

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA

PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

JUSTYNA KRZYŻANOWSKA

Związki fenolowe mięty długolistnej (*Mentha longifolia* L.)
i mięty pieprzowej (*Mentha × piperita* L.) rosnących w warunkach
polowych oraz w kulturach *in vitro*

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów
pod kierunkiem
prof. dr hab. Wiesława Oleszka

Puławy 2011

Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Wiesławowi Oleszkowi
za powierzenie tematu oraz pomoc okazaną przy realizacji niniejszej pracy.

Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Biochemii i Jakości Plonów
oraz z Zakładu Hodowli i Biotechnologii Roślin
za życzliwą współpracę i dobre rady.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
1. WSTĘP.....	9
1.1. Wprowadzenie.....	9
1.2. Rośliny lecznicze i ziołolecznictwo.....	10
1.2.1. Uprawa ziół i przetwórstwo zielarskie w Polsce.....	14
1.2.2. Charakterystyka rodzaju <i>Mentha</i>	18
1.3. Typy roślinnych kultur <i>in vitro</i>	26
1.3.1. Kultura kalusa.....	27
1.3.2. Kultura zawiesiny komórkowej.....	28
1.3.3. Kultura protoplastów.....	30
1.3.4. Kultura organów roślinnych.....	30
1.3.4.1. Kultura wierzchołków i pąków bocznych pędu.....	30
1.3.4.2. Kultura odciętych korzeni.....	31
1.3.5. Ko-kultury.....	31
1.3.6. Kultury genetycznie transformowanych organów.....	34
1.3.6.1. Kultury pędów (teratomy pędowe).....	34
1.3.6.2. Kultury korzeni transformowanych (włośnikowych).....	35
1.4. Roślinne kultury <i>in vitro</i> jako źródło metabolitów wtórnych.....	36
1.4.1. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach <i>in vitro</i>	37
1.4.2. Wpływ różnych czynników na biosyntezę związków bioaktywnych w kulturach <i>in vitro</i>	42
1.4.3. Metody zwiększenia produktywności w roślinnych kulturach <i>in vitro</i>	48
1.4.3.1. Stosowanie prekursorów biosyntezy.....	49
1.4.3.2. Elicytacja.....	51
1.4.3.3. Biotransformacja.....	54
1.4.3.4. Immobilizacja.....	56
1.5. Przemysłowa produkcja metabolitów wtórnych przez roślinne kultury <i>in vitro</i>	56
1.6. Kwas rozmarynowy - ważny składnik terapeutyczny surowców roślinnych.....	57
1.6.1. Produkcja kwasu rozmarynowego w kulturach <i>in vitro</i>	65
2. CEL PRACY.....	68
3. MATERIAŁY I METODY.....	69
3.1. Materiał roślinny.....	69
3.2. Wyodrębnianie frakcji fenolowej z części nadziemnych <i>Mentha longifolia</i>	70
3.2.1. Dobór rozpuszczalnika do ekstrakcji.....	70

3.2.2. Ekstrakcja.....	70
3.2.3. Oczyszczanie ekstraktu - ekstrakcja do fazy stałej (SPE).....	72
3.3. Rozdział frakcji fenolowej.....	73
3.4. Wyodrębnianie poszczególnych związków fenolowych.....	74
3.5. Chromatografia cienkowarstwowa.....	75
3.6. Ustalenie struktury wyizolowanych związków fenolowych.....	75
3.7. Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyizolowanych związków.....	76
3.7.1. Określenie zdolności zmiatania wolnych rodników metodą DPPH [•]	76
3.7.2. Określenie zdolności zmiatania wolnych rodników metodą ABTS ^{•+}	77
3.8. Pożywki stosowane w kulturach <i>in vitro</i>	79
3.8.1. Skład chemiczny pożywek.....	79
3.8.2. Przygotowanie pożywek.....	80
3.9. Sterylizacja pożywek, wody, szkła oraz narzędzi.....	81
3.10. Zakładanie i prowadzenie kultur <i>in vitro</i>	81
3.10.1. Sterylizacja nasion mięty, uzyskiwanie sterylnych siewek i roślin.....	81
3.10.1.1. Sterylizacja nasion mięty.....	81
3.10.1.2. Uzyskiwanie sterylnych siewek i roślin.....	82
3.10.2. Zakładanie i prowadzenie kultur kalusowych.....	82
3.10.2.1. Zakładanie kultur kalusowych z roślin pochodzących z hodowli <i>in vitro</i>	82
3.10.2.2. Zakładanie kultur kalusowych z liści roślin polowych.....	83
3.10.2.2.1 Sterylizacja liści mięty rosnącej w warunkach polowych.....	83
3.10.2.2.2. Indukcja kultur kalusowych.....	83
3.10.3. Zakładanie i prowadzenie kultur zawiesinowych.....	85
3.10.4. Filtracja zawiesin komórkowych.....	85
3.11. Określenie przyrostu świeżej i suchej masy zawiesiny komórkowej.....	87
3.12. Porównanie profili związków fenolowych <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i> w ekstraktach z roślin polowych w oraz różnych typach kultur <i>in vitro</i>	88
3.12.1. Przygotowanie próbek.....	88
3.12.2. Ekstrakcja.....	88
3.12.3. Oczyszczanie frakcji fenolowej z ekstraktu.....	89
3.12.4. Analizy chromatograficzne i spektrometryczne.....	91

3.13. Zabiegi biotechnologiczne zastosowane w celu zwiększenia syntezy kwasu rozmarynowego w zawiesinach komórkowych <i>M. piperita</i>	92
3.13.1. Materiał badań.....	92
3.13.2. Przygotowanie elicytorów.....	92
3.13.3. Procedura elicytacji.....	92
3.13.4. Analizy fitochemiczne.....	92
3.14. Dokumentacja fotograficzna.....	93
3.15. Analiza statystyczna wyników.....	93
4. WYNIKI I DYSKUSJA.....	94
4.1. Ekstrakcja i oczyszczanie związków fenolowych.....	94
4.1.1. Optymalizacja warunków ekstrakcji surowca.....	94
4.1.2. Oczyszczanie ekstraktu – ekstrakcja do fazy stałej (SPE)	94
4.2. Identyfikacja związków fenolowych w częściach nadziemnych <i>M. longifolia</i>	96
4.2.1. Analiza związków fenolowych metodą LC-MS.....	96
4.2.2. Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cieczowej z detekcją UV.....	103
4.3. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej wyizolowanych związków oraz ekstraktu <i>M. longifolia</i>	105
4.4. Kultury kalusowe <i>M. longifolia</i> oraz <i>M. piperita</i>	108
4.4.1. Sterylizacja nasion <i>M. longifolia</i> oraz <i>M. piperita</i>	108
4.4.2. Sterylizacja liści roślin <i>M. longifolia</i> oraz <i>M. piperita</i> rosnących w warunkach polowych.....	109
4.4.3. Wzrost i różnicowanie kalusa.....	109
4.4.3.1. Wpływ rodzaju eksplantatu wykorzystanego do zainicjowania kultury.....	109
4.4.3.2. Wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu na rozwój tkanki kalusowej.....	110
4.4.3.3. Wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu na syntezę metabolitów wtórnych w kulturach kalusowych <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	115
4. 5. Kultury zawiesinowe <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	117
4.5.1. Indukcja zawiesin komórkowych.....	117
4.5.2. Liczba agregatów w zawiesinie i ich morfologiczne zróżnicowanie.....	118
4.5.3. Charakterystyka wzrostu zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i>	123

4.5.4. Zmiany w akumulacji kwasu rozmarynowego w zawieszynie komórkowej <i>M. piperita</i> w czasie cyklu hodowlanego	125
4.6. Porównanie profili <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i> w ekstraktach z roślin polowych oraz w różnych typach kultur <i>in vitro</i>	128
4.7. Elicytacja zawiesin komórkowych <i>M. piperita</i>	138
4.7.1. Wpływ elicytorów na wzrost zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i>	139
4.7.2. Wpływ elicytorów na produkcję kwasu rozmarynowego.....	142
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	149
6. WYKAZ RYSUNKÓW UMIESZCZONYCH W PRACY.....	151
7. WYKAZ FOTOGRAFII UMIESZCZONYCH W PRACY.....	152
8. WYKAZ TABEL UMIESZCZONYCH W PRACY.....	153
9. LITERATURA.....	154

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

[M-H] ⁻	jon deprotonowany (deprotonated ion)
±S. D.	odchylenie standardowe (Standard Deviation)
2,4-D	kw. 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)
2D-NMR	dwuwymiarowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
2iP	6-{ γ- γ -dimetyloallilo -aminopuryna (6-{ γ - γ -dimethylallylamino}-purine)
ABTS	2,2-azynobis(3etylobenzotiazolino-6-sulfonian) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
BA	6-benzyloaminopuryna (6-benzylaminopurine)
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
EDTA	kw. etylenodiaminotetraoctowy (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ESI	elektrozpylenie (Electrospray Ionization)
ś. m.	świeża masa tkankowa (fresh weight)
s. m.	sucha masa tkankowa (dry weight)
GC	chromatografia gazowa (Gas Chromatography)
GC-MS	spektrometr mas sprzężony z chromatografem gazowym (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HCOOH	kw. mrówkowy (Formic Acid)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (High Performance Liquid Chromatography)
IAA	kw. indolilo-3-octowy (indole-3-acetic acid)
JA	kw. jasmonowy (Jasmonic Acid)
LC	chromatografia cieczowa (Liquid Chromatography)
LC-MS	spektrometr mas sprzężony z chromatografem cieczowym (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LOD	Granica Wykrywalności (Limit Of Detection)
LOQ	Granica Oznaczalności (Limit Of Quantification)
LS	pożywka Linsmaiera i Skooga (Linsmaier and Skoog medium)
m/v	% masowo-objętościowy (% mass/volume)
m/z	stosunek masy do ładunku (mass/charge ratio)
MeJA	metylowa pochodna kwasu jasmonowego (Methyl Jasmonate)
NAA	kw. naftylo-1-octowy (1-Naphthaleneacetic Acid)

NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
PDA	detektor fotodiodowy (Photodiode Detektor)
R ²	kwadrat współczynnika korelacji liniowej (coefficient of determination R ²)
rpm	liczba obrotów na minutę (rotation per minute)
SIM	monitoring wybranych jonów (Selective Ion Monitoring)
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (Solid Phase Extraction)
TEAC	ekwiwalent Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (Thin Layer Chromatography)
TQD	detektor mas typu potrójny kwadrupol (Tandem Quadrupole Detector)
Trolox	kwask 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,)
UPLC	Ultrasprawną Chromatografię Cieczową (Ultra Performance Liquid Chromatography)
v/v	% objętościowo-objętościowy (% volume/volume)
YE	ekstrakt drożdżowy (Yeast Extract)
SA	kwask salicylowy (Salicylic Acid)

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Rośliny wytwarzają szereg aktywnych biologicznie związków chemicznych tzw. metabolitów wtórnych. Nie odgrywają one istotnej roli w podstawowych procesach życiowych takich jak wzrost, różnicowanie, czy rozmnażanie, ale mogą spełniać inne ważne funkcje np. w interakcji roślina – środowisko [Wysokińska i Chmiel, 2006]. Do chwili obecnej poznano ponad 200 000 związków roślinnych o charakterze wtórnym [Fiehn, 2002; Hartmann, 2007]. Charakteryzuje je duża specyfika oraz wybiórczość w oddziaływaniu na organizmy. Są one bronią rośliny przed zagrożeniem jakie stanowią mikroorganizmy chorobotwórcze, pasożyty, owady, zwierzęta roślinożerne oraz rośliny konkurencyjne. Zawartość związków bioaktywnych w roślinach uzależniona jest od gatunku, odmiany, warunków środowiskowych (rodzaju gleby, nasłonecznienia, temperatury, ilości opadów), a także od położenia geograficznego [Smetanska, 2008]. Substancje te są w różny sposób klasyfikowane. Najczęściej jest to klasyfikacja oparta na strukturze chemicznej, często są one łączone w grupy związane biogenetycznie. Należą do nich: związki fenolowe, saponiny, olejki eteryczne, alkaloidy, sterole, terpeny, garbniki, kumaryny i inne [Fiehn, 2002; Hartmann, 2007].

Roślinne metabolity wtórne znalazły różnorodne zastosowanie w życiu człowieka. Wiele z nich jak np. związki fenolowe cechują właściwości prozdrowotne, wykazują one bowiem działanie antyoksydacyjne, antyalergiczne, przeciwzapalne, antibakteryjne, antywirusowe. Stabilizują błony komórkowe, chronią komórki przed promieniowaniem UV oraz wpływają na usprawnienie funkcjonowania układu krążenia. Właściwości te sprawiają, iż cieszą się one zainteresowaniem przemysłu spożywczego farmaceutycznego, a także kosmetycznego [Tapas i in., 2008; Lobo i in., 2010].

Aby sprostać rosnącemu zapotrzebowaniu na metabolity wtórne ważne jest opracowanie metod umożliwiających ich pozyskiwanie. Chemiczna synteza wielu z tych związków jest niemożliwa lub zbyt kosztowna do przeprowadzenia. Taką szansę stwarzają roślinne kultury *in vitro*. Praca z nimi umożliwia produkcję związków bioaktywnych w środowisku o kontrolowanych parametrach, niezależnie od uwarunkowań klimatycznych oraz glebowych. Ponadto negatywne oddziaływania mikroorganizmów oraz insektów, które wpływają na produkcję metabolitów wtórnych zostają wyeliminowane. Kultury *in vitro* okazały się być nieodzowne w przypadku

pozyskiwania związków bioaktywnych z gatunków zagrożonych wyginięciem lub gdy synteza chemiczna substancji jest nieopłacalna np. paklitaksel [Mulabagal i in., 2004; Mulabagal i Tsay, 2004]. Kultury *in vitro* umożliwiają ponadto zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych poprzez optymalizację warunków hodowli, jak również poprzez dodanie prekursorów szlaków metabolicznych lub elicytorów, które te szlaki aktywują.

1. 2. Rośliny lecznicze i ziołolecznictwo

Od połowy ubiegłego wieku obserwuje się na świecie, jak również i w Polsce wzrost zainteresowania ziołolecznictwem. Ma to związek, zwłaszcza w państwach rozwiniętych gospodarczo, z szerzeniem się chorób cywilizacyjnych, spadkiem naturalnej odporności na infekcje oraz wzrostem podatności na różnego rodzaju alergię. Wraz z rozwojem przemysłu spożywczego zwiększa się zapotrzebowanie na roślinne dodatki smakowe, zapachowe, konserwujące oraz prozdrowotne tzw. nutraceutyki, których źródłem są zioła [Kołodziej, 2010]. Zioła zawierają substancje biologicznie czynne, witaminy oraz mikroelementy niezbędne do zachowania właściwej równowagi fizjologicznej organizmu. Ponadto w roślinach substancje te występują grupowo, stąd ich działanie na organizm jest kompleksowe [Sanderski, 2009].

Wykorzystanie roślin w lecznictwie sięga zarania wieków. Rośliny lecznicze są ważną częścią naszej historii, kultury i tradycji. Sztuka leczenia roślinami wyszła z pierwotnego zielarstwa i w XX w. rozwinęła się w naukę o stosowaniu roślin leczniczych – fitoterapię. Pojęcie fitoterapii wprowadził francuski lekarz Henri Leclerc, a nazwa pochodzi od greckich słów *phyton* (roślina) oraz *therapeuo* (leczyć) i oznacza leczenie roślinami. Fitoterapia jest nauką medyczną zajmującą się zastosowaniem w terapii i profilaktyce środków leczniczych pochodzenia roślinnego, czyli surowców zielarskich lub substancji aktywnych farmakologicznie otrzymanych z roślin. Współczesna fitoterapia ma trzy źródła:

- tradycyjną medycynę narodową i ziołolecznictwo ludowe, etnobotanikę i farmakognozę;
- doświadczalną biologię molekularną, fitochemię, biochemię, farmakologię i toksykologię;
- farmakologię i farmakokinetykę kliniczną [Lamer-Zarawska i in., 2007].

Początki ziołolecznictwa są tak długie jak dzieje ludzkości. Człowiek poszukując roślin jadalnych, pozyskał również i te o specyficznym działaniu

i właściwościach jak np.: uśmierzanie bólu, regulowanie procesu trawienia, hamowanie krwawienia z ran, działanie pobudzające lub uspokajające, konserwowanie żywności lub barwienie tkanin. Wiele roślin, zwłaszcza o działaniu narkotycznym, stanowiło element obrzędów i praktyk religijnych. Już ludy pierwotne posiadały wiedzę o pewnych ziołach, znaleziska archeologiczne świadczą o tym, że człowiek neolitu posiadał już praktykę w leczeniu roślinami [Rumińska, 1973; Skarżyński, 1994; Sanderski, 2009]. W miarę rozwoju cywilizacji rozwijała się wiedza o właściwościach ziół. Przez stulecia była to wiedza tajemna, bliższa magii niż nauce. Zbieranie ziół było powiązane z rytuałami, a stosowanie leków roślinnych było obrzędem obfitującym w szereg zaklęć [Kiljańska i Mojkowska, 1988].

Środkowy Wschód jest kolebką cywilizacji, wiele uprawianych dzisiaj roślin zostało udomowionych w tym regionie. Sumerzy, Babilończycy i Asyryjczycy swoją wiedzę o ziołolecznictwie zapisali pismem klinowym na glinianych tabliczkach, których wiek datuje się na 4000 - 2600 r. p.n.e. Kilka roślin wymieniono także w Biblii, którą datuje się na ok. 1500 r. p.n.e. Sumerowie w lecznictwie stosowali m.in.: cebulę, czosnek, daktylę, jęczmień, sezam. Osiągnięcia Sumerów przejęli i kontynuowali Babilończycy i Asyryjczycy. Zнали oni około 250 surowców leczniczych pochodzenia roślinnego, które zażywano z miodem, oliwą, winem bądź mlekiem [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; van Wyk i Wink, 2008].

Ogromną wiedzę o ziołach posiadali starożytni Egipcjanie. W Egipcie, podobnie jak i w innych krajach Wschodu, cała wiedza i nadzór nad plantacjami roślin leczniczych znajdował się w rękach kapłanów. Wytwarzali oni olejowe wyciągi z ziół, mazidła i balsamy. Egipcjanie stosowali m.in. anyż, kolendrę, miętę, rącznik, mak, sezam, kminek. Wiedzę o dziejach egipskiego ziołarstwa czerpiemy głównie z papyrusu pochodzącego z ok. 1500 r. p.n.e., zwanego papyrusem Ebersa (nazwany tak od imienia egiptologa, który go odnalazł). Zawiera on 900 recept zalecanych przez egipskich kapłanów w przypadkach najróżniejszych chorób i dolegliwości [Rumińska, 1973; Lamer-Zarawska i in., 2007; Sanderski, 2009].

Podobnie stare i dobrze udokumentowane jest ziołolecznictwo Indii. Wiedza medyczna znajdowała się tam na wysokim poziomie, ale jednocześnie była wyjątkowo silnie związana z wierzeniami i obrzędami religijnymi. Już w III wieku p.n.e. w myśl zarządzenia władcy Asiokii uprawiano pewne gatunki roślin leczniczych. Europejczycy zawdzięczają Indiom wiele przypraw korzennych i leków, są to: pieprz, imbir, kardamon, gałka muszkatołowa, goździki, konopie, olej sezamowy i rycynowy.

Wzmianki o ziołach można znaleźć w świętej księdze Rigwedy (ok. 2000 r. p.n.e.) oraz późniejszej księdze Ayurwedy (ok. 1500 r. p.n.e.). Zawierają one bardzo dużo informacji o ziołach używanych w tamtych czasach [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Kiljańska i Mojowska, 1988; Lamer-Zarawska i in., 2007; Sanderski, 2009].

Początki medycyny naturalnej w Chinach sięgają 5000 lat wstecz. Wśród najwcześniejszych dokumentów dotyczących chińskiego ziołolecznictwa znajduje się zielnik chińskiego cesarza Shen-Nunga, zwanego ojcem chińskiego rolnictwa i lecznictwa (2800 r. p.n.e.). Zebrał on i ugruntował wiadomości na temat roślin leczniczych, które służyły do uzdrawiania ludzi, czyli przywracały zaburzoną przez chorobę równowagę jin-jang. Zioła podzielono na 3 klasy: książęcą (zioła podtrzymujące życie, nieszkodliwe dla organizmu), ministerską (zioła zwalczające ciężkie choroby i przywracające siły) oraz asystencką (zioła leczące pewne choroby, ale trujące i nie nadające się do stałego użytku). Współczesne lecznictwo zawdzięcza Chinom m.in.: korzeń rabarbaru i żeń-szenia, kamforę, efedrynę, a także herbatę [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Kiljańska i Mojowska, 1988; Lamer-Zarawska i in., 2007; van Wyk i Wink, 2008; Sanderski, 2009].

Wysoki poziom osiągnęło zielarstwo, a zwłaszcza ziołolecznictwo w Grecji. Było to związane z rozwojem nauki, a leczeniem zajmowali się nie tylko kapłani, ale uczeni i filozofowie. W tamtym okresie działali również tzw. korzeniokrajcy (rhizotomicy) zajmujący się zawodowo uprawą, zbiorem, suszeniem oraz przygotowywaniem ziół i mieszanek ziołowych. O licznych gatunkach roślin leczniczych znanych Grekom dowiadujemy się m.in. z zapisów Hipokratesa, Teofrasta, Dioscoridesa, Herodota, Hezjoda, Stracona i Peryplusa. *Corpus Hippocraticum* Hipokratesa zawiera opis 236 roślin leczniczych i prawie 300 surowców, natomiast *De Materia Medica* Dioscoridesa obejmuje opis około 600 roślin i leków roślinnych. Uważa się powszechnie, że książka ta była pierwszym w Europie zielnikiem i przez ponad 1000 lat stanowiła bazę większości późniejszych zielników. Ziołolecznictwo greckie wykorzystywało m.in.: krwawnik, bielun, lulek, bylicę, zimowit, rumianek, szafran, piołun, lukrecję, babkę, nagietek, koper, czosnek, mak polny, aloes, len, kolendrę, jaskółcze ziele, jałowiec [Rumińska, 1973; Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Skarżyński, 1994; Lamer-Zarawska i in., 2007; van Wyk i Wink, 2008; Sanderski, 2009].

Rzymianie niechętnie zajmowali się lecznictwem, pozostawiając tę dziedzinę wiedzy cudzoziemcom. Nie uprawiali ziół na większą skalę, ale był to ogromny rynek

zbytu roślin importowanych z różnych stron świata. W piśmiennictwie rzymskim (Katon, Vazzo, Pliniusz) spotykamy wzmianki o uprawie i stosowaniu ziół. Wybitną postacią tamtego okresu, która odegrała dużą rolę w rozwoju ziołolecznictwa oraz znajomości roślin leczniczych był Gallen (lekarz Marka Aureliusza). Podał on sposoby przyrządzania leków ziołowych, które przetrwały do naszych czasów pod nazwą preparatów galenowych [Rumińska, 1973].

Po upadku ośrodków naukowych w Grecji i Rzymie dużą rolę w rozwoju ziołarstwa odegrali Arabowie. Wprowadzili oni do uprawy wiele nowych roślin leczniczych, aromatycznych, przyprawowych, barwierskich i olejkowych. Zakładali plantacje tych roślin w krajach śródziemnomorskich, skąd poprzez klasztory chrześcijańskie (X – XI wiek) rośliny te rozpowszechniły się na terenie całej Europy. Poprzez medycynę arabską dostawały się do medycyny środkowoeuropejskiej elementy medycyny indyjskiej, egipskiej, perskiej, greckiej, rzymskiej. Arabowie wprowadzili także nowe formy leków: syropy, wody aromatyczne, spirytusy lecznicze, wzbogacili również asortyment leków wieloma roślinnymi surowcami indyjskimi (imbir, pieprz, cynamon, goździki) i chińskimi [Rumińska, 1973; Skarżyński, 1994].

Rośliny ziołarskie, podobnie jak wiele warzyw śródziemnomorskich w Europie, hodowano początkowo w ogrodach klasztornych. Za ich pośrednictwem wprowadzono w Europie środkowej, w tym również w Polsce po przyjęciu chrześcijaństwa, takie zioła jak: szałwia, tymianek, melisa, lawenda, hyzop, rozmaryn, malwa, ruta, kolendra. Z ogrodów klasztornych zioła przedostały się do siedzib magnackich, a potem do ogrodów szlacheckich i wiejskich [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Sanderski, 2009].

Dużym bodźcem dla rozwoju ziołarstwa były wyprawy odkrywcze. Ogromne znaczenie miało odkrycie przez Kolumba Ameryki (1492) oraz znalezienie przez Vasco da Gama drogi morskiej do Indii (1498). Powiększyło to asortyment roślin leczniczych, przyprawowych oraz jadalnych o nowe gatunki. Z Ameryki pochodzą: drzewo chinowe, drzewo balsamowe, krzew kokainowy, kakaowiec, ipekakuana, wanilia, papryka, ziemniak, kukurydza, tytoń i inne. Odkrycie drogi morskiej do Indii ułatwiło import wielu przypraw korzennych i leków azjatyckich oraz spowodowało obniżenie cen powyższych produktów [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Sanderski, 2009].

Przez wiele wieków ziołarstwo, botanika i medycyna przenikały się wzajemnie. W okresie Odrodzenia pojawiły się pierwsze drukowane zielniki i herbarze o charakterze encyklopedii ziołarskich. Stanowiły kompilację wiedzy autorów starożytnych jak i współczesnych. Zawierały one nie tylko opisy roślin, ale przede

wszystkim ich zastosowanie. Popularyzowały one znajomość roślin leczniczych, pełniły też funkcję poradników lekarskich [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Sanderski, 2009].

Nurtujące ludzkość pytanie o naturę substancji leczniczych zawartych w roślinach znalazło odpowiedź dzięki rozwojowi chemii analitycznej. W XVIII i XIX wieku poznano skład chemiczny ziół, wyizolowano z roślin szereg związków, określono ich strukturę, a także podjęto próby ich chemicznej syntezy. Otrzymane leki syntetyczne posiadały wiele zalet m.in.: ściśle określony skład chemiczny, możliwość dokładnego dozowania, wygodną w użyciu formę (krople, pigułki). Zioła i leki roślinne traktowane były z dużym sceptycyzmem. Ich stosowanie odeszło w zapomnienie, co więcej uznawanie leczniczych właściwości ziół było powszechnie uważane za objaw zacofania [Rumińska, 1973; Kiljańska i Mojowska, 1988; van Wyk i Wink, 2008; Sanderski, 2009].

Regres w ziołolecznictwie trwał dość długo. Miejsce preparatów ziołowych zajęły leki syntetyczne. Wiele z nich okazało się środkami o małej wartości terapeutycznej, powodowały liczne skutki uboczne, pewne preparaty okazały się substancjami szkodliwymi, a nawet toksycznymi (teratogenne, rakotwórcze) dla ludzkiego organizmu [Rumińska, 1973]. Ponadto pojawiły się szczepy lekooporne wielu bakterii jako skutek niekontrolowanego, masowego leczenia antybiotykowego [Davis, 1994; Service, 1995]. Nastąpił ponowny zwrot w terapii, zaczęto wracać do środków roślinnych i przypominać sobie dawne sposoby leczenia. Obecnie obserwujemy odrodzenie medycyny tradycyjnej, ponadto wiele krajów wspiera badania roślin leczniczych jako potencjalnego źródła nowych leków [van Wyk i Wink, 2008].

1.2.1. Uprawa ziół i przetwórstwo zielarskie w Polsce

Współczesne przetwórstwo zielarskie w Polsce obejmuje przede wszystkim produkcję leków roślinnych. Duże znaczenie gospodarcze ma również produkcja ziołowych środków spożywczych (suplementy diety, nutraceutyki) oraz kosmetyków naturalnych zawierających określone substancje pochodzenia roślinnego [Jambor, 2007; Mikołajczyk-Grzelak, 2008].

Polska jest krajem o dużym areale (Tabela 1) oraz potencjale w zakresie produkcji surowców zielarskich. Ogólna produkcja ziół w Polsce oceniana jest na około 20-22 tys. ton rocznie, a polski rynek produktów zielarskich oceniany jest na około 250 mln euro [Jambor, 2007].

Tabela 1. Powierzchnia upraw zielarskich w Krajach Unii Europejskiej

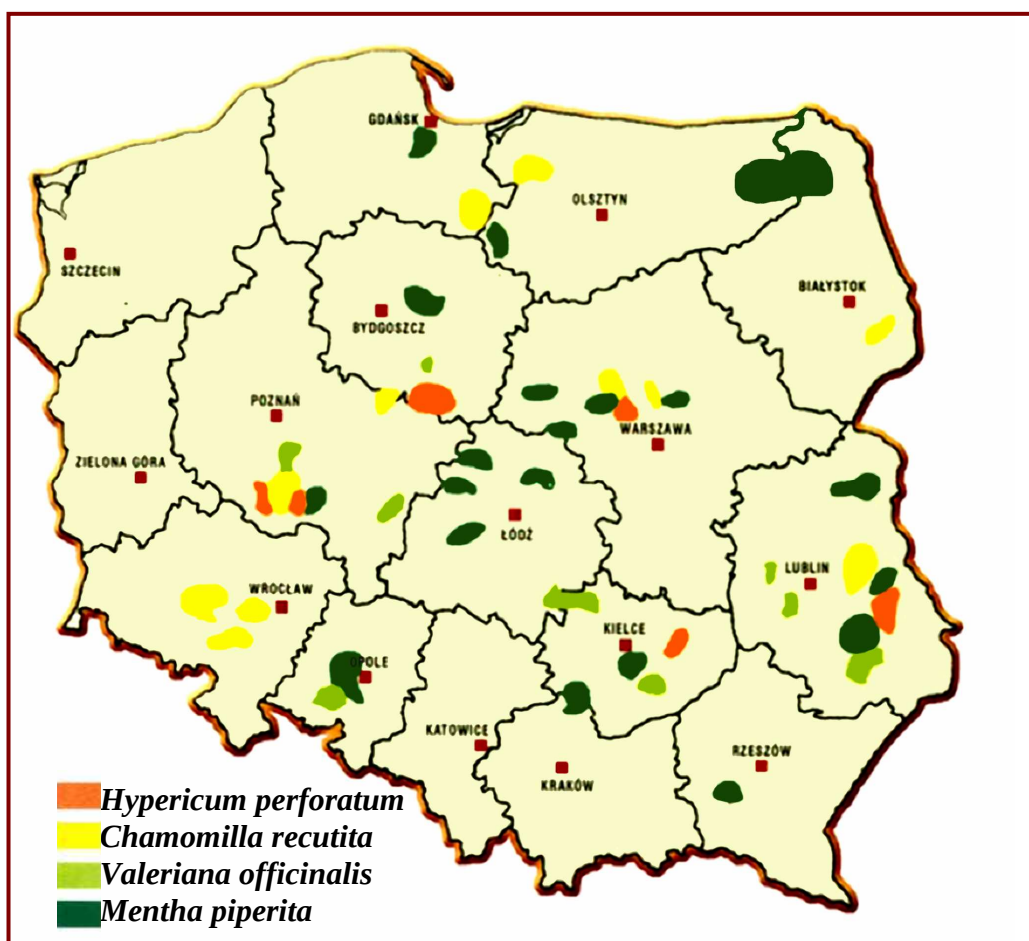
PANSTWA	POWIERZCHNIA UPRAW [ha]
Austria	4 300
Finlandia	1 900
Francja	25 000
Grecja	4 000
Hiszpania	19 000
Holandia	2 500
Irlandia	50
Niemcy	5 700
Polska	20 000
Wielka Brytania	2 000
Włochy	2 300

Źródło: Mikołajczyk-Grzelak N., (2008). Produkcja roślin zielarskich w Polsce. Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu 4: 272.

Najważniejszym źródłem pozyskiwania surowców zielarskich są uprawy polowe. Zioła zaczęto uprawiać na przełomie XIX i XX wieku. Jedne z pierwszych plantacji założono na Lubelszczyźnie w okolicy Krasnegostawu, a uprawianą tu rośliną była mięta [Kołodziej, 2010]. Obecnie łączna masa pozyskiwanych rocznie surowców z plantacji wynosi około 17 tys. ton. Plantacje roślin leczniczych zajmują w Polsce powierzchnię ponad 30 tys. hektarów, a w całej Europie plantacje te zajmują powierzchnię 70 tys. hektarów. Zioła uprawia w Polsce prawie 20 tys. gospodarstw rolnych, a w uprawie znajduje się ok. 70 gatunków roślin leczniczych. Do najważniejszych surowców zielarskich pozyskiwanych w Polsce zalicza się: kwiat rumianku pospolitego (*Chamomilla recutita*), liść mięty pieprzowej (*Mentha piperita*), korzeń kozłka lekarskiego (*Valeriana officinalis*) oraz owoc ostropestu plamistego (*Sylbium marianum*). Duże znaczenie mają też: ziele dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*), kwiat lipy (*Tilia spp.*), owoc aronii (*Aronia arbutifolia*) [Jambor, 2007]. W ostatnich dziesięcioleciach ukształtowały się w Polsce specyficzne rejony upraw zielarskich (Rys. 1), co umożliwia pozyskiwanie dużych partii surowca o jednolitej jakości.

Zioła pochodzące z Lubelszczyzny znane są z wysokiej jakości i cieszą się uznaniem w kraju i zagranicą. Dobre warunki klimatyczne i glebowe oraz stosunkowo niski poziom skażenia środowiska w tym rejonie Polski, korzystnie wpływają na wysoką jakość ziół. Na Lubelszczyźnie zioła uprawiane są na powierzchni ok. 3000 ha. Potentatem w uprawie ziół jest powiat krasnostawski, a zwłaszcza znajdująca się na jego terenie gmina Fajslawice specjalizująca się wyłącznie w uprawie ziół. Uprawia się tu m. in.: szalwię, melisę, mięte, tymianek, majeranek, oregano, cząber, arcydzięgiel,

lubczyk, kozłek lekarski, mniszek; mniejsze powierzchnie zajmują plantacje prawoślazu, bazylii, estragonu, kminku, kolendry i jeżówki. Teren powiatu bialskiego słynie z uprawy rumianku oraz mięty. W powiecie parczewskim uprawia się rumianek oraz mniejsze ilości mięty, melisy i kozłka lekarskiego. W powiecie świdnickim dominują uprawy tymianku, melisy, szalwii i majeranku. W powiatach puławskim, lubartowskim, zamojskim oraz biłgorajskim przeważa kozłek lekarski. Z uprawy rumianku słynie także powiat włodawski. Ponadto uprawia się tu babkę lancetowatą, rutę, malwę, dziurawiec, nagietek, wiesiołek, czarnuszkę [Kępka i Kwiatkowski, 2005].



Rys. 1. Rejony upraw zielarskich w Polsce. źródło: Jambor J., (2010) Lek roślinny – rynek technologia, rozwój. [http://www.fct.put.poznan.pl/wdg/wyklady/Jambor lek roslinny cz.1.pdf](http://www.fct.put.poznan.pl/wdg/wyklady/Jambor%20lek%20roslinny%20cz.1.pdf)

Zbiór ze stanu naturalnego jest nadal ważnym źródłem zaopatrzenia przemysłu zielarskiego w surowce. Ze stanowisk naturalnych pozyskuje się ok. 100 gatunków roślin leczniczych, a łączna masa pozyskiwanego surowca mieści się w granicach od 3 do 5 tys. ton rocznie. Obecne tendencje mają na celu maksymalne ograniczenie zbioru surowców ze stanowisk naturalnych a pozyskiwanie ich z upraw [Jambor, 2007].

Różnorodne formy pozyskiwania surowców zielarskich, różne pochodzenie geograficzne oraz różne chemotypy wpływają na znaczną niejednorodność poszczególnych partii surowca stosowanego w przetwórstwie. Stwarza to poważne problemy producentom preparatów ziołowych w otrzymaniu standaryzowanego produktu końcowego. Problem niejednorodności surowca może być rozwiązany przez rozwój kontrolowanych, wysoko wydajnych upraw roślin leczniczych. Ponadto jeżeli surowiec zielarski będzie przez plantatorów traktowany jak surowiec farmaceutyczny, a przetwórstwo zielarskie przyjmie cechy nowoczesnego przemysłu farmaceutycznego, Polska może stać się jednym z wiodących na świecie krajów w dziedzinie zielarstwa [Jambor, 2007; Mikołajczyk-Grzelak, 2008].

Na polskim rynku leków roślinnych największe znaczenie mają środki stosowane w chorobach i zaburzeniach przewodu pokarmowego (wyróżnia to polski rynek leków roślinnych od innych rynków europejskich) oraz środki tonizujące i wzmacniające. Leki takie, jak Sylimarol i Raphacholin od kilkadziesiątu już lat należą do najlepiej sprzedawanych leków. Profilaktyczne środki roślinne, które w wielu europejskich krajach wykazują rosnące znaczenie w pediatrii i geriatrii, w Polsce nie odgrywają większej roli. Polski rynek leków roślinnych ma szereg innych osobliwości. Istotne znaczenie, znacznie większe niż w innych krajach europejskich, mają preparaty aloesowe, jako leki o działaniu immunostymulującym oraz proste preparaty stosowane w chorobach serca i układu krążenia. Dużą rolę odgrywają preparaty ze świeżych roślin oraz ze sproszkowanych ziół [Jambor, 2007; Mikołajczyk-Grzelak, 2008].

Znajdujące się na polskim rynku leki pochodzenia roślinnego produkowane są w większości przez polskich producentów. Do największych producentów leków roślinnych należą: Herbapol Poznań i Herbapol Wrocław. Przedsiębiorstwa te wytwarzają wszystkie podstawowe formy leków roślinnych, od syropów do kapsułek. Największym producentem leczniczych herbat ziołowych jest Herbapol Lublin. Do czołówek polskich producentów leków roślinnych należą również: Hasco Lek, Aflofarm, Phytopharm, Biofarm oraz Labofarm [Jambor, 2007].

Rynek produktów ziołowych oferuje duży asortyment leków pochodzenia roślinnego o szerokim spektrum działania farmakologicznego. Surowce roślinne wykorzystuje się do izolacji związków aktywnych, ale również jako składniki specyfików ziołowych. Wiele gatunków rzadkich, niedostępnych lub zagrożonych wyginięciem roślin leczniczych może stać się łatwo dostępnym surowcem dla przemysłu farmaceutycznego dzięki kulturom *in vitro* [Thiem i Kikowska, 2008].

1.2.2. Charakterystyka rodzaju *Mentha*

Mięta, której nazwa pochodzi od łacińskiego *mentha* i greckiego *mintha* należy do najstarszych roślin leczniczych świata. Była znana już w starożytnym Egipcie i Chinach; jej opis zawarty jest w dziełach Dioskuridesa (I w. n.e.) i Pliniusza Starszego (23 – 79 r. n.e.) oraz w Nowym Testamencie. Jej właściwości lecznicze doceniali Hipokrates, Paracelsus oraz Awicenna. W czasach starożytnych rozpowszechniony był pogląd, że mięta pobudza mózg do lepszego myślenia, może dlatego uczniowie rzymskich filozofów nosili wianki ze świeżej mięty [Skarżyński, 1994; Kędzia, 2007].

Rodzaj mięta (*Mentha* spp.) należący do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*) obejmuje wiele gatunków oraz mieszańców międzygatunkowych, ich liczba była przedmiotem dyskusji przez wiele lat. Rozbieżności co do liczby gatunków wynikają z faktu, iż systematyka tego rodzaju dostarcza wielu trudności, zwłaszcza na poziomie gatunku. Problemy te są rezultatem rozprzestrzenienia gatunków na całym świecie, ich długiej historii uprawy, wysokiego polimorfizmu oraz występowania zjawiska krzyżowania się gatunków zarówno w populacjach rosnących dziko jak i hodowlanych [Voirin i in., 1999; Ali i in., 2002; Dorman i in., 2003; Jullien, 2007; Tucker i Naczi 2007]. Bazując na wynikach prac przeprowadzonych w ostatnich latach opartych o morfologiczne, cytologiczne oraz chemiczne markery wykazano, że rodzaj *Mentha* obejmuje 18 gatunków (*M. aquatica* L., *M. arvensis* L., *M. australis* R.Br., *M. canadensis* L., *M. cervina* L., *M. dahurica* Fisch. ex Benth., *M. diemenica* Spreng, *M. gattefossei* Maire, *M. grandiflora* Benth, *M. Japonia* (Miq.) Makino, *M. laxiflora* Benth. in DC, *M. longifolia* L., *M. pulegium* L., *M. repens* (J.D. Hook.) Briq., *M. requienii* Benth., *M. satureioides* R.Br., *M. spicata* L., *M. suaveolens* Ehrh) oraz 11 form mieszańcowych (*M. × carinthiaca* Host, *M. × dalmatica* Tausch, *M. × dumetorum* Schultes, *M. × gracilis* Sole, *M. × maximiliana* F.W. Schultz, *M. × piperita* L., *M. × rotundifolia* (L.) Huds, *M. × smithiana* R. Graham, *M. × verticillata* L., *M. × villosa* Huds, *M. × villosa-nervata* Opiz). Są one podzielone na cztery sekcje: *Pulegium*, *Tubulosae*, *Eriodontes*, *Mentha* [Tucker i Naczi 2007; Fialova i in., 2008].

Gatunki z rodzaju *Mentha* są rozpowszechnione na wszystkich kontynentach. Występują głównie w strefie umiarkowanej kontynentu Euroazjatyckiego, w Ameryce Północnej i Południowej, ale również w Australii i Afryce Południowej [Ali i in., 2002; Dorman i in., 2003; Baliga i Rao, 2010]. Do najważniejszych roślin uprawowych na

świecie należą: *M. piperita*, *M. arvensis* oraz *M. spicata*. Stanowią one główne źródło pozyskiwania olejku eterycznego [Ali i in., 2002; Gulluce i in., 2007]. Gatunki *Mentha spp.* to rośliny wieloletnie, preferujące stanowiska słoneczne do półcienistych oraz wilgotną, żyzną i bogatą w substancje odżywcze oraz wapń glebę. W takich warunkach rozwijają liczne kłącza i bujnie rosną [Sanderski, 2009; Kołodziej, 2010].

M. piperita ze względu na swój charakterystyczny smak i aromat jest najbardziej popularną rośliną wśród mięt. Została odkryta w 1696 roku w Anglii i bardzo szybko wprowadzona do uprawy. Jest alloheksaploidem ($2n=72$), naturalnym, spontanicznym mieszańcem międzygatunkowym *M. aquatica* L. ($2n=96$) oraz *M. spicata* L. ($2n=48$) [Isan i in., 2002; Tucker, 1992; McKay i Blumberg, 2006]. Jest rozmnażana głównie wegetatywnie, chociaż niektóre źródła podają że hybryda ta jest zdolna do wytwarzania kiełkujących nasion [Hornok, 1992].

M. longifolia jest uprawiana głównie w Europie, części Azji [Ali i in., 2002] oraz w Afryce Południowej [Asekun i in., 2007]. Jej liście są w krajach tropikalnych powszechnie stosowane do nacierania ciała w celu odstraszania moskitów, jak również w spichlerzach aby uchronić ziarno przed gryzoniami [Asekun i in., 2007].

Rośliny z rodzaju *Mentha spp.* były powszechnie znanym i cenionym środkiem medycyny ludowej wielu krajów [Shah i D'Mello, 2004; Jullien, 2007; Baliga i Rao, 2010]. Wykazują one szerokie walory lecznicze, są powszechnie stosowane przy wielu dolegliwościach związanych z układem pokarmowym. Zioło pobudza czynności wydzielnicze żołądka i wątroby, zwiększa produkcję soku żołądkowego oraz żółci ułatwiając tym samym trawienie i przyswajanie pokarmów [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Skarżyński, 1994; Lamer - Zarawska i in., 2007; Fialova i in., 2008; van Wyk i Wink, 2008; Sanderski, 2009; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010]. Miętę stosuje się w zaburzeniach trawienia [Lamer - Zarawska i in., 2007; Kędzia, 2007; van Wyk i Wink, 2008; Baliga i Rao, 2010], niżytych żołądka, dwunastnicy i jelit [Lamer-Zarawska i in., 2007; Kiljańska i Mojowska]. Używana jest w leczeniu zespołu jelita drażliwego oraz choroby Crohna [Shah i D'Mello, 2004]. Wykazuje działanie terapeutyczne przy dolegliwościach oraz schorzeniach wątroby, woreczka żółciowego oraz dróg żółciowych takich jak: kamica żółciowa, zapalenie pęcherzyka żółciowego i przewodów żółciowych, czy żółtaczką [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Kiljańska i Mojowska, 1988; Isan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Gulluce i in., 2007; Kędzia, 2007; van Wyk i Wink, 2008; Sanderski, 2009; Baliga i Rao, 2010]. To znane remedium na bóle brzucha, niestrawność [Shah i D'Mello, 2004; Vidal i in., 2007;

Baliga i Rao, 2010], wzdęcia [Iscan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Gulluce i in., 2007; Vidal i in., 2007; Fialova i in., 2008; van Wyk i Wink, 2008; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010], brak apetytu [Ożarowski i Jaroniewski, 1987; Kiljańska i Mojowska, 1988], bywa stosowana także w leczeniu anoreksji [Iscan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Gulluce i in., 2007]. Mięta niweluje nudności i mdłości, działa przeciwwymiotnie [Iscan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Gulluce i in., 2007; Vidal i in., 2007; Fialova i in., 2008; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010]. Wykazuje działanie rozkurczowe, obniża napięcie mięśni gładkich [Iscan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Vidal i in., 2007; Lamer-Zarawska i in., 2007; Fialova i in., 2008; Sanderski, 2009; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010], przynosi ulgę w kolce jelitowej [Kiljańska i Mojowska, 1988; Shah i D'Mello, 2004], skurczach żołądka [Vidal i in., 2007] i jelit [Fialova i in., 2008] oraz w bólach menstruacyjnych [Shah i D'Mello, 2004; Vidal i in., 2007]. Wykazuje działanie chemoprewencyjne [Fialova i in., 2008]. Badania potwierdziły profilaktyczne działanie mięty w indukowanej sztucznie karcenogenezie torby policzkowej u chomików [Samman i in., 1998] oraz guzów płuc u myszy [Kumar i in., 2004]. Działa antyseptycznie [Fialova i in., 2008; Kołodziej, 2010], przeciwzapalnie [Iscan i in., 2002; Gulluce i in., 2007; Vidal i in., 2007; Fialova i in., 2008; Sanderski, 2009; Kołodziej, 2010]. Jest pomocna w nieżytach górnych dróg oddechowych (inhalacje) [Iscan i in., 2002; Shah i D'Mello, 2004; Gulluce i in., 2007; Lamer-Zarawska i in., 2007; van Wyk i Wink, 2008; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010], w leczeniu przeziębień [Skarżyński, 1994], wykazuje działanie napotne [Iscan i in., 2002; Gulluce i in., 2007; Sanderski, 2009; Kołodziej, 2010]. Działa przeciwwirusowo [Fialova i in., 2008], przeciwbakteryjnie [Dorman i in., 2003; Bupesh i in., 2007; Vidal i in., 2007; Fialova i in., 2008; Baliga i Rao, 2010] i przeciwgrzybowo [Vidal i in., 2007]. Napary z mięty wykazują słabe działanie uspokajające [Fialova i in., 2008; Sanderski, 2009; Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010], hipotensyjne [Baliga i Rao, 2010; Kołodziej, 2010], przeciwbólowe [Skarżyński, 1994; Iscan i in., 2002; Gulluce i in., 2007; Fialova i in., 2008; Sanderski, 2009] oraz moczopędne [Fialova i in., 2008; Sanderski, 2009]. Niektóre źródła podają, że działa również jako afrodyzjak [Fialova i in., 2008].

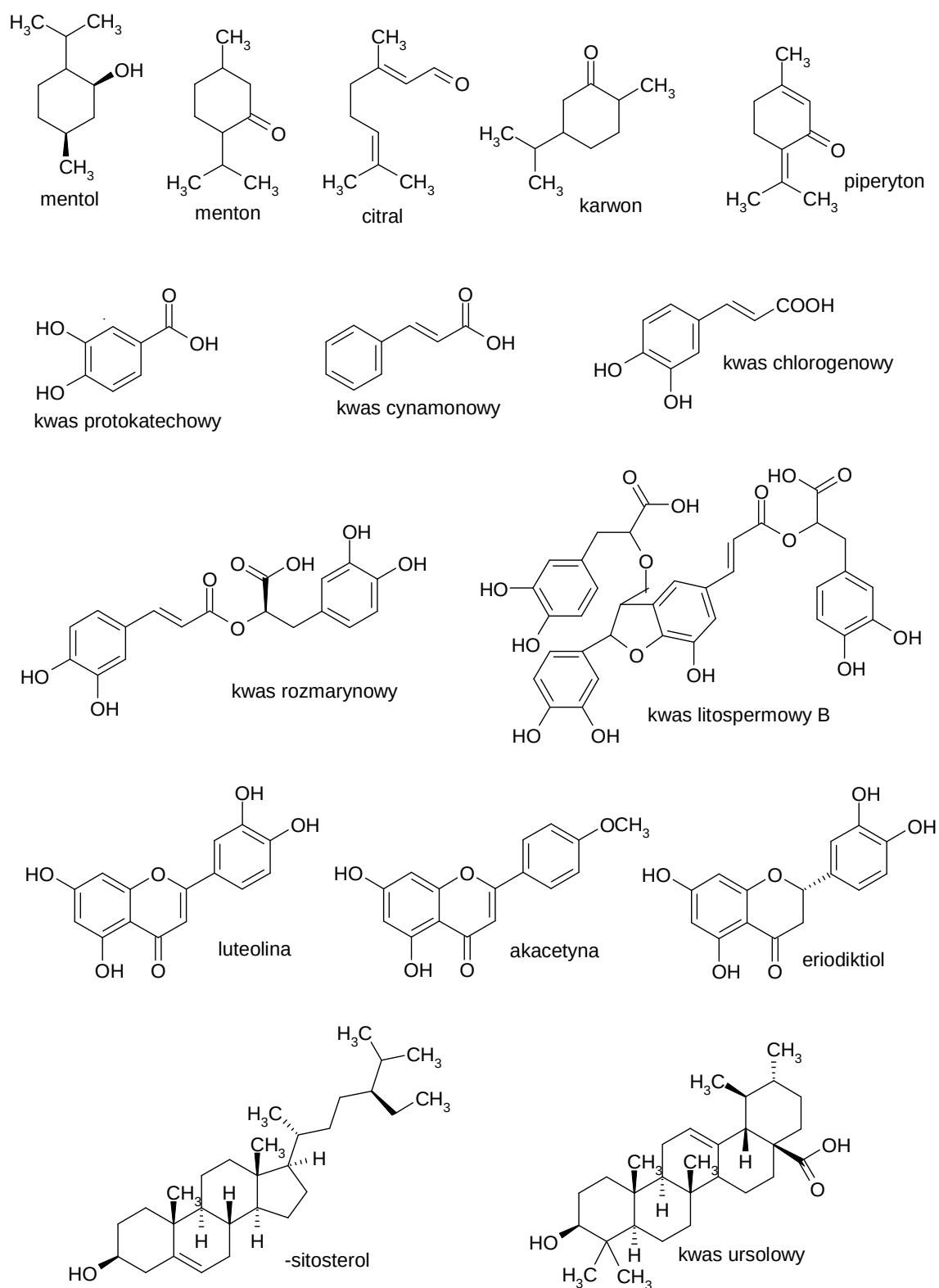
Liście mięty są stosowane w kuchni wielu narodów, poprawiają smak i aromat przygotowywanych potraw. Dodaje się je do sałatek, gotowanych ziemniaków, sosów, farszów, mięs. To dzięki nim tłuste i ciężkostrawne dania są łatwiej trawione. Ponadto znanym i popularnym we wszystkich rejonach świata napojem chłodzącym i orzeźwiającym jest herbata miętowa [Skarżyński, 1994; Asekun i in., 2007].

Ziele mięty, jak również olejek miętowy znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Są wykorzystywane w przemyśle spożywczym do produkcji wyrobów cukierniczych, napojów chłodzących, mieszanek przyprawowych, gum do żucia oraz wyrobów alkoholowych: miętowych wódek i likierów [De Vincezi i in., 1991; Kothari i Singh, 1995; Areias i in., 2001; Moreno i in., 2002; Asekun i in., 2007; Gulluce i in., 2007; Kołodziej, 2010]. Są surowcem dla przemysłu farmaceutycznego, wchodzi w skład wielu mieszanek, preparatów ziołowych i leków, są to m.in.: Normosan, Nervosan, Digestosan, Tannosan, Nerwogran, Normogran, Cholagran, Gastrogran, Gastrosan-fix, Gastronervit, Regulavit, Cholavit, Gastrovit, Hepatina, Cholagowar, Regulatex-fix, Mentaflor, Laxaflos, Pediflos, Mentisana, Herbogastrol oraz Raphacholin [Skarżyński, 1994; Kędzia, 2007; Sanderski, 2009; Kołodziej, 2010]. Znalazły również zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, jako składnik płynów do płukania jamy ustnej, past do mycia zębów, chłodzących i relaksujących maserek do twarzy, kremów, balsamów i szamponów [Kiljańska i Mojowska, 1988; Skarżyński, 1994; Kołodziej, 2010] oraz w przemyśle perfumeryjnym i tytoniowym do produkcji niektórych gatunków papierosów [Kołodziej, 2010]. Wiele gatunków funkcjonuje jako rośliny ozdobne: *M. pulegium*, *M. requienii*, *M. suaveolens* [Wiersema i León, 1999].

