

MÁSODLAGOS ANYAGCSERE TERMÉKEK SZINTÉZISE
DATURA ÉS SOLANUM SZUSZPENZIÓS SEJTKULTURÁKBAN

Doktori értekezés

Frank László

Alkaloida Vegyészeti Gyár

Tiszavasvári

1980.



T A R T A L O M J E G Y Z É K

BEVEZETÉS.....	3
IRODAIMI ÁTTEKINTÉS.....	6
1. Másodlagos anyagcsere termékek képződése növényi kultúrákban.....	8
2. Szekunder anyagcsere folyamatok regulá- ciója növényi sejtkultúrákban.....	16
3. Biotranszformáció.....	22
4. Növényi sejtkultúrák fermentációja.....	24
ANYAG ÉS MÓDSZER,.....	28
1. Sejtszuspenziós kultúrák indítása és fenntartása.....	28
2. Datura sejtkultúrák tropán alkaloid- tartalmának meghatározása.....	31
3. Solanum sejtkultúrák alkaloid és szapo- genintartalmának meghatározása.....	32
EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE.....	34
1. Datura innoxia Mill. sejtszuspenziós kul- túrák tropán alkaloid produkciója.....	34
2. Növekedési regulátorok hatása a Datura innoxia Mill. sejtkultúrák növekedésére és alkaloid termelésére.....	37



3. DMSO hatása a <i>Datura innoxia</i> Mill. sejt- kulturák növekedésére és alkaloid terme- lésére.....	43
4. Prekurzorok hatása a <i>Datura</i> tenyészetek hioszciamin és szkopolamin produkciójára....	49
5. Kísérletek a sejttenyészetek táptalajának egyszerűsítésére.....	55
6. Kolhicin jelenlétében tenyésztett <i>Datura</i> kulturák növekedése és alkaloid szintézise..	58
7. <i>Datura innoxia</i> Mill. sejtek kísérleti fermentációja.....	62
8. <i>Solanum</i> fajok sejtszuszpenziós tenyész- teinek szteroid alkaloid spektruma.....	65
9. Biotranszformációs kísérletek növényi sejttenyészetekben.....	69
EREDMÉNYEK ÉRTÉKELESE.....	74
ÖSSZEFOGLALÁS.....	89
IRODALOMJEGYZÉK.....	92
A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	105

B E V E Z E T É S

HABERLANDT /1902/ sikertelen kísérletei óta a növényi szövettenyésztés az 1970-es évek elejére érkezett el arra a szintre, hogy elméleti kérdéseken kívül egyes gazdasági problémák megoldására is alkalmassá váljék.

A növényi sejtszuszpenziós kulturák fermentációjával történő gyógyszeripari alapanyagok előállításának lehetősége már korábban felvetődött és a napjainkig végzett kísérleti eredmények alapján - a meglévő nehézségek ellenére - egyre perspektivikusabbnak ígérkezik. Hisz a sejtkulturák számos tekintetben olyan előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyeket a konvencionális mezőgazdasági termelés nem tud biztosítani.

A növényi termékek produkciója ily módon függetlenné válik a környezeti faktorok hatásától, ugyanint a klimatikus viszonyoktól, a földrajzi helyzettől, a kártevők pusztításától. A mezőgazdaság szakaszos termelése folyamatossá tehető, és nem

utolsósorban a sejtek növekedése és bioszintetikus folyamataik kontrollált körülmények közé kerülnek, a metabolikus folyamatok ésszerű regulációjával pedig lehetőség adódik a vegyületek produkciójának emelésére.

A növényi sejttenyészetek iparban való alkalmazásának egyedüli kritériuma, hogy a termelés gazdaságos legyen. Az in vitro előállított termék ára semmilyen körülmények között nem lehet magasabb a hagyományos mezőgazdasági művelés útján nyert termék áránál /ZENK, 1977/.

Dolgozatomban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az általunk létrehozott dedifferenciálódott sejtsuszpenziós kulturák milyen másodlagos anyagcsere kapacitással rendelkeznek, illetve bioszintetikus potenciáljukat a tenyésztési feltételek változtatásával miként lehet befolyásolni. Munkánk során olyan modell-rendszert szándékoztunk létrehozni, amely egy esetleges ipari alkalmazás lehetőségét is magában hordozza, továbbá az in vitro alkaloid bioszintézis alapkérdései és törvényszerűségei tanulmányozhatók, várhatóan a feltárt összefüggések általánosak, és más növények sejtte-

nyészetekben is érvényesek lehetnek.

A disszertációban szereplő valamennyi kísérletet a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében, az Alkaloida Vegyészeti Gyár anyagi támogatásával végeztük.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

A növényi szövettenyésztés történetét 1902-től számítják, amikor HABERLANDT eredménytelenül próbálkozott izolált növényi sejteket szintetikus táptalajon tenyészteni.

Harminc év telt el amig GAUTHERET /1934/ francia és WHITE /1934/ amerikai kutatók eredményesen oldották meg a gyökér-, illetve kalluszkulturák in vitro tenyésztését.

Azóta számos táptalajt és tenyésztési technikát dolgoztak ki és az elmúlt évek munkáinak eredményeként a növényfajok széles spektrumát sikerült tenyészetbe vonni, valamint a legtöbb faj esetében az izolált sejteket sejtszuspenzió formájában rutinszerűen fenntartani.

A magasabbrendű növények izolált sejtjeinek tenyésztési technikája alapvetően új lehetőségeket biztosított a kutatásban, különösen a fiziológia, biokémia és genetika területén, főleg ennek tud-



ható be az a rendkívül gyors és szerteágazó fejlődés, amelyet az elmúlt ötven év alatt megtett.

A növényi szövettenyésztési technika alkalmazása lehetőséget biztosított olyan problémák vizsgálatára és megoldására, mint a sejtosztódás és nagyobbodás, differenciálódás és morfogenezis, továbbá alkalmat nyújt a totipotencia és a növekedési regulátorok szerepének tisztázására, drog-hatás eredményes tesztelésére, tumorsejtek növekedésének és a szomatikus sejthibridizáció törvényszerűségeinek vizsgálatára, és nem utolsósorban a sejtek primer és szekunder metabolikus tevékenységének meghatározására.

Mivel dolgozatomban elsősorban az iparilag is hasznos növények in vitro másodlagos anyagcsere kapacitásával kívántunk foglalkozni, így a továbbiakban nem térünk ki a növényi szövettenyésztés egyéb területeinek irodalmának áttekintésére. Érdeklődésünk középpontjába azok a munkák kerültek, amelyek folyékony tápoldatban tenyésztett differenciálatlan sejtek, un. sejtszuszenziós kultúrák másodlagos anyagcsere produktivitásával

foglalkoznak, tekintettel arra, hogy ezek a tenyészetek - szemben a kallusz- és szervkulturákkal - egy esetleges ipari fermentáció lehetőségét is biztosítják.

1. Másodlagos anyagcsere termékek képződése
növényi kulturákban

A gyógyszeriparilag is hasznos növények szövettenyészteteiben képződő elsődleges és másodlagos termékek az 1950-es években kerültek a kutatás előterébe. E tenyészetek bioszintetikus és metabolikus potenciáljainak szisztematikus vizsgálata azonban csak később, az 1960-as években kezdődött el.

A vizsgálatokat eleinte szilárd táptalajon növesztett szerv-, illetve kalluszkulturákkal végezték, majd a tenyésztési technika tökéletesedésével egyre több kutató választotta vizsgálati objektumául a szuszpenziós sejtkulturákat.

Napjainkig a növényi sejtkulturákban főként a következő produktumokat identifikálták; enzimek, szénhidrátok, organikus savak, alkaloidok, glükozidok, szteroidok, szapogeninek, terpenoidok, cser-

savak.

Az utobbi időben elsősorban gazdasági jelentőségük, valamint elméleti érdekességük miatt egyre behatóbban tanulmányozzák a kulturák másodlagos anyagcsere szintézisét. Ezek a vegyületek a legtöbb esetben jelentős farmakológiai aktivitással rendelkeznek, és mint gyógyszeripari alapanyagokra egyre nagyobb mennyiségben van szükség.

NICKELL /1962/ a szekunder növényi produktumokat a következőképpen definiálta: " olyan vegyületek amelyeket nem minden növény szintetizál, amelynek funkciói általában nem ismeretesek, és a növény számára nem esszenciális anyagok, ennek ellenére sok esetben jelentős biológiai aktivitással, reguláló funkcióval rendelkeznek ".

SEIGER-PRICE /1976/ szerint a másodlagos metabolitok a korábbi nézetekkel szemben nem statikus állapotban lévő anyagcsere hulladékok, hanem rövid "turnoverrel" rendelkező, dinamikus egyensúlyi állapotú vegyületek, amelyeknek elsődleges funkciója nem a kártevők elleni védekezés és energia raktározás, hanem a primer produktu-

mokhoz hasonlóan a biokémiai folyamatok befolyásolása, szabályozása.

Az 1950-es években jelentek meg azok az első publikációk, amelyek szerv-, illetve kalluszkultúrák alkaloid szintézisét vizsgálták. WEST és MIKA /1957/ *Atropa belladonna* gyökér és gyökérkallusz kultúrában talált mérhető mennyiségű atropint, viszont sem levél sem szár eredetű kultúrából alkaloidot kimutatni nem tudott. A legmagasabb hozamot a gyökérkallusz kultúra adta 0,042-0,053 %-nyi értékkel.

CHAN és STABA /1965/ *Datura stramonium* szárkallusz alkaloid produktivitását tanulmányozta. A harmadik hét végére magas össz-alkaloid szintet sikerült kimutatni /0,83 mg/50 ml kultúra/, amennyiben a MURASHIGE-SKOOG-féle /1962/ táptalajt kókusztejjel és prekursorokkal egészítette ki. Ezekben a tenyészetekben 0,2 % L-fenilalanin jelenlétében igen magas, 0,161 % alkaloid szintetizálódott. A táptalajban az alkaloidok mindig kisebb koncentrációban voltak jelen mint a sejtekben.

METZ és LANG /1966/ *Hioscyamus niger* gyökér kultúrában 0,2-0,3 % szkopolamint detektált, STOH /1969/ pedig *Datura stramonium* szuszpenzió kultúra szkopolamin és hioszciamin produkciójáról számol be.

TABATA és mtsai. /1971/ *Datura innoxia* kultúrával 0,015 %-nyi, HIRAOKA-TABATA /1974/ pedig 0,03 % tropán alkaloidot szintetizált.

A fenti szerzőkön kívül még számos kutató vizsgálta a *Datura* szövettenyészetek alkaloid produktivitását, így KLEIN /1960/, SHAH-KHANNA /1965/, ROMEIKE-KOLBITZ /1970/, KHANNA-NAG /1971/.

A dohány alkaloidok közül nikotint, anatabint és anabazint identifikáltak növényi szuszpenzió kultúrából /SPEAKE és mtsai., 1964; MITRA, 1966; FURUYA és mtsai., 1967; PETERS és mtsai., 1974; TABATA-HIRAOKA, 1976 stb./.

Módosított White-féle médiumon /SOLTH, 1957/ *Nicotiana tabacum* differenciálódott gyökér kultúrája 29 mg/g szárazszövet mennyiségben termelt nikotint.

Később SOLTH és mtsai. /1960/ *Nicotiana* gyökér kultúrában egyidejű nikotin és anabazin produk-

ciót észlelt. A nikotin mennyisége arányosan növekedett a gyökér szárazsúly gyarapodásával, viszont az anabazin szintézis az idő függvényében jobban elnyújtott volt, s úgy látszott, hogy azt főleg az előregedő gyökök szintetizálják.

FURUYA és munkatársainak /1966/ *Nicotiana tabacum* szárkallusszal sikerült nikotint és anabazint termeltetni, míg CAREW /1965/ közleményében arról számol be, hogy gyökér szövetkulturája nikotint szekretál a táptalajba.

Az első jelentős nikotin produkcióval rendelkező dohány kulturát OHTA és munkatársainak /1975/ sikerült izolálni, amely a szárazsúlyra vonatkoztatva 1,7 % alkaloidot termelt.

OGINA és mtsai. /1978/ arról számolnak be, hogy klónszelektált kalluszkulturáik igen magas 1-4 %-nyi nikotint termelnek. A napjainkig publikált dohány kulturák közül ezek a vonalak rendelkeznek a legmagasabb bioszintetikus potenciállal.

A dioszgenin mint a gyógyszeripar egyik alapvető szteroid forrása hamar felhívta a szövettenyésztők figyelmét.

Dioscorea deltoidea /KAUL-STABA, 1968/ és *Solanum xanthocarpum* /HEBLE és mtsai., 1968/ sejtszuszenziós kultúrából hamarosan sikerült is dioszgenint izolálni.

E területen ezideig a legjobb eredményt KAUL és STABA /1968/ érte el. Dedifferenciált sejtkultúrájukat MURASHIGE-SKOOG-féle médiumon tenyésztették, amelynek növekedési rátája 0,54 g szárazsúly l/nap volt, dioszgenin tartalma pedig megközelítően 1 %.

HEBLE és mtsai. /1968/ által izolált *Solanum xanthocarpum* kalluszkultúrájának dioszgenin produktivitása 0,008-0,001 % között ingadozott. A *Dioscorea* sejtvonal a dioszgeninen kívül β -szitoszterolt és sztigmaszterolt is felhalmozott, míg e vegyületek közül a *Solanum xanthocarpum* kallusz csak a β -szitoszterolt termelte.

MITRA /1966/ összefoglaló munkájában az intakt növények és a sejtkultúrák másodlagos metabolizmusát hasonlította össze, s arra a következtetésre jutott, hogy jelentős biokémiai különbség van a növény és a belőle származó sejtkultúrák között, annak ellenére, hogy genetikai-

lag azonos információt hordoznak. A fiziológiai különbségeket a sejtek új környezetbe való kerülésének és azok dedifferenciált állapotának tulajdonította.

BÖHM /1977/ szerint a sejtkulturák alkaloid spektruma nem szükségszerűen tükrözi az anyanövényét. A sejtek alkaloid szintetizáló kapacitása a sejtek specifikus differenciációs programjától függ.

TABATA /1977/ az eltérő alkaloid spektrumot, valamint azt az általánosan elfogadott tényt, hogy sejtkulturákkal másodlagos anyagcsere terméket szintetizáltatni különösen nehéz, azzal magyarázza, hogy a dedifferenciált sejtek egyes specifikus bioszintetikus utjai blokkolódnak.

A reguláló folyamatok megértéséhez elengedhetetlennek látszik a szekunder termékek szintézisében résztvevő enzimek ismerete. Sajnos a sejt-kulturák metabolizmusa kevésbé vizsgált, jelentős nehézséget okoz, hogy ezekben a rendszerekben a bioszintetikus aktivitás gyakran nagyon alacsony. Véleményünk szerint a fenti területen csak a kezdeti lépések történtek meg, és az elért eredmények általános következtetések levonására még nem al-

kalmasak.

Amint a bevezetőben is látható volt a növényi sejtkulturák ipari alkalmazását egyetlen tényező befolyásolja, az hogy egységnyi fermentációs idő alatt az adott tenyészet mennyi terméket képes produkálni. A két legfontosabb paraméter a sejtek növekedési üteme és az általuk termelt anyag mennyisége.

TEUSCHER /1973/ megjelent összefoglalójában egyetlen egy növény az Ammi visnaga található, amelynek szuszpenzió kulturája magasabb másodlagos anyagcsere produkcióval rendelkezett, mint a differenciálódott növény.

Ezen a téren a helyzet az utóbbi időben nem sokat változott.

Sejtkulturában ezideig kimutatott másodlagos anyagcsere termékek közül a ginzengozidok szintetizálódtak a legnagyobb mennyiségben /OKAMATO, 1975/. A szárazsúly százalékában 27 %-nyi nyers szapogenin termelődött, amely a kifejlett növény produkciójának hatszorosa. Az egereken végzett farmakológiai tesztben a sejtextraktum teljesen egyenértékűnek mutatkozott a ginseng

gyökér kivonattal.

