

## V. BIOTECHNOLÓGIAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA NÖVÉNYI EREDETŰ HATÓANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

A növényi speciális anyagcsere termékei fontos alapanyagforrást jelentenek az élelmiszer-, kozmetikai- és gyógyszeripar számára. Ezek a vegyületek a legtöbbször csupán kis mennyiségben találhatók meg a növényekben, felépítésük pedig a legtöbbször bonyolult, így szintézis útján történő ipari előállításuk – néhány kivételtől eltekintve - nem megoldott. az analitikai módszerek fejlődésével ugyanakkor egyre nagyobb számú növényi anyagcseretermék feltárására és megismerésére van lehetőség.

A biotechnológiai módszerek és molekuláris biológiai ismeretek bővülésével párhuzamosan új lehetőségek nyíltak a növényi sejtek univerzális és speciális anyagcseréjének megismerésére laboratóriumi körülmények között, így egyes sejt és szövetkultúrák ma már reális lehetőséget nyújtanak bizonyos növényi vegyületek ipari méretű előállításához is.

- **A biotechnológia fogalma**

A *biotechnológia* a biokémia, mikrobiológia és műszaki tudományok olyan integrált alkalmazása, melynek célja a makro- és mikroorganizmusok, szervek, szövetek, tenyésztett **növényi, v. állati** sejtek, vagy azok bármely részének technológiai felhasználása. Tehát nem egyszerű diszciplína, hanem komplex tudományterület, amelyben az innovációs súlypontokat a molekuláris biológia, a fiziológia (mikrobiális, stb.), az immunológia és a *bioengineering* tudomány képezi.

Az elkövetkező évtizedekben a gyógyszeripar számára nyílik a legtöbb lehetőség, hogy a biotechnológia eredményeit a termelésben hasznosítsa.

A biotechnológia napjainkban egyre gyakrabban hallható kifejezés. A szó magyar eredetű, EREKY KÁROLY használta először 1919-ben megjelent könyvében minden olyan eljárást megnevezésére, amellyel különféle termékeket élő mikroorganizmusok segítségével állítanak elő.

Klasszikusnak tekinthető alkalmazása már korábban elterjedt a gyógyszeriparban, az élelmiszer- és takarmányiparban. Ezek az eljárások főleg a mikrobiális fermentációra, erjesztési folyamatokra alapultak.

A molekuláris biológiai ismereteink nagyarányú bővülésének eredményeként a biotechnológia fogalma is új értelmezést kapott. Így vált a genetikai információ megismerése és befolyásolása, a genetikai manipuláció a tudományág alapvető részévé. A génszabványi módszerek felfedezésével vált elérhetővé a gének szerkezetének feltárása, idegen gének adott genomba történő beépítése és mesterséges gének előállítására. A modern értelemben vett biotechnológiai eljárásokban tehát valamilyen cél érdekében genetikai programjukban megváltoztatott élő szervezetek, vagy azok sejtjei vesznek részt. Ezen belül a növényi biotechnológia a növények, növényi sejtek és sejtorganelumok *in vitro* manipulációját, örökítőanyaguk célzott megváltoztatását, és az így kialakított új képességeik technológiai felhasználását jelenti a gyakorlat számára.

Az *in vitro* szövettenyésztés módszereinek fejlődése jelentős változást hozott a növénygenetikában is. Fontos kiemelni az ún. **totipotencia** fogalmát, ami azt fejezi ki, hogy egy adott növény minden sejtje rendelkezik a fajra jellemző teljes génkészlettel. A növények izolált sejtjei megfelelő *in vitro* körülmények között képesek a dedifferenciációra és a korábbi differenciációnak megfelelő genetikai programjuk represszállására, továbbá különböző behatásokra (pl. növényi növekedésszabályozó anyagok, hormonok) a differenciáció programjának újbóli aktiválására, ami végső soron a teljes növény regenerációjához vezethet. Ennek eredményeként lehetőség adódik egy genetikailag plasztikus, teljes génkészlettel rendelkező növényi sejt előállítására, mely manipulálható, képes idegen gének felvételére és saját genomba történő integrációjára, és akár teljes értékű, ún. transzformáns növényre regenerálható.

Sok nehézséget okoz, hogy a kultúrák gyakran egyáltalán nem, vagy csak igen csekély mértékben szintetizálják az intakt növényre jellemző másodlagos anyagcseretermékeket. Pedig az izolált kultúrák morfogenetikus képessége alapján feltételezhető a fajra jellemző bioszintetikus potenciál is. A kérdés csak az, tudjuk-e úgy befolyásolni a potenciálisan minden szintézisre genetikailag kódolt sejteket, hogy olyan biokémiai szintézist

végezzenek, mint az intakt növényben, annak morfológiai környezete és fiziológiai korrelációja nélkül.

- **Magasabb rendű növények, mint gyógyszerforrások**

A magasabb rendű növények még napjainkban is fontos forrásai számos, terápiás szempontból jelentős vegyületnek, melyek a speciális növényi anyagcsere termékei. A legtöbb ilyen, farmakológiailag aktív vegyület szerkezete bonyolult, gazdaságos ipari előállítása kémiai szintézissel pedig nem megoldott. Így például a morfint és kodeint a mák (*Papaver somniferum*) éretlen, vagy érett tokterméséből állítják elő, a kinint és kinidint a kínafa (*Cinchona sp.*) kérgéből, a szívre ható glikozidokat pedig a *Digitalis*, *Convallaria* és *Strophantus* fajokból nyerik. A paraszimpatolitikus hatású tropán alkaloidokat (hioszciamin, szkopolamin) is különböző, *Solanaceae* családba tartozó fajokból (pl. *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Datura* és *Duboisia*) vonják ki. Addig, míg ezek és a hozzájuk hasonló vegyületek nem lesznek helyettesíthetők szintetikusán előállított társaikkal, a növényi sejtekben végzett bioszintézis marad az egyetlen járható út. Ezen vegyületek köre pedig egyre bővül, mivel a különböző növényfajok részletes kémiai vizsgálata napjainkban is egyre több, fiziológiásan aktív vegyület jelenlétét tárja fel. Vannak azonban olyan vegyületek, melyeket korábban növényekből nyertek ki, napjainkban pedig már szintetikus úton is sikerül nagyobb mennyiségben előállítani. Ilyenek pl. a koffein, teofillin, teobromin, efedrin, pszeudoefedrin, emetin, szalicilsav, papaverin. Nem szabad azonban elfelejteni azt sem, hogy számos esetben a növényi termékek szolgálnak mintaként a hasonló terápiás hatású, szintetikus úton előállított vegyületek számára.

A növényi eredetű szerves vegyületeket két nagy csoportba lehet sorolni annak alapján, hogy az univerzális (primer), vagy a speciális (szekunder) anyagcsere termékei (lásd részletesen III. fejezet). Az univerzális anyagcsere termékei a legtöbb növényben általánosan megtalálhatók és a sejtek alapvető anyagcsere folyamataiban vesznek részt (pl. enzimek, szénhidrátok). A speciális anyagcsere termékei kémiaiilag az univerzális anyagcsere termékeiből vezethetők le, elterjedésük azonban jóval korlátozottabb a növényvilágon belül [Verpoorte, 2000]. Általában egy ún. taxonómiai csoporton (rokon

fajok, növénycsaládok, nemzetségek) belül fordulnak elő nagyobb mennyiségben. Az univerzális anyagcsere termékeivel ellentétben nincs közvetlen szerepük a növekedésben, fejlődésben. Ezek a vegyületek sokszor ökológiai szempontból fontosak, így a növény túlélése miatt lényegesek. A speciális anyagcsere termékei pl. elősegítik a megporzó állatfaj(ok) odacsalogatását, környezeti stressz-hatásokhoz való kémiai alkalmazkodás eredményei, vagy védelmi funkciót látnak el mikroorganizmusokkal, rovarokkal, magasabb rendű növényevőkkel, vagy akár más növényekkel szemben is. Ezen feladatok jellegéből következik tehát, hogy az ide sorolható vegyületek jelentős részének fiziológiailag aktívnak kell lennie. A speciális anyagcsere termékei a növényekben legtöbbször csak kis mennyiségben vannak jelen, szintézisük és raktározásuk speciális sejtekben, szövetekben történik, az egyedfejlődés meghatározott szakaszában. Ennek következtében az ilyen vegyületek extrakciója, izolációja és tisztítása nehézségekbe ütközik. A vinkrisztin nevű alkaloid előállítása pl. *Catharantus roseus*-ból (rózsameténg) történhet. A növény egésze kb. 0,0003-0,0005% alkaloidot tartalmaz, ami azt jelenti, hogy átlagosan 500 kg levél feldolgozására van szükség 1g vinkrisztin előállításához. A daganatterápiában alkalmazott taxol 1g-jának előállításához pedig közel 10kg *Taxus brevifolia* kéreg feldolgozására van szükség.

A legtöbb olyan növényt, melyből különböző gyógyszervegyületeket állítanak elő, nagy kiterjedésű szabadföldi műveléssel termesztik. A terméshozam változékonysága (pl. időjárás, kártevők hatására) és más okok, például a termőhely és a feldolgozóipari háttér esetleges nagy távolsága, a magasabb szintű minőségbiztosítás elérése, a változó piaci igények gyorsabb kielégítése, vagy szélsőséges esetben akár a vadon termő növényfajok veszélyeztetettsége (kihalása) azonban szükségessé teszik üzemi szintű termelési módszerek keresését. A növényi sejt- és szövettenyésztési módszerek is szóba jöhetnek alternatív lehetőségként, mivel a fentebb említett gondok jelentős részére megoldást kínálnának. Számos laboratóriumban folynak vizsgálatok *in vitro* növénykultúrákkal az univerzális és speciális anyagcsere jobb megismerése, a környezeti hatások metabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából. Az így kapott eredmények azonban a legtöbbször

nem hasznosulnak rövid időn belül a gyógyszeriparban, mivel az ipari alkalmazások során más szempontokat is figyelembe kell venni. Abban az esetben például, ha az adott kultúrát valamilyen farmakológiailag aktív vegyület előállítására akarjuk alkalmazni meg kell vizsgálni, hogy a kérdéses vegyület mennyisége, a tenyészet produktivitása alapján gazdaságosan alkalmazhatók-e a biotechnológiai módszerek.

Figyelembe kell venni, hogy a különböző organizálódási szintű *in vitro* kultúrák hatóanyag termelése jelentősen fokozható:

- *génműködés befolyásolásán keresztül, pl. - hormonális regulációval, prekursor aminosavak segítségével, - az univerzális anyagcsereutak befolyásolásával, vagy*
- *géntranszformációval*

## V. 1. NÖVÉNYI SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

### • Táptalajok összetétele

Az *in vitro* fenntartott növények és izolált növényi részek anyagcsereje alapvetően megegyezik az intakt, természetes környezetükben megtalálható növényekével, metabolizmusuk célja tehát a szerv és a szervezet fenntartása, növekedésének, fejlődésének biztosítása. Ehhez számos fizikai (pl. hőmérséklet, fény, pH, páratartalom, oxigénellátás) és kémiai (pl. szénhidrátok, makro- és mikroelemek, vitaminok, növekedésszabályozó anyagok) feltételre van szükség. Ez utóbbiakat mesterségesen összeállított közegek, a táptalajok biztosítják. Alapvető követelmény ugyanakkor a sterilitás, mivel az izolált növényi részek alig rendelkeznek akár baktericid, akár fungicid hatással, a tenyésztés során keletkező sebfelületek nagyon könnyen fertőződhetnek, és az alkalmazott tápközegek a mikroorganizmusok növekedése számára is nagyon kedvezőek.