Wszystkie gatunki *Mentha* spp. wytwarzają szeroką gamę metabolitów wtórnych, są to m.in.: olejki eteryczne, flawonoidy, kwasy fenolowe, triterpeny, karotenoidy, garbniki. To właśnie ich obecność warunkuje wspomniane wcześniej tak liczne właściwości lecznicze mięty. Strukturę chemiczną części z nich prezentuje Rys.2. Metabolity wtórne *Mentha* spp. były przedmiotem wielu badań, wyizolowano szereg związków aktywnych z różnych gatunków i odmian [Areias i in., 2001; Ali i in., 2002; Kędzia, 2007; Fialova i in., 2008; Baliga i Rao, 2010]. Głównym składnikiem olejku miętowego jest mentol, ponadto występują: menton, mentofuran, octan mentolu, walerianian mentolu, pulegon, izopulegon, piperyton, piperytenon, felandren, pinen, cyneol, limonen, myrcen, karwon, linalol, dihydrokarwon, geraniol, eugenol, kamfen, kadinen, tujon, jasmon oraz w mniejszych ilościach obecne są stereoizomery mentonu i mentolu – izomenton, neomentol, izomentol, neoizomentol oraz ich octany. Mentol oraz octan mentolu są właśnie odpowiedzialne za niekiedy ostrą, odświeżającą woń, natomiast menton, mentofuran i pulegon charakteryzuje słabszy zapach. Śladowe ilości jasmonu poprawiają jakość olejku [Guido i in., 1997; Ali i in., 2002; Mimica-Dukić i in., 2003; Shah i D'Mello, 2004; McKay i Blumberg, 2006; Asekun i in., 2007; Baliga i Rao, 2010]. *Mentha* spp. zawierają również liczne flawonoidy (Tabela 2): akacetynę,

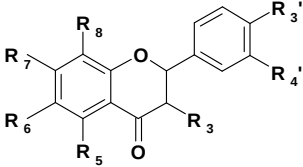
apigeninę, chryzoeriol, diosminę, diosmetynę, dezmetylonobiletynę, eriocytrynę, genkwaninę, gardeninę B i D, hesperydynę, hesperidozyd, isoroifolinę, izoorientynę, ksantomikrol, linarynę, luteolinę, mentozyd, narirutyne, nodifloretynę, rutynę, salwigeninę, tymoninę, tymuzynę [Guedon i Pasquier 1994; Zaidi i in., 1998; Voirin i in., 1999; Areias i in., 2001; Inoue i in., 2002; Sharaf i in., 1999; Shah i D'Mello, 2004; McKay i Blumberg, 2006; Mimica-Dukić i Bozin, 2008; Baliga i Rao, 2010; Olennikov i Tankhaeva, 2010]. Każdy gatunek mięty cechuje się jednak obecnością związków specyficznych (Tabela 3). W przypadku *M. spicata* wykazano obecność tymoniny, tymuzyny, sideritoflawonu oraz krizilineolu [Sankara-Subramanian i Nair 1972; Voirin i in., 1999; Mimica-Dukić i Bozin, 2008]. Dla *M. aquatica* są to: gardenia B, pebrelina i salwigenina [Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i in., 1999; Mimica-Dukić i Bozin, 2008]. *M. citrata* cechuje się obecnością: pebreliny, salwigeniny oraz gardeniny B [Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i in., 1999; Mimica-Dukić i Bozin, 2008]. Zdolność biosyntezy metabolitów charakterystycznych gatunkowo może być wykorzystana jako dodatkowy czynnik przy określaniu przynależności systematycznej hybryd oraz mieszańców międzygatunkowych gatunków dziko rosnących [Voirin i in., 1999]. Spośród kwasów fenolowych w rodzaju *Mentha* wykazano obecność: kwasu kawowego, chlorogenowego, rozmarynowego i protokatechowego oraz ich pochodnych [Guedon i Pasquier 1994; Shah i D'Mello, 2004; Baliga i Rao, 2010]. Ponadto występują triterpeny jak: skwalen, α -amyryna, kwas ursolowy [Shah i D'Mello, 2004].

Zawartość oraz kompozycja metabolitów wtórnych jest ściśle skorelowana z oddziałującymi czynnikami środowiskowymi jak temperatura, fotoperiod, stres wodny, nawożenie, zasolenie gleby, wiek rośliny, dużą rolę odgrywa także czas zbioru. Wszystkie te oddziaływania wpływają na skład jakościowy surowca jakim jest ziele mięty [Shah i D'Mello, 2004; Telci i Sahbaz, 2005; McKay i Blumberg, 2006]. Aby stale otrzymywać porcje jednorodnego pod względem chemicznym materiału roślinnego podjęto szereg prac nad hodowlą mięty bądź otrzymywaniem jej metabolitów wtórnych w warunkach hodowli *in vitro*. Drogą mikrorozmnażania otrzymano sadzonki wielu gatunków [Rech i Pires, 1986; Ravishankar i Venkatarman, 1988; Holm i in., 1989; Chaput i in., 1996; Phatak i Heble, 2002; Dhawan i in., 2003], podjęto również prace nad biosyntezą metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* [Aviv i Gulan, 1978; Aviv i in., 1983]. Niektóre wymienione tu badania szerzej opisane zostaną w kolejnych rozdziałach.



Rys. 2. Metabolity wtórne *Mentha* spp. Źródło: Baliga i Rao, 2010. Radioprotective potential of mint: a brief review. J Can Res Ther 6(3): 257.

Tabela 2. Flawonoidy *Mentha* spp.

FLAWONOID								
		R-podstawienie						
		3	5	6	7	8	3'	4'
1	ksantomikrol	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	OH
2	gardenina D	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
3	5-O-dezmetylnobiletyna	-	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
4	sideritoflawon	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
5	gardenina B	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃
6	5,6-dihydroksy-7,8,3',4'-tetrametoksyflawon	-	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
7	newadensyna	-	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	OCH ₃
8	haemenoksyna	-	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
9	mentokubanon	-	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
10	dimetoksysudachidyna	-	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	OH
11	5-hydroksy-6,7,3',4'-tetrametoksyflawon	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃	OCH ₃
12	eupatoryna	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	-	OH	OCH ₃
13	5-hydroksy-6,7,4'-trimetoksyflawon	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	-	-	OCH ₃
14	hesperetyna	-	OH	-	OH	-	OCH ₃	OH
15	luteolina	-	OH	-	OH	-	OH	OH
16	7-O-rutynozyd luteoliny	-	OH	-	O-Rut	-	OH	OH
17	7-O-glukozyd diosmetyny	-	OH	-	O-Glc	-	OH	OCH ₃
18	7-O-rutynozyd apigeniny	-	OH	-	O-Rut	-	-	OH
19	7-O-glukozyd apigeniny	-	OH	-	O-Glc	-	-	OH
20	7-O-glukozyd akacetyny	-	OH	-	O-Glc	-	-	OCH ₃
21	apigenina	-	OH	-	OH	-	-	OH
22	7-O-rutynozyd hesperetyny	-	OH	-	O-Rut	-	OCH ₃	OH
23	3'-hydroksy-5,6,7,4'-tetrametoksyflawon	-	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	OH	OCH ₃
24	akacetyna	-	OH	-	OH	-	-	OCH ₃
25	7-O-glukozyd luteoliny	-	OH	-	O-Glc	-	OH	OH
26	7-O-glukuronian luteoliny	-	OH	-	O-Glc	-	OH	OH
27	7-O-rutynozyd akacetyny	-	OH	-	O-Rut	-	-	OCH ₃
28	7-O-rutynozyd eriodiktiolu	-	OH	-	O-Rut	-	-	OCH ₃
29	kwercecytyna	OH	OH	-	OH	-	OH	OH
30	tymonina	-	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
31	5,6,4'-trihydroksy-7,3'-dimetoksyflawon	-	OH	OH	OCH ₃	-	OCH ₃	OH
32	5,7,3'-trihydroksy-4'-metoksyflawon	-	OH	-	OH	-	OH	OCH ₃
33	diosmetyna	-	OH	-	OH	-	OH	OCH ₃
34	diosmina	-	OH	-	O-Rut	-	OH	OCH ₃
35	hesperydyna	-	OH	-	O-Rut	-	OH	OCH ₃
36	8-metoksykirsilineol	-	OH	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
37	salwigenina	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	-	-	OCH ₃
38	5-O-dezmethylotangeretyna	-	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-
39	5,6,7,4'-tetrametoksyflawon	-	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	-	OCH ₃

Glc - glukoza

Glc - kwas glukuronowy

Rut - rutynozyna

Źródło: Mimica-Dukić i Bozin, 2008. *Mentha* L. Species (Lamiaceae) as Promising Sources of Bioactive Secondary Metabolites. Curr Pharm Des 14(29): 3146.

Tabela 3. Występowanie związków fenolowych w *Mentha* spp.

Związek	Nazwa zwyczajowa	<i>Mentha aquatica</i>	<i>Mentha citrata</i>	<i>Mentha longifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha suaveolens</i>
5,6,4'-trihydroksy-7,8,3'-trimetoksyflawon	tymonina			Tomas-Barberan i in., 1988; Bourwieg i Pohl, 1973	Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992	Tomas-Barberan i in., 1988; Sankara-Subramanian i Nair, 1972	Tomas-Barberan i in., 1988
5,6,4'-trihydroksy-7,8-dimetoksyflawon	tymuzyna				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,4'-dihydroksy-6,7,3'-trimetoksyflawon	kirsilineol					Voirin i in., 1999	
5,4'-dihydroksy-6,7,8,3'-tetrametoksyflawon		Voirin i in., 1999					
5,6-dihydroksy-7,8,3',4'-tetrametoksyflawon					Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,6- dihydroksy -7,8,4'-trimetoksyflawon	pebrelina				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,7,4'-trihydroksy-6,3'-dimetoksyflawon	jakeosidyna						
5,7,4'- trihydroksy -6-metoksyflawon	hispidulina						
5,7- dihydroksy -6,4'-dimetoksyflawon	pektolinarigenina						
5,6-dihydroksy-7,4'-dimetoksyflawon	ladaneina				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,6,4'-trihydroksy-7-metoksyflawon	sorbifolina				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,6,3',4'-tetrahydroksy-7-metoksyflawon	pedalityna						
5,6,4'-trihydroksy-7,3'-dimetoksyflawon				Tomas-Barberan i in., 1988; Bourwieg i Pohl, 1973		Tomas-Barberan i in., 1988; Sankara-Subramanian i Nair, 1972	Tomas-Barberan i in., 1988
5,6-dihydroksy-7,3',4'-trimetoksyflawon					Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5-hydroksy-6,7,3',4'-tetrametoksyflawon							
5-hydroksy-6,7,4'-trimetoksyflawon	salwigenina		Passannanti i in., 1990		Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,6,7,4'-tetrahydroksy-3'-metoksyflawon	nodifloretyna						
5,4'- dihydroksy-6,7,8-trimetoksyflawon	ksantomikrol				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5-hydroksy-6,7,8,4'-tetrametoksyflawon	gardenia B		Passannanti i in., 1990		Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,3',4'-trihydroksy-6,7,8-trimetoksyflawon	sideritoflawon				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,3'-dihydroksy-6,7,8,4'-tetrametoksyflawon	gardenina D				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5-hydroksy-6,7,8,3',4'-pentametoksyflawon	5-O-dezmetylnobiletyna				Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,7,4'-trihydroksyflawon	apigenina	Tomas-Barberan i in., 1988; Burzanska-Hermann i in., 1977			Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawon	akacetyna	Tomas-Barberan i in., 1988; Burzanska-Hermann i in., 1977		Tomas-Barberan i in., 1988; Bourwieg i Pohl, 1973	Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,7,3',4'-tetrahydroksyflawon	luteolina	Tomas-Barberan i in., 1988; Burzanska-Hermann i in., 1977			Tomas-Barberan i in., 1988; Voirin i Bayet, 1992		
5,7,3'-trihydroksy-4'-metoksyflawon	diosmetyna					Tomas-Barberan i in., 1988; Sankara-Subramanian i Nair, 1972	
5,7,4'-trihydroksy-3'-metoksyflawon	chryzoeriol						
5,4'-dihydroksy-7-metoksyflawon	genkwanina						
5,6,7,4'-tetrametoksyflawon			Passannanti i in., 1990				

Źródło: Zaidi i in., 1998. Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pelugium* and *Mentha suaveolens* (Labiatae). Phytochemistry 48(6): 992.

1.3. Typy roślinnych kultur *in vitro*

Kultury *in vitro* są alternatywną metodą dla tradycyjnej uprawy polowej roślin. Poprzez termin kultury *in vitro* rozumiemy hodowle roślin, częściej są to niewielkie fragmenty organów roślinnych prowadzone na syntetycznych pożywkach o określonym składzie w warunkach sterylnych. Pożywki zawierają odpowiedni zestaw makro- i mikroelementów, witamin, aminokwasów (dodawane opcjonalnie) oraz źródło węgla jakim najczęściej jest sacharoza. Wzrost i rozwój roślinnych kultur *in vitro* zależy od dodatku do pożywki regulatorów wzrostu: auksyn i cytokinin. Podłoża mogą być płynne bądź zestalone agarem, agarozą, gerlitem czy alginianem. Opracowane zostały liczne podłoża hodowlane umożliwiające prowadzenie różnych rodzajów kultur *in vitro* [Gamborg i in., 1976; George i in., 2008; Eibl i Eibl, 2009; Neumann i in., 2009].

Kultury *in vitro* odgrywają ważną rolę w badaniach podstawowych, głównie z dziedziny fizjologii, biochemii oraz biologii molekularnej roślin. Posiadają wiele zalet w porównaniu do uprawy tradycyjnej, są to m.in.: kontrolowane warunki hodowli, umożliwiające otrzymanie jednorodnego materiału, niezależnienie od warunków klimatycznych, wyeliminowanie niekorzystnych oddziaływań środowiskowych wpływających na produkcję metabolitów wtórnych (mikroorganizmy, insekty). Kultury *in vitro* są alternatywną drogą dla produkcji roślinnych metabolitów wtórnych, które znalazły zastosowanie jako farmaceutyki, substancje zapachowe i aromatyzujące, barwniki, dodatki do żywności oraz biopestycydy. Możliwe jest wyselekcjonowanie roślin lub linii komórkowych charakteryzujących się wysoką produktywnością metabolitów oraz zwiększenie produkcji związków aktywnych biologicznie poprzez dodanie prekursorów lub elicytację. Optymalizacja warunków hodowli pozwala obniżyć koszty produkcji biofarmaceutyków *in vitro*. Ponadto kultury tkankowe umożliwiają wyselekcjonowanie roślin o danym fenotypie lub genotypie, doskonalenie i pozyskiwanie nowych odmian, otrzymanie roślin wolnych od wirusów, mnożenie roślin nie wytwarzających nasion oraz ochronę gatunków zagrożonych wyginięciem [Mulabagal i Tsay 2004; Vanisree i in., 2004; Pietrosiuk i Furmanowa, 2006; Nasim i in., 2010]. Należy zaznaczyć, że kultury *in vitro* mogą syntetyzować nowe związki, nie wykryte dotychczas w świecie roślin [Smetanska, 2008]. Dane literaturowe podają, że z kultur *in vitro* wyizolowano oraz określono strukturę 322 nowych związków. Większość należała do terpenoidów (100), alkaloidów (72) i fenoli (144). Najwięcej nowych związków wyizolowano z kultur zawiesinowych [Wysokińska i Chmiel, 2006].

1.3.1. Kultury kalusa

Tkanka kalusowa w warunkach *in vivo* powstaje w wyniku mechanicznego uszkodzenia rośliny, jej wytwarzanie mogą wywołać mikroorganizmy oraz owady żerujące na roślinie. W kulturach *in vitro* możliwe jest zainicjowanie tworzenia tej tkanki przy wykorzystaniu dowolnego organu rośliny, jednak niektóre organy tworzą kalus łatwiej w porównaniu do eksplantatów pobranych z innej części [George i in., 2008]. Proces tworzenia tkanki kalusowej stymuluje się wykładając eksplantaty (listki, łodyżki, korzenie bądź organy generatywne) na pożywki inicjujące zawierające regulatory wzrostu: auksyny i cytokiny. Kultury kalusowe są prowadzone głównie jako powierzchniowe kultury agarowe, są pasażowane na świeże pożywki co 3-6 tygodni. W trakcie prowadzenia kultury, tkanka kalusowa może przystosować się do wzrostu bez obecności regulatorów, jest to tzw. zjawisko habituacji [Zenkteler 1984; Bhojwani i Razdan, 1996; George i in., 2008; Loyola-Vargas i in., 2008; Eibl i Eibl, 2009].

Kalus to stale dzieląca się, niezróżnicowana histologicznie oraz niezorganizowana, mająca wygląd bezpostaciowej masy tkanka. Tkanka kalusowa jest zbudowana z komórek parenchymatycznych o różnym kształcie i wielkości. Kalus może mieć strukturę luźną i łatwo się rozpadać w trakcie pasażu lub zbitą i wtedy trudno oddzielić go od eksplantatu pierwotnego. Sytuacja ta jest wynikiem stopnia adhezji międzykomórkowej i zależy od liczby, wielkości i rozmieszczenia przestworów międzykomórkowych. Barwa kalusa może być jednolita, biała, kremowa, żółta, od jasno- i ciemnozielonej do różnych odcieni czerwieni i fioletu (Rys. 3.). Tworząca się tkanka kalusowa, nawet w obrębie tego samego eksplantatu może wykazywać obecność sektorów o zróżnicowanej strukturze oraz zabarwieniu [Loyola-Vargas i in., 2008; Eibl i Eibl, 2009; Ekiert, 2009].



Rys. 3. Barwa i struktura tkanki kalusowej, a- kultura kalusowa *Fagopyrum esculentum* Moench; b- kultura kalusowa *Mentha x piperita* L.; c- kultura kalusowa *Glycine max* (L.) Merr. (badania własne Zakładu Biochemii i Jakości Plonów oraz Zakładu Hodowli i Biotechnologii Roślin IUNG-PIB)

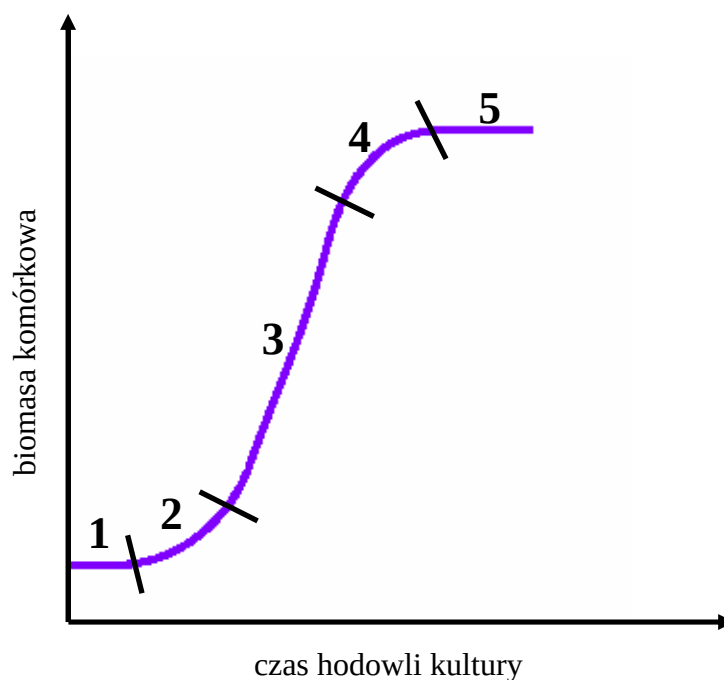
Kalus pod względem genetycznym jest tkanką niestabilną. Często mogą występować w nim zmiany liczby jak i struktury chromosomów. Procesy te nasilają się w miarę upływu czasu i starzenia się kultury [Stefaniak, 2007; Eibl i Eibl, 2009].

Tkanka kalusowa jest zespołem komórek totipotencjalnych, możliwe jest więc regulowanie organogenezą w kulturach kalusa głównie poprzez proporcję auksyn do cytokinin w pożywce. W centrach merystematycznych utworzonych w kalusie mogą powstać korzenie przybyszowe, pędy, liście oraz przybyszowe zarodki (zarodki somatyczne). Kultury kalusowe są często wykorzystywane w badaniach nad różnicowaniem się komórek i morfogenezą [George i in., 2008; Neumann i in., 2009]. Są również stosowane do mikrorozmnażania wielu roślin ozdobnych. Przy rozmnażaniu roślin z udziałem tkanki kalusowej istnieje możliwość wystąpienia zmian somaklonalnych, czyli uzyskania roślin zmienionych genetycznie. Proces ten jest często wykorzystywany przez hodowców do otrzymania nowych odmian, zwłaszcza roślin ozdobnych [Pietrosiuk i Furmanowa, 2006]. Kultury kalusowe są wykorzystywane jako źródło do pozyskiwania wtórnych metabolitów roślinnych (Tabela 4). Hodowany przez wiele lat kalus może wykazywać zdolność do syntezy metabolitów wtórnych na bardzo wysokim poziomie. Akumulacja izoflawonów w 25-letnich kulturach kalusowych *Glycine max* osiągnęła wartość 46,3 mg g⁻¹ s.m. [Federici i in., 2003]. Kalus stanowi również materiał wyjściowy do uzyskania kultur zawiesin komórkowych.

1.3.2. Kultura zawiesiny komórkowej

Do zainicjowania kultur zawiesinowych najczęściej wykorzystuje się tkankę kalusową, którą przenosi się do pożywki płynnej i poddaje wytrząsaniu uzyskując w ten sposób rozproszenie grudek kalusa. Istotne znaczenie odgrywa tutaj struktura kalusa oraz ilość tkanki tzw. inokulum [George i in., 2008; Eibl i Eibl, 2009]. Jako pierwsi technikę zakładania i prowadzenia kultur zawiesinowych opisali Muir i wsp. w roku 1954 [van Gulik i in., 2001]. W zawiesinie komórkowej pojedynczym komórkom towarzyszą różnej wielkości agregaty komórkowe, zbudowane z kilku do kilkudziesięciu komórek, czasami ich średnica może osiągnąć nawet kilka mm. Dlatego aby otrzymać jednorodną zawiesinę komórkową powszechnie stosuje się jej frakcjonowanie [Ibaraki i Kenji, 2001; Bourgaud i in., 2001]. Na wielkość agregatów komórkowych wpływają regulatory wzrostu, wysokie stężenie auksyn w stosunku do

cytokinin wpływa na ich rozdrobnienie, jednocześnie może być jednak przeszkodą dla produkcji metabolitów wtórnych [George i in., 2008].



Rys. 4. Modelowa krzywa wzrostu zawiesiny komórkowej

Ponieważ pobieranie składników odżywczych w kulturach zawiesinowych jest ułatwione, podziały komórkowe następują z większą częstotliwością i przyrosty biomasy są znacznie większe niż w przypadku kultur kalusowych. Przebieg wzrostu każdej kultury zawiesinowej ma swoisty charakter, jest mniej lub bardziej zbliżony do krzywej wykładniczej i możemy w nim wyróżnić następujące fazy: (Rys. 4)

- faza spoczynkowa tzw. lag (1) przygotowanie do podziałów, minimalny przyrost komórek;
- faza wykładnicza, ekspotencjalna (2), przyrost komórek jest bardziej wyraźny;
- faza wzrostu logarytmicznego (3), wzrost liczby komórek jest prawie liniowy;
- faza obniżonego tempa wzrostu (4), spada liczba i tempo podziałów;
- faza stacjonarna (5) liczba komórek utrzymuje się na stałym poziomie lub obniża się [Bhojwani i Razdan, 1996; Stefaniak, 2007].

1.3.3. Kultura protoplastów

Protoplast to komórka roślinna pozbawiona ściany komórkowej. Izolowanie protoplastów przeprowadza się głównie metodami enzymatycznymi stosując celulazy, hemicelulozy czy pektynazy. Podstawowym warunkiem prawidłowej izolacji oraz efektywności prowadzonych kultur jest zapewnienie żywotności protoplastów. Żywy protoplast po przeniesieniu na odpowiednią pożywkę odtwarza ścianę komórkową i rozpoczyna podziały mitotyczne. Kultury protoplastów są wykorzystywane do badań biochemicznych, modyfikacji genetycznych oraz do fuzjonowania, czyli łączenia z protoplastami z innych komórek. Proces ten umożliwia otrzymywanie tzw. mieszańców somatycznych, roślin powstałych w wyniku fuzji protoplastów komórek somatycznych pochodzących od osobników różnych gatunków [Rout i in., 2000; Davey i in., 2005; George i in., 2008; Loyola-Vargas i in., 2008; Neumann i in., 2009; Aoyagi, 2010].

1.3.4. Kultura organów roślinnych

Niska wydajność, a czasami brak zdolności do biosyntezy niektórych metabolitów w kulturach zawiesinowych często jest wynikiem braku zróżnicowanych struktur. Problem ten można wyeliminować stosując kultury organów, również transformowanych [Wysokińska i Chmiel, 2006].

1.3.4.1. Kultura wierzchołków i pąków bocznych pędu

Fragmenty merystemów (0,2-1,0 mm długości) izoluje się z pąków wierzchołkowych lub bocznych. Po przeniesieniu na pożywkę eksplantaty rozwijają się w pojedyncze ukorzenione rośliny. Ten typ kultury jest powszechnie wykorzystywany do regeneracji roślin wolnych od wirusów. Duże stężenie cytokinin w pożywce stymuluje merystem do proliferacji, w rezultacie w obrębie eksplantatu tworzą się liczne nowe zawiązki pąków [Stefaniak, 2007]. Ciekawym rozwiązaniem jest prowadzenie kultur pędów, które tylko czasowo zraszane są pożywką (tzw. Temporary Immersion System). Ten typ kultur *in vitro* znalazł zastosowanie w mikropropagacji roślin. Ważne w tym przypadku są zarówno czas trwania oraz częstość zraszania pędów pożywką. Rośliny rozmnażane tym sposobem charakteryzują się większą żywotnością,

oraz aklimatyzują się lepiej niż te na pożywkach półpłynnych czy płynnych [Etienne i Berthouly, 2002]. System TIS został wykorzystany m.in. do rozmnażania: *Lavandula officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus*, *Fabiana imbricata*. Ponadto zawartość metabolitów wtórnych w tych roślinach była wyższa w porównaniu do odpowiednich kultur zawiesinowych bądź kultur kalusowych [Wilken i in., 2005].

1.3.4.2. Kultura odciętych korzeni

Jako eksplantaty do założenia kultur stosowane są wierzchołki korzeni głównych oraz bocznych. Kultury *in vitro* izolowanych wierzchołków korzeni wykorzystuje się w badaniach mechanizmów reakcji odpornościowych roślin na zakażenia nicieniami, wzrostu grzybów mikoryzowych, procesu infekcji bakteryjnej. Służą one ponadto do regeneracji oraz namnażania roślin, ponieważ cechują się dużą stabilnością genetyczną [Stefaniak, 2007].

1.3.5. Ko-kultury

Nowatorskim podejściem do produkcji roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* jest prowadzenie tzw. ko-kultur. Metoda ta zakłada iż w jednym naczyniu hodowlanym rosną kultury dwóch gatunków roślin lub dwóch typów kultur jednego gatunku. Mogą to być: kultury korzeni włóśnikowatych, kultury korzeni i pędów, ale również kultury mikroorganizmów i organów roślinnych bądź organów roślinnych, czy korzeni włóśnikowatych i zawiesin komórkowych. W takim systemie metabolity jednej z kultur mogą stanowić substraty dla biosyntezy metabolitów przez drugą kulturę [Ekiert, 2009; Weathers i in., 2010].

Jako pierwsi technikę tę zaproponowali Subroto i wsp. w roku 1996. Badacze otrzymali ko-kulturę teratom pędowych i korzeni włóśnikowatych *Atropa belladonna* (transformacja *Agrobacterium tumefaciens* szczepem T37). Ko-kultura ta wykazała zdolność biokonwersji hioscyjminy w skopolaminę, cechowała ją najwyższa produkcja skopolaminy oraz najwyższy stosunek skopolaminy do hioscyjminy wynoszący 1,9:1. Teratomy pędowe w ko-kulturze akumulowały w biomasie do 0,84 mg g⁻¹ s.m. skopolaminy tj. 3-11 razy więcej niż znajduje się w liściach rośliny macierzystej. Co ważne, gdy kultura transformowanych pędów rosła bez obecności korzeni włóśnikowatych (kontrola) w ogóle nie wytwarzała skopolaminy [Subroto i in., 1996].

Model składający się z kultury korzeni transformowanych *Ammi majus* L. i kultury pędów *Ruta graveolens* L. wykorzystano w celu otrzymania furanokumaryn. Porównano produkcję furanokumaryn: ksantotoksyny i bergaptenu oraz ich glikozydów w niezależnych kulturach *A. majus* i *R. graveolens* oraz w ko-kulturze rosnących na świetle bądź w ciemności. Ko-kultura korzeni transformowanych *Ammi majus* i pędów *Ruta graveolens* rosnących na świetle nagromadziła 2,6 razy więcej ksantotoksyny ($38,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) w porównaniu do kultury pędów ($14,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$). Analogicznie w ko-kulturze rosnącej w ciemności poziom ksantotoksyny był 1,7 razy większy niż w kulturze pędów *R. graveolens* i wyniósł $25,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$ [Sidwa-Gorycka i in., 2003].

Łuczkiwicz i Kokotkiewicz opisały ko-kulturę pędów i korzeni włośnikowatych *Genista tinctoria* L. stanowiącą źródło izoflawonów. W ko-kulturze transformowane korzenie wytwarzały znaczną ilość uwalnianej do pożywki izolikwiritigeniny ($24,73 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) będącej prekursorem daidzeiny. Pędy pobierały ten związek, a następnie przeprowadzały jego biokonwersję do daidzeiny i finalnie do daidzyny. Rezultatem biokonwersji była produkcja daidzeiny wynosząca $16,47 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$, synteza była 38 razy większa niż w prowadzonych niezależnie kulturach pędowych (kontrola). Pędy rosnące w ko-kulturze wytwarzały ponadto nieznacznie większą ilość genisteiny ($69,41 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$) i jej pochodnych w porównaniu do kontroli $66,40 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$ [Łuczkiwicz i Korotkiewicz, 2005].

Ko-kultura korzeni włośnikowatych *Lepidium flaum* oraz zawiesiny komórkowej *Podophyllum hexandrum* były wykorzystane do otrzymywania podofilotoksyny. Korzenie włośnikowate *L. flaum* stanowiły źródło koniferyny, która z kolei była metabolizowana przez komórki zawiesiny *P. hexandrum* do podofilotoksyny. Porównując produkcję tego związku w kulturach zawiesinowych *P. hexandrum* oraz jego produkcję w ko-kulturze obu gatunków zaobserwowano bardzo wysoki wzrost poziomu syntezy o 240% w przypadku ko-kultur rosnących w wytrząsanych kolbach oraz o 72% gdy hodowlę ko-kultury prowadzono w 2 L bioreaktorze. Naukowcy wykazali ponadto, że stała dostępność koniferyny w pożywce jest czynnikiem ograniczającym syntezę podofilotoksyny w ko-kulturze [Lin i in., 2003]. Do pozyskiwania podofilotoksyny zastosowano również zawiesinę komórkową *Linum album* hodowaną w ko-kulturze z żywymi komórkami grzybów: *Piriformospora indica* lub *Sebacina vermifera*. Największą produkcję podofilotoksyny zaobserwowano w przypadku ko-kultury z *P. india* – grzybnia dodana w stężeniu 1 g L^{-1} , 11 dnia hodowli zawiesiny *L. album*. Koncentracja podofilotoksyny wynosiła 102 mg L^{-1} i była

3,6 razy większa w stosunku do kontroli, także o 7,4 razy zwiększona została synteza metoksypodofilotoksyny, wynosiła ona $13,7 \text{ mg L}^{-1}$. W przypadku ko-kultury z *S. vermifera* największą syntezę lignanów odnotowano gdy grzybnię inokulowano 11 dnia hodowli zawiesiny *L. album* w stężeniu $2,5 \text{ g L}^{-1}$. Synteza podofilotoksyny wynosiła 112 mg L^{-1} i była prawie 4-krotnie większa w odniesieniu do kontroli, podobnie zwiększona była też produkcja metoksypodofilotoksyny o 7,6 razy i wynosiła 14 mg L^{-1} . W przypadku obu ko-kultur produkcja lignanów zmniejszała się gdy wydłużano czas ich hodowli (48 i 72 godziny). Doświadczenie to potwierdziło możliwość wykorzystania żywych komórek grzybów do stymulacji produkcji metabolitów wtórnych w kulturach zawiesinowych. W dotychczasowych pracach wykorzystywano homogenaty lub filtry kultury grzybowych [Baldi i in., 2008].

Li i wsp. otrzymali ko-kulturę zawiesiny komórkowej *Taxus chinensis* var. *mairei* oraz jego endofitycznego grzyba *Fusarium mairei*. Poprzez optymalizację warunków hodowli ko-kultury otrzymano znaczący wzrost produkcji paklitakselu, który znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu wielu nowotworów. Synteza tego taksonu wynosiła $25,63 \text{ mg L}^{-1}$ i była ona aż o 38 razy większa w porównaniu do zawiesiny komórkowej rosnącej niezależnie – $0,68 \text{ mg L}^{-1}$ [Li i in., 2009].

Jako źródło pozyskiwania metabolitów wtórnych otrzymano ko-kulturę korzeni *Panax ginseng* oraz *Echianacea purpurea* inicjowane w różnych proporcjach: 4:1, 3:2 i 2:1. Wyniki doświadczenia nie przyniosły jednak pożądanego rezultatu, w ko-kulturze obserwowano negatywny wpływ korzeni *E. purpurea* na wzrost korzeni *P. ginseng*, ponadto otrzymana ko-kultura nie wytwarzała metabolitów wtórnych na zadowalającym poziomie. Dopiero elicytacja ko-kultury zwiększyła produkcję ginsenozydów, jak również pochodnych kwasu kawowego [Wu i in., 2008].

Metoda ko-kultury jest nową drogą pozyskiwania metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, a przytoczone powyżej eksperymenty potwierdzają zasadność jej stosowania. Metoda ta wymaga jednak przezwyciężenia wielu trudności m.in.: należy opracować odpowiednie proporcje kultury jednego gatunku lub typu do drugiego, pożywki hodowlane powinny umożliwić optymalny wzrost komórek, a warunki hodowli ko-kultury powinny sprzyjać gromadzeniu się metabolitów, duże znaczenie może mieć również rodzaj naczynia lub typ bioreaktora w którym hodowana jest ko-kultura [Weathers i in., 2010].

1.3.6. Kultury genetycznie transformowanych organów

Pod koniec lat 80-tych XX wieku otrzymano kultury genetycznie transformowanych organów. Kultury te cechuje szybsze tempo wzrostu i osiągają one znacznie wyższe przyrosty biomasy w porównaniu z kulturami organów nietransformowanych. Kultury organów transformowanych obejmują kultury pędów tzw. teratomy pędowe i kultury korzeni transformowanych nazywanych korzeniami włóśnikowatymi lub transgenicznymi [Wysokińska i Chmiel, 2006].

1.3.6.1. Kultury pędów (teratomy pędowe)

Kultury transformowanych pędów otrzymuje się poprzez transformację tkanek roślinnych niektórymi szczepami *Agrobacterium tumefaciens*. W tym celu najczęściej wykorzystywane są oktopinowe i nopalinowe szczepy z genem izopentylotransferazy (gen *ipt*). Produkt tego genu zmienia w komórkach stosunek auksyn do cytokinin, w wyniku czego na eksplantatach powstaje tkanka tumorowa. Z tkanki tej regenerują się pędy, jednakże ich morfologia jest zmieniona w porównaniu z pędami normalnymi [Bourgauud i in., 2001; Wysokińska i Chmiel, 2006].

Dotychczas teratomy pędowe otrzymano dla niewielkiej liczby roślin. Uzyskano je m.in. dla *Atropa belladonna* oraz hybrydy *Duboisia leichnardi* × *D. myoporoides*. Kultury te wykazywały zdolność biotransformacji alkaloidów tropanowych, przeprowadzały biokonwersję hioscyjminy w skopolaminę [Subroto i in., 1996]. Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach transformowanych pędów może przewyższać ich syntezę w stosunku do roślin nietransformowanych. Teratomy pędowe *Solanum dulcamara* syntetyzowały glikoalkaloidy w ilości 1% suchej masy i wartość ta była pięć razy większa w stosunku do rośliny macierzystej. W kulturach teratomów obserwowano również zmianę profilu wytwarzanych związków, jako główne metabolity powstawały glikozydy solasodyny: solamargina oraz solasonina, natomiast w roślinach nietransformowanych dominującym związkiem był tetraozyd soladulcydyny [Ehmke i in., 1995]. Produkcja związków bioaktywnych może również osiągać dużo niższą wydajność. Teratomy *Artemisia annua* syntetyzowały artemizynę na poziomie 0,06% suchej masy, hodowle *in vitro* pędów nietransformowanych wytwarzały ten związek w ilości 0,02% [Ghosh i in., 1997]. Obie te wartości są jednak dużo niższe w porównaniu do zawartości artemizyny w liściach rośliny macierzystej,

gdzie stanowi ona 1% suchej masy [Wysokińska i Chmiel, 2006]. Podobnie teratomy pędowe *Pimpinella anisum* wytwarzały nieznacznie mniej olejku eterycznego niż pędy nietransformowane. Ich zawartość była jednak 9 razy niższa niż w liściach rośliny macierzystej [Salem i Barry, 1995].

1.3.6.2. Kultury korzeni transformowanych (włośnikowatych)

Kultury korzeni włośnikowatych otrzymuje się w wyniku transformacji tkanek roślinnych szczepami *Agrobacterium rhizogenes*. Wynikiem tego procesu jest integracja fragmentu plazmidu Ri (T-DNA) z komórki bakteryjnej z genomem komórki roślinnej. W wyniku ekspresji zawartych w tym fragmencie DNA genów (m.in. rol genów a, b, c, d) na eksplantacie, w miejscu zakażenia dochodzi do powstania korzeni przybyszowych. Korzenie te po oddzieleniu od eksplantatu oraz eliminacji bakterii mogą rosnąć bez dodatku regulatorów wzrostu [Bourgaud i in., 2001; Wysokińska i Chmiel, 2006; Georgiev i in., 2007a; Guillon i in., 2006; Guillon i in., 2008].

Na powodzenie procesu transformacji składa się wiele czynników. Efektywność transformacji zależy przede wszystkim od genotypu *A. rhizogenes* (poziomu wirulencji), interakcji zachodzącej pomiędzy komórkami bakteryjnymi a roślinnymi, gęstości inokulum, genotypu transformowanej rośliny, użytego eksplantatu oraz zdolności eksplantatu do regeneracji po transformacji. Ważne są również: sposób wykonania inokulacji, warunki prowadzenia ko-kultury oraz metoda eliminacji bakterii *Agrobacterium* z kultur transformowanych [Giri i Narasu, 2000; Wasilewska i Królicka, 2005; Georgiev i in., 2007a; Guillon i in., 2006; Guillon i in., 2008].

Korzenie transformowane wykazują wiele cech różniących je od naturalnie występujących korzeni. Charakteryzuje je rozrost korzeni bocznych, ich plagiotropizm, brak przyrostu wtórnego i geotropizmu. W przeciwieństwie do kultur kalusowych czy zawieszinowych, kultury korzeni włośnikowych charakteryzują się stabilnością genetyczną i mogą utrzymywać wydajną biosyntezę metabolitów wtórnych podczas długotrwałego pasażowania (Tabela 4). Produkcja metabolitów w tych kulturach jest zbliżona lub wyższa niż w korzeniach rośliny macierzystej [Giri i Narasu, 2000; Bourgaud i in., 2001; Wasilewska i Królicka, 2005; Hu i Du, 2006; Kuzovkina i Schneider, 2006; Wysokińska i Chmiel, 2006; Georgiev i in., 2007a; Guillon i in., 2006; Guillon i in., 2008].

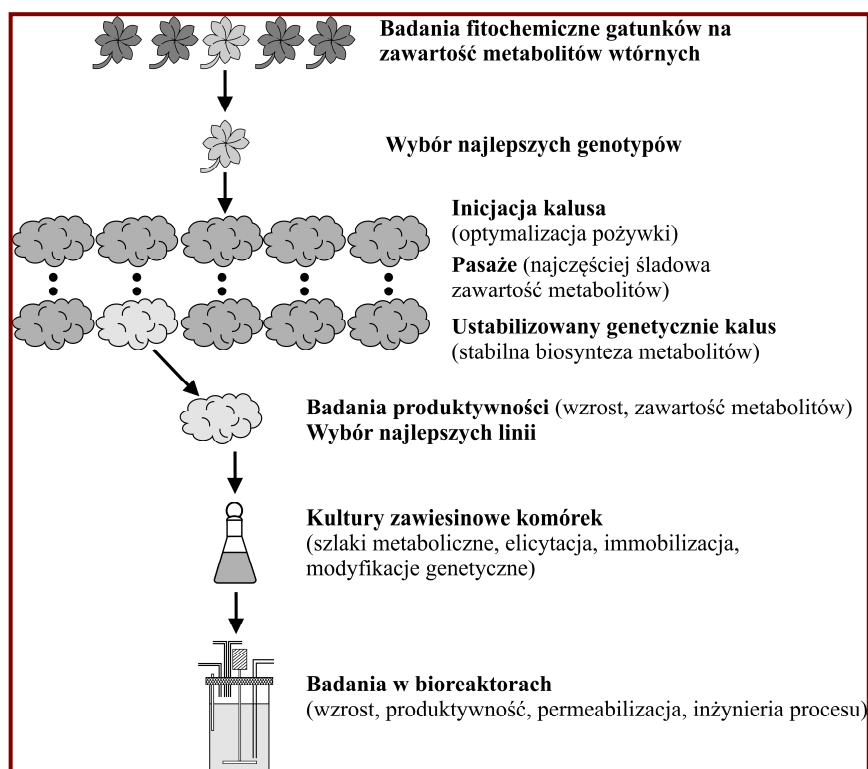
1.4. Roślinne kultury *in vitro* jako źródło metabolitów wtórnych

Tradycyjnym źródłem pozyskiwania metabolitów wtórnych dla przemysłu farmaceutycznego, spożywczego i innych są rośliny pochodzące z uprawy polowej, jak również te ze stanowisk naturalnych. Zawartość związków bioaktywnych w roślinach jest raczej niska (często stanowią one poniżej 1% suchej masy) i zmienna, gdyż ich synteza uzależniona jest od warunków środowiska oraz od fazy rozwojowej rośliny. Niedogodnością może być również ograniczona dostępność surowca roślinnego, w wielu przypadkach ważne dla człowieka związki pochodzą z roślin rzadko występujących, chronionych lub rosnących tylko w określonych strefach klimatycznych. Powyższe fakty przemawiają za wykorzystaniem metod biotechnologicznych do wytwarzania cennych metabolitów roślinnych [Wysokińska i Chmiel, 2006]. Pomimo pewnych wad, jak np. akumulacja pożądaných związków aktywnych w krótkim okresie hodowli kultury zawieszinowej, czy zmienność somaklonalna roślinne kultury *in vitro* umożliwiają pozyskiwanie wielu metabolitów wtórnych charakteryzujących się często antywirusowymi, antybakteryjnymi, przeciwrakowymi, przeciwzapalnymi, uspokajającymi oraz immunomodulacyjnymi właściwościami [Vanisree i in., 2004]. Szczególnie cenne są m.in.: winkrystyna, winblastyna, kamptotecyna, podophyllotoksyna, taksol i inne [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Mulabagal i Tsay, 2004; Sarin, 2005; Naredo, 2007; Karuppusamy, 2009; Vijaya i in., 2010]. Otrzymane tą drogą metabolity wtórne mogą następnie zostać wykorzystane jako dodatki do żywności: substancje wzbogacające i poprawiające smak, zapach oraz barwę, a także jako nutraceutyki i farmaceutyki [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska, 2008; Neumann i in., 2009].

Z ekonomicznego punktu widzenia wykorzystanie kultury *in vitro* do produkcji metabolitów wtórnych warunkowane jest zapotrzebowaniem rynku na określony związek oraz wydajnością samej techniki *in vitro* tzn. ilością uzyskanej substancji w przeliczeniu na suchą masę [Oleszek, 2009].

Zenk i wsp. w 1997 roku zaproponowali metodę postępowania mającą na celu zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, jest ona powszechnie stosowana do dzisiaj. Jej składowe elementy to: badania fitochemiczne roślin na zawartość związków bioaktywnych, wykorzystanie najlepszego chemotypu do założenia kultury kalusa, badania biochemiczne uzyskanych kultur kalusowych oceniające ich zmienność i produktywność, wyprowadzenie kultury zawieszinowej

z najlepszej kultury kalusa, analiza poziomu metabolitów wtórnych w zawieszinie komórkowej, wyselekcjonowanie linii komórkowych w oparciu o pojedyncze komórki, analiza stabilności kultury oraz zwiększenie jej produktywności przy zastosowaniu różnych metod: elicytacja, dodanie prekursorów szlaków metabolicznych, immobilizacja [Kirakosyan i in., 2009]. Rys. 5 przedstawia etapy postępowania przy pozyskiwaniu metabolitów wtórnych z kultur *in vitro*.



Rys. 5. Metody biotechnologiczne uzyskiwania roślinnych kultur *in vitro* do produkcji metabolitów wtórnych; źródło: Oleszek W. (2009) Roślinne substancje biologicznie aktywne i ich biosynteza w kulturach *in vitro*. w: Malepszy S. (red.) Biotechnologia roślin str. 136 Wydawnictwo Naukowe PWN.

1.4.1. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*

Pierwsze kultury *in vitro* otrzymano w latach 30-tych XX wieku, a pierwszy patent dotyczący wykorzystania kultur *in vitro* do produkcji metabolitów wtórnych przyznano w 1956 roku. Obecnie kultury *in vitro* są wykorzystywane zarówno do poznawania metabolizmu komórek, biochemii czy genetyki oraz stanowią źródło pozyskiwania cennych dla człowieka związków bioaktywnych [Smetanska, 2008].

Wiele metabolitów roślinnych akumulowanych jest w kulturach w większej koncentracji niż ma to miejsce w roślinach macierzystych, m.in. ajmalicina w kulturach *Catharanthus roseus* [Lee i Shuler, 2000], antrachinony w kulturach *Morinda citrifolia*

[Zenk i in., 1975], berberyina w kulturach *Coptis japonica* [Fujita i Tabata, 1987], kwas kawowy w kulturach *Vanilla planifolia* [Knorr i in., 1993], ginsenozydy w kulturach *Panax ginseng* [Matsubara i in., 1989], kwas rozmarynowy w kulturach *Coleus blumei* [Petersen i Simmonds, 2003], szikonina w kulturach *Lithospermum erythrorhizon* [Kim i Chang, 1990], koenzym Q w kulturach *Nicotiana tabacum* [Fujita i Tabata, 1987].

Metabolity wtórne pozyskiwane metodą *in vitro* są szczególnie cennym surowcem dla przemysłu farmaceutycznego. Największym zainteresowaniem cieszą się substancje wykazujące aktywność przeciwnowotworową. Należą do nich alkaloidy: winblastyna i winkrystyna syntetyzowane w kulturach *Catharanthus roseus*, taksol pozyskiwany z kultur *Taxus brevifolia*, *Taxus cuspidata* oraz *Taxus baccata*, artemizyna akumulowana w kulturach *Artemisia annua*, kamptotecyna otrzymywana w kulturach *Camptotheca acuminata*, galantamina syntetyzowana w kulturach *Galanthus nivalis* oraz podofilotoksyna pozyskiwana z kultur *Podophyllum hexandrum* [Vanisree i in., 2004]. Duża uwaga poświęcona jest również związkom o właściwościach przeciwutleniających. Stres oksydacyjny jest wiodącym czynnikiem w rozwoju chorób układu krążenia, nadciśnienia, chorób neurodegeneracyjnych, chorób nowotworowych, artretyzmu oraz procesu starzenia się [Shahidi i Chandrasekara, 2010]. Antyoksydanty neutralizując uszkodzenia powodowane w organizmie człowieka działaniem wolnych rodników, zapobiegają rozwojowi wymienionych chorób.

Pozyskiwane w kulturach związki bioaktywne znalazły zastosowanie również w przemyśle spożywczym. Są wykorzystywane jako dodatki poprawiające zapach oraz barwę wielu produktów spożywczych. Konsumenci w większym stopniu akceptują związki pochodzenia naturalnego niż te, otrzymywane drogą chemicznej syntezy. W kultur *in vitro* pozyskiwane są barwniki (antocyjany, betalainy, karotenoidy, antrachinony, naftochinony), substancje aromatyzujące (wanilina, szafran, substancje zapachowe z kawy, z kakao, z cebuli oraz z czosnku), substancje słodzące (stewiozydy, glicyryzyna, taumatyna), substancje pikantne (kapsaicyna), olejki eteryczne (miętowy, anyżkowy) [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska, 2008].

Metabolity wtórne są wykorzystywane również w przemyśle kosmetycznym i perfumeryjnym, najczęściej są to związki z grupy olejków eterycznych, saponin oraz barwników roślinnych. Są stosowane jako składniki kremów chroniących przed promieniowaniem UV, szamponów, barwników w cieniach do powiek czy farbach do włosów [Oleszek, 2009]. Tabele 4 - 6 przedstawiają metabolity wtórne syntetyzowane w roślinnych kulturach *in vitro*.

Tabela 4. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach kalusowych (Mulabagal i Tsay, 2004; Vanisree i in., 2004; Karuppusamy, 2009; zmodyfikowane)

Gatunek rośliny	Metabolit
<i>Agave amaniensis</i>	saponiny
<i>Allium sativum</i>	allina
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	altamizyna
<i>Artemisia annua</i>	artemizyna
<i>Bupleurum falcatum</i>	saikosaponiny
<i>Camellia chinensis</i>	flawony
<i>Canavalia ensiformis</i>	kanawanina
<i>Capsicum annum</i>	kapsaicyna
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	pyretryny
<i>Citrus spp.</i>	naringina, limonina
<i>Coffea arabica</i>	kofeina
<i>Corydalis ophiocarpa</i>	alkaloidy izochinolinowe
<i>Coscinium fenestratum</i>	berberyna
<i>Crataegus sinaica</i>	flawonoidy
<i>Cryptolepis buchanani</i> Roem.	kryptozyna
<i>Duboisia leichhardtii</i>	alkaloidy tropanowe
<i>Eriobotrya japonica</i>	triterpeny
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	sterole, związki fenolowe
<i>Fabiana imbricata</i>	rutyna
<i>Frangula alnus</i>	antrachinony
<i>Gentiana spp.</i>	glikozydy sekoirydoidów
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	flawonoidy
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	triterpeny
<i>Hyocyamus niger</i>	alkaloidy tropanowe
<i>Ipomoea cairica</i>	lignany
<i>Momordica charantia</i>	flawonoidy
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA
<i>Nandina domestica</i>	alkaloidy
<i>Nicotiana rustica</i>	alkaloidy
<i>Nothapodytes foetida</i>	kamptotecyna
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	kamptotecyna
<i>Panax ginseng</i>	saponiny, sapogeniny
<i>Papaver bracteatum</i>	tebaina
<i>Papaver somniferum</i>	alkaloidy, morfina, kodeina
<i>Phiorrhiza pumila</i>	alkaloidy
<i>Plantago media</i>	werbaskozyd
<i>Pluchea lanceolata</i>	kwercetyna
<i>Polygala amarella</i>	saponiny
<i>Portulaca grandiflora</i>	betacyjanina
<i>Ptelea trifoliata</i>	alkaloidy
<i>Rauvolfia sellowii</i>	alkaloidy
<i>Rauvolfia serpentina</i>	rezerpina, serpentyna
<i>Rhamnus catharticus</i>	antrachinony
<i>Rheum ribes</i>	katechiny
<i>Ruta spp.</i>	alkaloidy, kumaryny
<i>Salvia fruticosa</i>	kwasy rozmarynowy
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	kwasy rozmarynowy, kwas litospermowy
<i>Salvia officinalis</i>	terpenoidy
<i>Salvia sebiferum</i>	taniny
<i>Saprosma fragrans</i>	antrachinony
<i>Scopolia parviflora</i>	alkaloidy
<i>Scutellaria columnae</i>	związki fenolowe
<i>Silybum marianum</i>	syliaryna
<i>Tecoma sambucifolium</i>	glikozydy fenylopropanoidów
<i>Vaccinium myrtillus</i>	flawonoidy
<i>Victis vinifera</i>	resweratrol
<i>Zataria multiflora</i>	kwasy rozmarynowy

Tabela 5. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach zawiesin komórkowych (Mulabagal i Tsay, 2004; Vanisree i in., 2004; Karuppusamy, 2009; zmodyfikowane)

Gatunek rośliny	Metabolit
<i>Aloe saponaria</i>	glukozydy tetrahydroantracenu
<i>Ammi visnaga</i>	furanokumaryny
<i>Anchusa officinalis</i>	kwas rozmarynowy
<i>Brucea javanica</i>	alkaloidy
<i>Camellia sinensis</i>	tiamina, pochodne γ -glutamylu
<i>Capsicum annuum</i>	kapsaicyna
<i>Cassia acutifolia</i>	antrachinony
<i>Catharanthus roseus</i>	alkaloidy indolowe, katarantyna, winkrystyna
<i>Cayratia trifoliata</i>	stilbeny
<i>Choisya ternata</i>	alkaloidy furochinolinowe,
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	kwas chryzantemowy
<i>Cinchona ledgeriana</i>	chinina
<i>Cinchona robusta</i>	robustachinony
<i>Cinchona succirubra</i>	antrachinony
<i>Coscinium fenestratum</i>	berberyna
<i>Cornus kousa</i>	polifenole
<i>Cruciata glabra</i>	antrachinony
<i>Digitalis purpurea</i>	kardenolidy
<i>Dioscorea deltoidea</i>	diosgenina
<i>Ephedra spp.</i>	L-efedryna, D-pseudoefedryna
<i>Eucommia ulmoides</i>	kwas chlorogenowy
<i>Fabiana imbricata</i>	rutyna
<i>Fumaria capreolata</i>	alkaloidy izochinolinowe
<i>Ginko biloba</i>	ginkgolid A
<i>Glehnia littoralis</i>	furanokumaryny
<i>Hypericum perforatum</i>	hiperycyna
<i>Hyssopus officinalis</i>	triterpeny, sterole
<i>Isoplexis isabelliana</i>	antrachinony
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	szikonina
<i>Lycium chinense</i>	cerebrozyd
<i>Morinda citrifolia</i>	antrachinony
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA
<i>Nicotiana tabacum</i>	nikotyna
<i>Panax notoginseng</i>	ginsenozydy
<i>Papaver somniferum</i>	alkaloidy, morfina, kodeina
<i>Peganum harmala</i>	alkaloidy β -karbolinowe
<i>Phytolacca americana</i>	betacyjaniny
<i>Picrasma quassioides</i>	kwazyna
<i>Piper solmsianum</i>	piperyna
<i>Podophyllum hexandrum</i>	podofilotoksyna
<i>Polygonum hydropiper</i>	flawonoidy
<i>Rauwolfia sellowii</i>	alkaloidy
<i>Rauwolfia serpentina</i>	rezerpina
<i>Rubia akane</i>	antrachinony
<i>Salvia fruticosa</i>	kwas rozmarynowy
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	kryptotanszynon
<i>Sapium sebiferum</i>	taniny
<i>Saponaria officinalis</i>	saponiny
<i>Solanum chrysotrichum</i>	saponiny spirostanolowe
<i>Solanum laciniatum</i>	solasodyna
<i>Solanum paludosum</i>	solamargina
<i>Tabernaemontana divariata</i>	alkaloidy
<i>Taxus baccata</i>	taksol, bakkatyna III
<i>Taxus cuspidata</i>	taksoidy
<i>Tinospora cordifolia</i>	berberyna
<i>Trigonella foenugraecum</i>	saponiny
<i>Vitis vinifera</i>	antocyjany

Tabela 6. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach korzeni transformowanych (Wysokińska i Chmiel, 2006; Karuppusamy, 2009; zmodyfikowane)

Gatunek rośliny	Metabolit
<i>Agastache rugosa</i>	kwas rozmarynowy
<i>Ambrosia maritima</i>	poliacetyleny
<i>Amsonia elliptica</i>	alkaloidy indolowe
<i>Angelica gigas</i>	deoursin
<i>Anisodus luridus</i>	alkaloidy tropanowe
<i>Arachys hypogaea</i>	resweratrol
<i>Armoracia laphthifolia</i>	fisicoccin
<i>Arnica montana</i>	olejek eteryczny, kwas chlorogenowy
<i>Artemisia absinthium</i>	olejek eteryczny
<i>Artemisia annua</i>	artemizyna
<i>Beeta vulgaris</i>	betalainy
<i>Brugmansia candida</i>	alkaloidy tropanowe
<i>Campanula medium</i>	poliacetyleny
<i>Camptotheca acuminata</i>	kamtotecyna, hydroksykamptotecyna
<i>Cassia obtusifolia</i>	antrachinony
<i>Catalpa ovata</i>	werbaskozyd, izowerbaskozyd
<i>Catharanthus trichophyllus</i>	alkaloidy indolowe
<i>Centaurium erythraea</i>	glikozydy sekoirydoidowe
<i>Datura stramonium</i>	hioscyjanina
<i>Duboisia leichhardtii</i>	skopolamina
<i>Duboisia myoporoides</i>	skopolamina
<i>Echinacea purpurea</i>	alkamidy
<i>Fagopyrum esculentum</i>	rutyna
<i>Geranium thunbergii</i>	taniny
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	glicyryzyna, flawonoidy
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	saponiny
<i>Hyocyamus niger</i>	alkaloidy tropanowe
<i>Hyoscyamus muticus</i>	hioscyjamina
<i>Hyssopus officinalis</i>	kwas rozmarynowy
<i>Lactuca virosa</i>	laktony seskwiterpenowe
<i>Leontopodium alpinum</i>	olejki eteryczne
<i>Linum flavum</i>	koniferyna, lignany
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	szikonina
<i>Lupinus mutabilis</i>	izoflawony
<i>Nicotiana glauca</i>	anatabina
<i>Ocimum basilicum</i>	kwas rozmarynowy
<i>Papaver somniferum</i>	kodeina
<i>Physalis minima</i>	glukozyd solasodyny
<i>Pimpinella anisum</i>	olejki eteryczne
<i>Platycodon grandiflorum</i>	poliacetyleny
<i>Plumbago zeylanica</i>	plumbagina
<i>Pueraria phasoloides</i>	pueraryna
<i>Rubia spp.</i>	antrachinony
<i>Salvia spp.</i>	kwas rozmarynowy, diterpeny, triterpeny, sterole, tanszinony
<i>Scutellaria baicalensis</i>	flawonoidy
<i>Sesamum indicum</i>	naftachinony
<i>Silybium marianum</i>	sylimaryna
<i>Solanum aculeatissi</i>	saponiny steroidowe
<i>Solanum mauritanum</i>	solasodyna
<i>Swertia japonica</i>	amarogenetyna
<i>Tagetes patula</i>	tiofen
<i>Tanacetum parthenium</i>	seskwiterpeny
<i>Tylophora indica</i>	tyloforyna
<i>Valerianella lacustra</i>	walepotriaty

1.4.2. Wpływ różnych czynników na biosyntezę związków bioaktywnych w kulturach *in vitro*

Metoda pozyskiwania metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* jest procesem wieloetapowym, a na syntezę pożądaných związków wpływa wiele różnorodnych czynników. Ogólnie możemy je podzielić na czynniki związane z materiałem roślinnym wprowadzanym do kultury (genotyp rośliny macierzystej, źródło eksplantatu, faza fizjologiczna komórek w kulturze) i czynniki związane z samą kulturą jak zmienność somaklonalna w kulturze oraz czynniki fizyko-chemiczne kultury (skład pożywki: składniki mineralne, źródło węgla, regulatory wzrostu, prekursorzy, elicytory, pH pożywki, ale także warunki zewnętrzne w jakich prowadzona jest kultura: światło, temperatura czy napowietrzanie). Czynniki te razem tworzą zespół zależności warunkujących biosyntezę metabolitów wtórnych, a różnorodność zależności sprawia, że dla każdego rodzaju kultury warunki optymalne dla biosyntezy związków bioaktywnych ustala się eksperymentalnie [Smetanska, 2008; Shilpa i in., 2010].