Kiemelkedő produkcióval rendelkeznek még ZENK /1975/ *Murinda citrifolia*, valamint ZENK /1977/ *Coleus blumei* sejtszuspenziós kulturái, amelyek 10 % antrakinson, illetve 3,6 % rozmarinsav szintetizáló kapacitással rendelkeznek.

2. Szekunder anyagcsere folyamatok regulációja növényi sejtkulturákban

A növényi sejtkulturák másodlagos anyagcsere produkciója nagymértékben függ a környezeti és biológiai tényezőktől. Az alábbiakban néhány jelentősebb faktor szerepét szeretnénk illusztrálni.

Fény: Napjainkig meglepően kevés olyan közlemény jelent meg, amely a sejtkulturák másodlagos anyagcseréjének intenzitása és a fény közötti kölcsönhatást tette vizsgálata tárgyává. Az eddigi eredmények azonban egyértelműen bizonyítják, hogy a fény az egyik legjelentősebb fizikai faktor.

Ruta graveolens fényen, illetve sötétben tenyésztett kalluszainak illóolaj produkciója kö-

zötti különbségről számol be CORDUAN-REINHARD /1972/. A szövetkulturában a fény a legtöbb esetben stimulálta a karotinoidok, flavonoidok, polifenolok bioszintézisét.

HAHLBROCK /1971/ behatóan tanulmányozta petrezselyem kulturában a fény hatását a flavonoidok képződésére. Eredményei világosan bizonyították, hogy fényen a kultura enzimeinek aktivitása nő, a flavon, illetve flavonol glükozidok mennyisége emelkedik.

Lithospermum kulturában a stimuláló hatásban éles ellentét mutatkozik fehér, illetve kék fény alkalmazása esetén, a kék fény majdnem teljesen gátolja a shikonin származékok képződését /TABATA és mtsai., 1974/. Ennek okát a szerzők abban látják, hogy a shikonin szintézishez FMN /Flavinmononukleotid/ szükséges mint koenzim, ez az anyag viszont kék fény hatására inaktiválódik.

NAGEL-REINHARD /1975/ kísérleteiben a kék fény a terpenoidok bioszintézisét szintén gátolta.

A fent említett példák talán illusztrálják a fény szerepét a másodlagos anyagcsere regulációban, de a végzett kevés számú kísérlet nem



teszi lehetővé, hogy általános következtetéseket vonjunk le.

Növekedési regulátorok: A magasabb rendű növényekben egyes vegyületek szintézise, illetve felhalmozása specializált szervekben, szövetekben történik. Így például az olajok az erre a célra differenciálódott mirigyekben, szekréciós tömlőkben, míg a latex komponensek a tejcsövekben találhatók.

Számos dedifferenciált sejt-, illetve szövetkulturával sikertelenül próbáltak bizonyos vegyületeket termeltetni, így morfint /FURUYA, 1972/, mentolt /WANG-STABA, 1963/, tetrahidrokanabinolt /ITOKAWA, 1975/.

E negatív kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy a fenti vegyületek szintézise csakis specifikusan differenciálódott szervekben, szövetekben lehetséges.

Amennyiben a dedifferenciálódott kulturákban növényi hormonok adagolásával szerv, illetve növény regenerációt indukáltak, sok esetben jelentősen emelhető volt a szekunder termékek produk-

ciója. Így sikerült a dohány kultúra nikotin /TABATA és mtsai., 1971/, *Scopolia palviflora* tropán alkaloid /TABATA és mtsai., 1972/, a *Datura innoxia* össz-alkaloid /HIRAOKA-TABATA 1974/ szintjét emelni.

IKUTA /1974/ bizonyította, hogy a nem termelő *Papaver* kultúrában az ópium alkaloidok szintézise helyreáll, amennyiben a tenyésztésben növény redifferenciálódást indukál.

A növényi növekedési hormonok nemcsak a sejtkultúrák növekedését és differenciálódását befolyásolják, hanem a másodlagos metabolizmusra is kifejtik hatásukat. Ez a hatás azonban nagymértékben fajspecifikus.

Számos kutató vizsgálta az auxinok hatását a nikotin szintézisre. Ezzel kapcsolatban TABATA és mtsai. /1971/ munkáját emlitenénk, ahol a nikotin produkciót a 2,4 D erősen gátolta, illetve a kintin elősegítette.

A nikotin szintézis biokémiai mechanizmusának hormonális szabályozását MIZUSAKI és mtsai. /1971/ derítették fel. Bizonyították, hogy a magas koncentrációban jelenlévő auxin gátolja a

putreszcin-N-metil transzferáz aktivitását, s ennek következtében a putreszcin a sejtekben felhalmozódik, és abnormális metabolikus terméké alakul.

Lithospermum kultúrában szintetikus auxinokkal /2,4 D vagy NAA/ teljes mértékben gátolható volt a shikonin szintézis, viszont a természetes IAA alig befolyásolta azt /TABATA és mtsai., 1974/.

Érdekes eredményekről számol be ZENK és mtsai. /1975/ amikor auxinok másodlagos anyagcserére gyakorolt hatását vizsgálta Murinda kultúrában. A sejtek antrakinon produkciója NAA jelenlétében csökkent, viszont 2,4 D alkalmazása esetében nem.

Hasonlóan a 2,4 D nem gátolta az antrakinon termelődését Cassia tora sejt kultúrában /TABATA és mtsai., 1975/, míg a dioszgenin felhalmozódását jelentősen stimulálta /KAUL-STABA, 1969/.

Prekurzorok: A kultúrák végtermék produkcióját emelni lehet külsőleg adagolt szintetikus prekurzorokkal, abban az esetben, ha a vegyület felhalmozódását prekurzorhiány limitálja.

Scopolia és Datura kulturák tropán alkaloid szintje feltűnően emelkedett direkt prekursor, tropasav adagolása esetén /TABATA és mtsai., 1971/.

HIRAOKA /1973/ viszont arról számol be, hogy a Datura sejtek tropán alkaloid hozamát direkt prekursorokkal nem sikerült emelni, egyedül a gyógyszeriparilag értéktelen acetiltropin mennyisége gyarapodott.

KHANNA-NAG /1972/ közleményében arról ad hirt, hogy tirozin, valamint fenilalanin adagolása esetén a Datura metel kalluszkultúra atropin produkciója tekintélyes mértékben emelkedik, a hioszciamin, valamint a kolin képződés azonban megszűnik.

A direkt prekursorok alkalmazása nem vezet mindig szükségszerűen a végtermék mennyiségének emelkedéséhez /TABATA és mtsai., 1976/. Tapasztalatuk szerint a Lithospermum kultúrában háromszorosra emelkedett a shikonin tartalom, ha a kultúra táptalajához fenilalanint adtak, ellenben a közvetlen prekursor /p-hidroxibenzoesav/ ezt a hatást nem váltotta ki.

A fenti példákból is kiderül, hogy prekursorok adagolásával nem egyszerű feladat a végső ter-

mék hozamot hatásosan befolyásolni, különösen akkor nem, ha gazdasági szempontokat is figyelembe veszünk.

3. Biotranszformáció

Speciális vegyületek növényi sejtekkel történő átalakítása, biotranszformációja jelenleg talán az egyik legperspektivikusabb területnek ígérkezik. Talán itt várható leghamarabb, hogy a növényi sejtkultúra ipari termelés alapjává válik. Az optimizmus alapja az, hogy az eddig végzett munkák igazolták azt a hipotézist, hogy növényi sejtek segítségével vegyületeken olyan speciális átalakítások lehetségesek, amelyeket eddig sem mikrobiális, sem szintetikus úton nem sikerült megvalósítani.

A fenti területen a kezdeti lépéseket FURUYA és mtsai. /1973/ tették meg. Szívglükózidokat és szexhormonokat transzformáltattak növényi sejtekkel.

Növényi sejtek transzformálásával legkorábban REINHARD /1974/ ért el olyan praktikus értéket, hogy az ipari alkalmazás gondolata is felme-

rült. Digitális lanata sejtvonallával sikeresen alakította át mind a digitoxint, mind a β -metil-digitoxint gyógyszeriparilag hasznosabb vegyületé úgy, hogy a szteránváz 12 pozícióján hidroxilezési folyamat zajlott le.

PILGRIM /1970/ hat egyszerű fenol biotranszformációjáról számol be. Az átalakulás végén a fenti vegyületek monoglükozidjait nyerte.

Datura innoxia sejt kultúrában a fenol vegyületek glukolálását TABATA és mtsai. /1976/ tették vizsgálatuk tárgyává. A kémiai analízisek eredményei azt mutatták, hogy három dihidroxibenzol izomer, valamint más fenol vegyületek könnyedén alakulnak át mono- β -D-glükozidjaikká. A kísérleti eredmények bizonyították, hogy a Datura sejtek figyelemre méltó kapacitással glukolálják a hidroxikinonokat arbutinná, amely vizelethajtó, valamint antiszeptikus szer. A hidroxikinonok teljes átalakulásához tíz órára volt szükség.

Nyilvánvaló összefüggés van a sejtek anyagcsere állapota és biotranszformációs kapacitása között. Ennek érdekes bizonyítéka BARZ /1975/ munkája. Növényi sejtekkel fenol vegyületeket glukolálását tanulmányozta aerób és anaerób körül-



mények között. Az izoflavon glukozilálásának rátája bab szuszpenzió kulturában, aerób körülmények között 4 %, míg anaerób viszonyok mellett a transzformációs kapacitás hatszorosára emelkedett.

Végezetül MIURA-MILL /1971/ munkáját említjük meg. Dohány kulturában DL triptofánt alakított át L-triptofánná. Bár az átalakítás mértéke csak 6 %, de az eredmény mégis jelentős, mert bizonyította, hogy a növényi kulturák racemát vegyületek optikailag aktív formákká való átalakítására is alkalmasak.

4. Növényi sejtkulturák fermentációja

A növényi sejtfermentáció meglehetősen rövid multal rendelkezik. Ennek legfőbb oka, hogy napjainkig kevés olyan növényi kulturával rendelkezünk, amelynek termék produkciója olyan magas lenne, hogy gazdaságos ipari fermentációt is lehetővé tenne.

A növényi sejtek fermentációja területén 1977-ben két jelentős eredmény született. NAGAUCHI

és munkatársainak /1977/ sikerült 20 000 l-es fermentorban dohány sejteket fenntartani. A maximális sejthozam 70 óra alatt 15 g/l sejt-szárazsúly volt, ami közel ötszöröse az eddigi eredményeknek, továbbá bizonyította, hogy a modern fermentációs technikával mind a baktériumokkal, mind a gombákkal szemben megfelelő sterilitás érhető el.

WAGNER és VOGELMANN /1977/ *Murinda citrifolia* sejtek növekedését és antrakinnon produkcióját vizsgálta négy eltérő típusú reaktor rendszerben. Eredményeik szerint az "airlift" fermentorban a kulturák produktivitása lényegesen magasabb, mint a vizsgált másik három reaktorban. Az "airlift" reaktor nagy térfogatu fermentációkhoz is alkalmas modellnek látszik, a sterilizációs problémák, valamint a költségráfordítás itt a legkisebb.

A növényi sejtek fermentációja során speciális probléma a kevertetés és a levegőztetés, a sejtek nagy érzékenységet mutatnak a fermentorban fellépő nyíróerővel szemben.

Murinda citrifolia produkciós fázisában a kriti-

kus nyiróerő stresszt $800-2000 \text{ din/cm}^2$ -nél mérték, a kritikus oxigén tenzió 5 % telítettség-nél van /VOGELMANN és mtsai., 1978/.

A növényi sejtek fermentációja során rendszerint erős habzás figyelhető meg, és a tenyészetek a legtöbb esetben tolerálják a különböző habzás elleni kemikáliákat./MANDELS,1972/.

Az utobbi időben TAKAYAMA és munkatársainak sikerült csökkenteni, vagy teljesen megszüntetni a habzást, ha a táptalajban emelték a kalcium mennyiségét.

Másik probléma, hogy a tenyésztés költségei megtérülnek-e a növényi sejtek fermentációja során. Hiszen jelentős anyagi ráfordítás szükséges a fermentor üzemeltetéséhez, az inokulum előállításához, és a két hétig is eltartó végső fermentációhoz. Ipari szempontból kétségtelenül jelentősek azok a próbálkozások, amelyek a növényi sejtek táptalajainak egyszerűsítésével foglalkoznak. Jelen árviszonyok mellett a táptalajköltségek jelentős részét a vitaminok, valamint a szénforrásként alkalmazott szaharóz teszi ki.

TABATA /1977/ véleménye szerint az elkövet-

kezendő időben, a növényi fermentáció területén a következő feladatokat kell megoldani:

- a./ genetikailag stabil, gyors növekedéssel és magas bioszintetikus aktivitással rendelkező sejtvonalakokat kell izolálni,
- b./ a növényi sejtek fermentációjához speciális fermentorokat szükséges tervezni,
- c./ a fermentáció költségeit tovább kell csökkenteni.

Amennyiben a fenti problémákat sikerül megoldani, úgy a növényi kultúrákkal történő gyógyszeripari alapanyag előállítás egyre inkább gazdasági eredményt is ígérő feladat.

A N Y A G É S M Ó D S Z E R

Vizsgálatainkat *Datura innoxia* Mill., *Solanum dulcamara* L., *Solanaum laciniatum* és *Solanum vescum* sejtvonalakon végeztük.

A sejtvonalak indításához szükséges - hatóanyagra előzetesen szelektált - növényanyagot ifj. Dr. Mátyé Imre bocsátotta rendelkezésünkre /MTA Botanikai Intézet, Vácrátót/.

1. Sejtszuszenziós kulturák indítása és fenntartása

A növényi magvakat 70 %-os etanollal 30 másodpercig fertőtlenítettük, majd steril desztillált vízzel háromszor öt percig mostuk.

A steril magvakat - minden faj esetében - növekedésszabályzókat és szaharózt nem tartalmazó, MURASHIGE-SKOOOG-szerint /1962/ összeállított, 0,8% agarral szilárdított táptalajra helyeztük, és

fényen csiranövényeket neveltünk.

A steril csiranövények különböző szerveiből 3-5 mm-es szegmentumokat vágunk le, és 1,1 mg/l 2,4 D-t, valamint 0,20 mg/l kinetint tartalmazó szilárd MS táptalajra helyeztük.

A tenyészeteket sötétben, 26 °C hőmérségleten neveltük. A növényi szövetdarabkák felületén képződött kalluszokat leválasztottuk, és azonos összetételű, friss táptalajra helyeztük.

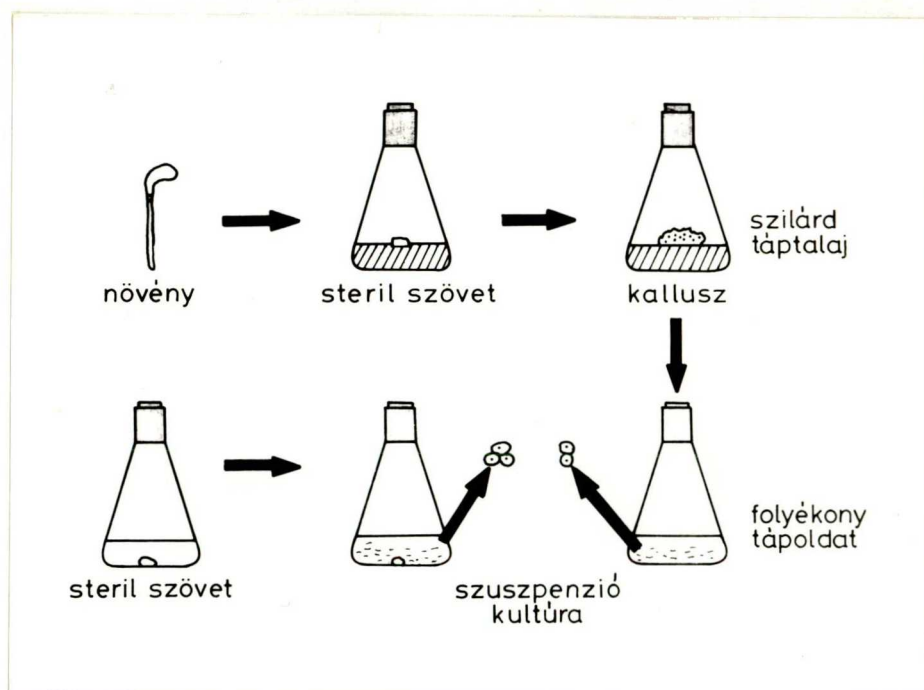
Többszöri átoltás után jól növekedő, differenciálatlan kallusztenyészetekkel rendelkezünk, amelyeket rendszeres, 4-6 hetenként történő átoltásokkal tartottunk fenn.

