



# OCENA WPŁYWU STRATEGII RETROBIOSYNTETYCZNYCH NA POZIOM BIOSYNTETYZU LIGNANÓW W KULTURZE PĘDÓW *PHYLLANTUS AMARUS*

B. Sparzak-Stefanowska, W. Gancarz, M. Krauze-Baranowska  
Katedra i Zakład Farmakognozji, Al. Gen. J. Hallera 107, e-mail: [bsparzak@gumed.edu.pl](mailto:bsparzak@gumed.edu.pl)

*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn., ze względu na efekt hepatoprotekcyjny i aktywność przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu B, jest jednym z najintensywniej badanych gatunków w obrębie rodzaju *Phyllanthus* – liściokwiat. Dane literaturowe wskazują, że zespół lignanów – fylantyna, hypofylantyna, nirantyna oraz nirtetralina, obok elagotanu, są odpowiedzialne za ww. efekty biologiczne gatunku. Wobec rosnącego zapotrzebowania na surowiec leczniczy oraz

ograniczony dostęp do jego zasobów naturalnych, roślinne kultury *in vitro* stanowią alternatywną metodę hodowli biomasy *P. amarus*.

[1] Patel J. R., Tripathi P., Sharma V., Chauhan N. S., Dixit V. K., *Phyllanthus amarus: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review*, Journal of Ethnopharmacology, (2011) 138: 286-313.

[2] Wang C. Y., Lee S. S., *Analysis and identification of lignans in Phyllanthus urinaria by HPLC-SPE-NMR*, Phytochemical Analysis (2005) 16: 120-126.



## CEL PRACY

Celem badań była ocena wpływu elicytorów biotycznych (lizaty bakteryjne, chitozan), składników odżywczych (woda kokosowa, hydrolizat kazeiny, lizat drożdży) oraz prekursorów biosyntezy (kwas cynamonowy, fenyloalanina) na akumulację lignanów (fylantyny, hypofylantyny i nirantyny) w kulturze pędów *P. amarus*.

## METODYKA

### Materiał do badań

stanowiły kultury pędów *P. amarus* otrzymane w Pracowni Kultur *in vitro* Roślin Wyższych Katedry i Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Fragmenty pędów z merystemem wierzchołkowym oraz zawiązkami pąków bocznych i liści przenoszono w warunkach aseptycznych na podłoże stacjonarne zerowe MS<sub>0</sub>. Kultury pasażowano w odstępach 5-tygodniowych. W dniu inicjowania doświadczenia na podłożu stacjonarnym MS<sub>0</sub> (50 ml) inokulowano ok. 100 mg tkanki. Cykl hodowlany trwał 35 dni.

### Elicytory biotyczne i prekursor biosyntezy

dodawano w 1. dniu cyklu hodowlanego i zbierano tkankę w 35. dniu cyklu hodowlanego. W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano następujące stężenia substancji w podłożu hodowlanym: wyciąg drożdżowy (DRO) – 50 µg/ml, hydrolizat kazeiny (K) – 100 mg/l, woda kokosowa (W) – 10%, fenyloalanina – 0,1 i 0,4 mmol (Phe 0,1, Phe 0,4), kwas cynamonowy – 1,0 mg/l (KC1), chitozan (CH) – 30 i 100 mg/l (do prób kontrolnych dodawano odpowiednią objętość kwasu octowego zobojętnionego 0,1n roztworem NaOH (CHX)), autoklawowane zawiesiny bakteryjne (*Enterobacter sakazakii* (ES), *Pectobacterium carotovorum* 1043 (PC), *Agrobacterium rhizogenes* A4 (AR)) – 7,5 i 15,0 ml/l podłoża hodowlanego.

