

Biotransformacje w kulturach komórek roślinnych.

Część I - Reakcje biotransformacji

Halina Wysokińska¹

Aleksander Chmiel²

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej¹

Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych²

Akademia Medyczna

Łódź

1. Wprowadzenie

Badania związane z zastosowaniem metod biotechnologicznych do produkcji roślinnych metabolitów wtórnych obejmują dwa zasadnicze kierunki. Pierwszy, polega na biosyntezie *de novo* metabolitów przez tkanki i komórki hodowane *in vitro*. Drugim jest biotransformacja (biokonwersja) egzogennych prekursorów, która polega na przekształceniu przez enzymy obecne w kulturach komórkowych różnorodnych substratów w bardziej wartościowe produkty. Są to najczęściej przemiany jednoenzymowe, chociaż znane są również procesy przebiegające przy udziale większej liczby enzymów. Jako substraty w kulturach komórkowych mogą być wykorzystane naturalne prekursorzy dróg metabolicznych lub też ksenobiotyki — zazwyczaj związki syntetyczne strukturalnie zbliżone do prekursorów, które normalnie nie biorą udziału w reakcjach metabolicznych.

Enzymy roślinne mogą katalizować różne typy reakcji biotransformacji (tab. 1). Najbardziej charakterystyczną cechą jest specyficzność działania enzymatycznego; biotransformacje w kulturach przebiegają z wysokim stopniem regioselektywności i stereoselektywności. Inną korzystną cechą jest to, że enzymy roślinne mogą dokonywać takich modyfikacji wprowadzonych związków, których nie można przeprowadzić w mikroorganizmach, ani na drodze syntezy chemicznej. Dane dotyczące możliwości otrzymywania nowych związków za pomocą biotransformacji w roślinnych kulturach komórkowych przedstawiono w pracy Phillipsona (1). W wyniku biotransformacji uzyskać można również zwiększenie wydajności metabolitów wtórnych, w tych przypadkach, kiedy ich biosynteza jest zahamowana z powodu braku lub niedostatecznego stężenia odpowiednich prekursorów.

TABELA 1
 PRZYKŁADY REAKCJI BIOTRANSFORMACJI W HODOWLACH KOMÓREK ROŚLINNYCH *IN VITRO*

Typ reakcji	Przykłady
utlenianie	odwodornienie, hydroksylacja, epoksydacja
redukcja	uwodornienie podwójnego wiązania, redukcja grupy ketonowej
synteza	kondensacja wiązania C – C, glikozylacja (glukozyłacja), estryfikacja (acetyłacja), metylacja
rozszczepianie	demetyłacja, hydroliza, dekarboksylacja
inne	epimeryzacja, izomeryzacja, saponifikacja

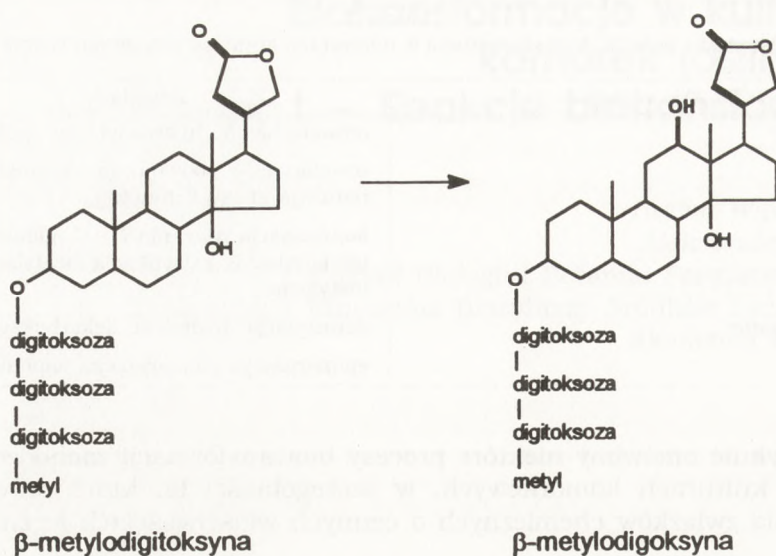
W artykule omówimy niektóre procesy biotransformacji zachodzące w roślinnych kulturach komórkowych, w szczególności te, które prowadzą do otrzymania związków chemicznych o cennych właściwościach leczniczych.

2. Przykłady biotransformacji w kulturach zawiesinowych

2.1. Kardenolidy

W przeciwieństwie do biosyntezy metabolitów wtórnych *de novo*, niezróżnicowane kultury komórkowe, nawet podczas długotrwałej hodowli, zachowują zdolność do przekształcania różnorodnych związków organicznych, w tym także kardenolidów. Najbardziej obiecującą i najlepiej zbadaną reakcją biokonwersji jest 12 β -hydroksylacja β -metylodigitoksyny do β -metylodigoksyny w kulturze komórkowej *Digitalis lanata* (rys. 1) (2). Poświęcimy jej zatem w tej pracy szczególnie dużo miejsca, omawiając niektóre warunki technologiczne. Reakcja katalizowana jest przez 12 β -hydroksylazę digitoksyny, enzym należący do grupy monoooksydaz i współdziałający z cytochromem P-450 (3). Enzym ten wymaga jako kofaktorów: NADPH+H⁺ oraz tlenu cząsteczkowego — jako akceptora wodoru. Rośliny *D. lanata* syntetyzują lanatozydy A i C, z których — w wyniku hydrolizy — powstają β -metylodigitoksyna i β -metylodigoksyna. Produkty te różnią się obecnością grupy 12 β -hydroksylowej w digoksynie. Hydroksylowany produkt jest znacznie bardziej wartościowy (stosowany jako lek nasercowy), ponieważ wyróżnia się dużo niższą toksycznością. W kulturach komórkowych *D. lanata* nie udało się, jak dotąd, doprowadzić do biosyntezy glikozydów nasercowych, natomiast możliwa jest wydajna hydroksylacja egzogennej metyłodigitoksyny do metyłodigoksyny. Opracowano proces technologiczny obejmujący trzy etapy (4):

1. Wstępne namnażanie komórek w hodowli wstrząsanej (7 dób).
2. Namnażanie materiału posiewowego do procesu produkcyjnego. Hodowla prowadzona w bioreaktorze typu *airlift* o pojemności 40 l (34 l podłoża).



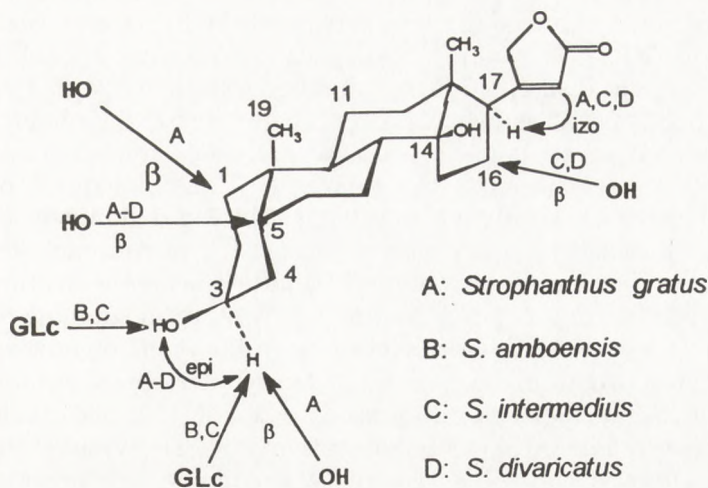
Rys.1. Biotransformacja β -metyldigitoksyny do β -metyldigoksyny w kulturze komórkowej *Digitalis lanata*.