A különböző táptalajok összeállításánál figyelembe kell vennünk mind az általános, mind pedig az adott kultúra esetében felmerülő speciális igényeket. Figyelembe kell venni azt is, hogy egyes táptalaj összetevők nem sterilizálhatók magas hőmérsékleten, autoklávban (pl. egyes növényi hormonok, antibiotikumok). Ezeket steril szűrővel kell az előzetesen már

megfelelően sterilizált tápközeghez adagolni. A táptalajok szilárdításához általában agart használunk 0,6-1,0% mennyiségben.

**V.1. táblázatban** két gyakran alkalmazott táptalajt, a magas sótartalmú **MS** és az alacsony sótartalmú **B5** közeget mutatjuk be, feltüntetve a legfontosabb összetevőket.

V.1. táblázat **MS** (Murashige és Skoog 1962) és **B5** (Gamborg és mtsai 1968) táptalajok összetétele

	<b>B5</b>	<b>MS</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1650
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	-
KNO <sub>3</sub>	2500	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	150	440
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	250	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	-
<b>Mikroelemek</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	6,2
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	13,2	22,3
ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2	8,6
KI	0,75	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	27,85
Fe-kelát	28	-
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	-	37,25
Inozit	100	100

Nikotinsav	1	0,5
Piridoxin · HCl (B <sub>6</sub> )	1	0,5
Tiamin · HCl (B <sub>1</sub> )	10,0	0,1
pH	5,7	5,7

*Táptalaj összetevők:*

**Víz:** a táptalajok legalapvetőbb összetevője. Mivel összetétele nem állandó (pl. oldott ásványi és szerves anyagok) táptalajkészítéshez – különösen laboratóriumi körülmények között – bidesztillált vizet kell használni.

**Ásványi elemek, szervesen oldható sók:** kisebb mennyiségben szükségesek, a sejtek anyagcsere folyamataiban (bioszintézis, enzim aktiváció) azonban alapvető szerepet töltenek be. A tenyészetek számára szükséges mennyiségük alapján makro- ill. mikroelemeknek nevezzük őket.

**Makroelemek** (pl. C, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Cl, Na): leggyakrabban alkalmazott koncentrációjuk 15-1000 mg/l között változik.

A *nitrogén* a fehérjeszintézishez, az enzimekhez, a pirimidin- és purinbázisok szintéziséhez egyaránt elengedhetetlen. A nitrátok formájában felvett nitrogént a növénynek redukálnia kell. Szervesen oldható nitrogén sók mellett nitrogénforrásként ammónia, kazein, pepton, élesztőkivonat és aminosavak is alkalmazásra kerülhetnek.

A *foszfor* szervesen oldható, vagy szerves foszfátok formájában jut be a növényi szervezetbe. Alapvető szerepe van a foszfolipidek (membránok), nukleotidok, nagyenergiájú foszfátkötések kialakításában.

A *ként* szulfátok formájában veszi fel a növény, melyet a nitrátokhoz hasonlóan szintén redukálni kell a beépítéshez. A fehérjeszintézishez, heterociklusos vegyületek (pl. tiamin) bioszintéziséhez nélkülözhetetlen.

A *kálium* a növényekben legnagyobb mennyiségben megtalálható kation. Meghatározza az ozmotikus potenciált, valamint számos enzim aktivációjához is szükséges.

A *kalcium*, mely szintén ionos formában jut be a növényekbe, a sejtmembránok fontos alkotóeleme, hiányában rendellenes sejtosztódás figyelhető meg.

A *magnézium* a sejtosztódásban játszik fontos szerepet, hiányában gátolt a fehérjeszintézis.

A gyökerek fejlődése gátolt, ún. koralloidosak lesznek

A *vas* a redoxi átalakulásokhoz, RNS-, proteinszintézishez szükséges, a kloroplasztiszokban található nagyobb mennyiségben. Hiányában gátolt a növekedés. A táptalajhoz citrát, ill. EDTA komplex formájában célszerű adagolni, mert így könnyebben felvehető.

**Mikroelemek** (pl. Mn, Zn, I, Mo, Cu, Co, B, Ni): leggyakrabban alkalmazott koncentrációjuk 0,002-1 mg/l között változik. Legtöbbször enzimek specifikus és nem specifikus aktiválásában játszanak fontos szerepet.

**Szénhidrátok:** a leggyakrabban alkalmazott szénforrás a szacharóz, de más cukrok is felhasználhatók, mint pl. fruktóz, glükóz, vagy maltóz (alkoholok, szerves savak kisebb jelentőségűek). Alkalmazott koncentrációjuk általában 0,5% és 3,0% között változik.

**Vitaminok:** A legtöbb tenyészet növekedéséhez és életben maradásához exogén vitamint igényel. Ezek hatása a környezeti viszonyoktól, a szövet típusától és differenciáltságától egyaránt függ, már kis koncentrációban is jelentős fiziológiás hatást fejtenek ki. Kiemelkedő szerepe van a B vitamin csoport tagjainak (pl. tiamin, bioflavin, nikotinsav, pantoténsav, piridoxin).

**Növényi növekedésszabályozó anyagok** (fitohormonok): a különböző tenyészetek két csoportra oszthatók az alapján, hogy maguk képesek ezen vegyületeket előállítani, vagy külsőleg kell őket a tápközeghez adagolni. Hatásukat több tényező befolyásolja (pl. az objektum faja, a tenyészet típusa, az alkalmazott koncentráció). Hatásuk lehet serkentő és gátló egyaránt, attól függően, hogy milyen koncentrációban és arányban alkalmazzuk őket. Három fő csoportba sorolhatók: auxinok, gibberellinek és citokininek.

- **Auxinok** (pl. NES, IES, 2,4-D): lehetnek a szövetekben keletkező természetes



vegyületek, valamint szintetikus molekulák is. Növekedéshez szükséges koncentrációjuk alapján erős ( $10^{-10}$ - $10^{-8}$  g/l), közepes ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  g/l) és gyenge ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  g/l) aktivitásúnak tekinthetjük őket. Hatásaik szerteágazóak, fokozzák pl. egyes enzimek aktivitását, befolyásolják a nitrogén anyagcserét, fokozzák a cukrok felvételét és hasznosítását, valamint jelentősen befolyásolják a tenyészetek morfogenetikus képességét.

- **Gibberellinek:** számtalan típusuk ismert ( $GA_1$ - $GA_{32}$ ), hatásuk az auxinokéhoz hasonló, azokkal együttműködve fejtik ki azt. Legismertebb a  $GA_3$ , melyet gibberellinsavként (GS) ismerünk.

- **Citokininek** (pl. kinetin, adenin, benzil-adenin): az auxinokhoz hasonlóan egyaránt lehetnek természetes és szintetikus vegyületek. Közös tulajdonságuk, hogy a sejtek osztódását aktiválják. Elősegítik a merisztémák differenciálódását, szervek iniciációját és szabályozzák a levelek öregedését is.

A növekedésszabályozók koncentrációja gyakran kritikus tényező a másodlagos anyagcseretermékek felhalmozódásában. A növekedésszabályozók típusa, koncentrációja, és egymáshoz viszonyított aránya (auxin-citokinin arány) nagymértékben képes a növények növekedését, így a hatóanyagok termelését és felhalmozódását is befolyásolni.

**Egyéb anyagok:** ezek a természetben megtalálható (kókusztej, vadgesztenye és kukorica éretlen termésének kivonata, élesztő, malátakivonat, kazeinhidrolizátum, paradicsomlé, alma, szilva és barack kivonata), vagy szintetikus anyagok (1,3-difenil-urea, 2-benzotiazol-oxi-ecetsav) nem esszenciálisak a tenyészetek számára, a szövetek növekedésére és fejlődésére azonban hatással vannak. Egymással, illetve fitohormonokkal kombinálva alkalmazzák őket, ezért hatásaikat is a fentebb tárgyalt tényezők befolyásolják.

*Citosztatikumok* (pl. 6-merkaptó-purin, ciklofoszfamid): gátolják a növények növekedését, a sejtosztódást.

*Abszizinsav:* jellegzetes endogén gátló vegyület, mely rügyek, hajtások nyugalmi szakaszának előidézésében, levelek, virágok és termések leválásában játszik szerepet.

*Etilén:* pl. az almában is keletkezik, elősegíti az érést.

*Antibiotikumok:* általában hatástalanok, de egyesek lehetnek serkentők (bacitracin), vagy

inhibitorok is (kloramfenikol, terramicin).

A biomassa és hatóanyag termelés fokozása elérhető pl. a tenyésztési körülmények optimalizálásával, a legmegfelelőbb tápközeg kiválasztásával, a környezeti feltételek módosításával (pl. hőmérséklet, fény), avagy prekursorok (pl. aminosavak) alkalmazásával. A hatóanyagok fitokémiai analízisével, kromatográfias vizsgálatával (VRK, HPLC, LC-MS/MS, GC, GC-MS, stb.) kiválaszthatóak a legtöbb és legkedvezőbb összetételű hatóanyag produkcióval rendelkező egyedek/klónok.

- **Néhány, elterjedten alkalmazott *in vitro* tenyészet típus**

Számtalan különböző sejt és szövetkultúra ismert, melyek közül néhány típus kiemelt jelentőségű a különböző, gyógyászatiilag fontos növényi metabolitok előállítás szempontjából.

### **Kallusz kultúrák**

Az un. kalluszsövet homogén, parenchimatikus sejtek halmaza (**V.1. ábra**), mely egyaránt kialakítható differenciálatlan és differenciált növényi szövetekből. Ezeknél a tenyészeteknél általában az a cél, hogy a későbbiekben ne alakuljon ki szöveti differenciáció, illetve ne induljon meg organizáció. Kallusz kialakulhat spontán módon, de előidézhető pl. növényi hormon(ok) adagolásával is.



V.1. ábra ***Datura innoxia*** levéleredetű kalluszsövet  
(2, 4 és 6 hetes, MS táptalajon sötétben nevelve)

Gyakorlatilag minden növényi szervből és szövetből létrehozhatók ilyen tenyészetek, melyek osztódó sejteket tartalmaznak. Különböző stimulusok hatására (pl. növényi hormonok, hőmérsékletváltozás) szöveti differenciáció, organizáció váltható ki bennük, így a növényi sejtek totipotenciáját kiaknázva elméletileg akár a kiindulási növény pontos másához is eljuthatunk. Figyelembe kell venni azonban, hogy a kalluszkultúrák fenntartásához általában elengedhetetlen exogén hormonadagolás következtében ezen tenyészetek genetikai stabilitása csökken. Szilárd és folyékony táptalajon egyaránt tenyészthetők.

### **Sejtszuspenziós kultúrák**

Ezeket általában kallusz tenyészetekből létesítik, úgy, hogy a kallusz darabokat növényi hormon(ok)at is tartalmazó folyékony tápközegbe helyezik át és abban tenyésztik tovább. Mivel a sejtszuspenziós tenyészetek optimális esetben különálló sejtekből, vagy néhány sejtből álló halmazokból állnak, az egyes sejtek igen érzékenyek a környezeti hatásokra (pl. mechanikai behatások). Ezért a tenyészeteket először Erlenmayer lombikban, rázógépen történő kevertetéssel (az oxigén ellátás biztosítása érdekében) szaporítják fel, majd ezt követően fokozatos léptéknövelés során optimalizálják a tenyésztés körülményeit.