A legjobban növekedő felületi tenyészetekből szuszpenziós kulturákat létesítettünk /1. ábra/, amelyeket 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban, 200 ml tápoldattal, 150 rpm fordulatszámmal, New Brunswick rázógépen rázattunk.

A tenyészetek passzálására, friss tápoldattal való ellátására két naponként került sor. A szuszpenziós tenyészetek, a felületieknél használt és bevált összetételű, de agart nem tartalmazó táptalajban nőttek.

Minden műveletet steril körülmények között végeztünk, a táptalajokat és a használt eszközöket autoklávban sterilizáltuk.

A tenyészetek jellemzésére használt száraz sejtsúly meghatározása, a sejtek Miracloth szűrőn történő átmosása után, 48 órás 60 °C hőmérsékleten való szárítás után történt.



1. ábra: Növényi sejtszuszenziós kulturák indítása.

2. Datura sejt kultúrák tropán alkaloid tartalmának meghatározása

A táptalajtól megszűrt *Datura innoxia* szövetmintákat az enzimek inaktiválása végett 105 °C-on 15 percig hevítettük, majd 60 °C hőmérsékleten szulfitállandóságig szárítottuk.

A finom porrá őrölt minták 1 g-hoz 0,75 ml 28 %-os NH_4OH -t, 1 ml 95 %-os etilalkoholt és 2 ml etilétert adtunk, majd a mintákat 12 órán át maceráltuk, és utánna bepároltuk.

Az így nyert szárazanyagot kloroformmal 24 órán keresztül Soxhlet-készülékben extraháltuk, a kloroformos oldatot vákuum alatt bepároltuk.

A maradékot 0,25 ml 0,1 N etanolos sósavba vettük fel, majd 10 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az így kapott felüluszt használtuk az alkaloidok kvantitatív analízisére.

A szkopolamin, illetve hioszciamin gázkromatográfiás meghatározását PARKER és mtsai. /1963/ módszere alapján végeztük.

Az irodalmi adatokkal való összevethetőség érdekében a kultúrák alkaloidtartalmát a sejtek szárazanyag százalékában adtuk meg.

3. Solanum fajok sejtkulturáinak alkaloid- és szapogenintartalmának meghatározása

Extrakció: A Solanum sejteket a táptalajtól szűrés útján különítettük el.

Ezután a sejteket 105 °C-on 15 percig, majd 60 °C hőmérsékleten 48 óráig szárítószekrényben szárítottuk, és a porított anyagot 80 %-os metanollal extraháltuk.

Az extrakció 24 órán keresztül szobahőmérsékleten Soxhlet-készülékben történt.

A metanolos kivonatot Rotadeszt készülékben bepároltuk, majd a mintákat savas hidrolízis után 9-es pH-án, megfelelő mennyiségű kloroformmal háromszor kiráztuk.

A bepárlási maradékot 1 ml kloroform:metanol /1:1/ arányu elegyében oldottuk fel.

Vékonyréteg kromatográfia: A minták futtatása 250 μ vastagságu TLP-012 Anasil G /NEN Chemicals/ szilikagélen, ill. néhány esetben házi készítésű rétegen történt.

A bepárlási maradék kloroform:metanol /1:1/ olda-

tákból 10 µl-es alikvótokat vittünk a rétegre. A futtatást 14 cm távolságig, szobahőmérsékleten jól záró kádákban végeztük.

Futtató szolvensnek kloroform:metanol /19:1/, valamint piridin:etilacetát:víz /1:5:4/ arányu elegyét használtuk.

A lemezeket az oldószernyomok teljes eltávozása után hívtuk elő, kloroformban oldott 20 %-os SbCl_3 -dal; a színreakció 10 percig 105°C -on történő melegítés után jelentkezett.

Az értékelést UV-fényben végeztük, az R_f értékek, és a SbCl_3 -dal adódó színreakció alapján. Az azonosítást részben együtt futtatott autentikus teszt-mintákkal történő összehasonlítás alapján, részben VÁGUJFALVI és mtsai. 1966-ban közölt módszerével végeztük.

EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

1. Datura innoxia Mill. sejtszuspenziós kulturák tropán alkaloid produkciója

A szuszenziókulturák indításához szükséges kallusz-szöveteket steril csíranövények kalluszosításával kaptuk, amelyeket 1,1 mg/l 2,4 D és 0,20 mg/l kinetin jelenlétében, 0,8 % agarral szilárdított MS médiumon tartottunk fenn.

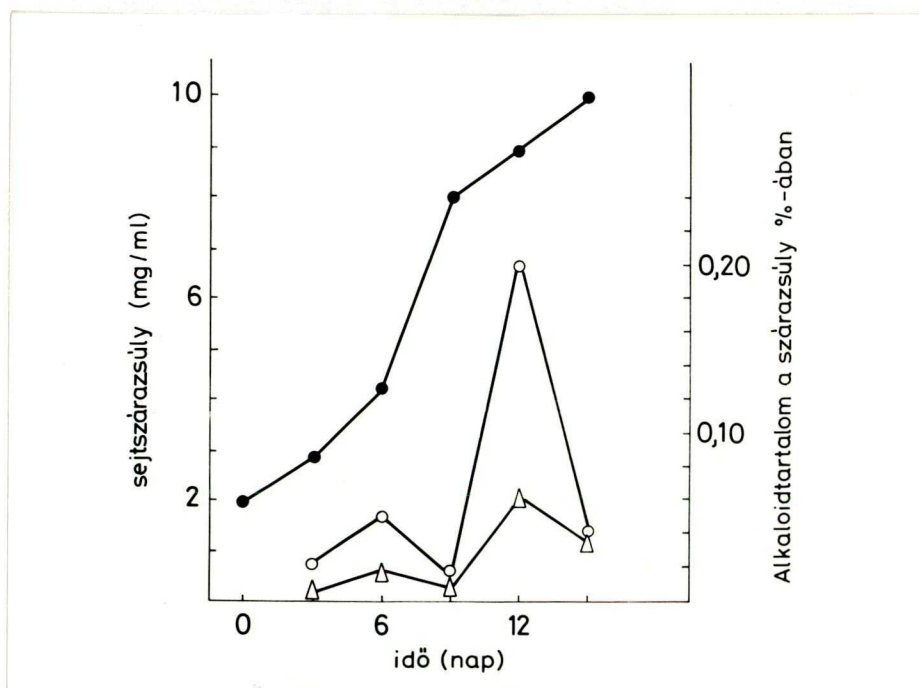
A szuszenziókulturák létrehozásának első lépése, a differenciálatlan kalluszok folyékony táptalajban történő tenyésztése, rázatása.

Az 1,1 mg/l 2,4 D-ről eredő kalluszokat 0,5 mg/l 2,4 D-t tartalmazó MS folyadék kulturába vive, a harmadik hét után kaptunk olyan tenyészeteket, amelyek nagy mennyiségben tartalmaztak intenzíven osztódó különálló sejteket és néhány sejtből álló

aggregátumokat.

Tulajdonképpen ez volt az a stádium, amikor az alkaloid produkcióval kapcsolatos kísérletek elindíthatóak voltak.

A nagyszámu lehetőség közül elsőként azt vizsgáltuk, hogy a tenyésztés során a kulturák alkaloidtartalma hogyan változik.



2. ábra: Datura kulturák növekedési intenzitása és alkaloid produktivitása.

Sejtek szárazsúly gyarapodása ●-●;

hioszciamin tartalom o-o; szkopo-

lamin tartalom Δ-Δ .

A sejtek szárazsúly gyarapodását és alkaloid értékeit a 2. ábra mutatja.

A kulturák növekedési intenzitását a száraz sejt-súly gyarapodása útján követtük nyomon, és mg/ml egységben határoztuk meg, míg a hioszciamin és szkopolamin tartalmat a szárazanyag százalékában.

I. táblázat: Előregedő Datura tenyészetek alkaloidtartalma.

inkubációs idő	sejtszárazsúly	hioszciamin	szkopolam.
/nap/	mg/ml	%	%
15	10,0	0,042	0,036
20	13,2	0,016	0,008
24	12,9	0,010	0,000

Az alkaloid értékek jelentősen ingadoznak. Lényegében két termelési csucs figyelhető meg a hatodik, illetve a tizenkettedik napon. A második hioszciamin csucs 0,2 %-al figyelemre méltó érték,

amely 18 mg hioszciamint jelent egy liter sejt-kulturában.

A szkopolamin értékek kisebbek, de a ciklikusság itt is megfigyelhető.

Kísérleteink során a tenyésztési idő további növelése, a kulturák előregitése nem vezetett a sejtek alkaloid produkciójának további növekedéséhez, mint az I. táblázat adatai is mutatják.

2. Növekedési regulátorok hatása a Datura innoxia Mill. sejt-kulturák növekedésére és alkaloid termelésére

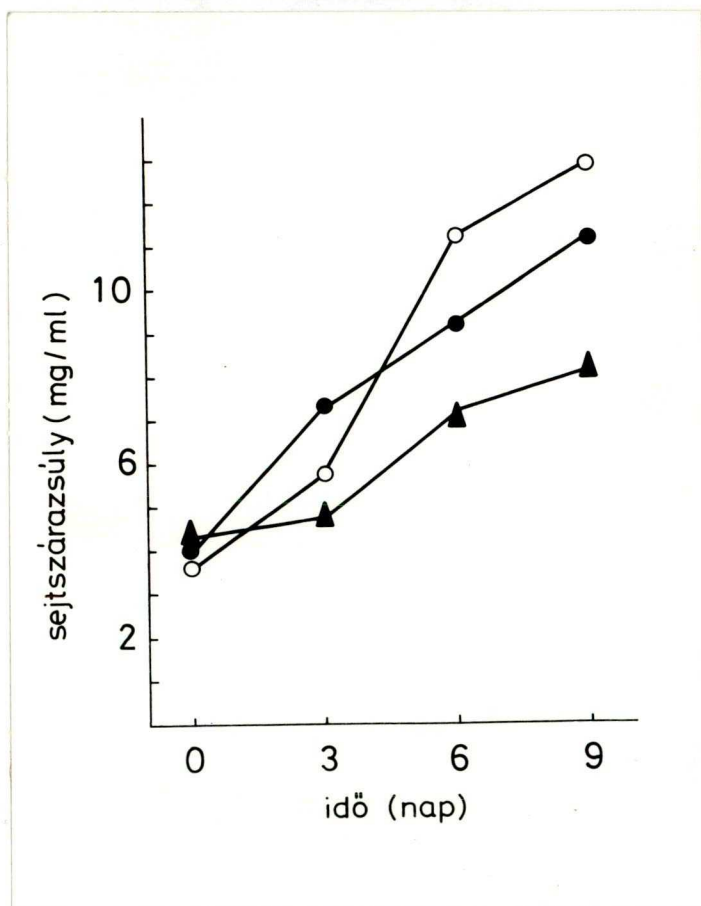
Mint minden sejttenyészetben, így a Datura esetében is dedifferenciált sejtek alkotják a szuszpenziókulturát.

A táptalajban jelenlévő növényi hormonok szükségessé teszik az intenzív sejtosztódáshoz, a tenyészetek gyors szaporodásához, de ugyanakkor dedifferenciációt is eredményeznek.

Ezzel szemben az alkaloid szintézis differenciált sejt-funkciónak tekinthető, amely nem esszenciális a sejtek alapanyagcseréje és életbenmaradása szem-

pontjából.

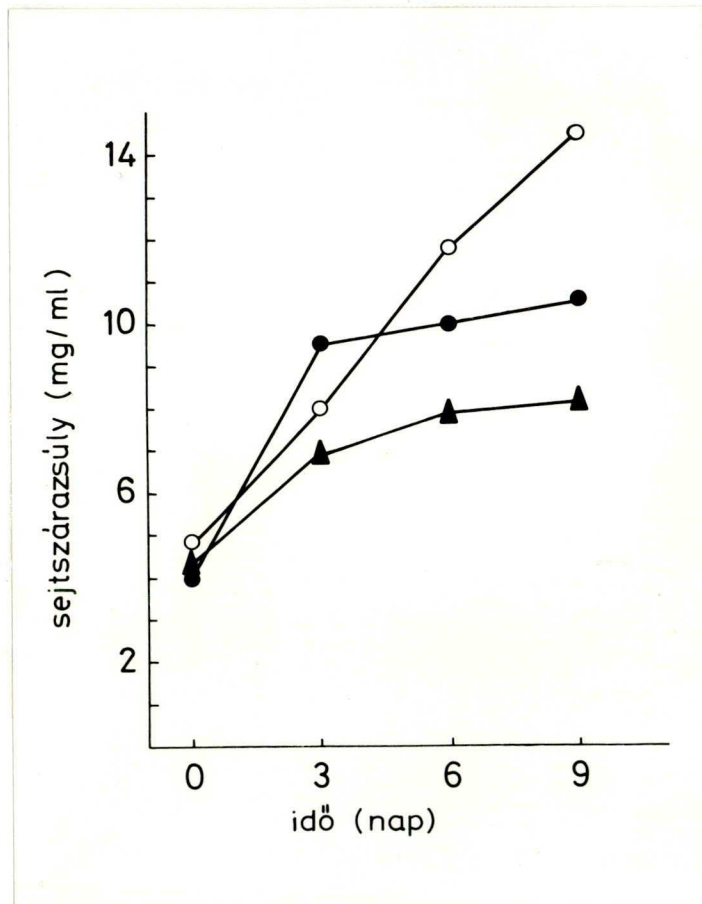
Kísérleteink kiindulópontja a következő kérdés feltevés volt; miként befolyásolják a dedifferenciált sejt kulturák növekedési intenzitását, és alkaloid produkcióját azok a hormon koncentrációk, amelyek kallusz szinten organogenezist, hajtás, ill. gyökér redifferenciálódást indukálnak.



3. ábra: Hipokotil eredetű *Datura* sejtek növekedési intenzitása eltérő hormon kombinációk mellett. o-o 2,4 D + kinetin; ▲-▲ IAA + kinetin; ●-● IAA + BA.

Datura kulturáinkat az alábbi hormon kombinációju MS alapu táptalajra helyeztük.

- 1./ 1,1 mg/l 2,4 D + 0,20 mg/l kinetin
- 2./ 1,0 mg/l IAA + 0,20 mg/l kinetin
- 3./ 1,0 mg/l IAA + 0,12 mg/l BA



4. ábra Gyökér eredetű Datura sejtek növekedése, eltérő hormon kombinációk mellett. o-o 2,4 D + kinetin; ▲-▲ IAA + kinetin; ●-● IAA + BA.