Początkowe stężenie biomasy ok. 2,5 g s. m./l, a po ośmiu dobach hodowli — ponad 10 g/l.

3. Proces produkcyjny w bioreaktorze typu *airlift* o pojemności 300 l (210 l podłoża) z okresowym odbieraniem części hodowli i uzupełnianiem jej świeżym podłożem.

Taki sposób prowadzenia procesu zapewniał ekonomiczniejsze wykorzystanie linii technologicznej, aniżeli ma to miejsce w klasycznym procesie okresowym. Po namnożeniu komórek w bioreaktorze produkcyjnym i przeprowadzeniu pierwszego cyklu biotransformacji, wielokrotnie odnawia się hodowlę w tym bioreaktorze i prowadzi kolejne cykle biotransformacyjne bez konieczności ponawiania wcześniejszych etapów technologicznych. Czas jednego cyklu produkcyjnego i ilość uzyskiwanego w nim produktu są ograniczone wrażliwością komórek na metyldigitoksynę i metyldigoksynę, przy czym substrat jest znacznie bardziej toksyczny dla komórek *D. lanata* aniżeli produkt. Roztwór metyldigitoksyny w metanolu (10 g/l) wprowadza się do bioreaktora w sposób ciągły, począwszy od piątej doby hodowli. Stężenie substratu w zakresie reakcyjnej utrzymywane jest w granicach 30 – 40 mg/l.

Biotransformacja metyldigitoksyny do metyldigoksyny zachodzi równolegle do biosyntezy materiału komórkowego. Hodowla zasilana jest zatem roztworem glukozy (przy utrzymywaniu jej stężenia poniżej 10 g/l) oraz jonów — amonowego i siarczanowego. Szybkość tworzenia produktu dochodzi do 2 mg/l·h. Po 13 – 17 dobach procesu uzyskuje się nagromadzenie produktu ok. 0,5 g/l. W tym stężeniu jest on już toksyczny dla komórek i silnie redukuje efektywność biotransformacji. Odbiera się wówczas część zawiesiny ho-



Rys. 2. Reakcje biotransformacji digitoksygeniny w kulturach komórkowych różnych gatunków *Strophanthus* (9).

dowlanej i wprowadza taką samą ilość świeżego podłoża, rozpoczynając kolejny cykl produkcyjny. W wyniku sześciu odnawianych cykli (od szóstego cyklu obserwowano spadek aktywności biotransformacyjnej komórek) uzyskuje się łącznie 0,5 kg produktu z wydajnością na poziomie 80%. Ta ilość β -metylodigoksyny umożliwiła przygotowanie pięciu milionów tabletek leku (5).

Komórki naparstnicy charakteryzują się również zdolnością do prowadze-

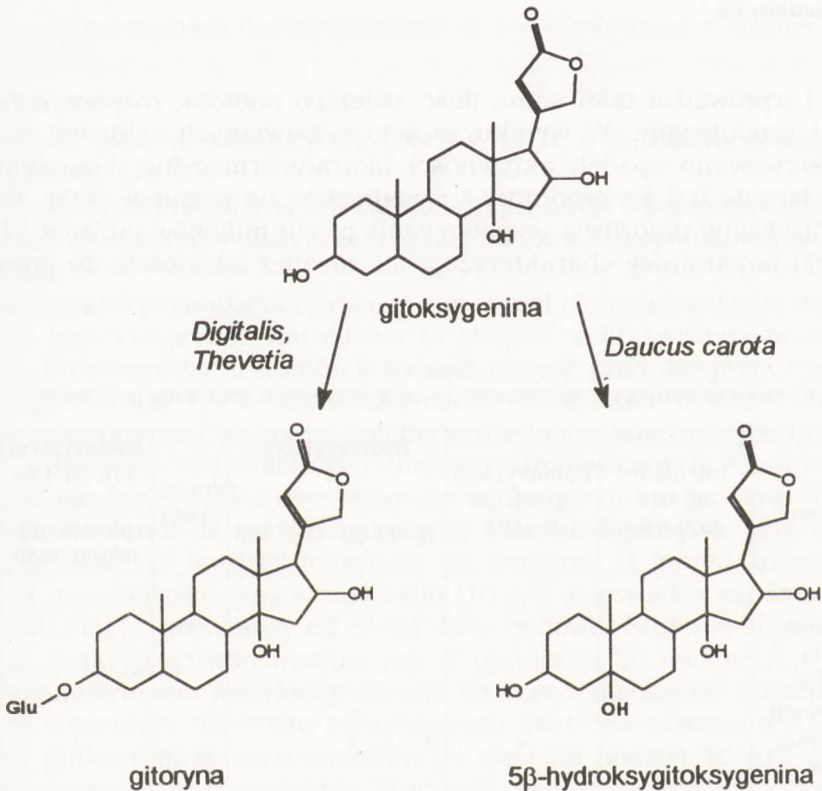
TABELA 2

REAKCJE BIOTRANSFORMACJI DIGITOKSYGENINY (rys. 2) W ROŚLINNYCH KULTURACH KOMÓRKOWYCH (9)

Kultury komórkowe	Utlenianie 3 β -OH do 3-keto	Epimeryzacja 3 β -OH do 3 α -OH	Hydroksylacja					Glukozylacja	Izomeryzacja 17 β do 17 α w pierścieniu laktonowym	Estryfikacja
			1 β	4 β	5 β	12 β	16 β			
<i>Digitalis lanata</i>	+				+			+		
<i>D. purpurea</i>	+	+			+			+		
<i>Thevetia nerifolia</i>	+							+		
<i>Daucus carota</i>					+					
<i>Strophanthus gratus</i>		+	+	+	+				+	
<i>S. amboensis</i>		+			+			+		
<i>S. intermedius</i>	+	+			+		+	+	+	
<i>S. divaricatus</i>		+			+		+		+	
<i>Panax ginseng</i>		+			+			+		+

nia reakcji glikozylacji digitoksyny. Tę właściwość wykorzystali Kreis i Reinhard do otrzymania cennego dla lecznictwa glikozydu nasercowego — deacetylanatozydu C (6 – 8). Autorzy zastosowali dwufazowy sposób hodowli komórek *D. lanata* w dwóch 20-litrowych bioreaktorach. W pierwszym bioreaktorze, w podłożu wzrostowym, odbywa się przyrost biomasy, natomiast w drugim, zawierającym podłoże produkcyjne, mają miejsce reakcje biokonwersji: 12β -hydroksylacja i $16-O$ -glikozylacja digitoksyny. W optymalnych warunkach po dziewięciu dniach inkubacji z 11,7 g digitoksyny komórki wytworzyły 13,2 g deacetylanatozydu C oraz 1,1 g purpureaglukozydu A (8).