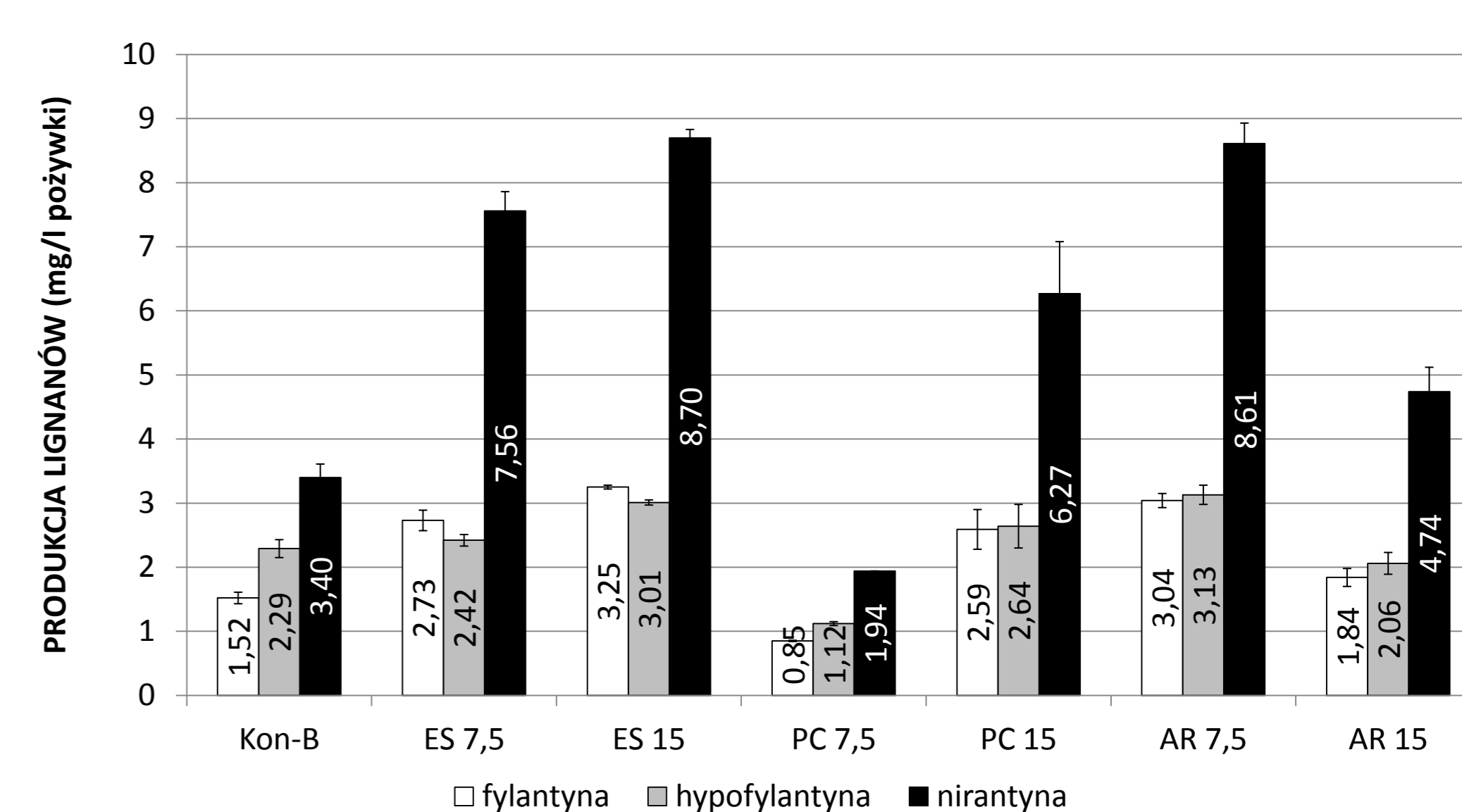