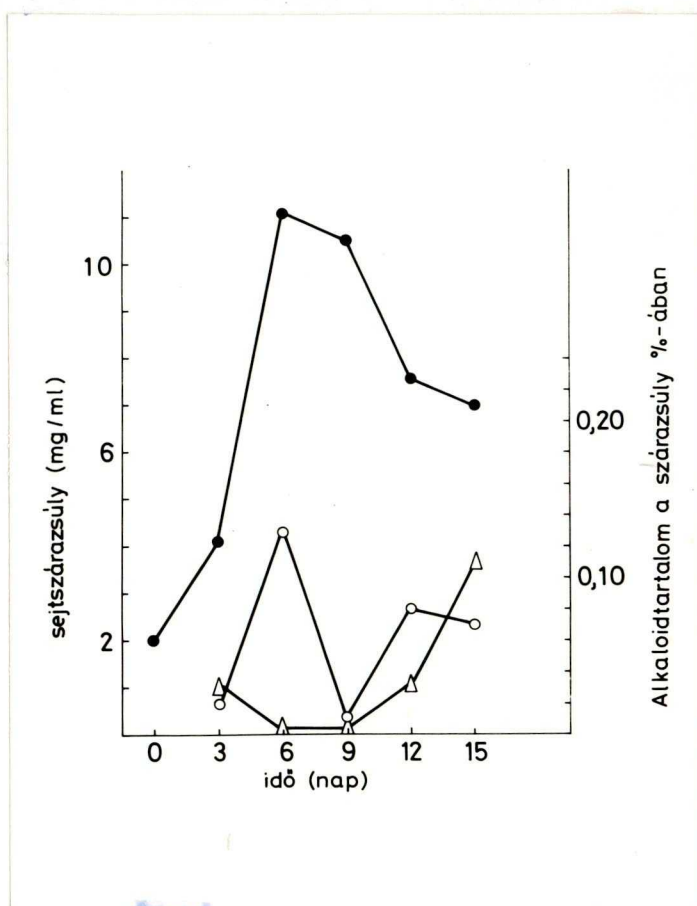
Az IAA, illetve a kinetin és BA hatását hipokotil eredetű kultúrákban értékeltük, amelyeket a kísérlet indítása előtt az adott hormonösszetételű táptalajon tíz napig előtenyésztettünk.

Az egyes sejtvonalak növekedési dinamikájáról a 3. és 4. ábra görbéi tájékoztatnak.

A legerősebb növekedésgátlás - minden sejtvonal esetében -, az IAA-t és kinetint tartalmazó táptalajon volt megfigyelhető, míg a legjobb növekedési rátával, átkontroll tenyészetként használt 2,4 D-t és kinetint tartalmazó médiumon tenyésztett kultúrák rendelkeztek.

A tropán alkaloid bioszintézist mindkét hormonkombináció, mindkét sejtvonal esetében negative befolyásolta. A hipokotil, illetve gyökér eredetű kontroll tenyészetek 0,1-0,2 % közötti alkaloidtartalmához viszonyítva az IAA + kinetinen és az IAA + BA-en növesztett *Datura* tenyészetekben elhanyagolható, 0,001-0,003 %-nyi hioszcinin, illetve szkopolamin szintetizálódott.

A szintetikus auxinok, mint például a 2,4 D megvonása a táptalajból fokozatosan a sejtek endogén hormonszintjének csökkenéséhez vezet, s ez



5. ábra: 2,4 D mentes médiumon tenyésztett *Datura* sejtek növekedése és alkaloidhozama. ●-● tenyészetek szárazsúly gyarapodása; ○-○ hioszciamin tartalom; △-△ szkopolamin tartalom.

számos növényi kultúrában differenciálódási folyamatokat indít meg. A hormonmentes körülmények kö-

zött tenyésztett *Datura* sejtekben mért eredményeinket az 5. ábra foglalja magában.

Látható, hogy a hormon megvonása után a szárazsúly növekedési görbe meredekebb, mint a hormonos kísérletekben volt. A hatodik nap után azonban a sejtek osztódása leállt, s ez a tizenötödik napra a tenyészetek teljes leromlásához vezetett.

A hioszciamin produkció szempontjából a hormonos /0,5 mg/l 2,4 D + 0,20 mg/l kinetin/ kísérletekhez hasonlóan itt is két termelési csucs figyelhető meg. A maximális hioszciamin produkció a hatodik nap volt detektálható, 0,125 % értékkel, ami lényegesen magasabb, mint a 2,4 D-on fenntartott *Datura* sejtek esetében volt, ugyanakkor a második csucs ez alatt marad.

A sejtekben a legmagasabb szkopolamin tartalom a 15. napon volt mérhető. A 0,116 % kiugró érték, amely a tenyészetek általános leromlásakor jelentkezik.

Ismeretes, hogy a növényi kallusz- és sejtenyészetekben a differenciálódás folyamata stimulálható antiauxinokkal. Ezek a vegyületek az

auxinokkal szerkezeti hasonlóságot mutatnak és azok dedifferenciáló hatását képesek függeszteni. A *Datura* tenyészeteinkben jelenlévő 2,4 D egyik antiauxinja a 2,4,6 T.

A kísérlet során valamennyi *Datura* tenyészet MS alapu médiumon növekedett, amely a II. táblázatban megadott hormonokkal volt kiegészítve. A szuszpenziókulturákra gyakorolt antiauxin hatást a II. táblázat alapján értékeltük.

Az alkaloid adatok egyöntetűen alacsony értéket képviselnek, a vizsgált antiauxin egyik koncentrációja sem okozott szintézis növekedést.

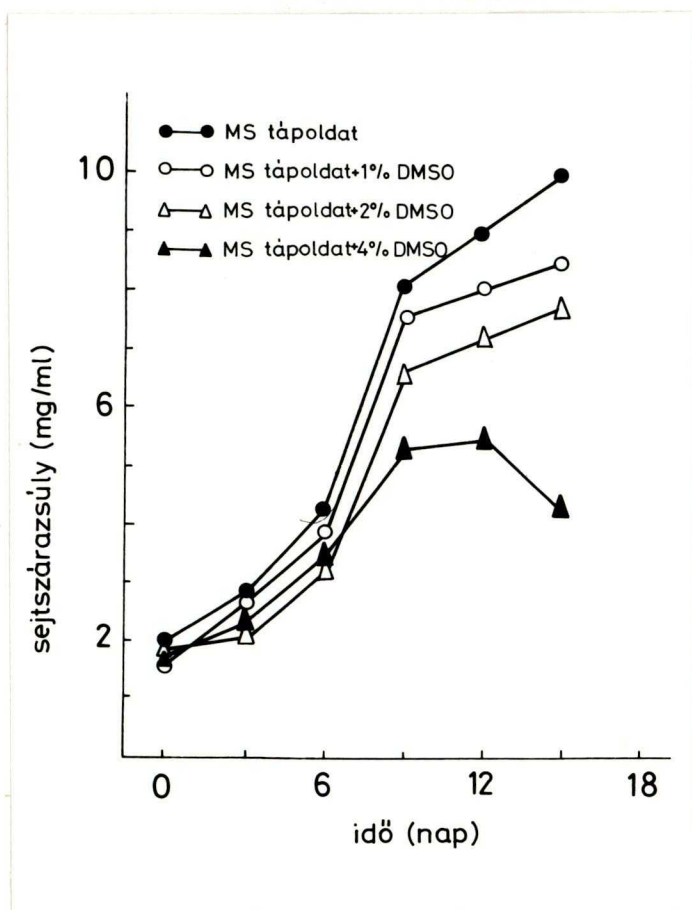
A 2,4,6 T a *Datura* sejtek poliferaációs rátáját csökkentette, de nem koncentráció függően, összességében ez a kísérleti megközelítés nem eredményezett alkaloid termelésbeli növekedést.

3. DMSO hatása a *Datura innoxia* Mill. sejtkulturák növekedésére és alkaloid termelésére

A DMSO-nak a sejtekre gyakorolt komplex hatása nem teljesen tisztázott. Vannak adatok,

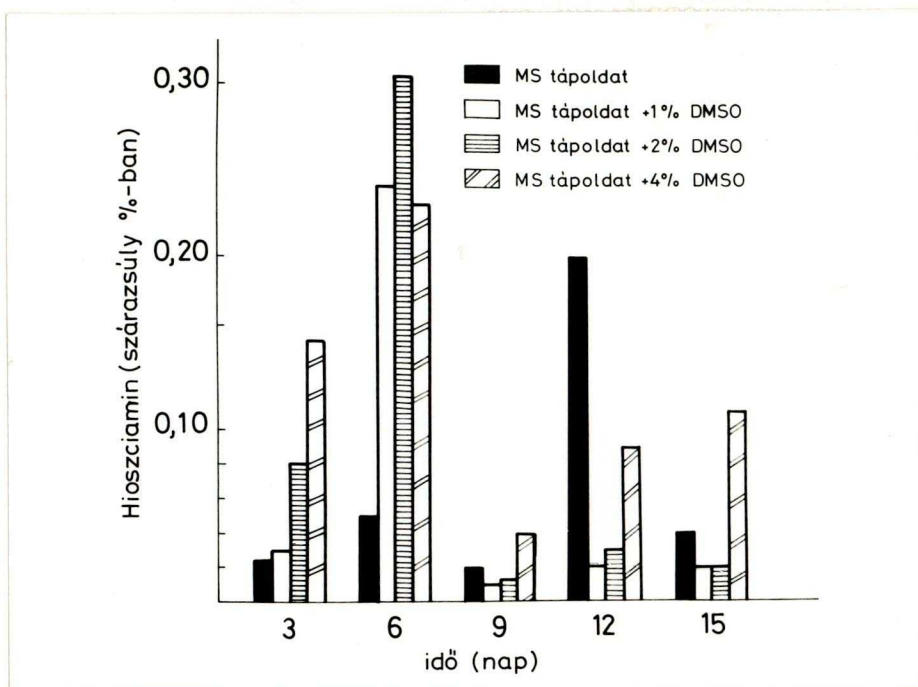
II. táblázat: Antiauxin hatása a Datura sejtek tropán alkaloidtartalmára.

hormon kombinációk	inkubációs idő 6 nap			inkubációs idő 12 nap		
	sejtszáraz- súly mg/ml	hioszci- amin %	szkopola- min %	sejtszáraz- súly mg/ml	hioszcia- min %	szkopo- lamin %
kinetin 0,20 mg/l	10,6	0,035	0,019	14,4	0,064	0,028
kinetin 0,20 mg/l + 0,256 mg/l 2,4,6 T	8,8	0,027	0,006	11,5	0,008	0,001
kinetin 0,20 mg/l + 1,28 mg/l 2,4,6 T	5,1	0,005	0,010	8,1	0,001	0,000
kinetin 0,20 mg/l + 2,56 mg/l 2,4,6 T	4,7	0,002	0,009	7,9	0,006	0,002



6. ábra: DMSO jelenlétében tenyésztett *Datura innoxia* kulturák növekedési intenzitása.

amelyek a membránokra kifejtett hatását, ill. sejtosztódást gátló szerepét mutatják. Differenciálódást kiváltó hatása szintén ismert.

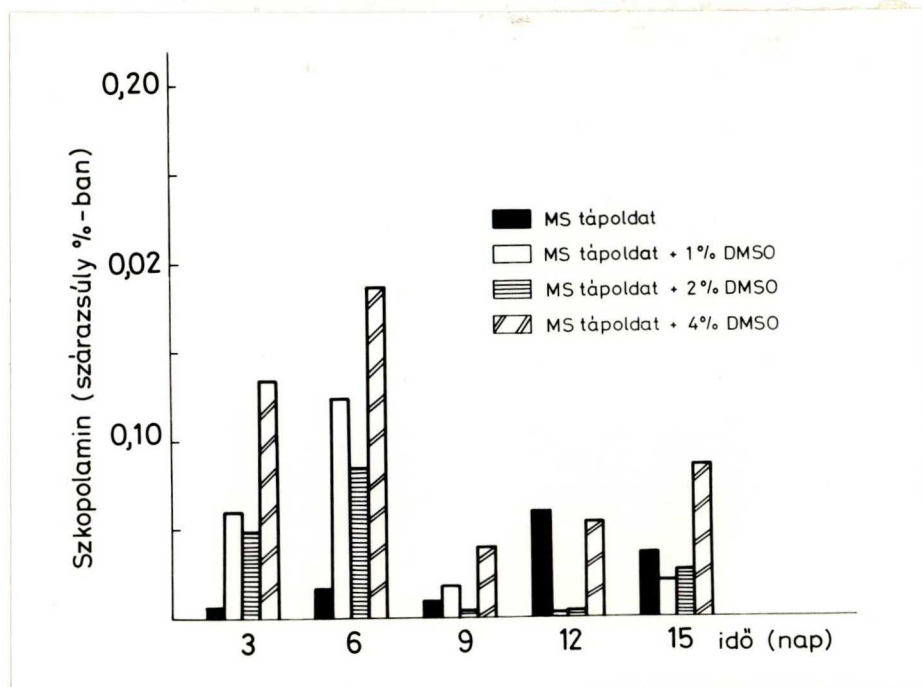


7. ábra: DMSO hatása a *Datura* tenyészetek hioszciamin produkciójára.

Ezekből az adatokból kiindulva nyultunk ehhez a vegyülethez, és vizsgáltuk a *Datura* kulturák alkaloid bioszintézisére kifejtett hatását.

A 6. ábra a sejtek növekedését mutatja 1 % 2 % és 4 % DMSO jelenlétében.

A kontroll tenyészetekhez viszonyítva valamennyi DMSO koncentráció gátolta a kulturák növekedését



8. ábra: DMSO hatása a Datura tenyészetek szkopolamin termelésére.

gyakorlati szempontból azonban csak a legmagasabb DMSO koncentráció növekedés gátlása volt figyelemre méltó.

A 7. ábrán az egyes kísérleti kombinációkban a hioszciamin tartalom változásait láthatjuk. A gázkromatográfiás analízissel kapott adatok szerint a DMSO jelenléte a táptalajban növelte a sejtek alkaloid szintézisét.

Az alkaloid produkció ciklikussága mind a hioszciamin, mind a szkopolamin esetében megfigyelhető. A DMSO kezelés hatására a maximális hioszciamin produkció időben előretolódott, s kiugró 0,3 %-nyi értékkel a 6. napon volt detektálható, ugyanakkor a kezeltetlen tenyészetek bioszintetikus kapacitása a 12. napon már magasabb, mint a DMSO-val kezeltéké.

A szkopolamin tartalomra vonatkozó adatokat a 8. ábrán ismertetjük. A DMSO valamennyi vizsgált koncentrációja fokozott szkopolamin szintézist eredményezett. A termelési csúcsok időbeli előretolódása itt is megmutatkozott.

A termelési értékeket tekintve a 4 % DMSO-t tartalmazó tenyészetek 0,17 %-nyi, az 1 % DMSO-t tartalmazók pedig 0,14 % szkopolamint termeltek, a szárazanyag százalékában, hat napos tenyésztés alatt.

A DMSO-nak az alkaloid bioszintézist befolyásoló hatását olyan *Datura* tenyészetekben is megvizsgáltuk, amelyeket 2,4 D, illetve kinetin mentes médiumon tenyésztettünk.

A hormonmentes táptalajon vizsgált kultúrák esetében is megfigyelhető volt, hogy a DMSO fokoz-

za az alkaloidok bioszintézisét, a pozitív hatás azonban nem volt olyan jelentős, mint a 2,4 D és kinetin jelenlétében.

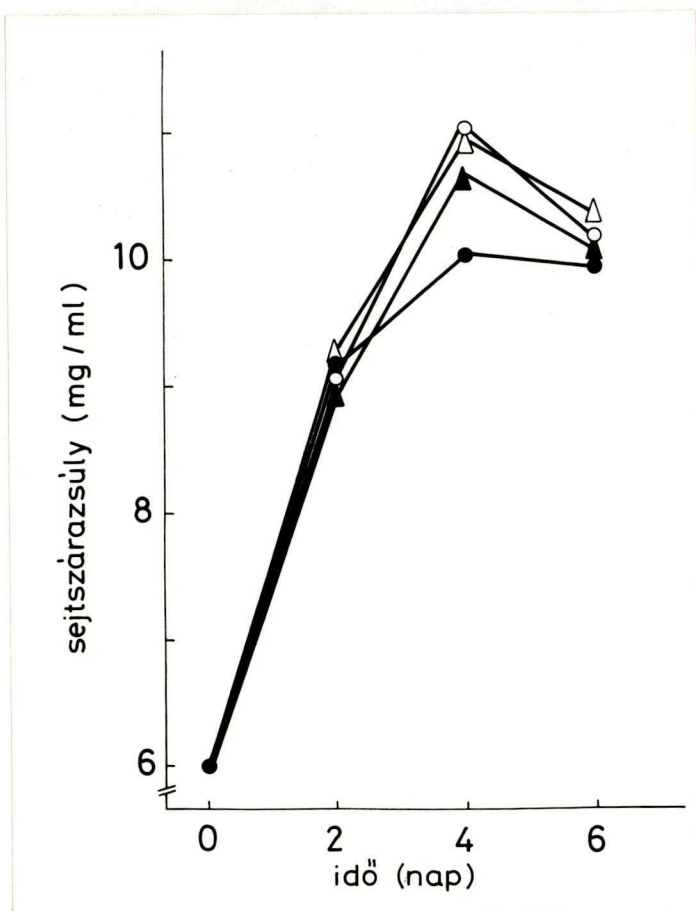
4. Prekurzorok hatása a Datura tenyészetek hioszciamin és szkopolamin produkciójára

Bár a hioszciamin és szkopolamin bioszintézis lehetséges utjai még meglehetősen tisztázatlanok, az azonban már bizonyítottnak vehető, hogy a hioszciamin a tropasav eszterifikációjából származik /LIEBISCH-SCHÜTTE, 1967/.

