

A lignánok elválasztása, azonosítása és mennyiségi meghatározása natív növényi mintákban és a lignántermelés fokozása *Forsythia in vitro* sejttenyészetben

Doktori értekezés

Sedlák Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gyurján István egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Böddi Béla egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: .

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lemberkovics Éva egyetemi tanár, C. Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kéry Ágnes egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Jenes Barnabás tud. főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2011

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS	5
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
II. 1. Lignánok általános jellemzése és biológiai jelentősége	7
II. 2. A lignánok előfordulása	9
II. 3. A lignánok bioszintézise	11
II. 4. A lignánok gyógyászati hatásai és hatásmechanizmusai	13
II.5. A lignánok kémiai analízise	17
II.5.1. Extrakció	17
II.5.2. Spektrofotometriás színreakciók	19
II.5.3. Lignánok azonosítása és meghatározása elválasztási technikákkal	21
II. 6. Az <i>Arctium lappa</i> , a <i>Centaurea scabiosa</i> és a <i>Forsythia</i> fajok botanikai és kémiai jellemzése	22
II. 7. A <i>Forsythia</i> fajok szövettenyésztése	25
III. CÉLKITŰZÉSEK	27
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
IV.1. Anyagok	29
IV.2. Növényi minták	29
IV.3. Növényi szövettenyésztés	30
IV.3.1. <i>Forsythia</i> kallusztenyésztés létrehozása	30
IV.3.2. <i>Forsythia</i> szuszpenziós sejttenyésztés fenntartása	30
IV.3.3. A munkában használt táptalaj kombinációk	31
IV.3.4. Az alkalmazott megvilágítások	32
IV.3.5. A sejkultúra ösztömegének gyarapodása, a „növekedési görbe” vizsgálata	33
IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok	33
IV.4.1. Fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálatok	33
IV.4.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	34
IV.5. Kémiai analízis	34
IV. 5.1. Lignán extrakció	34
IV.5.2. Fenoloid tartalom meghatározás	35
IV.5.3. Antioxidáns kapacitás meghatározása (FRAP)	36
IV.5.4. Összklorofill tartalom mérése	36
IV.5.5. A szuszpenziós kultúrák fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata	36
IV.5.6. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömeg spektrometriás (MS) detektálással	37
IV.5.7. Gázkromatográfiás mérés tömeg spektrometriás detektálással (GC-MS)	38
IV.6. Az eredmények statisztikai értékelése	39
V. EREDMÉNYEK	41
V.1. Lignán extrakció optimalizálása <i>Forsythia x intermedia</i> levélben	41

V.2. <i>Forsythia</i> fajok és fajták leveleinek fenoloid és lignántartalmának, illetve antioxidáns kapacitásának összehasonlítása	42
V.3.A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása.....	46
V.3.1. A lignánösszetétel folyadékromatográfiás meghatározása	46
V.3.2. A lignánok összetételének gázkromatográfiás meghatározása	48
V.3.3. A <i>Forsythia</i> fajok lignánösszetételének vizsgálata.....	52
V.3.4. A <i>Forsythia x intermedia</i> fajták lignánösszetételének vizsgálata.....	53
V.4. A <i>Forsythia</i> fajok és fajták szövettenyészetek létrehozása és lignántartalmának fokozása	56
V.4.1. A <i>Forsythia</i> fajok és fajták szövettenyészetek létrehozása.....	56
V.4.2. Az <i>in vitro</i> kultúrák táptalaj összetételének módosítása hat a lignántartalomra.....	57
V.4.3. A fény hatása az <i>in vitro</i> kultúrák sejt differenciációjára és lignántartalmára.....	66
V.4.4. <i>Forsythia</i> fajok és fajták közti különbség az <i>in vitro</i> kultúrák lignántartalmában (Az optimalizációs kísérletek eredményeinek alkalmazására)	78
V.4.5. A leghatékonyabb lignántermelő szuszpenziós kultúra növekedési görbéje	79
VI. MEGBESZÉLÉS	81
VI.1. A lignán extrakció optimalizálása <i>Forsythia x intermedia</i> fajban.....	81
VI.2. A <i>Forsythia</i> fajok és fajták leveleinek fenoloid és lignántartalma, illetve antioxidáns kapacitása	82
VI.3. <i>Forsythia</i> fajok és fajták lignánösszetételének azonosítása és mennyiségi meghatározása.....	84
VI.4. <i>Forsythia</i> fajok és fajták szövettenyészetek létrehozása és lignántartalmának fokozása	86
VI.4.1. <i>Forsythia</i> fajok és fajták szövettenyészetek létrehozása.....	87
VI.4.2. Az <i>in vitro</i> kultúrák táptalaj összetételének módosítása hat a lignántartalomra.....	87
VI.4.3. A fény hatása az <i>in vitro</i> kultúrák sejt differenciációjára és lignántartalmára.....	89
VI.4.4. <i>Forsythia</i> fajok és fajták közti különbség az <i>in vitro</i> kultúrák lignántartalmában.....	91
VII. KÖVETKEZTETÉSEK	93
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	96
IX. SUMMARY	97
X. IRODALOMJEGYZÉK.....	98
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	113
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114
FÜGGELÉK.....	116

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

12F12S: napi 12/12 óra Fény/Sötét periódus fénycsővel végzett megvilágításnál

2,4-D: 2,4-diklórfenoxiecetsav

4F20S: napi 4/20 óra Fény/Sötét periódus fénycsővel végzett megvilágításnál

8F16S: napi 8/16 óra Fény/Sötét periódus fénycsővel végzett megvilágításnál

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ESPI: Elektrospray ionizáció pozitív ion módban

FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma): A plazma vasion redukáló képessége

GC (Gas Chromatography): gázkromatográfia

HPLC (High Pressure Liquid Chromatography): nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia

IAA (indole-3-acetic acid): indol-3-ecetsav

m/z: tömeg/töltés

MS: tömeg spektrométer

MSA Á1/2, Á1/3: Murashige Skoog táptalaj 2 mg l⁻¹ NAA és 0.2 mg l⁻¹ kinetin tartalommal, egy kettő és egy harmad makro- és mikroelem mennyiséggel

MSA SZ30, MSA SZ60, MSA SZ90: Murashige Skoog táptalaj 2 mg l⁻¹ NAA és 0.2 mg l⁻¹ kinetin tartalommal, 30 g l⁻¹, 60 g l⁻¹ vagy 90 g l⁻¹ szacharóz mennyiséggel

MSA SZ90 Á1/3: Murashige Skoog táptalaj 2 mg l⁻¹ NAA és 0.2 mg l⁻¹ kinetin tartalommal, 90 g l⁻¹ szacharóz és egy harmad makro- és mikroelem mennyiséggel

MSA: Murashige Skoog táptalaj 2 mg l⁻¹ NAA és 0.2 mg l⁻¹ kinetin tartalommal

NAA (1-naphtylacetic acid): naftilecetsav

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): Oxigén gyök abszorbeáló képesség

RSD: relatív standard deviáció

SFE: szuperkritikus fluid extrakció

TEAC (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity): Troloxban kifejezett antioxidáns kapacitás

TFE: trifluor-ecetsav

TMS: trimetilszilil-éter

UV: ultraibolya

I. Bevezetés

Napjainkban a gyógyászatban egyre nagyobb az érdeklődés a természetes eredetű hatóanyagok iránt. Ezek a vegyületek túlnyomórészt a növény másodlagos anyagcseretermékei közül kerülnek ki. Az analitikai módszerek fejlődésének és az igen változatos gyógyászati felhasználhatóságnak köszönhetően nőtt meg a jelentősége ennek a csoportnak, ezen belül a fenoloidok közé tartozó lignánoknak is.

A lignánok gyógyászati alkalmazási lehetőségei igen széles spektrumúak. A népgyógyászatban már több mint ezer éve alkalmazzák, rákellenes szerként vagy hashajtóként. Ezek alapján sok kutató hozzáfogott a lignánok biológiai aktivitásának feltérképezéséhez. A hatóanyagok közül a matairezinol, az arktigenin, illetve ezek glikozidjai, és a pinorezinol valamint a filligenin kerültek a kutatások középpontjába. Biológiai hatásvizsgálatok során igazolódott ezeknek a lignánoknak a rákellenes, HIV ellenes, gyulladáscsökkentő, máj- és idegrendszer védő tulajdonsága, illetve szabadgyök fogó képessége.

A korábban említett lignánok több nemzetségben fordulnak elő jelentős mennyiségben, többek között az *Arctium*, *Centaurea* illetve a *Forsythia* nemzetségekben. Ezek közül az egyik legintenzívebben kutatott nemzetség az aranyfa, *Forsythia*, amelyben a lignánok mennyiségéről és bioszintéziséről egyre pontosabb adatok állnak rendelkezésre.

Az intakt növényekből történő hatóanyag kinyerés mellett az *in vitro* sejtenyészeteket egyre nagyobb mértékben alkalmazzák a másodlagos anyagcseretermékek előállítására, mivel a sejt kultúrákban a biológiailag aktív vegyületek szabályozott, optimalizált körülmények között termeltethetők. Ezen felül könnyebb és hatékonyabb az anyagok kivonása, és olyan új termékek előállítására is nyílnak lehetőségek, amelyek az intakt növényben nem képződnek, kémiai szintézissel történő előállításuk viszont még nem ismert.

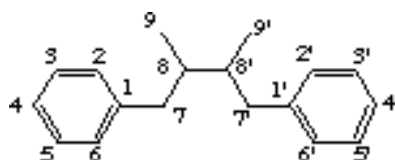
A lignánoknak nagy gyógyászati jelentősége van, viszont nagy mennyiségű és gazdaságos előállításuk nem megoldott. Ezért a munka során célul tűztük ki olyan növény fajok és fajták vizsgálatát, amelyek alkalmasak lehetnek biológiailag aktív lignánok

előállítására. Ennek során a lignánok jelenlétét és mennyiségét *Arctium*, *Centaurea* illetve a *Forsythia* nemzetségekben kívántuk meghatározni, valamint *Forsythia in vitro* sejttenyészek lignántermelését vizsgáltuk.

II. Irodalmi áttekintés

II. 1. Lignánok általános jellemzése és biológiai jelentősége

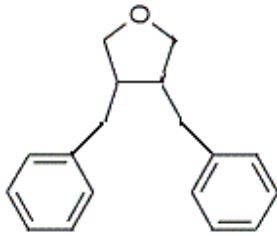
A lignánok első definíciója, Howarth-tól származik (1936). A lignánok, a növényi fenoloidok egyik csoportja, melyeknek szerkezete két fahéjsav származék vagy biogenetikai ekvivalensük egyesüléséből adódik (1. ábra). Többször átértelmezték ezt a meghatározást, így ma már nemcsak a dimerek, de az oligomerek is idetartoznak szeszkvilignánként. Emellett a propil oldalláncok központi 8-as szénatomjai közötti kötésen kívül, egyéb kötési helyeket is magába foglaló csoport, a neolignánok is idetartoznak (Moss 2000).



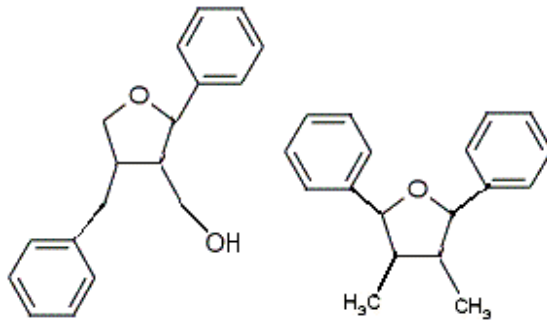
1. ábra Lignánok általános szerkezete

A lignánokat 8 fő csoportba sorolják (2. ábra) az oxigén atom vázon belüli elhelyezkedése és a gyűrűk kialakulása szerint (Umezawa 2003, Suzuki és Umezawa 2007).

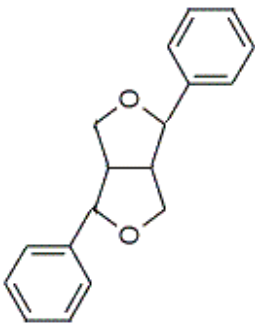
A kutatások eredményeiből kitűnik, hogy a lignánok jelentős szerepet töltenek be a növényi védekezésben antibakteriális, antivirális, antifungális, antioxidáns, valamint rovarölő hatásuk miatt (Ayres és Loike 1990). Fitoalexinként működhetnek, amelyre nemcsak a patogénekkal szemben előnyös tulajdonságaik, de a növényi szöveteken belüli elhelyezkedésük is utal (Burlat és mtsai 2001, Kwon és mtsai 2001). A lucfenyő matairezínolt termel gombafertőzéssel szemben, ami korlátozza a gomba további növekedését (Shain és Hillis 1971). *Aegilops ovata* (Poaceae) szemterméséből izolált lignán csírázást gátló hatást gyakorolt fejes saláta magokra (Lavie és mtsai 1974).