Biotransformacja kardenolidów była badana również w kulturach komórkowych różnych gatunków *Strophanthus* (9). Wykazano, że mają one zdolność izomeryzacji, epimeryzacji, hydroksylacji i glikozylacji digitoksygeniny (rys. 2; tab. 2). Wśród produktów biokonwersji wykryto trzy nowe związki, nie znane dotychczas w roślinach. Według Kawaguchi i współ. (10) także kultury korzeni transformowanych *Panax ginseng* charakteryzują się wysoką zdolnością do estryfikacji i glikozylacji digitoksygeniny. W rezultacie tych przekształceń uzy-

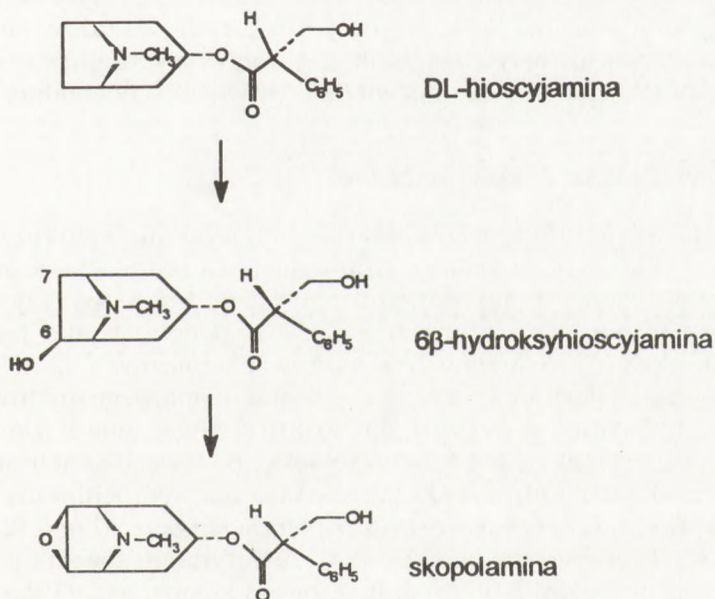


Rys. 3. Biotransformacja gitoksygeniny w kulturach komórkowych *Digitalis lanata*, *Thevetia nerifolia* i *Daucus carota* (13).

skano 5 nowych związków kardenolidowych. Prace te stwarzają perspektywy otrzymania nowych, bardziej aktywnych i bezpiecznych glikozydów nasercowych. *Panax ginseng* jest przykładem rośliny, która w warunkach *in vitro* przekształca kardenolidy, pomimo że gatunek ten nie ma zdolności do ich biosyntezy. Inną taką rośliną jest *Daucus carota*, która w kulturze komórkowej hydroksyluje gitoksygeninę do 5 β -hydroksygitoksygeniny (rys. 3) (11,12). Natomiast w kulturach komórkowych *Thevetia nerifolia* i *Digitalis lanata* ma miejsce reakcja glukozylacji gitoksygeniny, a jej produktem jest gitoryna (rys. 3) (13).

2.2. Alkaloidy tropanowe

Alkaloidy tropanowe: skopolamina, hioscyjamina i atropina są ważnymi lekami o właściwościach parasympatykolytycznych. Najważniejsza z nich jest skopolamina, na którą zapotrzebowanie jest 10 razy wyższe w porównaniu z hioscyjamina i jej racemiczną formą — atropiną (14). Proces biotransformacji DL-hioscyjminy do skopolaminy obserwowano w kalusach *Duboisia* sp. (15), w kulturach korzeniowych *Hyoscyamus niger* (16) oraz w hodowli zawieszinowej *Anisodus tanguticus* (*Scopolia tangutica*), która w warunkach *in vitro* nie syntetyzuje alkaloidów tropanowych (17). Głównym produktem tego procesu jest 6-hydroksyhioscyjamina, która następnie przekształcana jest w skopolaminę (rys. 4). Jednak wydajność biokonwersji 6-hydroksyhioscyja-



Rys.4. Biokonwersja DL-hioscyjminy do skopolaminy.

miny do skopolaminy jest niska, a czas reakcji długi. Po dodaniu 100 mg/l DL-hioscyjaminy kultura *Anisodus tanguticus* po czterech tygodniach inkubacji wytwarzała 10 mg/l 6-hydroksyhioscyjaminy. Skopolaminę w ilości 4 mg/l wykryto dopiero w piątym tygodniu hodowli (17). Podobne wyniki uzyskali Hashimoto i Yamada (16), którzy wykazali, że w kulturach *Hyoscyamus niger* tylko 10 – 20% wprowadzonej DL-hioscyjaminy uległo przekształceniu w skopolaminę. Enzymem katalizującym reakcję hydroksylacji hioscyjaminy do 6 β -hydroksyhioscyjaminy jest 6 β -hydroksylaza hioscyjaminy (H6H). Enzym ten odpowiedzialny jest również za epoksydację 6 β -hydroksyhioscyjaminy do skopolaminy, przy czym reakcja ta zachodzi z dużo niższą efektywnością niż hydroksylacja. H6H wymaga jako kofaktorów kwasu 2-okso-glutarowego i tlenu; jej aktywność zwiększa się w obecności żelaza (FeSO₄) i kwasu askorbinowego (18). H6H została wyizolowana przez Yamadę i Hashimoto z kultur korzeniowych *Hyoscyamus niger* (19). Wykorzystując techniki inżynierii genetycznej wprowadzono za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* gen 6 β -hydroksylazy hioscyjaminy do bogatych w hioscyaminę komórek *Atropa belladonna* (14). Uzyskano w ten sposób korzenie transformowane, które charakteryzowały się podwyższoną aktywnością H6H i wytworzyły 5 razy więcej skopolaminy.

2.3. Serotonina

Sasse i współl. (20) przedstawili możliwości wykorzystania kultury *Peganum harmala* dla biotransformacji tryptaminy w serotoninę. Hydroksylacja przebiegała z wydajnością ok. 80%. Autorzy stwierdzili, że także inne indoloalkiloaminy, takie jak α -metylotryptamina, N-metylotryptamina i 6-fluorotryptamina były przekształcone w odpowiednie 5-hydroksypochoodne.