A tropasav elsődleges prekurzoraként a fenilalanint, a tropin elsődleges prekurzoraként pedig az ornitint tételezik fel az irodalomban.

Kísérletünkben arra kerestünk választ, hogy az általunk fenntartott Datura innoxia sejtkultúrákban, a feltételezett prekurzor aminosavak hozzáadásával növelhető-e a tropán vázas alkaloidok bioszintetikus kapacitása.

Mivel a megelőző kísérleteinkben a legmagasabb alkaloidtartalmat a tenyészetek aktiv növekedé-



9. ábra: Datura sejtkulturák növekedési dinamikája aminosav prekursorokkal kiegészített, MURASHIGE-SKOOG szerint összeállított táptalajban. ●-● MS médium; ○-○ MS + arginin; ▲-▲ MS + fenilalanin; △-△ MS + arginin és fenilalanin.

si periódusának utolsó szakaszában detektáltuk, a prekursor hatás teszteléséhez a késői logaritmikus fázisban lévő tenyészeteket használtuk. Tropasav prekursoraként 200 mg/l fenilalanint, tropin prekursoraként ornitin helyett 200 mg/l arginint adtunk a tenyészetekhez, külön-külön és együttesen. Ismert, hogy az arginin az urea ciklusban egy lépésben képes ornitinné átalakulni.

Eredményeinket a 9. ábrán, valamint a III. és IV. táblázatban foglaltuk össze.

A sejtkulturák növekedési görbéi a kezelést követő 48 óráig megegyeznek a kontrolléval, majd a második nap után a prekursorokkal kezelt sejt-populációkban egy igen gyenge stimulus volt észlelhető, ami a további tenyésztés során fokozatosan csökkent.

A prekursorok azonban nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Az aminosavakkal kezelt tenyészetekben mind a hioszciamin, mind a szkopolamin tartalom a kontroll tenyészeteké alatt maradt.

III. táblázat: Aminósav prekursorok hatása a *Datura innoxia* sejtkultúrák
hioszciamin termelésére.



kezelés	alkaloid- tartalom %	mintavétel időpontja /nap/			
		0	2	4	6
Ms médium	sejt	0,048	0,030	0,162	0,026
	tápoldat	-	0,026	0,058	0,010
MS médium + 200 mg/l arginin	sejt	0,048	0,030	0,013	-
	tápoldat	-	-	0,020	-
MS médium + 200 mg/l fenilalanin	sejt	0,048	0,024	0,028	-
	tápoldat	-	-	0,028	-
MS médium + 200 mg/l arginin + 200 mg/l fe- nilalanin	sejt	0,048	0,015	0,023	-
	tápoldat	-	-	0,014	-

IV. táblázat: Aminósav prekurzorok hatása a Datura innoxia sejtkulturák
szkopolamin termelésére.

kezelés	alkaloid- tartalom %	mintavétel időpontja /nap/			
		0	2	4	6
MS médium	sejt	0,026	0,014	0,058	0,010
	tápoldat	-	0,010	0,023	-
MS médium + 200 mg/l arginin	sejt	0,026	-	0,021	-
	tápoldat	-	-	0,011	-
MS médium + 200 mg/l fenilalanin	sejt	0,026	-	0,008	-
	tápoldat	-	-	-	-
MS médium + 200 mg/l arginin + 200 mg/l fenilalanin	sejt	0,026	-	0,012	-
	tápoldat	-	-	0,006	-

A legmagasabb hioszciamin produkciót a 4. napon a kontroll tenyészetekben detektáltuk /0,162 %/. A prekursorokkal kezelt kulturák sejtjeiben a hioszciamin koncentrációk nem haladták meg a 0,003 %-ot.

A szkopolamin tartalomban is hasonló negatív tendenciák érvényesülnek.

Ezekben a kísérletekben értékeltük először a tenyészetek fermentlevében felhalmozódó tropán alkaloidok mennyiségét.

Figyelemre méltó a kulturák táptalajában detektálható 0,02-0,05 % között ingadozó szkopolamin és hioszciamin tartalom.

A kontroll tenyészeteknél különösen jól megfigyelhető, hogy a táptalajba szekretált alkaloidok mennyisége arányosan változik a sejtek alkaloidtartalmával. A ciklikusság a szekrécióban is megmutatkozik, a 4. napon minden kísérleti kombinációban detektálható volt alkaloid.

5. Kísérletek a sejttenyészetek táptalajának egyszerűsítésére

Vizsgálataink előrehaladásával egyre inkább aktuálissá vált, hogy a tenyészetek fenntartására használt MURASHIGE-SKOOG-féle táptalajt a nagyüzemi fermentoros termelés követelményeihez közelítsük.

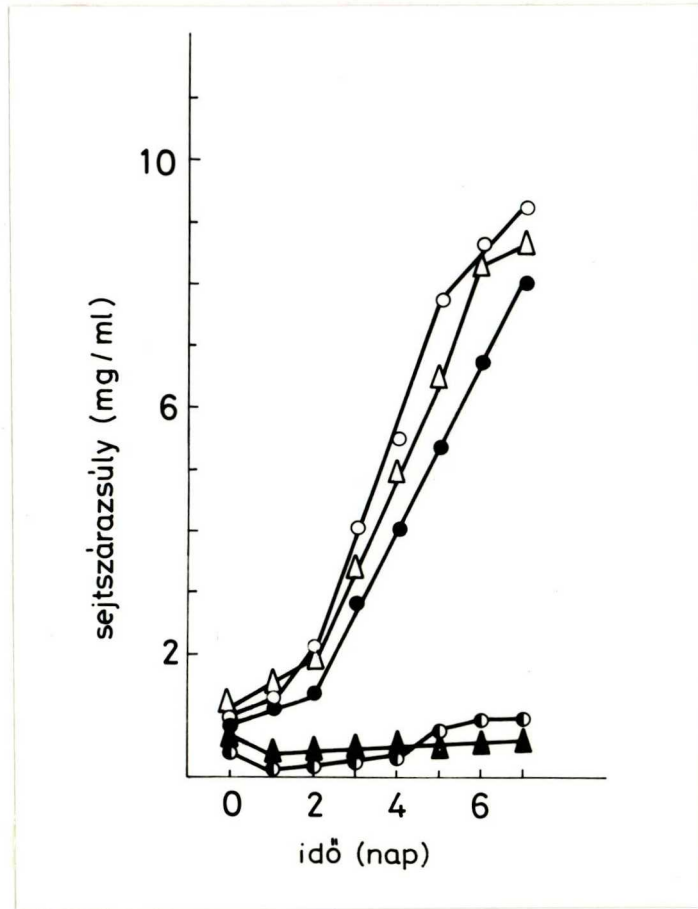
Az MS médium több alkotórésze drága vegyület, ami gazdaságtalanná teheti a nagytérfogatban való tenyésztést. Ezért volt szükség arra, hogy a rendelkezésre álló olcsó anyagok, mint kukorica- és tejpor felhasználhatóságát értékeljük.

Első megközelítésként azt vizsgáltuk, hogy a csak makró elemeket tartalmazó táptalajon, tejpor, illetve kukorica- és tejpor kiegészítés mellett, milyen a sejtek szaporodása és alkaloid termelése.

A kérdés eldöntésére az alábbi kísérleti rendszert állítottuk össze:

I. komplett MS médium

II. makró elemek, 500 mg/l tejpor, 2 %



10. ábra: *Datura innoxia* tenyészetek növekedési intenzitása egyszerűsített táptalajon. o-o I. kísérleti kombináció; ●-● II.; △-△ III.; ●-● IV.; ▲-▲ V.

szaharóz, 1,1 mg/l 2,4 D.

III. makró elemek, 1000 mg/l tejpor,

2 % szaharóz, 1,1 mg/l 2,4 D.

IV. makró elemek, 5 % kukoricafehérje,

1,1 mg/l 2,4 D.

V. makró elemek, 5 % kukoricafehérje,

1,1 mg/l 2,4 D.

V. táblázat: Egyszerűsített táptalajon tenyésztett *Datura* sejtek alkaloidtartalma.

táptalaj	144 órás minták		288 órás minták	
kombináció	hiosz- ciamin %	szkopola- min %	hiosz- ciamin %	szkopola- min %
I.	0,042	0,022	0,186	0,036
II.	0,073	0,052	0,018	0,000
III.	0,062	0,033	0,042	0,037
IV	0,602	0,515	1,150	1,000
V.	0,534	0,406	0,301	0,375

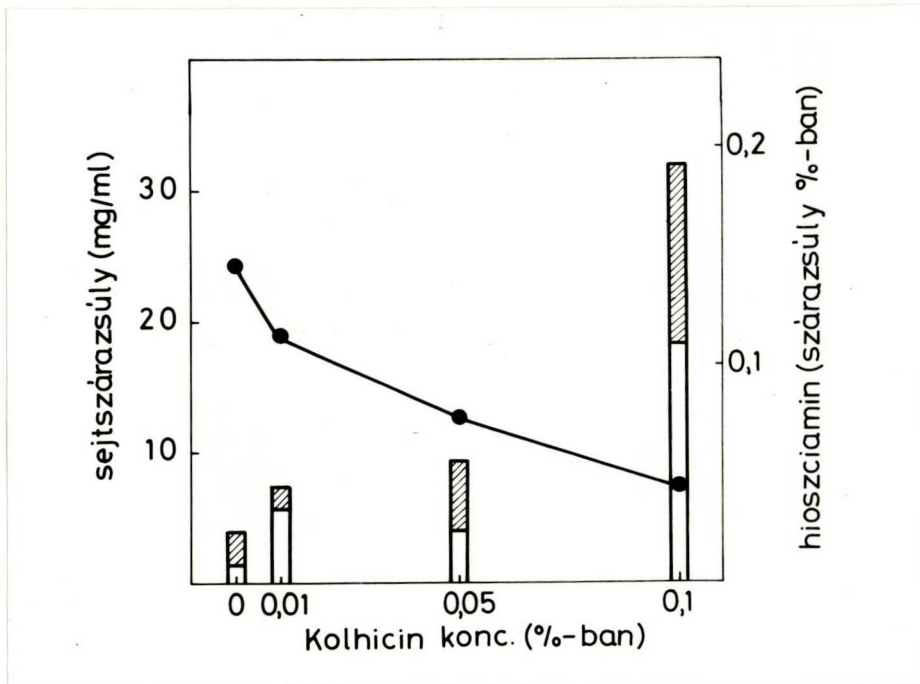
Az egyes táptalaj kombinációkon kapott növekedési görbéket a 10. ábra mutatja.

Látható, hogy míg a tejport tartalmazó táptalajon a sejtek jól szaporodnak, addig a kukoricailekváron növekedés nem mutatható ki. Az alkaloid vizsgálat eredményeit az V. táblázat tartalmazza.

A jól növekedő tenyészetek alkaloid termelésé nem kiemelkedő. Meglepő azonban a kukoricailekváron tenyésztett sejtek igen magas alkaloidtartalma. A gázkromatográfiás vizsgálatok szárazanyagra vonatkoztatva 1 % szkopolamint illetve hioszciamint mutattak ki, amely minden eddig ismert eredményt felülmul.

6. Kolhicin jelenlétében tenyésztett Datura kulturák növekedése és alkaloid szintézise

Az elsőként létrehozott és tanulmányozott Datura sejtvonala termelési szintjét vizsgálva megállapítható volt, hogy hosszabb idejű tenyésztés után lecsökken a sejtekben kimutatható alka-

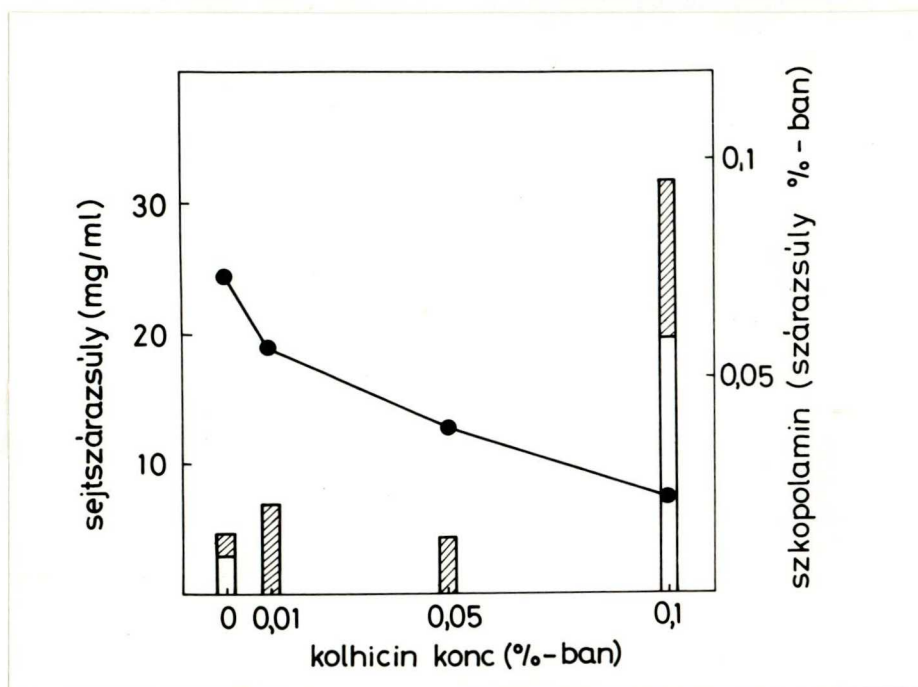


11. ábra: Kolhicint tartalmazó táptalajon tenyésztett *Datura* sejtek hiosciamin produkciója. ▨-sejtek alkaloidtartalma, □-táptalaj alkaloidtartalma, ●-● sejtek növekedése.

loid mennyiség.

A hosszú idejű tenyésztés folyamán megváltozik a sejtpopulációk összetétele, ami az alkaloid termelés csökkenéséhez vezet.

Ezért a további előrehaladás érdekében indokolt-



12. ábra: Kolhicint tartalmazó táptalajon tenyésztett *Datura* sejtek szkopolamin produkciója. ▨-sejtek alkaloidtartalma; □-táptalaj alkaloidtartalma; ●-● sejtek növekedése.

nak látszott magasabb bioszintetikus potenciállal rendelkező sejtvonalak előállításának megkezdése.

E program első feladataként magasabb kromoszóma számú sejtvonalak előállítását kezdtük meg.

A ploidszint növelését kolhicin kezeléssel

kivántuk elérni, ezért a sejteket 0,01, 0,05, 0,1 % kolhicinnel hat napig kezeltük, majd értékeltük a tenyészetek növekedését és alkaloid termelését./11. és 12. ábra/.

A kolhicin koncentrációjától függő növekedés gátlás ellenére a tenyészetek még 0,1 %-os kezelés után is mutattak lassu növekedést.

A kolhicinnel kezelt kulturákban a sejtek morfológiája megváltozott, megnagyobbodtak és proliferációs gyakoriságuk lecsökkent.