Badania na zawartość metabolitów wtórnych w populacji danego gatunku oraz selekcja najbogatszego w te związki materiału jest pierwszym etapem. Genetyczny potencjał rośliny jest najważniejszym czynnikiem warunkującym profil syntetyzowanych przez nią związków, czynniki środowiskowe mogą jedynie modyfikować ekspresję tych genów. W wielu przypadkach obserwowano pozytywną korelację pomiędzy wysoką zawartością związków bioaktywnych w roślinie macierzystej oraz otrzymanymi z niej kulturami *in vitro*. Kultury *Catharanthus roseus* założone z roślin wytwarzających duże ilości serpentyny [Zenk i in., 1977], podobnie jak kultury *Nicotiana tabacum* [Kinnersley i Dougall, 1980], które uzyskano z roślin bogatych w nikotynę cechowała również wysoka produkcja metabolitów wtórnych. Odwrotną zależność stwierdzono jednak w przypadku produkcji berberyny przez kultury *Thalictrum minus* [Suzuki i in., 1987].

W kulturach *in vitro* częstym zjawiskiem jest zmienność genetyczna i epigenetyczna komórek. Jednym ze źródeł zmienności jest zróżnicowanie tkanek eksplantatu wprowadzanego do kultury (wiek, typ tkanki). Merystemy apikalne zawierają wyłącznie komórki diploidalne, natomiast dojrzałe i zróżnicowane tkanki cechują zmiany chromosomów w komórkach, jako następstwo endoreduplikacji. Kultura kalusa, jak również zawiesiny komórkowej jest zbiorem heterogennych komórek o zróżnicowanej aktywności biochemicznej i zdolności do biosyntezy

metabolitów wtórnych [Bhojwani i Razdan, 1996]. Wobec tego zjawiska konieczna jest selekcja linii cechującej się wysoką zawartością pożądaných metabolitów wtórnych [Shilpa i in., 2010]. Selekcja linii komórkowej jest szczególnie łatwa do przeprowadzenia w przypadku gdy produkt jest barwnikiem. W ten sposób otrzymano wysokoproduktywne linie *Lithospermum erythrorhizon* wytwarzające 13 - 20 razy więcej szikoniny [Fujita i in., 1984] oraz linie *Euphorbia milli*, które produkowały siedem razy więcej antocyjanów [Yamamoto i in., 1982] w stosunku do heterogennej tkanki wyjściowej. W innych przypadkach selekcję umożliwiają różnorodne techniki chromatograficzne.

Monitorowanie zawartości związków bioaktywnych w kulturach *in vitro* umożliwia najprostsza technika jaką jest TLC (Cienkowiecowa Chromatografia Cieczowa), jak również HPLC (Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa), UPLC (Ultrasprawna Chromatografia Cieczowa) oraz GC (Chromatografia Gazowa). Stosując metody analityczne jak LC-MS (sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas), GC-MS (sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas), NMR (Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego) i 2D-NMR (Dwuwymiarowa Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego) możliwe jest określenie struktur nowych związków syntetyzowanych w kulturach *in vitro*, a nieobecnych w roślinie macierzystej [Cisowski i in., 1998; Stobiecki, 2000; Cuyckens i Clayes, 2004; de Rijke i in., 2006; Oleszek, 2009; Allwood i Goodarce, 2010; Schripsema, 2010; Steinmann i Ganzera, 2010].

Skład oraz proporcje mikro- i makroelementów w pożywce hodowlanej mają duże znaczenie dla metabolizmu komórki. Podziały komórkowe umożliwiające przyrost biomasy oraz wytwarzanie metabolitów wtórnych zazwyczaj są sobie przeciwstawne. Pożywki, które umożliwiają szybki przyrost biomasy (zawierają duże ilości jonów azotanowych, amonowych, fosforanowych) nie sprzyjają biosyntezie metabolitów wtórnych, a ich produkcję stymuluje wyczerpywanie się tych składników w pożywce [Dougall, 1980].

Pożywki hodowlane jak MS (pożywka Murashigiego i Skooga 1962), LS (pożywka Linsmaiera i Skooga 1965), B5 (pożywka Gamborga 1968) zawierają jako źródło azotu zarówno jony NO_3^- oraz NH_4^+ . Wykazano, iż proporcje tych jonów względem siebie, jak również całkowite stężenie azotu w pożywce wpływa na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* [Smetanska, 2008]. Obniżenie poziomu jonów amonowych i jednocześnie zwiększenie stężenia jonów azotanowych

stymulowały produkcję szikoniny w kulturach zawieszinowych *Lithospermum erythrorhizon* [Fujita i in., 1981] oraz betalain [Bohm i Rink, 1988]. Zwiększenie stężenia jonów amonowych w stosunku do azotanowych pobudzało natomiast wytwarzanie berberyny w zawieszinach komórkowych *Thalictrum minus* [Nakagawa i in., 1984], jak również koenzymu Q w kulturach tytoniu [Ikeda i in., 1977]. Wykazano również, że obniżenie zawartości azotu we wszystkich jego formach pozytywnie wpłynęło na biosyntezę antrachinonów w kulturze zawieszinowej *Morinda citrifolia* [Zenk i in., 1975] oraz antocyjanów w kulturze zawieszinowej *Vitis spp.* [Yamakawa i in., 1983]. Zwiększenie stężenia fosforanów w pożywce podnosiło zawartość digitoksyny w kulturach *Digitalis purpurea* [Hagimori i in., 1982], a także betacyjanin zarówno w kulturach *Chenopodium rubrum* czy *Phytolacca americana* [Bohm i Rink, 1988]. Obniżenie zawartości tych jonów wpłynęło natomiast pozytywnie na syntezę ajmalicyny oraz związków fenolowych w kulturach *Catharanthus roseus* [Knobloch i Berlin, 1983], a także nikotyny w kulturach zawieszinowych *Nicotiana tabacum* [Mantell i in., 1983]. Wykazano również, że na produktywność wielu kultur *in vitro* wpływa zmiana stężeń mikroelementów w pożywce. Pierwiastki śladowe są faktycznie wykorzystywane jako elicytory abiotyczne - czynniki indukujące biosyntezę metabolitów wtórnych [Verpoorte i in., 1999; Narula i in., 2004]. Przykładem może być chociażby wzrost akumulacji betalain w kulturach *Beta vulgaris* poprzez zwiększenie stężenia jonów Co^{2+} z 1 do 5 μM [Trejo-Tapia i in., 2001]. Wzrost stężenia jonów miedzi oraz siarczanowych stymulował produkcję szikoniny w kulturach zawieszinowych *Lithospermum erythrorhizon* [Fujita i in., 1981]. Obserwowano pozytywne oddziaływanie jonów Cu^{2+} na produkcję ksantotoksyny w kulturach *Amni majus* [Purohit i in., 1995a; Purohit i in., 1995b], lepidyny w kulturach *Lepidium sativum* [Saba i in., 2000] oraz siewkach *Amaranthus caudatus* [Obrenovic, 1990]. Wykazano ponadto stymulujące oddziaływanie jonów Cu^{2+} na proces embriogenezy somatycznej i rozwój powstałych zarodków w kulturach *Citrus spp.* [Jumin, 1995] oraz regenerację roślin *Nicotiana tabacum*, jak również *Bacopa monniera* [Narula i in., 2004]. Przebadano także wpływ różnorodnych pierwiastków m.in.: Ca, Mg, Mo na produkcję sapogenin steroidowych w kulturach *Agave amaniensis* [Indrayanto i in., 1993; Indrayanto i in., 1996]. Badania *in vitro* umożliwiły również otrzymanie roślin cechujących się podniesionym poziomem tolerancji w stosunku do pierwiastków śladowych. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do wzrastającego poziomu skażenia środowiska tymi pierwiastkami [Chakarvarty i Srivastava, 1997].

Istotny wpływ na produkcję związków bioaktywnych ma rodzaj źródła węgla oraz jego zawartość w pożywce. Sacharoza oraz glukoza w stężeniu 2 - 4% stanowią najpopularniejsze z nich. Jako dodatkowe bywają stosowane fruktoza, galaktoza oraz maltoza [Smetanska, 2008]. Wzrost stężenia sacharozy w pożywce wpływał na zwiększenie akumulacji alkaloidów w zawiesinie komórkowej *Holarrhena antidysenterica* [Panda i in., 1992], szikoniny w kulturach zawiesinowych *Lithospermum erythrorhizon* [Fujita i in., 1981; Srinivasan i Ryu, 1993] oraz produkcję kwasu rozmarynowego w kulturach *Anchusa officinalis* [Su i Humprey, 1990], czy *Coleus blumei* [Martinez i Park, 1993]. Podobnie w zawiesinie komórkowej *Eschscholtzia californica* wzrost stężenia sacharozy do 8% zwiększył wydajność produkcji alkaloidów aż o 10 razy (do 150 mg L⁻¹) [Berlin i in., 1983]. Przebadano również wpływ początkowego stężenia sacharozy (20, 30, 40 lub 60 g L⁻¹) na produktywność zawiesiny komórkowej *Panax notoginseng*. Największą akumulację saponin, jak również polisacharydów odnotowano gdy stężenie cukru wynosiło 40 g L⁻¹ [Zhang i in., 1996]. Stres osmotyczny powstały w wyniku oddziaływania sacharozy oraz innych czynników osmotycznych korzystnie wpłynął na produkcję antocyjanów w zawiesinach komórkowych *Vitis vinifera* [Do i Cormier, 1990] oraz gromadzenie się nikotyny w zawiesinach komórkowych *Nicotiana tabacum* [Mantell i in., 1983]. Obserwowano również odwrotną korelację, zwiększenie stężenia sacharozy do 5% w kulturach zawiesinowych *Aralia cordata* w niekorzystny sposób oddziaływało na produkcję antocyjanin, podczas gdy stężenie 3% stymulowało ich akumulację [Sakamoto i in., 1994]. Przebadano również wpływ różnych kombinacji i stężeń glukozy, fruktozy i sacharozy na przyrost biomasy oraz produkcję taksolu w kulturach zawiesinowych *Taxus media*. Warianty pożywek gdzie zastosowano fruktozę w stężeniu 40 g L⁻¹ obecna jako jedyne źródło węgla, bądź fruktozę w kombinacji z glukozą w stężeniach po 20 g L⁻¹, jak również sacharozę w stężeniu 80 g L⁻¹ sprzyjały przyrostowi biomasy. Produkcję taksolu stymulowała pożywka, w której źródło węgla stanowiła sacharoza (20 g L⁻¹) z niewielkim dodatkiem fruktozy i glukozy (po 2,5 g L⁻¹). W tym wypadku obserwowano jednak średni poziom przyrostu biomasy [Wincermesinhe i Arteca, 1994].

Zasadniczy wpływ na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* wywierają hormony, głównie auksyny i cytokininy oraz ich wzajemne proporcje. Czynniki te regulują podziały oraz różnicowanie się komórek, jak również oddziałują na enzymy z różnych szlaków metabolicznych [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002;

Smetanska, 2008; Shilpa i in., 2010]. Generalnie wysokie stężenie auksyny 2,4-D w pożywce obniża poziom akumulacji związków bioaktywnych w komórkach, jednocześnie związek ten bardzo efektywnie stymuluje indukcję tkanki kalusowej, jak również przyrost biomasy [Stafford i in., 1986; Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska, 2008]. W obecności tego hormonu w kulturach *Thalictrum minus* obserwowano szybki przyrost biomasy, jednak zawartość berberyny w komórkach była bardzo niska [Nakagawa i in., 1986]. Aplikacja 2,4-D powodowała również obniżenie produkcji antrachinonów w kulturach zawiesinowych *Morinda citrifolia* [Zenk i in., 1975], czy nikotyny w zawiesinach komórkowych *Nicotiana tabacum* [Furuya i in., 1971]. Obserwowano również sytuacje, w których obecność 2,4-D w pożywce stymulowała wytwarzanie związków bioaktywnych jak w przypadku akumulacji karotenoidów w kulturach kalusowych *Daucus carota* [Rajendran i in., 1992] oraz w kulturach zawiesinowych tego gatunku [Mok i in., 1976], antocyjanów w kulturach kalusowych *Oxalis linearis* [Meyer i Staden, 1995], jak również produkcji L-DOPA przez zawiesiny komórkowe *Mucuna* [Narula i in., 2004]. W przypadkach kiedy obecność 2,4-D była czynnikiem ograniczającym produktywność kultury jej eliminacja bądź zastąpienie poprzez inną auksynę IAA (kwas indolilo-3-octowy) lub NAA (kwas naftylo-1-octowy) przynosiło pozytywne rezultaty. W ten sposób zwiększono akumulację nikotyny w zawiesinach komórkowych *Nicotiana tabacum* [Sahai i Shuler, 1984], betacyjanin w kulturach zawiesinowych *Portulaca* [Bohm i Rink, 1988], antrachinonów w kulturach *Morinda citrifolia* [Zenk i in., 1975] oraz kamptotecyny w kulturach zawiesinowych *Nothapodytes foetida* [Fulzele i in., 2001]. Podobnie jak auksyny cytokininy również oddziałują na syntezę metabolitów wtórnych. I tak na przykład kinetyna w kulturach kalusa *Stizolobium hassjoo* zwiększała akumulację L-DOPA [Narula i in., 2004], podobnie w kulturach *Haplopappus gracilis* stymulowała wytwarzanie antocyjanów [Seitz i Hinderer, 1988], natomiast w kulturach zawiesinowych *Populus* wykazywała działanie inhibujące ich syntezę [Matsumoto i in., 1973]. BA (6-benzyloaminopuryna) natomiast zwiększał akumulację szikoniny w kulturach *Lithospermum erythrorhizon*, alkaloidów w kulturach zawiesinowych *Catharanthus roseus*, jak również witanolidów w kulturach *Withania somnifera* [Narula i in., 2004]. Kwas giberelinowy podobnie jak kwas abscysynowy wykazują działanie hamujące na produkcję antocyjanin w wielu kulturach *in vitro* [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Shilpa i in., 2010]. Opisano jednak stymulujący wpływ kwasu giberelinowego na syntezę berberyny w kulturach *Coptis japonica* [Hara i in., 1988].

Z czynników zewnętrznych największy wpływ na biosyntezę metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* odgrywa światło, istotna jest jakość oraz intensywność światła, ale i długość stosowanego fotoperiodu [Smetanska, 2008]. Odgrywa ono szczególnie ważną rolę w syntezie metabolitów wtórnych gdzie zaangażowane są enzymy foto-zależne jak np. PAL (amoniakoliza fenyloalaninowa) biorąca udział w biosyntezie kwasów cynamonowych, flawonoidów, czy antocyjanów [Stafford i in., 1986]. Wykazano stymulujące oddziaływanie światła na produkcję antocyjanów w kulturach *Daucus cordata* [Seitz i Hinderer, 1988], *Aralia cordata* [Sakamoto i in., 1994] i *Prunus cerasus* [Blando i in., 2005] oraz zawartość seskwiterpenów w kulturach kalusowych *Marticaia chamomilla* [Mulder-Krieger i in., 1988] a także produkcję kofeiny w zawiesinach komórkowych *Coffea arabica* [Kurata i in., 1998]. Wyeliminowanie światła spowodowało natomiast wzrost akumulacji monoterpenu w kulturach kalusowych *Citrus limon* [Mulder-Krieger i in., 1988].

Poza światłem istotny wpływ na produkcję metabolitów wtórnych odgrywa temperatura. W przeważającej liczbie przypadków optymalną temperaturą dla biosyntezy metabolitów wtórnych większości gatunków roślin jest 17 – 25°C, wartość ta pokrywa się z optimum temperaturowym dla wzrostu komórek [Smetanska, 2008; Shilpa i in., 2010]. Obniżenie temperatury hodowli z 27 do 16°C kultur *Catharanthus roseus* spowodowało 12-krotne zwiększenie akumulacji alkaloidów [Courtois i Guren, 1980], obniżenie temperatury spowodowało również wzrost produkcji kwasów tłuszczowych w kulturach zawiesinowych tego gatunku [Toivonen i in., 1992]. Zredukowanie temperatury z 27 do 10°C na okres 6 godzin zwiększyło akumulację olejku eterycznego w kulturach *Mentha piperita* [Dörnenburg i Knorr, 1996]. Wzrost temperatury z 24 do 32°C spowodował natomiast zwiększenie syntezy koenzymu Q w zawiesinach komórkowych *Nicotiana tabacum* [Ikeda i in., 1977]. W kulturach zawiesinowych *Digitalis lanata* temperatura 19°C powodowała biotransformację digitoksyny do digoksyny, podniesienie temperatury do 32°C okazała się być optymalnym dla produkcji purpureaglikozydu A [Smetanska, 2008].

Wartość pH pożywki wpływa również na biosyntezę metabolitów wtórnych, optymalne wartości dla wzrostu komórek mieszczą się w zakresie 5,5 – 6,0; wartości skrajne nie są stosowane. Wartość pH oddziałuje na pobieranie składników odżywczych i prekursorów z pożywki, jak również uwalnianie syntetyzowanych związków przez komórki do pożywki. Stężenie jonów wodorowych w pożywce zmienia się wraz z czasem trwania hodowli danej kultury. Wartość pH obniża się na skutek poboru

jonów amonowych, rośnie natomiast w wyniku poboru jonów azotanowych [McDonald i Jackman 1989; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska, 2008; Shilpa i in., 2010].

Jednym z ważniejszych czynników wpływającym na wzrost zawiesin komórkowych jest wielkość inokulum. Dla większości przypadków wielkość inokulum wynosząca 10 - 15% (v/v) okazała się być optymalna.

W procesie produkcji metabolitów wtórnych na dużą skalę ważny jest ponadto sposób wytrząsania oraz napowietrzania kultury [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002]. Wzrost akumulacji saponin w zawiesinach komórkowych *Panax ginseng* hodowanych w bioreaktorze uzyskano poprzez zwiększenie ilości tlenu [Thanh i in., 2006]. Syntezę linalolu oraz innych monoterpenuw w zawiesinach komórkowych stymulował dwutlenek węgla [Ambid i Fallot, 1981]. Powodował on jednak obniżenie produkcji ginsenozydów w kulturach korzeni *Panax ginseng* [Ali i in., 2008].

1.4.3. Metody zwiększenia produktywności w roślinnych kulturach *in vitro*

Skutecznym sposobem zwiększania produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* okazała się suplementacja egzogennymi prekursorami biosyntezy pożądaných związków, a także elicytacja. Kultury *in vitro* umożliwiają również przeprowadzenie biotransformacji różnorodnych metabolitów. Większość metabolitów wtórnych jest akumulowana wewnątrzkomórkowo, nieliczne są wydzielane do medium hodowlanego. W takim przypadku zastosowanie żywicy XAD-7 umożliwia absorpcję uwalnianego do pożywki związku. Uwalnianie syntetyzowanych metabolitów do pożywki umożliwia również proces permeabilizacji błon komórkowych. Rozszczelnienie błon uzyskuje się poprzez stosowanie impulsów elektrycznych oraz ultradźwięków, zmianę pH, a także poprzez dodanie związków jak: izopropanol, DMSO czy Triton X-100. Może to znacząco ułatwić procedurę ekstrakcji związków aktywnych, obniżając równocześnie koszty ich produkcji [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska 2008; Shilpa i in., 2010].

1.4.3.1. Stosowanie prekursorów biosyntezy

Egzogenne podanie prekursora ze szlaku metabolicznego jest często praktykowane w celu zwiększenia produkcji określonego związku bioaktywnego. Każdy związek będący początkowym elementem danego szlaku stwarza możliwość podniesienia wydajności biosyntezy produktu finalnego, ale pod warunkiem gdy jest on czynnikiem limitującym wydajność procesu. Stosowanymi prekursorami są przeważnie aminokwasy, stymulują one biosyntezę alkaloidów, kwasu rozmarynowego ale i innych związków [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Mulabagal i Tsay, 2004; Namdeo i in., 2007; Smetanska 2008].

Wzbogacenie o fenyloalaninę zawiesiny komórkowej *Salvia officinalis* stymulowało biosyntezę kwasu rozmarynowego [Ellis i Towers, 1970] oraz antocyjanów w przypadku zawiesin *Fragaria ananassa* [Edahiro i in., 2005]. Wzrost akumulacji taksolu w kulturach *Taxus cuspidata* był również wynikiem aplikacji tego aminokwasu [Fett-Neto i in., 1993; Fett-Neto i in., 1994]. Fenyloalanina podana do kultur korzeniowych *Cicer arietinum* wpłynęła na zwiększenie akumulacji izoflawonów: biochaniny A, formononetyny, homoferreiryne oraz ciceryny [Armero i in., 2001]. Podawanie kulturom *Vanilla planifolia* kwasu ferulowego wpłynęło na zwiększenie produkcji waniliny [Romagnoli i Knorr, 1988]. Dodatek leucyny spowodował natomiast zwiększoną akumulację monoterpenów w kulturze *Perilla frutiscens* [Mulder-Krieger i in., 1988]. Egzogenne podanie tryptofanu do zawiesin komórkowych *Catharantus roseus* zwiększyło akumulację ajmalicyny [Fulzele i Heble, 1994]. Wzrost akumulacji flawonoidów w zawiesinach komórkowych *Scutellaria baicalensis* spowodowany był dodaniem kwasu cynamonowego [Martin i Dusek, 2007]. Tabela 7 prezentuje wykorzystanie prekursorów w celu zwiększenia akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*.

Podawanie prekursorów biosyntezy związków bioaktywnych w kulturach *in vitro* może okazać się obiecującą metodą ich pozyskiwania pod warunkiem korzystnych rezultatów. Kluczem do sukcesu jest zastosowanie odpowiedniego prekursora oraz poznanie szlaku metabolicznego, w którym przeprowadzana jest synteza pożądanego metabolitu [Namdeo i in., 2007].

Tabela. 7. Metabolity wtórne otrzymane w kulturach *in vitro* poprzez dodanie egzogennych prekursorów (Namdeo i in., 2007), zmodyfikowane

Gatunek rośliny	Substrat	Produkt
<i>Atropa belladonna</i>	kwas tropowy	alkaloidy tropanowe
<i>Camptotheca acuminata</i>	[1'- ¹⁴ C]-tryptofan; [Ar- ³ H ₄]-tryptofan	kamptotecyna
<i>Capsicum annuum</i>	L-tyrozyna; DL-DOPA	kapsaicyna
<i>Capsicum frutescens</i>	fenyloalanina; kwas kumarowy, kwas cynamonowy, kwas ferulowy	kapsaicyna
<i>Capsicum frutescens</i>	kwas ferulowy	wanilina, kapsaicyna
<i>Catharanthus roseus</i>	sekologanina, loganina	ajmalicyna
<i>Catharanthus roseus</i>	tryptofan	ajmalicyna
<i>Ceanothus americanus</i>	aminokwasy	alkaloidy makrocycliczne
<i>Celosia plumosa</i>	betanidyna, betanina	amarantyna
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	tyrozyna, fenyloalanina	cefalina
<i>Cicer arietinum</i>	7,4'-dihydroksyflawanone-[T]	flawonoidy
<i>Coleus blumei</i>	fenyloalanina	kwas rozmarynowy
<i>Convallaria majalis</i>	(R,S)-[1- ¹⁴ C, ¹⁵ N]metionina	kwas azetydino-2-karboksylowy
<i>Coreopsis tinctoria</i>	fenyloalanina	1'-izobutyryloksyeugenol-4-izomaślan
<i>Daucus carota</i>	kwas synapowy	antocyjany
<i>Delonix regia</i>	kwas γ-diaminomasyłowy	kwas azetydino-2-karboksylowy
<i>Digitalis lanata</i>	cholesterol, fitosterol, stigmosterol	pochodne pregnanu
<i>Digitalis purpurea</i>	glukoza	digitoksoza
<i>Dioscorea deltoidea</i>	cholesterol	diosogenina
<i>Duboisia leichhardtii</i>	fenyloalanina	alkaloidy tropanowe
<i>Eschscholtziacalifornica</i>	tyrozyna	alkaloidy
<i>Ginkgo biloba</i>	terpenoidy	ginkgolidy i bilobalidy
<i>Glycine max</i>	daidzeina, 7,2',4',-trihydroksyizoflawon	fitoaleksyny
<i>Heimia salicifolia</i>	fenyloalanina	kryogenina
<i>Holarrhena antidysenterica</i>	cholesterol	alkaloidy steroidowe
<i>Hypericum perforatum</i>	1-[U-(¹³ C)(5)]walina 1-[U-(¹³ C)(6)]izoleucyna	hiperoforyna
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	fenyloalanina	kwas rozmarynowy
<i>Lunaria annua</i>	fenyloalanina	lunaryna
<i>Mentha piperita</i>	2- ¹⁴ C mewalonian	monoterpeny, seskwiterpeny
<i>Nicotiana tabacum</i>	ornityna	nikotyna
<i>Nicotiana tabacum</i>	nornikotyna	nikotyna
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2',4',4-trihydroksyhalkon, daidzeina	faseolina
<i>Podophyllum hexandrum</i>	fenyloalanina; kwas cynamonowy,	podofilotoksyna
<i>Portulaca grandiflora</i>	kwas ferulowy	4'-demetylo podofilotoksyna
<i>Rhodiola sachalinensis</i>	fenyloalanina	salidrozyd
<i>Scopilia japonica</i>	kwas tropowy	skopolamina
<i>Securinega suffruticosa</i>	tyrozyna	alkaloidy
<i>Taxus chinesis</i>	fenyloalanina	taksol
<i>Taxus wallichiana</i>	fenyloalanina, leucyna	taksol, bakatyna
<i>Taxus cuspidata</i>	fenyloalanina, kwas benzoesowy, seryna, glicyna	taksol
<i>Taxus cuspidata</i>	kwasy karboksylowe, aminokwasy	taksol
<i>Trifolium pratense</i>	7,2'-dihydroksy-4'-metoksyizoflawon	demetylohomopterokarpina
<i>Vanilla planifolia</i>	kwas cynamonowy; kwas ferulowy	kwas wanilinowy

1.4.3.2. Elicytacja

Elicytacja jest kolejną metodą zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, ponieważ elicytory aktywują szlaki ich biosyntezy. Ze względu na miejsce powstawania wyróżniamy elicytory endo- i egzogenne, natomiast w zależności od ich pochodzenia rozróżniamy elicytory biotyczne i abiotyczne (promieniowanie UV, sole pierwiastków śladowych). W procesie elicytacji zasadniczą rolę odgrywa rodzaj elicytora, jego stężenie, czas oddziaływania elicytora, a także rodzaj oraz faza wzrostu kultury poddawanej elicytacji [Yeoman i Yeoman, 1996; Szpitter i Królicka, 2005; Zhao i in., 2005; Namdeo, 2007; Smetanska, 2008; Zhou i Zhong, 2010; Sharma i in., 2011].

Kultury korzeni włośnikowych *Psoralea corylifolia* elicytowano ekstraktem drożdżowym (YE), chitosanem, kwasem salicylowym (SA) oraz poliaminami: putrescyną i spermidyną. Poszczególne elicytory wykazały zróżnicowany wpływ na produkcję izoflawonów. W kulturach elicytowanych chitosanem (2 mg L^{-1}) akumulacja daidzeiny wynosiła 2,78% s.m., natomiast genisteina stanowiła 0,279% s.m. W przypadku SA (1 mM) produkcja daidzeiny osiągnęła wartość 2,2% s.m. natomiast genisteina była akumulowana na poziomie 0,228% s.m. Dodanie petrescyny (50 mM) spowodowało wzrost akumulacji daidzeiny do 3,01% s.m., produkcja genisteiny w tych warunkach wynosiła 0,227% [Shinde i in., 2009]. Aby zwiększyć produkcję kwasu oleanowego w zawiesinach komórkowych *Calendula officinalis* poddano je procesowi elicytacji z wykorzystaniem chitosanu, YE, JA (kwasu jasmonowego), pektynazy oraz homogenatu pochodzącego z grzybni *Trichoderma viride*. Najbardziej efektywnym elicytorem okazał się JA. Maksymalną akumulację kwasu oleanowego ($0,84 \text{ mg g}^{-1}$ s.m.) odnotowano po dodaniu $100 \text{ }\mu\text{M}$ tego związku po 72 godzinach od momentu elicytacji. Dodanie chitosanu (50 mg L^{-1}) spowodowało wzrost akumulacji kwasu oleanowego do poziomu $0,37 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. po 48 godzinach. YE (200 mg L^{-1} po 96 godzinach od momentu dodania) oraz pektynaza (2 mg L^{-1} po 48 godzinach od momentu elicytacji) okazały się mniej efektywne, akumulacja kwasu oleanowego wynosiła $0,22 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. Najmniej skutecznym elicytorem okazał się homogenat *T. viride*, po 48 godzinach od elicytacji synteza kwasu oleanowego stanowiła $0,12 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. [Wiktorowska i in., 2010]. Optymalny czas inkubacji zależy od rodzaju stosowanego elicytora. Różnice w szybkości wywoływanych reakcji mogą być spowodowane różną dyfuzją elicytorów przez ścianę komórkową, a także zróżnicowaną

szybkością aktywacji szlaków przekazywania sygnału, które prowadzą do syntezy metabolitów wtórnych [Szpitter i Królicka, 2005].

Stymulacja szlaków metabolicznych prowadząca do syntezy metabolitów wtórnych w komórkach poddanych procesowi elicytacji zachodzi w wyniku aktywacji szeregu czynników. Pierwszym etapem kaskady jest percepcja sygnału przez odpowiednie receptory. W przekazywaniu sygnału zaangażowane są następnie: białka wiążące GTP, błonowy kanał wapniowy uruchamiający napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy, cyklaza adenylanowa (przeksztalca ATP w cAMP-wtórny cząsteczkę sygnałową), kinazy białkowe typu A (PKA), fosfolipaza C (PLC), fosfatydyloinozytol (PI), inozytolo(1,4,5)trifosforan (IP_3), diacyloglicerol (DAG), kinaza białkowa C (PKC), kinazy aktywowane mitogenami (MAPK). Następstwem tej kaskady jest aktywacja ekspresji genów warunkujących syntezę związków bioaktywnych [Zhao i in., 2005; Namdeo, 2007; Vasconsuelo i Boland, 2007]

Promieniowanie UV wpływa na aktywność enzymów wywodzących się z różnych szlaków metabolicznych. Są to m.in.: liaza fenyloalaninowa (PAL) oraz syntaza chalkonowej (CHS) pochodzące ze szlaku biosyntetycznego flawonoidów, a także dekarboksylaza tryptofanu przeprowadzająca pierwszy etap syntezy alkaloidów indolowych [Zhang i Björn, 2009]. Promieniowanie UVB wpłynęło na zwiększenie akumulacji izoflawonów w kulturach kalusowych *Genista tinctoria* [Tumová i Tuma, 2011], związków fenolowych (orientyny, izoorientyny, witeksyny, izowiteksyny) w kulturach kalusowych *Passiflora quadrangularis* [Antognoni i in., 2007], a także resweratrolu i piceatanolu w kulturach kalusowych *Arachis hypogaea* [Ku i in., 2005]. Napromieniowanie światłem UV-B zawiesin komórkowych *Catharanthus roseus* wpłynęło na zwiększenie akumulacji katarantyny oraz windoliny [Ramani i Jayabaskaran, 2008].

W kulturach *in vitro* jako elicytory są stosowane homogenaty oraz filtraty wielu kultur grzybowych oraz bakteryjnych. Zhao i wsp. przebadali wpływ homogenatów oraz filtratów kultur z 12 gatunków grzybów na produkcję alkaloidów indolowych (katarantyny, ajmalicyny i serpentyny) w zawiesinie komórkowej *Catharanthus roseus*. W zależności od gatunku grzyba oraz rodzaju elicytora (homogenat bądź filtrat) obserwowano różnice w całkowitej produkcji alkaloidów, ich uwalnianiu do pożywki oraz proporcjach między poszczególnymi alkaloidami. Najbardziej efektywnym elicytorem okazał się homogenat z *Ustilaginodia verens* [Zhao i in., 2001]. Inkubacja zawiesin komórkowych *Medicago sativa* z wyciągiem patogennego grzyba *Phoma*

medicagensis wpłynęła na wzrost akumulacji satiwanu, medykarpiny oraz kumestrolu [Paiva i in., 1994]. Filtrat z mycelium grzyba *Pythium aphanidermatum* stymulował syntezę eskuliny oraz eskuletyny w kulturach korzeni włosnikowatych *Cichorium intybus* [Bais i in., 2000]. Filtraty z micelli grzybów *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* oraz *Trichoderma viride* dodano do zawiesiny komórkowej *Catharanthus roseus* w celu zwiększenia akumulacji ajmalicyny [Namdeo i in., 2002].

Wykazano pozytywny wpływ YE na akumulację kwasu ursolowego oraz oleanolowego w zawieszynie komórkowej *Scutellaria baicalensis* [Yoon i in., 2000]. W kulturze korzeni włosnikowatych *Burgmansia candida* elicytowanej YE odnotowano wzrost zawartości skopolaminy i hioscyjminy o ok. 200% w porównaniu do kontroli [Pitta-Alvares i in., 2000]. Pozytywne oddziaływanie YE na akumulację kwasów fenolowych i naftochinonów obserwowano również w przypadku kultur korzeni włosnikowatych *Salvia miltiorrhiza* [Chen i in., 2001].

Chitozan skutecznie stymulował akumulację wielu metabolitów wtórnych jak: alkaloidy, naftochinony, fenylopropanoidy oraz terpenoidy w kulturach zawiesinowych, kalusowych lub kulturach korzeni włosnikowatych. Chitozan stymulował akumulację paklitakselu w kulturach kalusowych *Taxus × media* oraz *T. cuspidata* [Furmanowa i in., 2000] oraz zawiesinach komórkowych *T. chinesis* [Zhang i in., 2000; Zhang i Xu, 2001]. Produkcja plumbaginy w kulturze zawiesinowej *Plumbago rosea* po dodaniu chitozanu wzrosła ponad 6-krotnie do wartości 150 mg L⁻¹ [Komaraiah i in., 2002]. Chitozan spowodował również wzrost syntezy mentolu w kulturze zawiesinowej *Mentha piperita*. Elicytor w stężeniu 200 mg L⁻¹ podniósł 40-krotnie jego zawartość w stosunku do kontroli [Chang i in., 1998]. Chitosan w stężeniu 200 mg L⁻¹ zwiększył syntezę indirubiny w kulturze zawiesinowej *Polygonum tinctorum* [Kim i in., 1997], a w stężeniu 250 mg L⁻¹ spowodował wzrost akumulacji hioscyjminy w kulturze korzeni włosnikowatych *Hyoscyamus muticus* [Sevón i in., 1992].

Jako elicytory powszechnie wykorzystywane są kwas salicylowy oraz kwas jasmonowy i jego metylowa pochodna (MeJA) związki naturalnie syntetyzowane przez komórki i uczestniczą w transmisji sygnałów w organizmie roślinnym [Gundlach i in., 1992; Zhao i in., 2005]. Jasmoniany stymulowały syntezę awenanthramidów w kulturach zawiesinowych *Avena sativa* [Wise i in., 2009], izoflawonoidów w kulturach zawiesinowych *Pueraria candollei* [Korsangruang i in., 2010], hiperycyny i hyperforyny w kulturach pędów *Hypericum hirsutum* i *H. maculatum* [Coste i in., 2011], bakuchiolu w różnego typu kulturach *Psoralea drupacea* [Lystvan i in., 2010],

resweratrolu w zawiesinach komórkowych *Vitis vinifera* [Tassoni i in., 2005] oraz kumaryn w kulturach korzeni *Angelica gigas* [Rhee i in., 2010]. Korzenie włośnikowate *Datura stramonium* akumulowały najwięcej alkaloidów w obecności MeJA [Zabetakis i in., 1999]. MeJA oraz SA stymulowały akumulację antrachinonów w transformowanych i nietransformowanych kulturach kalusowych *Rubia cordifolia* [Bulgakov i in., 2002]. SA [Wang i in., 2007] oraz jego pochodna salicylan trifluoroetylu [Qian i in., 2006] skutecznie stymulowały akumulację taksanów w zawiesinach komórkowych *Taxus chinensis*. Elicytacja SA korzeni włośnikowatych *Burgmansia candida* wpłynęła na uwalnianie do pożywki syntetyzowanych alkaloidów: skopolaminy i hioscyjaminy [Pitta-Alvares i in., 2000].

Zwiększenie produkcji związków bioaktywnych w kulturach *in vitro* możliwe jest także poprzez połączenie elicytorów biotycznych z prekursorami, a także z elicytorami abiotycznymi. Działają one synergistycznie pozwalając na uzyskanie wielokrotnie wyższego poziomu syntetyzowanych metabolitów wtórnych [Szpitner i Królicka, 2005].

1.4.3.3. Biotransformacja

Ważnym procesem z farmaceutycznego punktu widzenia jest proces biotransformacji. Komórki roślinne są zdolne do przekształcania podanych egzogennie substratów w oczekiwane związki bioaktywne. Biotransformację cechuje stereospecyficzność przeprowadzanej reakcji dzięki czemu otrzymujemy jednorodne chiralnie metabolity, a także regiospecyficzność, umożliwiającą z kolei pozyskanie związków trudnych do otrzymania przez chemiczną syntezę lub produkcję przez mikroorganizmy. Proces ten umożliwia otrzymanie nowych związków, zwiększa produktywność pożądaných związków bioaktywnych jak również dostarcza istotnych informacji o szlakach biosyntezy różnorodnych metabolitów wtórnych. Reakcje biotransformacji obejmują: redukcję, utlenianie, hydroksylację, acetylację, estryfikację, glikozylację, izomeryzację, metylację, epoksydację. Warunkiem sukcesu procesu biotransformacji są następujące czynniki: obecność enzymów przeprowadzających odpowiednią reakcję; dodawany prekursor lub substrat musi cechować się nietoksycznością dla komórek roślinnych; ważna jest kompartmentacja procesu; proces syntezy produktu reakcji musi przeważać nad jego metabolizowaniem [Ramachandra

Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska 2008; Shilpa i in., 2010]. Biotransformacje przeprowadzone z udziałem roślinnych kultur *in vitro* przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Biotransformacja związków w kulturach *in vitro* (Giri i in., 2001).

Gatunek rośliny	Substrat	Produkt
<i>Acer nikoense</i>	(RS)-rododendrol	2-O- β -D-glukopiranozyd rododendrolu, 2-O- β -D-ksylopiranozylo- (1 β 6)- β -D-glukopiranozyd
<i>Artemisia annua</i>	kwas artemizynowy	estry kwasu artemizynowego
<i>Astasia longa</i>	karwon	dihydrokarwon, izodihydrokarwenol
<i>Capsicum frutescen</i>	kwas ferulowy	kapsaicyna, wanilina
<i>Capsicum frutescens</i>	winblastyna	winkrystyna
<i>Catharantus roseus</i>	hydrochinon	arbutyna
<i>Catharantus roseus</i>	geraniol, nerol, karwon	5 β -hydroksyneodihydroksykarwenol
<i>Centella asiatica</i>	3-demetylotiokolchicyna	tiokolchicinozyd
<i>Coffea arabica</i>	teobromina	kofeina
<i>Coffea arabica</i>	wanilina	β -D-glukozyd waniliny
<i>Crocus sativus</i>	krocetyna	dineapolitanosyl krocetyny
<i>Curcuma zedoaria</i>	germakren	seskwiterpeny typu guaianu
<i>Daucus carota</i>	kodeinon	kodeina
<i>Daucus lanata</i>	β -metylodigitoksyna	β -metylodigioksyna
<i>Eucalyptus perriniana</i>	izoeugenol, eugenol	β -rutynozyd eugenolu, β -gentiobiozyd izoeugenolu
<i>Eucalyptus perriniana</i>	kwas p-aminobenzoesowy	β -D-glukopiranozyd p-aminobenzylowy
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	papaweryna	papawerinol
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	kwas glicyretynowy	3-O- β -D-glukopiranozylo-24-hidroksylo glicyretynian
<i>Lobelias essilifolia</i>	(-)-epikatechina, kwas protokatechowy	7-O- β -D-glukopiranozyd-epiafzelachiny, 3-O- β -D-glukopiranozyd kwasu protokatechowego
<i>Linum flavum</i>	deoksypodophylotoksyna	β -D-glukozyd 5-metoksypodophylotoksyny sekologanina
<i>Lonicera japonica</i>	loganina	(+)-neomentol
<i>Mentha spp.</i>	(-)-menton	L-DOPA
<i>Mucuna pruriens</i>	tyrozyna	6-O-butyrylo-D-glukoza
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	kwas masłowy	geraniol, linalol, α -terpineol
<i>Peganum harmala</i>	octan geraniolu, octan linalolu	ester malonylowy β -D-glukozydu
<i>Penax ginseng</i>	digitoksygenina	digitoksygeniny
<i>Papaver somniferum</i>	sylibina	7-O- β -D-glukopiranozyd sybilijny
<i>Papaver somniferum</i>	kodeinon	kodeina
<i>Pinus radiata</i>	6-n-pentyl-2H-piran-2-one	5-(2-piran-6-yl)pentan-5-ol
<i>Rauwolfia serpentina</i>	hydrochinon	arbutyna
<i>Rhodiola rosea</i>	alkohol trans-cynamonowy	rozawina
<i>Solanum amosum</i>	kwas o- i p-aminobenzoesowy	ester N-acetylo 7-O- β -D-glukopiranozyl kwasu aminobenzoesowego
<i>Spirodela punctata</i>	kwas N-acetyloaminobenzoesowy pochodne cytroneolu i kwasu cytronelowego	pochodne z grupą hydroksylową przy C-6 i C-7 oraz wiązaniem podwójnym przy C-7, C-8 i C-5

1.4.3.4. Immobilizacja

Immobilizacja jest procesem polegającym na unieruchomieniu komórek poprzez związanie ich z powierzchnią nośnika. Jako nośniki wykorzystywane są: alginian wapnia, agar, agaroza, żelatyna oraz żele poliakrylamidowe [Nilsson i in., 1983]. Spośród wymienionych matryc najpopularniejszy jest żel alginianowy ze względu na swoją prostotę oraz relatywny brak toksyczności [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002]. Nośnik ten okazał się być najefektywniejszym dla produkcji ajamalicyny w przypadku komórek *Catharanthus roseus* [Brodellius i Pedersen, 1993]. Istnieją różne metody wiązania nośnika z komórką: „uwięzienie” we wnętrzu nośnika, adsorpcja lub też wiązanie kowalencyjne [Smetanska, 2008]. Immobilizowane komórki mogą zostać wykorzystane jako biokatalizatory przeprowadzające biotransformację prekursorów do pożądaných związków oraz do ich syntezy *de novo* [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002]. Często proces immobilizacji wpływa na zwiększenie produktywności. Immobilizowane na piance poliuretanowej komórki *Capsicum frutescens* produkowały 50-krotnie więcej kapsaicyny w porównaniu z zawiesinami komórkowymi [Johnson i Ravishankar, 1996].

1.5. Przemysłowa produkcja metabolitów wtórnych przez roślinne kultury *in vitro*

Pozyskiwanie metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* jest procesem możliwym do zrealizowania. Ważnym aspektem jest jednak opłacalność biotechnologicznej produkcji związków bioaktywnych. Podjęto próby oszacowania opłacalności syntezy dla kilku związków, jednak opłacalność ekonomiczna procesu okazała się nie być wystarczająca dla podjęcia produkcji [Verpoorte i in., 2002]. Udoskonalenie i rozwój nowych technologii produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* umożliwi w przyszłości większy ich udział na rynku.

Obecnie na skalę przemysłową pozyskiwane są: szikonina w kulturach *Lithospermum erythrorhizon*, berberyina w kulturach *Coptis japonica* oraz sangwinaryna w kulturach *Papaver somniferum* [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002].

Koncern Mitsui Petrochemical Industries Ltd. otrzymuje szikoninę w kulturach zawiesinowych *Lithospermum erythrorhizon*. Proces ten obejmuje dwa etapy, kultura zawiesinowa rośnie początkowo w 200 litrowym bioreaktorze, uzyskana biomasa jest następnie przenoszona do drugiego bioreaktora, gdzie pożywka oraz warunki hodowli

zoptymalizowano pod kątem produkcji szikoniny. Produktywność kultury wynosi 60 mg g⁻¹ w ciągu tygodnia hodowli, wartość ta jest 1000 razy większa w porównaniu do zawartości szikoniny w korzeniach roślin, których tradycyjna uprawa wymaga ponadto 5 - 7 lat [Smetanska, 2008].

Indyjski koncern Bio-Organic Division of the Bhabha Atomic Research Centre prowadzi badania nad możliwością pozyskiwania metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* z kilku roślin. Prace te dotyczą otrzymywania ajmaliny oraz rezerpiny w kulturach *Rauwolfia serpentina*, tebainy, kodeiny oraz morfiny w kulturach *Papaver somniferum*, artemizyny w kulturach *Artemisia annua* [Smetanska, 2008].

1.6. Kwas rozmarynowy – ważny składnik terapeutyczny surowców roślinnych

Kwas rozmarynowy – ester kwasu kawowego oraz kwasu 3,4-dihydroksyfenylo-mlekowego po raz pierwszy jako czysty związek został wyizolowany z liści rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*) przez włoskich chemików Scarpati i Oriente w 1958 roku [Petersen i Simmonds, 2003; Petersen i in., 2009]. Badania nad biosyntezą tego związku w roślinach zapoczątkowali w 1970 roku Ellis i Towers. Podawali oni szereg wyznakowanych radioaktywnie związków (fenyloalanina, tyrozyna, kwas cynamonowy, kwas malonowy, L-DOPA oraz BaCO₃) roślinom *Mentha arvensis* oraz *Mentha piperita*. Wykazali, że to właśnie dwa aromatyczne aminokwasy są wyjściowymi elementami budulcowymi cząsteczki kwasu rozmarynowego. Co ważne składowy element kwasu rozmarynowego jakim jest kwas kawowy powstaje z fenyloalaniny, natomiast kwas 3,4- dihydroksyfenylo-mlekowy jest tworzony w wyniku przemian tyrozyny [Ellis i Towers, 1970]. Wyniki te potwierdziły doświadczenia prowadzone na zawiesinach komórkowych *Coleus blumei* Benth. Komórki zawiesiny wykorzystywały podawane egzogennie radioaktywne izotopy tyrozyny i fenyloalaniny do syntezy cząsteczki kwasu rozmarynowego [Razzaque i Ellis, 1977]. Kolejne badania na zawiesinach komórkowych *Coleus blumei* oraz *Anehusa officinalis* dostarczyły informacji o enzymach zaangażowanych w procesie biosyntezy kwasu rozmarynowego tj.: amoniakoliazie fenyloalaninowej (EC 4.3.1.5), 4-hydroksylazie kwasu cynamonowego (EC 1.14.13.11), ligazie 4-kumaroil-CoA (EC 6.2.1.12), aminotransferazie tyrozynowej (EC 2.6.1.5), jak również reduktazie hydroksyfenylopirogronianowej (EC 1.1.1.237) [Ellis i in., 1979; De-Eknamkul i Ellis 1987a; De-Eknamkul i Ellis 1987b; Karwatzki i in., 1989; Mizukami i Ellis 1991;

Petersen 1991; Petersen i in., 1993; Petersen i Metzger, 1993; Petersen i in., 1994; Petersen 1997]. Schemat szlaku biosyntezy kwasu rozmarynowego przedstawia Rys. 6.