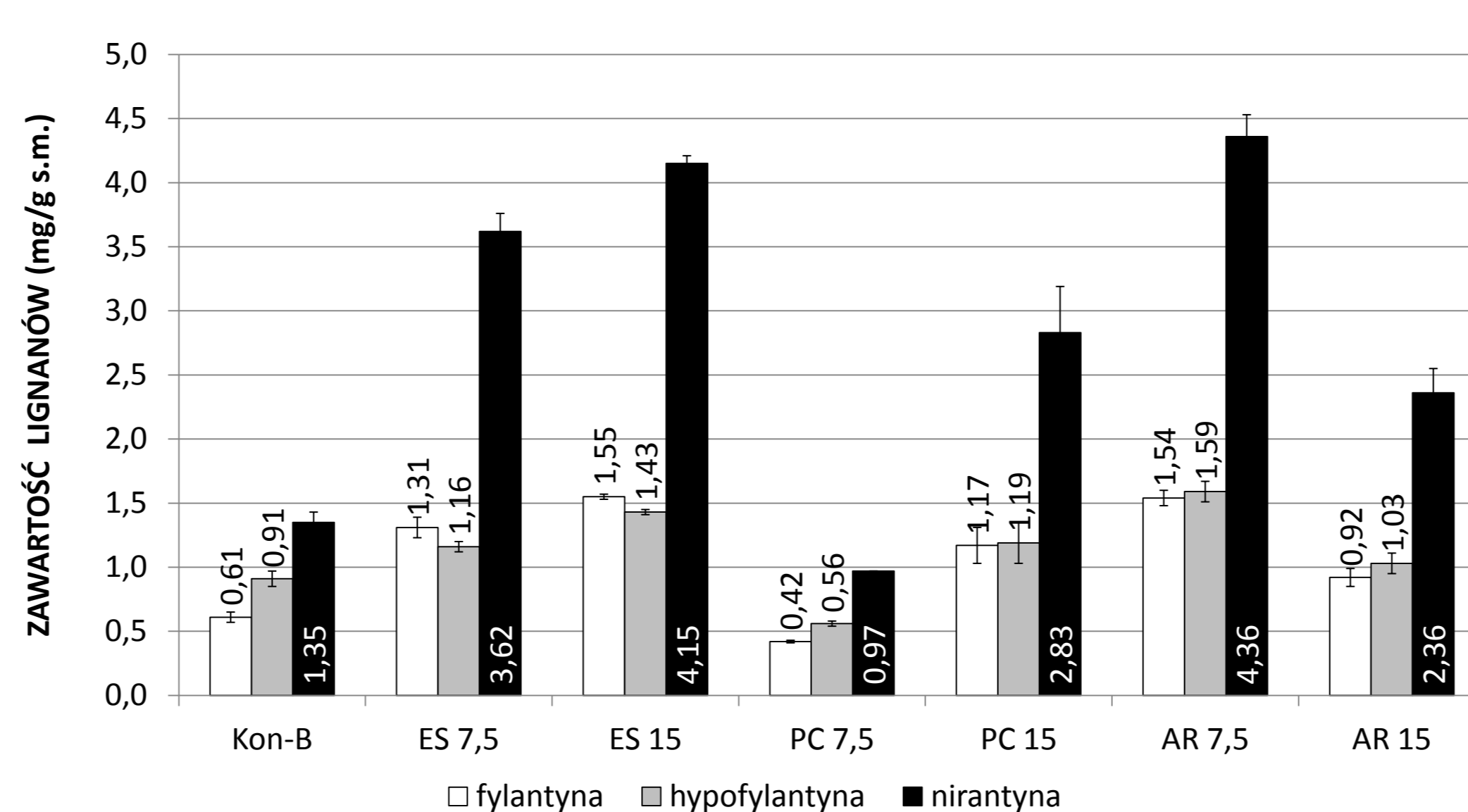
### Ekstrakcja lignanów.