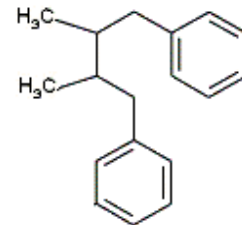
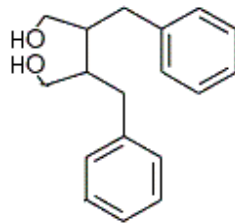
Furán 9(9')-oxigénnel



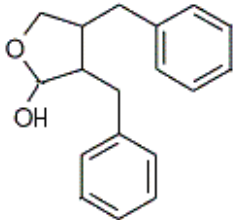
Furán 9(9')-oxigén nélkül



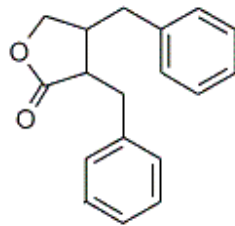
Furofuran



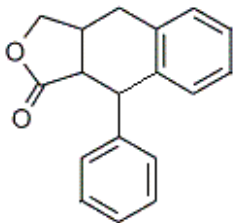
Dibenzilbután 9(9')-oxigénnel és 9(9')-oxigén nélkül



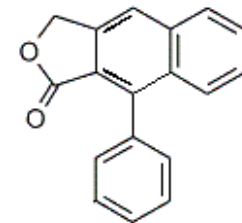
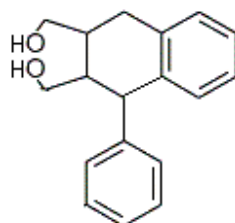
Dibenzilbutirolaktol



Dibenzilbutirolakton



Ariltetralin



Arilnaftalin



Dibenzocikloooktadién 9(9')-oxigénnel és 9(9')-oxigén nélkül

2. ábra A lignántípusok alapvázai Umezawa (2003) cikke alapján

A növény-rovar kölcsönhatásban, a növényevőkkel szembeni védekezésben is szerepet játszanak a lignánok (Schroeder és mtsai 2006). A *Piper futokadzura* és a *Libocedrus vateensis* fajból izolált lignánnál igazolták ezt (Seigler 1998), illetve a *Melia azedarach* fajnál a pinorezinol esetén (Cabral és mti 1999).

A lignánok növényekben betöltött szerepe mellett, a gyógyászati felhasználása is jelentős. A legelső dokumentált orvosi alkalmazásuk több mint ezer éves (Kelly és Hartwell 1954 cikke szerint). Ez az adat Dél Amerikából származik és a *Podophyllum* növény használatával kapcsolatos. Európában egy korai angol orvosi könyv, Bald Felcserkönyve írja le először egy lignánokat tartalmazó növény, a vad turbolya (*Chaerophyllum bulbosum* L.) felhasználását, melynek gyökeréből készült kenőcsöt rák gyógyítására javallták (Cockayne 1961 írása alapján). Kb. 400-600 évvel ezelőtt a Föld két táján, a Himalájában és az amerikai penobszot indiánok egy időben fedezték fel újra a *Podophyllum* fajt, mely rhizomájának alkoholos kivonatából keletkező gyanta hashajtó- és mérgező hatású volt (Imbert 1998). Ennek a növénynek a hatóanyaga, a podophyllotoxin lignán, az alapja az egyik legismertebb kemoterápiában alkalmazott gyógyszernek.

II. 2. A lignánok előfordulása

Lignánok jelentősége az utóbbi évtizedekben nőtt meg az igen sokoldalú gyógyászati hatásuknak köszönhetően. Ennek köszönhetően fellendült a lignánok azonosítása a különböző növény fajokban. Így a korábban elkezdett kemotaxonomiai vizsgálatok köre bővül és idővel lehetővé válik a lignánt termelő növények filogenetikai eloszlásának is az elemzése (Umezawa 2003).

1. Táblázat A matairezinol, az arktigenin, a pinorezinol valamint a filligenin és ezek glikozidjainak előfordulása növény családokban

Családok	Fajok	Azonosítás	Mérés	Hivatkozás
<i>Abietaceae</i>	<i>Picea abies</i> , <i>Abies alba</i>	pin		Shain és Hillis 1971
<i>Apiaceae</i>	<i>Anthriscus sylvestris</i>	argen, mat		Koulman és mtsai 2003
<i>Apocynaceae</i>	<i>Trachelospermum axillare</i>	argen, mat		Nishibe és mtsai 1993
<i>Aristolochiaceae</i>	<i>Pararistolochia flos-avis</i>	fill		Nan-Jun és mtsai 1987
<i>Asteraceae</i>	<i>Arctium lappa</i>		arktiin (7,5%), argen (0,89%)	Liu és mtsai 2010
	<i>Cynara cardunculus</i>	argen, arktiin		Koubaa és mtsai 1999
	<i>Centaurea urvillei</i>	arktiin, matgl	arktiin(1,2%), matgl (5,6%)	Shoeb és mtsai 2007
	<i>Centaurea scabiosa</i>	argen, h-argen, mat, matgl	argen (0,03%), h-argen (0,01%), mat (0,11%), matgl (0,16%)	Ferguson és mtsai 2003
	<i>Helianthus tuberosum</i>	pin		Pan és mtsai 2009
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Ipomoea cairica</i>	argen	argen (0,015%)	Páska és mtsai 1999
<i>Cupressaceae</i>	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	argen		Tanaka és mtsai 2008
<i>Linaceae</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	pin		Willför és mtsai 2006
	<i>Linum flavum</i>	mat		Xia és mtsai 2000
<i>Magnoliaceae</i>	<i>Magnolia fargesii</i>	pin, fill		Miyazawa és mtsai 1992
<i>Myristicaceae</i>	<i>Virola michelii</i>	fill		Vidigal és mtsai 1995
<i>Oleaceae</i>	<i>Forsythia x intermedia</i>	argen, mat, pin, fill	argen (3,3%); fgen (1,3%); mat (1,1%)	Rahman és mtsai 1990a
<i>Taxaceae</i>	<i>Torreya nucifera</i>	argen		Kim és mtsai 2003
<i>Thymelaeaceae</i>	<i>Daphne odora</i>	mat, pin		Okunishi és mtsai 2004

Rövidítések: argen=arktigenin; fgen=filligenin; fill=fillirin; h-argen=hidroxi-arktigenin; mat=matairezinol; matgl=matairezinol-glikozid; pin=pinorezinol; pingl=pinorezinol-glikozid

A lignánok vizsgálata során a hatóanyagok azonosítására nagyobb hangsúlyt fektettek a kutatók, mennyiségi meghatározást a növények kisebb hányadánál végeztek (1. Táblázat).

Számos család tagjaiban mutatták ki a dibenzilbutirolakton lignánokat, amelyek közül az arktigenin glikozidja, az arktiin kemotaxonómiai bélyeg az *Asteraceae* családban (Hansel és mtsai 1964). A *Cynarae* nemzetségen belül a *Carduinae* és *Centaurinae* alnemzetségre jellemző ez a lignán, a többi *Asteraceae* fajban nem található meg.

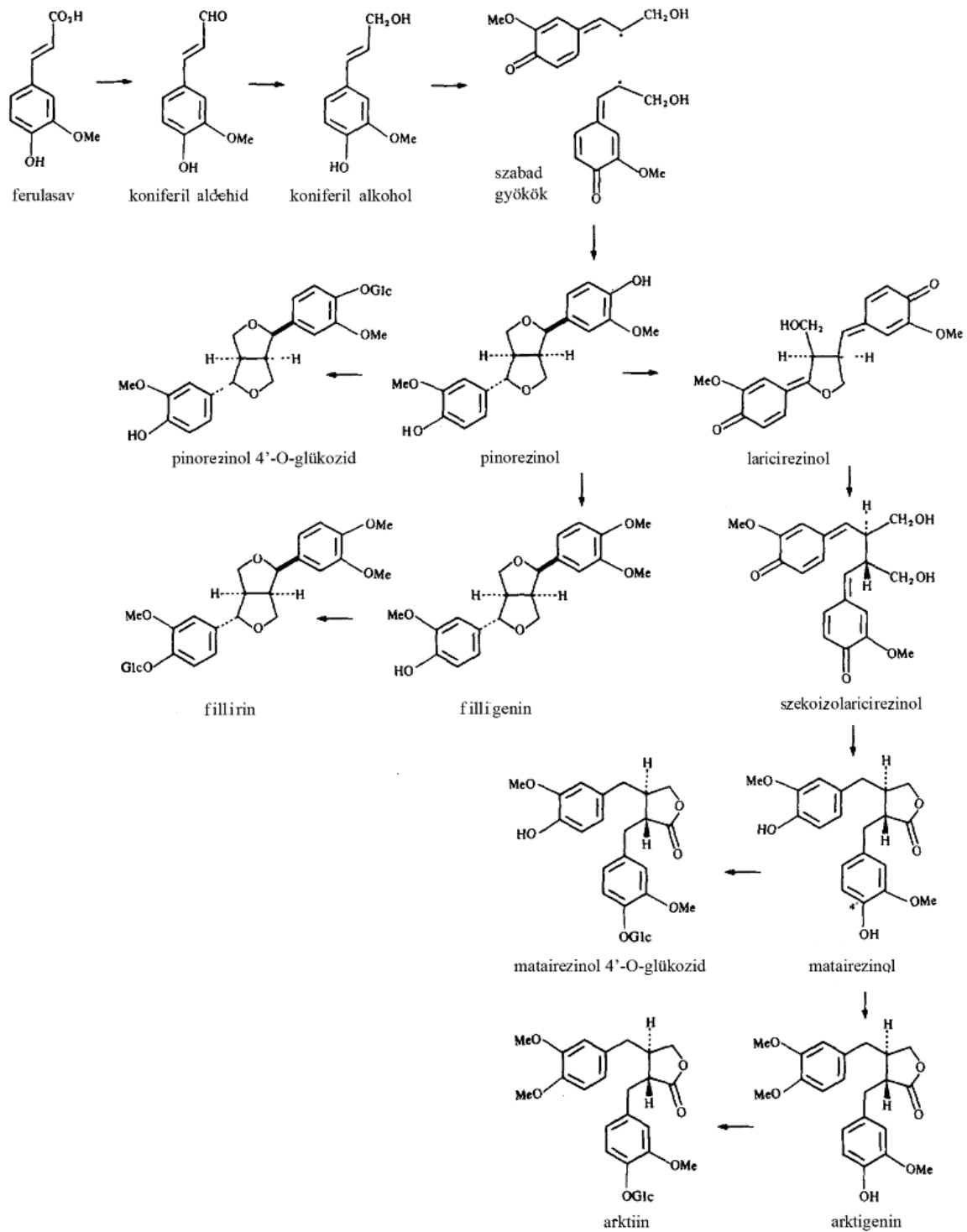
A furofurán típusú lignánok elterjedése általánosnak tekinthető a zárva- és nyitvatermő növényekben is (Umezawa 2003).

II. 3. A lignánok bioszintézise

A lignánok bioszintézise szorosan kapcsolódik a lignin szintéziséhez (Lewis és Sarkanen 1996). A növények többségében a lignin prekursorokkal együtt a sikimisav útvonalon fenilalaninon, majd fahéjsavon keresztül szintetizálódnak (Seigler 1998). A lignin és lignán szintézise a monolignolok kialakulása után tér el egymástól (Raffaelli és mtsai 2002).

A bioszintézis útvonal további kiemelt lépései részleteiben ismertté váltak (3. ábra), ezen eredmények nagy részét *Forsythia* fajok vizsgálata során tárták fel (Rahman és mtsai 1990c). A citoplazmából a sejtfalba szállított koniferil alkohol a nem specifikus oxidáz enzim és az úgynevezett irányító fehérjék közreműködésével sztereoszelektíven szabályozottan alakul át pinorezinollá (Gang és mtsai 1999, Davin és Lewis 2000). A dibenzilbutirolakton lignánok a bioszintézis későbbi lépéseiben jönnek létre és optikailag tiszták, szemben a furán és furofurán lignánokkal, amelyek enantiomerek keverékei és a bioszintézis kezdeti szakaszában keletkeznek (Umezawa 2003).