2.4. Arbutyna i inne związki fenolowe

W wielu roślinnych kulturach komórkowych występują glukozylotransferazy — enzymy, katalizujące reakcje glukozytacji. Glukozyłacja, która jest trudna do przeprowadzenia w mikroorganizmach i na drodze syntezy chemicznej, powszechnie występuje w roślinach — prawdopodobnie jako jeden ze sposobów detoksykacji wytworzonych związków chemicznych (21). Przykładem reakcji glukozytacji jest biokonwersja związku fenolowego hydrochinonu do monoglukozydu arbutyny przy użyciu kultury zawiesinowej *Datura innoxia* (22). Wydajność tej reakcji jest bardzo wysoka; po 24 godzinach otrzymywano 2,5 g arbutyny na litr kultury. Do przekształcenia hydrochinonu w arbutynę mogą być wykorzystane również kultury *Agrostemma githago* (23), *Digitalis purpurea* (23) i *Gardenia jasminoides* (24). Arbutyna stosowana jest jako środek antyseptyczny (głównie na drogi moczowe) i kosmetyczny (hamuje syntezę melaniny w skórze). Yokoyama i współl. (25) donoszą o możliwości prowadzenia reakcji glukozytacji hydrochinonu w kulturze komórkowej *Catharanthus*

roseus, rosnącej w fermentorach. Czynnikiem ograniczającym jest w tym wypadku toksyczność hydrochinonu. Według autorów niekorzystne działanie hydrochinonu na komórki roślinne można usunąć poprzez dodatek do hodowli sacharozy, glukozy lub sorbitolu. W tych warunkach produkcja arbutyny zwiększa się 2 – 3-krotnie (25). Ważną rolę odgrywa również selekcja odpowiednich szczepów *C. roseus*. Szczep B zawierający duże, silnie wydłużone komórki był bardziej odpowiedni dla biotransformacji niż szczep A, składający się z komórek mniejszych i okrągłych (25).

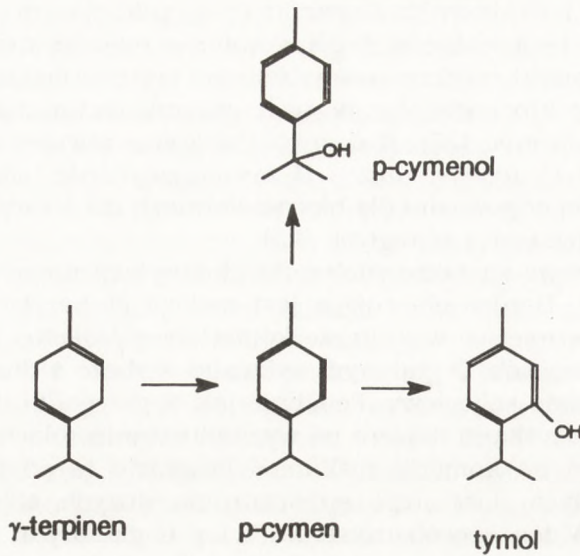
Kultury komórkowe są także zdolne do glukozytacji innych związków fenolowych (26 – 28). Bardzo obiecującą jest reakcja glukozytacji kwasu salicylowego, która ma miejsce w kulturze komórkowej *Mallotus japonicus* (29). Utworzony w ten sposób O-glukozyd wykazuje szybsze i dłuższe działanie analgetyczne niż kwas salicylowy. Podobnie jak w przypadku hydrochinonu, pozytywne wyniki uzyskano dopiero po wyeliminowaniu toksycznego wpływu kwasu salicylowego na komórki roślinne. Osiągnięto to poprzez stopniowe wprowadzanie małych ilości tego substratu do dużych objętości podłoża (5,8 mg /3 l/h). W ten sposób uzyskano 1,1 g O-glukozydu z litra kultury (29). Dane te wskazują, że w przyszłości biotransformacja może być przydatna do otrzymywania O-glukozydu kwasu salicylowego na dużą skalę. Jest to tym bardziej istotne, że chemiczna metoda glukozydacji tego kwasu jest skomplikowana, obejmuje ona trzy etapy i wymaga usunięcia produktów ubocznych.

2.5. Kwasy alifatyczne

Z przeprowadzonych przez Kamela i współ. (30) badań wynika, że również kwasy alifatyczne mogą być glukozylowane w warunkach *in vitro*. Jedynym jak dotąd przykładem takiej biotransformacji jest glukozyłacja kwasu masłowego w kulturze zawiesinowej *Nicotiana plumbaginifolia* (30). Kwas masłowy hamuje proliferację komórek nowotworowych *in vitro* (31). Jednak jego użyteczność znacznie ogranicza to, że związek ten jest szybko usuwany z organizmu ludzkiego (okres półtrwania < 5 min) (32). Wykazano, że produkt glukozyłacji kwasu masłowego, zidentyfikowany jako 6-O-D-glukozyd kwasu masłowego, charakteryzuje się większą aktywnością farmakologiczną i wydłużonym czasem działania.

2.6. Monoterpeny

Biotransformacja monoterpenów była badana głównie w kulturach komórkowych *Nicotiana* i *Mentha* (33,34). Jako substraty stosowano terpeny acykliczne (geraniol, nerol, citral) lub monocykliczne (menton, pulegon, α -terpineol). Przekształcenia enzymatyczne obejmowały głównie proste reakcje chemiczne (utlenianie, redukcję, hydroksylację). Galun i współ. (35) wykazali, że w kulturach komórkowych *Mentha* sp. (-)menton uległ stereospecyficznej reakcji do (+)neomentolu. Maksymalną wydajność obserwowano po dwunastu