Materiał roślinny (0,5 g) ekstrahowano metanolem w łaźni ultradźwiękowej (3 x 40 ml, 3 x 0,5 h) w temp. 50 °C. Połączone wyciągi przesączono i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeznaczono do dalszych badań.

### Analiza chromatograficzna

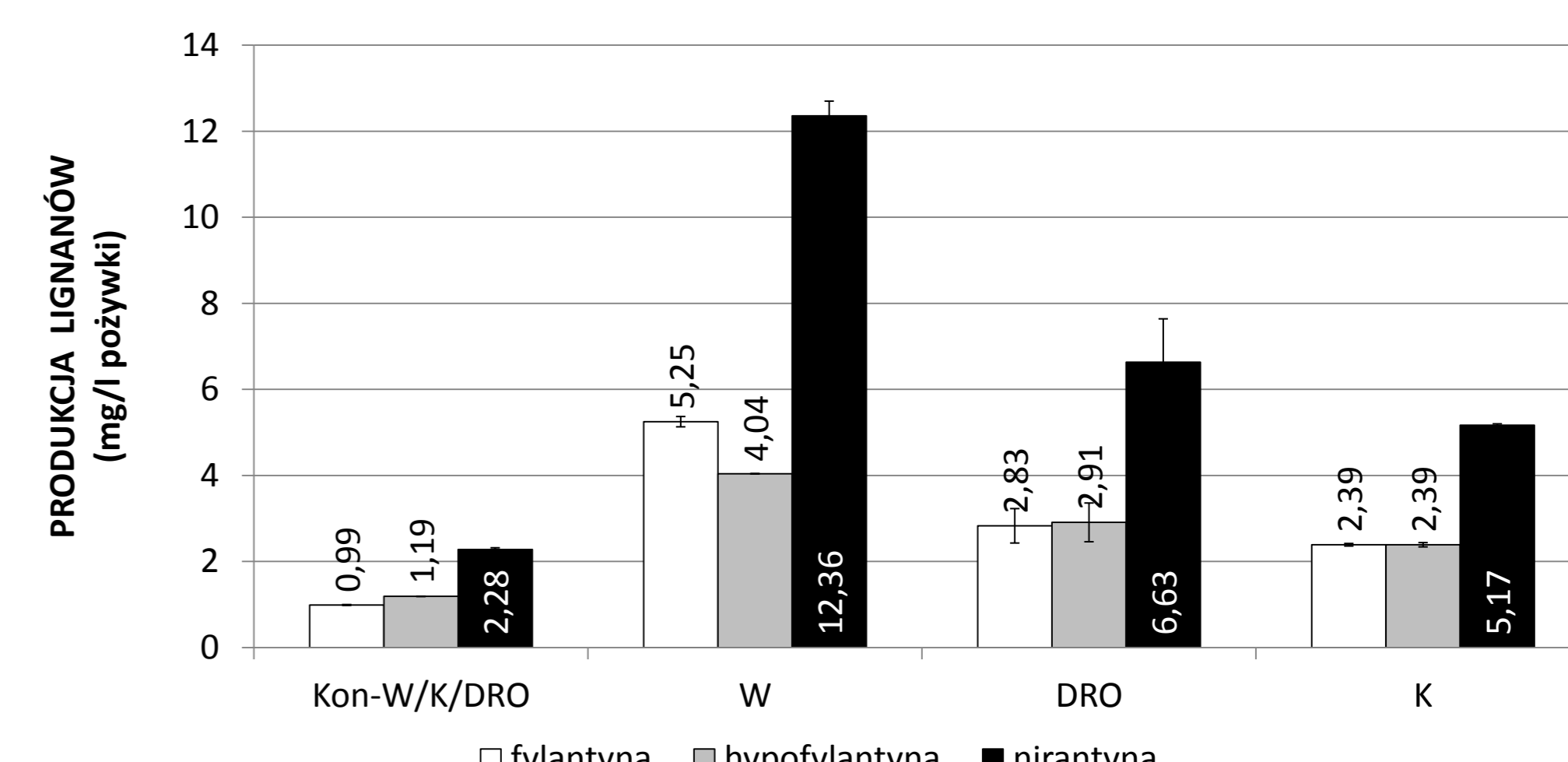
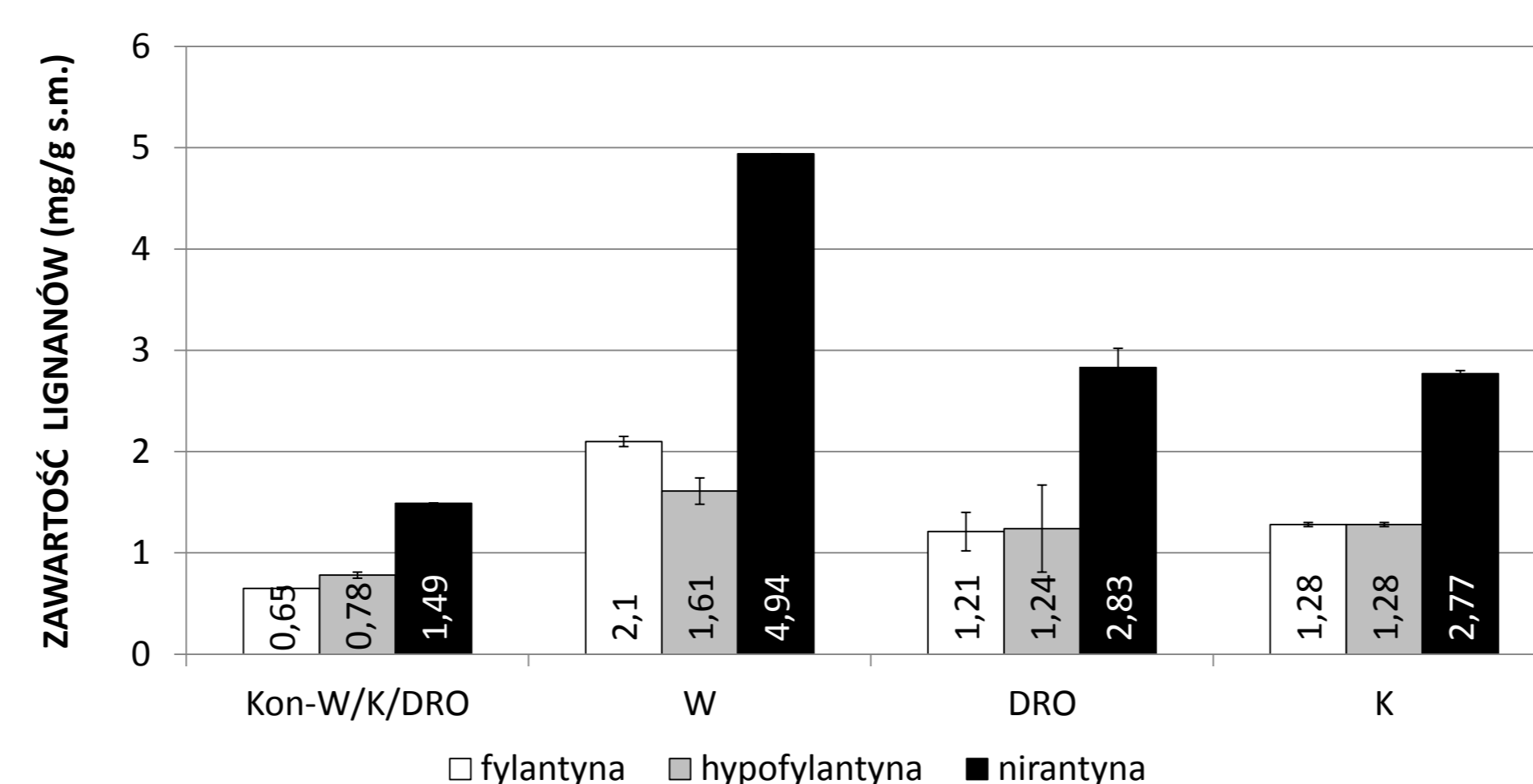
została prowadzona na kolumnie monolitycznej HPLC CHROMOLITH PERFORMANCE RP-18E 100-4.6 z prekolumną CHROMOLITH PERFORMANCE RP-18E 5-4.6, temperatura kolumny T=25 °C, stosując program elucji gradientowej: 0 min – 40% B, 20 min – 50% B, A – H<sub>2</sub>O, B – ACN. Przepływ fazy ruchomej: 1 ml/min, detekcja: UV λ = 280 nm, objętość nastrzyku 10 µl. Metodę zwalidowano w oparciu o oznaczenie liniowości, precyzji jedno- i międzynieowej, powtarzalności, granicy wykrywalności i granicy oznaczalności oraz odzysku.