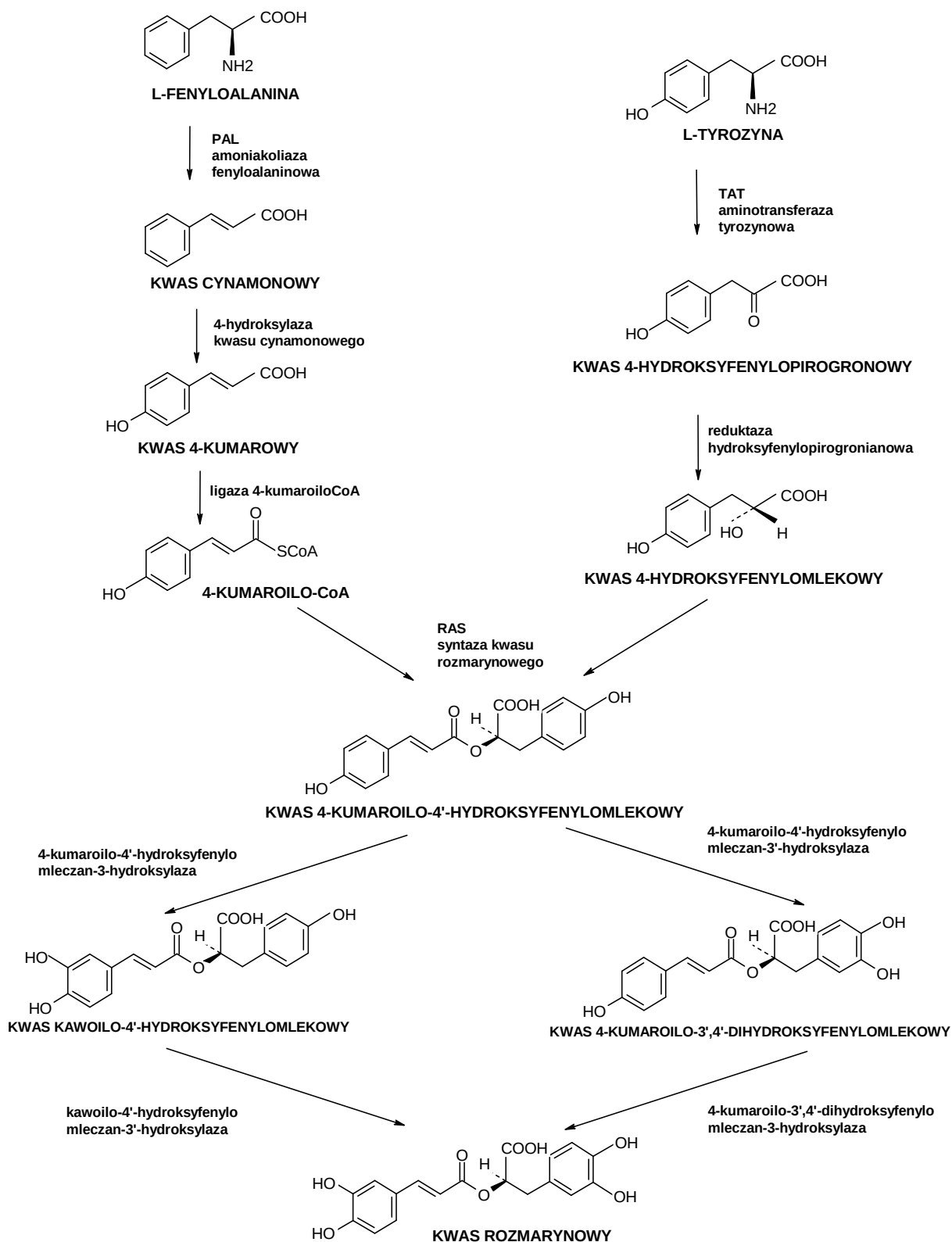
Kwas rozmarynowy występuje powszechnie u gatunków z rodziny *Lamiaceae* oraz *Boraginaceae* [Petersen i Simmonds, 2003]. Ostatnie badania skryningowe potwierdziły jego obecność w 26 innych rodzinach, jest on powszechnie syntetyzowany przez rośliny, począwszy od gromady glewików aż do roślin okrytonasiennych. Z tego powodu nie może być on wyznacznikiem chemotaksonomicznym w odniesieniu do rodzin botanicznych [Petersen i in., 2009]. W roślinach kwas rozmarynowy występuje w formie wolnej, zestryfikowanej, glikozydowej oraz w formie połączeń o charakterze oligomerów. Jako pochodne kwasu rozmarynowego w ekstraktach roślinnych występują: kwas litospermowy, kwas litospermowy B (nazywany także kwasem salwianolowym B), kwasy melitrykowe A i B, kwas sagerenowy, kwasy salwianolowe K i L, robdosiina oraz erytrychina. Rzadkimi formami są glikozydy kwasu rozmarynowego, należą do nich m.in.: 4'-O- β -D-glukopiranozyd oraz 4,4'-O-di- β -D-glukopiranozyd kwasu rozmarynowego [Fecka i in., 2002; Petersen i Simmonds, 2003; Bulgakov i in., 2011].

Badania wykazały obecność kwasu rozmarynowego w ponad stu gatunkach roślin w ilościach od 0,01 mg do 78 mg na 1 g surowca. Jego bogatym źródłem są rośliny prezentowane w Tabeli 9. [Fecka i in., 2002]. W roślinach kwas rozmarynowy jest stale akumulowanym metabolitem obronnym w stosunku do różnych patogenów a także roślinożerców dzięki swoim taninopodobnym właściwościom [Szabo i in., 1999].

Tabela 9. Zawartości kwasu rozmarynowego w wybranych surowcach leczniczych.

GATUNEK	SUROWIEC	ZAWARTOŚĆ % KWASU ROZMARYNOWEGO
<i>Lycopus europaeus</i> L.	ziele	3, 7-4,2
<i>Melissa officinalis</i> L.	liście	0,12-6,5
<i>Mentha piperita</i> L.	liście	0,31
<i>Perilla frutescens</i> L.	liście	0,1-7,8
<i>Prunella vulgaris</i> L.	ziele	6,1-7,4
<i>Origanum vulgare</i> L.	ziele	0,12-6,8
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	liście	0,2-4,3
<i>Salvia officinalis</i> L.	liście	0,2-4,2
<i>Thymus vulgaris</i> L.	ziele	0,43
<i>Thymus serpyllum</i> L.	ziele	0,11-0,45

Źródło: Fecka i in., (2002). Kwas rozmarynowy, ważny składnik terapeutyczny niektórych surowców roślinnych. Postępy Fitoterapii 8: 21.



Rys. 6. Szlak biosyntezy kwasu rozmarynowego.

źródło: Petersen M., Simmonds M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 123; oraz Petersen i in., (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70: 1664.

Właściwości biologiczne kwasu rozmarynowego są dobrze udokumentowane. Były one przedmiotem wielu badań naukowych i są prezentowane w ponad 250 pracach. Obecnie obserwujemy ponowny wzrost zainteresowania tym związkiem zarówno w odniesieniu do różnych źródeł oraz metod jego pozyskiwania, ale także poszukiwania jego nowych właściwości [Bulgakov i in., 2011].

Jako najważniejsze należy wymienić jego działanie przeciwutleniające [Fecka i in., 2002; Petersen i Simmonds, 2003; Park i in., 2008; Nowakowska i Pikul, 2011], molekuła ta chroni przed szkodliwym wpływem promieniowania UV, reaktywnymi formami tlenu oraz wolnymi rodnikami. Właściwości te wynikają z budowy chemicznej cząsteczki kwasu rozmarynowego. Posiada on 4 grupy hydroksylowe położone względem siebie w pozycji *orto* oraz podwójne wiązanie obecne w łańcuchu węglowym. Aktywność przeciwutleniająca oraz przeciwwolnorodnikowa orto-dihydroksyli wynika z ich właściwości oksydacyjno-redukcyjnych (donor protonów) oraz zdolności do kompleksowania jonów metali (głównie żelaza i miedzi) uczestniczących w reakcji Fentona, tj. konwersji anionorodnika ponadtlenkowego w reaktywny rodnik wodorotlenkowy odpowiedzialny za efekty cytotoksyczne. Kwas rozmarynowy, wobec przemian anionorodnika ponadtlenkowego wykazuje aktywność znacznie wyższą w porównaniu z witaminą C [Fecka i in., 2002]. Kwas rozmarynowy dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym blokuje powstawanie wolnych rodników przez co stabilizuje i chroni błony biologiczne przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [Peréz-Fons i in., 2010]. Związek ten wpływał również na wzrost stabilności liposomów poddawanych procesowi utleniania [Panya i in., 2010]. Kwas rozmarynowy znacząco obniżał tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT ang. ROS Reactive Oxygen Species) zmniejszał także uwalnianie interleukiny-6 w przypadku linii ludzkich keranocytów poddanych działaniu promieniowania UVB [Vostalova i in., 2010]. Ekstrakt *M. longifolia* zawierający kwas rozmarynowy chronił ludzkie keranocyty przed działaniem stresu oksydacyjnego. Obserwowano zmniejszenie uszkodzeń DNA i białek, zmniejszenie peroksydacji lipidów, zachowana została pula glutationu i dysmutazy ponadtlenkowej [Berselli i in., 2010]. Wykazano również, że kwas rozmarynowy wpływał na zmniejszenie częstotliwości uszkodzeń DNA, pęknięć oraz utraty części chromosomów powstałych w wyniku działania doksorubicyny [Furtado i in., 2010]. Zdolność inaktywowania wolnych rodników oraz znoszenia skutków ich toksycznego wpływu na cząsteczki kwasów nukleinowych, białek, lipidów i kwasów tłuszczowych, również w obrębie błon biologicznych, stanowi

naturalny czynnik prewencji procesów kancerogenezy [Fecka i in., 2002]. Ostatnie dane literaturowe potwierdzają antymutagenne właściwości kwasu rozmarynowego [Furtado i in., 2008]. Wykazano ponadto, że długoterminowe podawanie zwierzętom kwasu rozmarynowego w diecie może być wystarczalne w chemoprewencji nowotworów [Paluszczak i in., 2010]. Związek ten wykazuje także działanie przeciwzapalne [Kelm i in., 2000; Osakabe i in., 2004; Nowakowska i Pikul, 2011], działa hamująco na układ dopełniacza, pełniącego istotną rolę w odczynie zapalnym. Obniża również poziom syntezy mediatorów stanu zapalnego: prostaglandyn, prostacyklin oraz tromboksanu [Fecka i in., 2002]. Kwas rozmarynowy hamował proces angiogenezy [Huang i Zheng, 2006], wykazywał działanie antyproliferacyjne, obserwowany pod jego wpływem efekt antytrombinowy powstaje przypuszczalnie na drodze zapobiegania agregacji płytek krwi lub też promocji procesu fibrynolizy [Fecka i in., 2002]. Związek ten posiada nieznaczne właściwości przeciwalergiczne [Fecka i in., 2002; Park i in., 2008]. Wykazuje także działanie przeciwhormonalne. Współcześnie we wspomagającej terapii zespołu Gravesa zalecane bywają zioła zawierające w swoim składzie kwas rozmarynowy. Przyczyną choroby jest wytwarzanie immunoglobulin IgG, które pobudzając receptory tyreotropinowe prowadzą do powiększenia tarczycy oraz nadmiernej i niekontrolowanej biosyntezy trijodotyroniny (T₃) i tyroksyny (T₄). Prekursorem hormonów tarczycy T₄ i T₃ jest białko tyreoglobulina, zawierające w swojej cząsteczce ok. 70% jodu w postaci nieaktywnych prekursorów monojodotyrozyny (MIT) i dijonotyrozyny (DIT). Jod uwalniany jest z nieaktywnych aminokwasów dzięki aktywności enzymu dejodynazy. Kwas rozmarynowy hamuje aktywność dejodynazy jodotyroniny i w konsekwencji enzymatyczne odszczepienie jodu od MIT i DIT [Fecka i in., 2002]. Związek ten wywiera działanie ochronne na lipoproteiny osocza, w tym na frakcję LDL, głównego inicjatora procesu arterogenezy [Fecka i in., 2002]. Ostatnie badania dowiodły, że ekstrakt z oregano zawierający w swoim składzie kwas rozmarynowy wykazywał aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Helicobacter pylori*. Bakteria ta powoduje przewlekłe zapalenie żołądka, jest ona łączona z powstawaniem wrzodów żołądka i dwunastnicy a także z rozwojem nowotworu żołądka [Chun i in., 2005]. Ekstrakt z oregano wykazywał również aktywność przeciwbakteryjną skierowaną przeciwko *Listeria monocytogenes*. Jest to zjadliwy patogen przenoszony przez żywność, powodujący listeriozę, chorobę o stosunkowo wysokiej śmiertelności [Seaberg i in., 2003]. Dane literaturowe ujawniają również przeciwwirusowe działanie tego związku skierowane przeciwko wirusom

HSV-1 (wirus opryszczki pospolitej *Herpes simplex virus*) [Borkowski i in., 1996; Sanchez-Medina i in., 2007] oraz HIV-1 (ludzki wirus niedoboru odporności *Human immunodeficiency virus*). Kwas rozmarynowy jako niespecyficzny inhibitor enzymatyczny obniża aktywność enzymów kluczowych dla procesu replikacji wirusa HIV tj. odwrotnej transkryptazy oraz integrazy. Enzymy te uczestniczą w syntezie nici komplementarnego wirusowego DNA na matrycy RNA [Mazumder i in., 1997; Hooker i in., 2001, Tewtrakul i in., 2003; Dubois i in., 2008]. Kwas rozmarynowy zwiększa zdolności poznawcze [Park i in., 2010], wykazuje również działanie neuroprotekcyjne [Lee i in., 2008a]. Związek ten w niskich stężeniach 0,9-3,7 $\mu\text{M L}^{-1}$, hamował peroksydację lipidów i tworzenie reaktywnych form tlenu w tkance nerwowej [Fallarini i in., 2009]. Kwas rozmarynowy ma zdolność hamowania agregacji β -amyloidu, dlatego też może być wykorzystany w leczeniu choroby Alzheimera [Iuvone i in., 2006, Hamaguchi i in., 2009]. Kwas rozmarynowy wykazuje również działanie kardioprotekcyjne [Psotova i in., 2005], hepatoprotekcyjne [Osakabe i in., 2002; Lima i in., 2006] oraz fotoprotekcyjne [Yamada i in., 2006; Sánchez-Campillo i in., 2009]. Przeprowadzono doświadczenie, w którym kwas kawowy oraz rozmarynowy podawano doustnie bądź też aplikowano na skórę brzucha myszy pozbawionych sierści. Zwierzęta poddano następnie działaniu promieniowania UV. Zaobserwowano hamowanie wytwarzania RFT pod wpływem tych fenoli [Yamada i in., 2006]. Ostatnie badania potwierdzają że kwas rozmarynowy jako endogenne czynniki fotoprotekcyjne aktywuje mechanizmy obronne organizmu poprzez regulowanie aktywności tyrozynazy oraz stymulację syntezy melaniny [Sánchez-Campillo i in., 2009]. W stosunku do enzymów kwas rozmarynowy wykazuje cechy niespecyficznego inhibitora, w różnym stopniu obniża on aktywność wielu enzymów m.in.: α -amylazy, cyklooksygenazy, dekarboksylazy ornitynowej, heksozaminidazy, hialuronidazy, lipooksygenazy, β -reduktazy aldozowej, cyklazy adenylowej, karboksypeptydazy A oraz dejodynazy jodotyroniny [Fecka i in., 2002]. Ze względu na inhibicję α -amylazy przez kwas rozmarynowy roślinne ekstrakty zawierające ten związek niosą potencjalne korzyści w leczeniu cukrzycy za pomocą diety [Shetty, 2007]. Dane literaturowe podają również że kwas rozmarynowy jest przypuszczalnie odpowiedzialny za uspokajające działanie niektórych surowców. W pojedynczej dawce wynoszącej 30 mg kg^{-1} masy ciała związek ten osłabiał aktywność spontaniczną zwierząt doświadczalnych oraz aktywność stymulowaną amfetaminą [Fecka i in., 2002]. Wykazuje on również działanie antydepresyjne [Takeda i in., 2002; Ito i in., 2008].

Podsumowując opisane właściwości biologiczne kwasu rozmarynowego oraz wielowiekowe doświadczenia medycyny naturalnej dotyczące leczniczych właściwości roślin z rodziny *Lamiaceae* (m.in. *Mentha spp*, *Melisa officinalis* i wiele innych) można wysunąć wniosek, że wprowadzenie ich do codziennej diety może przynieść pozytywne efekty w profilaktyce oraz terapii niektórych schorzeń o podłożu zapalnym: wrzodach trawiennych, astmie oskrzelowej, chorobie niedokrwiennej serca, miażdżycy, artretyzmie, zaćmie jak również w prewencji chorób nowotworowych [Fecka i in., 2002; Park i in., 2008; Nowakowska i Pikul, 2011].

Przemysł farmaceutyczny oferuje szereg preparatów, maści oraz mieszanek ziołowych zawierających w swoim składzie kwas rozmarynowy (należą tu powszechnie stosowane herbaty ziołowe na bazie liści mięty pieprzowej wymienione w rozdziale 1.2.2.). Żaden z krajowych preparatów o kompozycji opartej o te surowce nie podlega jednak standaryzacji na obecność kwasu rozmarynowego lub ogólnej sumy polifenoli [Fecka i in., 2002]. Brak norm określających minimalny, dopuszczający do obrotu w lecznictwie poziom kwasu rozmarynowego może być przyczyną różnic w efekcie terapeutycznym leków produkowanych na bazie tego samego surowca przez różnych producentów, a nawet niejednorodności preparatów tej samej wytwórni pochodzących z kolejnych zbiorów lub od innych dostawców. Należy więc zadbać aby surowce i preparaty posiadały odpowiedni jakościowo oraz powtarzalny ilościowo skład metabolitów wtórnych [Fecka i in., 2002].

Kwas rozmarynowy wykorzystywany jest również w przemyśle spożywczym. Gatunki zawierające ten związek np.: oregano, tymianek, bazylia, rozmaryn są stosowane jako źródło antyoksydantów konserwujących żywność oraz dla poprawy i utrzymania trwałości antocyjanów oraz innych barwników w sokach z owoców jagodowych [Shetty, 2007]. W Japonii ekstrakty z *Perilla frutescens* (zawierające duże ilości kwasu rozmarynowego) są stosowane do wydłużenia trwałości świeżych owoców morza [Park i in., 2008].

Kosmetyki zawierające w swoim składzie metabolity roślinne stają się obecnie coraz bardziej popularne. Wraz ze wzrostem świadomości społeczeństwa rośnie zapotrzebowanie na produkty nieprzetworzone oraz produkty pochodzenia naturalnego. Zarówno metabolity jak i ekstrakty roślinne charakteryzujące się antyoksydacyjnymi, przeciwzapalnymi właściwościami mogą skutecznie chronić skórę przed uszkodzeniami powodowanymi przez promieniowanie UV. Ekstrakty z rodziny *Lamiaceae* jak bazylia, lawenda, mięta, rozmaryn, szalwia czy tymianek zawierające kwas rozmarynowy oraz

inne związki fenolowe są powszechnie wykorzystywane w różnorodnych produktach kosmetycznych. Są to m.in.: filtry przeciwsłoneczne chroniące skórę przed promieniowaniem UV, kosmetyki pomagające ukryć różne niedoskonałości skóry (zmarszczki), a także produkty antybakteryjne [Lee i in., 2011]. Grupa koreańskich naukowców zakapsułkowała kwas rozmarynowy do polikaprolaktonowych (PCL) mikrosfer. Emulsje i kremy zawierające kwas rozmarynowy w mikrosferach cechowały się wyższą stabilnością tego związku w porównaniu do emulsji zawierających sam antyoksydant [Kim i in., 2010].

Nieliczne badania dotyczyły natomiast biodostępności oraz metabolizmu kwasu rozmarynowego w organizmach zwierzęcych i człowieka jak również sposobu jego wydalania. W moczu szczurów, którym doustnie podawano kwas rozmarynowy jako 20% etanolowy roztwór w dawce 200 mg kg^{-1} , zidentyfikowano obecność siedmiu metabolitów: 4-*O*-siarczanu kwasu *trans*-kawowego (1), 3-*O*-siarczanu kwasu *trans m*-kumarowego (2), 4-*O*-siarczanu kwasu *trans*-ferulowego (3), kwasu *trans*-kawowego (4), kwasu *m*-hydroksyfenylopropionowego (5), kwasu *trans m*-kumarowego (6) i niezmienionego kwasu rozmarynowego (7). Kwas rozmarynowy ulegał zatem częściowej hydrolizie, selektywnej *para*-dehydroksylacji, metylacji oraz sprzęganiu z kwasem siarkowym. Ponadto obecność metabolitów 2, 3, 5 i 6 wykazano w osoczu, nie wykryto ich natomiast w żółci, co wskazuje że kwas rozmarynowy wydalany jest z moczem nie z żółcią. Poziom wydalonej z moczem sumy metabolitów kwasu rozmarynowego (związki 1-7) po 48 godzinach od doustnego podania oszacowano na 31,8% podanej dawki [Nakazawa i Ohsawa, 1998]. Późniejsze badania w których szczurom podawano doustnie ekstrakt *Perilla frutescens* (jego głównym składnikiem był kwas rozmarynowy) potwierdziły obecność w moczu oraz osoczu zwierząt związków takich jak: 4-*O*-siarczan kwasu *trans*-kawowego, 4-*O*-siarczan kwasu *trans*-ferulowego, 3-*O*-siarczan kwasu *trans m*-kumarowego, kwas *trans*-kawowy, kwas *m*-hydroksyfenylopropionowy oraz kwasu *trans m*-kumarowego. Gdy ten sam ekstrakt podano ludziom w ich moczu, a także w osoczu wykryto jedynie obecność kwasu 1-*O*-(2,4,5-trimetoksycynamonowo)- β -glukuronowego. Powstaje on w przewodzie pokarmowym z kwasu rozmarynowego w wyniku hydrolitycznego otwarcia pierścienia, hydroksylacji, metylacji oraz sprzęgania z kwasem glukuronowym [Nakazawa i Ohsawa, 2000]. Natomiast w innych badaniach jako metabolity kwasu rozmarynowego w moczu szczurów, którym z pokarmem podawano kwas rozmarynowy w dawce 50 mg kg^{-1} masy ciała wykazano obecność związków takich

jak: niezmieniony kwas rozmarynowy, jego metylowa pochodna, kwas kawowy, kwas ferulowy oraz kwas *m*-kumarowy. W osoczu zwierząt stwierdzono obecność niezmienionego kwasu rozmarynowego, jego metylowej pochodnej oraz kwasu *m*-kumarowego. Naukowcy potwierdzili również fakt, że wykryte metabolity kwasu rozmarynowego w organizmie szczurów występowały w większości jako pochodne z kwasem siarkowym i/lub kwasem glukuronowym [Baba i in., 2004]. W moczu mężczyzn, którym podawano ekstrakt *Perilla frutescens* zawierający 200 mg kwasu rozmarynowego wykazano obecność następujących jego metabolitów: niezmienionego kwasu rozmarynowego, jego metylowej pochodnej, kwasu kawowego, kwasu ferulowego oraz śladowych ilości kwasu *m*-kumarowego. Poziom wydalonej z moczem sumy metabolitów kwasu rozmarynowego wynosił 6,3 +/- 2% spożytej dawki. Co więcej 75% metabolitów kwasu rozmarynowego było wydalone już po 6 godzinach od spożycia ekstraktu roślinnego. W osoczu wykazano natomiast obecność: niezmienionego kwasu rozmarynowego, jego metylowej pochodnej oraz kwasu ferulowego. Maksymalne stężenie tych związków obserwowano już po 0,5 godziny od spożycia ekstraktu. Większość metabolitów kwasu rozmarynowego wykrytych w moczu, czy też w osoczu występowała jako związki sprzężone z kwasem glukuronowym i/lub jako siarczany [Baba i in., 2005].

1.6.1. Produkcja kwasu rozmarynowego w roślinnych kulturach *in vitro*

Biosynteza kwasu rozmarynowego w hodowlach *in vitro* została potwierdzona dla wielu gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae*: *Coleus blumei*, *Lavandula vera*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Salvia miltiorrhiza*, *Zataria multiflora*. Pozyskiwano go również w kulturach roślin z rodziny *Boraginaceae*: *Anchusa officinalis*, *Eritrichium sericeum*, *Lithospermum erythrorhizon* [Shetty, 2007; Kintzios, 2008; Matkowski, 2008; Bulgakov i in., 2011]. Wykorzystane zostały różne typy kultur *in vitro*: kultury kalusa, kultury zawiesin komórkowych, kultury organów a także kultury korzeni włósnikowatych. Podjęte prace kończyły się różnym powodzeniem, zawartość kwasu rozmarynowego syntetyzowanego w tych kulturach różniła się znacząco, a w otrzymanych ekstraktach wykazano ponadto obecność kilku jego pochodnych (kwasy litospermowe oraz salwianolowe) bądź też intermediatów ze szlaku jego biosyntezy (kwas kawowy).

Akumulacja kwasu rozmarynowego w kulturach *in vitro* uzależniona jest w dużej mierze od składu pożywki. Dużą rolę odgrywa stężenie cukru. Gertlowski i Petersen wykazały, że jedynie sacharoza stymulowała syntezę kwasu rozmarynowego w kulturach zawiesinowych *Coleus blumei*. Spośród przebadanych stężeń 1-6% najbardziej efektywne okazało się stężenie 5%, w tym przypadku akumulacja kwasu rozmarynowego osiągnęła 12% s.m. Glukoza i fruktoza stosowane samodzielnie w stężeniach 2 lub 4% obniżały tempo wzrostu zawiesiny w porównaniu do pożywek zawierających sacharozę jako źródło węgla. Pożywka z 4% fruktozą powodowała ponadto opóźnienie oraz obniżenie syntezy kwasu rozmarynowego o ok. 50% [Gertlowski i Petersen, 1993]. W kulturach *Coleus blumei* zwiększenie zawartości sacharozy z 2,5 do 7,5% spowodowało zwiększenie produkcji kwasu rozmarynowego z poziomu 0,8 do 3,3 g L⁻¹ [Misawa, 1985]. Podobnie produkcja tego metabolitu w kulturach zawiesinowych *Salvia officinalis* osiągnęła wartość 3,5 g L⁻¹ gdy stężenie sacharozy wynosiło 5%. W przypadku pożywki zawierającej 3% sacharozy kwas rozmarynowy był akumulowany w ilości 0,7 g L⁻¹ [Whitaker i in., 1984]. Zawiesiny komórkowe *Lavandula vera* hodowane na pożywce o zmodyfikowanej zawartości soli azotowych (KNO₃ oraz NH₄NO₃) syntetyzowały ten antyoksydant na poziomie 170 mg L⁻¹ [Ilieva i Pavlov, 1999]. Zoptymalizowanie składu pożywki w odniesieniu do jonów NH₄⁺, NO₃⁻ oraz H₂PO₄⁻ dla tej samej zawiesiny komórkowej spowodowało 27-krotne zwiększenie akumulacji kwasu rozmarynowego. Synteza tego metabolitu osiągnęła wartość 1786,74 mg L⁻¹ [Pavlov i in., 2000]. Podwyższenie temperatury hodowli z 28 do 30°C spowodowało natomiast zwiększenie akumulacji kwasu rozmarynowego do 3 g L⁻¹ [Georgiev i in., 2004]. W zawiesinach komórkowych *Lavandula vera* hodowanych na pożywkach wzbogaconych o fenyloalaninę kwas rozmarynowy był syntetyzowany na poziomie 87 mg L⁻¹ [Pavlov i Ilieva, 1999].

W wielu pracach wykazano zwiększenie akumulacji kwasu rozmarynowego pod wpływem działania elicytorów. Jasmoniany zostały wykorzystane w celu zintensyfikowania syntezy kwasu rozmarynowego w kulturach zawiesinowych *Coleus blumei* [Szabo i in., 1999], *Lithospermum erythrorhizon* [Mizukami i in., 1993; Ogata i in., 2004; Tsuruga i in., 2006] *Lavandula officinalis* [Nitzsche i in., 2004] oraz *Lavandula vera* [Georgiev i in., 2007b]. Pozytywne efekty odnotowano również w przypadku zastosowania YE w kulturach zawiesinowych *Orthosiphon aristatus* [Sumaryono i in., 1991] oraz *Lithospermum erythrorhizon* [Mizukami i in., 1992; Ogata i in., 2004].

Wysoką zawartość kwasu rozmarynowego akumulowały także kultury transformowane wielu gatunków. W kulturach korzeni włóśnikowatych *Salvia officinalis* kwas rozmarynowy stanowił 4,5% s.m. [Grzegorzczuk i in., 2006] jego akumulacja wyniosła 116 mg g⁻¹ s.m. w kulturach korzeni włóśnikowatych *Agastache rugosa* [Lee i in., 2008b] i aż 11% s.m. w transformowanych kulturach kalusowych *Coleus blumei* Benth hodowanych na pożywce z dodatkiem fenyloalaniny [Bauer i in., 2004]. Dodanie ekstraktu drożdżowego do kultury korzeni transformowanych *Salvia miltiorrhiza* stymulowało wzrost biomasy, a także indukowało produkcję kwasu rozmarynowego i naftochinonów. Natomiast po dodaniu elicytora do kultur narśli tumorowych tego gatunku przyrost suchej masy, jak również akumulacja kwasu rozmarynowego uległy obniżeniu. Jedynie poziom naftochinonów w kulturze był wyższy niż w kontroli [Chen i in., 2001]. Zwiększenie akumulacji kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni transformowanych *Coleus forskohlii* powodowały również YE, SA oraz MeJA [Li i in., 2005].

Źródła literaturowe podają, iż kwas rozmarynowy może być akumulowany w bardzo dużych ilościach. Związek ten stanowił 21% s.m. w zawieszynie komórkowej *Coleus blumei* [Ulbrich i in., 1985]. Największą jak dotąd zawartość kwasu rozmarynowego - 36% s.m. odnotowano w przypadku zawiesiny komórkowej *Salvia officinalis* [Hippolyte i in., 1992].

CEL PRACY

Związki fenolowe gatunków *Mentha spp.* uprawianych w warunkach polowych były już przedmiotem badań fitochemicznych dzięki którym zidentyfikowano występujące w nich metabolity wtórne. Istnieją również doniesienia na temat ich zróżnicowania chemotaksonomicznego oraz ilościowej zawartości. Nieliczne badania dotyczą natomiast biosyntezy metabolitów wtórnych w mięcie uprawianej w kulturach *in vitro*. Ponieważ warunki *in vitro* są znacząco różne od warunków polowych, należy się spodziewać, że profile fenolowe mogą się też zasadniczo różnić. Zróżnicowana może być także zawartość poszczególnych związków w zależności od typu kultury, warunków hodowli jak również pod wpływem stosowania elicytorów.

Z powyższej hipotezy wynikają szczegółowe cele przeprowadzonych badań:

- Izolacja i identyfikacja związków fenolowych z części nadziemnych *Mentha longifolia* L. oraz opracowanie metod analitycznych ich oznaczania;
- Określenie optymalnych warunków indukcji kultur kalusowych i doboru odpowiednich eksplantatów pierwotnych, oraz określenie wpływu zastosowanych w różnych proporcjach regulatorów wzrostu roślin na zawartość metabolitów wtórnych;
- Wyrowadzenie z uzyskanych tkanek kalusowych kultur zawiesinowych;
- Porównanie profili związków fenolowych *Mentha longifolia* L. i *Mentha × piperita* L. oraz oznaczenie zawartości poszczególnych związków w ekstraktach z roślin z uprawy polowej, z roślin pochodzących z kultur *in vitro*, z kultur kalusowych oraz z kultur zawiesin komórkowych;
- Sprawdzenie wpływu wybranych elicytorów na produkcję metabolitów wtórnych w zawiesinie komórkowej *M. piperita*.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki badań stanowią część prac fitochemicznych oraz biotechnologicznych, jakie prowadzono w trakcie realizacji projektu NUTRA-SNACK (Ready to eat food for breakfast and sport activity with high content of nutraceuticals, reducing a disease risk and promoting public health) w 6 Programie Ramowym Unii Europejskiej. Miały one na celu wytwarzanie związków naturalnych, wykazujących prozdrowotne działanie przy zastosowaniu metod *in vitro*, a następnie wykorzystaniu ich jako dodatków do żywności i produkcji nutraceutyków.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał roślinny

Obiektem badań były dwa gatunki mięty: *Mentha longifolia* (mięta długolistna) subsp. *longifolia* (L.) Huds oraz *Mentha* × *piperita* (L.) (mięta pieprzowa) var. *piperita*. Nasiona otrzymano z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Radzików, Polska.

Część nasion została wysiana na poletku doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach w czerwcu 2006 (Fot.1). Ulistnione szczyty pędów zbierano sukcesywnie przed zakwitnięciem pąków kwiatowych (czerwiec - sierpień 2007). Pędy suszono w suszarni w stałej temperaturze 35°C, następnie zostały one drobno zmielone w młynku elektrycznym. Tak przygotowany materiał posłużył do wyodrębniania frakcji flawonoidowej z części nadziemnych *Mentha longifolia*.

Pozostałe nasiona po sterylizacji wykładano na pożywkę LS (pożywka Linsmaiera i Skooga, 1965) do siewu. Otrzymane rośliny polowe oraz te pochodzące z hodowli *in vitro* były materiałem wyjściowym do indukcji kalusa, który posłużył następnie do wyprowadzenia zawiesin komórkowych.



A



B

Fot. 1. Rośliny *M. longifolia* (A) i *M. piperita* (B) rosnące na poletku doświadczalnym IUNG w Puławach

3.2. Wyodrębnianie frakcji fenolowej z części nadziemnych *Mentha longifolia*

3.2.1. Dobór rozpuszczalnika do ekstrakcji

Zmielone części nadziemne *M. longifolia* (500 mg) poddano ekstrakcji. Jako ekstrahenty wykorzystano szereg rozpuszczalników takich jak: metanol, chloroform, octan etylu, heksan oraz woda. Ekstrakcje przeprowadzono na gorąco lub na zimno.

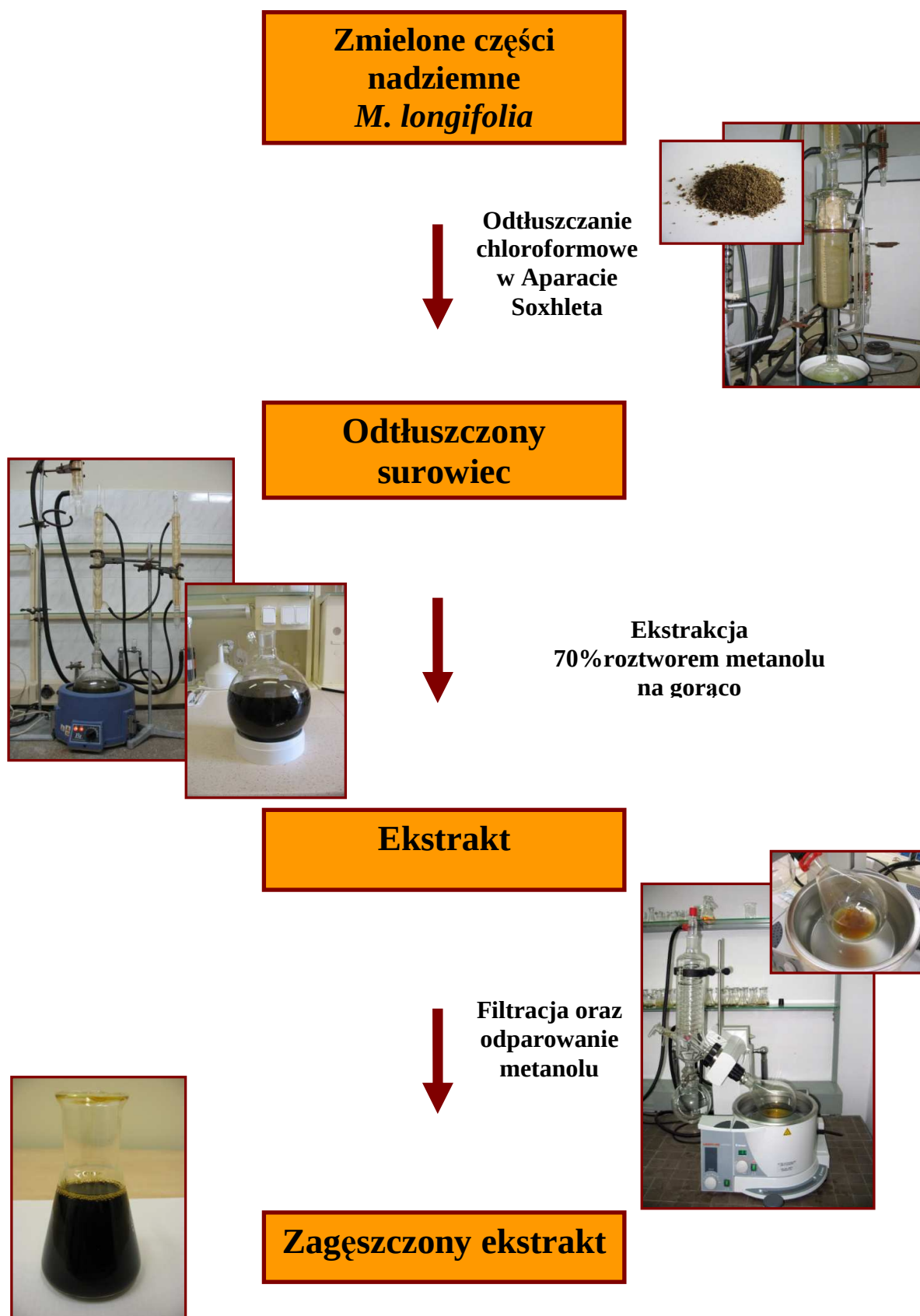
Przeprowadzono następujące ekstrakcje:

- ekstrakcja 80% roztworem MeOH (v/v) na zimno (50 ml) – 24 godz.
- ekstrakcja 30% roztworem MeOH (v/v) na zimno (50 ml) – 24 godz.
- ekstrakcja 70% roztworem MeOH (v/v) na gorąco (50 ml) – 1 godz.
- ekstrakcja 30% roztworem MeOH (v/v) na gorąco (50 ml) – 1 godz.
- ekstrakcja chloroformem na gorąco (50 ml CHCl₃) – 1 godz.
- ekstrakcja octanem etylu na gorąco (50 ml CH₃COOC₂H₅) – 1 godz.
- ekstrakcja heksanem na gorąco (50 ml C₆H₁₄) – 1 godz.
- ekstrakcja wodą na zimno (50 ml) – 24 godz.
- ekstrakcja wodą na gorąco (50 ml) – 1 godz.

Otrzymane ekstrakty przesączono, odparowano na wyparce próżniowej, rozpuszczono w 2 ml odpowiedniego rozpuszczalnika i poddano analizie chromatograficznej. Prace te miały na celu wybór najefektywniejszego ekstrahenta.

3.2.2. Ekstrakcja

Drobno zmielone części nadziemne *Mentha longifolia* odtłuszczono chloroformem w aparacie Soxhleta w czasie 40 godzin. Ekstrakt chloroformowy, po stwierdzeniu braku obecności związków fenolowych, przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej, wyłączono z badań. Po wysuszeniu, odtłuszczony materiał (150 g) poddano ekstrakcji 70% roztworem metanolu na gorąco. Materiał roślinny gotowano w 3 litrach 70% MeOH pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę, przesączono, a następnie ekstrahowano jeszcze dwukrotnie w tych samych warunkach. Uzyskane w ten sposób ekstrakty połączono i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do konsystencji syropu. Proces otrzymywania ekstraktu z części nadziemnych *M. longifolia* prezentuje Rys. 7.



Rys. 7. Etapy procesu otrzymywania ekstraktu z części nadziemnych *M. longifolia*.

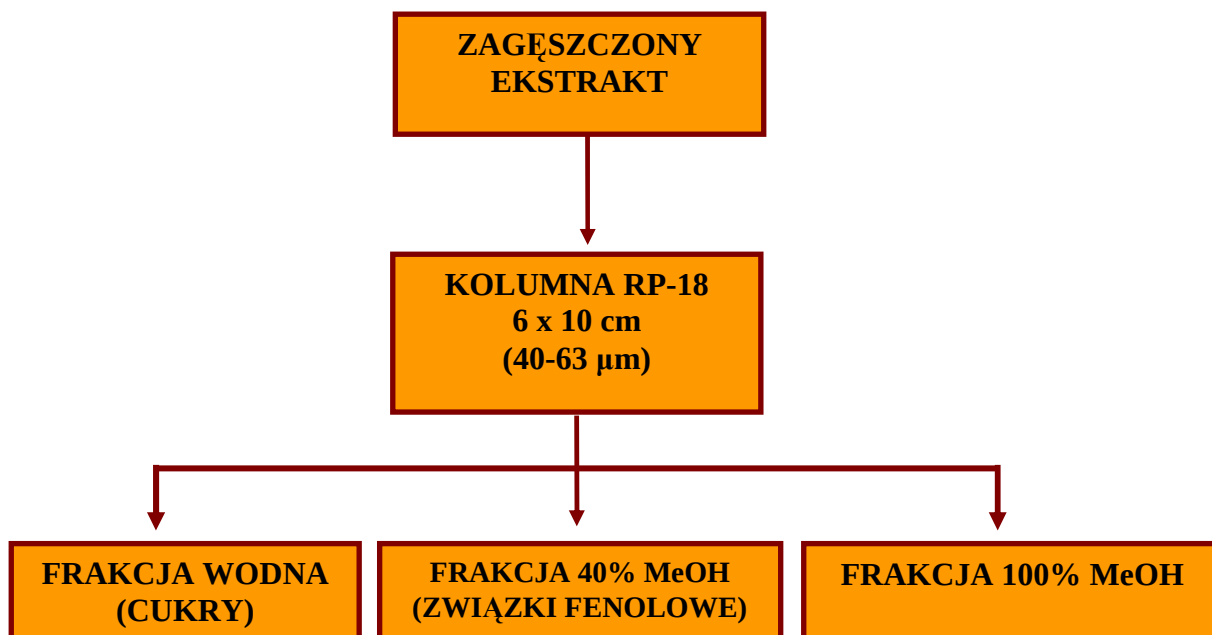
3.2.3. Oczyszczanie ekstraktu - ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Otrzymany we wcześniejszym etapie prac (3.2.2.) zagęszczony ekstrakt został rozpuszczony w wodzie (50 ml), a następnie naniesiony na krótką szklaną kolumnę (6 x 10 cm) wypełnioną nośnikiem RP-18 (LiChroprep RP-18; 40-63µm firmy Merck), kondycjonowaną uprzednio metanolem, a następnie wodą (Fot. 2).



Fot. 2. Kolumna na której przeprowadzono ekstrakcję do fazy stałej

Po naniesieniu ekstraktu na złożę chromatograficzne, kolumnę eluowano stosując różne rozpuszczalniki. Początkowo kolumnę przemywano wodą w celu usunięcia cukrowców. Kolejnym zastosowanym rozpuszczalnikiem był 40% MeOH, który posłużył do wymycia zawieszonych na złożu związków fenolowych. Ostatecznie kolumnę eluowano czystym metanolem. Schemat oczyszczenia frakcji flawonoidowej przedstawiono na Rys. 8. Eluaty z kolumny analizowano techniką chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymaną w ten sposób frakcję fenolową zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem.



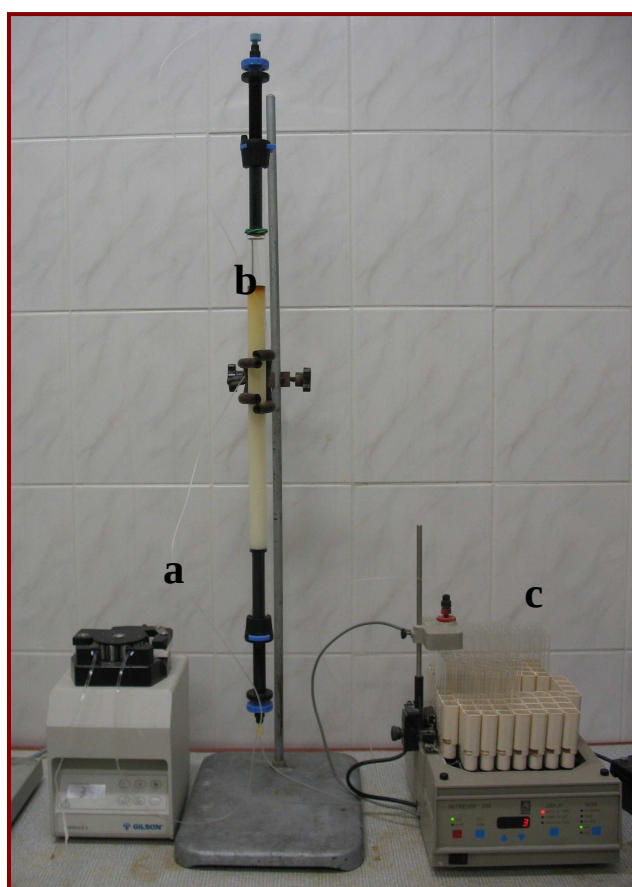
Rys. 8. Schemat procesu ekstrakcji do fazy stałej

3.3. Rozdział frakcji fenolowej

Frację fenolową zagęszczono prawie do sucha, rozpuszczono w metanolu a następnie naniesiono na kolumnę preparatywną (3,5 × 40 cm) wypełnioną złożem Sephadex LH-20 (25-100 μm; Pharmacia; Szwecja). Kolumnę eluowano metanolem z przepływem grawitacyjnym. Prędkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wynosiła 0,6 mL min⁻¹. Wycieki z kolumny - 10 ml frakcje zbierano do probówek umieszczonych w kolektorze frakcji (Retriver™ 500). Monitorowano je metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach celulozowych (DC-Alufolien Cellulose, Merck). Frakcje chromatograficznie jednorodne łączono i zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano łącznie 9 frakcji, z których każda zawierała po dwa - cztery związki fenolowe. Poddano je analizie z zastosowaniem ultrasprawnego chromatografu cieczowego Waters ACQUITY (3.13.3).

3.4. Wyodrębnianie poszczególnych związków fenolowych

Uzyskane uprzednio frakcje fenolowe (3.3.) poddano doczyszczaniu stosując kolumnę szklaną ($2 \times 35\text{cm}$, LiChroprep RP-18, $25\text{-}40\mu\text{m}$). Schemat rozdziałów preparatywnych przedstawiono na Fot. 3. Związki fenolowe wymywano stosując izokratyczny układ rozpuszczalników: acetonitryl (AcN) – 1% kwas fosforowy, zoptymalizowany dla każdej z frakcji na podstawie analizy UPLC. Zastosowana metodyka umożliwiła wyizolowanie dziewięciu czystych związków, których struktura została następnie ustalona za pomocą spektrometrii mas.



Fot. 3. Zestaw, na którym przeprowadzono doczyszczanie poszczególnych frakcji fenolowych:

- a) pompa perystaltyczna
- b) kolumna szklana $2 \times 35\text{ cm}$
- c) kolektor frakcji.

3.5. Chromatografia cienkowarstwowa

Fracje otrzymane na etapie oczyszczania ekstraktu (3.2.3.) jak również eluaty z kolumny w trakcie rozdziału preparatywnego (3.3.) analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Analizy te przeprowadzano na płytkach aluminiowych pokrytych warstwą celulozy (DC-Alufolien Cellulose, Merck). Chromatogramy rozwijano w pionowych szklanych kamerach, gdzie jako układ rozwijający wykorzystano 15% kwas octowy. Chromatogramy rozwijano na wysokość około 0,5 cm od brzegu płytki. Płytki po rozwinięciu suszono, następnie, poddano je działaniu par amoniaku i obserwowano w świetle UV.

3.6. Ustalenie struktury wyizolowanych związków fenolowych

W celu ustalenia mas cząsteczkowych jak również budowy chemicznej wyizolowanych związków wykonano analizy spektrometryczne. Przeprowadzono je na spektrometrze mas LCQ Advantage Max (Thermo Finnigan) z detektorem mas w postaci pułapki jonowej (Fot. 4.). Jako technikę jonizacji wykorzystano elektrorozpylanie (ESI). Wyizolowane wzorce rozpuszczono w metanolu (1 mg mL^{-1}) a następnie analizowano metodą nastrzyku bezpośredniego do źródła spektrometru. Warunki analizy były następujące: temperatura kapilary 240°C , napięcie na kapilarze wynosiło 4,2 kV, natomiast soczewek tubusowych 10 V. Analizy wykonano w trybie ESI jonów ujemnych (-).



Fot. 4. Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem mas (LC-ESI/MS) Thermo Finnigan LCQ Advantage Max

3.7. Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyizolowanych związków

Celem podjętych badań było oznaczenie i porównanie właściwości antyoksydacyjnych wyizolowanych związków fenolowych oraz ekstraktu części nadziemnych *M. longifolia*. W celu określenia zdolności antyoksydacyjnych jako wartość referencyjną zastosowano ekwiwalent Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - TEAC). Analizy wykonano na spektrofotometrze UV-160 Shimadzu (Tokyo, Japonia). Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach

3.7.1. Określenie zdolności zmiatania wolnych rodników metodą DPPH[•]

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej z rodnikiem DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) polegało na pomiarze spadku absorbancji DPPH[•] w obecności antyoksydantu. Pomiar spadku absorbancji wykonano przy $\lambda = 515 \text{ nm}$.

Stosowane odczynniki:

DPPH - Sigma-Aldrich

Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy) Sigma-Aldrich

Stosowane roztwory:

Roztwór 1: DPPH $2,5 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$

Roztwór 2: Trolox $2,5 \times 10^{-4} \text{ M L}^{-1}$

Zdolności antyoksydacyjne poszczególnych związków oraz ekstraktu przedstawione zostały jako ekwiwalent Trolox

$$TEAC_{próba} = n_{Trolox} \times f \times \frac{A_{próba} - A_{blank}}{A_{Trolox} - A_{blank}} \times \frac{1}{m}$$

gdzie:

- A_{blank} maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 1000 μL roztworu DPPH do kuwety pomiarowej zawierającej 2000 μL metanolu
- A_{Trolox} maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 100 μL Troloxu do kuwety pomiarowej zawierającej 1000 μL DPPH oraz 1900 μL metanolu
- $A_{próba}$ maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 100 μL badanej próby do kuwety pomiarowej zawierającej 1000 μL DPPH oraz 1900 μL metanolu
- f rozcieńczenie badanej próby
- n_{Trolox} ilość moli Trolox w kuwecie pomiarowej
- m ilość ekstraktu/związku w kuwecie pomiarowej

3.7.2. Określenie zdolności zmiatania wolnych rodników metodą ABTS^{•+}

Zdolność neutralizacji wolnego rodnika ABTS^{•+}: 2,2-azynobis-(3etylobenzotiazolino-6-sulfonianu), polegała na pomiarze spadku absorbancji ABTS^{•+} w obecności antyoksydantu. Pomiary spadku absorbancji wykonano przy $\lambda = 735 \text{ nm}$.

Stosowane odczynniki:

ABTS - Sigma-Aldrich

Trolox - Sigma-Aldrich

Stosowane roztwory:

Roztwór 1: $K_2S_2O_8$ $2,5 \times 10^{-3} \text{ M L}^{-1}$

Roztwór 2: ABTS $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ w roztworze 1

Roztwór 3: Trolox 10^{-3} M L^{-1}

Roztwór 4: Trolox 10^{-5} M L^{-1}

Roztwór 5: 2,5 mL roztworu 2 dodane do 100 mL roztworu 1

Zdolności antyoksydacyjne poszczególnych związków oraz ekstraktu przedstawione zostały jako ekwiwalent Trolox

$$TEAC_{próba} = n_{Trolox} \times f \times \frac{A_{próba} - A_{blank}}{A_{Trolox} - A_{blank}} \times \frac{1}{m}$$

gdzie:

- A_{blank} maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 2500 μL roztworu ABTS (roztwór 5) do kuwety pomiarowej zawierającej 500 μL wody destylowanej
- A_{Trolox} maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 100 μL Troloxu (roztwór 4) do kuwety pomiarowej zawierającej 2500 μL roztworu ABTS (roztwór 2) oraz 400 μL wody destylowanej
- $A_{próba}$ maksymalna absorbancja mierzona 3 min po dodaniu 100 μL badanej próby do kuwety pomiarowej zawierającej 2500 μL roztworu ABTS (roztwór 2) oraz 400 μL wody destylowanej
- f rozcieńczenie badanej próby
- n_{Trolox} ilość moli Trolox w kuwecie pomiarowej
- m ilość ekstraktu/związku w kuwecie pomiarowej

3.8. Pożywki stosowane w kulturach *in vitro*

3.8.1. Skład chemiczny pożywek

W kulturach *in vitro* używano pożywki LS [Linsmayer i Skoog, 1965] o następującym składzie chemicznym:

Składniki mineralne:

1) Makroelementy:

➤ NH_4NO_3	1650 mg L ⁻¹
➤ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg L ⁻¹
➤ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg L ⁻¹
➤ KNO_3	1900 mg L ⁻¹
➤ KH_2PO_4	170 mg L ⁻¹

2) Mikroelementy:

➤ H_3BO_3	6,2 mg L ⁻¹
➤ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg L ⁻¹
➤ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg L ⁻¹
➤ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg L ⁻¹
➤ $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3 mg L ⁻¹
➤ KI	0,83 mg L ⁻¹
➤ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg L ⁻¹
➤ $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6 mg L ⁻¹
➤ $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3 mg L ⁻¹

Składniki organiczne:

➤ glicyna	2,0 mg L ⁻¹
➤ tiamina – chlorowodorek	0,1 mg L ⁻¹
➤ pirydoksyna – chlorowodorek	0,5 mg L ⁻¹
➤ kwas nikotynowy	0,5 mg L ⁻¹
➤ M - inozytol	100 mg L ⁻¹

Pożywki poddano pewnym modyfikacjom:

- pożywka LS do siewu (zmniejszono o połowę ilość składników mineralnych, sacharoza w ilości 15 g L⁻¹ oraz agar 6 g L⁻¹)
- pożywka LS ukorzeniająca (pożywka została wzbogacona o hormony: 0,2 mg L⁻¹ NAA i 0,2 mg L⁻¹ IAA, 30 g L⁻¹ sacharozy oraz 8g L⁻¹ agaru)
- pożywki LS indukcyjne. W celu uzyskania kultur kalusowych wykorzystano różnorodne zestawienia hormonów (2,4-D i 2iP bądź 2,4-D i BA) oraz kombinacje ich stężeń. Tabela 10. prezentuje zastosowane warianty pożywek. Do pożywek dodano 30 g L⁻¹ sacharozy oraz 8g L⁻¹ agaru

Tabela 10. Diagram testowanych stężeń hormonów

stężenie hormonu [mg/l]	cytokinina (2iP lub BA)			
	0,5		1	2
auksyna (2,4-D)	0,5	X	X	X
	1	X	X	X
	2	X	X	X

kontrola - pożywka LS bez dodatku hormonów

Kultury zawiesinowe prowadzono na pożywce LS z takim samym zestawem regulatorów wzrostu jaki był wykorzystany do hodowli poszczególnych rodzajów kalusa. W przypadku zawiesiny *M. longifolia* pożywka została wzbogacona o 1 mg L⁻¹ BA oraz 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D, natomiast w przypadku zawiesiny komórkowej *M. piperita* do pożywki dodano 2 mg L⁻¹ 2iP i 0,5 mg L⁻¹ 2,4 D.

3.8.2. Przygotowanie pożywek

Składniki pożywek jak roztwory soli mineralnych a także roztwory hormonów zostały przygotowane w tzw. stężonych roztworach wyjściowych, z których pobierano odpowiednią ilość w trakcie przygotowywania pożywek.

Źródło węgla stanowiła sacharoza, natomiast czynnikiem zestalającym dla kultur roślin *in vitro* jak również kultur kalusa był agar. Odczyn pożywek doprowadzono przed sterylizacją do wartości pH = 5,8.

Wysterylizowane pożywki z dodatkiem agaru umieszczono w komorze laminarnej, gdzie po ich przestygnięciu w warunkach sterylnych dodawano przefiltrowane witaminy (filtr 0,22 μm). Następnie pożywki rozlewano na szalki Petriego (średnica 10 cm) w ilości ok. 20 ml na szalkę lub do sterylnych 300 ml kolb Erlenmeyer'a w ilości 50 ml na kolbę i pozostawiano do stężenia.