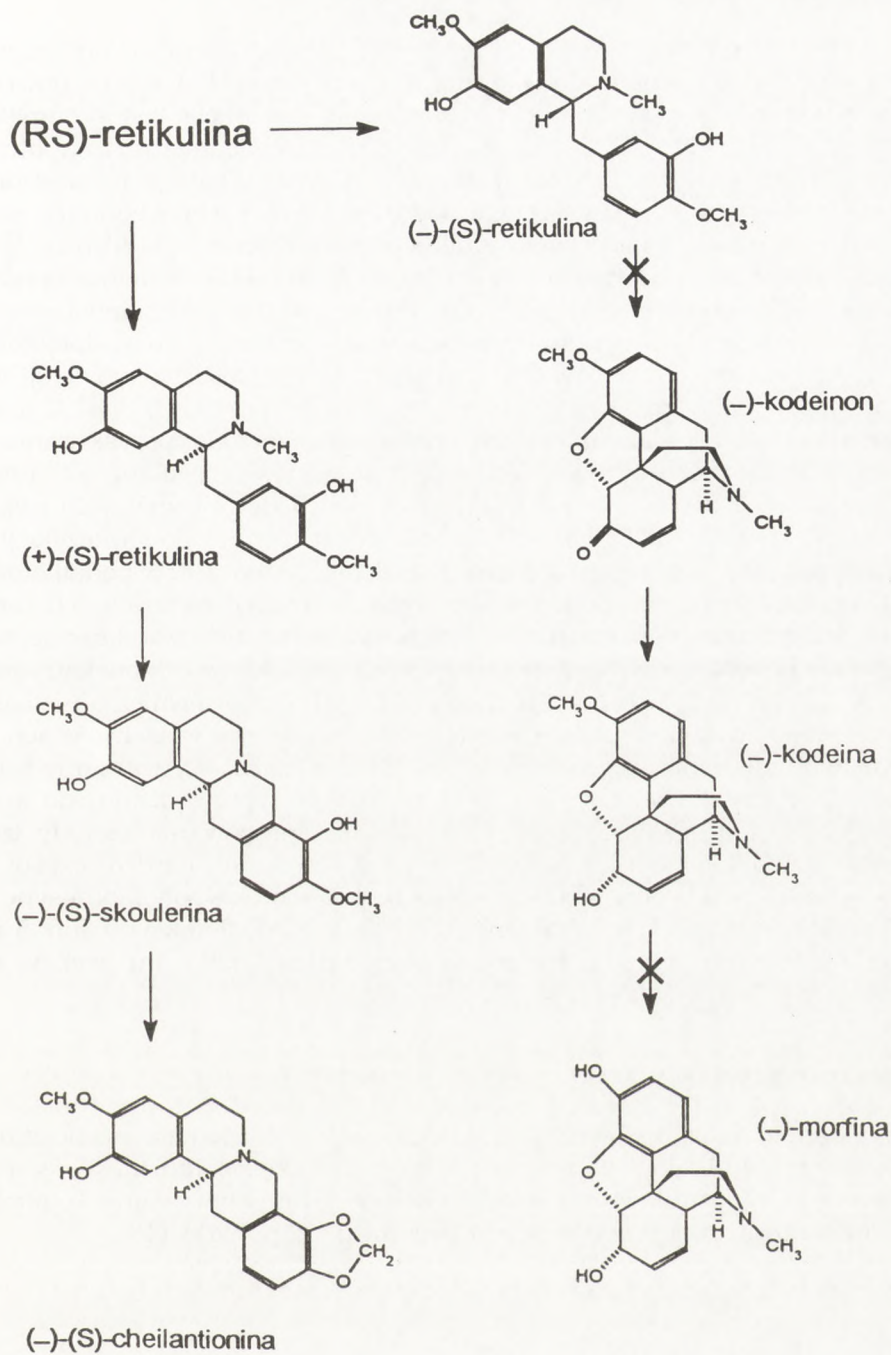
Rys. 5. Biotransformacja γ -terpinenu w hodowli *in vitro* *Thymus vulgaris* (39).

godzinach po czym stężenie (+)neomentolu szybko się obniżało. Według Croteau i Martinkusa (36, 37) spadek ten spowodowany był glukozylacją monoterenów przez obecne w kulturze glukozylotransferazy.

Glukozylację terpenów i alkoholi aromatycznych w kulturze zawiesinowej *Mentha piperita* obserwowali również Berger i Drawert (38). Proces ten uzależniony był od stężenia substratu, okresu inkubacji, światła, wieku kultury i agregacji komórek. W optymalnych warunkach przebiegał z wydajnością powyżej 70%. Biokonwersja monoterenów ma miejsce także w kulturze *Thymus vulgaris*. Tamura i współ. (39) wykazali, że kalusy tej rośliny nie syntetyzują tymolu. Mogą natomiast przekształcać γ -terpinen w p-cymen. Ten ostatni ulegał następnie wielokierunkowej hydroksylacji z wytworzeniem p-cymenolu i niewielkiej ilości tymolu (rys. 5). Zawartość tymolu zwiększała się 10-krotnie jeżeli substratem był p-cymen.

2.7. Alkaloidy opium (kodeina)

Ważną, z medycznego punktu widzenia, jest reakcja redukcji (-)kodeinonu do (-)kodeiny (rys. 6). Reakcja zachodzi w kulturze komórkowej *Papaver somniferum*, która pozbawiona jest zdolności do biosyntezy alkaloidów typu morfinanu, co wg Furuya i współ. (40) wiąże się z brakiem enzymu katalizującego reakcje biokonwersji (-)R retikuliny do salutarydiny, ważnego prekursora dla biosyntezy morfiny, kodeiny i tebainy. Interesujące jest to, że komórki *P. somniferum* zawierają enzymy odpowiedzialne za biotransformację (+)S lub (RS)-retikuliny (rys. 6).



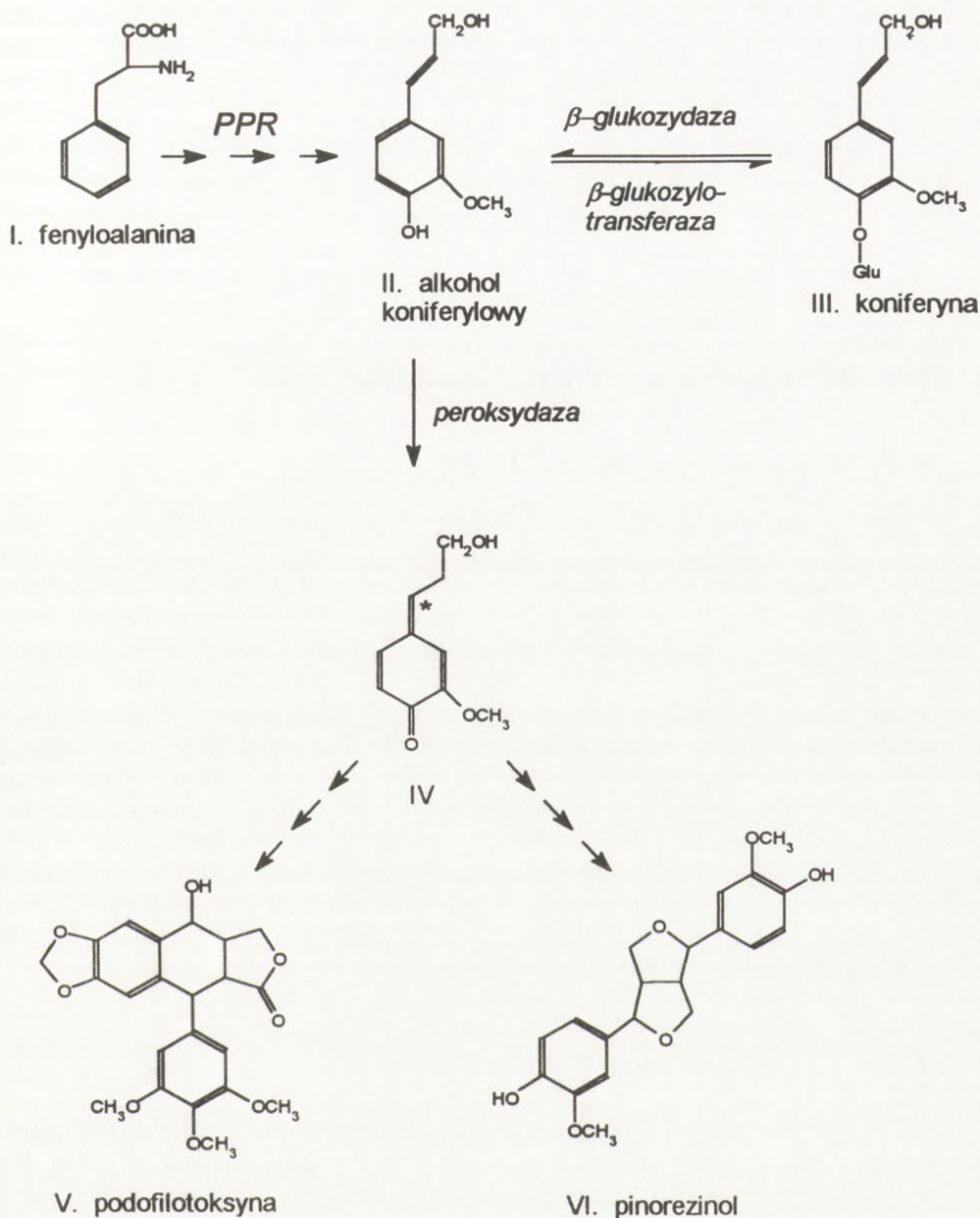
Rys. 6. Biotransformacja (RS)-retikuliny i kodeinonu w kulturze komórkowej *Papaver somniferum* (40).