A sejtszuspenziós kultúrákat egyre elterjedtebben alkalmazzák növényi metabolitok termeltetésére különböző méretű **bioreaktorokban**, melyeknek számos típusa ismert (pl. mechanikus kevertetésű, lapátos reaktorok, buborékoszlopos reaktorok, air-lift reaktorok és forgótartály reaktorok). Tekintettel arra, hogy a növényi sejtek igen érzékenyek a nyíróerőre (**V.2. táblázat**), az un. **air-lift** levegőztetésű fermentorok alkalmazása az előnyösebb. A sejtszuspenziós tenyészetek nagy előnye, hogy a sterilitás szigorú biztosítása mellett, akár éveken keresztül, folyamatos üzemeltetéssel is fenntarthatók.

A fermentáció során az az elsődleges cél, hogy egységnyi táptalajban minél nagyobb tömegű sejtet, ill. minél több, minőségileg minél egyöntetűbb hatóanyagot állítsunk elő. Az

ipari mennyiségben történő előállítását a következő három hatóanyag esetében oldották már meg:

- shikonin (*Lithospermum erythrorhizon*-ból),
- berberin (*Coptis japonica*-ból),
- szangvinarin (*Papaver somniferum*-ból).

Az **V. 2. ábrán** egy ipari méretű, hagyományos működésű keverőlapátos bioreaktort mutatunk be.

**V.2. táblázat A mikrobiális és növényi sejtek jellemzői a fermentációval kapcsolatban**

<i>JELLEMZŐK</i>	<i>MIKROORGANIZMUS</i>	<i>NÖVÉNYI SEJT</i>
<i>méret</i>	<i>2 μ</i>	<i>&gt; 10 μ</i>
<i>deformálódási hajlam</i>	<i>nem érzékeny</i>	<i>érzékeny nyíróerőre</i>
<i>víztartalom</i>	<i>75 %</i>	<i>&gt; 90 %</i>
<i>kettőződési idő</i>	<i>&gt; 1 óra</i>	<i>napok</i>
<i>levegőztetés</i>	<i>1-2 vvm</i>	<i>0.3 vvm</i>
<i>fermentációs idő</i>	<i>napok</i>	<i>hetek</i>
<i>termékfelhalmozódás</i>	<i>közepes</i>	<i>vakuólum</i>
<i>mutáció</i>	<i>lehetséges</i>	<i>haploidok szükségesek</i>
<i>átlagár (\$) (MS medium)</i>	<i>8-9/m</i>	<i>65-70/m</i>

A bioreaktorban történő tenyésztés előnye, többek között, hogy a

- tápközeg lecserélhető
- prekursor folyamatosan adagolható,
- rendszer biokonverzióra alkalmas,
- folyamatos tenyésztés megvalósítható



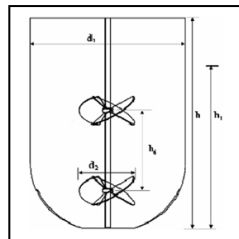
V.2. ábra 1 m<sup>3</sup>-es ipari szintű fermentor

A fermentációs technológiában is kezd már teret hódítani az egyszer használatos steril ballonok alkalmazása. Az **egyszer használatos bioreaktorokban** a hagyományos fermentációs paraméterek is mérhetők és szabályozhatók. A berendezés speciális nyírásmentes lapátkeverővel van ellátva, így növényi sejtfermentációra kiválóan alkalmas (V.3. ábra).

Az egyszer használatos, műanyag bioreaktor laboratóriumi méretű változata hullámzó mozgatású, mely szintén alkalmas a nyíróerőre érzékeny sejtek fermentálására.



V.3. ábra  
**BIOSTAT® STR (Sartorius)**  
nagyobb léptékű,  
egyszer használatos  
műanyag bioreaktor  
speciális nyírásmentes  
lapátkeverővel.



- **Immobilizált növényi sejt kultúrák**

Az immobilizáció - a sejtek nem szabadon lebegnek a folyadékban, hanem valamilyen nagy felületű hordozó közegen (pl. alginát-gél) kötjük meg őket- következtében jelentős mértékben nő a sejtdenzitás és tovább fokozható a metabolitok termelése. Az immobilizált sejtek sok esetben messze felülmúlják a szuszpenziós kultúrák produkcióját: például egy 5 literes, mikroporozus anyagot tartalmazó fixágyas reaktor, egy 50-100 l-es szuszpenziós reaktornak felel meg. Ennek köszönhetően a fermentor üzemeltetése sokkal gazdaságosabb lesz.

A késői stacioner fázisban levő kultúrát megfelelő mátrixban rögzítve, folyamatos üzemű, átáramoltatott tápközegű reaktorban termeltetve a kívánt hatóanyagot, az eljárásnak több előnye is van:

- többszörösére emelhető a metabolitok mennyisége,
- a tápközeg bármikor módosítható és lecserélhető sejtvesztés nélkül,
- a prekursor folyamatosan adagolható,
- a végtermék folyamatosan eltávolítható a táptalajból,
- a rendszer biokonverzióra alkalmas,
- a sejtek hosszú időn át megőrzik életképességüket,
- nagy sejtdenzitás érhető el
- valódi folyamatos tenyésztés is megvalósítható.

**Az *in vitro* növényi tenyészetek előállításával és fenntartásával** (az izolált növényi részek sterilizálásával, a szilárd és folyékony táptalajok készítésével, a növénykultúrák tenyésztésével, stb.) foglalkozó gyakorlati útmutatók részletesen megtalálhatóak Szőke és munkatársai (2009) „Növényi drogok farmakobotanikai és fitokémiai vizsgálata” c. papíralapú tankönyvében.

## **V. 2. NÖVÉNYI SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZETEK, MINT FARMAKOLÓGIAILAG AKTÍV VEGYÜLETEK FORRÁSAI**

Világszerte kiterjedt kutatásokat kezdtek a gyógynövényekből nyert *in vitro* kultúrák segítségével a növényi hatóanyagok előállítási módszereinek a kidolgozására, ellenőrzött és reprodukálható

módon. Várható, hogy a gyógyszeripari célra használt természetes anyagok gyártására egyre többször fognak pl. sejt kultúrákat alkalmazni. Számos laboratóriumban folytatnak kiterjedt kutatásokat annak érdekében, hogy olyan biotechnológiai módszereket fejlesszenek ki, amelyek a gyógynövénykultúrákban - a biomassza termelés fokozásán túlmenően - a speciális/szekunder anyagcseretermékek bioszintézisét is előnyösen befolyásolják; növelik a gyógyászati szempontból fontos hatóanyag mennyiségét, ill. a kívánt irányban módosítják a hatóanyag spektrumát (a fermentációs gyógyszeriparban és a szabadföldi gyógynövénytermesztésben egyaránt).

Az első, és azóta is egyik legjelentősebb sikert Japánban érték el a sikonin ipari szintű előállításának kidolgozásával. A vegyületet, mely egy naftokinon pigment a *Lithospermum erythrorhizon* gyökerének kérge tartalmazza nagyobb mennyiségben. Antibakteriális és szövetgranulációt indukáló hatásai miatt a növény gyökere a fekélyterápiában és különböző sérülések esetén nyert alkalmazást. Európában a sikonint, valamint sztereoizomejét (alkanin) mint színezéket használja fel az élelmiszeripar. Nyersanyagként korábban csupán a 3-4 éves növények gyökerét lehetett felhasználni, melyek sikonin tartalma ekkor is mindössze 1-2% volt. Sejtszuspenziós kultúrák létrehozásával, valamint a tenyésztési körülmények optimalizálásával és magas sikonin tartalmú sejt vonalak szelekciójával mindössze 23 napos tenyésztési periódus alatt sikerült elérni a 15-20%-os hatóanyag tartalmat (**V.3. táblázat**). Az ipari szintű gyártástechnológia alkalmazását követően a vegyület ára jelentősen csökkent, az értékesíthető mennyiség viszont növekedett.

A hatóanyagok fitokémiai analízisével, kromatográfiai vizsgálatával (VRK, HPLC, LC-MS/MS, GC, GC-MS, stb.) kiválaszthatóak a legtöbb és legkedvezőbb összetételű hatóanyag produkcióval rendelkező egyedek/klónok.

**V.3. táblázat Növényi sejt kultúrák által előállított speciális anyagcseretermékek**

Alkotórész	Növényfaj	Hozam (% szárazsúly)		Kultúra Típusa *
		Kultúra	Növény	
Sikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1,5	S
Ginzenozid	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	C
Antrakinonok	<i>Morinda citrifolia</i>	18	0,3	S



Ajmalicin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,0	0,3	S
Rozmaringsav	<i>Coleus blumeii</i>	15	3	S
Ubiquinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,036	0,003	S
Dioszgenin	<i>Dioscorea deltoides</i>	2	2	S
Benzilizokinolin alkaloidok	<i>Coptis japonica</i>	11	5-10	S
Berberin	<i>Thalictrum minor</i>	10	0,01	S
Berberin	<i>Coptis japonica</i>	10	2-4	S
Antrakinonok	<i>Galium verum</i>	5,4	1,2	S
Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	3,4	2,0	C
* S = sejtszuspenziós kultúra, C = kallusztanyészet				

A fenti táblázat olyan növényi kultúrákat foglalt össze, melyek a kiindulási növényvel összehasonlítva magasabb koncentrációban tartalmazznak terápiás szempontból jelentős speciális anyagcseretermékeket (pl. ginzénózid, dioszgenin, rozmaringsav).

Az alábbiakban csupán néhány, közismertebb terápiás csoportot és vegyületet kiragadva példaként szeretnénk röviden bemutatni az elért eredményeket és a még megoldásra váró problémákat.

### **Morfinán alkaloidok**

A *Papaver somniferum* L. (mák) a legjelentősebb gyógynövények egyike, mely több, gyógyászati szempontból fontos alkaloidot (pl. morfin, kodein) tartalmaz. A kodein széles körben használt köhögéscsillapító. A morfin jelentős analgetikum. Addiktív karaktere miatt azonban csupán az erős fájdalmak csillapítására alkalmazzák, pl. végstádiumban lévő daganatos betegeknél. A *P. somniferumot* számos országban termesztik az alkaloidok előállítására céljából (pl. India, Irán, Törökország). A növény alkaloidtartalma a hajtáscsúcson elhelyezkedő éretlen toktermésben a legjelentősebb. Gyűjtik az éretlen toktermést, továbbá a bemetszésekor kifolyó és megszilárduló tejnedvet (ópium). Az éretlen termés átlagosan 0,62% morfint, 0,11% kodeint és 0,03% tebaint tartalmazhat (szárzsúlyra vonatkoztatva).

A *Papaver bracteatum*, mely Indiában és Oroszország déli vidékein honos, jelentős tebain tartalommal rendelkezik (2,5 - 3,5%). Ezzel szemben kodein és morfin tartalma nem jelentős. A

tebain kémiai úton kodeinné alakítható, így a növény gyógyászati nyersanyagként fontos szerepet kaphat.