3.9. Sterylizacja pożywek, wody, szkła oraz narzędzi

Pożywki oraz wodę sterylizowano w 500 lub 1000 ml kolbach w autoklawie, w temperaturze 121°C, pod ciśnieniem 0,1 MPa przez 20 min (Prestige Medical 2100). Szkło oraz narzędzia (skalpele, pęsety, sitka i in.) używane do pracy w warunkach sterylnych, sterylizowano w autoklawie w tych samych warunkach lub wyprażano w suszarce (Pol-Eko-Aparatura) w temperaturze 180°C przez 90 minut.

3.10. Zakładanie i prowadzenie kultur *in vitro*

Wszystkie czynności związane z zakładaniem kultur, pasażami kalusa i zawiesin komórkowych, oraz procesem elicytacji wykonywano w warunkach sterylnych, w komorze z laminarnym przepływem powietrza..

3.10.1. Sterylizacja nasion mięty, uzyskiwanie sterylnych siewek i roślin

3.10.1.1. Sterylizacja nasion mięty

Nasiona obu gatunków mięty płukano pod bieżącą wodą przez 15 min, następnie poddano je sterylizacji w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 2 min. W kolejnym etapie etanol odlewano, a nasiona zalewano 10% roztworem H_2O_2 na 20 min. stale wytrząsając. Po tym czasie roztwór sterylizujący zlewano, a nasiona trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej przez 5 min.

3.10.1.2. Uzyskiwanie sterylnych siewek i roślin

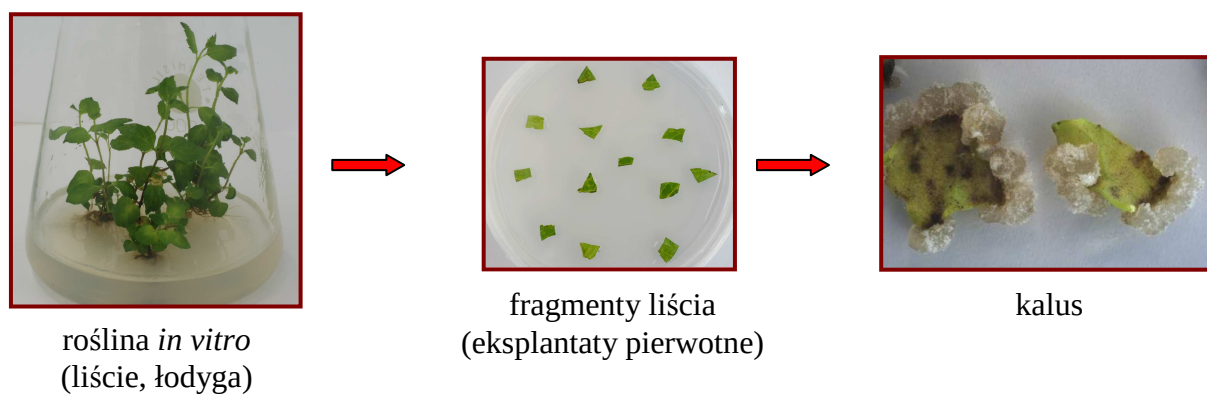
Wysterylizowane nasiona (3.10.1.1.) odsączono na sterylnej bibule a następnie wykładano je na pożywkę LS przeznaczoną do siewu. Szalki z nasionami umieszczono w fitotronie (Heraeus Vötsch) w temp. 25°C, przy fotoperiodzie wynoszącym 16 godz. Po tygodniu uzyskano młode siewki z dobrze wykształconymi liścieniami oraz z pojawiającymi się pojedynczymi liśćmi właściwymi. Przeniesione do 300 ml kolb Erlenmeyer'a z pożywką ukorzeniającą. Kolby umieszczono w fitotronie w tych samych warunkach w jakich utrzymywano szalki z nasionami. Po kolejnych 10 - 14 dniach hodowli uzyskano z nich młode rośliny.

3.10.2. Zakładanie i prowadzenie kultur kalusowych

3.10.2.1. Zakładanie kultur kalusowych z roślin pochodzących z hodowli *in vitro*

W celu doboru najbardziej odpowiedniego eksplantatu przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnych organów roślin. Były to hipokotyle oraz liścienie pochodzące z młodych 7-dniowych sterylnych siewek. Wykorzystano także liście (Rys. 9) oraz fragmenty łodyg pochodzące z 3 tygodniowych roślin *in vitro*. Organy te pocięto skalpelem na małe fragmenty 3 - 5 mm² i wykładano na pożywki LS indukujące, zawierające różne warianty oraz kombinacje stężeń roślinnych regulatorów wzrostu (Tabela 10). Zawartość cukru w wymienionych powyżej pożywkach wynosiła 30 g L⁻¹. Do ich zestalenia użyto agaru (8 g L⁻¹), a pH pożywek doprowadzano do wartości 5,8. Wariant kontrolny stanowiła pożywka LS bez dodatku hormonów. Dla każdego wariantu pożywki przygotowano 10 szalek zawierających 15 eksplantatów. Szalki z eksplantatami przetrzymywano w fitotronie w temp. 25°C, przy długości dnia 16 godz.

Pasaży tkanek kalusowych dokonywano co 4 tygodnie przenosząc fragmenty tkanki na analogiczne świeże pożywki.



Rys. 9. Indukcja kalusa z roślin *in vitro*

3.10.2.2. Zakładanie kultur kalusowych z liści roślin polowych

3.10.2.2.1 Sterylizacja liści mięty rosnącej w warunkach polowych

Ulistnione szczyty pędów z roślin gruntowych pozyskiwano przed zakwitnięciem pąków kwiatowych. Pędy podzielono na mniejsze fragmenty, a następnie płukano je pod bieżącą wodą przez 20 min i poddano je procesowi sterylizacji. W tym celu wykorzystano 70% etanol (1 min.) oraz 10% komercyjny środek dezynfekujący zawierający podchloryn wapnia (10 min.). W kolejnym etapie liście płukano trzykrotnie w jałowej wodzie destylowanej.

3.10.2.2.2. Indukcja kultur kalusowych

Po wysuszeniu, fragmenty liści (3.10.2.2.1.) przenoszono na odpowiednie pożywki indukcyjne. Szalki z eksplantatami przetrzymywano w fitotronie w temp. 25°C, przy długości dnia 16 godz. Rys. 10. prezentuje schemat indukcji tkanek kalusowych z liści roślin polowych.

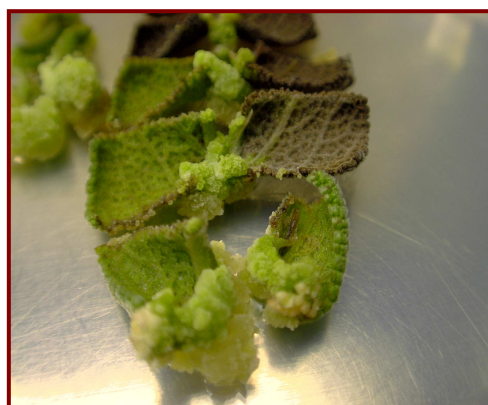


roślina z uprawy polowej
(liście)



sterylizacja liści:

- 70% etanol (1 min.)
- 10% komercyjny środek dezynfekujący zawierający podchloryn wapnia (10 min.)
- płukanie w jałowej wodzie destylowanej (3×)



fragmenty liścia (eksplantaty pierwotne)
wytwarzające tkankę kalusową



kalus

Rys. 10. Indukcja kalusa z liści roślin gruntowych

3.10.3. Zakładanie i prowadzenie kultur zawiesinowych

Materiałem wyjściowym do zainicjowania kultur zawiesinowych były tkanki kalusowe *M. longifolia* oraz *M. piperita* charakteryzujące się szybkim tempem przyrostu biomasy oraz luźną strukturą. Do wyprowadzenia kultur zawiesinowych posłużył kalus pochodzący z dziewiątego pasażu. Hodowle zawiesinowe prowadzono na podłożu LS z takim samym zestawem regulatorów wzrostu jaki był wykorzystany do hodowli poszczególnych rodzajów kalusa. W przypadku *M. longifolia* była to pożywka LS wzbogacona o 1 mg L^{-1} BA i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, natomiast w przypadku *M. piperita* do pożywki LS dodano 2 mg L^{-1} 2iP oraz $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D.

Grudki kalusa były przenoszone na pożywki płynne. Tkanki (0,3 g - 0,4 g) kalusa (świeża masa) były zawieszane w 20 ml pożywki w 100 ml kolbach Erlenmeyer'a. (Rys. 11) Następnie kolby szczelnie zamykano kapturkiem z folii aluminiowej. Zawiesiny utrzymywano w temp. 25°C , fotoperiodzie 16 godzin, oraz przy ciągłym wytrząsaniu wynoszącym 110 rpm (wytrząsarka Innova 44, New Brunswick Scientific).

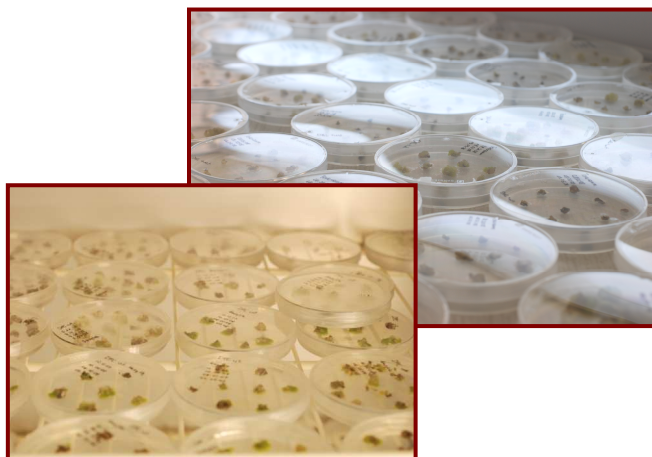
3.10.4. Filtracja zawiesin komórkowych

Po okresie wstępnej hodowli (3 tygodnie) zawiesinę przefiltrowano by ujednolicić materiał i otrzymać tylko małe agregaty komórkowe jak również pojedyncze komórki. Do oddzielenia odpowiedniej frakcji użyto aluminiowych sit o średnicy oczek $500 \mu\text{m}$ (Rys. 12).

Kolejne pasáže przeprowadzano w tygodniowych odstępach (przenoszono 5 ml zawiesiny do 20 ml świeżej pożywki), zachowując wielkość agregatów wprowadzanych do kolejnej subkultury.



kalus

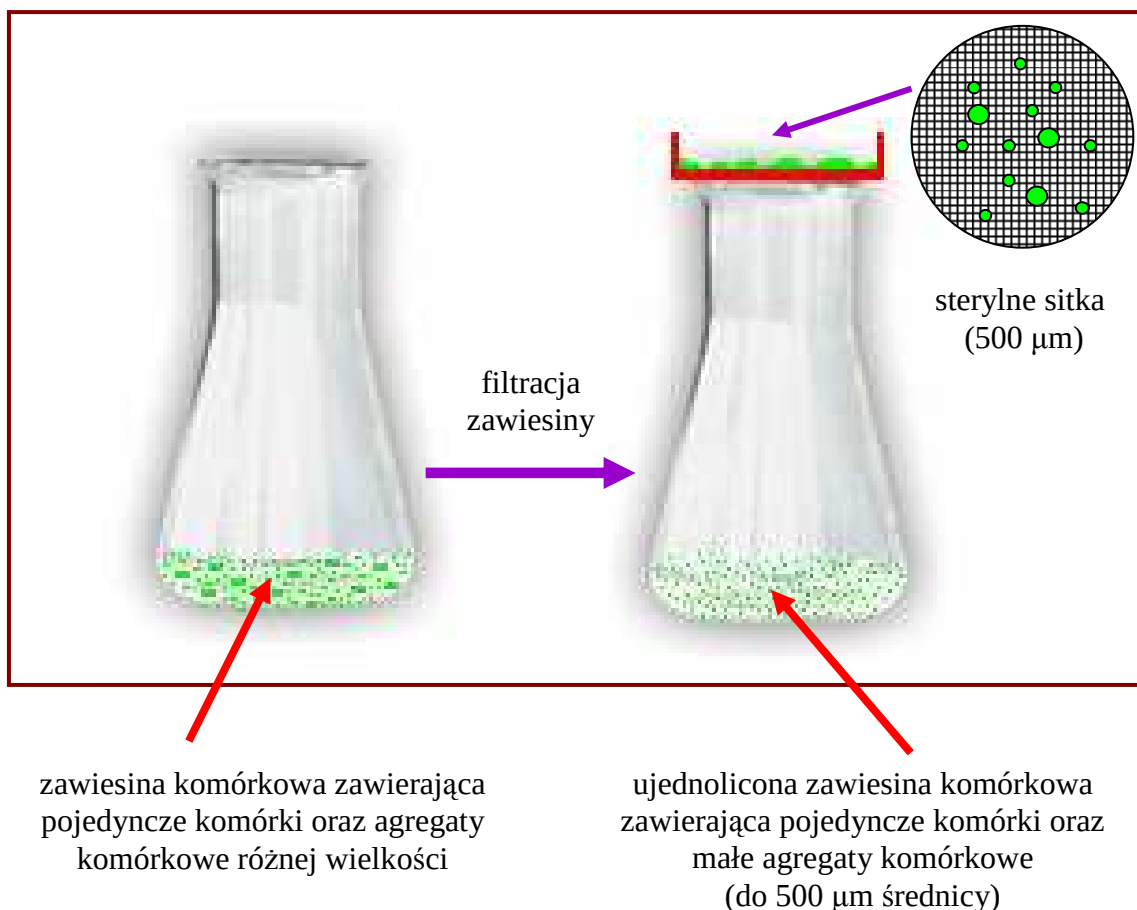


namnażanie tkanki kalusowej



zawiesiny komórkowe

Rys. 11. Schemat indukcji zawiesin komórkowych



Rys. 12. Filtracja zawiesin komórkowych.

3.11. Określenie przyrostu świeżej i suchej masy zawiesiny komórkowej

Określenia przyrostu świeżej masy (ś.m.) i suchej masy (s.m.) zawiesiny komórkowej dokonywano co drugi dzień hodowli. Zawiesinę z kolby przenoszono do cylindra w celu pomiaru PCV (Packed Cell Volume), a następnie tkankę odsączano od pożywki i ważono. W kolejnym etapie tkankę zamrażano i liofilizowano w celu uzyskania suchej masy. Uzyskane wyniki pozwoliły wykreślić krzywe wzrostu zawiesiny, jak również zawartość kwasu rozmarynowego w różnych fazach hodowli.

3.12. Porównanie profili związków fenolowych *M. longifolia* i *M. piperita* w ekstraktach z roślin polowych oraz w różnych typach kultur *in vitro*

W celu określenia zmian jakościowych jak również ilościowych związków fenolowych przebadano rośliny polowe, rośliny otrzymane w warunkach *in vitro*, kultury kalusowe oraz kultury zawiesinowe *Mentha longifolia* i *Mentha piperita* (Rys.13).



rośliny polowe
M. piperita



rośliny *in vitro*
M. piperita



kultura kalusa
M. piperita (9 pasaż)



zawiesina komórkowa
M. piperita

Rys. 13. Materiał roślinny wykorzystany do badania profili fenolowych *M. piperita*

3.12.1. Przygotowanie próbek

Zawiesiny komórkowe filtrowano przez bibułę filtracyjną (Whatman No – 1) w celu oddzielenia biomasy komórkowej oraz płynów pochodzących. Rośliny polowe zostały wysuszone w suszarni w temperaturze 35°C. Rośliny pochodzące z hodowli *in vitro*, tkanki kalusowe oraz biomasa zawiesin zostały zliofilizowane. Następnie wszystkie próbki rozdrobniono i tak przygotowany materiał został wykorzystany do dalszych analiz.

3.12.2. Ekstrakcja

Próbki (3.12.1.) poddano procesowi ekstrakcji z wykorzystaniem automatycznego ekstraktora ASE 200 (Fot. 5.). Jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny wykorzystano 70% metanol pod ciśnieniem 1500 psi, a temperatura cel ekstrakcyjnych wynosiła 100°C, flush 150%. Przeprowadzono 2 niezależne cykle, każdy po 2 min. Ekstrakty 25 ml zbierano w kolbkach.



Fot. 5. Ekstraktor ASE 200

3.12.3. Oczyszczanie frakcji fenolowej z ekstraktu

W celu usunięcia metanolu ekstrakty odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w temp 40°C , a otrzymane w ten sposób suche ekstrakty rozpuszczano w wodzie MiliQ. Następnie ekstrakty oczyszczano poprzez ekstrakcje do fazy stałej przy użyciu kolumn SPE (C-18 Sep-Pak cartridges, 1 cm^3 , 360 mg, Waters). Kolumny te były kondycjonowane metanolem, a następnie wodą. Po naniesieniu ekstraktu na kolumnę przemywano ją początkowo wodą w celu usunięcia cukrowców, kolejnym zastosowanym rozpuszczalnikiem był 40% MeOH, który posłużył do wymycia frakcji fenolowej. Schemat oczyszczenia frakcji fenolowej przedstawiono na rysunku 14. Frakcje te odparowywano i rozpuszczano w 1 mL 40% MeOH. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w trzech niezależnych powtórzeniach. Próbkę przechowywano w lodówce w temp -20°C .



surowe ekstrakty



odparowywanie na
wyparce próżniowej



kolumna SPE
RP-18, 1 cm³
0 - 40% MeOH

Rys. 14. Oczyszczanie frakcji fenolowej z ekstraktu

3.12.4. Analizy chromatograficzne i spektrometryczne

Analizy fitochemiczne (zarówno jakościowe oraz ilościowe) roślin gruntowych oraz biomas z różnych kultur *in vitro* były przeprowadzane na wszystkich etapach doświadczeń biotechnologicznych. Przeprowadzono je wykorzystując ultrasprawy chromatograf cieczerw Waters ACQUITY (Waters Corp., Milford, MA, USA) sprzężony z detektorem mas TQD (Waters Corp., Manchester, UK) (Fot. 6.). Wszystkie dane uzyskano w oparciu o program MassLynx 4.1. (Waters Corp., Milford, MA, USA). Analizy wykonano stosując kolumnę ACQUITY UPLC® BEH C-18 (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm, Waters Crop, Milford, MA, USA). Jako fazę rozwijającą zastosowano gradient rozpuszczalników: wody zawierającej 0,1 % HCOOH (v/v) (roztwór A) oraz wodę i acetonitryl (60:40) zawierające 0,1 % HCOOH (roztwór B). Program gradientu był następujący: 0 min (80% A); 5,1min (50% A); 6,0 min (0% A); 6,5min (0% A); 7,0 min (80% A - stabilizacja kolumny), czas analizy to 7.5 min. Szybkość przepływu roztworów wynosiła 0,4 mL/min., a temperatura kolumny 50°C. Parametry analizatora MS były następujące: temperatura źródła: 120°C, napięcie na kapilarze: 3,0 kV, przepływ gazu desolvacyjnego: 800 L/h, temperatura desolvacji: 350°C, napięcie na stożku 50 V. Analizy były w trybie ESI (-).



Fot. 6. Ultrasprawy chromatograf cieczerw sprzężony z detektorem mas TQD Waters ACQUITY

3.13. Zabiegi biotechnologiczne zastosowane w celu zwiększenia syntezy kwasu rozmarynowego w zawiesinach komórkowych *M. piperita*

3.13.1. Materiał badań

Zawiesiny komórkowe *M. piperita* hodowano na pożywkach LS z dodatkiem 2 mg/l 2iP oraz 0,5 mg/l 2,4 D. Pożywki zawierały 30 g/l sacharozy a ich pH ustalono na 5,8 przed procesem autoklawowania. Doświadczenia prowadzono w 100 ml kolbkach Erlenmeyera (objętość robocza – 25 ml). Zawiesiny utrzymywano w temp. 25°C, fotoperiodzie wynoszącym 16 godzin, oraz przy ciągłym wytrząsaniu 110 rpm na wytrząsarce rotacyjnej (Innova 44, New Brunswick Scientific).

3.13.2. Przygotowanie elicytorów

Kwas jasmonowy (JA) oraz jego metylową pochodną (MeJA) (Duchefa) rozpuszczono w alkoholu etylowym. W następnym etapie elicytory były sterylizowane przy pomocy jałowych flitrów 0,22 µm (Milipore Bedford USA) a następnie dodawane do kolb z zawiesinami *M. piperita* w stężeniach: 50, 100, 200 µM L⁻¹.

3.13.3. Procedura elicytacji

W celu określenia wpływu jasmonianów na akumulację a także na profil syntetyzowanych związków fenolowych w zawiesinie komórkowej *M. piperita* elicytory (JA oraz MeJA) dodano do pożywek w 7 dniu trwania hodowli. Elicytowane kultury hodowano następnie przez 96 godzin w warunkach opisanych dla zawiesiny *M. piperita*. Biomasy komórkowe oraz media hodowlane zbierano w czasie „0” (dodanie elicytora) oraz po 6, 12, 24, 48, 72 i 96 godzinach od momentu elicytacji. Kontrolę stanowiły podstawowe zawiesiny komórkowe *M. piperita* hodowane w tych samych warunkach ale bez dodatku elicytora.

3.13.4. Analizy fitochemiczne

Otrzymany w wyniku procesu elicytacji materiał poddano analizie fitochemicznej wg procedury opisanej w rozdziałach 3.12.1. – 3.12.4.

3.14. Dokumentacja fotograficzna

Zdjęcia roślin *in vitro* jak również zdjęcia tkanek kalusowych na szalkach oraz zawiesin komórkowych w kolbach wykonano aparatem Nikon D60. Zawiesiny komórkowe poddawano również obserwacji mikroskopowej. Na szkiełko podstawowe nanoszono kilka kropli zawiesiny i oglądano w mikroskopie Nikon Optiphot-2. Zdjęcia preparatów mikroskopowych wykonano aparatem Canon PowerShot A620 zainstalowanym na mikroskopie.

3.15. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie doświadczenia przeprowadzone w trakcie realizacji prezentowanych badań zostały wykonane w trzech powtórzeniach, uzyskane wyniki poddano następnie analizie statystycznej. Dla każdej serii danych obliczono odchylenie standardowe jako miarę rozrzutu zbioru. Do oceny istotności różnic między średnimi zastosowano wielokrotny test Duncan'a, przyjmując 5% przedział ufności. Na podstawie tego testu wydzielono grupy średnich różniących się istotnie między sobą, oznaczając wartości najmniejszej istotnej różnicy (NIR). Obliczenia wykonano wykorzystując program Statistica.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

4. 1. Ekstrakcja i oczyszczanie związków fenolowych

4. 1. 1. Optymalizacja warunków ekstrakcji surowca

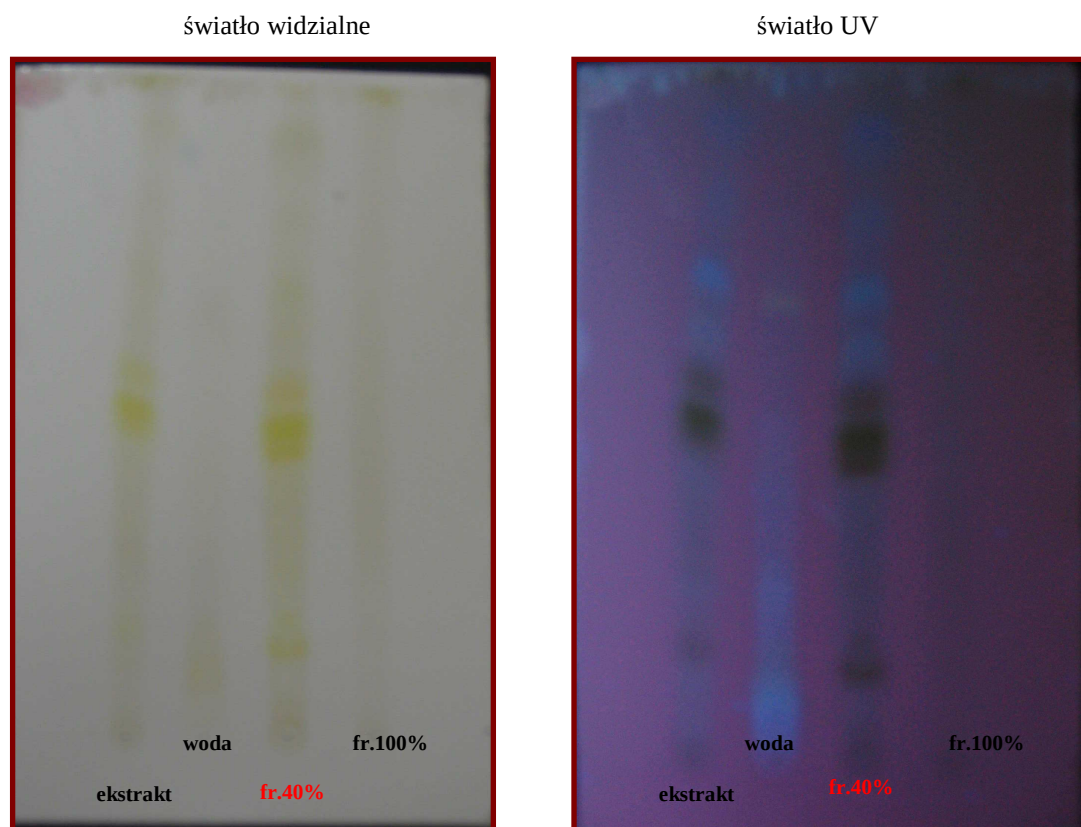
Ekstrakcja ciało stałe – ciecz (ang. Solid-Liquid Extraction SLE) jest podstawowym procesem wyodrębniania związków organicznych z materiału roślinnego. Polega ona na rozpuszczaniu substancji znajdujących się w próbce za pomocą rozpuszczalnika. Zwykle konieczny jest kompromis pomiędzy warunkami ekstrakcji (temperatura, rodzaj rozpuszczalnika, czas trwania ekstrakcji czy ilość cykli), pozwalający na uzyskanie odpowiednio dobrej wydajności procesu oraz zachowanie wystarczającego poziomu aktywności izolowanych związków. Podczas badań rozdrobniony materiał roślinny (części nadziemne *M. longifolia*) poddano ekstrakcji przy wykorzystaniu różnych ekstrahentów (metanol, chloroform, octan etylu, heksan oraz woda); zróżnicowana była również temperatura w jakiej ten proces przebiegał.

Analizy HPLC surowych ekstraktów wykazały, że profile związków fenolowych ekstrahowane różnymi rozpuszczalnikami różniły się jakościowo i ilościowo. W ekstraktach chloroformowych oraz heksanowych nie wykazano obecności związków fenolowych. Ekstrakty wodne charakteryzowały się niższą wydajnością procesu w porównaniu do ekstrakcji metanolowej. Najbardziej efektywnym procesem okazała się być ekstrakcja 70% roztworem MeOH przeprowadzona na gorąco.

4. 1. 2. Oczyszczanie ekstraktu – ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Surowy ekstrakt części nadziemnych *M. longifolia* został oczyszczony poprzez ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Metoda ta umożliwia stosunkowo łatwy, wstępny rozdział metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym. Do złoża typu RP-C18 (40-63µm) wiążą się zarówno związki fenolowe jak i inne średnio- i niepolarne metabolity wtórne. Stosując różną procentowość metanolu w wodzie podzielono ekstrakt na różne frakcje. Otrzymane frakcje (frakcja wodna, frakcja 40% MeOH oraz frakcja 100% MeOH) poddano analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Po rozwinięciu chromatogramu obecność związków fenolowych została potwierdzona we frakcji 40% MeOH (Fot. 7). Preparatywny

rozdziół tej frakcji przeprowadzono na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex LH-20 (25-100 μm). Rozdział ten pozwolił uzyskać dziesięć frakcji zawierających mieszaniny 2 - 4 związków o zbliżonej retencji. Dalszej izolacji poszczególnych związków fenolowych dokonano na kolumnach wypełnionych nośnikiem typu RP-18 (25-40 μm). Proces ten umożliwił wyizolowanie dziewięciu związków, które stanowią dominujące związki fenolowe części nadziemnych *M. longifolia*. Związki te stanowiły wzorce w trakcie późniejszych analiz zarówno jakościowych, jak i ilościowych. Ilości standardów jakie uzyskano w wyniku rozdziałów preparatywnych prezentuje Tabela 11, ich struktura została ustalona za pomocą spektrometrii mas.



Fot. 7. Płytki TLC frakcji otrzymanych w wyniku oczyszczania SPE

4. 2. Identyfikacja związków fenolowych w częściach nadziemnych *M. longifolia*

4. 2. 1. Analiza związków fenolowych metodą LC-MS

Przeprowadzone badania umożliwiły ustalenie składu jakościowego części nadziemnych roślin *M. longifolia* w obrębie frakcji fenolowej. Strukturę chemiczną wyizolowanych związków fenolowych ustalono przy wykorzystaniu spektrometrii mas oraz w oparciu o dostępne dane literaturowe. Związki ponumerowano od 1 do 9 zaznaczając ich miejsce na chromatogramach. Wyniki te są prezentowane w Tabeli 11 oraz na Rys. 15.

Identyfikacja związków fenolowych *M. longifolia* oparta była na następujących parametrach: czas retencji, widmo UV, wartości m/z jonów $[M-H]^-$ oraz widmach masowych, powstałych na skutek rozpadu wiązań glikozydowych lub estrowych w cząsteczkach analizowanych związków. W badaniach LC/MS zastosowano metodę jonizacji poprzez elektrorozpylanie (Elektrospray Ionisation, ESI) w trybie jonów ujemnych. Jonizacja tego typu polecana jest do bezpośredniej identyfikacji flawonoidów, również tych występujących w zespółach, z uwagi na czułość metody i prostą interpretację uzyskanych widm [Fabre i in., 2001; de Rijke i in., 2003].

Zidentyfikowane związki fenolowe to 5 flawonów, 1 flawanon oraz 3 kwasy fenolowe. Są to odpowiednio: diglukuronid luteoliny (**1**), dwa glukuronidy luteoliny (**3**, **7**), ester metylowy glukuronidu luteoliny (**9**), rutynozyd luteoliny (**4**), rutynozyd eriodiktliolu (**2**), kwas rozmarynowy (**6**), kwas salwianolowy L (**5**) oraz kwas didehydrosalwianolowy L (**8**).

Związek nr 1 wyizolowano w ilości 6,34 mg (Tabela 11). Cechował się najkrótszym czasem retencji spośród wszystkich wyizolowanych związków, wynoszącym 2,02 min. Jego widmo UV zarejestrowane na detektorze PDA zawierało dwa maksima absorpcji: przy 251,4 oraz przy 338,8 nm. W jego widmie masowym deprotonowany jon 637 $[M-H]^-$ wskazywał na masę 638. W wyniku fragmentacji tego związku powstały jony m/z 461 o intensywności względnej (wz.) 12, jon o m/z 351 i intensywności wz. 100 oraz jon o m/z 285 i intensywności wz. 32. Z analizy widma masowego wynika, iż aglikon tego związku stanowi luteolina (m/z 285). Sygnał m/z 351 wskazuje natomiast na obecność dwóch połączonych liniowo cząsteczek kwasu glukuronowego ($2 \times 176-H$). Na podstawie analizy widm absorpcyjnych, masowych oraz danych literaturowych

[Fecka i Turek, 2007; MassBank Record PR100643, <http://www.massbank.jp>] zidentyfikowano go jako **diglukuronid luteoliny**.

Związek nr 2 wyizolowano w ilości 7,25 mg. Jego czas retencji wynosił 3,08 min. Wykazywał on maksimum absorpcji światła UV przy 283,3 nm. W widmie masowym jon 595 [M-H]⁻ sugerował masę 596. Analiza MS/MS wykazała obecność jonu o *m/z* 449 i intensywności wz. 100 oraz *m/z* 287 i intensywności wz. 20 wskazujący na obecność heksozy i deoksyheksozy. Na podstawie analizy widm masowych oraz danych literaturowych [Marais i in. 2000; MassBank Record PR100639, <http://www.massbank.jp>] zidentyfikowano go jako **rutynozyd eriodiktiolu**.

Związek nr 3 uzyskano w największej ilości spośród wszystkich wyizolowanych standardów; jego masa wynosiła 15,39 mg. Czas retencji tego związku wynosił 3,20 min. Związek ten na detektorze PDA wykazywał dwa maksima absorpcji przy 252,6 oraz przy 345,7 nm. Jego deprotonowany jon obserwowany w widmie masowym miał *m/z* 461 [M-H]⁻. Jon [M-H]⁻ o takiej wartości posiadał również związek nr 7. Związki nr 3 i nr 7 wykazywały ponadto identyczny sposób fragmentacji. Analiza widm ESI/MS/MS tych związków wykazała obecność jonu o *m/z* 285 i intensywności wz. 100, charakterystycznego dla luteoliny. Różnica mas pomiędzy jonami wynosiła 176 j. m. (461 – 285) co odpowiada jednej cząsteczce kwasu glukuronowego. Na podstawie analizy widm masowych oraz danych literaturowych [Fecka i Turek, 2007; MassBank Record PR100643, <http://www.massbank.jp>] związki te zidentyfikowano jako **glukuronidy luteoliny**. Uzyskane wyniki nie pozwoliły określić położenia podstawnika kwasowego.

W rozdziale preparatywnym uzyskano 12,26 mg **związku nr 4**. Jego czas retencji wynosił 3,28 min, natomiast zarejestrowane na detektorze PDA maksima absorpcji występowały przy 253,8 oraz przy 345,7 nm. W widmie masowym obserwowano jon o *m/z* 593 [M-H]⁻. Analiza ESI-MS/MS wykazała obecność jonu o *m/z* 447 i intensywności wz. 30 oraz jonu o *m/z* 285 i intensywności wz. 100, charakterystycznego dla aglikonu luteoliny. Na podstawie analizy widm masowych oraz danych literaturowych [Koşar i in., 2004] zidentyfikowano go jako **rutynozyd luteoliny**.

Związek nr 5 wyizolowano w ilości 8,53 mg. Jego czas retencji wynosił 4,35 min, a widmo UV zarejestrowane na detektorze PDA cechowały dwa maksima absorpcji: przy 284,5 oraz przy 337,5 nm. W widmie masowym jon o m/z 717 $[M-H]^-$ sugerował masę 718. W wyniku fragmentacji tego związku stwierdzono obecność jonu o m/z 519 i intensywności wz. 25, jonu o m/z 339 i intensywności wz. 100 oraz jonu o m/z 321 i intensywności wz. 25. Na podstawie analizy widm masowych oraz danych literaturowych [Fecka i in., 2004] zidentyfikowano go jako **kwas salwianolowy L**.

Związek nr 6 został wyizolowany w ilości 6,16 mg. Jego czas retencji wynosił 4,45 min. Posiadał on maksimum absorpcji światła UV przy 327,6 nm. Masę związku wynoszącą 360 w widmie masowym sugerował deprotonowany jon o m/z 359 $[M-H]^-$. Analiza LC-ESI-MS/MS wykazała obecność jonu o m/z 223 i intensywności wz. 20, jonu o m/z 197 i intensywności wz. 25, jonu o m/z 179 i intensywności wz. 30, jonu o m/z 161 i intensywności wz. 100, jonu o m/z 133 i intensywności wz. 5, oraz jonu o m/z 123 i intensywności wz. 5. Na podstawie analizy widm masowych oraz danych literaturowych [Fecka i in., 2004; MassBank Record PR100686, <http://www.massbank.jp>] zidentyfikowano go jako **kwas rozmarynowy**.

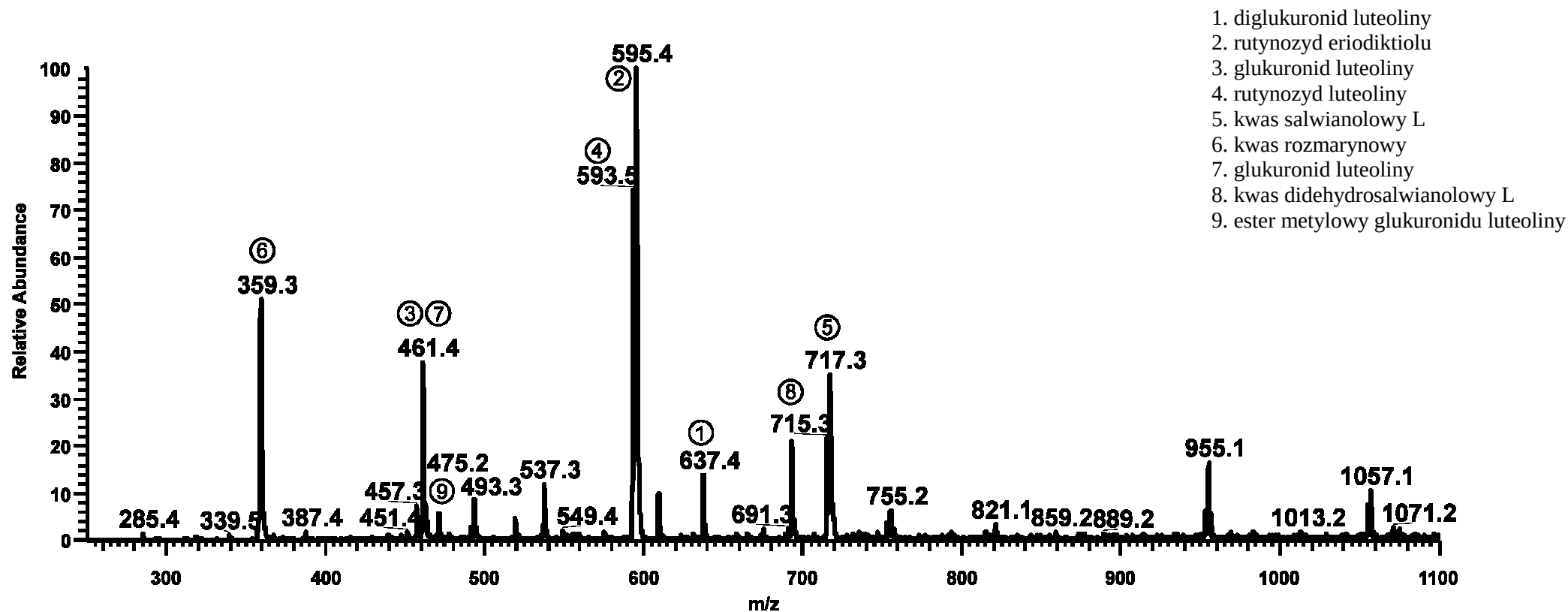
Związek nr 7 uzyskano w ilości 8,54 mg. Czas retencji tego związku wynosił 4,66 min. Związek ten na detektorze PDA wykazywał dwa maksima absorpcji przy 267,3 oraz przy 332,6 nm. Widmo masowe tego związku zawierało jon pseudomolekularny o m/z 461 oraz silny jon o m/z 285 odpowiadający cząsteczce aglikonu. Na podstawie widm absorpcyjnych i masowych związek ten został zidentyfikowany jako glukuronid luteoliny, podobnie jak związek 3. Od związku 3 różnił się prawdopodobnie miejscem podstawienia cukru.

Związek nr 8 wyizolowano w najmniejszej ilości (3,89 mg) spośród wszystkich substancji. Jego czas retencji wynosił 5,36 min, a widmo UV zarejestrowane na detektorze PDA zawierało dwa maksima absorpcji: przy 283,3 oraz przy 344,4 nm. W widmie masowym jon pseudomolekularny o m/z 715 $[M-H]^-$ sugerował masę 716. W wyniku fragmentacji tego związku stwierdzono obecność jonu o m/z 517 i intensywności wz. 20, jonu o m/z 337 i intensywności wz. 100 oraz jonu o m/z 321 i intensywności wz. 10. Na podstawie analizy widm masowych i absorpcyjnych oraz

danych literaturowych [Liu i in., 2007] zidentyfikowano go jako **kwask didehydrosalwianolowy L.**

Związek nr 9 był obecny w niewielkiej ilości w rozdzielanej frakcji, po wysuszeniu otrzymano 4,23 mg tego wzorca. Charakteryzował się najdłuższym czasem retencji wynoszącym 6,20 min. Posiadał on dwa maksima absorpcji światła UV przy 258,7 oraz przy 316,5 nm. W widmie masowym jon o m/z 475 $[M-H]^-$ sugerował masę 476. Analiza ESI-MS/MS wykazała obecność jonu o m/z 460 i intensywności wz. 15 oraz jonu o m/z 285 i intensywności wz. 100. Na podstawie analizy widm masowych i absorpcyjnych oraz danych literaturowych [Fecka i Turek, 2007; MassBank Record PR100643, <http://www.massbank.jp>] zidentyfikowano go jako **ester metylowy glukuronidu luteoliny.**

Wyizolowane i scharakteryzowane związki zostały wykorzystane jako wzorce w dalszych analizach jakościowych i ilościowych różnych ekstraktów *M. longifolia* oraz *M. piperita*. Umożliwiły one m.in. analizę porównawczą syntezy tych metabolitów w obu gatunkach, jak również sprawdzenie ich akumulacji w różnych typach kultur *in vitro*. Badania fitochemiczne są integralnym procesem badań biotechnologicznych, ukierunkowanych na produkcję metabolitów wtórnych. Analizy te mają na celu rozpoznanie profilu związków syntetyzowanych przez roślinę wprowadzaną do hodowli *in vitro* oraz późniejsze analizy monitorujące zawartości oraz profil metabolitów akumulowanych w różnych typach kultur *in vitro*. Przebadanie wielu próbek wymagało również opracowania sprawnej i krótkotrwałej metody ich analizy.



Rys. 15. Widmo mas ESI/MS uzyskane z bezpośredniego nastrzyku do źródła spektrometru ekstraktu *M. longifolia*

Tabela 11. Związki fenolowe części nadziemnych *M. longifolia* zidentyfikowane za pomocą analiz LC-ESI-MS/MS

Nr piklu	RT (min)	λ max (nm)	$[M-H]^-$ m/z	jony fragmentacyjne m/z (względna intensywność %)	masa (mg)*	identyfikacja	literatura
1	2,02	251,4; 338,8	637,4	461(12), 351(100), 285(32)	6,34	diglukuronid luteoliny	Fecka i Turek, 2007 MassBank Record PR100643, http://www.massbank.jp
2	3,08	283,3	595,4	449(100), 287(20)	7,25	rutynozyd eriodiktiolu	Marais i in., 2000 MassBank Record PR100639, http://www.massbank.jp
3	3,20	252,6; 345,7	461,3	285(100)	15,39	glukuronid luteoliny**	Fecka i Turek, 2007 MassBank Record PR100643, http://www.massbank.jp
4	3,28	253,8; 345,7	593,5	447(30), 285(100)	12,26	rutynozyd luteoliny	Koşar i in., 2004
5	4,35	284,5; 337,5	717,3	519(25), 339(100), 321(25)	8,53	kwaskwas salwianolowy L	Fecka i in., 2004
6	4,45	327,6	358,9	223(20), 197(25), 179(30), 161(100), 133(5), 123(5)	6,16	kwaskwas rozmarynowy	Fecka i in., 2004 MassBank Record PR100686, http://www.massbank.jp
7	4,66	267,3; 332,6	461,2	285(100)	8,54	glukuronid luteoliny**	Fecka i Turek, 2007 MassBank Record PR100643, http://www.massbank.jp
8	5,36	283,3; 344,4	715,3	517(20), 337(100), 321(10)	3,89	kwaskwas didehydrosalwianolowy L	Liu i in., 2007
9	6,20	258,7; 316,5	475,5	460(15), 285(100)	4,23	ester metylowy glukuronidu luteoliny	Fecka i Turek, 2007 MassBank Record PR100643, http://www.massbank.jp

* - masa związku wyizolowana za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej

** - izomery podstawnikowe

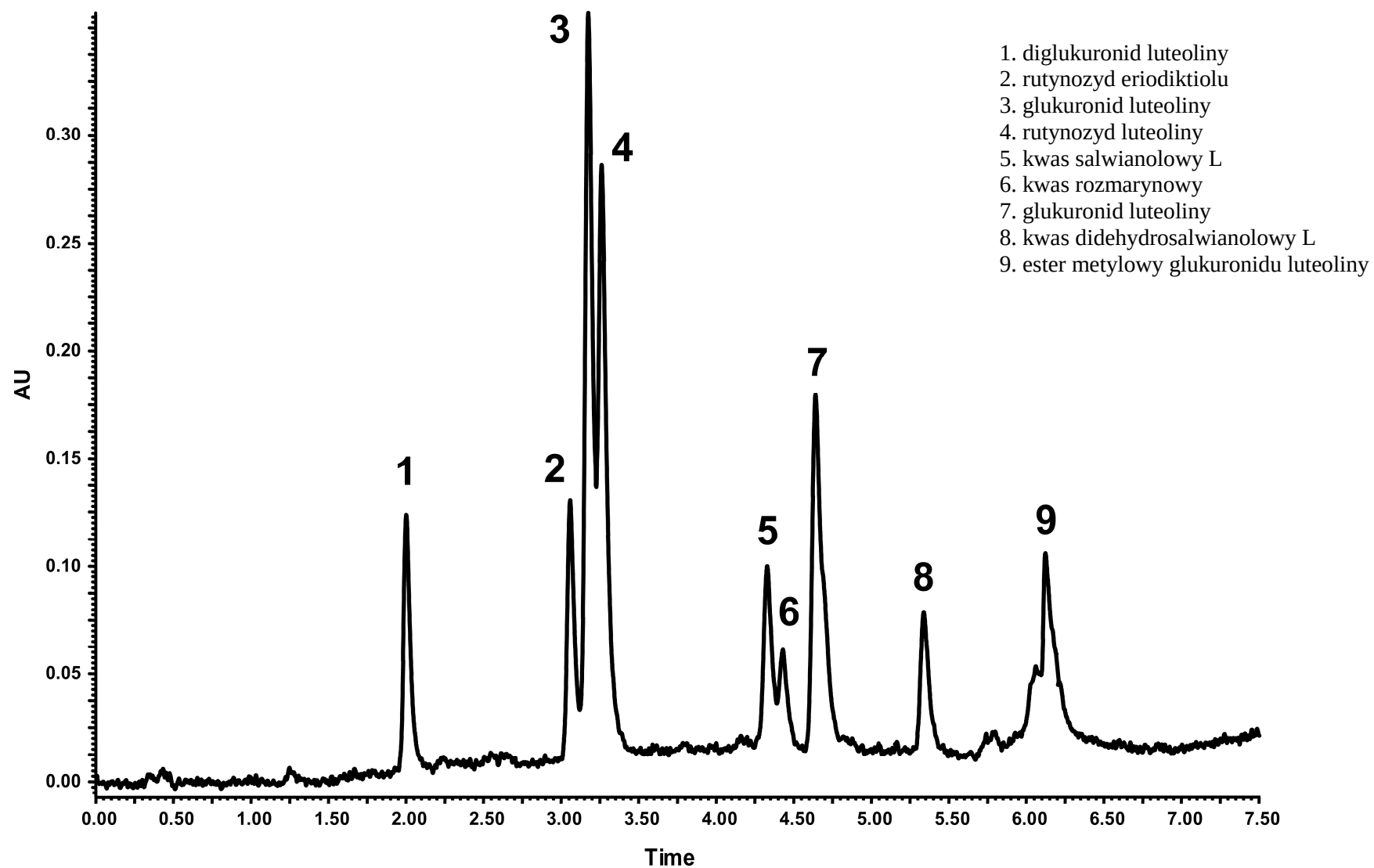
Gatunek *M. longifolia* będący przedmiotem niniejszej pracy był już obiektem badań fitochemicznych, mających na celu ustalenie składu metabolitów wtórnych warunkujących jego aktywność biologiczną. Skład chemiczny olejku eterycznego jest poznany i wyczerpująco opisany. Mniej prac dotyczy natomiast syntetyzowanych przez roślinę związków fenolowych. W ekstraktach *M. longifolia* zidentyfikowano m.in. glikozydy luteoliny. Dane literaturowe podają obecność takich związków jak glukuronid oraz rutynozyd tego flawonu [Bourwieg i Pohl, 1973]. Rutynozyd luteoliny zidentyfikowano również w mięcie pieprzowej *M. piperita* [Guédon i Pasquier, 1994; Areias i in., 2001]. W badanym ekstrakcie *M. longifolia* zidentyfikowano ponadto jeden flawanon - rutynozyd eriodiktiolu. Obecność tego związku w ekstrakcie *M. longifolia* potwierdzają także wcześniejsze badania [Bourwieg i Pohl, 1973]. Występowanie rutynozydu eriodiktiolu wykazano ponadto w *M. piperita* [Guédon i Pasquier, 1994; Areias i in., 2001]. Przeprowadzone analizy jakościowe wykazały, że profil syntetyzowanych związków fenolowych w badanym materiale różnił się pod względem obecności niektórych metabolitów od profili opisywanych dla tego gatunku w literaturze. W badanym materiale nie zidentyfikowano następujących metabolitów: 7-glukuronidu apigeniny, 7-rutynozydu akacetyny, 7-rutynozydu diosmetyny, 7-rutynozydu hespertyny [Bourwieg i Pohl, 1973], 7-glukozydu luteoliny [Bourwieg i Pohl, 1973; Sharaf i in., 1999], izoorientyny, 2-wiceniny, hypolaetyny, 1-luceniny, 7-O-neohesperozydu, 7-O-metylo-3'-O-glukozydo-5'-O-ramnozydu trycetyny, 3'-O-glukozydo-5'-O-ramnozydu trycetyny oraz 3'-O-ramnozylo-(1→4)-ramnozydu trycetyny [Sharaf i in., 1999], 5,7,4'-trihydroksy-6,2',3'-trimetoksyflawonu [Ghoulami i in., 2001] oraz longityny [Ali i in., 2002]. Różnice w profilu syntetyzowanych związków fenolowych mogą być wytłumaczone odmiennymi warunkami geograficznymi: Polska, Arabia Saudyjska [Sharaf i in., 1999], Maroko [Ghoulami i in., 2001], Pakistan [Ali i in., 2002] w jakich prowadzono uprawę *M. longifolia*. Skład jakościowy i ilościowy zależy od warunków klimatycznych oraz lokalnego ekosystemu, w którym występują rośliny. Dyskutowane dane literaturowe nie podają ponadto dokładnej przynależności systematycznej analizowanego materiału w randze podgatunku. Ze względu na zróżnicowanie geograficzne istnieje również duże prawdopodobieństwo, że do badań wykorzystano różne podgatunki *M. longifolia*. Najnowsza systematyka rodzaju *Mentha* wyróżnia aż 22 podgatunki *M. longifolia*, przy czym ich rozmieszczenie geograficzne jest raczej wąskie i specyficzne dla każdego podgatunku [Tucker i Naczi, 2007]. Dane literaturowe wykazują poza tym na

zróźnicowanie profilu syntetyzowanych związków fenolowych pomiędzy różnymi gatunkami mięty (Tabela 3). Zdolność biosyntezy metabolitów charakterystycznych gatunkowo może być wykorzystana jako dodatkowy czynnik przy określaniu przynależności systematycznej hybryd oraz mieszańców międzygatunkowych, gatunków dziko rosnących [Voirin i in. 1999]. Analiza genetycznego pokrewieństwa gatunków *Mentha* wzbogacona o dane fitochemiczne pozwoli uściślić i uporządkować skomplikowaną systematykę tego rodzaju. Pomimo, iż profil syntetyzowanych związków fenolowych jest charakterystyczny dla każdego gatunku, czy nawet odmiany, wszystkie surowce z rodzaju *Mentha* stanowią dobre źródło związków przeciwutleniających w diecie człowieka.

4.2.2. Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cieczowej z detekcją UV

Podstawową techniką wykorzystaną podczas analiz jakościowych oraz ilościowych była ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC). Rozdziały prowadzono na kolumnie ze złożem typu RP-C18, natomiast jako fazę ruchomą zastosowano gradient acetonitrylu w wodzie. Warunki te są powszechnie stosowane w analizach związków fenolowych.

Podczas rozdziałów fazę ruchomą stanowił gradient roztworu A (woda zawierająca 0,1% kwasu mrówkowego) oraz roztworu B (woda-acetonitryl (60:40) zawierające 0,1% kwasu mrówkowego). Modyfikując zarówno czas analizy jak i zmianę stężenia acetonitrylu opracowano trwający 7,5 min. rozdział (Rys. 16) dający zadawalającą separację związków fenolowych obecnych w próbce. W tych warunkach niektóre piki (związki nr 2 - 4 oraz 5 i 6) nie były do końca rozdzielone. Wydłużanie czasu analizy powodowało jednak rozszerzanie się pików i nie poprawiło ich separacji.



Rys. 16. Chromatogram UPLC ekstraktu z części nadziemnych *M. longifolia* ($\lambda = 350$ nm).

4. 3. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej wyizolowanych związków oraz ekstraktu *M. longifolia*

Każde oznaczenie zdolności antyoksydacyjnych jest ściśle skorelowane z naturą wolnego rodnika, gdyż tylko pewne ugrupowania obecne w cząsteczce związku o właściwościach antyoksydacyjnych mają zdolność do ich zmiatania. Rodnik DPPH[•] okazał się idealnym związkiem w badaniu właściwości przeciwutleniających, zwłaszcza polifenoli. Zarówno DPPH[•] jak i ABTS^{•+} oddziałują z antyoksydantami poprzez połączony mechanizm przekazania atomu wodoru (Hydrogen Atom Transfer) oraz transferu elektronu (Elektron Transfer). Właściwości antyoksydacyjne związków fenolowych polegają na eliminowaniu reaktywnych form tlenu, blokowaniu (zmiataniu) wolnych rodników (najczęściej nadtlennokowych, hydroksylowych i hydroksynadtlenkowych), inhibicji enzymów z grupy oksydaz a także chelatowaniu jonów metali, głównie żelaza i miedzi [Rice-Evans i in., 1996; Huang i in., 2005]. Przeciwutleniacze mogą chronić organizm człowieka przed skutkami stresu oksydacyjnego i zapobiegać w ten sposób przed rozwojem chorób, m.in. miażdżycy naczyń oraz zmianami nowotworowym.

Wyodrębnione i oczyszczone miligramowe ilości związków fenolowych (p.p. 4.2.1.) posłużyły do określenia ich właściwości antyoksydacyjnych. Oznaczano je metodą polegającą na badaniu spadku wartości absorbancji zachodzącej podczas reakcji redukcji wolnego rodnika DPPH[•], jak również wolnego rodnika ABTS^{•+} przez ekstrakt *M. longifolia*, a także roztwory poszczególnych związków fenolowych. Wyniki analiz zostały przedstawione w Tabeli 12.

Tabela 12. Aktywność antyoksydacyjna poszczególnych związków fenolowych oraz ekstraktu *M. longifolia*

związek	TEAC _{DPPH} (μM g ⁻¹)	TEAC _{ABTS} (μM g ⁻¹)
kwask rozmarynowy	6729,29	4522,77
glukuronid luteoliny*(3)	2608,96	3955,37
glukuronid luteoliny*(7)	1662,77	3839,07
rutynozyd eriodiktiołu	1566,08	2995,78
rutynozyd luteoliny	766,80	2128,07
ekstrakt <i>M. longifolia</i>	1540,85	1994,59

* izomery, związki nr 3 i 7.