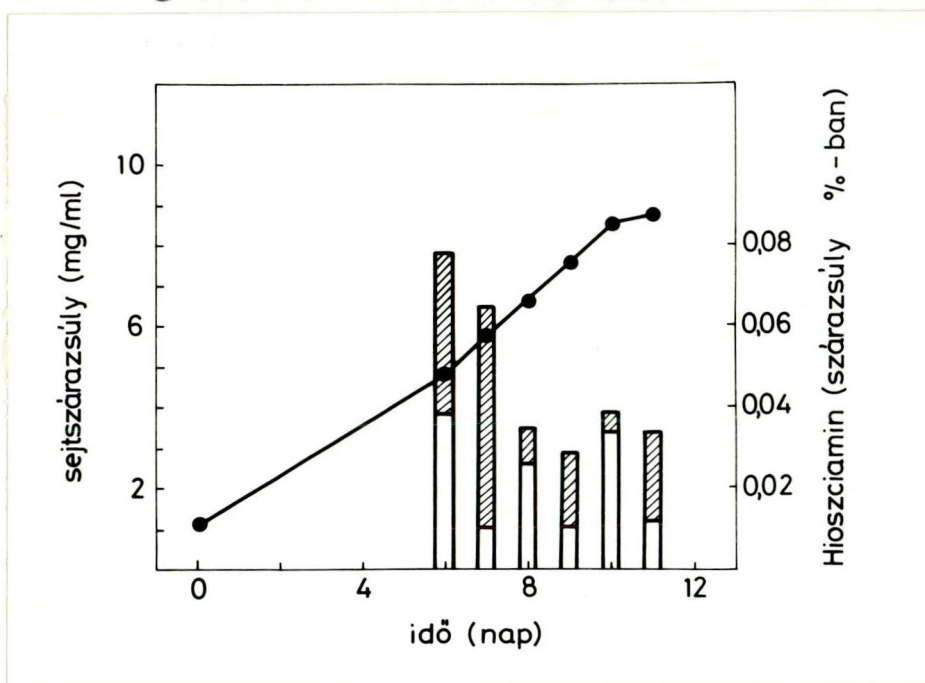
a kolhicin kezelést követően a tenyészetekben szignifikánsan növekedett mind a hioszciamin, mind a szkopolamin mennyisége.

A 0,1 % kolhicin jelenlétében tenyésztett sejt-szuszpenziókban közel négyszer nagyobb alkaloid szintetizáló kapacitás figyelhető meg, mint a kezeletlen kulturákban. Figyelmet érdemel továbbá, hogy a kezelt tenyészetekben a sejtek által kiválasztott alkaloid mennyiség is megnövekedett.

Összmenyiségét tekintve a hioszciamin tartalom 0,04 %-ról 0,28 %-ra, a szkopolamin tartalom pedig 0,025 %-ról 0,136 %-ra emelkedett.

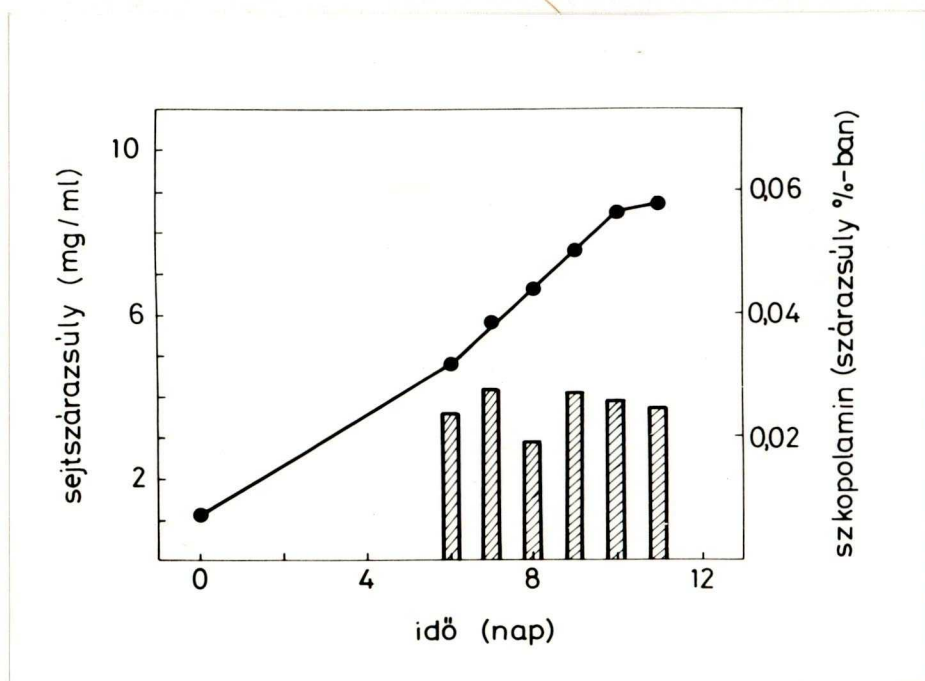
7. Datura innoxia Mill. sejtek kísérleti fermentációja

A rendelkezésünkre álló *Datura innoxia* szuszpenzió kultura különálló sejteket, valamint néhány sejtes, kisméretű aggregátumokat tartalmazott. Így ezek a tenyészetek megfelelő homogenitásuk voltak fermentorban való te-^{nyésztéshez.}



13. ábra: Fermentált *Datura* sejtek növekedése és hioszciamin produkciója.

▨ -sejtek alkaloidtartalma; □ -tápanyag alkaloidtartalma; ●-● sejtek növekedése.



14. ábra: Fermentált *Datura* sejtek növekedése és szkopolamin produkciója. ▨-sejtek alkaloidtartalma; ●-● sejtek növekedése.

A kísérleti fermentációkat BIO TEC FL 110 típusu, 10 liter térfogatú fermentorban végeztük, az alábbi paraméterekkel.

táptalaj	MS médium
keverési fordulatszám	150 rpm
levegőztetés	60 l/óra
pH /induló/	5,6
hőmérséklet	25 C

A sejteket a táptalajjal együtt sterilizált fermentorba inokuláltuk 1,1 mg/ml szárazsúly induló sejtdenzitás mellett.

A tenyészetek növekedési ütemét és alkaloidtartalmát a 13. és 14. ábra szemlélteti.

A fermentált *Datura* sejtek intenzív növekedési szakasza tíz napig tartott, s ez alatt a tenyészetek sejttömege 8-9 szeresére növekedett.

A megelőző kísérletekben egyedül a sejtek alkaloidtartalma került meghatározásra, ugyanakkor néhány szuszpenziókultura táptalajának vizsgálata felhívta a figyelmet arra, hogy a sejtek kimutatható mennyiségű alkaloidot választanak ki a táptalajba.

Ezért a tenyészetek összes alkaloidhozamának értékelésére - a tenyésztés folyamán többszöri mintavétellel - meghatároztuk mind a sejtek, mind a táptalajok hioszciamin és szkopolamin tartalmát.

A kapott adatokat a 13. és 14. ábra foglalja össze.

A sejtekben a hioszciamin termelés maximuma a 6., illetve a 7. napon mérhető, amikor a sejtek még az aktív növekedési fázisban vannak.

A sejtekhez hasonlóan a táptalajban is a 6. napon detektálható a legmagasabb hioszciamin érték, amely a tenyészetek előregedésével fokozatosan csökken.

A totális alkaloid produkció a hatodik napon a legmagasabb, amikor a sejtek szárazanyag súlyára viszonyítva 0,13 % alkaloid szintetizálódik.

A kísérleti fermentáció során a szkopolamin mennyiség 0,02-0,03 % között változott, és ez az alkaloid csak a sejtekben volt kimutatható.

8. Solanum fajok sejtszuszenziós tenyészeinek szteroid alkaloid spektruma

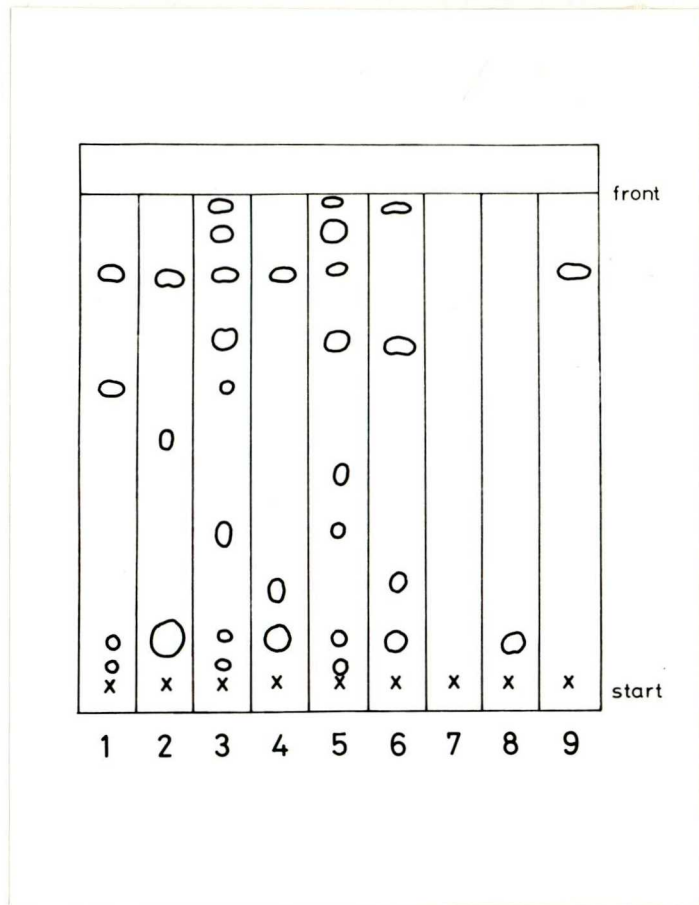
A szteroid hormonok ipari előállításának alapanyagaként felhasználásra kerülő szteroid glükóalkaloidok és szapogeninek kedvező arányban és mennyiségben találhatóak meg a Solana-

ceae család egyes növényeiben.

A sejtenyészetekben történő szteroid hatóanyag előállítás lehetőségének vizsgálatára *Solanum dulcamara*, *Solanum vescum*, *Solanum laciniatum* sejtvonalakat hoztunk létre. A kulturák indítása és fenntartása a *Datura* tenyészeteknél részletezett módon történt. Előkísérleteink során jellemeztük a sejtenyészetek növekedési mutatóit, és értékeltük a szuszpenziókulturákban megtalálható szteroid szapogeninek és glükokaloidok típusát. A MURASHIGE-SKOOG-féle médiumon tenyésztett *Solanum* fajok szuszpenziókulturái több hónapos tenyésztés után érték el a megfelelő növekedési gyorsaságot és a kívánt sejttösszetételt.

A szekunder anyagcsere szempontjából elsőként a *Solanum* speciesek szuszpenziókulturáinak alkaloid spektrumát hasonlítottuk össze az intakt növényekével /15. ábra, VI. táblázat/.

A *Solanum* szuszpenziókulturák szteroid aglükontartalmának jellemzésekor, a tenyésztett sejtekben több, a növényre nem jellemző



15. ábra: Solanum sejttenyészetek szteroid aglúkonjainak vékonyréteg kromatogramja. Futtató szolvens kloroform:metanol 19:1 arányu elegye.

- 1./ Solanum dulcamara sejttenyészet
- 2./ Solanum dulcamara növény
- 3./ Solanum vescum sejttenyészet
- 4./ Solanum vescum növény
- 5./ Solanum laciniatum sejttenyészet
- 6./ Solanum laciniatum növény
- 7./ MURASHIGE-SKOOG-féle médium
- 8./ szolaszodin
- 9./ tigogenin

VI. táblázat: Solanum fajok sejttenyészetekben
kimutatható szteroid aglükonok.

aglükonok			minták sorszáma					
megnevezés	Rf	szin	1.	2.	3.	4.	5.	6.
X ₁	0,03	zöldeskék	+	-	+	-	+	-
szolaszo- din	0,09	téglavörös	+	+	+	+	+	+
X ₂	0,20	téglavörös	-	-	-	+	-	+
X ₃	0,31	lila	-	-	+	-	+	+
X ₄	0,43	zöldeskék	-	-	-	-	+	-
X ₅	0,50	téglavörös	-	+	-	-	-	-
X ₆	0,60	lila	+	-	+	-	-	-
X ₇	0,71	kék	-	-	+	+	+	-
tigogenin	0,84	lila	+	+	+	+	+	-
X ₈	0,93	téglavörös	-	-	+	-	+	-
X ₉	0,98	téglavörös	-	-	+	-	+	+

aglükont mutattunk ki. Az egyes aglükonok azonosítását nehezítette, hogy kevés standard állt rendelkezésünkre, másrészt számos ismeretlen aglükon jelent meg a kromatogrammon.

Szolaszodinnak azokat a foltokat tekintettük, amelyek a szolaszodin standarddal azonos Rf érté-

ket és téglavörös színt mutattak, míg tígogenninek azokat, amelyek 0,84 Rf érték mellett lila színűek voltak.

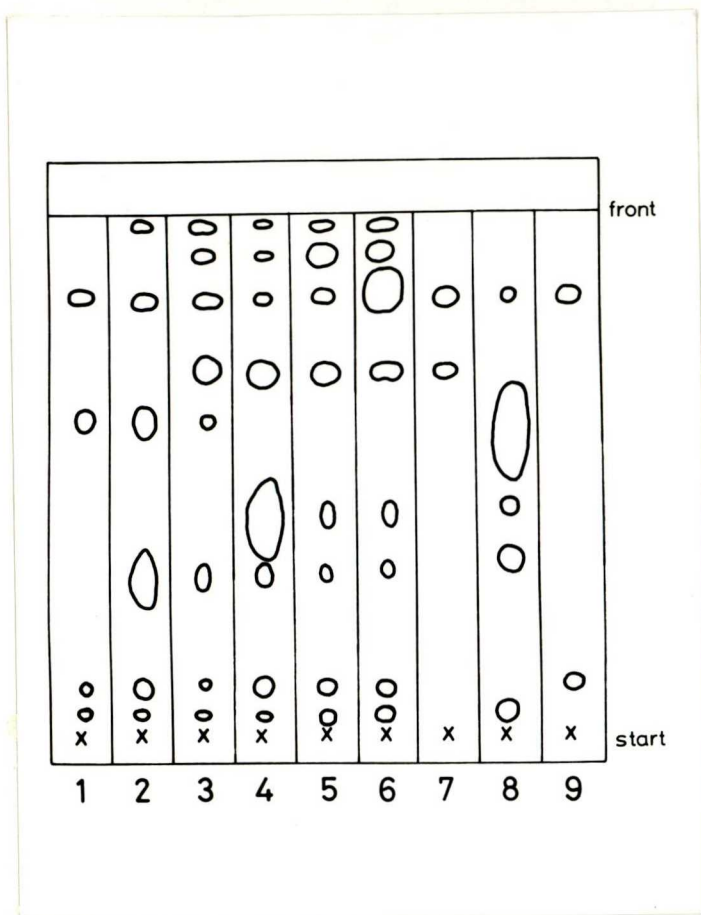
A sejttenyészetekben kimutatható, a növényre nem jellemző alkaloidok száma hét. Az alkaloid spektrum megváltozása különösen a *Solanum ves-cum*, illetve *Solanum laciniatum* tenyészeteknél szembetűnő, ahol hat, illetve öt a növényre nem jellemző alkaloidot mutattunk ki.

A *Solanum* sejttenyészetekkel végzett kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy a sejtkulturák termelnek szteroid alkaloidokat, amelyeknek mennyiségi meghatározása és kémiai szerkezet megállapítása további feladatot jelent.

9. Biotranszformációs kísérletek növényi sejttenyészetekben

Az előző kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a dedifferenciált sejtekből álló *Solanum* szuszpenziós kulturák alap alkaloid és





16. ábra: Koleszterinnel kezelt növényi kultúrák vékonyréteg kromatogrammja. Futtató szolvens kloroform:metanol 19:1 arányu elegye.

- 1./ Solanum dulcamara sejtkivonat
- 2./ koleszterinnel kezelt S. dulcamara kivonat
- 3./ Solanum vescum sejtkivonat
- 4./ koleszterinnel kezelt S. vescum kivonat
- 5./ Solanum laciniatum sejtkivonat
- 6./ koleszterinnel kezelt S. laciniatum kivonat
- 7./ Glycine soja sejtkivonat
- 8./ szolaszodin + koleszterin

szapogenin termelési szintje alacsony. Ezt lényegében nem sikerült javítani a tenyésztési körülmények változtatásával, és új genotípusok bevonásával sem.