Mindkét mákfaj (*P. somniferum*, *P. bracteatum*) alkaloidtartalma a toktermés tejnedvében (latex) a legmagasabb, 28 - 53%. Mindkét faj különböző típusú *in vitro* kultúráit előállították a világ számos laboratóriumában. A kalluszkultúrákat vizsgálva megállapították, hogy azok hosszú ideig megőrzik regenerációs képességüket. Így pl. teljes növényt, hajtást, vagy akár gyökeret még több éven keresztül fenntartott kalluszsövetből is sikeresen regeneráltak különböző növényi hormonok alkalmazása mellett. A *P. somniferum*, *P. bracteatum* kalluszkultúrák alkaloidtartalmának tanulmányozása ellentétes eredményekhez vezetett, mivel egyes szerzők nem tudtak alkaloidokat kimutatni, míg mások morfint, kodeint és tebaint is detektáltak *P. somniferum* *in vitro* szövetekben, ill. a tebaint *P. bracteatum* kalluszsövetekben. A tenyészetek alkaloidtartalma optimális esetben is a növényben mért értékek felét, harmadát érte el csupán. Megállapították, hogy mind a kallusz-, mind pedig a sejtszuspenziós tenyészetek szöveti differenciációja hatással van az alkaloidprodukcóra, mivel mértékének növekedésével együtt nő az alkaloidtartalom is. A kultúrák kora szintén befolyásoló tényezőnek bizonyult. Minél hosszabb ideje fenntartott az adott kalluszsövet, annál kisebb az alkaloidok mennyisége. A folyékony táptalajon tenyésztett sejtszuspenziós kultúrákban sem voltak – a kalusztenyészetekhez hasonlóan – a korábban is említett alkaloidok minden esetben kimutathatók.

A szuspenziós tenyészetekkel biotranszformációs vizsgálatokat is végeztek. Így pl. egyes kultúrák a kívülről adagolt kodeinon prekursorból kodeint állítottak elő. Az átalakítás hatékonysága 60% - 66% között változott. Egyéb prekursorokat megvizsgálva igazolást nyert továbbá, hogy a tenyészetek alkaloidmetabolizmusa az intakt növényétől eltérő is lehet. A biotranszformációs képesség még azon sejt kultúráknál is megfigyelhető, amelyek eredetileg nem tartalmaznak morfinán alkaloidokat.

A kalusz- és sejtszuspenziós kultúrákból regenerált növények szöveteit Kamo és Mahlberg által vizsgálva, azok alkaloidtartalma szintén elmaradt az intakt növényekétől. Érdekes, hogy a főalkaloid ezekben a tenyészetekben nem a morfin, hanem a kodein volt, ami a metabolizmus bizonyos fokú megváltozására utal.

Összefoglalva elmondható, hogy az eddigi eredmények alapján a mák szövettenyészetek még nem alkalmazhatók gazdaságosan morfinán alkaloidok előállítására. A kutatások azonban

intenzíven folynak, mivel az ipari szintű termelés földrajzi helytől független előállítást tenne lehetővé. Fontos szempont, hogy az ENSZ határozata szellemében tovább lehetne csökkenteni a szabadföldi, gyógyászati célú máktermesztést és ezzel párhuzamosan akár az illegális ópium előállítást is.

### **Szívre ható glikozidok**

A szívre ható glikozidok a gyógyszerkincs terápiás szempontból igen értékes növényi eredetű vegyületei. Legismertebb forrásuk a *Digitalis lanata* és *D. purpurea*, melyek kardenolid típusú (5-tagú, egyszeresen telítetlen laktongyűrűt tartalmazó) szívglükozidokat termelnek. Az említett növények leveleiben legmagasabb a szívglükozid tartalom. Szívelégtelenség kezelésére leggyakrabban az  $\alpha$ - és  $\beta$ -acetildigitoxint, valamint a  $\beta$ - metildigoxint használják. Különböző *Digitalis* fajokat termesztnek szabadföldi körülmények között pl. Hollandiában, Magyarországon és Argentínában is a szívglükozidok ipari előállítása céljából.

Kallusztenyészetek vizsgálata során megállapították, hogy az eddig alkalmazott módszerek mellett a tenyészetek kardenolid tartalma elmarad a növényekétől. A kultiválási idő emelkedésével pedig ez a mennyiség is tovább csökkent. A kalluszsövet eredete (pl. szár, levél) szintén hatással van a hatóanyagprodukciónak. Érdekes megfigyelés, hogy egyes hajtás eredetű *D. lanata* és *D. purpurea* kalluszkultúrákban sikerült kardenolidokat kimutatni, holott az eredeti hajtástenyészetek nem tartalmaztak ilyen vegyületeket. A *D. purpurea* kalluszsövetek vizsgálata során megállapították, hogy az átoltások során fokozatosan csökken a hatóanyag-produkció, mely pl. hajtás regenerációt követően ismét megemelkedik. A megvilágítási idő növelése a klorofill tartalom emelésén túl jótékony hatásúnak bizonyult a szívglükozid tartalomra is. A táptalaj összetétele (hormonok, cukrok, vitaminok, nitrogénforrás, stb.) hatással van a kultúrák regenerációs képességére, pl. hajtások kialakulására, ezen keresztül pedig a szívglükozidok produkciójára. Japán kutatóknak sikerült 3 literes fermentorban tenyésztett *D. purpurea* szövetekben - melyek hajtás regenerációjára képesek - magas kardenolid (pl. digitoxin) koncentrációt mérni. Ezek a tenyészetek azonban több kultivációs időt igényelnek, mint a sejtszuspenziós kultúrák, így a módszer jelenleg még nem hatékony.

A *de novo* szintézis mellett - a kereskedelmi szempontból szintén ígéretesnek tűnő - biotranszformációs folyamatokat is vizsgálták. Egyes szerzők beszámoltak *D. lanata* és *D.*

*purpurea* kallusztényészetekről, melyek a progeszteront pregnánná alakítják. A kardenolidok biotranszformációját vizsgálva megállapították, hogy *Digitalis* sejtekben végbemegy az aglikonok glikozilációja. Sejtszuspenziós kultúrákat alkalmazva mind különböző prekursor molekulákat, mind pedig különböző szívglikozidokat adagoltak, mint kiindulási vegyületeket.

Az egyik legígéretesebb módszernek tűnik a digitoxin digoxinná történő átalakítása *D. lanata* sejtek segítségével, mivel a digoxin terápiás alkalmazása felülmúlja a digitoxinét. A növények levelei nagyobb mennyiségű digitoxint tartalmaznak, így ezek felhasználhatók nyersanyagként. A biotranszformáció során a  $\beta$ -metildigitoxinból metildigoxin keletkezik legnagyobb mennyiségben. Az eljárást üzemi körülmények között is vizsgálták, immobilizált sejtek alkalmazásával, ipari méretű fermentorban. Bár ipari szintű termelés még nem történik ezzel a módszerrel, ezen az úton haladva azonban hamarosan elérhetővé válhat, hogy terápiás szempontból kevésbé fontos vegyületeket értékes szívglikozidokká alakíthassanak.

### **Daganat ellenes vegyületek**

A magasabb rendű növényekben számtalan daganatellenes hatású vegyület fordul elő, ezek koncentrációja azonban a legtöbb esetben rendkívül alacsony. Ennél fogva nem csupán előállításuk, hanem pusztán már kimutatásuk is nehézségekbe ütközik. A termőhely és az éghajlati, időjárási viszonyok is jelentősen befolyásolják a hatóanyagtartalmat, viszont pl. a megfelelő klinikai vizsgálatok elvégzéséhez is nagy mennyiségű, rendszeresen rendelkezésre álló nyersanyagforrásra van szükség. Az előbbi okok miatt is jelentős erőfeszítéseket tesznek a szövettényészetek esetleges alkalmazására ezen a területen. Bár még sok problémát kell megoldani (pl. stabil sejtvonalak előállítása, táptalaj optimalizálás), néhány elért eredmény mégis igen ígéretes a jövőbeni alkalmazás szempontjából.

A tumorgátló vegyületek kimutatására számos biológiai módszert dolgoztak ki, melyek elsősorban a daganatos sejtek kultúráira kifejtett citotoxikus hatások vizsgálatán alapulnak. Ezek a vizsgálatok azért alapvető fontosságúak, mert rendkívül sok növényi kivonatot kell megvizsgálni az esetleges hatás szempontjából. Így pl. az 1980-as évek elején az USA-ban elvégzett tanulmány során közel 114 000 különböző növényi kivonatnak csupán 4,3%-a bizonyult daganatgátló hatásúnak. A növényekből izolált különböző tumorelleses vegyületek rendkívül

változatos szerkezetűek (tanninok, terpének, lignánok, flavonoidok, szaponinok, proteinek, alkaloidok, stb.) és az újabb vizsgálatok eredményeként számuk feltehetően tovább növekszik.

### **Vinblasztin és vinkrisztin**

A vinblasztin és a vinkrisztin a *Catharanthus roseus* dimér indol alkaloidjai, melyeket több daganatos betegség terápiájában alkalmaznak. A vinkrisztint többek között akut leukémia, limfomák kezelésére használják. A vinblasztin a Hodgkin kór terápiájában kap szerepet. Készítményeik igen drágák, mert előállításuk növényből történik, mely csak igen kis mennyiségben (0,0005%, szárazsúlyra vonatkoztatva) tartalmazza az alkaloidokat. Sejt kultúrákkal történő előállításukat ez ideig még nem sikerült megoldani, mivel a kallusz- és sejtszuspenziós kultúrák *de novo* alkaloidszintézise szintén alacsony szintű.

A vinblasztin molekula két monomer alkaloidból katarantinból és vindolinból épül fel. A vindolin koncentrációja az intakt növényben kb. 0,2%, mely jelentősen meghaladja a katarantin tartalmát, így ára is alacsonyabb. *C. roseus* sejtszuspenziós kultúrák alkalmazásával – táptalaj optimalizációt követően – már sikerült 150mg/l, majd 230mg/l katarantin produkciót elérni 100 l-es airlift fermentorokban. A katarantin monomert *C. roseus* sejtekből előállított enzim és vindolin alkaloid hozzáadásával igen jó hatásfokkal sikerült 3',4'-anhidrovinblasztinná alakítani, mely a vinblasztin közvetlen prekursora. Japán kutatók, különböző szervesetlen sók adagolásával optimalizálták az anhidrovinblasztin-vinblasztin enzimátikus átalakítását, melynek hozama így elérte az 50%-ot.

### **Podofillotoxin**

A podofillotoxin a lignánok közé tartozó vegyület, melyet a *Podophyllum peltatum* -ből izoláltak. Számos vírus ellen hatékony, továbbá a bőr rákos betegségeinek kezelésében is alkalmazható. Félszintetikus származékát (etopozid) egyes agydaganatok, lymphosarcoma és a Hodgkin kór terápiájában használják fel.

A *P. peltatum* kalluszkultúrákkal végzett kísérletek során, a táptalaj-összetevők és környezeti paraméterek változtatásával sikerült elérni a 0,69%-os podofillotoxin hozamot, mely igen ígéretes eredmény a további vizsgálatokhoz.. Megfelelő hormonkombináció alkalmazásával (kinetin és 2,4-diklórfenoxi ecetsav) optimalizálni lehetett a hatóanyag-produkciót. Más hormonok

adagolásával gyökérbésozódést indukáltak. A képződő gyökereket izolálták a kalluszoszövetről, majd hormonmentes, folyékony táptalajon tenyésztették tovább. Az így fenntartott *in vitro* gyökerek podofillotoxin tartalma elérte az 1,6%-ot (szárazsúlyra vonatkoztatva), mely az anyanövényben mért érték hatszorosa.