Z prezentowanych danych wynika, że najwyższą aktywnością przeciwutleniającą spośród wszystkich związków poddanych analizie charakteryzował się kwas rozmarynowy. Wartości TEAC dla kwasu rozmarynowego wynosiły 6729,29 $\mu\text{M g}^{-1}$ dla oznaczeń z DPPH $\cdot$ oraz 4522,77 $\mu\text{M g}^{-1}$ dla oznaczeń z ABTS $^{+\cdot}$. Liczne dane literaturowe potwierdzają również wysoką zdolność przeciwutleniającą kwasu rozmarynowego [Chen i Ho, 1997; Lu i Foo, 2001; Soobrattee i in., 2005]. Aktywność antyoksydacyjna tego metabolitu determinowana jest w głównej mierze jego strukturą chemiczną. Aktywność antyoksydacyjna polifenoli związana jest m.in. z ilością oraz pozycją grup hydroksylowych w strukturze związku. Kwas rozmarynowy posiada cztery takie grupy. Ponadto, dwie grupy hydroksylowe są przyłączone do pierścienia benzenowego w pozycji *orto*-, tworząc strukturę katecholu. Obecność grup hydroksylowych w tym położeniu wpływa na zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych polifenoli. Kwas rozmarynowy wykazywał największą efektywność zmiatania rodników DPPH $\cdot$ w różnych doświadczeniach *in vitro*, w porównaniu do pozostałych kwasów hydroksycynamonowych [Chen i Ho, 1997].

W przypadku oznaczeń z DPPH $\cdot$ właściwości antyoksydacyjne glukuronidów luteoliny wyrażone jako TEAC wynosiły odpowiednio 2608,96 $\mu\text{M g}^{-1}$ (związek nr 3) oraz 166277 $\mu\text{M g}^{-1}$ (związek nr 7). Aktywniejszym z izomerów był związek nr 7. Tak więc przyłączenie kwasu glukuronowego w określonej pozycji aglikonu w znacznym stopniu wpływa na zmianę właściwości przeciwutleniających związku. Rutynozyd luteoliny (766,80 $\mu\text{M g}^{-1}$) oraz rutynozyd eriodiktiolu (1566,08 $\mu\text{M g}^{-1}$) również wykazywały zróżnicowane właściwości antyoksydacyjne wyrażone jako TEAC. Może być to spowodowane budową aglikonów tych związków. Luteolina podobnie jak i eriodiktiol posiada cztery grupy hydroksylowe, natomiast aglikon luteoliny posiada ponadto grupę funkcyjną 2,3-dihydro w pierścieniu C cząsteczki, co może korzystnie wpłynąć na zwiększanie właściwości antyoksydacyjnych. Wartość TEAC dla ekstraktu *M. longifolia* wynosiła 1540,85 $\mu\text{M g}^{-1}$.

W przypadku oznaczeń z ABTS $^{+\cdot}$ największą aktywność antyoksydacyjną 4522,77 $\mu\text{M g}^{-1}$ wyrażoną jako TEAC wykazywał kwas rozmarynowy. Właściwości antyoksydacyjne glukuronidów luteoliny były zbliżone i wynosiły odpowiednio 3955,37 $\mu\text{M g}^{-1}$ oraz 3839,07 $\mu\text{M g}^{-1}$. W oznaczeniu z tym rodnikiem wartości antyoksydacyjne (wyrażone jako TEAC) uzyskane dla rutynozydów nie różniły się tak znacząco jak w przypadku oznaczeń z DPPH $\cdot$. Wynosiły one 2995,78 i 2128,07 $\mu\text{M g}^{-1}$

odpowiednio dla rutynozydu eriodiktiołu oraz rutynozydu luteoliny. Najniższą wartość TEAC równą 1994,59 $\mu\text{M g}^{-1}$ wykazywał ekstrakt *M. longifolia*.

Przeprowadzono także badania aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów *M. longifolia* w zależności od warunków ich przechowywania. Celem podjętych badań było określenie zmian w aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów zachodzących w trakcie przechowywania. Dla surowych oraz wstępnie oczyszczonych ekstraktów określono początkowe wartości TEAC_{DPPH} oraz TEAC_{ABTS}. Następnie przechowywano je w zróżnicowanych warunkach temperaturowych. Część ekstraktów została umieszczona w lodówce (temp. 2-4°C), inne były przechowywane w temperaturze pokojowej ok. 25°C (czerwiec 2008, temp. max 32°C). Wyniki doświadczeń prezentuje Tabela 13.

Tabela 13. Wpływ warunków przechowywania ekstraktu *M. longifolia* na jego właściwości antyoksydacyjne

rodzaj ekstrakt	TEAC _{DPPH} ($\mu\text{M g}^{-1}$ s. m.)			TEAC _{ABTS} ($\mu\text{M g}^{-1}$ s. m.)		
	wartość początkowa	ekstrakt przechowywany w temperaturze pokojowej	ekstrakt przechowywany w lodówce	wartość początkowa	ekstrakt przechowywany w temperaturze pokojowej	ekstrakt przechowywany w lodówce
surowy ekstrakt	670,55	1188,80	674,51	1191,01	1726,13	1715,68
frakcja fenolowa ekstraktu	1470,12	1182,80	1384,94	1705,33	2403,17	1935,76

Analizując powyższe dane można jednoznacznie stwierdzić, że wstępne oczyszczenie ekstraktu metodą SPE wpłynęło na zwiększenie jego właściwości antyoksydacyjnych. W przypadku oznaczeń z DPPH[•] było to odpowiednio 670,55 $\mu\text{M g}^{-1}$ s. m. dla ekstraktu surowego oraz 1470,12 $\mu\text{M g}^{-1}$ s. m. dla oczyszczonej frakcji fenolowej ekstraktu (wartości te zostały przedstawione jako TEAC). W przypadku oznaczeń z ABTS^{•+} właściwości antyoksydacyjne wynosiły 1191,01 $\mu\text{M g}^{-1}$ s. m. versus 1705,33 $\mu\text{M g}^{-1}$ s. m. odpowiednio dla ekstraktu surowego oraz oczyszczonego (wartości te zostały przedstawione jako TEAC). Z analizy powyższej tabeli można wywnioskować również, że stabilność antyoksydacyjna uzależniona jest od warunków przechowywania ekstraktu. Przechowywanie ekstraktu w temperaturze 25°C wpłynęło na zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów. Przyczyną tego procesu mógł być rozkład wiązań glikozydowych w związkach fenolowych.

Obecność wolnych aglikonów charakteryzujących się większymi właściwościami antyoksydacyjnymi w porównaniu do swoich glikozydów może tłumaczyć ten ewenement.

4. 4. Kultury kalusowe *M. longifolia* oraz *M. piperita*

4.4.1. Sterylizacja nasion *M. longifolia* oraz *M. piperita*

W biotechnologicznej części badań podjęto próby określenia warunków indukcji kultur kalusowych, a następnie kultur zawiesinowych *M. longifolia* oraz *M. piperita*. Najodpowiedniejszym materiałem do wyprowadzenia kultur są fragmenty sterylnych roślin. W celu otrzymania sterylnych roślin, nasiona obu gatunków mięty odkażano roztworami 70% EtOH, 10% H₂O₂ lub 10 % komercyjnym środkiem dezynfekującym zawierającym podchloryn wapnia. W procesie tym konieczny jest kompromis pomiędzy stężeniem i czasem działania środka odkażającego, który dociera do coraz głębszych warstw tkanek, mogąc jednocześnie uszkodzić zarodki znajdujące się wewnątrz okrywy nasiennej. Określono skuteczność sterylizacji oraz ilość prawidłowo skielkowanych siewek. Wyniki te przedstawia Tabela 14.

Tabela 14. Wpływ czasu sterylizacji na kiełkowanie nasion *M. longifolia*

CZAS STERYLIZACJI			
NASIONA	15	20	30
LICZBA NASION WYSIANYCH	70	70	70
STERYLNE SKIELKOWANE PRAWIDŁOWO	58	62	54
STERYLNE ZDEFORMOWANE	2	2	5
STERYLNE NIESKIELKOWANE	3	2	7
ZAKAŻONE	7	4	4

Analiza otrzymanych danych wykazała, iż optymalny jest czas sterylizacji wynoszący 20 min.

4.4.2. Sterylizacja liści roślin *M. longifolia* oraz *M. piperita* rosnących w warunkach polowych

Ulistnione szczyty pędów z roślin gruntowych sterylizowano 70% roztworem etanolu, a następnie 10% komercyjnym środkiem dezynfekującym zawierającym podchloryn wapnia. Najbardziej skuteczną metodą sterylizacji było odkazanie 70% roztworem etanolu przez 1 min. Wydłużanie tego okresu powodowało liczne nekrozy fragmentów liści, co wpłynęło na zmniejszenie się liczby eksplantatów wytwarzających tkankę przyranną (kalus).

4. 4. 3. Wzrost i różnicowanie kalusa

Zoptymalizowano skład pożywek w odniesieniu do regulatorów wzrostu. W celu doboru najbardziej odpowiedniego eksplantatu przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnych organów roślinnych.

4. 4. 3. 1. Wpływ rodzaju eksplantatu wykorzystanego do zainicjowania kultury

Kultury kalusowe *M. longifolia* i *M. piperita* założono z fragmentów organów sterylnych roślin, jak również z fragmentów młodych liści pochodzących z roślin polowych. Początkowo tkankę kalusową zainicjowano z liścieni części hipokotyli młodych 7 dniowych siewek. Organ ten jest często wykorzystywany do zakładania kultur kalusowych. Jako eksplantaty wykorzystano także młode liście oraz fragmenty łodyg. Z przebadanych organów, liście okazały się być najlepszym eksplantantem dla zainicjowania tkanki kalusowej. Eksplantaty te tworzyły tkankę kalusową na wszystkich typach pożywek, ponadto tworzeniu kalusa nie towarzyszyła organogeneza lub nekrozy, które obserwowano przy zastosowaniu innych fragmentów roślinnych.

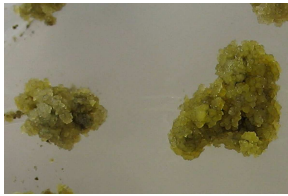
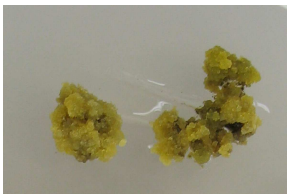
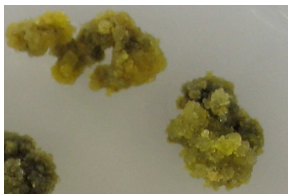
4. 4. 3. 2. Wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu na rozwój tkanki kalusowej

Kultury kalusowe z liści założono na pożywce LS wykorzystując kombinacje i stężenia regulatorów wzrostu prezentowane w Tabeli 10. Na wszystkich podłożach hodowlanych (z wyjątkiem kontrolnego) stwierdzono rozwój tkanki kalusowej. Jednakże w zależności od zastosowanej kombinacji stężeń hormonów zaobserwowano pewne różnice cech morfologicznych (barwa, spójność komórek, struktura powierzchni oraz zdolność do organogenezy) narastającego kalusa. Morfologię tkanek kalusowych utrzymywanych w kulturach przez 5 miesięcy prezentują tabele 15 - 18. Kalus wykazywał również zróżnicowanie pod względem przyrostu świeżej masy. Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że fragmenty liści są organem najłatwiej formującym tkankę kalusową w przypadku obu gatunków mięty.

W przypadku kultur kalusowych *M. longifolia* oraz *M. piperita* zarówno stężenie regulatorów wzrostu, jak i proporcja fitohormonów auksyna : cytokinina wpływały na zdolność komórek do agregacji, a tym samym na zwartość tkanek kalusowych. Stosunek 2 : 0,5 stymulował tworzenie się zwartego, twardego kalusa. Luźną, łatwo rozpadającą się tkankę obserwowano natomiast przy proporcji 1 : 0,5

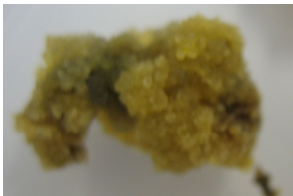
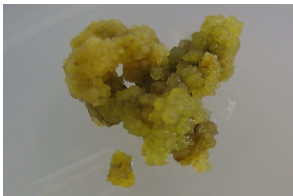
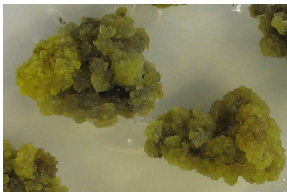
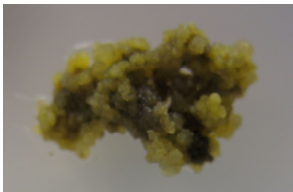
Kalus z liści roślin polowych indukowano na dwóch wariantach hormonalnych, o proporcji auksyny do cytokininy, które okazały się być najlepsze dla liści. Były to więc pożywki suplementowane 1 mg L⁻¹ BA i 0,5 mg L⁻¹ 2,4 D lub 2 mg L⁻¹ 2iP i 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D.

Tabela 15. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i 2iP na tworzenie tkanki kalusowej na liściach *M. longifolia*

Cechy tkanki kalusowej: obfitość, struktura, barwa itp.					
BA					
2,4-D	stężenie [mg/l]	0,5	1	2	
	0,5	średnio obfity żółtokremowy kruchy 	średnio obfity żółtokremowy, kruchy 	słaby, żółtokremowy, kruchy 	
	1	średnio obfity, żółtokremowy kruchy nekrozy 	słaby, żółty, kruchy, 	słaby, żółty, kruchy, 	
	2	bardzo słaby żółtokremowy kruchy 	słaby jasnokremowy zwały 	słaby żółty kruchy nekrozy 	

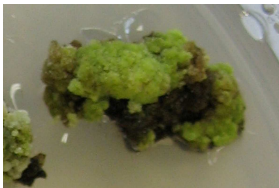
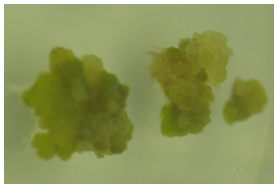
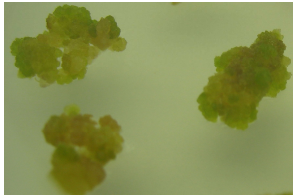
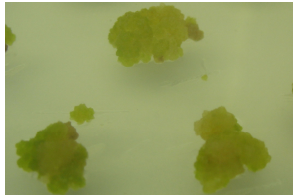
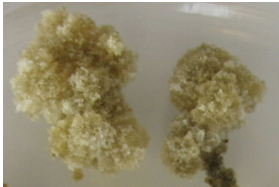
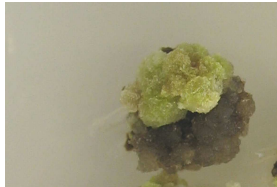
kontrola – BRAK KALUSA

Tabela 16. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i BA na tworzenie tkanki kalusowej na liściach *M. longifolia*

Cechy tkanki kalusowej: obfitość, struktura, barwa itp.						
BA						
2,4-D	stężenie [mg L ⁻¹]	0,5	1		2	
	0,5	średnio obfity, żółtokremowy, kruchy 	obfity, żółtokremowy, kruchy, gruzelkowaty		średnio obfity, żółtokremowy, kruchy 	
	1	średnio obfity, żółtokremowy, kruchy 	średnio obfity, żółty, kruchy 		słaby, żółty, kruchy 	
	2	słaby, żółtokremowy, kruchy 	słaby, jasnokremowy, kruchy 		słaby, żółty, kruchy, nekrozy 	

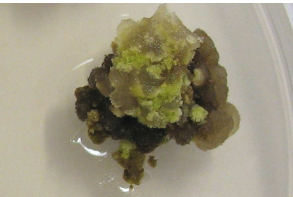
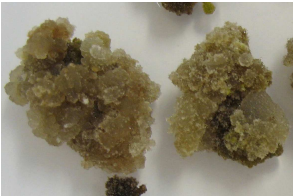
kontrola – BRAK KALUSA

Tabela 17. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i 2iP na tworzenie tkanki kalusowej na liściach *M. piperita*

Cechy tkanki kalusowej: obfitość, struktura, barwa itp.						
2iP						
2,4-D	stężenie [mg L ⁻¹]	0,5	1	2		
	0,5	średnio obfity, jasnozielony, b. twardy, nekrozy 	średnio obfity, zielony, kruchy 	obfity, jasnozielony, kruchy, gruzelkowaty 		
	1	słaby niejednorodny jasnozielony lub brunatny twardy 	średnio obfity, żółtozielony, kruchy 	średnio obfity, żółtozielony, kruchy, nekrozy 		
	2	średnio obfity jasnokremowy, kruchy, małe nekrozy 	słaby jasnokremowy twardy, nekrozy 	bardzo słaby, żółtokremowy, twardy, nekrozy 		

kontrola – BRAK KALUSA

Tabela 18. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i BA na tworzenie tkanki kalusowej na liściach *M. piperita*

Cechy tkanki kalusowej: obfitość, struktura, barwa itp.					
BA					
2,4-D	stężenie [mg L ⁻¹]	0,5	1	2	
	0,5	średnio obfity, jasnokremowy, kruchy 	średnio obfity, niejednorodny, zielony lub brunatny, kruchy 	średnio obfity, niejednorodny: jasnokremowy lub żółtokremowy kruchy 	
	1	średnio obfity jasnozielony lub brunatny twardy 	średnio obfity jasnokremowy kruchy 	średnio obfity jasnokremowy kruchy 	
	2	średnio obfity jasnokremowy kruchy małe nekrozy 	słaby jasnokremowy kruchy 	bardzo słaby żółtokremowy kruchy 	

kontrola – BRAK KALUSA

4. 4. 3. 3. Wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu na syntezę metabolitów wtórnych w kulturach kalusowych *M. longifolia* i *M. piperita*

Zastosowane proporcje stężeń fitohormonów wpływały na poziom akumulacji kwasu rozmarynowego w tkankach kalusowych. Analizie poddano biomasy kalusowe pochodzące z 5-ego pasażu (Tabela 19). Akumulacja kwasu rozmarynowego generalnie nie była wysoka. W przypadku *M. piperita* jego zawartość wahała się w granicach 6 - 8 mg g⁻¹s.m. Maksymalną zawartość 14,67 mg g⁻¹s.m. oznaczono w biomase kalusa hodowanej na pożywce LS z dodatkiem 2 mg L⁻¹ BA oraz 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Kalus ten charakteryzował się bardzo zwartą strukturą, przez co nie został wykorzystany do indukcji zawiesiny komórkowej. Zawartość kwasu rozmarynowego była jeszcze mniejsza w kalusach *M. longifolia* gdzie oscylowała w przedziale 0,1 - 1,28 mg g⁻¹s.m. Istnieje przekonanie, że wyższy poziom auksyn, a zwłaszcza 2,4-D w kulturze stymuluje podziały komórkowe, a więc i przyrost tkanki. Obniża on jednocześnie poziom metabolitów wtórnych w kulturze [Stafford i in., 1986; Rao i Ravishankar, 2002; Smetanska, 2008].

Najlepszy wariant pożywki dla każdego gatunku został wybrany w oparciu o efektywność przyrostu biomasy tkanek kalusowych oraz skład jakościowy i ilościowy metabolitów wtórnych uzyskany w wyniku analiz biochemicznych. W przypadku *M. longifolia* najbardziej odpowiednią pożywką okazała się pożywka LS wzbogacona w 1 mg L⁻¹ BA oraz 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D, natomiast dla kultur kalusowych *M. piperita* wybrano pożywkę LS z dodatkiem 2 mg L⁻¹ 2iP oraz 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D.

Wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego obserwowano jednak w trakcie prowadzenia kultur kalusowych wyselekcjonowanych linii *M. longifolia* i *M. piperita*. Biomasy pochodzące z 9-ego pasażu gromadziły wielokrotnie większe ilości tego związku (Tabela 20).

Tabela 20. Zawartość kwasu rozmarynowego (mg g⁻¹ s.m.) w czasie trwania kultur kalusowych *M. longifolia* i *M. piperita*

	<i>M. longifolia</i>	<i>M. piperita</i>
kalus pochodzący z 5-ego pasażu	0,13	8,01
kalus pochodzący z 9-ego pasażu	21,57	37,49

Tabela 19. Zawartość kwasu rozmarynowego ($\text{mg g}^{-1}\text{s.m.}$) w kulturach kalusowych *M. longifolia* i *M. piperita* uzyskanych na różnych wariantach pożywki LS (5-ty pasaż)

Mentha longifolia

2iP				
2,4-D	stężenie [mg/l]	0,5	1	2
	0,5	0,17± 0,02	0,58± 0,007	0,93± 0,12
	1	0,39± 0,02	1,28± 0,06	0,43± 0,02
	2	ślady	0,12± 0,01	0,20± 0,03

Mentha piperita

2iP				
2,4-D	stężenie [mg/l]	0,5	1	2
	0,5	7,35± 1,39	7,85± 0,43	8,01± 0,79
	1	4,99± 0,12	1,21± 0,08	6,86± 0,43
	2	6,46± 0,50	4,84± 0,21	8,06± 1,63

BA				
2,4-D	stężenie [mg/l]	0,5	1	2
	0,5	0,43± 0,02	0,13± 0,001	0,12± 0,02
	1	0,07± 0,003	0,05± 0,008	0,18± 0,03
	2	0,09± 0,01	0,03± 0,003	0,04± 0,002

BA				
2,4-D	stężenie [mg/l]	0,5	1	2
	0,5	6,15± 0,32	3,68± 0,12	8,32± 0,30
	1	5,41± 0,32	1,24± 0,08	14,67± 0,12
	2	2,42± 0,25	1,20± 0,05	1,56± 0,13

4. 5. Kultury zawiesinowe *M. longifolia* i *M. piperita*

Stabilne 9-miesięczne tkanki kalusowe (Fot. 8) charakteryzujące się luźną strukturą, odpowiednią do indukcji zawiesin komórkowych oraz intensywnymi przyrostami biomasy (p.p.4.4.) posłużyły do założenia kultur zawiesinowych. Syntetyzowały one kwas rozmarynowy w ilości $21,57 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. - kalus *M. longifolia* oraz $37,49 \text{ mg g}^{-1}$ s.m. - kalus *M. piperita*.

Kultury zawiesinowe w porównaniu z kulturami agarowymi umożliwiają pełniejszą kontrolę procesu doświadczalnego np.: dokarmianie prekursorami szlaków metabolicznych lub elicytację, przez co możliwe jest zwiększenie akumulacji pożądaných metabolitów wtórnych [Bourgaud i in., 2001; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey i Inzé, 2004]. Wstępne badania nad hodowlami *in vitro* wykazały wzrost zawartości kwasu rozmarynowego zarówno w roślinach *in vitro*, jak i w kalusach w porównaniu do części nadziemnych odpowiednich roślin gruntowych.



kalus *M. longifolia* – pożywka LS
+ 1 mg L^{-1} BA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4 D



kalus *M. piperita* – pożywka LS
+ 2 mg L^{-1} 2iP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4 D

Fot. 8. Tkanki kalusowe *M. longifolia* i *M. piperita* pochodzące z 9-ego pasażu

4. 5. 1. Indukcja zawiesin komórkowych

Istotnym czynnikiem warunkującym wzrost zawiesiny komórkowej jest masa komórek w określonej ilości pożywki. Wzrost zawiesiny komórkowej jest mniej intensywny w przypadku, gdy ich gęstość jest niższa. Jako inokulum użyto kalusa z 9-ego pasażu. Grudki kalusa o odpowiedniej strukturze ($0,2 \text{ g}$) były zawieszane w 20 ml pożywki, w 100 ml kolbach Erlenmeyera. Hodowle zawiesinowe prowadzono

na podłożu LS, z takim samym zestawem regulatorów wzrostu jaki był wykorzystany do hodowli poszczególnych rodzajów kalusa:

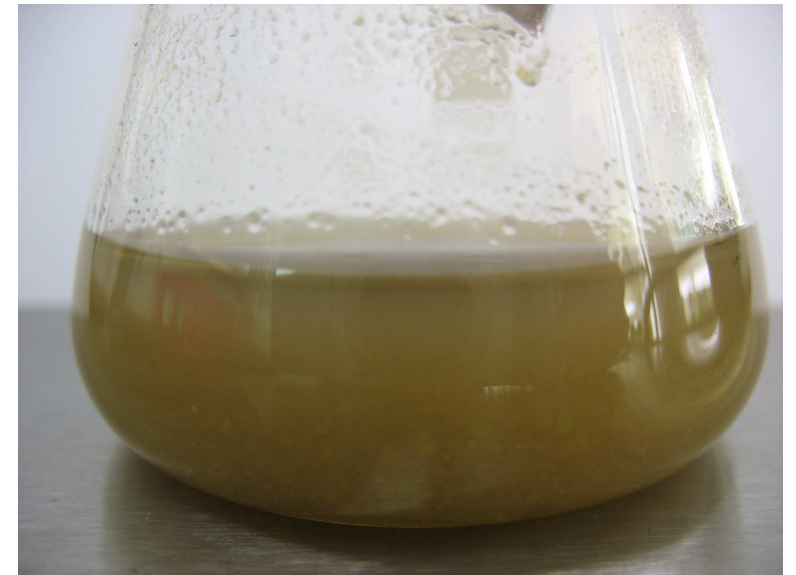
M. longifolia - 1 mg L⁻¹ BA + 0,5 mg L⁻¹ 2,4 D

M. piperita - 2 mg L⁻¹ 2iP + 0,5 mg L⁻¹ 2,4 D

W trakcie początkowych pasaży nastąpiła adaptacja komórek do odmiennego środowiska oraz ich samoistna selekcja. Komórki niezdolne do wzrostu w warunkach płynnych zamierały i były eliminowane z zawiesiny. Na kolbach obserwowano pierścień utworzony z martwych komórek, które osadzały się na szkle. Na skutek tego procesu w kulturach pozostały komórki zdolne do podziałów w pożywce płynnej.

4. 5. 2. Liczba agregatów w zawiesinie i ich morfologiczne zróżnicowanie

W czasie prowadzenia kultury obserwowano zmiany w wyglądzie komórek. Początkowo dominowały duże i wydłużone komórki z dużymi wakuolami. W trakcie kolejnych pasaży komórki te były stopniowo eliminowane z zawiesiny. Jednocześnie zostały one zastąpione przez komórki małe, okrągłe, o małych wakuolach (Fot. 11 i 12). Sukcesywne pasáže oraz filtracja zawiesin umożliwiły otrzymanie ustabilizowanych, jednorodnych zawiesin komórkowych, charakteryzujących się pojedynczymi komórkami oraz drobnymi agregatami komórkowymi.



Fot. 9. Wytrząsana kultura zawiesiniowa *M. longifolia*



Fot. 10. Wytrząsana kultura zawiesiniowa *M. piperita*



Fot. 11. Obrazy mikroskopowe zawiesin komórkowych *M. longifolia*

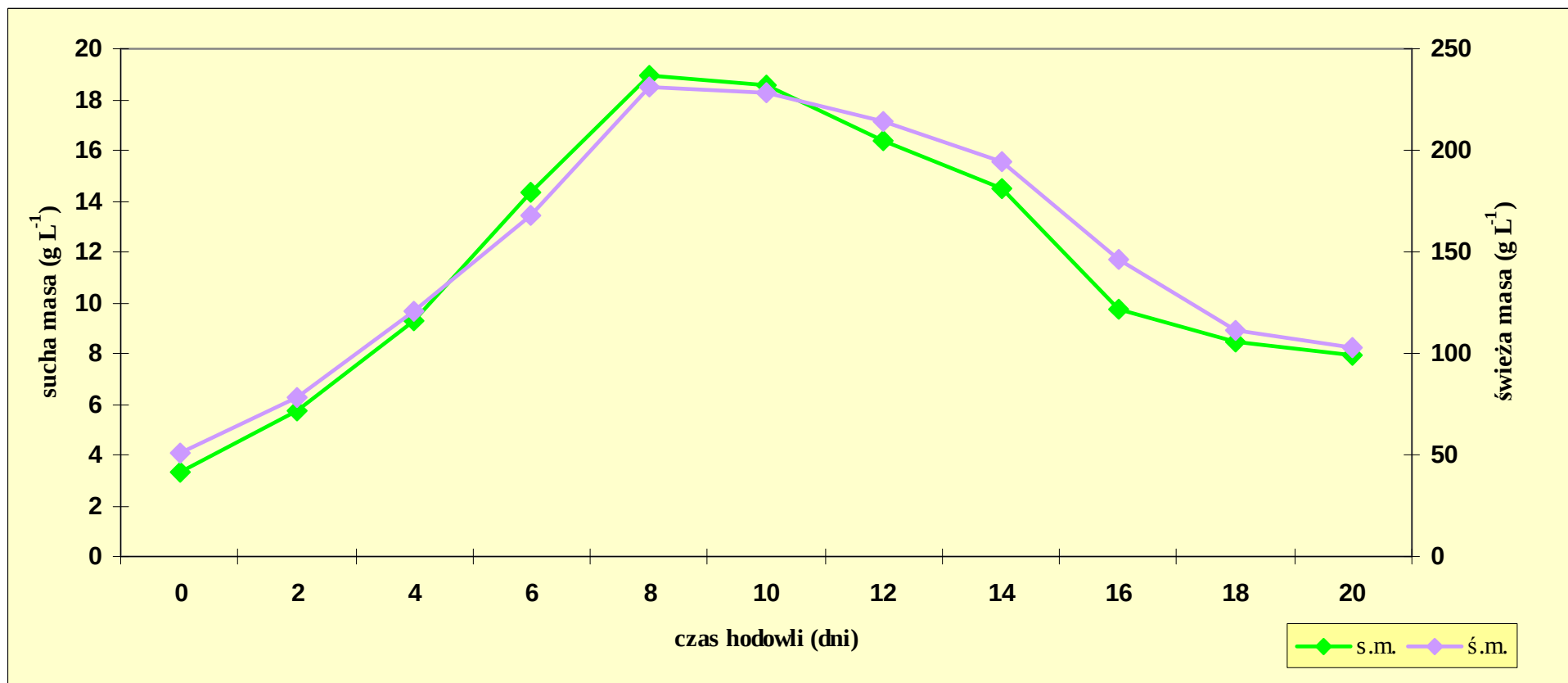


Fot. 12. Obrazy mikroskopowe zawiesin komórkowych *M. piperita*

4. 5. 3. Charakterystyka wzrostu zawiesiny komórkowej *M. piperita*

Na podstawie ilości świeżej (ś.m.) oraz suchej (s.m.) masy tkankowej otrzymanej w poszczególnych dniach cyklu hodowlanego trwającego 20 dni wykreślono krzywe wzrostu zawiesiny (Rys. 17) komórkowej *M. piperita*. Inokulowane na świeżą pożywkę komórki, niemal natychmiast podjęły podziały komórkowe, dlatego też faza spoczynkowa była bardzo krótka (niezauważalna). Następnie komórki osiągnęły fazę wzrostu liniowego, gdzie nastąpiło namnażanie komórek niemal w postępie geometrycznym (2 - 8 dzień hodowli). Maksymalna akumulacja biomasy została odnotowana 8-ego dnia cyklu i wynosiła ona 12,97 g L⁻¹ s.m. W następnych dniach hodowli zawiesina komórkowa osiągnęła fazę stacjonarną. Przyrost suchej masy (s.m.) względem świeżej masy przebiegał równolegle.

Podczas wzrostu kultury zawiesinowej *M. piperita* obserwowano zmianę jej barwy. Z jasnozielonej przekształciła się ona na zielono-brązową, a nawet brązową pod koniec trwania kultury. Brązowienie tkanek w kulturach *in vitro* jest silnym wskaźnikiem wzrostu akumulacji związków fenolowych. Nasilenie intensywności brązowego koloru można tłumaczyć utlenianiem związków fenolowych syntetyzowanych przez komórki zawiesinowe, spowodowane aktywnością oksydazy polifenolowej [Zhou i in., 2010]. W przypadku zawiesin komórkowych *Lavandula intermedia* utlenianie cząsteczki kwasu rozmarynowego, powodowane przez enzymy typu peroksydaz, było czynnikiem powodującym brązowienie kultury. Proces ten był nasilony wraz z wiekiem oraz trwaniem hodowli. Powodował ponadto obniżenie zawartości kwasu rozmarynowego [López-Arnaldos i in., 1994]. Podobne spostrzeżenie opisano również w przypadku zawiesiny komórkowej *Agastache rugosa* [Kim i in., 2001].



Rys. 17. Krzywa wzrostu zawiesiny komórkowej *M. piperita*

4. 5. 4. Zmiany w akumulacji kwasu rozmarynowego w zawiesinie komórkowej *M. piperita* w czasie cyklu hodowlanego

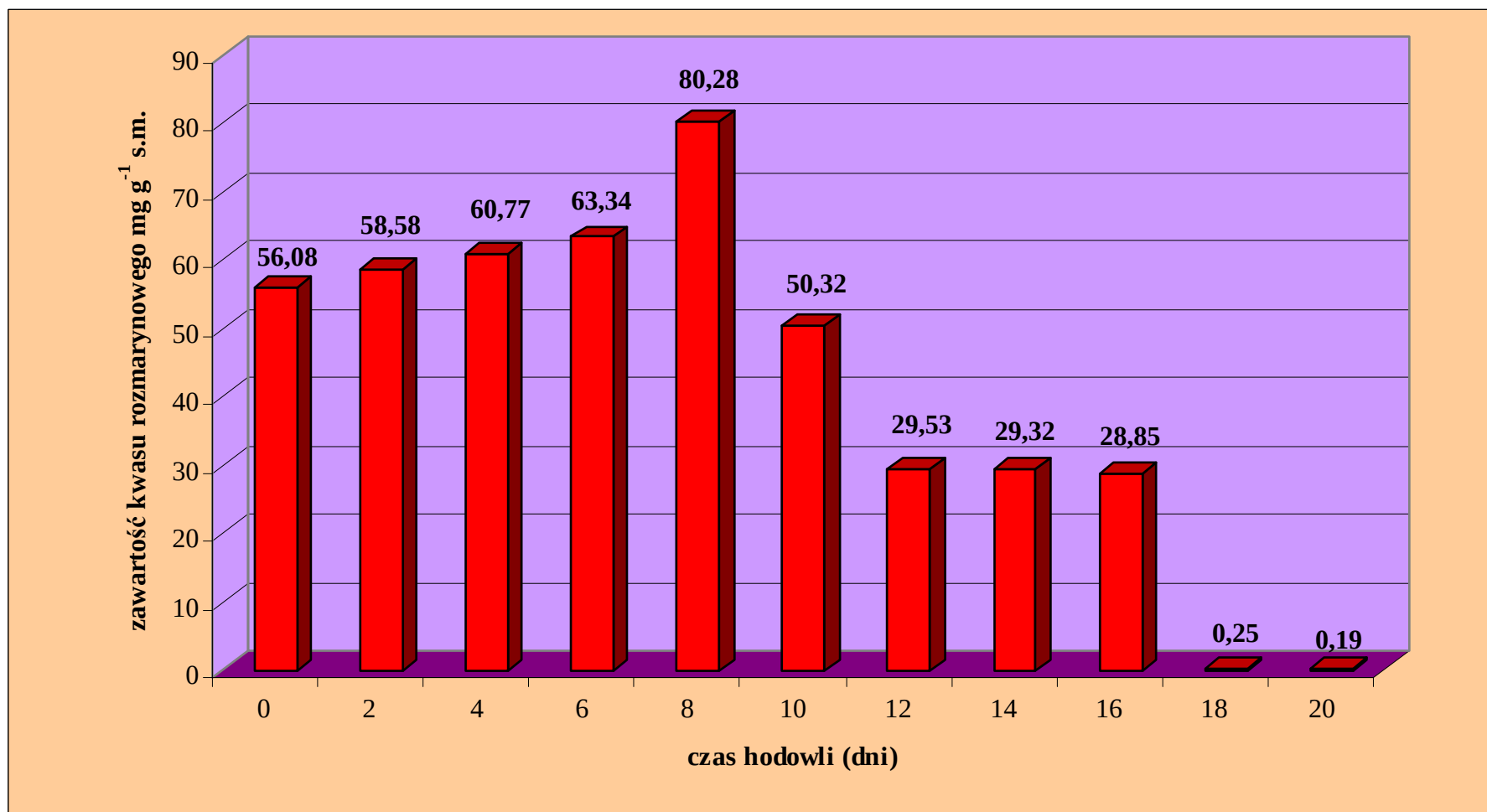
Analizując przyrost biomasy w trakcie cyklu hodowlanego zawiesiny komórkowej *M. piperita*, wykonano także pomiary zawartości kwasu rozmarynowego. Tkanę odsączono od pożywki, a następnie mrożono, liofilizowano, ekstrahowano i oczyszczano frakcję fenolową (p.p. 3.12). Otrzymane ekstrakty poddano analizie ilościowej stosując UPLC.

W zawiesinie komórkowej *M. piperita* kwas rozmarynowy był magazynowany wewnątrzkomórkowo. W płynie pohodowlanym wykryto śladowe ilości tego związku, a niewielki wzrost akumulacji tego metabolitu w pożywce zaobserwowano pod koniec cyklu hodowlanego. Zawartość kwasu rozmarynowego w zawiesinie komórkowej *M. piperita* uzależniona była od fazy jej wzrostu (Rys. 18). Akumulacja tego metabolitu zwiększała się stopniowo podczas liniowej fazy cyklu (2-8 dzień hodowli), będąc szczególnie zintensyfikowaną pomiędzy 6-ym a 8-ym dniem. Ósmego dnia odnotowano maksymalną zawartość kwasu rozmarynowego, która wynosiła 80,28 mg g⁻¹s.m. Był to jednocześnie ostatni dzień wzrostu liniowego zawiesiny, po tym osiągnęła ona fazę stacjonarną. W fazie tej zawartość kwasu rozmarynowego obniżyła się znacząco osiągając wartość 28,85 mg g⁻¹ s.m. W końcowym etapie hodowli (dzień 18 i 20) w biomacie komórkowej stwierdzono jedynie śladowe ilości kwasu rozmarynowego. Wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego może być związany ze stresem fizjologicznym, na skutek wyczerpywania się składników pokarmowych w pożywce, bądź też procesem starzenia się komórek.

Porównując produkcję kwasu rozmarynowego oraz przyrost biomasy możemy stwierdzić, że maksimum akumulacji występowało 8-ego dnia hodowli (ostatni dzień wzrostu liniowego zawiesiny). Zawiesina komórkowa osiągnęła wkrótce fazę spoczynkową. Synteza tego metabolitu miała więc miejsce już po intensywnym namnożeniu się komórek, gdy procesy podziałowe niemalże nie zachodziły.

Podobny schemat akumulacji kwasu rozmarynowego w zawiesinie komórkowej, gdzie jego zawartość rosła wraz z przyrostem biomasy komórkowej, osiągnęła wartość maksymalną, a następnie obniżała się gwałtownie, obserwowano również w przypadku zawiesin komórkowych innych gatunków roślin. Zawiesiny komórkowe *Coleus blumei* akumulowały kwas rozmarynowy kilka dni pod koniec wzrostu zawiesiny [Petersen, 1992]. Akumulacja kwasu rozmarynowego w przypadku zawiesin komórkowych

Agastache rugosa zmieniała się w zależności od fazy wzrostu zawiesiny [Kim i in., 2001]. Akumulacja kwasu rozmarynowego w przypadku zawiesin *Lavandula vera* również była skorelowana z fazą wzrostu zawiesiny. W tym przypadku kwas rozmarynowy był syntetyzowany podczas liniowej fazy wzrostu, między 4-ym a 8-ym dniem hodowli. Maksymalna zawartość wynosiła 68 mg L⁻¹ [Ilieva i Pavlov, 1997].



Rys. 18. Zawartość kwasu rozmarynowego w poszczególnych fazach wzrostu zawiesiny komórkowej *M.piperita* (stężenie wyrażono w mg g⁻¹ s.m.)

4. 6. Porównanie profili *M. longifolia* i *M. piperita* w ekstraktach z roślin polowych oraz w różnych typach kultur *in vitro*

Analizie poddano metanolowe ekstrakty związków fenolowych otrzymanych z roślin gruntowych, roślin hodowanych w warunkach *in vitro*, kultur kalusowych oraz kultur zawiesinowych *Mentha longifolia* i *Mentha piperita* (p.p. 3.12.). Części nadziemne roślin polowych obu gatunków suszono w temperaturze 35°C. W kolejnym etapie rozdrobniony materiał poddano ekstrakcji z wykorzystaniem automatycznego ekstraktora ASE 200. Ekstrakty oczyszczano metodą SPE przy użyciu kolumn SPE (1 cm³, 360 mg; Waters). Istotnym czynnikiem tego procesu jest dobór odpowiedniej ilości ekstraktu nanoszonego na złożo, tak aby ilość związków w ekstrakcie nie przekraczała jego zdolności sorpcyjnej. Pozostały materiał roślinny (rośliny hodowane w warunkach *in vitro*, kultury kalusowe oraz kultury zawiesinowe) zamrożono i zliofilizowano. Kolejne etapy przygotowania ekstraktu fenolowego były już identyczne jak w przypadku materiału polowego.

Identyfikację związków w ekstraktach przeprowadzono w oparciu o wyizolowane standardy. Porównano czasy retencji, widma UV oraz masy cząsteczkowe poszczególnych związków, obecnych w ekstraktach, z wyizolowanymi i scharakteryzowanymi za pomocą LC-ESI-MS wzorcami (p.p. 4.2.). Wykonano krzywe kalibracyjne dla wyizolowanych substancji wzorcowych w zakresie stężeń 01 - 200 µg mL⁻¹, a następnie obliczono dla nich wartości LOD (Granica Wykrywalności ang. Limit Of Detection), LOQ (Granica Oznaczalności ang. Limit Of Quantitation), liniowość oraz R² (kwadrat współczynnika korelacji liniowej). Dane te zostały zebrane w Tabeli 21. W związku z niekompletną separacją niektórych pików przy rozdzielach chromatograficznych (Rys. 16) z zastosowaniem detektora PDA, aby uniknąć problemów związanych z nieprawidłową integracją ich pól powierzchni w analizach zastosowano detektor masowy i technikę monitoringu wybranych jonów (Selected Ion Monitoring - SIM). Chromatogramy SIM poszczególnych standardów przedstawia Rys. 19.

Związki fenolowe w otrzymanych ekstraktach zostały sprofilowane jakościowo. Na podstawie otrzymanych chromatogramów UPLC można stwierdzić, że profile związków fenolowych *M. longifolia* oraz *M. piperita* cechowały się wysokim podobieństwem. Ponadto skład jakościowy poszczególnych związków zmieniał się w podobny sposób dla obu gatunków, zależnie od warunków hodowli (Rys. 20 i 21).

Chromatogramy wskazują jednoznacznie na mniejsze zróżnicowanie metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* w porównaniu z roślinami z uprawy gruntowej. Ekstrakty z roślin polowych charakteryzowały się różnorodnością związków fenolowych; potwierdzono w nich obecność wszystkich dziewięciu analizowanych metabolitów. W kulturach *in vitro* obu gatunków obserwowano uproszczenie syntezy wytwarzanych metabolitów wtórnych. Zarówno w przypadku sterylnych roślin, tkanek kalusowych jak i zawiesin komórkowych dominującym związkiem był kwas rozmarynowy.

W kolejnym etapie poszczególne związki fenolowe analizowanych ekstraktów zostały określone ilościowo (Tabela 22). W przypadku ekstraktów z roślin polowych dla obu gatunków związkiem dominującym okazał się być jedyny flawanon - rutynozyd eriodiktiolu (2). Jego zawartość wynosiła 7,60 mg g⁻¹ s.m. w przypadku *M. longifolia* oraz 18,08 mg g⁻¹ s.m. dla *M. piperita*. Spośród flawonów największą zawartość odnotowano w przypadku rutynozydu luteoliny (4). Zawartość tego związku to 3,57 oraz 8,88 mg g⁻¹ s.m. odpowiednio dla *M. longifolia* i *M. piperita*. Pozostałe flawony tj. diglukuronid luteoliny (1) oraz glukuronid luteoliny (3) były obecne w nieco mniejszym stężeniu. Ponadto suma wszystkich flawonów (pochodne luteoliny) okazała się być niższą od zawartości flawanonu zarówno w przypadku ekstraktu *M. longifolia* (7,53 mg g⁻¹ s.m.), jak i ekstraktu *M. piperita* (15,17 mg g⁻¹ s.m.). Wśród kwasów fenolowych związkiem dominującym był kwas rozmarynowy (6). Jego zawartość była stosunkowo niska w przypadku *M. longifolia* - 1,93 mg g⁻¹ s.m. i zdecydowanie wyższa w przypadku ekstraktu *M. piperita*, gdzie wynosiła 7,10 mg g⁻¹ s.m. Sumaryczna zawartość związków fenolowych w poszczególnych ekstraktach *M. longifolia* wynosiła: rośliny polowe - 17,44 mg g⁻¹ s.m.; rośliny *in vitro* - 5,74 mg g⁻¹ s.m.; kalus - 21,73 mg g⁻¹ s.m.; zawiesina komórkowa - 12,78 mg g⁻¹ s.m. Natomiast sumaryczna zawartość związków fenolowych w poszczególnych ekstraktach *M. piperita* wynosiła: rośliny polowe - 41,74 mg g⁻¹ s.m.; rośliny *in vitro* - 10,76 mg g⁻¹ s.m.; kalus - 37,60 mg g⁻¹ s.m.; zawiesina komórkowa - 61,41 mg g⁻¹ s.m. (Tabela 22). W ekstraktach pochodzących z roślin polowych kwas rozmarynowy stanowił 0,19% oraz 0,71% s.m., odpowiednio dla *M. longifolia* i *M. piperita*. Był on natomiast związkiem dominującym we wszystkich ekstraktach pochodzących z kultur *in vitro*. W kulturach *in vitro* zarówno w przypadku *M. longifolia* jak i *M. piperita* obserwujemy więc uproszczenie syntezy związków fenolowych, pochodzących często ze szlaków metabolicznych, charakteryzujących się skomplikowaną syntezą, na korzyść produkcji kwasu rozmarynowego. Jest on syntetyzowany z prostych aminokwasów: fenyloalaniny

oraz tyrozyny. Jego synteza w roślinie nie jest skomplikowana, a ponadto nie angażuje dużej liczby enzymów (Wstęp, Rozdział 6).

W prezentowanych badaniach zawartość kwasu rozmarynowego w roślinach rosnących w warunkach *in vitro* wynosiła 0,44% s.m. w przypadku *M. longifolia* i 1,04% s.m. dla ekstraktu *M. piperita*. Wartości te są tylko nieznacznie większe od poziomu kwasu rozmarynowego w roślinach rosnących w warunkach polowych. W przypadku kultur kalusowych oraz kultur zawiesin komórkowych, czyli kultur „komórek niezróżnicowanych” jego akumulacja osiągnęła znacznie wyższe wartości. W kulturach kalusowych *M. longifolia* zawartość kwasu rozmarynowego wynosiła 2,15% s.m. Synteza tego metabolitu była wyższa w przypadku kultur kalusowych *M. piperita* gdzie stanowił on 3,74% s.m. Kwas rozmarynowy w zawiesinach komórkowych *M. longifolia* osiągnął poziom 1,27% s.m. (6 dzień hodowli). Wstępne analizy fitochemiczne zawiesiny komórkowej *M. longifolia* pochodzące z 3, 6, 9 oraz 12 dnia hodowli wykazały na bardzo niską zawartość kwasu rozmarynowego oscylującą na poziomie 1 - 1,5% s.m. Produkcja tego związku uległa zatem obniżeniu w porównaniu do tkanki kalusowej, z której zawiesina została wyprowadzona. Spadek syntezy tego metabolitu w porównaniu do wyjściowej tkanki kalusowej mógł być spowodowany zmianą warunków hodowli (pożywka płynna). Niski poziom akumulacji kwasu rozmarynowego w zawiesinie komórkowej *M. longifolia* był przyczyną, która spowodowała, że badania mające na celu określenie szczegółowej charakterystyki wzrostu oraz produkcji kwasu rozmarynowego nie były kontynuowane. Największą zawartość kwasu rozmarynowego wynoszącą 6,02% s.m (6 dzień hodowli – faza wzrostu liniowego) odnotowano w ekstrakcie z zawiesiny komórkowej *M. piperita*. Porównanie uzyskanych wyników na zawartość kwasu rozmarynowego w biomasach kultur *in vitro* gatunku *M. piperita* otrzymanych w kolejnych etapach doświadczeń (roślina *in vitro*, kalus, zawiesina komórkowa) potwierdza efektywność opracowanego systemu hodowlanego do produkcji tego metabolitu (Rys. 22).

Dane literaturowe również wskazują na fakt, iż kwas rozmarynowy jest łatwo akumulowany w niezróżnicowanych kulturach komórkowych. Często jego zawartość jest większa niż w roślinach macierzystych, z których te kultury zostały wyprowadzone [Shety, 2007; Matkowski, 2008]. Największą ilość tego związku sięgającą 33,7% s.m. zidentyfikowano w przypadku kultur kalusowych *Coleus blumei* [Qian i in., 2009] oraz w przypadku zawiesin komórkowych *Salvia officinalis*, gdzie zawartość tego metabolitu osiągnęła poziom 36% s.m. [Hippolite i in., 1992]. Doniesienia te mogą być jednak

zawyżzone, ponieważ przedstawiona w artykułach metodyka jest przedstawiona bardzo lakonicznie. Określenie zawartości kwasu rozmarynowego na tak wysokim poziomie może być wynikiem użycia nieodpowiednich metod analitycznych [Bulgakov i in., 2011]. Wiarygodnym oraz dokładnym sposobem określenia zawartości kwasu rozmarynowego w próbach pochodzących z kultur *in vitro* mogą okazać się biosensory [Franzoi i in., 2009; Litescu i in., 2010; Brondani i in., 2011].

W warunkach *in vitro* produkcja związków fenolowych w przypadku *M. longifolia* oraz *M. piperita* uległa znacznemu uproszczeniu. W przypadku kultur *in vitro* związkiem dominującym był kwas rozmarynowy. W niektórych ekstraktach (Tabela 23) jego zawartość stanowiła 99,8 – 99,9% sumy związków. W związku z tym kultury kalusowe oraz zawiesinowe obu gatunków, a zwłaszcza *M. piperita* gdzie odnotowano wysoką akumulację kwasu rozmarynowego, mogą zostać wykorzystane do jego produkcji. Powyższe wyniki wskazują jednoznacznie, że gatunek *M. piperita* jest bogatszym źródłem związków fenolowych (Tabela 22), jak również kwasu rozmarynowego (Rys. 22) w porównaniu z *M. longifolia*.