A következő lépésben a pinorezinol/laricirezinol reduktáz enzim játszik szerepet, amely egy NADPH függő kettős funkciót betöltő fehérje. Ez az enzim alakítja át sztereoszelektíven a pinorezinolt laricirezinollá, illetve a laricirezinolt szekoizolaricirezinollá (Davin és mtsai 1992, Katayama és mtsai 1992, Dinkova-Kostova és mtsai 1996).



3. ábra A vizsgált lignánok bioszintézise (Rahman és mtsai (1990a) illetve Umezawa (2003) cikkei alapján)

Ezen enzim jelentőségét jelzi, hogy a kodoló génjét is meghatározták és ennek segítségével az adott lignánok szöveteken belüli elhelyezkedését is feltárták (Burlat és mtsai 2001, Kwon és mtsai 2001). A szekoizolaricirezinol dehidrogenáz enzim enantioszelektív oxidációval alakítja át matairezinollá a szekoizolaricirezinolt (Xia és mtsai 2001). Metiláció útján keletkezik a matairezinolból az arktigenin, hasonlóan a pinorezinol filligenin átalakuláshoz (Ozawa és mtsai 1993).

A koniferil alkoholtól a matairezinolig tartó útvonal közösnek tekinthető a lignán bioszintézisben, mivel ezt számos növényben leírták. Viszont sztereokémiai szempontból a fajok között nagy változatosságot mutat ez a bioszintézis szakasz (Umezawa 2003). Emellett a különböző növényi szervekben is eltérő sztereoselektívitású lignánok szintetizálódnak, amely a szintézisben résztvevő eltérő izoenzimek jelenlétére utal (Suzuki és mtsai 2002).

A bioszintézis útvonal egyre pontosabb megismerése, a résztvevő enzimek és az irányító fehérjék gén szinten történő feltérképezése lehetővé teszi a bioszintézis célzott módosítását. Kim és munkatársai (2009) a pinorezinol/laricirezinol reduktáz (PLR) enzim működését szabályozták az enzim interferencia RNS-ének a segítségével. A géntranszformált *Forsythia koreana* sejtenyészet sejteiben a PLR-interferencia RNS-t fokozott mértékben expreszáltatták, emiatt a PLR enzim alulműködött. Ennek következtében a piniorezinol-matairezinol átalakulás nem zajlott le, a pinorezinol közel 20-szoros mennyiségben halmozódott fel, ráadásul egy exogén lignán, a szezamin is szintetizálódott.

A lignánok közül a *Forsythia x intermedia* növényben termelődő dibenzilbutirolakton lignánokat, az arktigenint és a matairezinolt, illetve furofurán lignánokat, a filligenint és a pinorezinolt, helyeztük vizsgálataink középpontjába.

II. 4. A lignánok gyógyászati hatásai és hatásmechanizmusai

A lignánok között az arktigenin hatását vizsgálták a legtöbben. Az arktigenin jótékony hatása igazolódott már vastagbél- (Hausott és mtsai 2003, Yoo és mtsai 2010), hasnyálmirigy- (Awale és mti 2006), máj- (Kang és mtsai 2007), bőr- és tüdőrák (Takasaki és mtsai 2000), valamint leukémia (Hirano és mtsai 1994), HIV-vírus (Schröder és mtsai

1990, Vlietinck és mtsai 1998) esetén. Az idegrendszerre gyakorolt jótékony hatása mellett (Jang és mtsai 2002) májvédő (Kim és mtsai 2003), és gyulladáscsökkentő tulajdonságát is leírták (Cho és mtsai 2004, Kang és mtsai 2008).

Hausott és munkatársai szerint (2003) arktigeninnel végzett kezelés apoptózist indukált vastagbélrákos sejtekben. Az apoptózishoz kapcsolódó fehérjék mennyiségi változásait mérték és így kimutatták, hogy az arktigenin hatékonyabb volt az arktiinnél, az arktigenin glikozidos formájánál. Hasonló megállapításokra jutottak Yoo és mtsai (2010) is. Munkájuk során megerősítették, hogy a vastagbélrákos sejtekben az arktigenin rendelkezik a legerősebb apoptózist indukáló hatással az arktiinnel és matairezinnel szemben. A lignánok a hatásukat Wnt/ β katein szignáltranszdukciós útvonal gátlásán keresztül érték el. Szintén az apoptózis indukálásán keresztül hatott az arktigenin Hirano és munkatársai (Hirano és mtsai 1994) *in vitro* kísérleteiben leukémia sejtek esetén.

Awale és munkacsoportja által 2006-ban publikált cikkben arról számolnak be, hogy *Arctium lappa*-ból (bojtorján) sikerült egy olyan anyagot izolálniuk, az arktigenint, mely 100 %-os preferenciális citotoxicitást mutatott „éheztetett” hasnyálmirigy rákos sejteknél. A rákos sejtek toleranciáját csökkentette az arktigenin, ez által fejtette ki jótékony hatását. Tápanyaghiány esetén a hasnyálmirigy rák sejtek nagymértékben expresszálnak kináz B/Akt fehérjét, aminek a foszforilációját gátolja az arktigenin. Ennek következtében a PANC-1 sejtek nekrotizálódnak.

Bőr- és tüdőrák esetén Takasaki és munkatársai (2000) *in vivo* egér kísérletekben igazolták a lignánok rákellenes hatását. Kimutatták, hogy a tüdőráknál az aglikonos forma, az arktigenin erősebb gátlószer az arktiinnél, viszont a bőrrák esetén ezzel ellentétes jelenséget tapasztaltak. A bőrrák vizsgálatánál az aglikonos és a glikozidos lignán forma egyforma mértékben gátolta a papillómák kialakulását, függetlenül attól, hogy az egereknek szájon át adagolták a lignánokat vagy a bőrfelületet kezelték. A szájon át történő lignán bevitelnél az arktiinnél a bélrendszer mikroflórájának enzimeji lehasítják a glukózt, így a véráramba az aglikonos forma jut be (Nose és mtsai 1992 és 1993). Viszont a bőrrák esetén ez nem okozott különbséget az eltérő módon végzett kezelések hatásossága között. Kang és munkatársai (2007) az aglikonos és a glikozidos lignán forma hatékonysága közötti eltérést a két molekula membrán permeabilitása közötti különbséggel magyarázta.

Kang és munkatársai (2007) humán és egér májrák sejteken vizsgálták az arktigenin, matairezinol, valamint ezek glikozidos formáinak hatását. A lignánok az apoptózis és a II fázisú detoxifikáló enzim indukcióján keresztül fejtették ki gátló hatásukat. Az aglikonos formák ebben az esetben is hatékonyabbak voltak a glikozidos formáknál és az arktigenin bizonyult a legerősebb gátlószernek. A két lignán forma hatékonysága közötti eltérést a két molekula membrán permeabilitása közötti különbséggel magyarázták.

Kim és munkatársai (2003) arról számolnak be, hogy *Torreya nucifera* kéregből sikerült arktigenint izolálniuk. *In vitro* vizsgálták ennek hatását széntetrakloriddal (CCl₄) kezelt patkány májsejtekben, és azt tapasztalták, hogy a molekula megköti a szabadgyököket, ezáltal segíti a sejtek gyökfogó kapacitását.

Az arktigenin idegsejteket érintő hatásainak vizsgálata során elsősorban neuroprotektív aktivitását mutatták ki (Jang és mtsai 2002). Idegi szövetenyészetben az arktigenin közvetlenül kötődik a szinaptikus membránon lévő kainát receptorokhoz, gátolva ezzel a központi idegrendszer fő serkentő transzmitterének, a glutamátjának a kötődését, erős aktiváló hatását. A glutamát kötődése ioncsatornákat megnyitva kóros mértékű Ca²⁺ beáramlást, és szabadgyök képződést eredményezhet, ami végső soron az idegsejtek degradációjához vezethet.

Vlietinck és kutatócsoportja (1998) olyan természetes hatóanyagokat (pl. flavonoidokat, lignánokat) vizsgált, amelyek hatásosak lehetnek HIV vírus fertőzés ellen. Az arktigeninről és analógjairól megállapították, hogy a vírus DNS integrációját akadályozza meg. Ezzel szemben Schröderék (1990) azt tapasztalták, hogy az arktigenin virális fehérjék expresszióját, a reverz transzkriptáz enzim működésének gátlását, illetve a topoizomeráz II gátlását idézte elő. Megállapításuk szerint azonban az arktigenin glikozidos formája, az arktiin hatástalannak bizonyult.

Az arktigeninnek gyógyszerként való törzskönyvezése felé is történtek lépések. Említést érdemel, hogy japán kutatók az arktigeninből szintézissel módosított terméket szabadalmaztattak antitumor szerként (Kitarou és mtsai 1989a), kardiotonikumként (Kitarou és mtsai 1989b) és immunoszuppresszív szerként (Kitarou és mtsai 1989c), melynél már a gyógyszeradagolás módja is meghatározott.

A matairezinol, mint az arktigenin közvetlen előanyaga (2. ábra), gyógyászati szempontból szintén fontos molekula. Védő funkciója van mell- és prosztata rák, valamint érrendszeri betegségekkel szemben (Wang 2002, Clavel és mtsai 2006).

A matairezinol kapcsán meg kell említeni, hogy a növényi eredetű fitoösztrogének szerkezetükben hasonlítanak az emlős ösztrogénekhez. A lignánok, mint a fitoösztrogének egyik csoportja, a bélbaktériumok közvetítésével úgynevezett emlős lignánokká alakulnak át. Kimutatták, hogy a bélbaktériumok közül az *Eubacterium* sp. ARC-2, *E. limosum* és *Peptostreptococcus* sp. demetiláló és dehidroxiláló hatása révén a secoizolariciresinol enterodiollá, majd enterolaktonná, míg a matairezinol enterolaktonná alakul át (Jin és mtsai 2007, Lampe és mtsai 2006). Mások is kimutatták, hogy a lignánok fitoösztrogén hatásuk miatt gátolják a hormonfüggő daganatok kialakulását (van der Schouw és mtsai 2000, Yang és mtsai 2001, Potter és mtsai 2002, Saarinen és mtsai 2005). További enterolignán prekursor lehet a pinorezinol is (Pellegrini és mti 2010). Mivel az emberi táplálékban a lignánok legfőbb forrásai az olajos magvak (len és szezám), bogyós gyümölcsök, hüvelyesek és a teljes kiörlésű gabonafélék, ezek fogyasztása javasolt (Lampe és mtsai 2006).

Ishida és munkatársai (2001) *Symplocos setchuensis* szárának etanolos kivonatából izolálták a matairezinolt. A H9 limfocita sejtekkel végzett kísérletekben a matairezinolt, mint anti-HIV molekulát azonosították, a vírusreplikáció gátlása miatt. Ezen felül jelentős antioxidatív tulajdonságáról is beszámoltak (Yamauchi és mtsai 2006).

A korábban említett növényekben a dibenzilbutirolakton lignánok mellett két furofurán lignánt, a pinorezinolt és a filligenint (2. ábra) is kimutattak, és vizsgálták terápiás hatásukat. A pinorezinolról szabadgyök fogó képessége (Chen és mtsai 1999), fájdalomcsillapító hatása (Schmitt és Petersen 2002b) valamint a mikroglia sejtekben kifejtett gyulladáscsökkentő hatása (Jung és mtsai 2010) derült ki. A filligeninről ugyancsak antioxidáns mivolta (Jong és Chau 1998), és vastagbélrák elleni hatása igazolódott (Fini és mtsai 2007). Ez utóbbi lignán glikozidos formája, a fillirin gyulladáscsökkentő (Diaz és mti 2001), vírusgátló (Chen és mti 2004) és antioxidáns tulajdonságú (Zhao és Li 2005).

II.5. A lignánok kémiai analízise

II.5.1. Extrakció

A *Forsythia* nemzetség lignánjainak, különösen az arktigenin és arktiin kivonására alkalmazott kivonási módszerek összefoglalását mutatja be a 2. táblázat, amelyet irodalmi adatok alapján állítottam össze.

A lignánok többsége közepesen poláros molekula, emiatt az általánosan alkalmazott kivonószerek közül az etanol és metanolt alkalmazták az extrakciók során a kutatók. A kivonó elegyek polaritásának a mértékét módosították az alkoholok hígításával (Willför és mti 2006).

A hagyományosan alkalmazott kivonási módszert, a refluxálást a *Forsythia* fajok lignánjainak első azonosításakor már alkalmazták (Kitagawa és mtsai 1984). Egészen napjainkig (Gou és mti 2007) használják ezt a kis eszközigényű módszert, amellyel egyszerre sok minta vonható ki hatékonyan.