Felmerült azonban annak lehetősége, hogy a szuszpenziókultúrákban történő alkaloid termelés helyett, a tenyészeteket különböző szteroidok kémiai átalakítására használjuk fel. Különösen indokolt lehet ez a megközelítés olyan vegyületek esetében, amelyeken szerves-kémiai úton, vagy mikrobiális fermentációval nem lehet a kívánt szerkezeti módosításokat végrehajtani.

A fentiek alapján szükségesnek láttuk az ilyen irányú előkísérletek megkezdését is.

A nagyszámu lehetőség közül elsőként azt vizsgáltuk, hogy a növényi sejttenyészetek felveszik és átalakítják-e a koleszterint.

E célból a kultúrák médiumához 5 % koleszterint adagoltunk és a tenyészetek transzformációs rátáját a hatodik napon értékeltük.

A kísérletben használt növény fajokat, valamint a koleszterin biotranszformációját a 16. ábra

és a VII. táblázat mutatja.

Az alkalmazott koleszterin koncentráció egyik sejtvonal esetében sem okozott növekedés gátlást. A kromatogrammok analízise a következő eredményekre vezetett.

Valamennyi sejtvonal felvette a táptalajból a koleszterint, valamint megállapítható, hogy hatása fajonként eltérő.

A koleszterin jelenlétében tenyésztett *Solanum dulcamara* sejtek alkaloid spektrumában változás történt. A kromatogrammon 0,31 és 0,98 Rf értéknél /UV fényben/ lila, illetve téglavörös színű új foltok jelentek meg. A szolaszodin, valamint a 0,60 Rf értékű alkaloidok szintézisében nagyon gyenge stimulus észlelhető.

A *Solanum vescum* kultúrában koleszterin adagolás után új komponens található Rf 0,43 értékkel, amelynek színe látható fényben kék, UV fényben pedig vörös. A foltnagyság megítélése alapján ennek az anyagnak a szintézise jelentős mértékű.

A *Solanum laciniatum* sejtek szekunder anyagcsere spektrumában a koleszterin adago-

lás semminemű változást nem idézett elő. A sejtek ugyan a koleszterint felvették, de azt tovább nem metabolizálták. Ez jól értékelhető a 16. ábrán látható kromatogramm 6. sávján /koleszterin R_f 0,84/.

A koleszterinnek az aglúkon összetételre gyakorolt hatása legszembetűnőbben a szója tenyészetek esetében mutatkozott meg. A kontroll tenyészetekkel szemben négy új aglúkont detektáltunk, s ezek közül a 0,53 R_f értékű zöldeskék színű anyag mennyisége feltétlenül figyelmet érdemel.

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

1. Datura innoxia Mill. sejtszuspenziós kultúrák tropán alkaloid produkciója

A Datura fajok sejt- és szövettenyészetait alkaloid produkció szempontjából számos kutató vizsgálta, így KLEIN /1960/, CHAN-STABA /1965/, SHAH-KHANNA /1965/, ROMEIKE-KOBLITZ /1970/, KHANNA és mtsai. /1971/ stb..

E közleményekből kiderül, hogy a Datura kallusz- és sejttenyészetekben egyaránt szintetizálódik alkaloid, azonban az in vitro tenyészetek bioszintetikus kapacitása nagyságrendekkel az intact növényeké alatt marad.

A laboratóriumunkban létrehozott Datura innoxia sejt-kultúrák rendelkeznek mindazokkal a paraméterekkel, amelyek egy jó növényi sejtszuspenziós kultúrától elvárható. A tenyész-



tek nagy mennyiségben tartalmaznak intenzíven osztódó különálló sejteket és néhány sejtes aggregátumot. A dedifferenciált sejtek megkészt-szereződésének ideje 2-3 napra tehető.

Az alkaloid produkciós vizsgálataink során elsőnek mutattuk ki, hogy a tenyésztés folyamán a sejtek alkaloid szintézise jól kifejezett ciklikusságot mutat. Mind a hioszciamin, mind a szkopolamin produkció esetében lényegében két termelési csucs figyelhető meg, a hatodik, illetve a tizenkettedik napon.

A 12.napon detektált hioszciamin tartalom figyelemre méltó érték. Ismereteink szerint Datura sejtvonalkunk 5-10 szer magasabb termelési szintet képvisel, mint az irodalomból eddig ismeretes Datura sejtszuspenziós kulturák, és megközelíti a Datura innoxia növény hatóanyag produkcióját /KARNICK-SAXENA, 1970/.

A sejtvonalk bioszintetikus potenciáljának további emelése végett, a későbbiekben szükséges az alkaloid termelés ciklikusságának részletesebb jellemzése, a sejtdenzitás és tro-

pán alkaloid produkció közötti összefüggések feltárása.

2. Növekedési regulátorok hatása a Datura innoxia Mill. sejtkulturák növekedésére és alkaloid termelésére

A Datura kulturákban történő tropán alkaloid képződést számos szerző leírta, azonban a tenyészetek alkaloidtartalma sokkal alacsonyabb, mint az intakt növényeké.

HIRAOKA-TABATA /1974/ véleménye szerint a Datura, valamint Scopolia dedifferenciált kulturák alacsony produktivitásának oka, hogy a szkopolamin, illetve hioszciamin szintézise nagyon erős represszió alatt áll. Atropa és Scopolia kulturák esetében bizonyították, hogy a tropán vázas alkaloidok bioszintézise szignifikánsan emelkedik, ha a kalluszkulturákban gyökér, illetve hajtás redifferenciálódást indukálnak.

A fenti adatok ismeretében, a nagyszámu

lehetőség közül az alábbi faktorokat vizsgáltuk:

- a./ IAA, kinetin és BA kallusz-szinten differenciálódást kiváltó koncentrációjainak hatása,
- b./ hormonok megvonásának lehetséges szerepe,
- c./ antiauxin hatás.

Kísérleteink során nem sikerült sem növényi hormonok jelenlétében, sem azok hiányában a kulturák alkaloid produkcióját pozitívan befolyásolni, és ugyanez mondható el a 2,4,6 T antiauxin hatásáról is.

Alkaloid termelés szempontjából a merisztémagócokat nem tartalmazó tenyészetek kedvezőbbek voltak, mint a specifikusan organizált, passzív növekedéssel rendelkező kulturák.

A negatív kísérleti eredményeink egyik lehetséges oka az, hogy a *Datura* sejtvonalunk magas alkaloid produktivitásu, s ezen a termelési szinten már a differenciálódás indukálásával a tenyészetek bioszintetikus kapacitása

tovább nem növelhető.

Az irodalomban közzétett sikeres próbálkozásokat mind olyan kultúrákkal végezték, melyeknek alkaloid termelési szintje nagyságrenddel alacsonyabb mint a növényé.

Lehetséges azonban, hogy az alkaloidtartalom növekedésének elmaradása arra vezethető vissza, hogy a szerv differenciálódásra optimalizált hormon kombináció az alkaloid produkció tekintetében nem a legkedvezőbb.

3. DMSO hatása a Datura innoxia Mill. sejtkultúrák növekedésére és alkaloid termelésére

TANAKA /1974/ felületaktiv anyagok alkalmazásával eredményesen fokozta a Symphytum officinale sejtkultúrák glutamin produkcióját. Véleménye szerint azért emelhető ily módon a kultúrák bioszintetikus potenciálja, mert elkerülhetővé válik az a negatív feedback gátlás amit a sejtekben felgyülemelő végtermék

okoz.

Ismereteink szerint, ennek ellenére nem vizsgálták a felületaktív anyagokat alkaloid termelő sejtvonalak szintetikus kapacitásának növelésére.

Kísérleteink során valamennyi alkalmazott DMSO koncentráció csökkentette a *Datura* kulturák növekedését, ugyanakkor szignifikánsan emelte mindkét tropán alkaloid mennyiségét. A maximális értéket képviselő 0,3 % hioszcinin azt jelenti, hogy a tenyészet egy literében 13,5 mg alkaloid termelhető. A magas DMSO koncentráció növekedést gátló hatása miatt ez az összprodukció nem a legmagasabb. Termelés szempontjából az 1 % DMSO jelenlétében növekedő tenyészet kedvezőbb, ahol 20 mg hioszcinin szintetizálódik egy liter sejtszuszpenzióban .

A szkopolamin szintézisben is hasonló tendenciák érvényesülnek. Az 1 % DMSO-t tartalmazó tenyészet egy literében 11,6 mg szkopolamin termelődött, amely minden eddig közölt ered-



ményt felülmúl.

A DMSO hatására vonatkozó megállapításaink új kutatási eredmények. Olyan eddig nem vizsgált lehetőségekre mutatnak rá, amelyek pozitívan járulhatnak hozzá a sejttenyészetekkel történő alkaloid termelés problémáinak megoldásához.

4. Prekurzorok hatása a Datura tenyészetek hioszciamin és szkopolamin produkciójára

Számos közlemény számol be arról, hogy az in vitro tenyészetek szekunder anyagcsere kapacitása sikeresen növelhető exogén adagolt prekurzorokkal /CHAN-STABA,1965; TABATA,1971; ZENK,1975 stb./.

KHANNA- NAG /1972/ és HIRAOKA /1973/, viszont aminósav prekurzorokkal Datura kulturák alkaloid produkcióját emelni nem tudta.

Vizsgálataink során exogén fenilalaninnal, illetve argininval a Datura tenyészetek tropán alkaloid mennyiségét növelni nem tudtuk. Minden

kísérleti kombinációban a kezeletlen tenyész-
tek magasabb alkaloid produkcióval rendelke-
tek, mint az aminosavval inkubáltak.

Ugy tűnik, hogy Datura kulturáink alkaloid
szintézisét prekursor hiány nem limitálja, a-
zonban a kérdés egyértelmű eldöntéséhez izo-
tópos vizsgálatokra van szükség.

Ebben a kísérletben értékeltük először a sej-
tek által a táptalajba szekretált hioszciamin
és szkopolamin mennyiségét.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a
sejtek választanak ki a táptalajba alkaloido-
kat, és a ciklikus termelés a szekrécióban is
megmutatkozik.

5. Kísérletek a sejttenyészetek táptala- jának egyszerűsítésére

A növényi sejtek gazdaságos ipari alkal-
mazásának egyik elengedhetetlen feltétele, hogy
a szuszpenziókulturák a jelenleginél olcsóbb
táptalajon legyenek tenyésztethetők.

A költséggráfordítás jelentős hányadát a táptalaj szerves szénforrásai, a növekedési hormonok és vitaminok teszik ki.

Az irodalomban kevés olyan dolgozat jelent meg, amelyben sikeres táptalaj egyszerűsítéséről számolnak be /TAKAYAMA és mtsai., 1977/.

A feladat az egyik legösszetettebb és legnehezebben megoldható problémának látszik, hisz a táptalaj komponenseit úgy kell egyszerűsíteni, hogy a tenyészetek polifériációs gyakorisága és a sejtek szekunder anyagcsere kapacitása ne csökkenjen.

Előkísérleteinkben a könnyen beszerezhető tejpor és kukoricalekvár alkalmazhatóságát vizsgáltuk. A tejpor jelenlétében a *Datura* sejtek növekedési dinamikája megfelelő, kukoricalekvár alkalmazása esetén viszont a tenyészetek osztódása teljes mértékben gátolt.

A gázkromatográfiás analízis eredményei azt mutatták, hogy a jól növekedő tenyészetek alkaloid produkciója nem kiemelkedő, a kukorica-

lekváron tenyésztett sejtek alkaloidtartalma viszont igen magas. A szárazanyagra vonatkoztatott 2 %-nyi össz alkaloid produkció minden eddigi eredményt messze felülmúló.

Természetesen a kukoricalekvár önmagában nem alkalmas a kulturák fenntartására, a magasabb alkaloid értékek okait azonban feltétlenül indokolt tovább vizsgálni. Olyan új eredmények várhatók, amelyek segítségével, a későbbiekben lehetőség adódik a sejtkulturák bioszintetikus folyamatainak ezideig nem ismeretes regulációjára.

6. Kolhicin jelenlétében tenyésztett Datura kulturák növekedése és alkaloid szintézise

Az alkaloid termelés fokozását célzó kísérleteink alapvetően két megközelítésre épülnek. Egyrészt a sejtek anyagcseréjének megváltoztatására, ami a tenyésztési körülmények változtatásával, fiziológiás tényezőkkel érhető el. Másrészt, magasabb alkaloid szintézisre képes

sejtvonalak izolálására, amelyeknél a nagyobb alkaloid produkció genetikailag meghatározott. Az eddigi kísérletek különböző vegyületekről, mint például DMSO, kukoricaalekvár igazolták, hogy jelentősen növelik a sejtek által termelt alkaloidok mennyiségét.

A pozitív hatású kezelések ellenére a sejtek nem érték el a gazdaságos ipari módszer kidolgozásához szükséges termelési szintet, ezért a további előrehaladás érdekében magasabb termelésű poliploid sejtvonalak előállítását kezdtük meg.

Előkísérleteink során beigazolódott, hogy a kolhicinnel kezelt, magasabb kromoszóma számú tenyészetek magasabb bioszintetikus potenciállal rendelkeznek, mint a kezeletlen sejtpopulációk.

A tenyészetek alkaloid termelésének további javításához az szükséges, hogy egy-egy sejt ki szelektálása, felszaporítása után minden sejtvonal termelését külön-külön értékeljük, s így várhatóan a legjobbak kerülnek kiválasztásra és felhasználásra.

7. Datura innoxia Mill. sejtek kísérleti
fermentációja

A növényi sejtek fermentációja meglehetősen rövid multal rendelkezik, azonban az eddigi munkák egyértelműen igazolták, hogy a növényi szuszpenziós kultúrák fermentálhatóságának elvi akadálya nincs.

A Datura tenyészeteket BIO TEC FL 110 típusu bakteriális fermentorban fermentáltuk, és eredményeink a fentiekben foglaltakat megerősítették, a sejtek növekedési dinamikája közel megegyezett a lombikban rázatott tenyészetekével.

A sejtek alkaloidtartalmában és annak ciklikus képződésében azonban eltérés mutatkozik, amely bizonyítja, hogy fermentációs paramétereink további optimalizálásra szorulnak.

8. Solanum fajok szuszpenziós tenyészeteinek szteroid alkaloid spektruma

A Datura tenyészetek tropán alkaloid pro-

dukciójának tesztelése mellett előkísérleteket végeztünk különböző *Solanum* fajok sejtszuspenziós kulturáinak szteroid glükoalkaloid és szapogenin tartalmára,

Az általunk létrehozott *Solanum laciniatum*, *Solanum vescum*, *Solanum dulcamara* sejtkulturák rendelkeznek mindazokkal a paraméterekkel, amelyek egy jól fermentálható kulturától elvárhatók. A sejtvonalak szekunder anyagcsere termékeinek analizisekor beigazolódott, hogy mindegyik sejtvonál szintetizál szteroid alkaloidot, illetve szapogenint, de az intakt növénytől erősen eltérő spektrumban. Ez a jelenség különösen a *Solanum vescum* tenyészeteknél szembetűnő. Néhány általunk nem azonosítható aglúkon mennyisége az előzetes összehasonlítások alapján jelentős. Ezért a tenyészetek termelésének megítéléséhez a továbbiakban szükséges az ismeretlen aglúkok kémiai szerkezetének megállapítása, illetve gyógyszeripari alapanyagként töltendő felhasználhatóságuk értékelése.

9. Biotranszformációs kísérletek növényi sejttenyészetekben.

A növényi sejtekkel nemcsak természetes vegyületeiket lehet termeltetni, hanem kihasználva szintetizáló kapacitásukat, a sejtektől idegen vegyületek kémiai átalakítására is felhasználhatók.

A biotranszformációt a legkülönbözőbb reakció-típusoknál alkalmazzák és gyakorlati vonatkozásban is perspektivikusnak tartják.

Kísérleteink során a *Solanum* és szója tenyészetek biotranszformációs kapacitását vizsgáltuk.