*P. hexandrum* sejtuszpenziós kultúrák tápközegébe podofillotoxin prekuzort (koniferil-alkohol és  $\beta$ -ciklodextrin komplexe) adagolva sikerült elérni a 0,013%-os hozamot. Ezzel szemben prekuzor adagolása nélkül csupán 0,003%-os podofillotoxin tartalmat értek el. A koniferil alkohol  $\beta$ -D-glükozidja (koniferin) még hatásosabbnak bizonyult, ennek alkalmazásával a tumorelles lignán hozama 0,055% volt. Más szerzők beszámoltak arról, hogy a tápközegbe adagolt növényi hormonok (2,4-D, gibberellinsav, 6-benzilaminopurin) hatására a *P. hexandrum* kalluszoszövetek 4'-demetil-podofillotoxin és podofillotoxin-4-O-glükozid tartalma elérte az anyanövényben mért értéket.

## **Taxol**

A *Taxus* nemzetség nyolc fajt és két hibridfaját tartalmaz melyek mindegyikét, mint mérgező növényt ismertünk. Alkalmazása a daganatterápiában az 1960-as években elért eredmények alapján indulhatott meg, amikor is megállapították, hogy a kéreg kivonata citotoxikus hatású leukémiás sejtekben és számos tumor növekedését gátolja. A kivonat aktivitásáért felelős vegyületet (taxol) amerikai kutatóknak sikerült izolálni 1971-ben. A taxol - mely egy toxikus diterpén – gátolja a sejtosztódást, ami a sejtciklus blokkolásának (a G2/M fázisban) eredménye. Klinikai vizsgálatok alapján egyes nőgyógyászati és emlődaganatok, továbbá tüdő, fej és a nyaki daganatok kezelésében bizonyult különösen aktívna, így a felhasználás oldaláról nagy igény jelentkezett a vegyület iránt.

1994-ig csupán a növény, a *T. brevifolia* kérgéből állították elő a hatóanyagot. Az előállítás problémáját jellemzi, hogy 5000-10000kg kéreg szükséges 1kg taxol kinyeréséhez, mely csupán mintegy 500 beteg kezeléséhez elegendő (1g taxol előállításához 2-3 öreg fát kell kidönteni). A jelenlegi igények mellett csupán kb. 10 évre lenne elegendő a jelenlegi *Taxus* állomány. A növény rendkívül lassú növekedése és az alacsony taxol tartalom miatt azonban szükségessé vált további források kutatása. Annak ellenére, hogy 1994-ben sikerült megoldani a taxol totálszintézisét, eddig ez sem bizonyult gazdaságosna, mivel a folyamat bonyolult és viszonylag alacsony

hozamú. Jelenleg a legígéretesebb megoldásnak a taxol prekursorokból történő szemi-szintézise és a növényi sejt kultúrák alkalmazása tűnik.

Számos kutatóhelyen hoztak létre különböző kallusz és sejtszuszpenziós kultúrákat a taxol-produkció tanulmányozása céljából. *T. cuspidata* kalluszkultúrákban pl. sikerült elérni a szárazsúlyra vonatkoztatott  $0,02 \pm 0,005\%$  taxol tartalmat. *T. cuspidata* sejtszuszpenziós kultúrákat előállítva, majd a sejteket üvegszál mátrix segítségével immobilizálva a taxol tartalom  $0,012 \pm 0,005\%$  volt.

Mára már több, szabadalmi védelem alatt álló eljárást dolgoztak ki a taxol *in vitro* előállítására. A sejtszuszpenziós kultúrák előnye, hogy a képződő taxolt a sejtek a tápközegbe választják ki (1-3mg/l), ahonnan az viszonylag könnyen kinyerhető. Mind a kallusz, mind pedig a szuszpenziós kultúrák esetében részletesen tanulmányozták a környezeti feltételek (hőmérséklet, megvilágítás, stb.) és a táptalaj-összetevők (pl. szénhidrátok, aszkorbinsav, citromsav) növekedésre és taxol-produkcióra gyakorolt hatását. Gyökér-hidro-kultúrákkal történő taxol-termelés lehetőségét is vizsgálják, mivel a gyökérkéreg hatóanyag-tartalma közel duplája az ágakéregének, valamint a gyökerek intenzíven növekednek, ami a kultiválási idő jelentős csökkentését teszi lehetővé.

Számos biotechnológiával foglalkozó cég tett előkészítő lépéseket a taxol sejt kultúrákkal történő előállításának megindítására. Az alternatív taxolforrások utáni kutatás azonban tovább folytatódik, mivel több, taxol prekursor molekulából levezethető vegyület tűnik terápiás szempontból még ígéretesebbnek. Újabban *E. coli*-ban termeltetnek taxol prekursor molekulákat igen jó hatásfokkal.

**Összefoglalva** megállapítható, hogy a terápiás szempontból jelentős, speciális növényi anyagcseretermékek előállításának ipari szintű megvalósítása napjainkban egyre fontosabb feladattá válik. Ehhez mind a korábban említett problémák (pl. a növénytermesztés nehézségei, alacsony hatóanyag-tartalom, stb.), mind pedig az alkalmazás oldaláról jelentkező igények növekedése, új vegyületek izolálása és ezzel együtt új terápiás lehetőségek megjelenése is hozzájárulnak. Jelentős alternatív forrásként jöhetnek szóba a különböző *in vitro* növényi tenyészetek, melyek hatóanyag-produkciója – a korszerű biotechnológiai módszerek (pl. génműködés befolyásolása, géntranszformáció) alkalmazásának köszönhetően – sok esetben eléri, sőt jelentősen meg is haladja a növényekben mért értékeket.

### V.3. GÉNTÉCHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

A növényi géntechnológia a molekuláris biológia, sejtgenetika és szövettenyésztés különböző módszereit alkalmazza és lehetővé teszi előnyös tulajdonságokkal rendelkező genetikailag módosított növényi kultúrák, transzgénikus növények létrehozását. Idegen gének bevitelére számos lehetőség van. Történhet vektorok (baktériumok, vírusok) segítségével, közvetett úton, de az elmúlt évtizedekben több olyan módszert is kidolgoztak, melyek közvetlenül a célszövetbe juttatják az idegen DNS-t. A sejtfalettől megfosztott növényi sejt (protoplaszt) különösen alkalmas idegen gének gyors befogadására.

A növényi géntechnológiát megalapozó legfontosabb felfedezések az *Agrobacterium* törzsek sajátosságainak, fertőzési módjainak megismerésére vezethetők vissza.

Ezeket az ismereteket Mary-Dell Chilton, a Ti-plazmid egyik feltérképezője így foglalta össze a *Scientific American*, 1983. júniusi számában:

„Hosszú időn keresztül, talán az évek millióin át, látta el a közönséges talajbaktérium, az *Agrobacterium tumefaciens* azt a feladatot, amivel a kutatók ma még csak kísérleteznek. Ez a baktérium egyik növényfajból a másikba vitt át örökítőanyagot, és a fogadó növény örökítőanyagába beépítette azokat.”

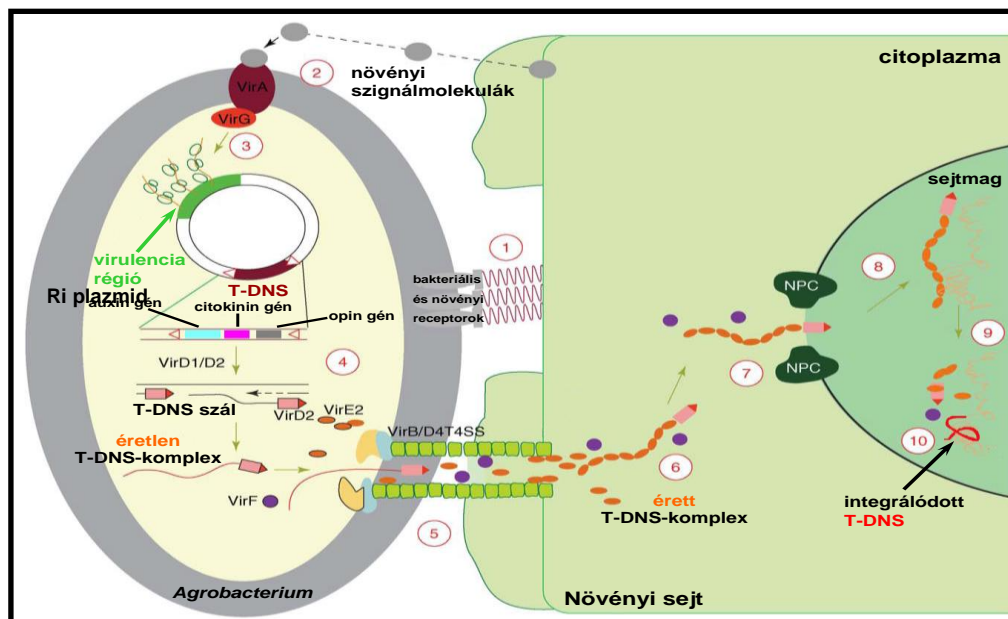
- **Indirekt géntranszfer**

Indirekt géntranszfer esetében az idegen DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével érhető el, pl: *Agrobacterium* fajok közvetítésével, vagy vírus vektorok alkalmazásával.

A talajban megtalálható *Agrobacterium* fajok közvetítésével végzett génmanipuláció felhasználása napjainkban általánosan elterjedt és eredményesen alkalmazható számos növényfaj (főleg kétszikűek) esetében [Hooykaas, 2000]. A módszer kivitelezése során a növényeket sebzési helyükön fertőzik *Agrobacterium tumefaciens* ill. *A. rhizogenes* baktériummal. A fertőzés során a



baktérium plazmid (*A. tumefaciens*: Ti-plazmid, *A. rhizogenes*: Ri-plazmid) egy része, az ún. transzfer DNS (T-DNS) átkerül a növényi sejtekbe és beépül a növényi sejtmag DNS-ébe (V.4. ábra). A fertőzés helyén az *Agrobacterium* hormon génjeinek működése következtében *A. tumefaciens* fertőzése esetén „tumor”, *A. rhizogenes* fertőzés esetén pedig „hairy root” (hajszálgöyökér) képződés indukálódik a sikeres géntranszformáció eredményeként (V.6. ábra). A T-DNS határszekvenciái közötti gének nem befolyásolják a fertőzőképességet, a virulenciát, a génátvitelt és az integrációt, így ezek a részek kicserélhetők idegen DNS szakaszokra, lehetővé téve ezzel különböző hasznos gének beépítését.