Az ultrahangos dezintegrálást a vizsgált nemzetségnél csak az utóbbi évtizedben kezdték el alkalmazni (Schmitt és Petersen 2002a). Hasonlóan a refluxáláshoz, a kutatócsoportok ennél a módszernél sem optimalizálták a kivonást a paraméterek vagy a kivonószerek változtatásával.

A szuperkritikus fluid extrakció (SFE) napjainkban az egyik legjobban fejlődő extrakciós módszer. Olyan alternatív kivonási eljárás, amely lehetővé teszi a szerves oldószerek teljes elhagyását, és az ún. "tisza" technológia bevezetését. A módszer lényege, hogy adott hőmérsékleten és nyomáson szuperkritikus fluid állapotú CO₂-t állítunk elő, és ezzel történik a hatóanyagok kivonása. A módszerrel biztosított a hatóanyagok bomlásmentes kinyerése. A szuperkritikus fluidok sajátosságai (denzitás, viszkozitás, diffúzió) alapján képesek oldani az apoláros szilárd anyagokat. Mindezek ellenére a szuperkritikus fluidok nem tekinthetők "szuper" szolvenseknek, mivel egyes szerves vegyületek folyadékban jobban oldódnak. Ezekben az esetekben célszerű a hőmérsékleti és nyomás értékekkel a folyadék tulajdonságait "utánozni", vagy végső soron a szuperkritikus fluidhoz kis mennyiségben poláros oldószert adni.

2. Táblázat Lignánok kivonása és elválasztása *Forsythia* fajokban

Fajok	Objektum	Extrakció	E. h.	Elválasztás	Lignánok (mg g ⁻¹)	Hivatkozások
<i>F. europaea</i>	Levél	reflux. MeOH		TLC, oszlop kromatográfia	fgen, pin, fill, pgl	Kitagawa és mtsai 1988
<i>F. ovata</i>					argen, mat, arktiin, matgl	
<i>F. intermedia</i>	Levél	reflux. MeOH	E. h.	RP-HPLC	argen (32,8-13,1); fgen (12,9-2,6); mat (11,0-0,8)	Rahman és mtsai 1990c
<i>F. intermedia</i>	Sejtszuszpenzió	70 °C MeOH	E. h.	RP-HPLC	pgl (1,4); matgl (10)	Rahman és mtsai 1990b
<i>F. intermedia</i>	Levél Sejtszuszpenzió	u.d. MeOH vízfürdőben	E. h.	RP-HPLC	mat (5,3); pin (0,14) mat (1,0-2,7); pin (0,6-0,8)	Schmitt és Petersen 2002a
<i>F. intermedia</i>	Sejtszuszpenzió	u.d. MeOH jeges vízfürdőben	E. h.	RP-HPLC	mat (2,24); pin (0,86)	Schmitt és Petersen 2002b
<i>F. koreana</i>	Levél	MeOH		n.i.	argen, fgen, mat, pin, arktiin, fill, pgl, matgl	Kitagawa és mtsai 1984
<i>F. suspensa</i>					fgen, pin, fill, pgl	
<i>F. viridissima</i>					argen, mat, arktiin, matgl	
<i>F. koreana</i>	Levél	u.d. MeOH		RP-HPLC	argen (0,41)	Choi és mtsai 2003
	Szár				argen (0,82)	
	Szár				argen (0,90)	
<i>F. koreana</i>	Szár	u.d. MeOH		pr. izol. CPC	argen; mat	Kim és mtsai 2006
<i>F. suspensa</i>	Termés	u.d. 60% EtOH		pr. izol. HSCCC	fill	Li és mtsai 2005
<i>F. suspensa</i>	Termés	reflux. 50% MeOH		RP-HPLC	pgl, fill, pin, fgen	Gou és mtsai 2007

Rövidítések: argen=arktigenin; CPC=centrifugális megoszlásos kromatográfia; E.h.=enzimatis hidrolízis; EtOH=etanol; fgen=filligenin; fill=fillirin; HSCCC=nagy sebességű ellenáramú kromatográfia; l.a.=liofilizált anyag; mat=matairezinol; matgl=matairezinol-glikozid; MeOH=metanol; n.i.=nem ismert; pgl=pinorezinol-glikozid; pin=pinorezinol; pr. izol.=preparatív elválasztás; reflux.=refluxálás RP-HPLC=fordított fázisú magas nyomású folyadék kromatográfia; SFE=szuperkritikus fluid extrakció; TLC=vékonyréteg kromatográfia; u.d.=ultrahangos dezintegrálás. Liofilizált növényi mintákat alkalmaztak mindegyik esetben.

Az SFE-t a lignánok kivonására először 1997-ben alkalmazták (Lojková és mtsai). Munkájukban a magokból kiinduló kivonás 96%-os hatékonyságú volt, viszont a levélből történő extrakciónál csak 26%-os, a Soxhlet berendezéssel végzett lignán kivonáshoz viszonyítva. A Soxhlet készülékben a forralás során elpárolgó oldószer vonja ki a hatóanyagot a növényi mintákból nagy hatékonysággal, viszonylag hosszú időt igénybevéve. Choi és mtsai (1998) a hőmérséklet és a nyomás változtatásával növelték a hatékonyságot, de csak igen kis mértékben. A CO₂ és az etanol együttes alkalmazása jelentősen fokozta a levélből történő kivonás eredményességét (Slanina és Glatz 2004). A *Forsythia koreana* termés, szár és levél kivonása során Choi és mti (2003) vizsgálták az arktigenin kivonás hatékonyságát az SFE paramétereinek változtatásával. Az optimális metodika során metanolt használtak a széndioxiddal együtt, 20:80 arányban.

A leírtakból kitűnik, hogy ezen irodalmi adatok egymással nem összevethetőek. Így munkámban szükségessé vált e módszerek optimalizálása és összehasonlítása. Különböző, nem egységes sejtfeltérési módszereket alkalmaztak az irodalomban a lignánok, s azon belül az arktigenin és arktiin kivonására. A kutatócsoportok nagy része nem optimalizálta a kivonási eljárásokat, illetve az optimalizálást végző kutatók csak a vizsgált kivonási eljáráson belül folytattak összehasonlító kísérleteket vagy olyan extrakciós eljárással vetették össze a munkáik eredményét, amit más munkákban nem alkalmaztak.

II.5.2. Spektrofotometriás színreakciók

A színreakción alapuló spektrofotometriás mérések nagyszámú minta gyors feldolgozására alkalmasak. Emiatt a nagyobb pontosságú, viszont időigényesebb kromatográfiás módszerek használata előtt mintaszám csökkentő szelekcióra megfelelőek lehetnek.

A fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás spektrofotometriás mérését választottuk ki a HPLC mérésekkel nyert összesített lignántartalom becslésére, mivel az összlignán tartalom meghatározására spektrofotometriás színreakció nem ismert. Az antioxidáns kapacitás megbecslésére alkalmasnak bizonyult az összfenoloid tartalom

meghatározás számos gyógynövény esetén, a két színreakció közötti szoros korreláció miatt (Liu és mtsai 2008).

A másodlagos anyagcsere termékek között a fenoloidok főbb csoportjaiba tartozó összetevőket azonosították a *Forsythia* fajokban. A flavonoidokat a virágsziromban (Tokar és Klimek 1998, 2004) illetve a levelekben mutatták ki (Kitagawa és mtsai 1984 és 1988). Fenilpropanoidokat a termésben (Nishibe 1994, Guo és mtsai 2007, Kuang és mtsai 2009) és a levélben határoztak meg (Kitagawa és mtsai 1984 és 1988). A lignánok nagy arányú jelenlétét levélben, szárban, termésben és hajtásban is leírták (2. táblázat). Ezek alapján feltételeztük, hogy a *Forsythia* fajokban a lignánok meghatározó mennyiségben fordulnak elő a fenoloidokon belül. Emiatt az fenoloid tartalom mérése alkalmas lehet az összesített lignán tartalom becslésére, így az időigényesebb kromatográfias módszereket megelőző előszelektálásra *Forsythia* fajoknál. A fenoloidok mennyiségének meghatározására többféle spektrofotometriás módszert alkalmaznak. Ezek közül a Folin-Ciocalteu reagenssel végzett színreakciót választottuk, mert ez a fenoloid komponensek széles körét kimutatja, szemben a specifikus, egy-egy alcsoport vizsgálatára szabott metodikákkal. A reakció során a fenoloid molekula redukálja a Folin-Ciocalteu reagens foszfor-molibdén- és foszfor-wolframsav komponenseinek keverékét molibdán- illetve wolfram-oxidá (Singleton és mtsai 1999). A kialakult szín intenzitása a reakcióban résztvevő fenoloid molekulák mennyiségével egyenesen arányos koncentráció tartományban.

A fenoloidok, különösen a flavonoidok csoportja közismerten erős antioxidáns. A *Forsythia* fajokban nagy mennyiségben termelődő lignánok antioxidáns kapacitását mindegyik lignán komponens esetén igazolták a kutatók (Kim és mtsai 2003; Yamauchi és mtsai 2006; Chen és mtsai 1999; Jong és Chau 1998). Ezek alapján feltételeztük, hogy a fenoloidok csoportján belül az antioxidáns hatású lignánok jelentős mennyiségben vannak jelen a *Forsythia* fajokban. Így az antioxidáns kapacitást vizsgáló színreakció alkalmas lehet a *Forsythia* fajok összesített lignántartalmának becslésére. Az elterjedt antioxidáns kapacitást mérő reakciók közül a FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma: A plazma vasion redukáló képessége) mérést találtuk a munkánkhöz a legmegfelelőbbnek. A gyakran alkalmazott metodikákat, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity: Oxigén gyök abszorbeáló képesség), TEAC (Trolox-equivalent

Antioxidant Capacity: Troloxban kifejezett antioxidáns kapacitás), és DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil komponenssel végzett antioxidáns kapacitás mérés), irodalmi adatok segítségével hasonlítottuk össze (Cao és Prior 1998; Apak és mtsai 2007). Az ORAC és TEAC metodikák a reakció során képződött oxidatív gyökök gátlásán alapulnak. Ezzel szemben a FRAP és a DPPH eljárás az antioxidatív hatású molekulák azon tulajdonságát méri, hogy milyen mértékben képesek redukálni színes oxidatív formákat, a FRAP esetén Fe^{3+} ionokat Fe^{2+} formává redukálni (Benzie és Strain 1996). A FRAP könnyen kivitelezhető, olcsó és gyors módszer a gyökfogó képesség mérésére, viszont nem képes detektálni az SH csoportot tartalmazó molekulákat. Az ORAC eljárást magas időigénye, a TEAC módszert drágasága és a mérési körülményektől való erős függősége nehezkesse teszi. A DPPH módszer elsősorban hidrofób minták mérésére alkalmas (Floegel és mtsai 2011), emiatt nem volt megfelelő az alkoholos levél kivonataink vizsgálatára. Ezek alapján a levél kivonatok antioxidáns kapacitásának meghatározására a munkánkban a FRAP módszert véltük alkalmasnak.

II.5.3. Lignánok azonosítása és meghatározása elválasztási technikákkal

A *Forsythia* fajok lignánjainak mérésére, detektálására Kitagawa és munkatársai használták először a HPLC készüléket 1984-ben, viszont a munkájuk során mennyiségi meghatározást nem végeztek. A többi kutatócsoport már pontos mennyiségi adatokat is közölt. Általánosságban elmondható, hogy a lignánok esetén a fordított fázisú HPLC esetén vivőelegyként inkább a vizes oldat és acetonitril elegyét alkalmazták a víz-metanol eleggyel szemben, mivel a kromatogramokon megjelenő csúcsok jobban elkülönültek. Az UV detektálás szelektivitása és érzékenysége általában elegendő a lignánok mennyiségi meghatározáshoz, viszont a kis mennyiségben előforduló lignánok méréséhez már másféle detektálási módszer (például MS) alkalmazása is szükséges (Choi és mti 2003).

A gázkromatográfiás mérés esetén a vizsgálatot megelőzően származékkészítés (a leggyakoribb trimetil-szilil) szükséges, mivel a lignánok nem illékonyak. Emiatt a GC alkalmazása időigényesebb a HPLC speciális minta előkészítést nem igénylő módszerénél. Bár a lignánok esetén már 1969-től használják (Ayres és Chater 1969) a GC készüléket, a *Forsythia* fajok lignánjainál először csak 2001-ben alkalmazták (Heinonen

és mtsai 2001). Az eltérő kromatográfiai módszerek párhuzamos alkalmazása megnöveli a vizsgálatok pontosságát és megbízhatóságát (Slanina és Glatz 2004).

II. 6. Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa* és a *Forsythia* fajok botanikai és kémiai jellemzése

A vizsgált fajok lényegi jellemzőit emeltem ki a botanikai leírás során, amely Simon Tibor (1992) és Dános Béla (1997) munkáin alapul.