## WYNIKI



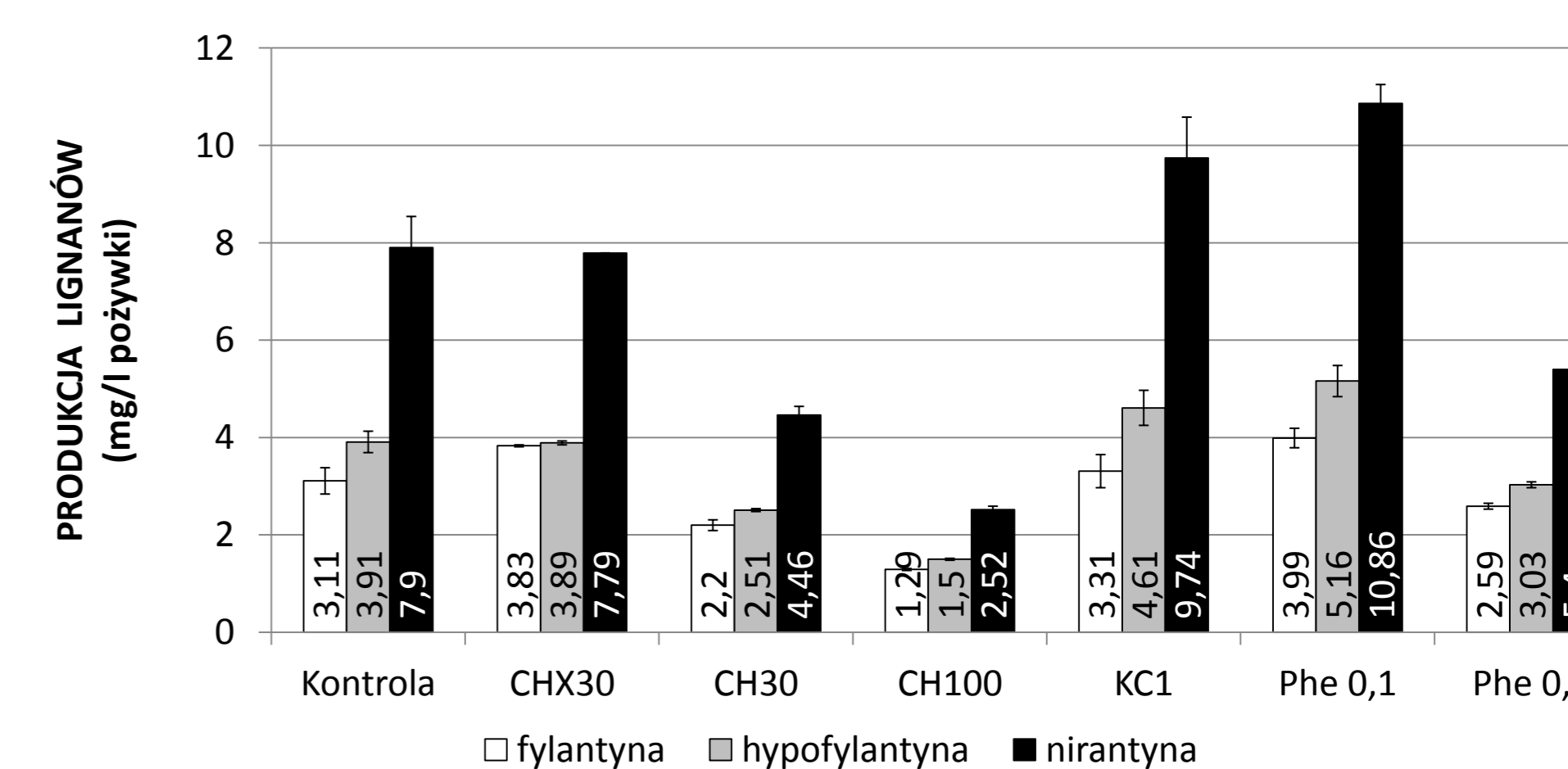
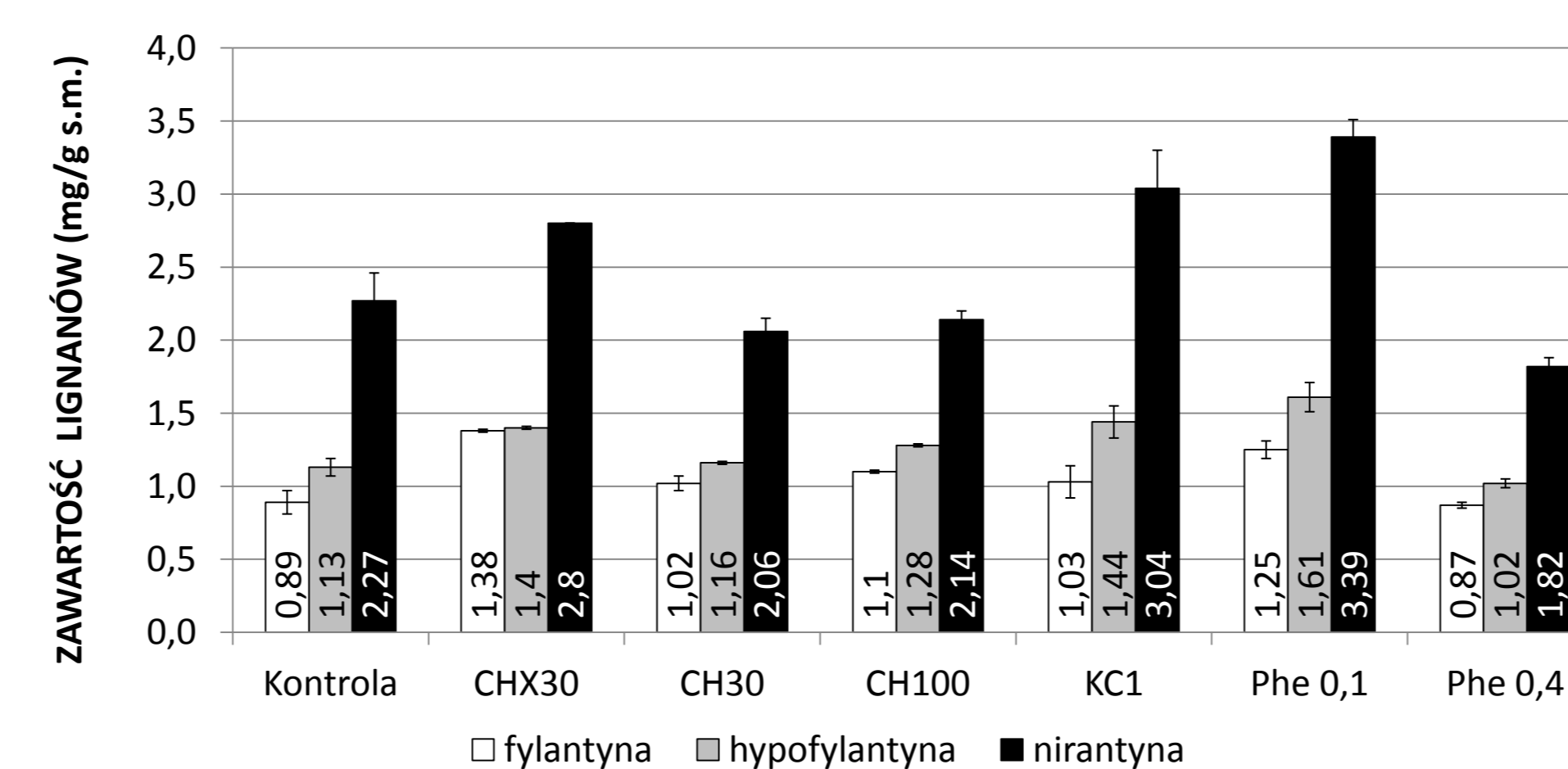
Zawartość (mg/g s.m.) i produkcja (w mg/l pożywki) lignanów w kulturze pędów *P. amarus* hodowanych na pożywce MS<sub>0</sub> z dodatkiem lizatów bakteryjnych i w próbie kontrolnej (wartości średnie, n=3±SD).