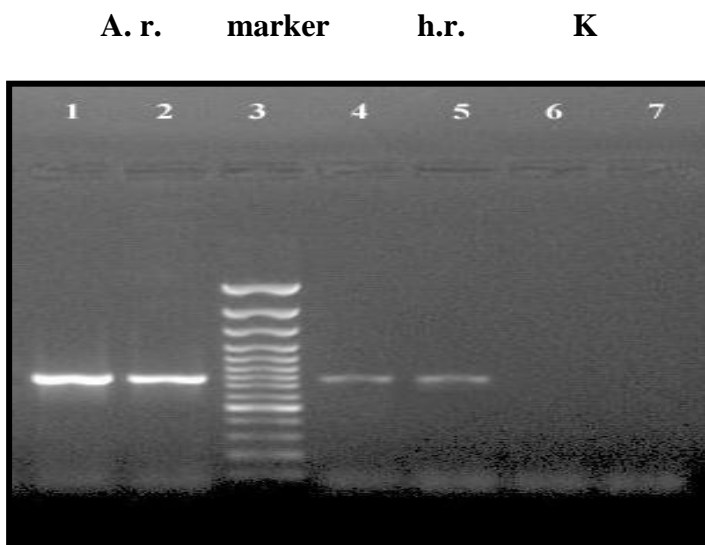


V.4. ábra **Az *Agrobacterium* által közvetített géntranszformáció folyamata**  
 (A Ri-plazmid egy része, az ún. T-DNS a baktériumfertőzés során átkerül a növényi sejtekbe és stabilan integrálódik a sejtmag DNS-ébe; Tzfira és Citovsky, 2006 nyomán Szarka, 2010)

**Jelölések:** 1 = Az *Agrobacterium* és a gazdasejt kapcsolódása 2 = a virulencia régió (vir) aktiválódása, virulencia fehérjék szintézise 3 = létrejön az éretlen T-DNS-komplex (VirD2 molekula hozzákapcsolódásával) 4 = az éretlen T-DNS-komplex a gazdasejt citoplazmájába kerül 5 = létrejön az érett T-DNS-komplex (VirE2 molekulák hozzákapcsolódásával) 6 = az érett T-DNS-komplex a gazdasejt aktív transzport mechanizmusaival bejut annak sejtmagjába 7 = a fehérjék leválnak a T-DNS felületéről, hogy az integrálódni tudjon a gazdasejt genomjába (azt a gazdasejt töredezett DNS darabként ismeri fel és beépíti saját örökítőanyagába)

### A géntranszformáció ellenőrzése történhet:

- PCR –(polimeráz láncreakció) módszerrel– amivel az idegen gén jelenlétét lehet kimutatni a növényi genomban (V.5. ábra)
- Blot – analizissel (gél-elektroforézissel) – az idegen gén beépülési gyakoriságát is lehet vizsgálni
- Opín – kimutatással (papír elektroforézissel, HPLC-vel) – az idegen gén működését ill. annak produktumát lehet kimutatni



*A. r. plasmid DNS*    *Hairy root (rolB-gén)*    *Nem transzformált*  
*(rolB-gén szakaszok)*    *bakt. DNS-szakasz*    *gyökér (neg.reakció)*

### V.5. ábra **Hairy root** kultúrában a bakteriális DNS jelenlétének kimutatása PCR módszerrel

A hatóanyagok termelése szempontjából az *A. rhizogenes* fertőzés indukálta hajszálgökereknek ill. az általuk megnövekedett gyökértömegnek van nagy jelentősége, ezért a továbbiakban erről a módszerről beszélünk.

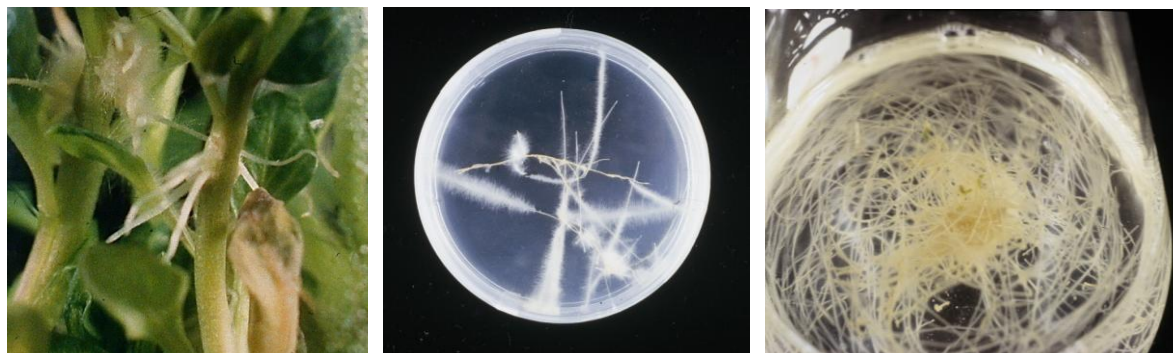
A *hairy root* kultúrák olyan genetikailag transzformált gyökereket tartalmaznak, amelyekben auxin szintetizálódik a beépített baktérium DNS hatására, így a növények gyökérmegnövekedése burjánzó méretet ölt, és egyúttal a másodlagos anyagcsere mértéke is jelentősen megnövekedhet.

Ez a technika lehetőséget nyújt gyökérben képződő hatóanyagok intenzív termeltetésére. Már több száz növényfajt sikerült transzformálni, a teljesség igénye nélkül néhány fontosabb faj, melynek *hairy root* kultúrájával biológiailag aktív vegyületeket, köztük gyógyszeripari szempontból fontos alapanyagot termelnek: *Panax ginseng*, *Datura* spp., *Echinacea pupurea*, *Cinchona ledgeriana*, *Glycyrrhiza glabra*, *Artemisia absinthium*, *Lithospermum erythrorhizon*. Néhány speciális anyagszerterméket az **V. 4. táblázatban** mutatunk be példaként.

A módszerek alkalmazása előrelépést hozhat a morfinán alkaloidok előállítására területén is. A *rhizogenes* felhasználásával sikeresen állítottak elő géntranszformált szövetkultúrákat (feltehetően a mák sajátságából következően nem gyökér, hanem elkalluszosodó szövet képződött). A transzformált sejtekből álló kalluszsövet morfinán alkaloid tartalma több mint tízszerese volt a nem transzformált kallusztenyészetének. A kalluszokból regenerált, transzgénikus növények némelyike is jelentős mennyiségű morfinán alkaloidot tartalmazott, mely elérte és meghaladta a magról nevelt növények alkaloid tartalmának 50%-át.

A *hairy root* kultúrák alkalmazásának számos előnye közt kiemelendő, hogy:

- nagyfokú genetikai stabilitással rendelkeznek
- hormonmentes táptalajon korlátlan növekedésre képesek
- hatóanyagtartalmuk általában magasabb mint más *in vitro* tenyészeteké
- az anyanövénytől eltérő új vegyületeket is szintetizálhatnak



V.6. ábra *Atropa belladonna* hairy root kultúrák (#K4 klón) képződése és tenyésztése szilárd, folyékony B5 táptalajon

A hairy root kultúrák szilárd táptalajon, majd folyékony táptalajon történt tenyésztése során (V.6. ábra) - organizálódást követően - teljes növények is regenerálódhatnak, melyek kiültetést követően fitotronban vagy izolált üvegházban virágzásig, ill. termésérésig felnevelhetők az elővigyázatossági rendszabályok szigorú betartásával (V.7. ábra).



V.7. ábra **Genetikailag transzformált *Atropa belladonna* (#K4), *in vitro* és *in vivo***

V.4. táblázat **Hairy root kultúrákban képződő néhány speciális anyagcseretermék**

Család anyagcseretermék	Növényfaj	Speciális
Solanaceae	<i>Atropa belladonna</i>	hioszciamin, szkopolamin, 6-OH-hioszciamin
	<i>Datura stramonium</i>	hioszciamin
	<i>Datura innoxia</i>	hioszciamin, szkopolamin,
	<i>Hyoscyamus muticus</i>	apotropin hioszciamin
	<i>Nicotiana rustica</i>	nikotin, anatabin
	<i>N. tabacum</i>	nikotin, anatabin
	<i>N. hesperis</i>	nikotin, anatabin
	<i>N. cavicola</i>	nikotin, nornikotin
	<i>Scopolia japonica</i>	hioszciamin
	<i>Solanum laciniatum</i>	szteroid-alkaloidok
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	ajmalicin, szerpentin. vindolinin, katarantin
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	betacianin, betaxantin
Boraginaceae	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	shikonin
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i>	bizabolol, farnezén
	<i>Tagetes patula</i>	tiofénszármazékok, szeszkviterpének
Rubiaceae	<i>Cinchona ledgeriana</i>	kinolin-alkaloidok
Lobeliaceae	<i>Lobelia inflata</i>	lobelin, poliacetilének

- **Hairy root tenyészetek speciális anyagcseretermékeinek vizsgálata**

Tekintettel arra, hogy a genetikailag eltérő klónok hatóanyag produkciója illetve összetétele jelentősen különbözhet, szelekció céljából minden egyes *hairy root* klón külön-külön vizsgálata szükséges. Ezen fitokémiai analízisek céljára a tömegspektrométerrel összekötött HPLC vagy GC, azaz HPLC-MS/MS és/vagy GC-MS alkalmazása optimális a vizsgálni kívánt hatóanyag típusától függően (ld. II. fejezet). Példaként az előzőekben bemutatott *Atropa belladonna* #K4

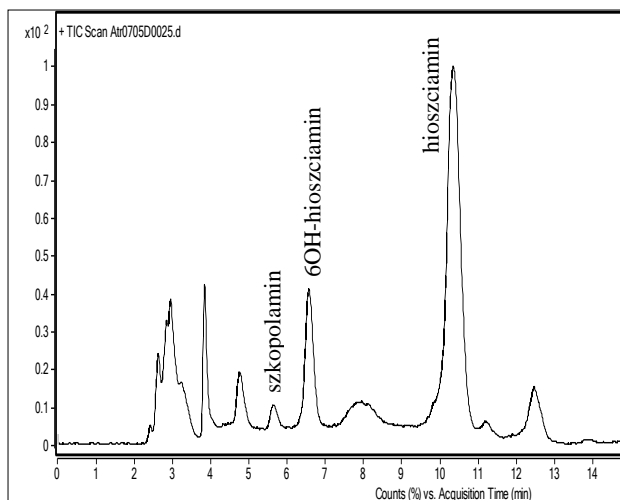
*hairy root* klón főbb tropán alkaloid komponenseinek HPLC-MS/MS azonosítását mutatjuk be az alábbiakban (V.8. és V.9. ábrák).

#### HPLC-MS/MS vizsgálat

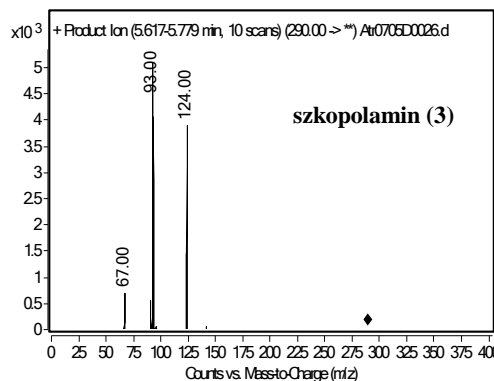
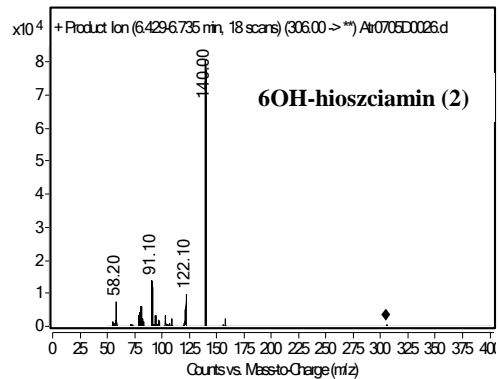
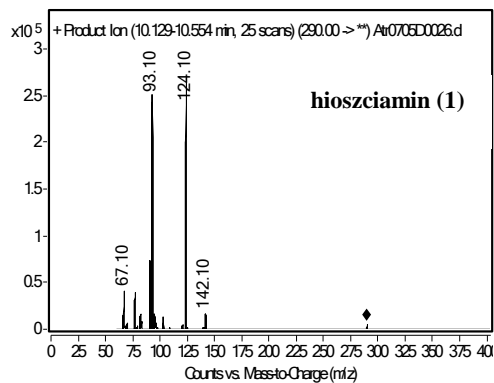
A vizsgált *hairy root* klónt liofilizáljuk, majd ezt követően kivonjuk az alkaloidokat és tisztítjuk (ld. részletesen a *Növényi drogok farmakobotanikai és fitokémiai vizsgálata c. papíralapú tankönyvben*, Szőke és mtsai 2009).