A *Centaurea scabiosa* és az *Arctium lappa* a Csövesvirágú fészkesek családjába (Asteraceae) tartozik, mely az egyik legfajgazdagabb család, tagjai mindegyik kontinensen megtalálhatóak.

A *Centaurea* nemzetség tagjai két tenyészidejű, szórt levélállású lágyszárú növények. A fészkek szegélyén nagyobb, ferde tölcsérszerű meddő virágok vannak.

A *Centaurea scabiosa*, a vastövű imola pikkelyfüggelékei a nemzetségen belül nagyok, fekete foltjai a pikkelyek hátát kissé takarja, fekete szegélyei vastagabban futnak le, rojtjai hosszabbak. Cserjésekben, bokorerdőkben és száraz gyepeken élő faj. A másodlagos anyagcsere termékek közül 25 féle poliacetilént, 4 féle polién aldehidet és egy flavonoidot, az apigenint izolálták a faj gyökeréből, föld feletti részéből, illetve a virágzatából (Andersen és mtsai 1977). A lignánok közül az arktigenin, hidroxiarktigenin, matairezínol és a matairezínózid mennyiségét határozták meg Ferguson és munkatársai (2003).

A *Arctium* nemzetség fajai két tenyészidejű lágyszárú növények. Karós gyökérral és tölevélrózsában álló levelekkel rendelkeznek, fészkepikkelyeinek csúcsa horgas.

A *Arctium lappa*, a közönséges bojtorján nagy lemezű, akár 50 cm-es, töleveleinek nyele tömör, a szárlevelei kisebb méretűek. Virágzatának főága sátorozó és a fészkek kocsánya 3-10 cm. A bíborlila virágokat hordozó fészkekvirágzata 3-3,5 cm-es, ami a nemzetségen belül nagynak tekinthető. Gyom- és áltéri társulásokban gyakori faj. Hatóanyagainak köszönhetően szerepel a faj gyökere a Magyar nemzeti szabványok gyógynövény- és drogjegyzékében, *Bardanae radix* néven, de hazánkban kívül Európa számos országában is alkalmazzák gyógynövényként (EMA/HMPC/246764/2009). A gyökér anyagcsere termékei között megtalálható az inulin, nyálka illóolaj, poli- és

kéntartalmú acetilének, polifenolok, lignánok és a szterinek. A hatóanyagok vizsgálata során a termésében az arktiint, az arktigenint és a diarktigenint azonosították (Hoon és mtsai 1994). Az arktiin és az arktigenin mennyiségét Liu és munkatársai határozták meg (2010). Ferracane és munkatársai (2010) a faj magjában klorogén savat, kávé savat, cinarint, lappaolt (A, C és F), arktigenint, arktiint és matairezinolt mértek. A növény többi szervében is hasonló komponenseket azonosítottak, a gyökérben klorogén savat, kávé savat, cinarint, kvercitrint, arktiint, kvercetint és luteolint, a levelében klorogén savat, kávé savat, cinarint, kvercitrint, arktiint, kvercetint, rutint és luteolint mértek.

A *Forsythia* fajok közkedvelt és közismert cserjék. Az aranyfa elnevezést a tavasszal nyíló sárga virágokról kapták. A nemzetséget latinul a Királyi Kertészeti Társaság (Royal Horticultural Society) egyik alapító tagjáról, William Forsyth-ról (1737-1804) nevezték el.

Az Olajfafélék (Oleaceae) családjába tartozó *Forsythia* nemzetség tagjai 2-3 méter magasra növő díszcserjék, amelyek hajtásainak belseje üreges vagy bél tölti ki. A 4-10 cm hosszú levelek átellenesen állnak, hosszúkás tojásdad vagy hosszúkás lándzsás alakúak, a hosszú hajtásokon hármasak. A sárga virágok, melyek színe a zöldessárgától a mély narancssárgáig változhat, lombfakadás előtt nyílnak a levelek hónaljában egyhatosával. Termésük bőrnemű vagy kemény, kétkopácsos csőrös tok, amely szárnyas magokat tartalmaz (Simon 1992).

A *Forsythia ovata* Nakai, koreai cserje, amelynek vesszői felfelé törnek és közép sárga virágai általában egyesével fejlődnek ki a hajtáson. Hatóanyagai közül a fenilpropanoid akteozidot, a flavonoid rutint, illetve a matairezinol, matairezinozid és arktiin lignánokat azonosították (Kitagawa és mtsai 1988).

A *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl, bókoló aranyfa, Kínából származó cserje, ahol elsősorban gyógynövényként használják évszázadok óta. Az ívesen lehajló vesszőin parazemölcsök találhatóak. Virágai élénksárgák és kisebb csoportban nyílnak. Kínában a termését alkalmazzák drogként „Laoqiao” néven emellett Japánban és Koreában is elterjedt gyógynövény (Wang és mtsai 2009). A faj termésében Nishibe (1994) szuszpenzazidot (suspensaside), forzitiazidot (Forsythiaside), pinorezinol-glikozidot és fillirint mutatott ki. Ezt erősítették meg Guo és munkatársai (2007) mennyiségi

meghatározással, amelynél R/S-szuspenzazidot (suspensaside), S-szuspenzazid-metil-étert, szuspenzazid A-t, forzitiazidot (Forsythiaside), rutint, pinorezinolt, pinorezinol-glikozidot, epipinorezinolt, epipinorezinol-glikozidot, filligenint és fillirint mértek. A fillirin mellett két újabb lignánt, a forzitialan A és B (forsythialan) molekulákat is leírták a termésben (Piao és mtsai 2008). A filligenin, fillirin és forzitiazid tartalom mellett az izolarcirezinol és a liankiaoxinszid A (lianqiaoxinside A) mennyiségét is meghatározták a termésben (Kuang és mtsai 2009). A termésben a korábban leírt feniletanoid glikozidok mellett három újabb glikozidot (forzitiazid H-J) azonosítottak (Wang és mtsai 2009). A lignánok, flavonoidok és feniletanoidok képviselőin kívül triterpéneket is azonosítottak a termésben (Rouf és mtsai 2001). A levelek kémiai vizsgálatában feniletanoid komponenseket, a szuspenzazidot (suspensaside) és a forzitiazidot (Forsythiaside), flavonoidot, a rutint, valamint lignánokat pinorezinolt, pinorezinol-glikozidot, filligenint és fillirint azonosítottak (Kitagawa és mtsai 1984 és 1988). A virágban fillirin, pinorezinol-glikozid, forzitiazid, rutin és pektin poliszacharidok mellett triterpén savakat (urzolsav és oleanolsav) is kimutattak (Tokar és Klimek 1998).

A *Forsythia viridissima* Lindl., zöldágú aranyfa, szintén Kínából származó, viszonylag alacsony növekedésű cserje, amelynél a vesszők felállóak és az élénk sárga virágoknak gyakran zöldes árnyalati vannak. A levelek kémiai összetételének elemzése során akteozidot, rutint, illetve matairezinolt, matairezinozidot, arktigenint és arktiint mutattak ki (Kitagawa és mtsai 1984 és 1988). Nishibe (1994) akteozid, matairezinozid és arktiin mellett β -hidroxilaktozidot is azonosított a faj termésében. A levélben forzitidot (Forsythide), egy iridoid származékot is leírtak (Iizuka és mtsai 2009). A virágban lignánokat (arktiin és matairezinozid), flavonoidokat (rutin és izokvercitrin), feniletanoidokat (akteozid, urzolsav és β -szitoszterol) mellett viaszt és számos poliszacharidot azonosítottak (Tokar és Klimek 2004).

A *Forsythia x intermedia* (Zabel) két Kínából származó faj (*F. suspensa* és *F. viridissima*) hibridje. Európában, a kertekben és a parkokban igen gyakran ültetett díszcserje. Nagyobb termetű cserje, amelynek vesszői felfelé törnek és nagy, mély sárga virágokat nagyobb csoportban hordoznak tavasszal. Rahman és munkatársai (1990c) másodlagos anyagcsere termékek közül a rutin, matairezinol, arktigenin, pinorezinol és filligenin mennyiségét határozták meg levélben, szárban és termésben.

II. 7. A *Forsythia* fajok szövettenyésztése

Az intakt növényekből nyerik ki leggyakrabban a hatóanyagokat, viszont az *in vitro* növényi sejttenyészeteket is egyre szélesebb körben alkalmazzák, mivel ez a technológia számos előnnyel rendelkezik (Petersen és Alfermann 2001; Arroo és mtsai. 2002; Fuss 2003). Többek között a sejttenyésztés független a földrajzi, klimatikus és szezonális hatásoktól. Emellett steril körülmények között hozható létre és tartható fenn az *in vitro* kultúra, így biztosított, hogy nem tartalmaz szennyező nehézfémeket, herbicideket, peszticideket vagy inszekticideket. Ráadásul a sejt kultúrákban lehetőség nyílik új, az intakt növényben nem szintetizálódó molekulák előállítására is.

A hatóanyagok előállításához az *in vitro* technológiát a nagyléptékű fermentálási eljárásokban alkalmazzák. A nagyléptékű termelés során a hatékonyság érdekében optimalizálják a növényi tenyészetek sejttömeg-gyarapodását és a hatóanyag termelését (Payne és mtsai 1987). A termelés szempontjából fontos, hogy ismert legyen mikor éri el a két folyamat a maximumát a tenyésztési időn belül, mert ezek segítségével meghatározható az optimális átoltási periódushossz és a minta begyűjtési időpont, így növelhető a biomassza illetve a hatóanyag előállítás hatékonysága. A termelés folyamatát általában két fázisra osztják, az első szakaszban a biomassza mennyiségét növelik, majd a második szakaszban a maximális hatóanyag-termelésre törekednek. Az első fázisban a maximális sejttömeg-gyarapodás érdekében egy erre a célra optimalizált úgy nevezett fenntartó tápközeget alkalmaznak. A második fázisban az úgy nevezett hatóanyag termelő tápközeget használják, amit a maximális termelésre optimalizálnak.

A *Forsythia* nemzetségen belül először 1982-ben a *Forsythia suspensa* fajból hozták létre *in vitro* kultúrát morfológiai vizsgálatok céljából (Bader és mtsai 1982, Dewick 1994). Először 1998-ban vizsgálták a másodlagos anyagcseretermékek, a feniletanoid származékok termelődését kallusz tenyészetben (Yamamoto és mtsai 1998). Az általunk is vizsgált lignánok közül a fillirin előállítására a faj kallusz tenyészetét alkalmazták (Liu és mtsai 2003) különböző hormonösszetételű MS táptalajon, fényen fenntartva a tenyészetet. A legújabb kutatásokban nem hatóanyag-termelés céljából, hanem mikroszaporításra alkalmazták ennek a fajnak a tenyészeit (Wang és mtsai 2010).

Rahman és munkatársai (1990b) vizsgálták először a *Forsythia x intermedia* faj sejttenyészetének másodlagos anyagcsere termelését. Ez utóbbi kutatócsoport kalluszt indított levélből, szárból és hajtáscsúcsból, Gamborg's B5 (B5), White's valamint Murashige és Skoog (MS) különböző tápközeg változatain. Kallusz, illetve szuszpenziós sejttenyészet lignántermelését fokozták a táptalaj hormon és ásványi anyag összetételének változtatásával, illetve a megvilágítással.

Schmitt és Petersen kutatócsoportja is fokozta a hatóanyag-termelést a *Forsythia x intermedia* sejt- és szövettenyészetben táptalaj cukor tartalmának változtatásával és elicitorok alkalmazásával. (Schmitt és Petersen 2002 a és b). A fajon belül a fajtát egyedül ez a kutatócsoport jelölte meg cikkében. A *Forsythia x intermedia* faj szuszpenziós tenyészeit leginkább a lignánok bioszintézis útvonalának feltárása során használták (Rahman és mtsai 1990a, Katayama és mtsai 1993, Ozawa és mtsai 1993).

A *Forsythia viridissima* faj kallusz kultúrában feniletanoid származékok és lignán glikozidok termelődését írták le Yamamoto és munkatársai (1998).

III. Célkitűzések

A lignánok gyógyászati szempontból igen jelentős növényi másodlagos anyagcsere termékek, viszont nagy hatékonyságú kinyerésük és előállításuk nem minden esetben ismert, ezért a doktori értekezésben célul tűztük ki:

Hatékony lignán kinyerés és előállítás érdekében a lignánok azonosítását és mennyiségi meghatározását magas lignántartalmú intakt növényi mintákban és a lignántermelés fokozását *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészetekben, nagyléptékű fermentációs termelés céljából.