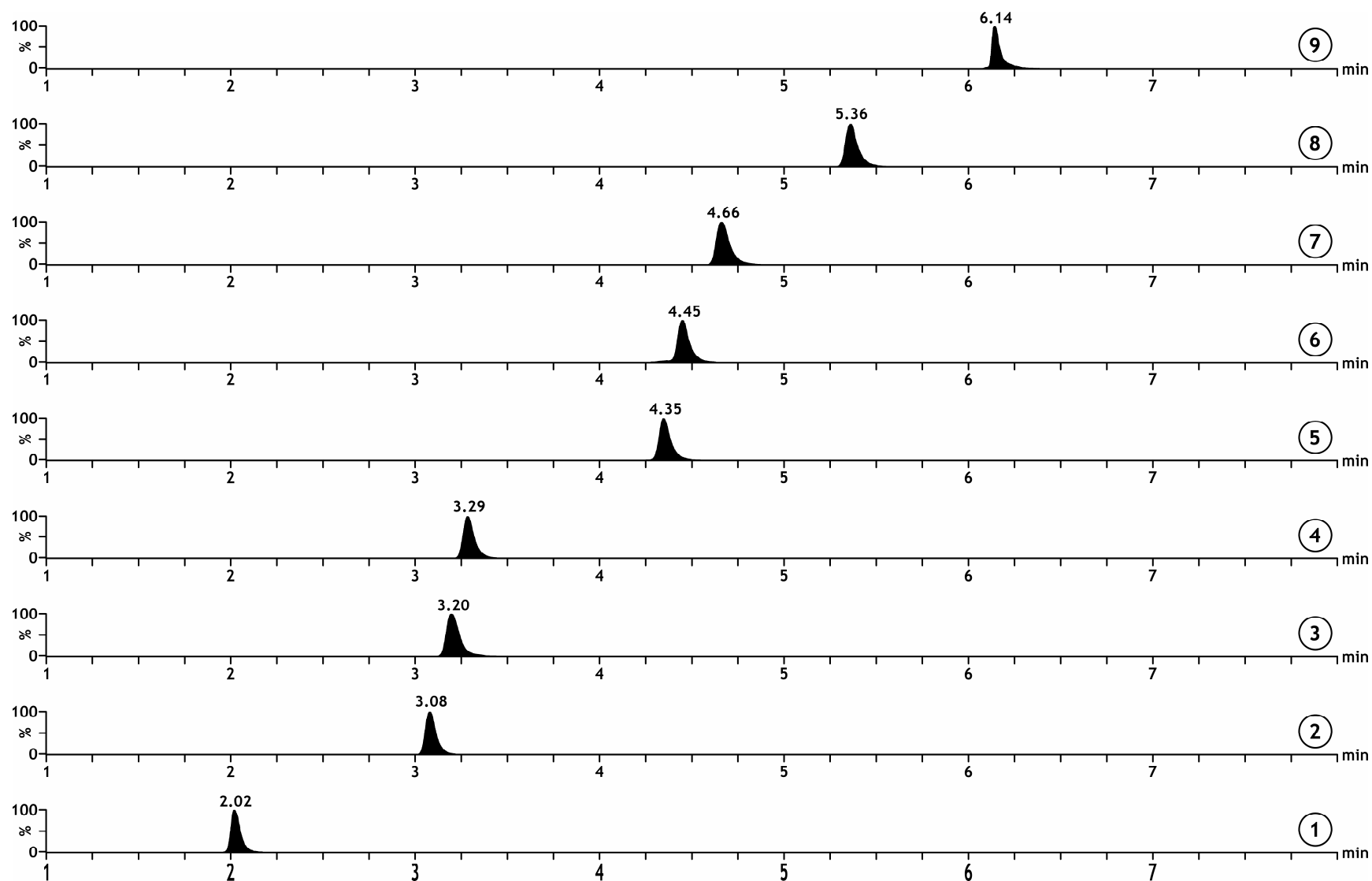
Tabela 23. Udział procentowy kwasu rozmarynowego we frakcji fenolowej różnych ekstraktów *M. longifolia* i *M. piperita*

<i>Mentha longifolia</i>				<i>Mentha piperita</i>			
roślina polowa	roślina <i>in vitro</i>	kalus	zawiesina komórkowa	roślina polowa	roślina <i>in vitro</i>	kalus	zawiesina komórkowa
11,08	77,43	99,29	99,90	17,02	97,29	99,71	98,05

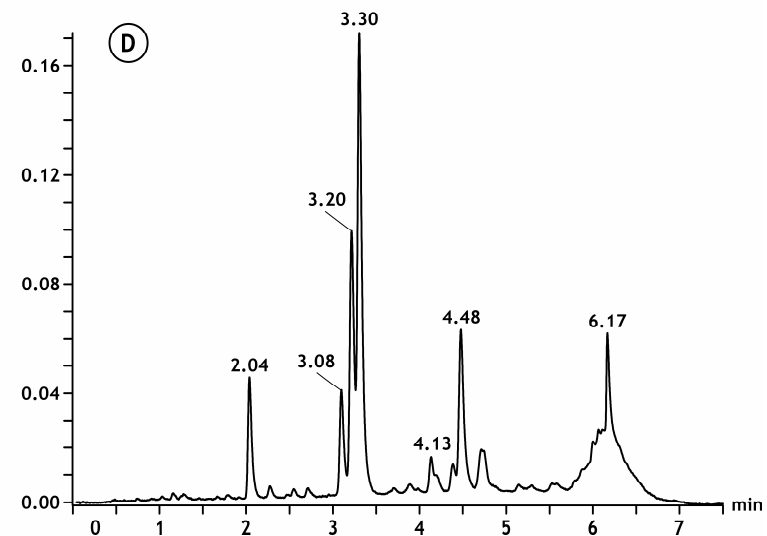
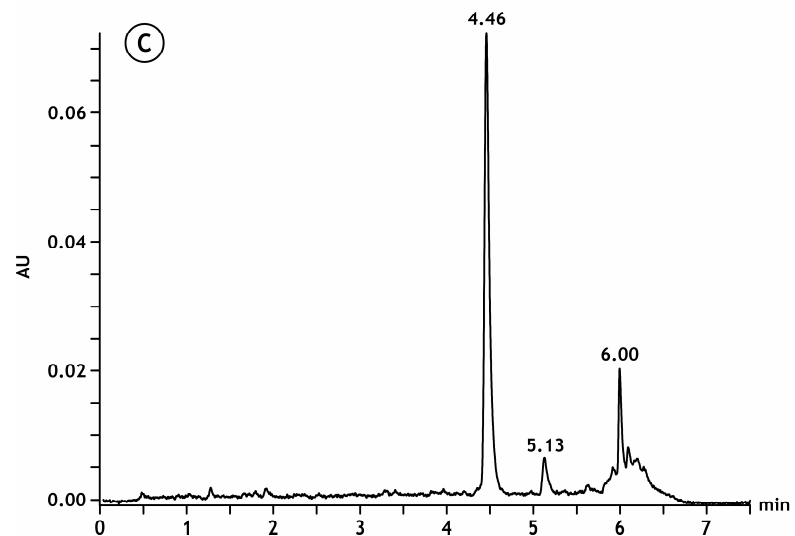
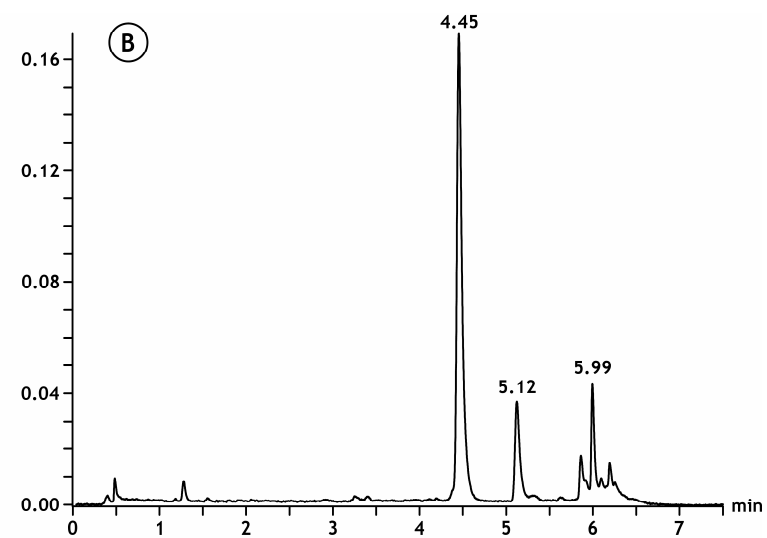
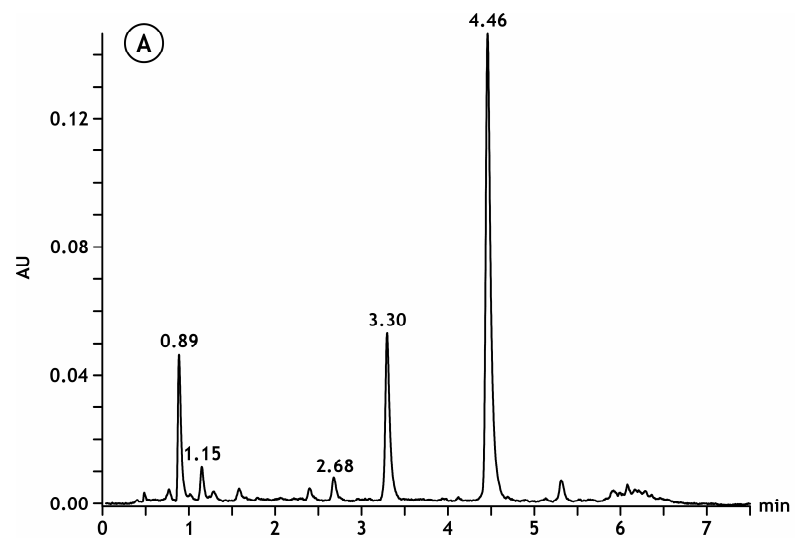
Tabela 21. Dane LOD, LQD, liniowość i R^2 dla stosowanej metody analitycznej

numer związku	nazwa związku	LOD (ng)	LOQ (ng)	liniowość (ng)	R^2
1	diglukuronid luteoliny	5,4	16,1	20 – 350	0,95543
2	rutynozyd eriodiktiolu	0,8	2,3	2,75 – 750	0,97081
3	glukuronid luteoliny*	2,1	6,2	10 – 300	0,92006
4	rutynozyd luteoliny	0,8	2,5	5 – 400	0,96968
5	kwask salwianolowy L	7,2	21,8	25 – 500	0,97302
6	kwask rozmarynowy	6,9	20,8	50 – 750	0,97748
7	glukuronid luteoliny*	2,5	7,6	11 – 300	0,92106
8	kwask didehydrosalwianolowy L	8,3	24,8	30 – 500	0,96948
9	ester metylowy glukuronidu luteoliny	4,6	14	15 - 300	0,90471

*- izomery podstawnikowe



Rys. 19. Chromatogramy SIM poszczególnych związków fenolowych *M. longifolia*.



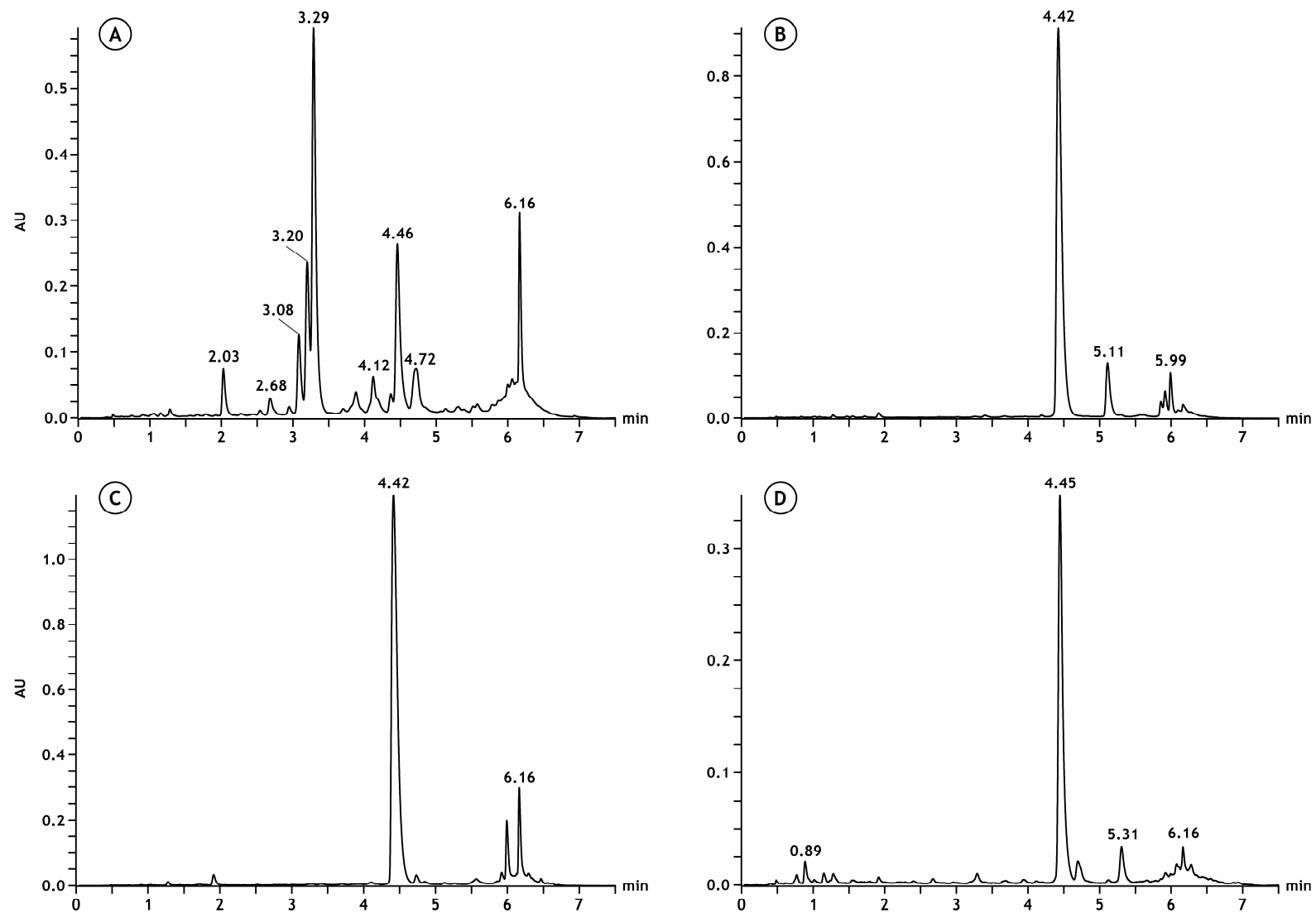
Rys. 20. Profile UPLC różnych ekstraktów *M. longifolia* ($\lambda = 350$ nm)

A – roślina *in vitro*

C – zawiesina komórkowa

B - kalus

D – roślina polowa



Rys. 21. Profile UPLC różnych ekstraktów *M. piperita*

A – roślina polowa

B – kalus

C – zawiesina komórkowa

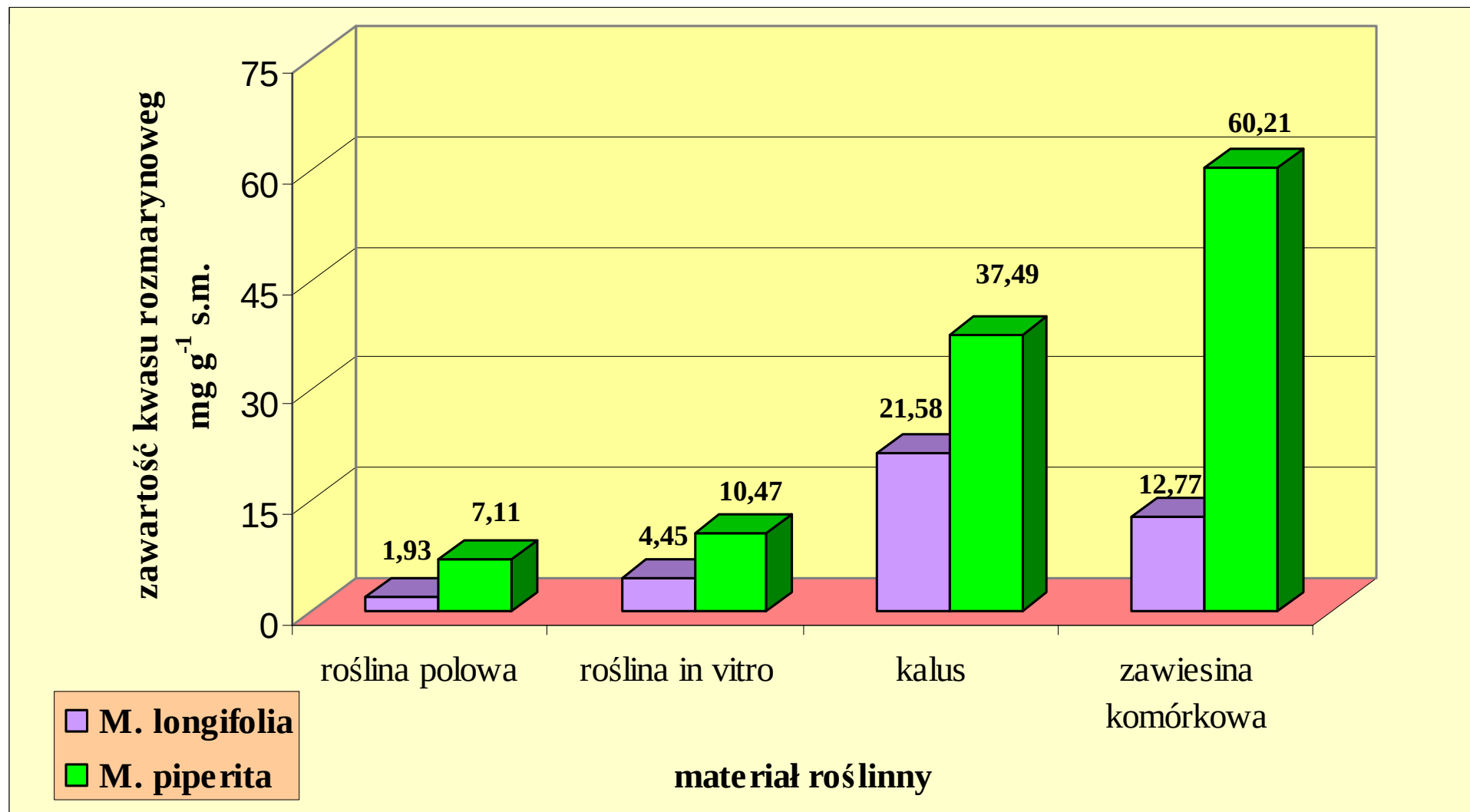
D – roślina *in vitro*

Tabela 22. Zawartość związków fenolowych (mg g⁻¹ s.m.) w różnych ekstraktach *M. longifolia* i *M. piperita*

<i>Mentha longifolia</i>					<i>Mentha piperita</i>			
związek	roślina polowa	roślina in vitro	kalus	zawiesina komórkowa	roślina polowa	roślina in vitro	kalus	zawiesina komórkowa
diglukuronid luteoliny	1,432	NW	NW	NW	2,039	NW	NW	NW
rutynozyd eriodiktiolu	7,604	0,135	0,062	0,006	18,083	0,009	NW	0,006
glukuronid luteoliny *	2,237	0,007	NW	ślady	3,088	ślady	NW	ślady
rutynozyd luteoliny	3,576	1,134	0,018	0,013	8,883	0,124	0,012	0,020
kwas salwianolowy L	0,084	NW	NW	NW	0,389	NW	NW	NW
kwas rozmarynowy	1,933	4,445	21,576	12,768	7,107	10,469	37,492	60,214
glukuronid luteoliny *	0,285	0,005	0,074	NW	1,153	0,026	0,011	0,081
kwas didehydrosalwianolowy L	0,282	ślady	NW	NW	0,994	0,118	0,087	1,089
ester metylowy glukuronidu luteoliny	0,007	0,013	NW	NW	0,009	0,019	NW	NW
SUMA	17,44	5,74	21,73	12,78	41,74	10,76	37,60	61,41

NW – nie wykryto

* – izomery podstawnikowe



Rys. 22. Zawartość kwasu rozmarynowego (mg g⁻¹ s.m.) w różnych ekstraktach *M. longifolia* i *M. piperita* (zawiesiny komórkowe znajdują się w fazie wzrostu liniowego – 6 dzień hodowli)

4. 7. Elicytacja zawiesin komórkowych *M. piperita*

Skuteczną metodą zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* okazała się elicytacja. Ponieważ szlaki metabolizmu wtórnego aktywowane są przez czynniki stresowe, elicytory są powszechnie stosowane do zwiększenia syntezy tych substancji w warunkach *in vitro*. W prezentowanych doświadczeniach jako elicytory zostały wybrane kwas jasmonowy (JA) oraz jego metylowa pochodna (MeJA). W warunkach *in vivo* biorą one czynny udział w szlaku metabolicznym kwasu oktadekanowego, wpływając na przekazywanie impulsów aktywujących procesy obronne w komórkach roślinnych narażonych na niekorzystne warunki środowiskowe lub też atak patogenów [Zhao i in., 2005]. Są one powszechnie stosowane w doświadczeniach dotyczących wpływu warunków stresowych na metabolizm komórek w warunkach *in vitro* [Gundlach i in., 1992]. Jasmoniany zostały wykorzystane w celu zintensyfikowania syntezy kwasu rozmarynowego w kulturach zawiesinowych *Coleus blumei* [Szabo i in., 1999], *Lithospermum erythrorhizon* [Mizukami i in., 1993; Ogata i in., 2004; Tsuruga i in., 2006] *Lavandula officinalis* [Nitzsche i in., 2004] oraz *Lavandula vera* [Georgiev i in., 2007b].

Zawiesiny komórkowe *M. piperita* były już przedmiotem wielu eksperymentów *in vitro*, część z nich dotyczyła także elicytacji. Badania te skierowane były jednak na sprawdzenie, a następnie zintensyfikowanie produkcji mentolu [Park i in., 1997; Chang i in., 1998; Kim i in., 2002; Chakraborty i Chattopadhyay, 2008]. Wpływ jasmonianów na akumulację kwasu rozmarynowego w kulturach zawiesinowych *M. piperita* nie był dotąd zbadany.

Elicytyory mogą być dodawane do hodowli zawiesinowych w czasie inokulacji zawiesiny, czyli w momencie założenia kultury (dzień 0 hodowli). Wybór tej opcji umożliwia prześledzenie wpływu określonego elicytora na przyrost biomasy zawiesiny oraz na produkcję metabolitów wtórnych w trakcie całego cyklu hodowlanego. Jednakże wariant ten w wielu przypadkach nie przyniósł pożądanych rezultatów. Synteza metabolitów wtórnych w zawiesinach komórkowych skorelowana jest z fazą wzrostu kultury. Akumulacja związków bioaktywnych, m.in. kwasu rozmarynowego ma zazwyczaj miejsce po ustaniu intensywnych podziałów komórkowych. W fazie spoczynkowej komórki nastawione są na syntezę metabolitów, a nie na wzrost jak we wcześniejszych fazach cyklu. Inną opcją jest dodanie elicytora do zawiesiny w fazie cyklu, gdy przygotowuje się ona do akumulowania maksymalnych stężeń metabolitów

wtórnych (koniec fazy wzrostu liniowego). Skuteczność tego wariantu elicytacji poparta jest licznymi doniesieniami literaturowymi wspomnianymi powyżej.

Biorąc pod uwagę istotne informacje dotyczące akumulacji kwasu rozmarynowego w trakcie cyklu hodowlanego zawiesiny komórkowej *M. piperita* (Rys. 18), elicytory zostały dodane 7-ego dnia hodowli. Była to jednocześnie końcowa faza wzrostu liniowego kultury.

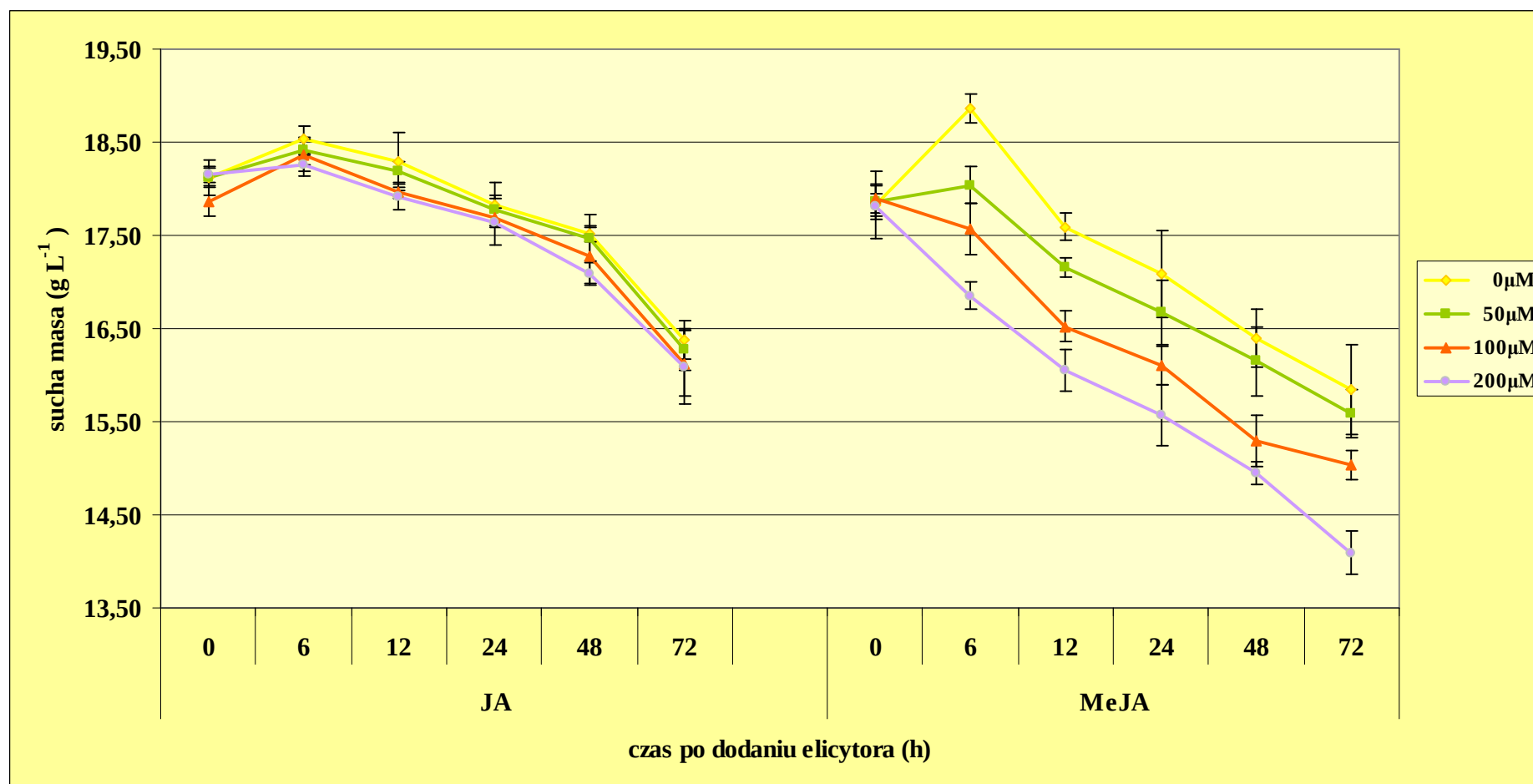
4. 7. 1. Wpływ elicytorów na wzrost zawiesiny komórkowej *M. piperita*

Wpływ jasmonianów na przyrost biomasy zawiesiny komórkowej *M. piperita* wykazany został w oparciu o pomiary suchej masy. W przypadku elicytowanych zawiesin, zarówno w odniesieniu do JA czy MeJA, uzyskana biomasa okazała się być niższa w porównaniu do wariantu kontrolnego. Jasmoniany osłabiły tempo wzrostu zawiesiny. Zahamowanie wzrostu obserwowano już po upływie 6 godzin od dodania JA, czy też MeJA (Rys. 23). Wraz z upływem kolejnych dni hodowli sucha masa zawiesin komórkowych poddanych procesowi elicytacji obniżała się sukcesywnie. Dodanie do zawiesiny komórkowej JA w dawce 50 μM nie wpłynęło znacząco na zahamowanie wzrostu, obserwowano nieznaczne zmiany w porównaniu do kontroli. Wyższe stężenia tego elicytora – 100 oraz 200 μM okazały się być bardziej supresyjne. Wyniki te pozostają w zgodzie z generalnym poglądem, że JA jest obecny w komórkach roślinnych w niskich stężeniach, ale wyższe stężenia tego związku powodują zahamowanie wzrostu komórek [Creelman i Mulet, 1995]. W przypadku dodania MeJA obniżenie przyrostu biomasy zawiesiny *M. piperita* odnotowano we wszystkich zastosowanych stężeniach. Największe zahamowanie wzrostu odnotowano w przypadku dodania do zawiesin 200 μM MeJA. W tym przypadku biomasa komórkowa obniżyła się w stosunku do kontroli o 10-12%. Dane literaturowe również opisują supresyjne działanie jasmonianów na przyrost biomasy w różnych kulturach *in vitro*. Przyrost biomasy komórkowej w zawiesinach komórkowych *Coleus blumei* poddanych działaniu MeJA również uległ nieznacznemu obniżeniu w stosunku do kontroli [Szabo i in., 1999]. Wzrost zawiesiny *Lavandula vera* MM również został zahamowany po dodaniu MeJA. Początkowo, 4 godziny po dodaniu elicytora obserwowano zwiększenie przyrostu biomasy we wszystkich użytych stężeniach MeJA. Natomiast już po 8 godzinach od momentu elicytacji, aż do końca hodowli biomasa elicytowanej zawiesiny była obniżona w porównaniu do kontroli. Obniżenie przyrostu

biomasy było ponadto proporcjonalne do zastosowanego stężenia MeJA. Spośród testowanych dawek największą inhibicję wykazywały dawki 100 oraz 150 μM MeJA [Georgiev i in., 2007b].

W przypadku kultur elicytowanych podobnie jak w przypadku kultury podstawowej *M. piperita* (4.5.3.) obserwowano brązowienie biomasy. Zmiany te zaczęły być widoczne już po 24 godzinach od momentu dodania elicytora zarówno dla JA oraz MeJA. Zmiany w intensywności brązowej barwy tkanki zależały od dawki elicytora jak również od czasu jego działania. Dla najniższych dawek elicytorów 50 μM zmiany te były ledwie widoczne. W przypadku wyższych stężeń: 100 i 200 μM były one bardziej zauważalne, zwłaszcza po 72 godzinach od dodania elicytora. Zjawisko to było bardziej nasilone w przypadku elicytacji MeJA.

Dodanie elicytorów nie wpłynęło natomiast na agregację komórek w zawiesinie. Obrazy mikroskopowe zawiesin poddanych działaniu elicytorów oraz wariantu kontrolnego były podobne. We wszystkich przypadkach obserwowano zarówno pojedyncze okrągłe komórki, jak i agregaty komórkowe osiągające do 1 mm średnicy.



Rys. 23. Wpływ elicytacji kwasem jasmonowym (JA) oraz jasmonianem metylu (MeJA) na biomasę zawiesiny komórkowej *M. piperita* (dane reprezentują uśrednione wartości z trzech powtórzeń $\pm$ SD).

4. 7. 2. Wpływ elicytorów na produkcję kwasu rozmarynowego

Badania przeprowadzone na zawiesinach komórkowych różnych gatunków roślin dowiodły, że elicytacja zwiększa akumulację metabolitów wtórnych. Jednakże na efektywność tego procesu mają wpływ takie czynniki jak rodzaj zastosowanego elicytora, jego stężenie, czas kultury zawiesiny z elicytorem oraz faza wzrostu zawiesiny w momencie elicytacji [Vasconsuelo i Boland, 2007].

Wstępne doświadczenia z hodowlą zawiesinową *M. piperita* wykazały, że charakteryzuje się ona stosunkowo wysoką produkcją kwasu rozmarynowego - 80,28 mg g⁻¹ s.m. (Rys. 18). Może stanowić zatem potencjalne źródło do produkcji tego związku w warunkach *in vitro*. Dalsze zwiększenie akumulacji tego metabolitu możliwe było poprzez elicytację

Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają wpływ jasmonianów na akumulację kwasu rozmarynowego. Wykazano, iż aktywność enzymów ze szlaku biosyntezy prowadzącej do powstania tego związku rośnie w odpowiedzi na elicytację MeJA. Ponadto czas w którym każdy enzym osiąga maksymalny poziom swojej aktywności jest zróżnicowany [Yamamura i in., 2001]. Elicytacja MeJA zwiększała aktywność amoniakolizy fenyloalaninowej (PAL) oraz reduktazy hydroksyfenylopirogrońianowej (HPR), kluczowych enzymów dla szlaku fenylopropanoidowego [Yamamura i in., 2001; Matsuno i in., 2002]. Zwiększenie poziomu PAL odpowiada zwiększeniu syntezy kwasu rozmarynowego. Najnowsze badania potwierdziły ponadto, że MeJA zwiększał aktywność hydroksylazy kwasu izorynowego (IA3'H), enzymu katalizującego końcowy etap biosyntezy cząsteczki kwasu rozmarynowego [Tsuruga i in., 2006].

Profil biochemiczny zawiesiny komórkowej *M. piperita* elicytowanej jasmonianami pozostał tożsamy z profilem związków fenolowych syntetyzowanych w kulturze podstawowej. Zarówno kwas jasmonowy, jak i jego pochodna nie wpłynęły na zmianę profilu syntetyzowanych związków fenolowych (Rys. 24). Obserwowano natomiast wzrost zawartości kwasu rozmarynowego w zawiesinach komórkowych *M. piperita* poddanych zabiegowi elicytacji. Zwiększenie akumulacji tego metabolitu związane było z rodzajem zastosowanego elicytora, było również uzależnione od czasu jego działania.

Wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego odnotowano przy wszystkich zastosowanych stężeniach elicytorów, jednakże maksimum syntezy tego związku

obserwowano w różnym czasie (Rys. 25). W przypadku elicytacji JA wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego odnotowano już po 6 godzinach od momentu jego dodania do zawiesin. Ponadto akumulacja tego związku stale wzrastała aż do 48 godziny od momentu aplikacji. Po 48 godzinach od dodania 200 μM JA odnotowano maksymalną akumulację kwasu rozmarynowego, która wynosiła 110,12 mg g^{-1} s.m. Nieco niższe stężenie tego antyoksydantu wynoszące 106,31 mg g^{-1} s.m. odnotowano w przypadku zawiesiny elicytowanej 50 μM kwasu jasmonowego. W obu przypadkach odnotowano wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego w porównaniu do warunków kontrolnych (zawiesina komórkowa bez dodatku elicytora), a wartości te są 1,5 raza wyższe w porównaniu do warunkach kontrolnych. Po 72 godzinach od momentu dodania do zawiesin JA akumulacja kwasu rozmarynowego obniżyła się we wszystkich testowanych wariantach. Jego zawartość wynosiła od 82 do 88 mg g^{-1} s.m.

MeJA również zwiększył akumulację kwasu rozmarynowego. Spośród wszystkich testowanych stężeń elicytora najbardziej efektywne okazało się stężenie 100 μM po czasie 24 godzin. Zawartość kwasu rozmarynowego wynosiła w tych warunkach 117,95 mg g^{-1} s.m, co stanowiło prawie 12% s.m. Wartość ta jest o 50% wyższa w porównaniu do zawiesin nie poddanych procesowi elicytacji (kontrola), w których kwas rozmarynowy stanowił nieco ponad 8% s.m. Dodanie MeJA w najwyższym stężeniu – 200 μM również spowodowało zwiększenie akumulacji tego kwasu fenolowego. W tym przypadku maksymalną zawartość kwasu rozmarynowego wynoszącą 111,93 mg g^{-1} s.m. odnotowano po 24 godzinach od dodania elicytora. Akumulacja kwasu rozmarynowego pozostała na podobnym poziomie przez następną dobę, gdyż po 72 godzinach od dodania MeJA jego zawartość wynosiła 110,98 mg g^{-1} s.m.

Elicytowane jasmonianami zawiesiny komórkowe różnych gatunków roślin również akumulowały zwiększone ilości kwasu rozmarynowego. Dodanie 50 μM MeJA do zawiesiny komórkowej *Lavandula vera* MM spowodowało 2,4 krotny (3348 mg L^{-1}) wzrost jego akumulacji [Georgiev i in., 2007b]. Zawiesiny komórkowe *Coleus blumei* poddane działaniu tego elicytora niemalże trzykrotnie zwiększyły akumulację tego metabolitu. W zawiesinach tych zaobserwowano równoczesne zwiększenie aktywności enzymów PAL i HPR [Szabo i in., 1999]. Zawiesiny komórkowe *Lithospermum erythrorhizon* suplementowane 100 μM MeJA 10 krotnie zwiększyły akumulację kwasu rozmarynowego [Mizukami i in., 1993]. Podobnie po 48 godzinach od dodania MeJA do zawiesin komórkowych *L. erythrorhizon*, zawartość kwasu rozmarynowego osiągnęła

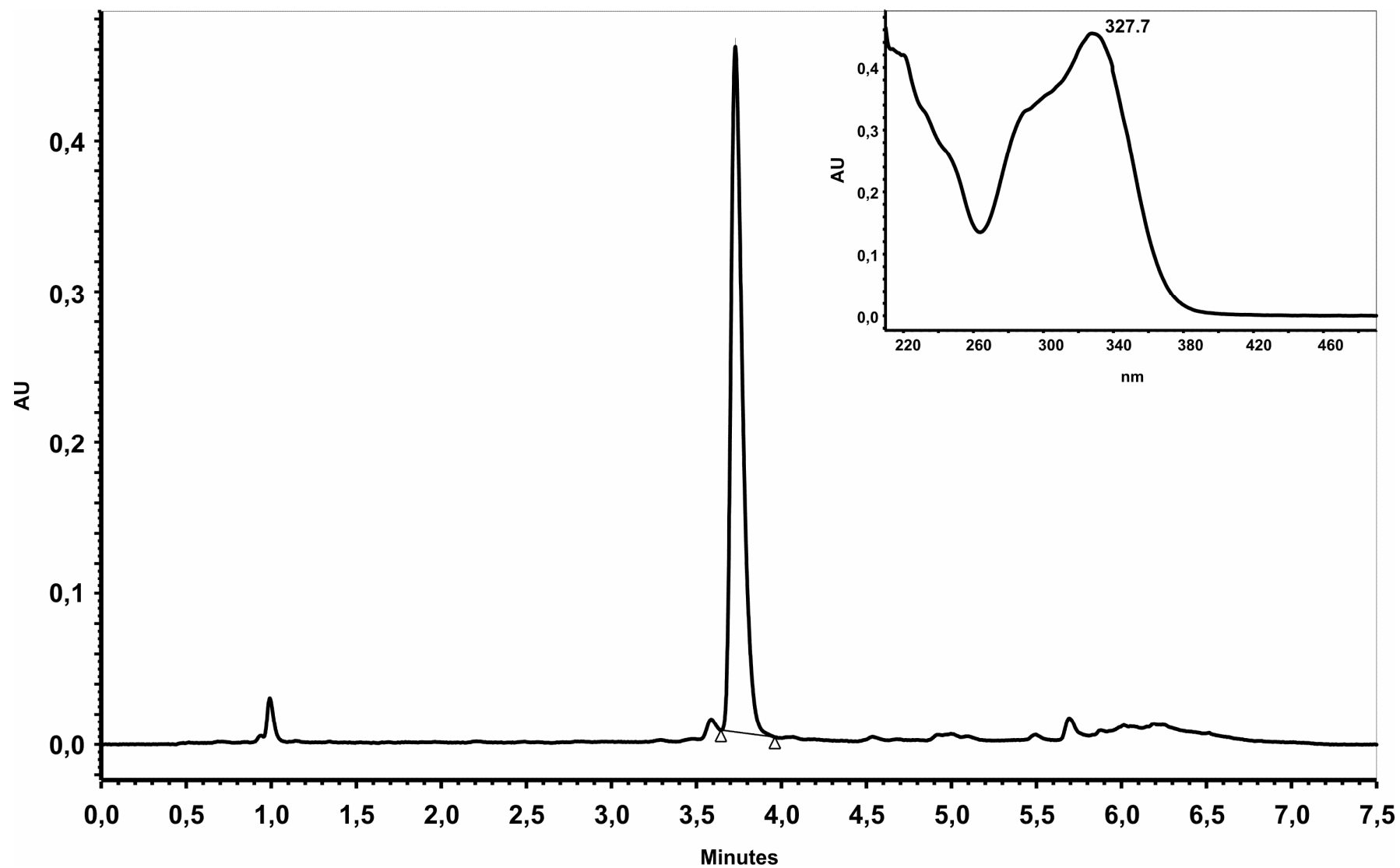
10-krotnie wyższy poziom w porównaniu do kontroli. Pomiędzy 48 a 72 godziną od jego dodania zawartość tego związku obniżyła się jednak znacząco. Zjawisko to może sugerować iż kwas rozmarynowy został przekształcony do innych metabolitów [Ogata i in., 2004]. Podobne wyniki otrzymano również w prezentowanych w niniejszej pracy badaniach. W przypadku elicytacji JA największą zawartość kwasu rozmarynowego odnotowano również po 48 godzinnym okresie inkubacji, wynosiła ona 110,12 mg g⁻¹ s.m. oraz 106,31 mg g⁻¹ s.m. odpowiednio dla 200 oraz 50 µM stężeń JA. Ponadto po 72 godzinach od dodania elicytora zawartość kwasu rozmarynowego obniżyła się znacznie i jego stężenie osiągnęło 77,81 – 89,94% maksymalnych wartości. W przypadku elicytacji MeJA obniżenie zawartości kwasu rozmarynowego po 72 godzinach od momentu dodania elicytora odnotowano dla stężeń 50 oraz 100 µM. Akumulacja kwasu rozmarynowego osiągnęła odpowiednio 90,75 oraz 80,41% wartości maksymalnych jakie obserwowano po 24 godzinach od dodania MeJA. Dłuższy okres działania elicytora (48 oraz 72 godziny) powodował natomiast wzrost zawartości kwasu rozmarynowego w przypadku stężenia 200 µM MeJA. Podobnie dodanie MeJA do zawiesin komórkowych *Lavandula vera* MM spowodowało wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego. Maksymalne zawartości akumulacji tego związku uzależnione były od dawki oraz od czasu działania elicytora. W przypadku stężeń 12,5 oraz 50 µM maksymalną zawartość kwasu rozmarynowego odnotowano po 12 godzinach od momentu dodania elicytora. Wyższe stężenia MeJA wynoszące 100 oraz 150 µM powodowały maksymalną akumulację tego antyoksydantu już po 4 godzinach od jego dodania. Wartości te były jednak niższe w porównaniu do największego stężenia kwasu rozmarynowego jakie otrzymano w przypadku elicytacji 50 µM MeJA [Georgiev i in., 2007b]. Tsuruga i wsp. również odnotowali pozytywny wpływ elicytacji MeJA na syntezę kwasu rozmarynowego w zawiesinach komórkowych *Lithospermum erythrorhizon*. Początkowo, w ciągu 4 - 8 godzin od momentu dodania elicytora obserwowano jedynie niewielki wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego. Znaczący wzrost akumulacji kwasu rozmarynowego odnotowano natomiast po upływie 72 godzin od dodania elicytora. Zawartość kwasu rozmarynowego osiągnęła wówczas 16-krotnie wyższą wartość w porównaniu do kontroli [Tsuruga i in., 2006]. Inne doświadczenie przeprowadzone na zawieszynie komórkowej *Lithospermum erythrorhizon* poddanej działaniu MeJA wykazało, iż akumulacja kwasu rozmarynowego osiągnęła wartości maksymalne po 48 – 72 godzinach od momentu dodania elicytora [Mizukami i in., 1993]. W przypadku zawiesin komórkowych *Coleus blumei* elicytowanych MeJA

zwiększenie akumulacji kwasu rozmarynowego odnotowano natomiast po 16 godzinach od momentu dodania elicytora. Zawartość tego metabolitu utrzymywała się na wysokim poziomie przez okres kolejnych 5-ciu dni hodowli [Szabo i in., 1999].

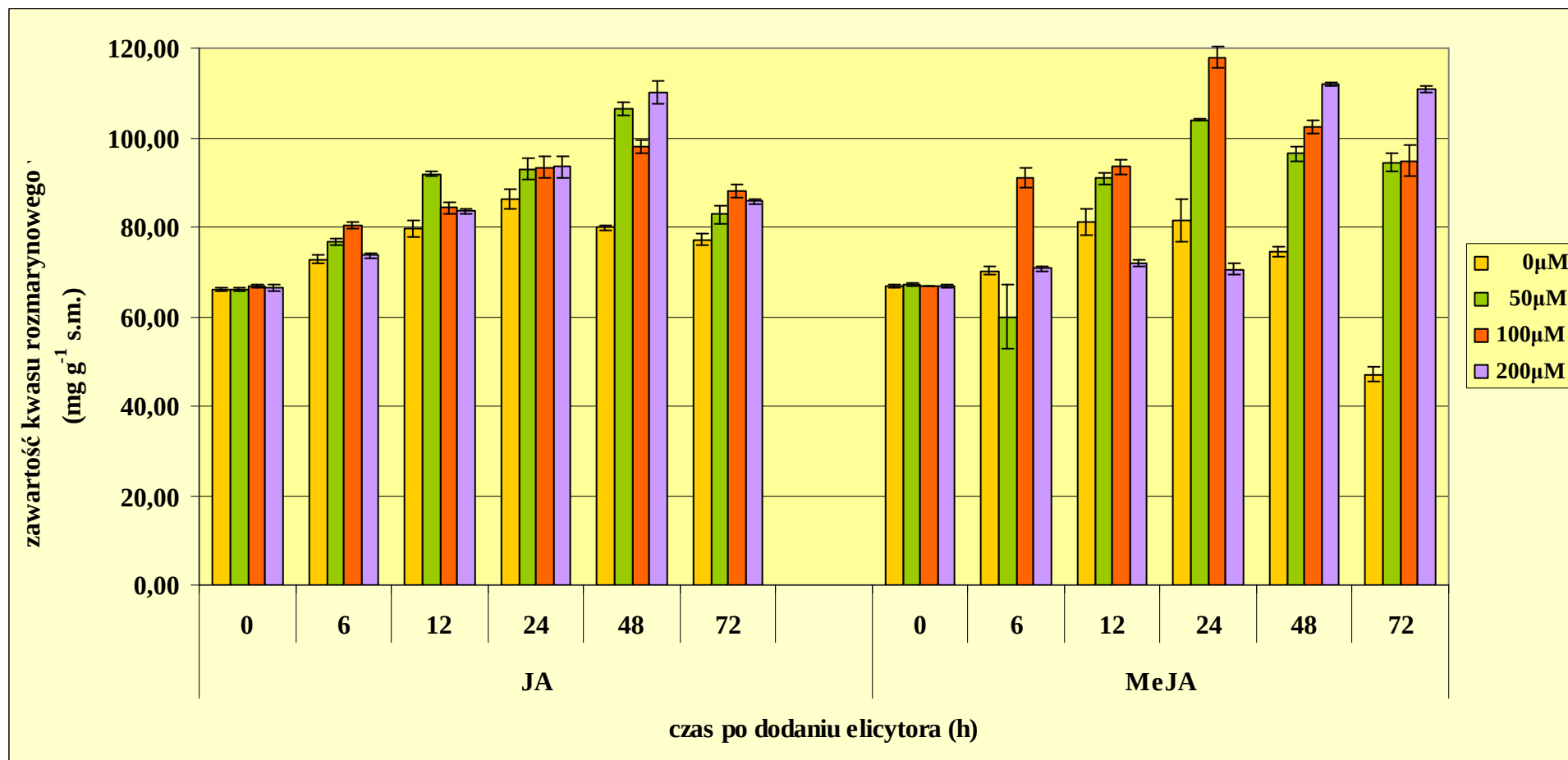
Obecność kwasu rozmarynowego potwierdzono również w pożywce hodowlanej *M. piperita* poddanej procesowi elicytacji. Zawartość tego metabolitu była jednak bardzo niska. Stężenie kwasu rozmarynowego stopniowo wzrastało równolegle z czasem trwania hodowli. Największą koncentrację tego związku odnotowano w przypadku elicytacji jasmonianami po 72 godzinach od momentu ich dodania. Zwiększenie zewnątrzkomórkowej zawartości kwasu rozmarynowego w tym okresie odpowiada procesowi brązowienia zawiesiny. Niewielki wzrost zawartości kwasu rozmarynowego w pożywce hodowlanej odnotowany po 48 godzinach, a zwłaszcza po 72 godzinach od momentu dodania elicytorów można powiązać również ze zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego stężenia tego związku. Zróżnicowane stężenia elicytorów w tym wypadku wywarły tylko niewielki wpływ na uwalnianie kwasu rozmarynowego do pożywki. Nieznacznie wyższą zawartość tego związku obserwowano w pożywce poddanej działaniu elicytorów w stężeniu 200 μM . Największą zawartość kwasu rozmarynowego obserwowano po 72 godzinach od momentu dodania 200 μM MeJA. Wartość ta była jednak bardzo zbliżona do tych obserwowanych w zawiesinie nie poddanej procesowi elicytacji (kontrola). Zwiększenie sekrecji kwasu rozmarynowego do pożywki hodowlanej potwierdzono również w przypadku zawiesin komórkowych *Lavandula vera* MM elicytowanych MeJA. Chociaż i w tym przypadku kwas rozmarynowy gromadzony był głównie wewnątrzkomórkowo, jego zawartość w pożywce wahała się od 5 do 19,8 mg L^{-1} [Georgiev i in., 2007b]. Natomiast w zawiesinie komórkowej *Lithospermum erythrorhizon* elicytowanych MeJA zawartość kwasu rozmarynowego w pożywce hodowlanej była niewielka i pozostała na zbliżonym poziomie zarówno w pożywkach poddanych elicytacji jak i tych stanowiących kontrolę [Mizukimi i in., 1993].

Kwas rozmarynowy w wysokim stężeniu zewnątrzkomórkowym przejawia aktywność cytostatyczną. Sekrecja kwasu rozmarynowego do medium hodowlanego jest główną przyczyną powodującą zahamowanie wzrostu komórek w zawiesinie. Broniąc się przed tym procesem komórki zawiesiny wydzielają do medium hodowlanego peroksydazy, które szybko rozkładają kwas rozmarynowy. Z tego powodu zawartość kwasu rozmarynowego w pożywce hodowlanej zależy od dwóch konkurencyjnych procesów: sekrecji kwasu rozmarynowego do pożywki oraz jego

enzymatycznej degradacji. Elicytory również oddziałują na oba te procesy [Georgiev i in., 2007b].



Rys. 24. Chromatogram UPLC ekstraktu z zawiesiny komórkowej *M. piperita* oraz spektrum UV kwasu rozmarynowego ($\lambda = 329$ nm).



Rys.25. Wpływ elicytacji kwasem jasmonowym (JA) oraz jasmonianem metylu (MeJA) na produkcję kwasu rozmarynowego w zawiesinie komórkowej *M.piperita*. (dane reprezentują uśrednione wartości z trzech powtórzeń $\pm$ SD)

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Z części nadziemnych *Mentha longifolia* technikami chromatografii preparatywnej wyizolowano 9 związków fenolowych, których strukturę określono metodą LC-MS.
2. Wyizolowane związki wykazywały zróżnicowaną aktywność przeciwutleniającą. Najwyższą aktywnością charakteryzował się kwas rozmarynowy. Wartości TEAC wynosiły: 6729,29 i 4522,77 $\mu\text{M g}^{-1}$ odpowiednio dla oznaczeń z DPPH[•] oraz z ABTS^{•+}.
3. Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że liście roślin rosnących w warunkach *in vitro* są najefektywniejszymi organami do indukcji kalusa *M. longifolia* i *M. piperita*.
4. Stężenie oraz kombinacja zastosowanych hormonów miały wpływ na morfologię tkanek kalusowych, przyrosty biomasy oraz produkcję kwasu rozmarynowego. Przeprowadzono selekcję kultur kalusowych w kierunku otrzymania tych o luźnej strukturze, intensywnym przyroście biomasy oraz wysokiej produkcji kwasu rozmarynowego. Posłużyły one do wyprowadzenia zawiesin komórkowych.
5. Kwas rozmarynowy stanowił 1,27% s.m. w przypadku zawiesin komórkowych *M. longifolia* (6 dzień hodowli). W zawiesinach komórkowych *M. piperita* jego zawartość w tym samym czasie wynosiła 6,02% s.m.
6. Dla zawiesiny komórkowej *M. piperita* określono profil wzrostu oraz zbadano akumulację kwasu rozmarynowego w cyklu hodowlanym. Największą biomasę zawiesina osiągnęła 8-go dnia hodowli. Produkcja kwasu rozmarynowego była największa również 8-go dnia - wynosiła 80,28 mg g⁻¹ s.m.
7. Sprofilowano jakościowo związki fenolowe w ekstraktach z roślin gruntowych, roślin *in vitro*, kalusa oraz z zawiesin komórkowych *M. longifolia* i *M. piperita*. Ekstrakty z roślin polowych charakteryzowały się dużą różnorodnością związków fenolowych. W kulturach *in vitro* obserwowano zmianę profilu syntetyzowanych związków. W wyniku wprowadzenia roślin do hodowli *in vitro* obserwowano zahamowanie

syntezy flawonów oraz flawanonu - związków charakterystycznych dla roślin macierzystych. Dominującym związkiem we wszystkich typach kultur *in vitro* był kwas rozmarynowy.

8. Sprofilowano ilościowo związki fenolowe w roślinach polowych, roślinach rosnących w warunkach *in vitro*, kalusie oraz w zawiesinach komórkowych *M. longifolia* i *M. piperita*. W przypadku *M. longifolia* największą zawartość związków fenolowych stwierdzono w kalusie, zawartość kwasu rozmarynowego stanowiła 99,29%. W przypadku *M. piperita* największe stężenie związków fenolowych wykazano w zawiesinach komórkowych, a procentowy udział kwasu rozmarynowego był najwyższy w przypadku kultur kalusa – 99,71%. Gatunek *M. piperita* jest bogatszym źródłem fenoli, jak również kwasu rozmarynowego w porównaniu z *M. longifolia*.
9. Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że gatunek *M. piperita* jest odpowiedni do otrzymywania kwasu rozmarynowego. W wyniku hodowli *in vitro*; uzyskiwany jest 9-krotny wzrost zawartości tego związku. Największą zawartość kwasu rozmarynowego wynoszącą 6,02% s.m. (6 dzień hodowli) odnotowano w ekstrakcie z zawiesiny komórkowej *M. piperita*.
10. Dodanie elicytorów spowodowało zmniejszenie przyrostu biomasy zawiesin komórkowych *M. piperita*. Kwas jasmonowy oraz jego metylowa pochodna nie wpłynęły na zmianę profilu syntetyzowanych związków fenolowych. Elicytacja spowodowała blisko 50% wzrost produkcji kwasu rozmarynowego w zawiesinach komórkowych *M. piperita* w stosunku do zawiesin podstawowych. Najlepsze efekty odnotowano po dodaniu 100 μM MeJA po 24 h (117,95 mg g^{-1} s.m.), jak również przy użyciu 200 μM JA po 48 h od momentu dodania (110,12 mg g^{-1} s.m.)