Analízis pozitív ionmódban Agilent 6410 Triple Quad LC-MS rendszeren.

- Alkaloidok elválasztása: Phenomenex Luna 5<sub>m</sub> C18 (2) fordított fázisú oszlopon(250x 4,6mm I.D.), Phenomenex SecurityGuard C18 előtétoszloppal (8x 3mm I.D.), mozgófázis acetonitril: 30mM ammóniumformiát 17: 83 (v/v), pH 2,8; áramlási sebesség 1,0 ml/perc, oszlophőmérséklet 25°C.
- Az LC-MS-MS paraméterek: porlasztó nyomás 45,0psi, szárítógáz áramlási sebesség 9 l/perc, szárító gáz hőmérséklete 350°C, kapilláris feszültség 3500V, pásztázási tartomány 50-700m/z, kollíziós energia 35Ev.



V.8. ábra *Atropa belladonna* #K4 *hairy root* klón totálion kromatogramja



V.9. ábra **A. belladonna** #K4 hairy root klón - tandem-mass spektrumai

1. hioszciamin
2. 6OH-hioszciamin
3. szkopolamin

- **Direkt géntranszfer, vektor nélküli eljárások**

Idegen gének bevitele nemcsak indirekt módon, vektorok (baktériumok, vírusok) közvetítésével történhet, hanem közvetlen úton is. A sejtfaltól megfosztott növényi sejt (protoplaszt) különösen alkalmas idegen gének gyors befogadására. A növényi sejtek és protoplasztok esetén alkalmazott vektor nélküli eljárások pl.:

- *elektroporáció* (a sejtmembránban elektromos erőter hatására keletkező pórusokon keresztül jut be az idegen DNS),
- *génbevétel polietilén-glikol (PEG) alkalmazásával* (a PEG elősegíti a protoplasztok fúzióját, a hozzá kevert DNS átjut a membránon),
- *ultrahanggal történő génbevétel*,
- *mikroinjektálás* (mechanikai módszer, idegen DNS sejtbe, vagy sejtmagba való közvetlen bejuttatása mikromanipulátor segítségével, mikroszkóp alatt),
- *DNS bejuttatása génbelövéssel* (nagy sebességre felgyorsított, felszínükön DNS-t tartalmazó nemesfém szemcséket alkalmaznak),

- *szilikon-karbid tűk* alkalmazása (a sejteket DNS tartalmú folyékony tápközegben szilikon-karbid tűkkel együtt rázatják)

Nemzetközi felmérések alapján, a genetikailag módosított növények felhasználása leginkább a humán terápia területén elfogadott, ami talán annak is köszönhető, hogy a legtöbb élelmezési célra felhasznált növényvel szemben (ahol a táplálékkal maga a módosított genetikai állomány is az emberi szervezetbe juthat) itt csupán bizonyos speciális anyagcseretermékek kerülnek alkalmazásra, leggyakrabban különböző gyógyszerkészítmények formájában.

#### **V. 4. GENETIKAILAG MÓDOSÍTOTT SZERVEZETEK**

A XX. század végére az emberiség nemcsak megismerte az élet információját hordozó molekulát, hanem képessé vált annak molekuláris módosítására, azaz géntechnológiai módszerekkel transzgénikus (**GM**) fajták előállítására. Géntechnológiai módszerekkel lehetőség nyílt a növények életfolyamatait vezérlő genetikai program megváltoztatására, a felhasználók igényeinek megfelelően, remélve hogy ezt mindenkor az emberiség javára teszik (Heszky, 2012).

*GMO = génmódosított vagy génkezelt élőlény:* a géntechnológia segítségével előállított transzgénikus élőlények elterjedt neve a köznyelvben, a sajtóban és a jogi környezetben. A hagyományos nemesítési módszerek az egész genomra kiterjedő véletlenszerű változásokat, génmódosításokat idéznek elő, a GMO-k előállítása irányított, tervezett, egy vagy néhány gént módosítanak, vagy visznek be a genomba, más genotípusú egyedből vagy más fajból. A növények genetikai anyaga tehát nem természetes úton változik meg (nem a párosodást követő rekombináció útján), hanem a géntechnológia eszközei által, idegen DNS szakasz bejuttatásával.

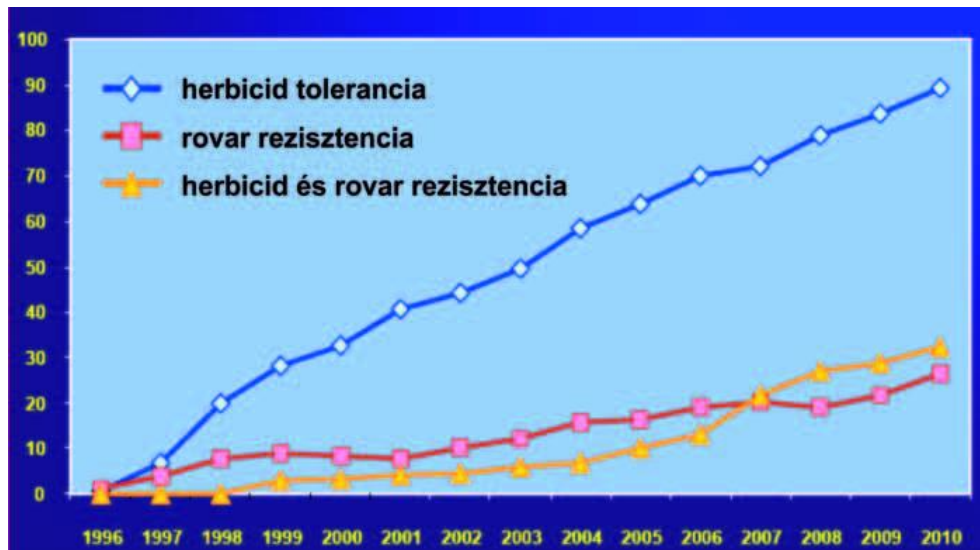
Az első transzgénikus növényt 1983-ban állították elő. 1994-ben már az USA-ban termesztették az első genetikailag módosított (GM) növényfajtát (későn puhuló paradicsom). Napjainkban elsősorban herbicidtoleráns és rovarrezisztens GM fajtákat termesztnek, melyek vetésterülete folyamatosan emelkedik.

Napjainkban már a világ 29 országában kb. 150 millió hektáron termesztnek valamilyen GM



fajtát (közülük 26 országban csak 4 növényfaj: a kukorica, a szója, a repce és a gyapot herbicid toleráns és rovar rezisztens GM fajtáit termesztik). 2010-től un. *többgénes hibrideket* is egyre nagyobb területen termesztnek az USA-ban, melyek a herbicid tolerancia (glifozát, glufozinat) és rovar rezisztencia géneket különböző kombinációban tartalmazzák.

Clive (2010) felmérése alapján a herbicid tolerancia kimagaslóan vezet a géntechnológiai módosítások között, közel négyszer akkora területen termesztnek herbicid toleráns GM fajtákat, mint rovar rezisztenseket (**V.11. ábra**).



11. ábra **A herbicid és rovar rezisztens GM növények vetésterületének (millió ha) alakulása 1996-2010 között (Clive 2010)**

A XX. század végén a növénynevelésben is paradigmaváltást eredményezett a géntechnológia alkalmazása. Lehetővé vált, hogy a DNS szintjén változtassák meg a növényfajták tulajdonságait, és az esetlegesen hiányzó tulajdonságokat, az azokért felelős gének beépítésével pótolják (Heszky, 2012).

- **Az emberiséget szolgáló legfontosabb géntechnológiai fejlesztések**

Dr. Heszky László akadémikus (2010) véleménye szerint, a géntechnológiai fejlesztések közül az alábbi, emberiséget szolgáló stratégiák érdemelnek figyelmet:

***Technológiát javító stratégiák:***

- Herbicid toleráns GM-növényfajták (gyomirtás megoldása minden kultúrnövénynél);
- Hímsteril GM-növényfajták (hibridizáció felhasználása minden kultúrnövénynél);
- Abiotikus stressz (szárazság, hő, só, hideg stb.) rezisztens GM-növényfajták (az adott faj természetességi határának bővítése, klímaváltozás kivédése).

#### ***Környezetbarát stratégiák***

- Rovarrezisztens GM-növényfajták (vegyszerhasználat és költségek csökkenése);
- Baktérium- és gombarezisztens GM-növényfajták (vegyszerhasználat csökkentése).
- Bioremediáció GM-növényfajtákkal (talajok nehézfém-, vegyszer- stb. mentesítése);

#### ***Humanitárius stratégiák***

- Vitamint (A, E) termelő, ehető GM-növényfajták (hiányos táplálkozás leküzdése);
- Allergén fehérjék termelésében gátolt GM-növényfajták (életminőség javítása);
- Fehérje- és aminosav-tartalomban javított élelmiszer- és takarmány GM-növényfajták, (hiányos táplálkozás leküzdése, takarmányérték javítása).

#### ***Fogyasztókat szolgáló stratégiák***

- Színében (virág, gyümölcs stb.) módosított GM-növényfajták (piacképesség javítása);
- Ízében (pl. cukortartalom) módosított GM-növényfajták (piacképesség javítása);
- Magnélküli (gyümölcs) GM- növényfajták (piacképesség javítása);
- Nem puhuló gyümölcsöket termelő GM-növényfajták (szállíthatóság, tárolhatóság javítása);
- Lassan érő gyümölcsöket termő GM-növényfajták (tárolhatóság javítása)

#### ***Emberiség egészségét szolgáló stratégiák***

- Egészségesebb élelmiszereket biztosító GM-növényfajták (omega-3-zsír, fitoszterol);
- Flavonoidok, lycopin, fruktán, vas stb. - tartalom növelése (életminőség javítása);
- Vitaminokat termelő (C, A, stb.) transzgénikus növényfajták (hiányos táplálkozás megszüntetése, életminőség javítása).

#### ***Ipari termelést szolgáló stratégiák***

- Alfa-amilázt termelő GM-növényfajták (üdítőital gyártás, szeszipar);
- Nagy olajsavas (HO) GM-növényfajták (biodízel-gyártás, növényolajipar stb.);
- Nagy keményítő és cukortartalmú GM-növényfajták (bioalkoholgyártás, szeszipar stb.);
- Ehető vakcinát termelő GM-növényfajták (gyógyszeripar);
- Gyógyászati fehérjéket (interferon, enkefalin, szérum albumin, stb.) termelő GM-növényfajták (gyógyszeripar)

A gyógyszeripari felhasználás lehetősége, valamint újdonság értéke indokolja az utolsó két pont részletesebb magyarázatát.