2.8. Podofilotoksyna i jej pochodne

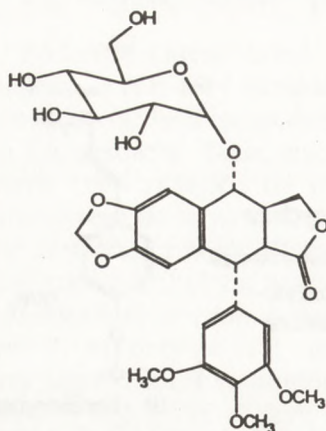
Podofilotoksyna należy do lignanów i jest półproduktem do otrzymania etopozydu (VP-16) i tenipozydu (VM-26), leków używanych w terapii przeciwnowotworowej. Izolacja podofilotoksyny z materiału roślinnego jest skomplikowana i kosztowna. Brak jest dotychczas również odpowiedniej metody otrzymania tego związku na drodze syntezy chemicznej. Dlatego prowadzone są intensywne badania nad uzyskaniem podofilotoksyny i jej pochodnych na drodze biotransformacji. Eksperymenty takie przeprowadzono z kulturami komórkowymi *Podophyllum hexandrum* (41) i *Linum flavum* (42). Schemat biosyntezy podofilotoksyny proponowany przez van Udena i współ. (41) przedstawiono na rys. 7. Autorzy ci (41) uzyskali biokonwersję koniferyny do podofilotoksyny przy użyciu kultury komórkowej *P. hexandrum*. Szybkość biokonwersji wynosiła 3,2 mg/g/dobę, przy optymalnym stężeniu prekursora 0,8 – 1,2 mmol/l. W poszukiwaniu źródeł koniferyny opracowano metodę pozyskiwania tego związku z kultury komórkowej *Linum flavum*, z której uzyskano ok. 12% koniferyny w przeliczeniu na suchą masę (43). Van Uden i współ. (42) wykazali, że kultura zawieszinowa *Linum flavum* zdolna jest również do glikozylacji podofilotoksyny. Komórki tej rośliny przekształcały 73 do 100% podofilotoksyny w β -D-glukozyd (rys. 8). Ustalono, że szybkość reakcji wynosiła 6,6 mmol/g świeżej masy/dobę. Warunkiem jej przeprowadzenia było zwiększenie rozpuszczalności podofilotoksyny przez utworzenie kompleksu z cyklodekstryną (42). Komórki *Linum flavum* rosnące w zawieszinie wytwarzają również 5-metoksypodofilotoksynę, związek o podobnych jak podofilotoksyna właściwościach cytotoxycznych. Jednakże jej zawartość jest bardzo niska. Wytwarzanie 5-metoksypodofilotoksyny zwiększa się 3 – 5-krotnie po wprowadzeniu do kultury fenyloalaniny (44). Dalsze prace pozwoliły na opracowanie metody izolacji 5-metoksypodofilotoksyny z hodowli *in vitro*. Uzyskano bardzo czysty związek (> 99%) o określonej konfiguracji, tj. (-)5-metoksypodofilotoksynę (45). Przekształcanie koniferyny lub fenyloalaniny w podofilotoksynę lub 5-metoksypodofilotoksynę jest przykładem biotransformacji kilkuetapowej, w której uczestniczy kilka enzymów (rys. 7).

2.9. Kapsaicyna

Przykładem biotransformacji kilkuetapowej jest również przekształcenie fenyloalaniny w alkaloid kapsaicynę w kulturze *Capsicum frutescens*. Proces ten prowadzony jest głównie z użyciem komórek immobilizowanych, ponieważ takie warunki sprzyjają wydzielaniu produktu do podłoża (46).



Rys. 7. Schemat biosyntezy podofilotoksyny wg van Udena i współ. (41). PPR — enzymy katalizujące reakcje biosyntezy związków fenylopropanoidowych.

Rys. 8. Struktura β -D-glukozydu podofilotoksyny.

3. Czynniki regulujące reakcje biotransformacji

3.1. Kultury komórkowe i warunki hodowli

Jednym z najważniejszych uwarunkowań odpowiedzialnych za przebieg procesów biotransformacji jest, podobnie jak w przypadku użycia drobno-ustrojów, selekcja odpowiednich szczepów (linii komórkowych), charakteryzujących się wysoką zdolnością do prowadzenia określonego typu reakcji. Przykładem mogą być prace badaczy japońskich z kulturą komórkową *Gardenia jasminoides*. Tabata i współ. (47) stwierdzili, że hodowane *in vitro* komórki tej rośliny nie mają zdolności do glikozylacji alkoholu salicylowego. Reakcja ta zachodzi natomiast w liniach komórkowych *G. jasminoides* otrzymanych przez Mizukami i współ. (28). Głównym produktem jest w tym wypadku salicyna (o-hydroksymetylofenylo- β ,D-glukozyd), podczas gdy kultury komórkowe innych roślin przekształcały alkohol salicylowy przede wszystkim w izosalicynę (o-hydroksybenzylo- β ,D-glukozyd). Na szybkość i wydajność procesów biotransformacji wpływa również stan metaboliczny komórek związany z wiekiem kultury i fazą cyklu wzrostu, warunki hodowli, struktura i stężenie substratu oraz obecność kofaktorów.