Céljaink fő vonalakban:

1. Hatékony kivonási és analitikai módszerek kidolgozását a lignánok vizsgálatához.
2. *Forsythia* fajok és fajták lignántartalmában megjelenő különbség meghatározását.
3. *In vitro* sejttenyészetek létrehozását *Forsythia* fajokból és fajtákból és lignántartalmuk fokozását.
4. A fény hatásának a vizsgálatát *Forsythia* szuszpenziós kultúráiban.

Céljaink részleteiben:

1. A lignánok vizsgálatához hatékony módszerek kidolgozását:
 - a) megfelelő kivonás kiválasztása háromféle extrakciós eljárás és négyféle kivonó elegy kombinációjának vizsgálatával a *Forsythia x intermedia* levél kivonatánál,
 - b) előszelekcióra alkalmas spektrofotometriás mérés keresése az fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás meghatározásával a *Forsythia* fajokban és fajtákban
 - c) pontos analitikai módszer fejlesztése HPLC-UV, HPLC-ESPI-MS és GC-MS módszerek esetén *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* terméseiben és *Forsythia* fajok leveleiben.

2. A *Forsythia* fajok és fajták leveleiben a lignánösszetétel és a lignántartalom mennyiségi meghatározását, a további munkákban alkalmazott optimális fajta kiválasztása céljából.
3. A *Forsythia* kallusz- és szuszpenziós kultúrák létrehozását illetve a szuszpenziós kultúrák hatóanyag-termelésének a fokozását:
 - a) tápközegek módosításával, különböző hormon, cukor illetve ásványi anyag mennyiségek alkalmazásával,
 - b) megfelelő fajták kiválasztásával.
4. A *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetben a fény indukálta sejtdifferenciáció és a lignántartalom közötti összefüggés vizsgálata megvilágítás időtartamának változtatásával.

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Anyagok

A lignán standardok (arktigenin, arktiin, matairezinol és matairezinol-glikozid), a színreakción alapuló spektroszkópai méréseknél a Folin-Ciocalteou reagens és a TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-tirazine) a Sigma cégtől származott (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA). A munka során használt egyéb vegyszerek a Reanal cégtől származtak (Reanal Finomvegyszergyár ZRt. Budapest).

IV.2. Növényi minták

Vizsgálatainkhoz az alábbi növényfajokat és fajtákat használtuk:

- *Arctium lappa*
- *Centaurea scabiosa*
- *Forsythia x intermedia* Zabel
 - 'Beatrix Farrand'
 - 'Golden Nugget'
 - 'Karl Sax'
 - 'Lynwood'
 - 'Melisa'
 - 'Minigold'
 - 'Primulina'
 - 'Spectabilis'
 - 'Spring Glory'
 - 'Week-End'
- *Forsythia ovata* Nakai
 - 'Robusta'
 - 'Tetragold'
- *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl
- *Forsythia viridissima* Lindl

Kísérleteinkhez a fenti növények terméseit (*Arcticum lappa*, *Centaurea scabiosa*) vagy leveleit (*Forsythia sp*) használtuk. Az *Arcticum lappa* érett terméseit augusztusban a *Forsythia* leveleket virágzás után, április végén gyűjtöttük a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Karának Botanikus Kertjéből. A *Centaurea scabiosa* terméseket a francia B and World Seed cégtől vásároltuk.

Minden esetben figyeltünk arra, hogy megfelelő számú mintát gyűjtsünk és véletlenszerűen kiválasztott egyedekről történjék a mintavétel, hogy elkerülhessük a mintavételből származó, a későbbi mérések során megjelenő eltéréseket. Termések esetében minimum 6 egyedről történt a begyűjtés, a leveleknél 3 egyedről a csúcsi kb. 30 cm-es hajtásvégekről. A leveleket 4 órán belül lefagyasztottuk majd liofilizáltuk annak érdekében, hogy megakadályozzuk a lebontó folyamatok elindulását és a lignánösszetétel esetleges változását.

IV.3. Növényi szövettenyésztés

IV.3.1. *Forsythia* kallusztenyésztés létrehozása

A *Forsythia* levél darabokat (10x10 mm), 20 (v/v) %-os nátrium-hipoklorit oldattal 5 percig majd 70 % (v/v) etil alkohollal 5-7 percig sterilizáltuk, ezután háromszor mostuk steril desztillált vízben. Ezt követően mindegyik *Forsythia* fajból és fajtából három Petri csészébe helyeztünk mintákat, Petri csészénként hat levél darabot. B5 szilárd táptalajt (0.5 mg l⁻¹ 2,4-D (2,4-diklórfenoxiecetsav), 8 g l⁻¹ agar, 30 g l⁻¹ szacharóz) használtunk a kallusz indításához (Gamborg és mtsai 1968; Függelék). A kalluszokat sötétben tartottuk fenn szobahőmérsékleten (20-25 °C) és 3 hetente friss tápközegre helyeztük át.

IV.3.2. *Forsythia* szuszpenziós sejttenyésztés fenntartása

A B5 táptalajon indukált kalluszokat fenntartás céljából B5 és Murashige-Skoog táptalajon növesztettük tovább (Murashige-Skoog 1962; Függelék). A sejtsuszpenziókat stabil, folyamatosan fenntartott kalluszokból indítottuk el 100 ml folyékony tápközeg tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer lombikban, a kiindulási táptalajnak megfelelően. Minden kalluszból minden esetben három sejtsuszpenziót indítottunk. A kalluszokat három illetve a szuszpenziókat kéthetenkénti átolással tartottuk fenn. A sejtsuszpenziók

egy részét folyamatos sötétben, míg más részét természetes megvilágítás mellett tartottuk és 110 rpm sebességgel rázattuk (G10 Gyrotary Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, N.J. USA).

IV.3.3. A munkában használt táptalaj kombinációk

A sejteszészet lignántartalmának fokozása érdekében végzett táptalaj optimalizáció során az Murashige-Skoog táptalaj hormon, cukor illetve ásványi anyag tartalmát változtattuk meg.

Irodalmi leírás alapján választottuk ki a hormonösszetételt a táptalaj optimalizációhoz. Ennek során, 3 féle auxint, indolecetsavat (IAA), naftalinsavat (NAA), 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) és egy fajta citokinint, kinetint alkalmaztunk (3. táblázat).

3. táblázat A táptalaj optimalizáció során alkalmazott hormonösszetételek. Jelölések: Alkalmazott táptalaj változatok: B5, MSA, MSB, MSC; Alkalmazott hormonok: IAA: indol-3-ecetsav, NAA: naftilecetsav, 2,4-D: 2,4-diklórfenoxiecetsav.

Táptalaj változatok	Hormonok (mg l ⁻¹)				Hivatkozások
	IAA	NAA	2,4-D	Kinetin	
B5			0.5		Páska és mtsai 1999
MSA		2		0.2	Rahman és mtsai 1990b
MSB		1	2	0.2	Petersen és Alfermann 1988
MSC	1	0.1		0.2	Orbán és mtsai 2008

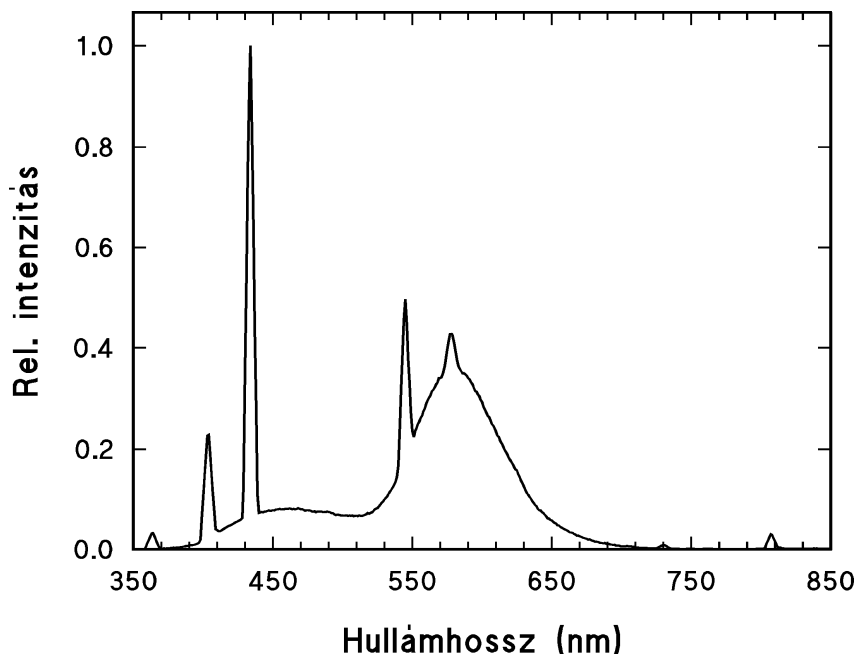
A táptalaj optimalizációban a hormonösszetétel vizsgálata során az MSA táptalajt találtuk megfelelőnek a szuszpenziós kultúra lignántartalmának fokozására. Emiatt a további táptalaj optimalizációs kísérleteinkben az MSA tápközeget alkalmaztuk. A táptalaj szacharóz, mennyiségét növeltük az eredeti 30 g l⁻¹ (MSA Sz30) kétszeresére (MSA Sz60) és háromszorosára. (MSA Sz90).

A tápközeg ásványi anyag, makro- és mikroelemeinek mennyiségét az eredeti felére (MSA Á1/2) és harmadára (MSA Á1/3) csökkentettük.

IV.3.4. Az alkalmazott megvilágítások

A fénynek a sejtkultúra lignántartalmára és differenciációjára gyakorolt hatását kívántuk elemezni a megvilágítási kísérleteinkben. Ezekben három féle csoportot alakítottunk ki. Az első csoportban a sejttenyészeteket sötétben tartottuk fenn. A második esetben a kultúrákat $10\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intenzitású természetes fény világította meg, amelynél a megvilágítási időtartam és intenzitás az évszakok és napszakok szerint változott. A harmadik csoportban fénycsővel (Tungsram Warm White) világítottuk meg a sejttenyészeteket ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (4. ábra). Ebben az esetben háromféle megvilágítási periódust, 4/20; 8/16; 12/12 óra Fény/Sötét periódust alkalmaztunk. Mindegyik csoportnál 6 héten át tartottuk fenn a sejttenyészeteket és kéthetente vettünk mintákat.

Munkánk során a fény jelenlétének illetve a hiányának a sejtkultúra lignántartalmára és differenciációjára gyakorolt hatását a sötétben valamint a természetes fényen fenntartott sejttenyészetek segítségével vizsgáltuk. Viszont a fény hatásának pontosabb megismeréséhez pontos paraméterekkel jellemezhető fénycsővel történő megvilágítást használtunk, további részletekért többféle megvilágítási periódusidőt alkalmaztunk (Smollny és mtsai 1998).



4. ábra Tungstram Warm White fénycső emissziós spektruma.

A fénycsővel végzett megvilágítás kontrollált körülményeket biztosított a természetes fényen történő fenntartáshoz képest, mert ebben az esetben a megvilágítás ideje és a fény spektruma is pontosan ismert. A fénycső ereje közel kétszerese a természetes fényének, ami még nem vált ki fotodegradációt, viszont fotoszintetikusán aktív, főleg a kék tartományban (443 nm) emittált fény miatt. A vörös tartományban (600 nm felett) emittált fény intenzitása kicsi, ezért a fénycsövek hőtermelése elhanyagolható (4. ábra).

IV.3.5. A sejkultúra ösztömegének gyarapodása, a „növekedési görbe” vizsgálata

A növekedési görbe elkészítéséhez egyforma mennyiségű innokulumot helyeztünk adott mennyiségű folyékony táptalajba a kísérlet elindításánál.

Forsythia x intermedia esetén 1 gramm sejtszuszpenziót 100 ml folyékony MSA Sz30 táptalajt tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer lombikba (24 db) helyeztünk, amelyeket természetes fényen tartottunk fenn.

A *F. i. 'Week End'* esetén 0.5 gramm innokulumot tettünk 50 ml folyékony MSA SZ90 Á1/3 táptalajt tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikba (24 db). A sejkultúrákat fénycső alatt neveltük napi 8 órás megvilágítást alkalmazva (*8F16S = napi 8/16 óra Fény/Sötét*).

Mindegyik növekedési görbe készítésénél 21 napon keresztül gyűjtöttük be a mintákat és vizsgáltuk az *in vitro* kultúrák sejtömeg gyarapodását. A növekedési görbék adatait 3 naponként 3 lombik begyűjtésével kaptuk, amelyeket 100 ml tápközegre vonatkoztattunk. A szuszpenziók begyűjtésekor vákum szűrés után mértük meg a friss tömeget. A növényi anyagot mélyhűtőbe helyeztük, majd fagyasztás után liofilizáltuk (100 órán át), ezt követően állapítottuk meg a száraz tömeget.

IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok

IV.4.1. Fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálatok

A szuszpenziós kultúra különálló sejtjeit és néhány tíz sejtből felépülő aggregátumait vizsgáltuk fluoreszcencia mikroszkóppal (Olympus BH-2-RFCA). A

sejtkultúrák részleteiről 20-as nagyításban, kék gerjesztő fényt alkalmazva készítettünk képeket.

IV.4.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a sejtszuszpenzió néhány mm átmérőjű aggregátumait alkalmaztuk mintaként, így biztosítva a fixálószer egyenletes és gyors penetrációját. A glutáraldehidben (2%, 3 óra) és ozmium-tetroxidban (1%, 2 óra) fixáltuk, 70 mM foszfát-puffert (pH 7,2) alkalmazva. A fixált anyagot etanol (25; 50; 70; 90; 96; 100 %) sorban dehidratáltuk. Ezt követően propilénoxidban, Durcupán ACM I. és propilénoxid keverékben, majd 16 órát Durcupán ACM I-ben inkubáltuk a fixált mintákat. Ezután Durcupán ACM II-be kerültek a minták, majd 2,5 napig 60 °C-on polimerizáltattuk a műgyantát. Az ultravékony (70 nm) metszeteket Reichert-Jung ULTRACUT E ultramikrotommal (Bécs, Ausztria) készítettük. A mintákat Hitachi 7100 TEM (Tokio, Japán) mikroszkóppal vizsgáltuk, 75 kV gyorsítófeszültség mellett.

IV.5. Kémiai analízis

IV. 5.1. Lignán extrakció

Az irodalom nem egységes a lignánok feltárására vonatkozó módszereket illetően. Annak érdekében, hogy a leghatékonyabb módszereket megtaláljuk, összevetettük az irodalomban leggyakrabban alkalmazott módszereket és kivonószereseket. A három leggyakrabban használt módszert (szonikálás, refluxálás, SFE) hasonlítottuk össze, kombinálva négy féle kivonó eleggyel, 100 % (v/v) és 60 % (v/v) etil- ill. metanollal. *Forsythia x intermedia* levélmintán végeztük el a kivonás optimalizálást, így együttesen 12 féle kivonási eljárást vetettünk össze.

Minden esetben a növényi anyagot mélyhűtőbe helyeztük, majd -20 °C –on történő fagyasztás után liofilizáltuk, 5 napig (Jencons Freeze Dryer, Bedfordshire, Nagy-Britania). Az így kapott vízmentes levélmintákat dörzsmozsárban porítottuk el, majd 0.20 gramm tömegű részletét használtuk fel mindhárom kivonási módszernél.

Az első módszerben, az ultrahangos dezintegrálás (Szonikálás) (Soniprep 150) során a levélmintát 5 percig tártuk fel 5 ml kivonó elegyben, amelyet jeges vízfürdőben hűtöttünk. Az első szonikálás után az oldatot 4000 fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk

majd a felülúszó leöntése után a leülepedett résszel a feltárást még kétszer megismételtük. A felülúszókat összegyűjtöttük és 15 ml-re kiegészítettük.

4. Táblázat A kivonások optimalizálása során összehasonlított módszerek és kivonószerek kombinációja. Kivonási eljárások: Szonikálás: ultrahangos dezintegrálás; Refluxálás: visszafolyós hűtő melletti forralás; SFE: szuperkritikus fluid CO₂-dal történő extrakció. Kivonószerek: 100 % EtOH, 60 % EtOH, 100 % MeOH, 60 % MeOH.

Kivonási eljárások	Kivonószerek			
	100 % EtOH	60 % EtOH	100 % MeOH	60 % MeOH
Szonikálás	+	+	+	+
Refluxálás	+	+	+	+
SFE	+	+	+	+

Második esetben a visszafolyós hűtő melletti forralásnál (Refluxálás) a mintát 1 órán át forraltuk 5 ml kivonószemben. Ezt a kivonási lépést kétszer ismételtük, így 15 ml összegyűjtött felülúszót kaptunk.

A harmadik eljárásnál a szuperkritikus CO₂-dal történő extrakció (SFE) 30.4 MPa nyomáson és 40 °C-on történt Choi és munkatársai cikkének nyomán (2003). A hőmérsékletet előkísérleteink során állapítottuk meg. A mintatartó henger belső térfogata 0.5 ml, szűrőjének pórusátmérője 0.4 mm. A készülék (ISCO SFX 2-10, USA) egyik pumpája CO₂-t tartalmazott, a másik a négy féle alkoholos kivonó elegyek egyikét, a CO₂/alkoholos kivonószerek aránya 75/25 (v/v). A feltárási ideje 30 perc statikus, majd szintén 30 perc dinamikus fázisból állt, mely utóbbi szakasz hosszát elővizsgálataink alapján határoztuk meg. Az áramlási sebesség 1.6 ml/perc volt. Az összegyűjtött kivonatot 15 ml-re egészítettük ki.

IV.5.2. Fenoloid tartalom meghatározás

Singleton és munkatársainak (1999) cikkében leírt eljárást alapul véve, Folin-Ciocalteu reagens segítségével határoztuk meg a mintáink fenoloid tartalmát. A vizsgált minta fenoloid tartalmának hatására megjelenő színt 30 perc elteltével,

spektrofotométerrel (Pharmacia LKB) mértük 700 nm-en és standardként galluszsavat használtunk (Turkmen és mtsai 2006).

Reagens:

- 80 ml H₂O
- 5 ml Folin-Ciocalteu reagens (foszfor-wolframsav és foszfor-molibdénsav keveréke)
- 15 ml 20 % (m/v) NaHCO₃ oldat

Egy minta vizsgálatához 5 ml reagenst és 1 ml vizsgálandó kivonatot használtuk.

IV.5.3. Antioxidáns kapacitás meghatározása (FRAP)

A mintáink antioxidáns kapacitását a FRAP reagenssel határoztuk meg Benzie és Strain (1996) cikke alapján. Ezen reakció során a 4 perc után kialakuló színt mértük meg spektrofotometrián 593 nm-en. Standardként aszkorbinsavat használtunk.

Reagens:

- 20 ml 3 mM Acetát puffer, pH=3,6
- 2 ml 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-tirazine) 40 mM HCl oldatban
- 2 ml 20 mM FeCl₃·6H₂O

FRAP reagensből 3 ml-t felmelegítettük 37 °C-ra, majd a kivont mintákból 10 µl-t használtunk fel egy-egy vizsgálatához.

IV.5.4. Összklorofill tartalom mérése

A sejtenyészet 0,2 g friss tömegét 4 ml metanollal 0 °C-on, dörzsözősárban eldörzsöltük és centrifugáltuk 5 percig (4000 rpm). A felülúszóban a klorofill-a és b pigmentekhez tartozó adatokat spektrofotométerrel mértük 665.2 és 652 nm-n. A klorofill tartalmat Porra és munkatársainak cikke alapján számoltuk ki (Porra és mtsai 1989), a következő egyenletek alapján:

$$Kl-a = 16,29 * E_{665,2} - 8,54 * E_{652,0}$$

$$Kl-b = 30,66 * E_{652,0} - 13,58 * E_{665,2}$$

$$Kl-a + Kl-b = 22,12 * E_{652,0} + 2,71 * E_{665,2}$$

IV.5.5. A szuszpenziós kultúrák fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata

Az szuszpenziós kultúra 0,2 g friss tömegét 50% (v/v) glicerint és 50% (m/v) szacharózt tartalmazó Na₂HPO₄ – KH₂PO₄ pufferben (pH 7.2), 0 °C-ra hűtött

dörzsmozsárban homogenizáltuk. A homogenátumot 4 réteg gézlapon megszürtük, majd fluoreszcencia mérőcsövekbe pipettáztuk

A fluoreszcencia emissziós és gerjesztési spektrumokat Jobin Yvon – Horiba Fluoromax 3 (Párizs, Franciaország) típusú spektrofluoriméterrel mértük.

Az emissziós spektrumok mérése közben a minták folyékony nitrogénben voltak. Az emissziós és gerjesztő rés nagyságát 2, illetve 5 nm-re állítottuk. A gerjesztő fény hullámhossza 440 nm volt. Az adatgyűjtés 0,5 nm-enként történt. Az integrációs idő 0,1 s volt. Mintánként 3 spektrum átlagát számoltattuk automatikusan a műszerrel. A méréseket 3 különböző szuszpenziós kultúrából vett mintán ismételtük meg. Az emissziós spektrumokat korigáltuk a spektrofluoriméter hullámhossz függvényében változó érzékenységére.

A spektrumokat SPSEV V.3.11 programmal (Bagyinka Csaba, MTA SZBK Biofizikai Intézet) dolgoztuk fel. Öt pontos lineáris simítást, alapvonal korrekciót alkalmaztunk.

IV.5.6. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömeg spektrometriás (MS) detektálással

A TSQ QuantumAMTriple Quadrupol Mass Spectrometer típusú, Thermo Finnigan gyártmányú (River Oaks Parkway, San Jose, CA, USA) készülékkel mértünk, amihez Surveyor MS pumpa, automata mintaadagoló és PDA5 detektor tartozik.

Az elválasztást GraceSmart RP18 (5 μm), 150 x 4.6 mm (Grace Davison Discovery Sciences Lokeren, Belgium) oszlopon végeztük. A következő oldószereket alkalmaztuk: eluens A=acetonitril:0.07M ecetsav 15:85 (v/v), eluens B=acetonitril:0.07M ecetsav 85:15 (v/v). Az alábbi gradiens program szerint vizsgáltuk a hatóanyagokat: 0 perc: 15% B, 5 perc: 30% B, 12 perc: 44% B, és 20 perc: 60% B. A mérés során az áramlási sebesség: 1 ml perc⁻¹ volt, az injektált mennyiség: 20 μl . Az UV detektálás 280 nm-en történt.

A mérés során az MS detektor paraméterei a következők voltak: elektropray ionizáció, pozitív ionmód, 140-700 m/z tömegtartomány, N₂ szárítógáz sebessége 8 l

perc⁻¹, a kapilláris feszültség 3000 V, fragmentációs feszültség 80 V, fragmentáló gázként Argont alkalmaztunk.

IV.5.7. Gázkromatográfiás mérés tömeg spektrometriás detektálással (GC-MS)

IV. 5.7.1. A készülék paraméterei és az elválasztás körülményei

A méréseket a SATURN II GC-MS típusú, Varian gyártmányú (Walnut Creek, USA) készüléken végeztük, amely ioncsapda rendszerű tömeg szelektív detektorral, Varian 8200 automata mintaadagolóval és változtatható hőfokú injektorral rendelkezik.

Az elválasztásokat SGE BPX5 (30m x 0,25mm, 0,25 µm filmvastagságú) oszlopon végeztük. A vivőgáz hélium volt (1,5 ml perc⁻¹). A transfer line hőfoka 280°C volt.

5. táblázat A GC paraméterei: az injektor és a oszlop fűtési programja

Oszlop				Injektor			
Lépcső	°C	°C/perc	Idő/perc	Lépcső	°C	°C/perc	Idő/perc
1	60	0,0	2	1	60	0,0	2
2	120	20	3	2	320	180	1,44
3	155	6,0	5,83	3	320	0,0	5
4	155	0,0	10,00				
5	250	13,0	7,30				
6	250	0,0	12,00				
7	330	20	4,00				
8	330	0,0	10,00				

Mérési paraméterek: a tömegtartomány: 50-650 amu, Fil/Mul késleltetés: 420 sec. A tömegspektrométer adatfelvételi sebessége egységesen 1,0 sec/scan volt.

A lignánok elválasztása kis illékonyságuk miatt származékkészítés után történt. Az illékonyságuk növelésére trimetilszilil-éter (TMS) származékaikat állítottuk elő. Ennek során a lignánok szabad hidroxil csoportjainak oxigén atomjaihoz egy-egy trimetilszilil (-SiMe₃) molekula kapcsolódik vízkilépés mellett. A származékkészítés termosztálható, a kémcsövekkel egyező méretű fémbetéteket tartalmazó kályhákban (Kutesz, Hungary) történt. A TMS származékok elkészítése előtt a mintákat oximáltuk.

Ennek célja a mintákban jelenlévő redukáló mono- és diszacharid izomerek számának csökkentése. Ezzel a lépéssel a sok izomer csúcs helyett a redukáló szacharidok csak két csúccsal detektálhatók, egyszerűsítve az azonosításukat.