WYKAZ RYSUNKÓW UMIESZCZONYCH W PRACY

Rys. 1. Rejony upraw zielarskich w Polsce.....	str. 16
Rys. 2. Metabolity wtórne <i>Mentha spp.</i>	str. 23
Rys. 3. Barwa i struktura tkanki kalusowej.....	str. 27
Rys. 4. Modelowa krzywa wzrostu zawiesiny komórkowej.....	str. 29
Rys. 5. Metody biotechnologiczne uzyskiwania roślinnych kultur <i>in vitro</i> do produkcji metabolitów wtórnych.....	str. 37
Rys. 6. Szlak biosyntezy kwasu rozmarynowego.....	str. 59
Rys. 7. Etapy procesu otrzymywania ekstraktu z części nadziemnych <i>M. longifolia</i>	str. 71
Rys. 8. Schemat procesu ekstrakcji do fazy stałej.....	str. 73
Rys. 9. Indukcja kalusa z roślin <i>in vitro</i>	str. 83
Rys. 10. Indukcja kalusa z liści roślin gruntowych.....	str. 84
Rys. 11. Schemat indukcji zawiesin komórkowych.....	str. 86
Rys. 12. Filtracja zawiesin komórkowych.....	str. 87
Rys. 13. Materiał roślinny wykorzystany do badania profili fenolowych <i>M. piperita</i> ...	str. 88
Rys. 14. Oczyszczanie frakcji fenolowej z ekstraktu.....	str. 90
Rys. 15. Widmo mas ESI/MS uzyskane z bezpośredniego nastrzyku do źródła spektrometru ekstraktu <i>M. longifolia</i>	str. 100
Rys. 16. Chromatogram UPLC ekstraktu z części nadziemnych <i>M. longifolia</i>	str. 104
Rys. 17. Krzywa wzrostu zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i>	str. 124
Rys. 18. Zawartość kwasu rozmarynowego w poszczególnych fazach wzrostu zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i>	str. 127
Rys. 19. Chromatogramy SIM związków fenolowych <i>M. longifolia</i>	str. 133
Rys. 20. Profile UPLC różnych ekstraktów <i>M. longifolia</i>	str. 134
Rys. 21. Profile UPLC różnych ekstraktów <i>M. piperita</i>	str. 135
Rys. 22. Zawartość kwasu rozmarynowego (mg g ⁻¹ s.m.) w różnych ekstraktach <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	str. 137
Rys. 23. Wpływ elicytacji kwasem jasmonowym (JA) oraz jasmonianem metylu (MeJA) przyrost biomasy zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i>	str. 141
Rys. 24. Chromatogram UPLC ekstraktu z zawiesiny komórkowej <i>M. piperita</i> elicytowanej 50 µM JA po 24 h oraz spektrum UV (λ=329 nm) kwasu rozmarynowego.....	str. 147
Rys. 25. Wpływ elicytacji kwasem jasmonowym (JA) oraz jasmonianem metylu (MeJA) na produkcję kwasu rozmarynowego w zawieszynie komórkowej <i>M. piperita</i>	str. 148

WYKAZ FOTOGRAFII UMIESZCZONYCH W PRACY

Fot. 1.	Rośliny <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i> rosnące na poletku doświadczalnym IUNG w Puławach.....	str. 69
Fot. 2.	Kolumna na której przeprowadzono ekstrakcję do fazy stałej.....	str. 72
Fot. 3.	Zestaw, na którym przeprowadzono doczyszczanie poszczególnych frakcji fenolowych.....	str. 74
Fot. 4.	Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem mas (LC-ESI/MS) Thermo Finnigan LCQ Advantage Max.....	str. 76
Fot. 5.	Ekstraktor ASE 200.....	str. 89
Fot. 6.	Ultrasprawy chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem mas TQD Waters ACQUITY.....	str. 91
Fot. 7.	Płytki TLC frakcji otrzymanych w wyniku oczyszczania SPE.....	str. 95
Fot. 8.	Tkanki kalusowe <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i> pochodzące z 9 pasażu..	str. 117
Fot. 9.	Wytrząsana kultura zawiesiniowa <i>M. longifolia</i>	str. 119
Fot. 10.	Wytrząsana kultura zawiesiniowa <i>M. piperita</i>	str. 120
Fot. 11.	Obrazy mikroskopowe zawiesin komórkowych <i>M. longifolia</i>	str. 121
Fot. 12.	Obrazy mikroskopowe zawiesin komórkowych <i>M. piperita</i>	str. 122

WYKAZ TABEL UMIESZCZONYCH W PRACY

Tabela 1. Powierzchnia upraw zielarskich w Krajach Unii Europejskiej.....	str. 15
Tabela 2. Flawonoidy <i>Mentha spp.</i>	str. 24
Tabela 3. Występowanie związków fenolowych w <i>Mentha spp.</i>	str. 25
Tabela 4. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach kalusowych.....	str. 39
Tabela 5. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach zawieszin komórkowych.....	str. 40
Tabela 6. Metabolity wtórne otrzymywane w kulturach korzeni transformowanych.....	str. 41
Tabela 7. Metabolity wtórne otrzymane w kulturach <i>in vitro</i> poprzez dodanie egzogennych prekursorów.....	str. 50
Tabela 8. Biotransformacja związków w kulturach <i>in vitro</i>	str. 55
Tabela 9. Zawartości kwasu rozmarynowego w wybranych surowcach leczniczych.....	str. 58
Tabela 10. Diagram testowanych stężeń hormonów.....	str. 80
Tabela 11. Związki fenolowe części nadziemnych <i>M. longifolia</i> zidentyfikowane za pomocą analiz LC-ESI-MS/MS.....	str. 101
Tabela 12. Aktywność antyoksydacyjna poszczególnych związków fenolowych oraz ekstraktu <i>M. longifolia</i>	str. 105
Tabela 13. Wpływ warunków przechowywania ekstraktu <i>M. longifolia</i> na jego właściwości antyoksydacyjne	str. 107
Tabela 14. Wpływ czasu sterylizacji na kiełkowanie nasion <i>M. longifolia</i>	str. 108
Tabela 15. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i 2iP na tworzenie tkanki kalusowej na liściach <i>M. longifolia</i>	str. 111
Tabela 16. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i BA na tworzenie tkanki kalusowej na liściach <i>M. longifolia</i>	str. 112
Tabela 17. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i 2iP na tworzenie tkanki kalusowej na liściach <i>M. piperita</i>	str. 113
Tabela 18. Wpływ różnych stężeń 2,4-D i BA na tworzenie tkanki kalusowej na liściach <i>M. piperita</i>	str. 114
Tabela 19. Zawartość kwasu rozmarynowego w kulturach kalusowych <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i> uzyskanych na różnych wariantach pożywki LS.....	str. 116
Tabela 20. Zawartość kwasu rozmarynowego w czasie trwania kultur kalusowych <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	str. 115
Tabela 21. Dane LOD, LQD, liniowości i R^2 stosowanej metody analitycznej....	str. 132
Tabela 22. Zawartość związków fenolowych (mg g ⁻¹ s.m.) w różnych ekstraktach <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	str. 136
Tabela 23. Udział procentowy kwasu rozmarynowego we frakcji fenolowej różnych ekstraktów <i>M. longifolia</i> i <i>M. piperita</i>	str. 131

LITERATURA

1. Ali M. S., Saleem M., Ahmad W., Parvez M., Yamdagni R. (2002). A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 59: 889 – 895.
2. Ali M.B., Dewir Y.H., Hahn E.J., Peak K.Y. (2008). Effect of carbon dioxide on antioxidant enzymes and ginsenoside production in root suspension cultures of *Panax ginseng*. *Environ Exper Bot* 63: 297 – 304.
3. Allwood J.W., Goodacre R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal* 21: 33 – 47.
4. Ambid C., Fallot J. (1981). Role of the gaseous environment on volatile compound production by fruit cell suspension cultured in vitro. W: Schreider P. (red.) *Flavour'81* (529 – 538). Berlin, New York: Walter de Gruyter & Co.
5. 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.
6. Aoyagi H. (2010). Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. *Biochem Eng J* 56: 1 – 8.
7. Areias F.M., Valentão P., Andrade P.B., Ferreres F., Seabra R.M. (2001). Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chem* 73: 307 – 311.
8. Armero J., Requejo R., Jorrín J., López-Valbuena R., Tena M. (2001). Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level. *Plant Physiol Biochem* 39: 785 – 795.
9. Asekun O.T., Grierson D.S., Afolayan A.J. (2007) Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chem* 101: 995 – 998.
10. Aviv D., Galun E. (1978). Biotransformation of monoterpenes by *Mentha* cell lines: conversion of pulegone to isomenthone. *Planta Med* 33: 70 – 77.
11. Aviv D., Krochmal E., Dantes E., Galun E. (1983). Biotransformation of monoterpenes by *Mentha* cell lines: conversion of menthone to neomenthol. *Planta Med* 42: 236 – 243.
12. Baba S., Osakabe N., Natsume M., Terao J. (2004). Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci* 75(2): 165 – 178.
13. Baba S., Osakabe N., Natsume M., Yasuda A., Muto Y., Hiyoshi K., Takano H., Yoshikawa T., Terao J. (2005). Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur J Nutr* 44(1): 1 – 9.
14. Bais H.P., Govindaswamy S., Ravishankar G.A. (2000). Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *J Biosci Bioeng* 90: 648 – 653.
15. Baldi A., Jain A., Gupta N., Srivastava A.K., Bisaria V.S. (2008) Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cells of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxins: a first report. *Biotechnol Lett* 309(9): 1671 – 1677.

16. Baliga M.S., Rao S. (2010). Radioprotective potential of mint: a brief review. *J Can Res Ther* 6(3): 255 – 262.
17. Bauer N., Leljak-Levanic D., Jelaska S. (2004). Rosmarinic Acid Synthesis in Transformed Callus Culture of *Coleus blumei* Benth. *Z. Naturforsch* 59: 554 – 560.
18. Berlin J., Forche E., Wray V., Hammer J., Hösel W. (1983). Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z Naturforsch* 38: 346 – 452.
19. Berselli P.V.R., Zava S., Montorfano G., Corsetto P.A., Krzyzanowska J., Oleszek W., Berra B., Rizzo A.M. (2010). A mint purified extract protects human keratinocytes from short-term, chemically induced oxidative stress. *J Agric Food Chem* 58(21): 11428 – 11434.
20. Bhojwani S.S., Razdan M.K. (1996). Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo: Elsevier.
21. Blando F., Scardino A.P., De Bellis L., Nicoletti I., Giovinazzo G. (2005). Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Res Int* 38: 937 – 942.
22. Bohm H., Rink E. (1988). Betalaines. W: Constabel F., Vasil I. (red.). Cell culture and somatic cell genetics of plants (449 – 463). New York: Academic Press.
23. Borkowski B., Biesiadecka A., Litwińska B. (1996). Porównanie aktywności wirusostatycznej kwasów: kawowego, chlorogenowego i rozmarynowego. *Herba Pol* 42(4): 317 – 321.
24. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161: 839 – 851.
25. Bourwieg D., Pohl R. (1973). Die Flavonoide von *Mentha longifolia*. *Planta Med* 24: 304 – 314.
26. Brodelius P., Pedersen H. (1993). Increasing secondary metabolite production in plant cell culture by redirecting transport. *Trends Biotechnol* 11(1): 30 – 36.
27. Brondani D., Zapp E., Vieira I.C., Dupont J., Scheeren C.W. (2011). Gold nanoparticles in an ionic liquid phase supported in a biopolymeric matrix applied in the development of a rosmarinic acid biosensor. *Analyst* 136: 2495 – 2505.
28. Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., Khodakovskaya M. V., Glazunov V. P., Radchenko S. V., Zvereva E. V., Fedoreyev S. A., Zhuravlev N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J Biotechnol* 97: 213 – 221.
29. Bulgakov V.P., Inyushkina Y.V., Fedoreyev S.A. (2011). Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Crit Rev Biotechnol* DOI:10.3109/07388551.2011.596804
30. Bupesh G., Amutha C., Nandagopal S., Ganeshkumar A., Sureshkumar P., Sarawana Murali K. (2007). Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant. *Acta Agric Slov* 89(1): 73 – 79.
31. Burzanska-Hermann Z., Rządowska-Bodalska H., Olechnowicz-Stepien W. (1977). Isolation and identification of flavonoid compounds of *Mentha aqatica* L. *Herb Rocz Chem* 51: 701 – 709.

32. Chakarvarty B., Srivastava S. (1997). Effect of cadmium and zinc on metal uptake and regeneration of tolerant plants in linseed. *Agric Ecosyst Environ* 61: 45 – 50.
33. Chakraborty A., Chattopadhyay S. (2008). Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44: 518 – 524.
34. Chang J.H., Shin J.H., Chung I.S., Lee H.J. (1998). Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnol Lett* 20: 1097 – 1099.
35. Chaput M.A., San H., Hys L., Grenier E.H., David H., David A. (1996). How plant regenerate from *Mentha*×*piperita* L. and *Mentha*×*citrata* Ehrh. Leaf protoplasts affect their monoterpene composition in field conditions. *J Plant Physiol* 149: 481 – 488.
36. Chen H., Chena F., Chiu F.C., Lo C.M. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microbial Technol* 28: 100 – 105.
37. Chen J.H., Ho C.T. (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45: 2374 – 2378.
38. Chun S.S., Vatter D.A., Lin Y.T., Shetty K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem* 40: 809 – 816
39. Cisowski W., Dembinska-Migas W., Krauze-Baranowska M., Luczkiewicz M., Migas P., Matysik G., Soczewinski E. (1998). Application of planar chromatography to the analysis of secondary metabolites in callus cultures of different plant species. *J Planar Chromatogr* 11: 441 – 446.
40. Coste A., Vlase L., Halmagyi A., Deliu C., Coldea G (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106: 279 – 288.
41. Courtois D., Guren J. (1980). Temperature response of *Catharanthus roseus* cells cultivated in liquid medium. *Plant Sci Lett* 17: 473 – 482.
42. Creelman R.A., Mullet J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4114 – 4119.
43. Cuyckens F., Claves M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 39: 1 – 15.
44. Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotech Adv* 23: 131 – 171.
45. Davis J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375 – 382.
46. de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromat A* 1112: 31 – 63.
47. de Rijke E., Zappy H., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J Chromatogr. A* 984: 45 – 58.
48. De Vincenzi, M., Maialetti F., Di Pasquale M., Dessi M.R. (1991). Monographs on botanical flavouring substances used in foods. *Fitoterapia* 62: 47 – 64.

49. De-Eknamkul W., Ellis B.E. (1987a). Tyrosine aminotransferase: the entry point enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 26: 1941 – 1946.
50. De-Eknamkul W., Ellis B.E. (1987b). Purification and characterization of tyrosine aminotransferase activities from *Anchusa officinalis* cell cultures. *Arch Biochem Biophys* 257: 430 – 438.
51. Dhawan S., Shasany A.K., Naqvi A.A., Kumar S., Khanuja S.P.S. (2003). Menthol tolerant clones of *Mentha arvensis*: Approach for *in vitro* selection of menthol rich genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75: 87 – 94.
52. Do C.B., Cormier F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep* 9: 143 – 146.
53. Dorman H.J.D., Koşar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agric Food Chem* 51: 4563 – 4569.
54. Dörnenburg H., Knorr D. (1996). Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Crit Rev Plant Sci* 15: 141 – 168.
55. Dougall D.K. (1980) Nutrition and metabolism. W: Staba E. (red.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals* (21 – 58). Boca Roton, Florida: CRC Press.
56. Dubois M., Bailly F., Mbemba G., Mouscadet J.F., Debyser Z., Witvrouw M., Cotellet P. (2008). Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as a new anti-HIV-1 agents. *J Med Chem* 51: 2575 – 2579.
57. Edahiro J., Nakamura M., Seki M., Furusaki S. (2005). Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of Phenylalanine into the medium. *J Biosci Bioeng* 99: 43 – 47.
58. Ehmke A., Ohmstede D., Eilert U. (1995). Steroidal glycoalkaloids in cell and shoot teratoma cultures of *Solanum dulcamara*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 43: 191 – 197.
59. Eibl R., Eibl D. (2009). *Plant Cell – Based Bioprocessing*. W: Eibl R., Eibl D., Pörtner R., Catapano G., Czermak P. (red.) *Cell and Tissue Reaction Engineering* (315 – 356). Berlin Heidelberg: Springer – Verlag.
60. Ekiert H. (2009). Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze. *Biotechnologia* 65 (1): 69 – 77.
61. Ellis B.E., Remmen S., Goeree G. (1979). Interactions between parallel pathways during biosynthesis of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Coleus blunei*. *Planta* 147: 163 – 167.
62. Ellis B.E., Towers G.H.N. (1970) Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J* 118: 291 – 297.
63. Etienne H., Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69: 215 – 231.
64. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Leclercq J.Q. (2001). Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* 12: 707 – 715.
65. Fallarini S., Miglio G., Paoletti T., Minassi A., Amoruso A., Bardelli C., Brunelleschi S., Lombardi G. (2009). Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *Brit J Pharmacol* 157: 1072 – 1084.

66. Fecka I., Kowalczyk A., Cisowski W. (2004). Optimization of the separation of flavonoid glycosides and rosmarinic acid from *Mentha piperita* on HPTLC plates. *J Planar Chromat* 17(1): 22 – 25.
67. Fecka I., Mazur A., Cisowski W. (2002). Kwas rozmarynowy, ważny składnik terapeutyczny niektórych surowców roślinnych. *Postępy Fitoterapii* 8: 20 – 25.
68. Fecka I., Turek S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. *J Agric Food Chem* 55(26): 10908 – 10917.
69. 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.
70. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Nicholson S.A., Pennington J.J., DiCosmo F. (1994). Improved taxol yield by aromatic carboxylic and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng* 44: 967 – 971.
71. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Sakata K., DiCosmo F. (1993). Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Nat Biotechnol* 11: 731 – 734.
72. Fialova S., Tekelova D., Mrlianova M., Grancai D. (2008). The determination of phenolics compounds and antioxidant activity of mints and balms cultivated in Slovakia. *Acta Facult Univ Comenianae* 55: 96 – 102.
73. Fiehn O. (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48: 155 – 171.
74. Franzoi A.C., Dupont J., Spinelli A., Vieira I.C. (2009). Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. *Talanta* 77: 1322 – 1327.
75. Fujita Y., Hara Y., Ogino T., Suga C. (1981). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep* 1: 59 – 60.
76. Fujita Y., Tabata M. (1987). Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. W: Green C.E., Somers D.A., Hackett W.P., Biesboer D.D. (red.) *Plant Tissue and Cell Culture* (169 – 185). New York: Alan R. Liss.
77. Fujita Y., Takahashi S., Yamada Y. (1984). Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplasts of *Lithospermum erythrorhizon*. *Proc Euro Congr Biotechnol*, 3rd, 1: 161 – 166.
78. Fulzele D.P., Heble M.R. (1994). Large - scale cultivation of *Catharanthus roseus* cells: Production of ajmalicine in a 20-l airlift bioreactor. *J Biotechnol* 35(1): 1 – 7.
79. Fulzele D.P., Satdive R.K., Pol B.B. (2001). Growth and production of camptothecin by cell suspension cultures of *Nothapodytes foetida*. *Planta Med* 67: 150 – 152.
80. Furmanowa M., Olędzka H., Sykłowska-Baranek K., Józefowicz J., Gieracka S. (2000). Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus × media* by some elicitors and precursors. *Biotechnol Lett* 22: 1449 – 1452.
81. Furtado M.A., Almeida L.C.F., Furtado R.A., Cunha W.R., Tavares D.C. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 657: 150 – 154.

82. Furtado R.A., de Araújo F.R., Resende F.A., Cunha W.R., Tavares D.C. (2010). Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol* 30: 254 – 259.
83. Furuya T., Kojima H., Syono K. (1971). Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. *Phytochemistry* 10: 1529 – 1532.
84. Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* 12 (7): 473 – 478.
85. George E.F. (2008). *Plant Tissue Culture Procedure – Background*. W: George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. (red). *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition (1 – 28). The Netherlands: Springer.
86. Georgiev M., Pavlov A., Ilieva M. (2004). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effect of temperature. *Biotechnol Lett* 26(10): 855 – 856.
87. Georgiev M.I., Kuzeva S.L., Pavlov A.I., Kovacheva E.G., Ilieva M.P. (2007b). Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 301 – 304
88. Georgiev M.I., Kuzeva S.L., Pavlov A.I., Kovacheva E.G., Ilieva M.P. (2007b). Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 301 – 304.
89. Georgiev M.I., Pavlov A., Bley T. (2007a). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1175 – 1185.
90. Gertlowski C., Petersen M. (1993). Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34: 183 – 190.
91. Ghosh B., Mukherjee S. Jha S. (1997). Genetic transformation of *Artemisia annua* by *Agrobacterium tumefaciens* and artemisinin synthesis in transformed cultures. *Plant Sci* 122: 193 – 199.
92. Ghouli S., Idrissi A.I., Fkih-tetouani S. (2001). Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco. *Fitoterapia* 72: 596 – 598.
93. 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. *Biotechnol Adv* 19: 175 – 199.
94. Giri A., Narasu M.L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 28: 1 – 22.
95. Grzegorzczak I., Królicka A., Wysokińska H. (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Z Naturforsch* 61:351 – 356.
96. Guedon D.J., Pasquier B.P. (1994). Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha×piperita* clones. *J Agric Food Chem* 42: 679 – 684.
97. Guido S., Alessandra B., Guido F., Luigi C.P., Emilio T.P. (1997). Variability of essential oil composition of *Mentha aquatica* collected in two different habitats of North Tuscany, Italy. *J Essent Oil Res* 9: 455–457.
98. Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Gantet P. (2008). Hairy roots: a powerful tool for plant biotechnological advances. W: Ramawat K.G., Mérillon J.M. (red.) *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (271 – 278). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

99. Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. (2006). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol* 9: 341 – 346.
100. Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. *spp. longifolia*. *Food Chem* 103: 1449 – 1456.
101. Gundlach H., Müller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2389 – 2393.
102. Hagimori M., Matsumoto T., Obi Y. (1982). Studies on the production of *Digitalis purpurea* cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol* 69: 653 – 656.
103. Hamaguchi T., Ono K., Murase A., Yamada M. (2009). Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175(6): 2557 – 2565.
104. Hara Y., Yoshioka T., Morimoto T., Fujita Y., Yamada Y. (1988). Enhancement of berberine production in suspension cultures of *Coptis japonica* by gibberellic acid treatment. *J Plant Physiol* 133: 12 – 15.
105. Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831 – 2846.
106. Hippolite I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R. (1992). Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep* 11: 109 – 112.
107. Holm V., Hiltunen R., Jokinen K., Törmälä T. (1989). On the quality of the volatile oil in micropropagated peppermint. *Flavour Frag J* 4: 81 – 84.
108. Hooker CW, Lott WB, Harrich D (2001). Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Target Distinct Phases of Early Reverse Transcription. *J Virol* 75: 3095 – 3104
109. Hornok L. (1992). Peppermint (*Mentha piperita* L.) W: Cultivation and processing of medicinal plants (187 – 196). Budapest: Akadémiai Kiadó.
110. Hu Z.B., Du M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J Integrat Plant Biol* 48(2): 121 – 127.
111. Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841 – 1856.
112. Huang S.S., Zheng R.L. (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett* 239: 271 – 280.
113. Ibaraki Y., Kenji K. (2001). Application of image analysis to plant cell suspension cultures. *Comput Electron Agr* 30: 193 – 203.
114. Ikeda T., Matsumoto T., Noguchi M. (1977). Effects of inorganic nitrogen source and physical factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Agric Biol Chem* 41(7): 1197 – 1201.
115. Ilieva M., Pavlov A. (1997). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 683 – 688.
116. Ilieva M., Pavlov A. (1999). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture nitrogen effect. *World J Microbiol Biotechnol* 15: 711 – 714.
117. Indrayanto G., Pratnaningsih B., Santosa M.H. (1996). The influence of molybdate and calcium ions on the sapogenin content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Indonesian J Pharm* 7: 21 – 27.

118. Indrayanto G., Rahayu L., Rahman A., Noerani P.E. (1993). Effect of calcium, strontium and magnesium ions on the formation of phytosteroids in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Planta Med* 59: 97 – 98.
119. Inoue T., Sugimoto Y., Masuda H., Kamei Ch. (2002). Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biol Pharm Bull* 25(2): 256 – 259.
120. Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K.H., Demirci F., (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem* 50: 3943 – 3946.
121. Ito N., Yabe T., Gamo Y., Nagai T., Oikawa T., Yamada H., Hanawa T. (2008). Rosmarinic acid from *Perillae Herba* produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus. *Biol Pharm Bull* 31: 1376 – 1380.
122. Iuvone T., De Filippis D., Esposito G., D'Amico A., Izzo A.A. (2006). The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 317(3): 1143 – 1149.
123. Jambor J. (2007). Zielarstwo w Polsce – stan obecny i perspektywy rozwoju. *Postępy Fitoterapii* 2: 78 – 81.
124. Jambor J. (2010) Lek roślinny – rynek technologia, rozwój. [http://www.fct.put.poznan.pl/wdg/wyklady/Jambor lek roslinny cz.1.pdf](http://www.fct.put.poznan.pl/wdg/wyklady/Jambor%20lek%20roslinny%20cz.1.pdf)
125. Johnson T.S., Ravishankar G.A. (1996). Precursor biotransformation in immobilized placental tissues of *Capsicum frutescens* Mill: I. Influence of feeding intermediate metabolites of the capsaicinoid pathway on capsaicin and dihydrocapsaicin accumulation. *J Plant Physiol* 147: 481 – 485.
126. Jullien F. (2007). Mint. W: Pua E.C., Davey M.R. (red.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 59. *Transgenic Crops IV* (435 – 466). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
127. Jumin H.B. (1995). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Citrus* and its relatives. *Phytomorphol* 45: 1 – 8.
128. Karuppusamy S. (2009), A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res* 3 (13): 1222 – 1239.
129. Karwatzki B., Petersen M., Alfermann A.W. (1989) Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med* 55: 663 – 664.
130. Kędzia A. (2007) Działanie olejku z mięty pieprzowej (*Oleum menthae piperitae*) na bakterie beztlenowe. *Postępy Fitoterapii* 4: 182 – 186.
131. Kelm M.A., Nair M.G., Strasburg G.M., De Witt D.L. (2000) Antioxidant and COX inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomed* 7: 7 – 13.
132. Kępka M., Kwiatkowski C. (2005). Zioła jako gatunki uprawne. *Wiad Rol Pol* 11: 18.
133. Kiljańska I., Mojowska H. (1988). *Zielnik Polski*. Warszawa: Wydawnictwo Interpress.
134. Kim D.J., Chang H.N. (1990). Increased shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* suspension cultures with *in situ* extraction and fungal cell treatment (Elicitor). *Biotechnol Lett* 12: 443–446.

135. Kim G.S., Park S.H., Chang Y.J., Lim Y.H., Kim S.U. (2002). Transformation of menthane monoterpenes by *Mentha piperita* cell culture. *Biotechnol Lett* 24: 1553 – 1556.
136. Kim H.J., Kim T.H., Kang K.C., Pyo H.B., Jeong H.H. (2010). Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants. *Int J Cosmetic Sci* 32:185 – 191.
137. Kim H.K., Oh S.R., Lee H.K., Huh H. (2001). Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Biotechnol Lett* 23: 55 – 60.
138. Kim J.H., Shin J.H., Lee H.J., Chung I.S. (1997). Effect of chitosan on indirubin production from suspension culture of *Polygonum tinctorum*. *J Ferment Bioeng* 83: 206 – 208.
139. Kinnersley A.M., Dougall D.K. (1980). Correlation between the nicotine content of tobacco plants and callus cultures. *Planta* 149: 205 – 206.
140. Kintzios S. (2008). Secondary metabolite production from plant cell cultures: the success stories of rosmarinic acid and taxol. W: Ramawat K.G., Merillon J.M. (red.) *Bioactive molecules and medicinal plants* (85 – 100). Berlin Heidelberg: Springer - Verlag.
141. Kirakosyan A., Cseke L.J., Kauffman P.B. (2009). The use of plant cell biotechnology for the production of phytochemicals. W: Kirakosyan A., Kaufman P.B. (red.) *Recent Advances in Plant Biotechnology* (15 – 33). Springer.
142. Knobloch K.H., Berlin J. (1983) Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. I. Comparison of enzyme activities and product accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2: 333 – 340.
143. Knorr D., Caster C., Dörnenburg H., Dorn R., Gräf S., Havkin - Frenkel D., Podstolski A., Werrmann U. (1993). Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue culture. *Food Technol* 47(12): 57 – 63.
144. Kołodziej B. (2010). *Uprawa ziół. Poradnik dla plantatorów*. Warszawa: PWRiL.
145. 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 Microbial Technol* 31: 634 – 639.
146. Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S (2010). Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103: 333 – 342.
147. Koşar M., Dorman H.J.D., Başer K.H.C., Hiltunen R. (2004). Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method. *J Agric Food Chem* 52(16): 5004 – 5010.
148. Kothari S.K., Singh U.B. (1995). The effect of row spacing and nitrogen fertilization on scotch spearmint (*Mentha gracilis* Sole). *J Essent Oil Res* 7: 287 – 297.
149. Ku K.L., Chang P.S., Cheng Y.C., Lien C.Y. (2005). Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J Agric Food Chem* 53: 3877 – 3881.

150. Kumar A., Samarth R.M., Yasmeen S., Sharma A., Sugahara T., Terado T., Kimura H. (2004). Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. *Biofactors* 22: 87 – 91.
151. Kurata H., Takemura T., Furusakai S., Kado C.I. (1998). Light controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells. *J Ferment Bioeng* 86: 317 – 323.
152. Kuzovkina I.N., Schneider B. (2006). Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant species. *Progress in Botany* 67: 275 – 314.
153. Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J. (2007). *Fitoterapia i leki roślinne*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
154. Lee C.J., Chen L.G., Chang T.L., Ke W.M., Lo Y.F., Wang C.C. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chem* 124: 833 – 841.
155. Lee C.W.T., Shuler M.L. (2000). The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnol Bioeng* 67: 61 – 71.
156. Lee H.J., Cho H.S., Park E., Kim S., Lee S.Y., Kim S.C., Kim do K., Kim S.J., Chun H.S. (2008a). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology* 250: 109 – 115.
157. Lee SY, Xu H, Kim YK, Park SU (2008). Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 969 – 972.
158. Li W., Koike K., Asada Y., Yoshikawa T., Nikaido T. (2005). Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80: 151 – 155.
159. Li Y.Ch., Tao W.Y., Cheng L. (2009). Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 83: 233 – 239.
160. Lima C.F., Fernandes - Ferreira M., Pereira - Wilson C. (2006) Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79: 2056 – 2068.
161. Lin H.W., Kwok K.H., Doran P.M. (2003). Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions. *Biotechnol Progress* 19(5): 1417 – 1426.
162. Linsmaier E.M., Skoog F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100 – 127.
163. Litescu S.C., Eremia S., Bertoli A., Pistelli L., Radu G.L. (2010). Laccase-nafion based biosensor for the determination of polyphenolic secondary metabolites. *Anal Lett* 43(7–8): 1089 – 1099.
164. Liu A.H., Guo H., Ye M., Yan-Hua L., Jiang-Hao S., Xu M., De-An G. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromat A*. 1161: 170 – 182.
165. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* 4(8): 118 – 126.
166. López-Arnaldos T., López-Serrano M., Ros Barceló A., Calderón A.A., Zapata J.M. (1994). Tentative evidence of rosmarinic acid peroxidase in cell cultures

- from Lavandin (*Lavandula × intermedia*) flowers. *Biochem Mol Biol Int* 34: 809 – 816.
167. Loyola-Vargas V.M., De-la-Pena C., Galaz-Avalos R.M., Quiroz-Figueroa F.R. (2008). *Plant Tissue Culture*. W: Walker J.M., Rapley R. (red.) *Molecular biomethods Handbook* (875 – 904). Totowa, NJ, Humana Press.
 168. Lu Y., Foo L.Y. (2001). Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett* 42: 8223 – 8225.
 169. Łuczkiwicz M., Kokotkiewicz A. (2005). Co - cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Sci* 169 (5): 862 – 871.
 170. Lystvan K, Belokurova V, Sheludko Y, Ingham JL, Prykhodko V et al. (2010). Production of bakuchiol by in vitro systems of *Psoralea drupacea* Bge. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101: 99 – 103.
 171. Mantell S.H., Pearson D.W., Hazell L.P., Smith H. (1983). The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Rep* 2: 73 – 83.
 172. Marais C., van Rensburg W.J., Ferreira D., Steenkamp J.A. (2000). (S)- and (R)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* 55: 43 – 49.
 173. Martin J., Dusek J. (2007). Flavonoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgii in vitro cultures upon treatment with sodium cinnamate. *Ceska Slov Farm* 56(6): 280 – 283.
 174. Martinez B.C., Park C.H. (1993). Characteristics of batch suspension cultures of preconditioned *Coleus blumei* cells: sucrose effect. *Biotechnol Prog* 9: 97 – 100.
 175. MassBank Record PR100639, <http://www.massbank.jp>
 176. MassBank Record PR100643, <http://www.massbank.jp>
 177. MassBank Record PR100686, <http://www.massbank.jp>
 178. Matkowski A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnol Adv* 26: 548 – 560.
 179. Matsubara K., Shigekazu K., Yoshioka T., Fujita Y., Yamada Y. (1989). High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *J Chem Technol Biotechnol* 46: 61 – 69.
 180. Matsumoto T., Nishida K., Noguchi M., Tamaki E. (1973). Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. *Arg Biol Chem* 37: 561 – 567.
 181. Matsuno M., Nagatsua A., Ogiharaa Y., Ellisb B.E., Mizukami H. (2002). CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4P-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 514: 219 – 224.
 182. Mazumder A., Neamati N., Sunder S., Schulz J., Pertz H., Eich E., Pommier Y. (1997) Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J Med Chem* 40: 3057 – 3063
 183. Mc-Donald K.A., Jackman A.P. (1989). Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in Alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Rep* 8: 455 – 458.
 184. McKay D.L., Blumberg J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res* 20: 619 – 633.

185. Meyer H.J., Staden J.V. (1995). The *in vitro* production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. Plant Cell Tissue Organ Cult 40: 55 – 58.
186. Mikołajczyk-Grzelak N. (2008). Produkcja roślin zielarskich w Polsce. Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu 4: 270 – 273.
187. Mimica-Dukić N., Bozin B. (2008). *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. Curr Pharm Des 14(29): 3141 – 3150.
188. Mimica-Dukić N., Božin B., Soković M., Mihajlović B., Matavulj M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essentials oils. Planta Med 69: 413 – 419.
189. Misawa M. (1985). Production of useful plant metabolites. W: Fiechter A. (red.) Adv Biochem Eng Biotechnol (59 – 88). Berlin: Springer-Verlag.
190. Mizukami H., Ellis B.E. (1991) Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anehusa officinalis* cell suspension cultures. Plant Cell Rep 10: 321 – 324.
191. Mizukami H., Ogawa T., Ohashi H., Ellis B.E. (1992). Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. Plant Cell Rep 11(9): 480 – 483.
192. Mizukami H., Tabira Y., Ellis B.E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Rep 12: 706 – 709.
193. Mok M.C., Gabelman W.H., Skoog F. (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. J Am Soc Hortic Sci 101: 442 – 449.
194. Moreno L., Bello R., Primo - Jufera E., Esplugues J. (2002) . Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. Phytother Res 16: 10 – 13.
195. Mulabagal V., Lee Ch.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin Ch.Y. Tsay H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot Bull Acad Sin 45: 1 – 22.
196. Mulabagal V., Tsay H.S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng 2,1: 29 – 48.
197. Mulder-Krieger T., Verpoorte R., Svendsen A.B., Scheffer J.J.C. (1988). Production of essential oils and flavors in plant cell and tissue cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult 13: 85 – 114.
198. Nakagawa K., Fukui H., Tabata M. (1986). Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus* Plant Cell Rep 5: 69 – 71.
199. Nakagawa K., Konagai A., Fukui H., Tabata M. (1984). Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep 3: 254 – 257.
200. Nakazawa T., Ohsawa K. (1998). Metabolism of rosmarinic acid in rats. J Nat Prod 61: 993 – 996.
201. Nakazawa T., Ohsawa K. (2000). Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans. Biol Pharm Bull 23(1): 122 – 127.
202. Namdeo A., Patil S., Fulzele D.P. (2002). Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Prog 18: 159 – 162.
203. Namdeo A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Phcog Rev 1(1): 69 – 79.

204. Namdeo A.G., Jadhav T.S., Rai P.K., Gavali S., Mahadik K.R. (2007). Precursor feeding for enhanced production of secondary metabolites: A review. *Phcog Rev* 1(2): 227 – 231.
205. Narula A., Kumar S., Bansal K.C., Srivastava P.S. (2004). *Biotechnological Approaches Towards Improvement of Medicinal Plants*. W: Srivastava P.S., Narula A., Srivastava S. (red.) *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (78 – 116). New Delhi: Anamaya Publishers.
206. Nasim S.A., Aslam J., Kapoor R., Khan S.A. (2010). Secondary metabolites production through biotechnological intervention: a review. *Emir J Food Agric* 22(3): 147 – 161.
207. Neumann K.H., Kumar A., Imani J. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application*. Springer Verlag.
208. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schroder U., Jeppsson U., Larsson P., Mosbach K., Brodelius P. (1983). A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17: 319 – 326.
209. Nitzsche A., Tokalov S.V., Gutzeit H.O., Ludwig-Muller J. (2004). Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavendula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. *J Agric Food Chem* 52: 2915–2923.
210. Nowakowska J., Pikul P. (2011). Kwas rozmarynowy i walerenowy w fitoterapii. *Farm Pol* 67(9): 600-606.
211. Obrenovic S. (1990). Effect of Cu (II) D-penicillamine on phytochrome mediated betacyanin formation in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Plant Physiol Biochem* 28: 639 – 646.
212. Ogata A., Tsuruga A., Matsunob M., Mizukami H. (2004). Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. *Plant Biotechnol* 21: 393 – 396.
213. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* 9: 433 – 440.
214. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. (2010). Quantitative determination of phenolic compounds in *Mentha piperita* leaves. *Chem Nat Comp* 46(1): 22 – 27.
215. Oleszek W. (2009). Roślinne substancje biologicznie aktywne i ich biosynteza w kulturach *in vitro*. W: Malepszy S. (red.) *Biotechnologia roślin* (122 – 171). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
216. Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Sanbongi C., Kato Y., Osawa T., Yoshikawa T. (2002). Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN) - sensitized mice. *Free Radic Biol Med* 33: 798 – 806.
217. Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Yoshikawa T. (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25: 549 – 557.
218. Ożarowski A., Jaroniewski W. (1987). *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*. Warszawa: Instytut Wydawnictw Związków Zawodowych.

219. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A. (1994). Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 38: 213 – 220.
220. Paluszczak J., Krajka - Kuzniak V., Baer - Dubowska W. (2010). The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicol Lett* 192: 119 – 125.
221. Panda A.K., Bisaria V.S., Mishra S. (1992). Alkaloid production by plant cell cultures of *Holarrhena antidysenterica*: II. Effect of precursor feeding and cultivation of stirred tank bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 39: 1052.
222. Panya A., Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., Weiss J., McClements D.J., Decker E.A. (2010). Effects of chitosan and rosmarinic acid esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *J Agric Food Chem* 58: 5679 – 5684.
223. Park D.H., Park S.J., Kim J.M., Jung W.Y., Ryu J.H. (2010). Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia* 81: 644 – 648.
224. Park S.H., Kim K.S., Suzuki Y., Kim S.U. (1997). Metabolism of isopiperitenones in cell suspension culture of *Mentha piperita*. *Phytochemistry* 44: 623 – 626.
225. Park S.U., Uddin M.R., Xu H., Kim Y.K., Lee S.Y. (2008) Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *Afr J Biotech* 7: 4959 – 4965.
226. Passannanti S., Paternostro M., Piozzi F. (1990). Tormentonic acid and others components from *Mentha citrata*. *Fitoterapia* 61: 54 – 56.
227. Pavlov A., Ilieva M. (1999). The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic and caffeic acids by *Lavandula vera* MM cell culture. *World J Microbiol Biotechnol* 15: 397 – 399.
228. Pavlov A.I., Ilieva M.P., Panchev I.N. (2000). Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension. *Biotechnol Prog* 16: 668 – 670.
229. Pérez-Fons L., Garzón M.T., Micol V. (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem* 58: 161 – 171.
230. Petersen M. (1992) .New aspects of rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med* 58: 578 – 579.
231. Petersen M. (1997). Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45: 1165 – 1172.
232. Petersen M., Abdullah Y., Benner J., Eberle D., Gehlen K., Hücherig S., Janiak V., Kim K.H., Sander M., Weitzel C., Wolters S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70: 1663 – 1679.
233. Petersen M., Häusler E., Meinhard J., Karwatzki B., Gertlowski C. (1994). The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 38: 3171 – 179.
234. Petersen M., Häusler E., Karwatzki B., Meinhard J. (1993). Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189: 10 – 14.
235. Petersen M., Metzger J. W. (1993). Identification of the reaction products of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei* by ion spray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 4: 131 – 134.

236. Petersen M., Simmonds M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121 – 125.
237. Petersen M.S. (1991). Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry* 30: 2877 – 2881.
238. Phatak S.V., Heble M.R. (2002). Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. *Fitoterapia* 73: 32 – 39.
239. Pietrosiuk A., Furmanowa M. (2006). Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka. *Biotechnologia* 4(75): 116 – 123.
240. Pitta-Alvares S.I., Spollansky T.C., Giulietti A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microbial Technol* 26: 252 – 258.
241. Psotova J., Chlopcikova S., Miketova P., Simanek V. (2005). Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes. *Fitoterapia* 76: 556 – 561.
242. Purohit M., Pande D., Datta A., Srivastava P.S. (1995a). Enhanced xanthotoxin content in regenerating cultures of *Ammi majus* and micropropagation. *Planta Med* 61: 481 – 482.
243. Purohit M., Pande D., Datta A., Srivastava P.S. (1995b). *In vitro* flowering and high xanthotoxin content in *Ammi majus* L. *J Plant Biochem Biotechnol* 4: 73 – 76.
244. Qian J., Guiping L., Xiujun L., Xincan H., Hongmei L. (2009). Influence of growth regulators and sucrose concentrations on growth and rosmarinic acid production in calli and suspension cultures of *Coleus blumei*. *Nat Prod Res* 23: 127 – 137.
245. Qian Z.G., Zhao Z.J., Xu Y.F., Qian X.H., Zhong J.J. (2006). Novel chemically synthesized salicylate derivative as an effective elicitor for inducing the biosynthesis of plant secondary metabolites. *Biotechnol Prog* 22: 331 – 333.
246. Rajendran L., Ravishankar G.A., Venkatarman L.V., Prathiba K.R. (1992). Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnol Lett* 14: 707 – 712.
247. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. (2002). Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20: 101 – 153.
248. Ramani S., Jayabaskaran C. (2008). Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *J Mol Signalling* 25: 3 – 9.
249. Ravishankar G.A., Venkatarman L.V. (1988). Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of *Mentha piperita*. *Philippine J Sci* 117: 121 – 129.
250. Razzaque A., Ellis B.E. (1977) Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137: 287 – 291.
251. Rech E.L., Pires M.J.P. (1986). Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. *Plant Cell Rep* 5: 17 – 18.
252. Rhee HS, Cho HY, Son SY, Yoon SYH, Park JM (2010). Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101: 295 – 302.
253. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7): 933 – 956.

254. Romagnoli L.G., Knorr D. (1988). Effects of ferulic acid treatment on growth and flavour development of cultured *Vanilla planifolia* cells. Food Biotechnol 2: 93 – 104.
255. Rout G.R., Samantaray S., Das P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnol Adv 18: 91 – 120.
256. Rumińska A. (1973). Rośliny lecznicze. Podstawy biologii i agrotechniki. Warszawa: PWN.
257. Saba D.P., Iqbal M., Srivastava P.S. (2000). Effect of ZnSO₄ and CuSO₄ on regeneration and lepidine content in *Lepidium sativum*. Biol Plant 43: 253 – 256.
258. Sahai O.P., Shuler M.L. (1984). Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnol Bioeng 26: 111 – 120.
259. Sakamoto K., Iida K., Sawamura K., Hajiro K., Asada Y., Yoshikawa T., Furuya T. (1994). Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. Plant Cell Tissue Organ Cult 36(1): 21 – 26.
260. Salem K.M., Barry V.Ch. (1995). Accumulation of essential oils by *Agrobacterium tumefaciens*-transformed shoot cultures of *Pimpinella anisum*. Plant Cell Tissue Organ Cult 40: 209 – 215.
261. Samman M.A., Bowen I.D., Taiba K., Antonius J., Hannan M.A. (1998). Mint prevents shamma-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. Carcinogenesis 19(10):1795 – 1801.
262. Sánchez-Campillo M., Gabaldon J.A., Castillo J., Benavente-García O., Del Baño M.J., Alcaraz M., Vicente V., Alvarez N., Lozano J.A. (2009). Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. Food Chem Toxicol 47: 386 – 392.
263. Sanchez-Medina A., Etheridge C.J., Hawkes G.E., Hylands P.J., Pendry B.A., Hughes M.J., Corcoran O. (2007). Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*). J Pharm Pharmaceut Sci 10: 455 – 463.
264. Sanderski M.E. (2009). Zioła praktyczny poradnik o ziołach i ziołolecznictwie. WarszawaWydawnictwo K.E. Liber.
265. Sankara-Subramanian S., NairA.G.R. (1972). Flavonoids of the leaves of *Mentha spicata* and *Anisochilus carnosus*. Phytochemistry 11: 452 – 453.
266. Sarin R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. Biotechnology 4(2): 79 – 93.
267. Schripsema J. (2010). Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. Phytochem Anal 21(1):14 – 21.
268. Seaberg A., Labbe R.L., Shetty K. (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). Food Biotechnol 17: 129 – 149.
269. Seitz H.U., Hinderer W. (1988). Anthocyanins. W: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Constabel F., Vasil I. (red.) San Diego, Academic Press.
270. Service R. F. (1995). Antibiotics that resist resistance. Science 270: 724 – 727.
271. Sevón N., Hiltunen R., Caldentey K.M.O. (1998). Somoclonal variation in transformed roots and protoplast-derived hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. Planta Med 64: 37 – 41.
272. Shah P.P., D'Mello P.M. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*. Nat Prod Radiance 3: 214 – 221.
273. Shahidi F, Chandrasekara A. (2010). Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. Phytochem Rev 9: 147-170

274. Sharaf M., El - Ansari M.A., Saleh N.A.M. (1999). Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. *Fitoterapia* 70: 478 – 483.
275. Sharma M., Sharma A., Kumar A., Basu S.K. (2011). Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *Am J Plant Physiol* 6(2): 50 – 71.
276. Shetty K (2007) Rosmarinic acid biosynthesis and mechanism of action. W: Shetty K., Paliyath G., Pometto A.L., Levin R.E. (red.) *Functional Foods and Biotechnology* (187 – 207). Boca Raton, London, New York, CRC Taylor & Francis Group.
277. Shilpa K., Varun K., Lakshmi B.S. (2010). An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5: 222 – 247.
278. Shinde, A., Malpathak N., Fulzele D.P. (2009). Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnol Bioprocess Eng* 14: 288 – 294.
279. Sidwa-Gorycka M., Królicka A., Kozyra M., Głowniak K., Bourgaud F., Łojkowska E. (2003). Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins. *Plant Sci* 165(6): 1315 – 1319.
280. Skarżyński A. (1994). *Zioła czynią cuda*. Warszawa: Agencja Wydawnicza COMES.
281. Smetanska I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 111: 187 – 228.
282. Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon - Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Res* 579: 200 – 213.
283. Srinivasan V., Ryu D.D.Y. (1993). Improvement of shikonin productivity in *Lithospermum erythrorhizon* cell culture by alternating carbon and nitrogen feeding strategy. *Biotechnol Bioeng* 42(7): 793 – 799.
284. Stafford A., Morris P., Fowler M.W. (1986). Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme Microbial Technol* 8: 19 – 23.
285. Stefaniak B. (2007). *Roślinne kultury in vitro*. W: Woźny A., Przybył K. (red.) *Komórki roślinne w warunkach stresu, tom 2 Komórki in vitro* (14 – 92). Poznań: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.
286. Steinmann D., Ganzera M. (2010). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J Pharm Biomed Anal* 55(4): 744 – 757.
287. Stobiecki M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54: 237 -256.
288. Su W.W., Humphrey A.E. (1990). Production of rosmarinic acid in high density perfusion cultures of *Anchusa officinalis* using a high sugar medium. *Biotechnol Lett* 12: 793 – 798.
289. Subroto M.A., Kwok K.H., Hamill J.D., Doran P.M. (1996). Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnol Bioeng* 49 (5): 481 – 94.
290. Sumaryono W., Proksch P., Hartmann T., Nimtz M., Wray V. (1991). Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochemistry* 30: 3267 – 3271.

291. Suzuki M., Nakagawa K., Fukui H., Tabata M. (1987). Relationship of berberine-producing capability between *Thalictrum* plants and their tissue cultures. *Plant Cell Rep* 6: 260 – 263.
292. Szabo E., Thelen A., Petersen M. (1999). Fungal elicitor preparation and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep* 18: 485 – 489.
293. Szpitter A., Królicka. (2005). Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 4(71): 82 – 108.
294. Takeda H., Tsuji M., Inazu M., Egashira T., Matsumiya T. (2002). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 449: 261 – 267.
295. Tapas A.R., Sakarkar D.M., Kakde R.B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Trop J Pharm Res* 7: 1089 – 1099.
296. Tassoni A., Fornale S., Franceschetti M., Musiani F., Micheal A.J., Perry B. Bagni N. (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* L. cv. Barbera cell cultures. *New Phytol* 166: 895 – 905.
297. Telci I., Sahbaz N. (2005). Determination of agronomic and essential oil properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) in various ages of plantation. *J Agron* 4(2): 103 – 108.
298. Tewtrakul S., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., Yoshinaga T., Fujiwara T., Supavita T., Yuenyongsawad S., Rattanasuwon P., Dej-Adisai S. (2003) HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. *Phytother Res* 17: 232 – 239.
299. Thanh N.T., Murthy H.N., Yu K.W., Jeong C.S, Hahn E.J., Paek K.Y. (2006). Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *J Plant Physiol* 163: 1337 – 1341.
300. Thiem B., Kikowska M. (2008). Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*. *Herba Polonica* 54(4): 168 – 178.
301. Toivonen L., Laakso S., Rosenqvist H. (1992). The effect of temperature on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: growth, indole alkaloid accumulation and membrane lipid composition. *Plant Cell Rep* 11: 395 – 399.
302. Tomas-Barberan F.A., Husain S., Gil M.I. (1988). The distribution of methylated flavones in the *Lamiaceae*. *Biochem Syst Ecol* 16: 43 – 46.
303. Trejo-Tapia G., Jimenez-Aparicio A., Rodriguez-Monroy M., De. Jesus-Sanchez A., Gutierrez-Lopez G. (2001). Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 67: 19 – 23.
304. Tsuruga A., Terasaka K., Kamiya K., Satake T., Mizukami H. (2006). Elicitor-induced activity of isorinic acid 3'-hydroxylase, an enzyme catalyzing the final step of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Biotechnol* 23: 297 – 301.
305. Tucker A.O. (1992). The truth about mints. *Herb Kompanion* 4(6): 51 – 52.
306. Tucker A.O., Naczi R.F.C. (2007). *Mentha*: an overview of its classification and relationships. W: Lawrence B.M. (red.) *Mint. The Genus Mentha. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles* (1 – 39). CRC Press, Boca Raton, Florida, Taylor & Francis Group.
307. Tumová L., Tuma J. (2011). The effect of UVlight on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Physiol Plant* 33: 635 – 640.

308. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H. (1985). Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. W: Deus-Neumann B., Barz W., Reinhard E. (red.) Secondary metabolism of plant cell culture (293 – 303). Berlin, Springer-Verlag.
309. van Gulik W.M., ten Hoopen H.J.G, Heijnen J.J. (2001). The application of continuous culture for plant cell suspensions. *Enzyme Microbial Technol* 28: 796 – 805.
310. van Wyk B.E., Wink M. (2008). Rośliny lecznicze świata. Wrocław: MedPharm Polska.
311. Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y., Tsay H.S. (2004), Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin* 45: 1 – 22.
312. Vasconsuelo A., Boland R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci* 172: 861 – 875.
313. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1: 13 – 25.
314. Verpoorte R., Van der Heijden R., Ten Hoopen H.J.G., Memelink J. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolites pathway for the production of fine chemicals. *Biotechnol Lett* 21: 467 – 479.
315. Vidal F., Vidal J.C., Gadelha A.P.R., Lopes C.S., Coelho M.G.P., Monteiro-Leal L.H. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol* 115: 25 – 31.
316. Vijaya S.N., Udayasri P.V.V., Aswani K.Y., Ravi B.B., Phani K.Y., Vijay V.M., (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. *J Nat Prod* 3: 112 – 123.
317. Voirin B., Bayet C. (1992). Developmental variations in leaf flavonoid aglycones of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry* 31: 2299 – 2304.
318. Voirin B., Bayet C., Faure O., Jullien F. (1999). Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata*, and *M. x piperita*. *Phytochemistry* 50: 1189 – 1193.
319. Vostálová J., Zdarilová A., Svobodová A. (2010). *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 302: 171 – 181.
320. Wang Y.D., Wu J.C., Yuan Y.J. (2007). Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Cell Biol Int* 31: 1179 – 1183.
321. Wasilewska A., Królicka A. (2005). Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia* 4 (71): 173 – 188.
322. Weathers P.J., Towler M.J., Xu J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1339 – 1351.
323. Whitaker R.J., Hashimoto T., Evans D.A. (1984). Production of secondary metabolite, rosmarinic acid by plant cell suspension cultures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 435: 364 – 366.
324. Wiersema J.H., León B. (1999). *World Economic Plants: A Standard Reference*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
325. Wiktorowska, E., M. Długosz and W. Janiszowska, 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme Microbial Technol* 46: 14 – 20.

326. Wilken D., González E.J., Hohe A., Jordan M., Kosky R.G., Hirschmann G.S., Gerth A. (2005). Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. W: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (red.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (525 – 537). Springer, Netherlands.
327. Wincremesinhe E.R.M., Arteca R.N. (1994). *Taxus* cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol. *J Plant Physiol* 144: 183 – 188.
328. Wise ML, Sreenath HK, Skadsen RW, Kaeppler HF (2009). Biosynthesis of avenanthramides in suspension cultures of oat (*Avena sativa*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97: 81 – 90.
329. Wu Ch.H., Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. (2008). Establishment of adventitious root co-culture of *Ginseng* and *Echinacea* for the production of secondary metabolites. *Acta Physiol Plant* 30: 891 – 896.
330. Wysokińska H., Chmiel A. (2006). Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4 (75): 124 – 135.
331. Yamada Y., Yasui H., Sakurai H. (2006). Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. *Photochem Photobiol* 82: 1668 – 1676.
332. Yamakawa T., Kato S., Ishida K., Kodama T., Minoda Y. (1983). Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric Biol Chem* 47: 2185 – 2191.
333. Yamamoto T., Mizuguchi R., Yamada Y. (1982). Selection of a high stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. *Theor Appl Genet* 16: 113 – 116.
334. Yamamura Y., Ogihara Y., Mizukami H. (2001). Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Rep* 20: 655 – 662.
335. Yeoman M.M., Yeoman C.L. (1996). Tansley Review No 90. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytol* 134: 553 – 569.
336. Yoon H.J., Kim H.K., Ma C.J., Huh H. (2000). Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor. *Biotechnol Lett* 22: 1071 – 1075.
337. Zabetakis I., Edwards R., O'Hagan D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* 50: 53 – 56.
338. Zaidi F., Voirin B., Jay M., Viricel M.R. (1998). Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pelugium* and *Mentha suaveolens* (Labiatae). *Phytochemistry* 48(6): 991 – 994.
339. Zenk M.H., El-Shagi E., Arens H., Stockigt J., Weiler E.W., Deus B. (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. W: Barz W., Reinhard E., Zenk M.H. (red.) *Plant tissue culture and its biotechnological applications* (27 – 43). Berlin, Springer-Verlag.
340. Zenk M.H., El-Shagi H., Schulte U. (1975). Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med Suppl* 1975: 79 – 101.
341. Zenkteler M. (1984). *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. Warszawa: PWN.

342. Zhang C.H., Mei X.G., Liu L., Yu L.J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett* 22: 1561 – 1564.
343. Zhang C.H., Xu H.B. (2001). Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett* 23: 189 – 193.
344. Zhang W.J., Björn L.O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* 80: 207 – 218.
345. Zhang Y.H., Zhong J.J., Yu J.T. (1996). Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol* 51: 49 – 56.
346. Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23: 283 – 333.
347. Zhao J., Hu Q., Zhu W.H. (2001). Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Enzyme Microbial Biotechnol* 28: 666- 682.
348. Zhou B., Wei X., Wang R., Jia J. (2010). Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. *Asian J Tradit Med* 5: 109 – 116.
349. Zhou X., Zhong J.J. (2010). Plant cell culture, secondary product accumulation. W: Flickinger M.C. (red.) *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and cell technology* (1 – 29). John Wiley & Sons Inc.