Dla wszystkich użytych lizatów bakteryjnych z wyjątkiem PC 7,5 odnotowano wzrost zawartości i produkcji badanych lignanów. Zastosowanie wybranych lizatów umożliwiło ponad 2,5-krotny wzrost produkcji nirantyny, 2-krotny wzrost produkcji fylantyny i 1,4-krotny wzrost produkcji hypofylantyny.



Zawartość (mg/g s.m.) i produkcja (w mg/l pożywki) lignanów w kulturze pędów *P. amarus* hodowanych na pożywce MS<sub>0</sub> z dodatkiem lizatu drożdży (DRO), wody kokosowej (W) i hydrolizatu kazeiny (K) oraz w próbie kontrolnej (wartości średnie, n=3±SD).

Dodatek wszystkich substancji odżywczych zwiększał zawartość i produkcję lignanów w porównaniu do próby kontrolnej. Najlepsze rezultaty osiągnięto przez zastosowanie wody kokosowej, która zwiększyła produkcję fylantyny, hypofylantyny i nirantyny odpowiednio 5,3-, 3,4- i 5,4-krotnie. Powyższe rezultaty są sumarycznym wynikiem pozytywnego wpływu wody kokosowej na przyrost biomasy oraz poziom zawartości badanych związków w biomacie.



Zawartość (mg/g s.m.) i produkcja (w mg/l pożywki) lignanów w kulturze pędów *P. amarus* hodowanych na pożywce MS<sub>0</sub> z dodatkiem chitozanu (CH) i prekursorów biosyntezy oraz w próbie kontrolnej (wartości średnie, n=3±SD).

Kwas cynamonowy 1 mg/l oraz fenyloalanina 0,1 mmol powodowały wzrost zawartości i produkcji badanych lignanów. Chitozan nie wywierał istotnego wpływu na zawartość badanych związków w stężeniu 30 i 100 mg/l jednak negatywny wpływ na przyrost biomasy powodował, że produkcja badanych lignanów była niższa w porównaniu z próbą kontrolną. Dodatek zobojętnionego kwasu octowego w ilości odpowiadającej stężeniu chitozanu 30 mg/l nie wpływał na poziom lignanów w porównaniu do próby kontrolnej.

## PODSUMOWANIE

➤ Zastosowanie wybranych lizatów bakteryjnych pozwoliło na ponad 2,5-krotny wzrost produkcji nirantyny, 2-krotny wzrost produkcji fylantyny i 1,4-krotny wzrost produkcji hypofylantyny w porównaniu do próby kontrolnej.

➤ Dodatek wszystkich substancji odżywczych zwiększał zawartość i produkcję fylantyny, hypofylantyny i nirantyny w porównaniu do próby kontrolnej (odpowiednio 0,65 mg/g s.m., 0,99 mg/l; 0,78 mg/g s.m., 1,19 mg/l; 1,49 mg/g s.m., 2,28 mg/l). Najlepsze rezultaty osiągnięto przez zastosowanie wody kokosowej, która zwiększyła produkcję fylantyny, hypofylantyny i nirantyny odpowiednio 5,3-, 3,4- i 5,4-krotnie (5,25, 4,04, 12,36 mg/l,

odpowiednio).

➤ Wykazano negatywny, proporcjonalny do stężenia, wpływ chitozanu oraz roztworu zobojętnionego kwasu octowego na rozwój biomasy.

➤ Wśród zastosowanych prekursorów biosyntezy kwas cynamonowy w stężeniu 1 mg/l oraz fenyloalanina w stężeniu 0,1 mmol powodowały wzrost zawartości i produkcji badanych lignanów. Wzrost był najwyższy dla nirantyny (Kontrola – 2,27 mg/g s.m., 7,9 mg/l, Phe 0,1 – 3,39 mg/g s.m., 10,86 mg/l, KC1 – 3,04 mg/g s.m., 9,74 mg/l).