- **Pharming for Pharmaceuticals / „Molecular farming”**

A biotechnológia egy viszonylag új területe a farmakológiai aktív anyagok, köztük jelentős

részben fehérjék előállítása transzgénikus organizmusokban, így növényekben is. Ez egy alapjaiban új lehetőség, amely a GM növényeknek, mint bioreaktoroknak a felhasználásán alapul. Ezen fejlesztési törekvések során a növényeket mint fehérje- vagy gyógyszeralapanyag-gyárakat kívánjuk hasznosítani (Fox, 2006). Az ily módon előállított termékek között találjuk az inzulint, virtonectint, glükocerebrozidázt, albumint, locteront és különböző vakcinákat. A termeltetés egyaránt történik növényi szövetekben vagy sejtszuszpenziós kultúrákban. A molekuláris gazdálkodás (molecular farming) mint az agrárgazdaság új területe, sok lehetőséget rejt magában. A Debreceni Egyetemen az Agrárcentrum által kidolgozott program a hazai próbálkozások jó példája. Az Orsós Ottó laboratórium munkatársai sikeresen építették be a „*Penicillium chrysogenum*” gomba PAF (kis molekulatömegű gombaellenes fehérje) génjét dohányba. A módszer különös újdonsága, hogy kloroplasztisz transzformációval történt, tehát a termék csak zöld növényi részben képződik. Emellett, a transzgén nagy kópiaszáma miatt a kloroplasztisz DNS-ben módosított GM-növények nagyságrendekkel több ipari alapanyag termelésére képesek, a hagyományos sejtmagi transzformánsokhoz képest (Maliga és Bock, 2011).

**Végezetül** Heszky akadémikus (2010) gondolatait idézem: „Az emberi természet sajátja, hogy használja mindazon ismereteket és eszközöket, melyek rendelkezésére állnak. Az emberiség története során mindig is ezt tette. A biotechnológiával sem lesz ez másképp.”

Hosszú távon nem tehetünk mást, mint elfogadjuk *James D. Watson* Nobel-díjas professzor ajánlását:

*„Meg kell tanulnunk együtt élni a DNS-ről szerzett tudásunkkal”.*

## Irodalomjegyzék

- Balandrin M.F. and Klocke J.A. (1988) Medicinal, aromatic and industrial materials from plants, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3-36.
- Balázs E-, Dudits D., Sági L. (2011) Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében. Magyar Fehér Könyv. Szeged
- Berger R.G. (1995): Aroma biotechnology. Springer-Verlag, Berlin
- Berlin J. (1988) Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 37-60.
- Cardillo A.B., Otalvaro MA., Calabro A.A., Enrique L.M., Lozano V., Talou, J.R., Giulietti A. (2010) Anisodamine production from natural sources: seedlings and hairy root cultures of argentinean and Colombian *Brugmansia candida* plants, *Planta Med.* 76:402–405.
- Clive J. (2010) Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief. No. 42., ISAAA, Ithaca, NY.
- Dudits D., Heszky L. (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia, Agroinform Kiadó, Budapest,
- Dudits D., Vetier M. (2012) Pró és kontra a génmódosított növénytermesztésről. Interpress Magazin: Bioszféra.
- Fox J. L. (2006): Turning Plants into Protein Factories. *Nature Biotechnology.* 24, 10, 1191–1193.
- Fujita Y. (1988): Shikonin: Production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 225-236.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50: 151-158.
- Grabkowska R., Królicka A., Mielicki W., Wielanek M., Wysokinska H. (2010) Genetic transformation of *Harpagophytum procumbens* by *Agrobacterium rhizogenes*: iridoid and phenylethanoid glycoside accumulation in hairy root cultures. *Acta Physiol. Planta* 32:665–673.
- Gyurján I, László M, Dános B. (1992) Növényi sejtfermentáció; egy új lehetőség a növényi eredetű hatóanyagok gyártására. *Acta Biol Debr Suppl*, 8<sup>th</sup> Hung Fermentation Conf: 340-345.
- Gyurján I. (1999): Biotechnológia a mezőgazdaságban, In: Humánökológia (ed. I. Nánási), Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 451-476.
- Hank H, Szőke É, Tóth K, László I, Kursinszki L. (2004) Investigation of tropane alkaloids in genetically transformed *Atropa belladonna* L. cultures. *Chromatographia*, 60: S55-S59.
- Heszky L. (2012) Transzgénikus (GM) fajták globális termesztésének eredményei és következményei. *Agrofórum*, 70-75.

- Heszky L. (2010) Biotechnológia és növénytermesztés a XXI. században. Agrofórum, 88-91.
- Hooykaas, P.J.J. (2000): *Agrobacterium*, a natural metabolic engineer of plants, In: Metabolic engineering of plant secondary metabolism (eds. Verpoorte, R. and Alfermann, A.W.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 51-68.
- Kadkade, P.G. (1981): Formation of podophyllotoxins by *Podophyllum peltatum* tissue cultures, *Naturwissenschaften*, **68**, 481-482.
- Kadkade, P.G. (1982): Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*, *Plant Sci. Lett.*, **25**, 107-175.
- Kamo, K.K. and Mahlberg, P.G. (1988) Morphinan alkaloids: Biosynthesis in plant (*Papaver* spp.) tissue cultures, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 251-264.
- Kayser O., Quax W. (2009): Medicinal plant biotechnology Vol. 1-2. Wiley-VCH Verlag.
- Kim J., Baek K., Son Y., Son S., Shin H. (2009) Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel, *J. Appl. Biol. Chem.* 52:144–150.
- Kollár, J. (2001): Gyógyászati szempontból fontos hatóanyagok termeltetése növényi kultúrákkal, különös tekintettel az ipari szintű eljárásokra, Diplomadolgozat, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Orvosbiológiai Mérnök Szak.
- Komarovska, H., Giovannini A., Kosutha J., Cellarovia E. (2009) *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fries, *Z. Naturforsch. C* 64:864–868.
- Kuzovkina I.N. (2012) Artificial seeds production using hairy root culture of *Ruta graveolens*. *Russian Journal of Plant Physiology*, in press.
- Kuzovkina I.N., Guseva A.V., Kovács Gy., Szöke É. and Vdovitchenko M.Yu. (2005) Flavones in Genetically Transformed *Scutellaria baicalensis* Roots and Induction of Their Synthesis by Elicitation with Methyl Jasmonate. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (1):77–82.
- Kuzovkina I.N., Mantrova O.V., Al'terman I.E., Yakimov S.A. (1996) Culture of genetically transformed hairy roots derived from anthraquinone-producing European Madder plants. *Russ J Plant Physiol*, 43: 291-298.
- László I, Szöke É. (2002) Biotechnológiai módszerek alkalmazása terápiás szempontból fontos, növényi eredetű hatóanyagok előállítására. *Képzés egy életen át*, 10:10-16.
- Maliga P, Bock R. (2011) Plastid biotechnology: food, fuel and medicine for the 21st century. *Plant Physiology*, 155 (4) : 1501-1510.
- Maróti M. (1976) A növényi szövettenyésztés alapjai. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 49-52.
- Mirjalili H., Fakhr-Tabatabaei S., Bonfill M., Alizadeh H., Cusido R., Ghassempour A., Palazon J. (2009) Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures, *Eng. Life Sci.* 9 197–204.
- Misawa, M. (1994): Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolite, *FAO Agricultural Services Bulletin*, No. 108.

- Misawa, M. and Nakanashi, T.M. (1988) Antitumor compounds: Production by plant cell cultures, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 191-209.
- Miura, Y. and Okazaki, M. (1983): Production process for vinblastine, Jpn. Patent (Kokai), 83-201982.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- Nessler, C.L. (1998): *In vitro* culture technologies, In: Poppy, The genus *Papaver* (ed. Bernáth, J.), Harwood Academic Publishers, pp. 209-218.
- Ono N.N., Tian L. (2011) The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* 180:439–446
- Phongprueksapattana S., Putalun W., Keawpradub N., Wungsintaweekul J. (2008) *Mitragyna speciosa*: hairy root culture for triterpenoid production and high yield of mitragynine by regenerated plants, *Z. Naturforsch. C* 63:691–698.
- Putalun W., Yusakul G., Patanasethanont D., (2009) Dicine production from a hairy roots culture of *Stephania suberosa*, *Z. Naturforsch. C* 64:692–696.
- Rahimi K., Haghbeen K., Marefatjo J., Jazii F., Sheikhani R. (2008) Successful production of hairy root of *Valeriana sisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*, *Biotechnology* 7:200–204.
- Rajesh Arora (Ed.) (2010): *Medicinal Plant Biotechnology*. CPI Antony Rowe, Chippenham. (UK). pp. 1-357.
- Rao, S. R., Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories for secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20:101-153
- Rücker, W. (1988) *Digitalis* spp.: In vitro culture, regeneration, and the production of cardenolides and other secondary products, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 4, Medicinal and aromatic plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 388-419.
- Saha S,S., Chaudhury S.R., Dasgupta M. (2009) Transformed hairy roots of *Arachis hypogea*: a tool for studying root nodule symbiosis in a non-infection thread legume of the Aeschynomeneae tribe, *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:132–142.
- Sidik N., Norihan M., Shafii K. (2010) In vitro culture of *Pereskia bleo*. *Acta Hort.* 829:99–104.
- Sidwa-Gorycka M., Krolicka A., Orlita A., Malinski E., Golebiowski M., Kumirska J., Chromik A., Biskup E., Stepnowski P., Lojkowska E. (2009) Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 97:59–69.
- Smith, J., Smart, N.J., Quesnel, A.A., Misawa, M. and Kurz, W. (1986): Development of scale-up studies for the production of catharine by cell cultures of *Catharanthus roseus*, 5<sup>th</sup> Int. Cong. Plant tissue and cell culture, Minneapolis, MN, p. 248.
- Szarka Sz. (2010) *Tagetes patula* L. géntranszformált hairy root kultúrák tiófen anyagcseréjének vizsgálata. Ph.D. disszertáció, Semmelweis Egyetem, Budapest

Szőke É, Kéry Á, Lemberkovic É. (2009) Farmakognózia. Növényi drogok farmakobotanikai és fitokémiai vizsgálata. Semmelweis Kiadó, Budapest

Szőke É. (1994) The effects of magnesium on changes in growth intensity of hairy root cultures of the *Datura candida* x *D. aurea* hybrid. In: Fazekas T, Selmeczi B, Stefanovits P (szerk.), Magnesium in biological systems, Environmental and biomedical aspects. Akadémia Kiadó, Budapest, pp. 93-94.

Szőke É. (1998): *In vitro* biosynthesis of poppy alkaloids, In: Poppy, The genus *Papaver* (ed. Bernáth, J.), Harwood Academic Publishers, pp. 189-208.

Szőke É., László I. and Liszt K. (2001): A mákalkaloidok képződése szövettenyészetekben (a mák alkaloidjainak *in vitro* bioszintézise), In: Magyarország kultúrflórája, A mák (eds. Sárkány, S., Bernáth, J., Tétényi, P.), Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 135-153.

Szőke, É. (1994): *Lobelia inflata* L. *In Vitro* Culture and the Production of Lobeline and Other Related Secondary Metabolites. Vol. 28, in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. (Ed. Bajaj Y.P.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, pp. 289-327.

Triplett B., Moss S., Bland J., Dowd M. (2008) Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 44:508–517.

Tzfira T., Citovsky V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 17:147-154.

Udomsuk L., Jarukamjorn K., Tanaka H., Putalun W. (2009) Isoflavonoid production in a hairy roots culture of *Pueraria candollei*, *Z. Naturforsch. C* 64 687–691.

Verpoorte R. (2000): Plant secondary metabolism, In: Metabolic engineering of plant secondary metabolism (eds. Verpoorte, R. and Alfermann, A.W.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 1-30.

Wickremesinhe E.R.M. and Arteca R.N. (1999): *Taxus* species (yew): *In vitro* culture, and the production of taxol and other secondary metabolites, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 45, Transgenic medicinal plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 415-443.

Yoshimatsu K. and Shimomura K. (1999): Genetic transformation of *Papaver somniferum* L. (opium poppy) for production of isoquinoline alkaloids, In: Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 45, Transgenic medicinal plants (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 178-193.