3.2. Przepuszczalność błony cytoplazmatycznej

Na efektywność procesów biokonwersji można wpływać poprzez stosowanie zabiegów zwiększających przepuszczalność błon cytoplazmatycznych (48). Pozwala to na uzyskanie wysokiego stężenia prekursora w komórkach, gdzie najczęściej zachodzą procesy biotransformacji. Można w ten sposób zwiększyć również wydzielanie produktu do podłoża. Zmianę funkcjonowania błon komórkowych osiąga się najczęściej poprzez traktowanie komórek różnymi związkami organicznymi, takimi jak: dimetylosulfotlenek (DMSO), alkohol fe-

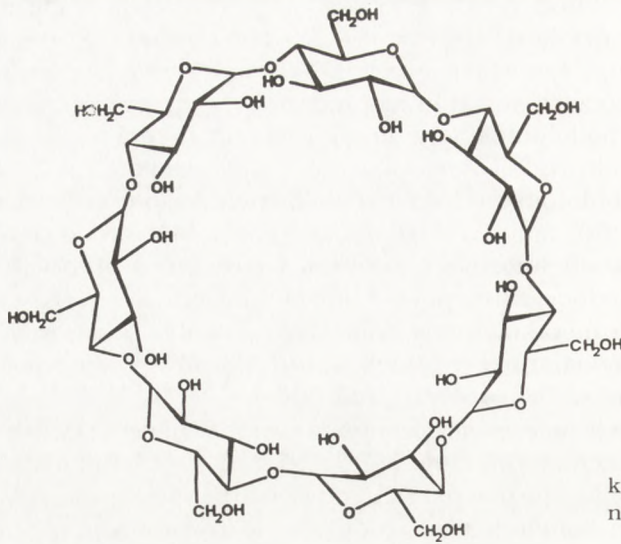
nylowy, chloroform, eter, Triton X-100, chitosan (49,50). Wadą takiego postępowania jest toksyczne działanie tego typu związków na komórki roślinne. Zjawisko to obserwowali np. van Uden i współ. (41) w kulturze komórkowej *Podophyllum hexandrum* po zastosowaniu izopropanolu w stężeniu 0,5 – 10%. Efektem było wydzielanie podofilotoksyny do podłoża, przy jednoczesnym obniżeniu żywotności komórek. Nie stwierdzono natomiast zwiększenia biokonwersji koniferyny do podofilotoksyny, co było głównym celem tych badań. Według Berlina i współ. (50) zmiana przepuszczalności błon komórkowych po zastosowaniu związków chemicznych zwiększa wydzielanie wtórnych metabolitów do podłoża, ale jednocześnie powoduje zahamowanie wzrostu i zdolności do wytwarzania tych metabolitów w komórkach tytoniu hodowanych *in vitro*. Biotransformacja fenyloalaniny w takich kulturach prowadzi do powstania nowych, normalnie nie wytwarzanych produktów.

Dla celów permeabilizacji najczęściej proponowane jest użycie DMSO; jego działanie polega na ekstrakcji steroli z błony komórkowej. Dobierając stężenie i czas działania tego czynnika można uzyskać odwracalny efekt permeabilizacji, zachowując żywotność komórek i ich zdolność do rozmnażania. Sprzyja temu również wcześniejsza immobilizacja komórek w matrycach żelowych. Efekt działania DMSO może być różny, zależnie od badanej kultury komórkowej i czynnik ten nie może być uważany za uniwersalny (51). Permeabilizowane komórki immobilizowane, aczkolwiek mogą wykazać niższą aktywność niż nieimmobilizowane, to jednak są częściej proponowane aniżeli te ostatnie z uwagi na efekt stabilizacyjny immobilizacji (zob. cz. II).

Do zmiany przepuszczalności błon komórkowych można wykorzystać również enzymy lipolityczne. Ich dodatek do kultur zawiesinowych *Morinda citrifolia* powodował wydzielanie atrachinonów do podłoża nie zmieniając przy tym żywotności komórek. Dornenburg i Knorr (52) uważają, że działanie lipazy polega na interakcji z fosfolipidami błony komórkowej, efektem czego jest krótkotrwała jej perforacja. Jest to korzystne w porównaniu z działaniem czynników chemicznych (np. DMSO), które jest nieodwracalne.

3.3. Problem rozpuszczalności substratów

DMSO i innych rozpuszczalników organicznych używa się w przypadku stosowania substratów słabo rozpuszczalnych w wodzie, takich jak: steroidy, aglikony kardenolidów czy monotereny. Jednakże korzystniejszym rozwiązaniem jest w tym przypadku hodowla w systemie dwufazowym. Cormier i Ambid (53) wykorzystali tę metodę dla biokonwersji geraniolu do innych związków terpenowych w kulturze *Vitis vinifera*. Komórki w płynnej pożywce zostały pokryte warstwą obojętnego lipofilowego triacetyloglicerydu (Miglyol 812). Autorom udało się zwiększyć w ten sposób 5-krotnie ilość geraniolu bez obniżania żywotności komórek. Ostatnio, dobre rezultaty osiągnięto stosując metodę polegającą na połączeniu substratu z β -cyklodekstryną (β -CD) (rys. 9). Ten cykliczny oligosacharyd może tworzyć kompleksy z apolarnymi ligandami,



Rys. 9. Częsteczka β -cyklodekstryny (β -CD) zawierająca 7 jednostek glukozy.

zmieniając ich właściwości fizykochemiczne, w tym także rozpuszczalność w wodzie (54). Po utworzeniu kompleksu β -estradiol- β -CD, na przykład rozpuszczalność tego steroidu wzrosła 55-krotnie (z 12 mmoli do 660 mmoli) (55). Zastosowanie β -CD w połączeniu z alkoholem koniferylowym znacznie zwiększało biosyntezę podofilotoksyny w kulturze komórkowej *Podophyllum hexandrum* (56).

3.4. Inne czynniki

Spśród zabiegów stosowanych w celu intensyfikacji procesów biotransformacji wymienić należy również naświetlenie promieniami γ (35), elicytację (57), a także inne formy stresu, takie jak pH, czy szok osmotyczny (58). Elicytacja, czyli wprowadzenie do hodowli zawiesinowej ekstraktu lub wycelowanej frakcji z grzybów patogenicznych, umożliwia wzrost aktywności różnych enzymów, co może prowadzić do wydajniejszej biotransformacji. W tych warunkach mogą być również indukowane inne, dodatkowe drogi metaboliczne. Przykładem jest biotransformacja alkaloidu tabersoniny do hydroksytabersoniny, która zachodzi jedynie w hodowli zawiesinowej *Catharanthus roseus* traktowanych elicytorem (59).

Literatura

1. Phillipson J. D., (1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Eds. Nijkamp H. J. J., van der Plas L. H. W., van Aartrijk J., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 592 – 600.
2. Reinhard E., Boy M., Kaiser F., (1975), *Planta Med. Suppl.*, 163 – 168.
3. Peterson M., Steitz H. U., (1985), *FEBS Lett.* 188, 11 – 14.