Az exogén adagolt koleszterint valamennyi sejt felvette, és a *Solanum laciniatum* kivételével metabolizálta. A szekunder anyagcsere spektrumában a legszembetűnőbb változást a szója sejt-kultúra esetében észleltük, ahol négy új szteroid típusu anyagot detektáltunk, és ezek közül egynek a mennyisége kiemelkedően jelentős.

Véleményünk szerint a koleszterin bio-

transzformációs előkísérleteink jó kiindulási alapot szolgáltatnak a növényi sejt kultúrákra épülő további biotranszformációs kutatásokhoz. A kiindulási anyagok körültekintő megválasztásával, illetve a keletkezett termékek kémiai szerkezetének meghatározásával lehetővé válna a növényi sejttenyészetek ilyen irányú alkalmazhatóságának megítélése is.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A növényi sejtszuszpénziós kultúrákkal történő in vitro alkaloid szintézis lehetőségeit, illetve a sejttenyészetek bioszintetikus kapacitásának fokozását célzó kísérleteink eredményei az alábbiakban foglalhatók össze.

- 1./ *Datura innoxia* Mill. sejtszuszpénziós kultúránk jó növekedési rátával és magas, a növény szintjét megközelítő tropán alkaloid produkcióval rendelkezik.
A szkopolamin és hioszciamin szintézisben egyaránt ciklikusság figyelhető meg.
- 2./ A kultúrák alkaloid szintetizáló kapacitását redifferenciáció indukálásával nem sikerült fokozni.
- 3./ A sejtekben DMSO hatására szignifikánsan

emelkedik mindkét tropán alkaloid mennyisége.

- 4./ Aminósav prekurzorok exogén adagolásával
Datura kulturáink szekunder anyagcsere kapacitása nem volt fokozható.
A sejtek a táptalajba mérhető mennyiségű hioszciamint és szkopolamint szekretálnak.
- 5./ A táptalaj egyszerűsítésére irányuló kísérleteink során, a kukoricaalekvár jelenlétében tenyésztett sejtekben 2 % összalkaloid szintet detektáltunk, amely minden eddig ismert eredményt felülmul.
- 6./ A Datura sejtek ploidszintjének növelésével fokozható azok alkaloid szintetizáló kapacitása.
- 7./ A növényi sejtek a mikroorganizmusokhoz hasonlóan fermentálhatók.

8./ A Solanum fajok sejtszuszenziós kulturái szintetizálnak alkaloidokat, szapogenineket, azonban az intakt növénytől erősen eltérő spektrumban.

9./ A növényi sejtek testidegen anyagok biotranszformálására is felhasználhatók. Tenyészetek az exogén koleszterint felvették és azt metabolizálták.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

- BARZ, W., 1975: Abbau von aromatischen und heterocyclischen Pflanzeneinhaltsstoffen durch Zellsuspensionskulturen. *Planta Med. Suppl.* 117.
- BÖHM, H., 1977: In: Secondary Metabolism and Cell Differentiation, ed. M. Luckner, L. Nover, H. Böhm, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 104.
- CAREW, D. P., STABA, E.J., 1965: Plant tissue culture: Its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia* 28, 1.
- CHAN, W. N., STABA, E. J., 1965: Alkaloid production by *Datura* callus and suspension tissue cultures. *Lloydia* 28, 55.
- CORDUAN, G., REINHARD, E., 1972: Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 11, 917.

- FURUYA, T., IKUTA, A., SYCHE, K., 1972: Alkaloids from callus tissue of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 11, 3041.
- FURUYA, T., KAWAGUCHI, K., HIROTANI, M., 1973: Biotransformation of progesterone by suspension cultures of *Digitalis purpurea* cultured cells. *Phytochemistry* 12, 1621.
- FURUYA, T., KOJIMA, H., SYONO, K., 1966: Nicotine and anatabine in tobacco callus tissue. *Chem. Pharm. Bull.* 14, 1189.
- FURUYA, T., KOJIMA, H., SYONO, K., 1967: Regulation of nicotine synthesis in tobacco callus tissue. *Chem. Pharm. Bull.* 15, 901.
- GAUTHERET, R., 1934: Culture de tissue cambial. *C. R. Acad. Sci. /Paris/* 198, 2195.
- HABERLANDT, G., 1902: Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math-Naturwiss. kl.* 111, 69.
- HAHLBROCK, K., EBEL, J., ORTMANN, R., SUTTER, A., WELLMANN, E., GRSEBACH, H., 1971: Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension

- cultures of parsley /*Petroselinum hortense*/. *Biochim. Biophys. Acta* 244, 7.
- HEBLE, M., NARAYANASWAMI, S., CHADHA, M., 1968: Solanine in tissue cultures of *Solanum xanthocarpum*. *Naturwissenschaften* 66, 350.
- HEFTMANN, E., 1968: Biosynthesis of plant steroids. *Lloydia* 31, 293.
- HIRAOKA, N., TABATA, M., 1974: Alkaloid production by plants regenerated from cultured cell of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* 13, 1671.
- HIRAOKA, N., TABATA, M., KONOSHIMA, M., 1973: Formation of acetyltropine in *Datura* callus cultures. *Phytochemistry* 12, 795.
- IKUTA, A., SYONO, K., FURUYA, T., 1974: Alkaloids of callus tissues and re-differentiated plant-let in the *Papaveraceae*. *Phytochemistry* 13, 2175.
- ITOKAWA, H., TAKEYA, K., AKASU, M., 1975: Studies on the constituents isolated from the callus of *Cannabis sativa* L.. *Japan J. Pharmacog.* 29, 106.



- KARNICK, C., SAXENA, M., 1970: On the variability of alkaloid production in *Datura* species. *Planta Med.* 18, 266.
- KAUL, B., STABA, E., 1968: *Dioscorea* tissue cultures I. Biosynthesis and isolation of diosgenin from *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cells. *Lloydia* 31, 171.
- KAUL, B., STOHS, S., STABA, E., 1969: *Dioscorea* tissue cultures III. Influence of various factors on diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cultures. *Lloydia* 32, 347.
- KHANNA, P., NAG, T., 1972: Effect of fenylalanin and tyrosine on growth and alkaloid production in *Datura metel* L. tissue cultures. *Indian J. Pharm.* 34, 42.
- KHANNA, P., MOHAN, S., NAG, T., 1971: Antimicrobials from plant tissue cultures. *Lloydia* 34, 168.
- KLEIN, R., 1960: plant tissue cultures a possible source of plant constituents. *Econ Botany* 14, 286.

- KONOSHIMA, M., TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., 1970: Growth and alkaloid production of *Datura* tissue cultures. *Yakugaku Zasshi* 90, 370.
- LIEBISCH, H., SCHÜTTE, H., 1967: Zur biosynthese der tropanalkaloide. *Z. Pflanzenphysiol.* 57, 437.
- LINSMAYER, E., SKOOG, F., 1965: Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100.
- METZ, H., LANG, H., 1966: Verfahren zur Zuechtung von differenziertem Wurzelgewebe. Auslegungsschrift B. D. Patentamt, Nr. 1, 216, 009.
- Mitra, G., 1966: Plant tissue and organ culture I. Biosynthesis of plant constituents. *Bull. Nat. Bot. Gardens* 119, 1.
- MIURA, G., MILLS, S., 1971: The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell cultures of tobacco. *Plant Physiol.* 47, 483.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M., TAMAKI, E., 1971: p-Coumaroylputrescine, caffeoylputrescine, and feruloylputrescine from callus tissue culture of *Nicotiana tabacum*,

- Phytochemistry 10, 1347.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473.
- NAGEL, M., REINHARD, E., 1975: Das äthersche Öl der Calluskulturen von *Ruta graveolens*. II. Physiologie zur Bildung des ätherischen Öles. *Planta Med.* 27, 264.
- NICKELL, L., 1962: Submerged growth of plant cells. *Adv. Appl. Microbiol.* 4, 213.
- NOGUVHI, M., MATSUMOTO, T., HIRATA, Y., YAMAMOTO, K., KATSUYAMA, A., KATO, A., AZECHI, S., KATO, K., 1977: In: *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*, ed. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M. H., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 85-94.
- OGINO, T., HIRAOKA, N., TABATA, M., 1978: Selection of high nicotine-producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. *Phytochemistry* 17, 1907.

- OHTA, S., MATSUI, O., YATAZAWA, M., 1976: Effects of environmental factors on nicotine production in *Nicotiana tabacum* callus tissues. Abst. 5th Symp. Plant Tissue Culture, Sendai, No. 22.
- OKAMATO, A., KAWASAKI, Y., TRAMOTO, T., 1975: Production of Pnax ginseng cells. JAPAN Patent /kokai/ 75-40384.
- PARKER, K., FONTAN, C., KIRK, P., 1963: Rapid gas chromatographic method for screening of toxicological extracts for alkaloids, barbiturates, sympathomimetic amines and tranquilizers. Anal. Chem. 35, 356.
- PETERS, J., WU, P., SHARP, W., PADDOCK, E., 1974: Rooting and the metabolism of nicotine in tobacco callus cultures. Physiol Plant. 31, 97.
- PILGRIMM, H., 1970: Untersuchungen zur Glykosidbildung in pflanzlichen Gewebekulturen. Pharmazie. 25, 568.
- PUHAN, Z., MARTIN, S., 1967: The industrial potential of plant cell culture. In: Progr.

- Ind. Microbiol. vol. 9. D. J. D. Hockenfull, ed. J. A. Church, London. p. 13.
- REINHARD, E., 1974: Biotransformations by plant tissue cultures. In Tissue Culture and Plant Science Street, H. E. /ed/. London: Academic Press, pp. 433-459.
- ROMEIKE, A., KOBLITZ, H., 1970: Gewebekulturen aus Alkaloidpflanzen II. Versuche an Datura- Arten. Die Kulturpflanze, Bad XVIII: Akademie-Verlag, Berlin.
- SAIRAM, T., KHANNA, P., 1971: Effect of phenylalanine on growth and production of alkaloids in Datura tatula tissue cultures. Lloydia 34 170.
- SEIGLER, D., PRICE, P., 1976: Secondary compounds in Plants: Primary function. Amer. Natur. 110, 101.
- SHAH, C., KHANNA, P., 1965: Alkaloid estimation of roots of Datura metel and Datura metel var. fastuosa. Lloydia 34, 170.
- SOLT, M., 1957: Nicotine production and growth of excised tobacco root cultures. Plant. Physiol. 32, 480.
- SOLT, M., DAWSON, R., CHRISTMAN, D., 1960: Biosyn-

- thesis of anabasine and of nicotine by excised root cultures of *Nicotiana glauca*. *Plant. Physiol.* 35, 887.
- SPEAKE, P., McCLOSKEY, P., SMITH, W., 1964: Isolation of nicotine from cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Nature* 201, 614.
- STABA, E., 1963: The biosynthetic potential of tissue cultures. *Development in Ind. Microbiol.* 4, 193.
- STABA, E., 1969: Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. *Recent advances in phytochemistry*, vol. 2. 75-106. North Holland, Amsterdam.
- STABA, E., JINDRA, A., 1968: *Datura* tissue cultures: Production of minor alkaloids from chlorophyllous and nonchlorophyllous strains. *J. Pharm. Sci.* 57, 701.
- STOHS, S., 1969: Production of scopolamine and hyosciamine by *Datura stramonium* L. suspension cultures. *J. Pharm. Sci.* 58, 703.
- STOHS, S., ROSENBERG, H., 1975: Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures.

Lloydia 38, 181.

TABATA, M., 1977: In: Plant Tissue Culture and Its Bio-tecnological Application, ed. Barz W., Reinhard, E., Zenk,,M., Springer-Verlag, Berlin pp. 3-16.

TABATA, M., HIRAOKA, N., IKENOUE, M., SANO, Y., KONOSHIMA, M., 1975: The production of ant-raquinones in callus cultures of Cassia tora. Lloydia 38, 13.

TABATA, M., IKEDA, F., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M., 1976: Glucosylation of phenolic compounds by Datura innoxia suspension cultures. Phytochemistry 15, 1225.

TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M., 1974: Pigment formation in callus cultures of Lithospermum erythrorhizon. Phytochemistry 13, 927.

TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M., 1976: The production and regulation of shikonin derivatives in cultured cells. Abst. 12+4 Phytochem. Symp. Japan, Kyto, pp. 1.

TABATA, M., HIRAOKA, N., 1976: 1976: Variation of

- alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. *Physiol. Plant.* 38, 19.
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., 1971: Alkaloid production in the cultures of some solanaceous plants. In: *Les cultures de Tissue de Plantes*, pp. 389-402, Le Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- TABATA, M., YAMATO, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M., 1972: Organization and alkaloid production in tissue culture of *Scopolia parviflora*. *Phytochemistry* 11, 949.
- TABATA, M., YAMATO, H., HIRAOKA, N., MARAMOTO, Y., KONOSHIMA, M., 1971: Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. *Phytochemistry* 10, 723.
- TAKAYAMA, S., MISAWA, M., KO, K., 1977: *Physiol. Plant.* 41, 313.
- TANAKA, M., MACHIDA, Y., MUKAI, N., MISAWA, M., 1974: Accumulation of glutamine by suspension cultures of *Symphytum officinale*. *Agr. Biol. Chem.* 38, 987.

- TEUSCHER, E., 1973: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. *Pharmazie*. 28, 6.
- VAGUJFALVI, D., HELD, GY., TÉTENYI, P., 1966: Solanum-fajok semleges és bázisos szapogenezisnek rétegekromatográfiás vizsgálata. *Bot. Közl.* 53, 125.
- WAGNER, R., VOGELMANN, H., 1977: In: Plant Tissue Culture and Bio-technological Application, ed. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York pp. 245.
- WANG, C., STABA, E., 1963: Peppermint and spearmint tissue culture II. Dual carboy culture of spearmint tissues. *J. Pharm. Sci.* 52, 1058.
- WEST, F., MIKA, E., 1957: Synthesis of atropine by isolated roots and rootcallus cultures of *Beladonna*. *Bot. Gaz.* 119, 50.
- WHITE, P., 1934: Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in liquid medium. *Plant Physiol.* 2, 585.
- VOGELMANN, H., BISCHOF, A., PAPE, D., WAGNER, F., 1978: In: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods, ed. Alfermann, A.

- Reinhard, E., GSF-BPT report, Munich pp. 130.
- ZENK, M., EL-SHAGI, H., STOCKIGT, J., WELLER, E.,
DEUS, B., 1977: In: Plant Tissue Culture and
Its Bio-technological Application. ed. Barz,
W., Reinhard, E., Zenk, M., Springer-Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York pp. 27-43.
- ZENK, M., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U., 1975: Antra-
quinone production by cell suspension cultu-
res of *Murinda citrifolia*. *Planta Med. Suppl.*
79-101.
- ZENK, M., EL-SHAGI, H., ULBRICH, B., 1977: Produc-
tion of rosmarinic acid by cell-suspension cul-
tures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften*
64, 585.



A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK
JEGYZÉKE

BA	Benziladenin
2,4 D	2,4 Diklor-fenoxiecetsav
IAA	Indol- β -ecetsav
NAA	Naftoxiecetsav
2,4,6 T	2,4,6 Triklor-fenoxiecetsav
MS	MURASHIGE-SKOOG-féle médium

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Dr. Dudits Dénes tudományos főmunkatársnak értékes tanácsaiért, valamint munkám során nyújtott hasznos elméleti és gyakorlati segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki Kubala Ferenc főosztályvezetőnek, és Dr Zsupán Kálmán Alkaloida Vegyészeti Gyár /Tiszavasvári/ főosztályvezető helyettesének, hogy a vezetésük alatt álló Farmakológiai Laboratóriumban lehetővé tették számomra a dolgozat elkészítését.

Dr. ifj. Máthé Imrének a Datura és Solanum növényanyag biztosításáért, Dr. Farkas Tibor. tud. főmunkatársnak a gázkromatográfiás analízisért, az SZBK Genetikai Intézet dolgozóinak pedig értékes szakmai és technikai segítségéért mondok köszönetet.