4. Reinhard E., Kreis W., Barthlen U., Helmbold H., (1989), *Biotechnol. Bioengin.*, 34, 502 – 508.
5. Breuling M., Spieler H., Schwantag D., Alfermann A. W., Reinhard E., (1987), *Biochemical Engineering*, Eds. Chmiel A., Hammes W., Bailey J. E., Gustaw Fischer Verlag, Stuttgart, 443 – 449.
6. Kreis W., Reinhard E., (1987), *J. Plant Physiol.*, 128, 311 – 326.
7. Kreis W., Reinhard E., (1988), *Planta Med.*, 54, 143 – 148.
8. Kreis W., Zhu W., Reinhard E., (1989), *Biotechnol. Lett.*, 11, 325 – 330.
9. Kawaguchi K., Hirotani M., Furuya T., (1993), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 21, Medicinal and Aromatic Plants IV, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 371 – 386.
10. Kawaguchi K., Hirotani M., Yoshikawa T., Furuya T., (1990), *Phytochemistry*, 29, 837 – 843.
11. Jones A., Veliky I. A., (1981), *Planta Med.*, 42, 160 – 166.
12. Jones A., Veliky I. A., Ozubko R. S., (1978), *Lloydia*, 41, 476 – 487.
13. Reinhard E., Alfermann A. W., (1980), *Advances in Biochemical Engineering*, Ed. Fiechter A., Springer-Verlag, Berlin, 49 – 84.
14. Hashimoto T., Yun D-I., Yamada Y., (1993), *Phytochemistry*, 32, 713 – 718.
15. Anderson L. A., Phillipson J. D., Roberts M. F., (1985), *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 31, Ed. Fiechter A., Springer-Verlag, Berlin, 1 – 36.
16. Hashimoto T., Yamada Y., (1983), *Planta Med.*, 47, 195-199.
17. Cheng K. D., Zhu W. H., Li X. L., Meng C., Shun Z. M., Yang D. H., (1987), *Planta Med.*, 53, 211 – 213.
18. Hashimoto T., Konno J., Yamada Y., (1989), *Phytochemistry*, 28, 1077 – 1082.
19. Yamada Y., Hashimoto T., (1989), *Proc. Japan Acad.*, 65, B, 156 – 159.
20. Sasse F., Witte L., Berlin J., (1987), *Planta Med.*, 53, 354 – 359.
21. Sandermann H., Diesperger H., Schel D., (1977), *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, Eds. Barz W., Reinhard E., Zenk M. H., Springer-Verlag, Berlin, 177 – 196.
22. Suzuki T., Yoshioka T., Tabata M., Fujita Y., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 275 – 278.
23. Pilgrim H., (1970), *Pharmazie*, 25, 568.
24. Mizukami H., (1986), *Plant Tissue Cult. Letters*, 3, 35 – 37.
25. Yokoyama M., Inomata S., Seto S., Yanagi M., (1990), *Plant Cell Physiol.*, 31, 551 – 555.
26. Tabata M., Umetani Y., Ooya M., Tanaka S., (1988), *Phytochemistry* 27, 809 – 813.
27. Mizukami H., Terao T., Miura H., Ohashi H., (1983), *Phytochemistry*, 22, 679 – 680.
28. Mizukami H., Terao T., Amono A., Ohashi H., (1986), *Plant Cell Physiol.*, 27, 645 – 650.
29. Umetani Y., Kodakari E., Yamamura T., Tanaka S., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 325 – 327.
30. Kamel S., Brazier M., Desmet G., Fliniaux M-A., Doubreuil A. J., (1992), *Phytochemistry*, 31, 1581 – 1583.
31. Wright I. A., (1973), *Expl. Cell. Res.*, 78, 456 – 460.
32. Daniel P., Brazier M., Cerutti I., Pieri F., Tardivel I., Desmet G., Baillet J., Chany C., (1989), *Clin. Chim. Acta*, 181, 255 – 264.
33. Aviv D., Krochmal E., Dantes A., Galun E., (1981), *Planta Med.*, 42, 236 – 243.
34. Aviv D., Dantes A., Krochmal E., Galun E., (1983), *Planta Med.*, 47, 7 – 10.
35. Galun E., Aviv D., Dantes A., Freeman A., (1985), *Planta Med.*, 51, 511 – 514.
36. Croteau R., Martinkus C., (1979), *Plant Physiol.*, 64, 169 – 175.
37. Martinkus C., Croteau R., (1981), *Plant Physiol.*, 68, 99.
38. Berger R. C., Drawert F., (1988), *Z. Naturforsch.*, 43c, 485 – 490.
39. Tamura H., Takebayashi P., Sugisawa H., (1993), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 21, Medicinal and Aromatic Plants IV, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 413 – 426.
40. Furuya P., Nakano M., Yoshikawa T., (1978), *Phytochemistry*, 17, 891 – 893.

41. van Uden W., Pras N., Malingre Th. M., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 23, 217 – 224.
42. van Uden W., Oeij K. H., Woerdenbag H. J., Pras N., (1992), 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research, September, Trieste, 45.
43. van Uden W., Pras N., Batterman S., Visser J. E., Malingre Th. M., (1991), *Planta*, 183, 25 – 30.
44. van Uden W., Pras N., Vossebeld E. M., Mol J. N. M., Malingre Ph. M., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 20, 81 – 87.
45. van Uden W., Homan B., Woerdenbag H. J., Pras N., Malingre Th. M., Wichers H. J., Harkes M., (1992), *J. Nat. Prod.*, 55, 102 – 110.
46. Lindsey K., Yeoman M. M., (1984), *Planta*, 162, 495 – 501.
47. Tabata M., Umetani Y., Tanaka S., (1985), *Biotechnology — from Biochemistry to Metabolite Production*, Ed. Maruo B., Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo, 524-530.
48. Felix H. R., (1982), *Anal. Biochem.*, 120, 211 – 234.
49. Brodelius P., Nilsson K., (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 275 – 280.
50. Berlin J., Martin B., Nowak J., Witte L., Wray V., Strack D., (1989), *Z. Naturforsch.*, 44C, 249 – 254.
51. Felix H. R., (1987), *International Conference on Bioreactors and Biotransformations*. „Gleneagles”, UK, 9 – 12 November, Proceedings, Eds. Moody G. W., Baker P. B., Elsevier Appl. Sci. Publ., London, 277 – 286.
52. Dornenburg H., Knorr D., (1992), *Process Biochemistry*, 27, 161.
53. Cormier F., Ambid C., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 427 – 430.
54. Szejtli J., (1982), *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akademiai Kiado, Budapest, 95 – 109.
55. Woerdenbag H. J., Pras N., Frijlink H. W., Lerk C. F., Malingre Th. M., (1990), *Phytochemistry*, 29, 1551 – 1554.
56. Woerdenbag H. J., van Uden W., Frijlink H. W., Lerk C. F., Pras N., Malingre Th. M., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 97-100.
57. Kurz W. G. W., Constabel F., Eilert U., Tyler R. T., (1987), *Topics in Pharmaceutical Sciences*, Eds. Breimer D. D., Speiser P., Elsevier, Amsterdam, 413 – 416.
58. Renaudin J. P., (1981), *Plant Sci. Lett.*, 22, 59 – 69.
59. Eilert U., (1987), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 4, Eds. Constabel F., Vasil I. K., Academic Press, London, 153 – 196.

Biotransformation by plant cell cultures. Part I – Reactions

Summary

Plant enzymes are able to catalyse regio- and stereospecific reactions and can be applied to the production of pharmaceutically important compounds. This paper summarizes the results of such biotransformations in freely suspended cells. The factors affecting bioconversion capabilities of cells are also discussed. Special attention is paid to permeabilization and the problems of poorly water-soluble precursors.

Key words:

plant cell cultures, secondary metabolites, biotransformation.

Adres dla korespondencji:

Halina Wysokińska, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.