Mintaelőkészítés:

A mintából 5 ml-t mértünk be és a teljes víztelenítés után származékkészítésnél elvégeztük az oximmá, majd szilil származékká alakítást (Füzfai és Molnár-Perl 2007).

IV. 5.7.2. Származékkészítés

Oximálás:

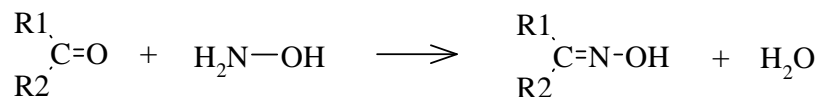
A 2,5% hidroxilamin.HCl oldatot 0,5 g hidroxilamin.HCl-nak 20 ml, előzetesen desztillált piridinben való oldásával készítettük. Ebből 500 µl-t adtunk a bemért mintához, az oximmá alakítás 70°C-on 30percig történt.

Szililezés:

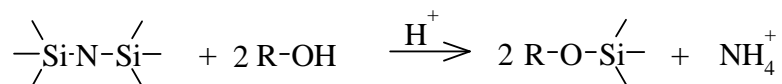
Az oximálást követően 900 µl HMDS-t és 100 µl TFE-t adtunk a mintához. A szilil-származékká alakítás 100°C-on 60 percig történt.

A származékká alakítás reakciói:

- az oximálás



a szililezés



IV.6. Az eredmények statisztikai értékelése

Az adataink háromszori, egymástól független mérés eredményeinek az átlagai. Excel programot használtuk az adataink feldolgozásához és a statisztikai értékek kiszámolásához (átlag, RSD%, szórás), emellett a diagramok elkészítéséhez is. A minták jellegétől és a kísérletben alkalmazott módszertől függ, hogy mely RSD% illetve szórás értékeket tekinthetjük elfogadottnak az irodalomban. Az *Arctium* és *Centaurea* terméseknél illetve a *Forsythia* leveleknél az extrakció optimalizálása és a lignánok

azonosítása és mennyiségi meghatározása esetén a 10 alatti RSD% az elfogadott (Choi és mtsai 2003). A *Forsythia* leveleknél alkalmazott spektrofotometriás színreakciónál az irodalomban fellelt szórás értékek széles spektrumon mozognak. A fenoloid tartalomnál 0,06-3,24 mg g⁻¹ szórás értékeket találunk (Turkmen és mtsai 2006) illetve az antioxidáns kapacitás esetén 0,24-0,56 mg g⁻¹ közötti a szórás (Tadhani és mtsai 2007).

Az *in vitro* kultúrák sajátosságából fakad, hogy az intakt növényekéhez viszonyítva nagyobbak az irodalomban megjelent szórás értékek vagy az eredményeket tág intervallumként közlik és nem határoznak meg elkülönülten szórást (Schmitt és Petersen 2002 a és b).

A sejtenyészetek összklorofill mérésénél viszonylag szélesebb intervallumban elfogadottak a szórás értékek az *in vitro* rendszer nagyobb fokú diverzitása miatt.

A *Forsythia* fajták lignán összetétel szerinti szelekciójának megkönnyítésére alkalmaztuk a Biplot analízist a levélmintáknál. A PCA (Principal Component Analysis) statisztikai módszert a SYN-TAX programmal végeztük el (Podani 1997). Ennek lényege, hogy egy n dimenziójú koordináarendszert hozz létre, amelyben a változókat dimenzióként alkalmazza és ezt redukálja két dimenzióra, amelyben a vektorok elhelyezkedése és nagysága jellemzi az eredeti adatok varianciáját és belső szerkezetét. A koordináarendszerben a pontok a mintákat jelölik, ebben az esetben a *Forsythia* fajtákat, a vektorok a változók hatását ábrázolják, jelen elemzésnél a lignánokét. A biplot grafikai ábrázolásánál a párhuzamos vektorok hasonló hatású változókat jelölnek, még az egymásra merőleges vektorok olyan változókat jelképeznek, amelyek hatásai függetlenek egymástól. Ha a koordináarendszerben a vizsgált adatok (minták) egymástól jól elkülöníthető csoportokba tömörülnek, ebben az esetben az alkalmazott változók alkalmasak a vizsgált adatok kategorizálására.

V. Eredmények

V.1. Lignán extrakció optimalizálása *Forsythia x intermedia* levélben

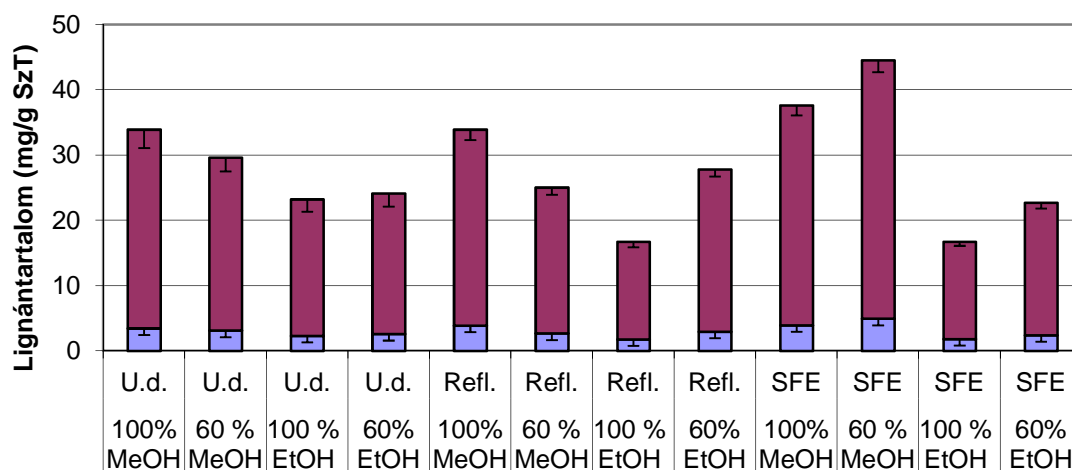
Több kutatócsoport is vizsgálta korábban a *Forsythia* fajok hatóanyagtartalmát, és azon belül az arktigenin és arktiin mennyiségét. Azonban az egyes kutatócsoportok által használt lignán kivonási és elválasztási módszerek nagyon különbözőek (2. Táblázat). Mivel nem csak az alkalmazott módszerek, de azok hatékonysága is változatos képet mutatott első lépésként célul tűztük ki, hogy megtaláljuk az optimális lignán kivonási módszert.

Első lépésként a leghatékonyabb lignán kivonási módot határoztuk meg, majd a második lépésben az adott módszer egyéb paramétereit (mintaszám, szükséges idő) is figyelembe véve választottuk ki a megfelelő kivonási eljárást és kivonószert a további munkákhoz. Az első lépésben a három leggyakrabban használt módszert (ultrahangos dezintegrálás, refluxálás és SFE) hasonlítottuk össze, kombinálva négyféle alkoholos kivonó eleggyel (100 és 60 %-os etanol és metanol). Összesen tizenkét féle kivonási módot hasonlítottunk össze. Az SFE esetén a kivonásnál a széndioxidot alkohollal együtt alkalmaztuk. Ezt az indokolta, hogy a csak széndioxidot használó kivonás hatékonyságát a metanol nagymértékben növelte (Choi és mtsai 2003). A leghatékonyabb extrakciós módszer kiválasztásához *Forsythia x intermedia* levél kivonatában mértük az összesített arktigenin és arktiin tartalmát HPLC készülékkel (Sedlák és mti 2008a).

A többféle kivonó elegy és feltárási módszer összehasonlításában több mint kétszeres eltérés mutatkozott, a leghatékonyabb módszer, a 60%-os metanollal végzett SFE és a legkevésbé hatékony módszer, a 100%-os etanollal történt refluxálás között (5. ábra).

A kivonási eljárások közötti különbség hasonló mértékű volt a metodikákon belüli eltéréshez, amely a különböző alkoholos kivonóelegyek alkalmazásából fakadt. A kivonóelegyek kivonási hatékonyságot befolyásoló hatása különösen az SFE esetén volt erőteljes. A kivonásban használt oldószereket vizsgálva az etanol, mindhárom kivonási módszert tekintve, a metanolnál gyengébb kivonószereknek bizonyult. Egyetlen kivétel a

60%-os etanollal végzett refluxálás, ami hatékonyabb volt a 60%-os metanollal történt kivonásnál.



Kivonási módszerek és kivonó elegyek



5. ábra Lignán extrakció optimalizálása *Forsythia x intermedia* levélmintákban. Az adatok a HPLC-vel mért arktiin és arktigenin tartalmat mutatják. Rövidítések: U.d.=Ultrahangos dezintegrálás; Refl.=Refluxálás; SFE=Szuperkritikus CO₂ extrakció. Az adatok három, független kivonás átlagai, a hibasávok a szórást jelölik.

V.2. *Forsythia* fajok és fajták leveleinek fenoloid és lignántartalmának, illetve antioxidáns kapacitásának összehasonlítása

Kutatásaink egyik célja egy hatékony lignántermelő sejt kultúra létrehozása volt, ennek elindításához magas lignántartalmú növény fajokat, illetve fajtákat kerestünk. Ennek során meghatároztuk a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Karának botanikus kertjében (Budai Arborétum) fellelhető 4 *Forsythia* faj és 12 fajta levelének lignán tartalmát.

A szelektálás gyorsítása érdekében a lignántartalom meghatározására használt kromatográfiai mérések számát előszelekcióval kívántuk csökkenteni. Az előszelekciós lépésben a kromatográfiai méréseknél gyorsabban elvégezhető spektrofotometriás módszerekkel mérhető színreakciókat alkalmaztunk. Mivel az összlignántartalom

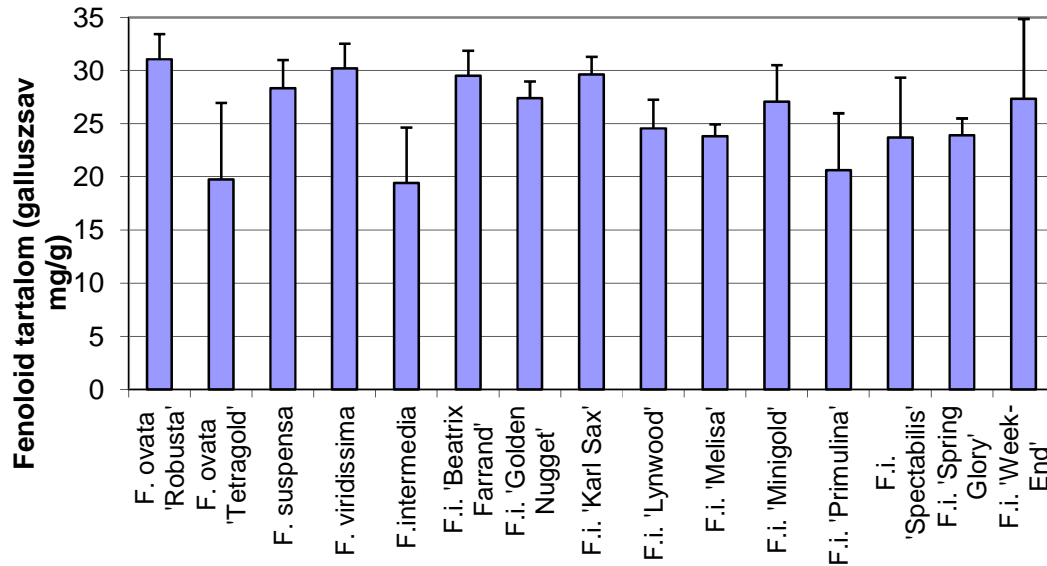
közvetlen mérésére nem ismert spektrofotometriásan mérhető színreakció, ezért a HPLC-UV készülékkel mért lignán mennyiségek összesített értékét a spektrofotometriás mérési módszerekkel mért fenoloid tartalommal és az antioxidáns kapacitással vetettük össze.

A lignánok a fenoloidok egyik alcsoportját alkotják, emellett a *Forsythia* fajok és fajták lignánjainak antioxidáns hatása is ismert az irodalomból (Jong és mtsai 1998; Chen és mtsai 1999; Kim és mtsai 2003; Yamauchi és mtsai 2006). Az irodalmi adatok összesítése után (2. táblázat) úgy véltük, hogy a *Forsythia* fajokban a lignánok mennyisége meghatározó a fenoloidok között. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a lignán tartalmat közvetetten megbecsülő spektrofotometriás színreakciók (fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás mérése) alkalmasak lehetnek a kromatográfiás analízis előtti szelekcióra.

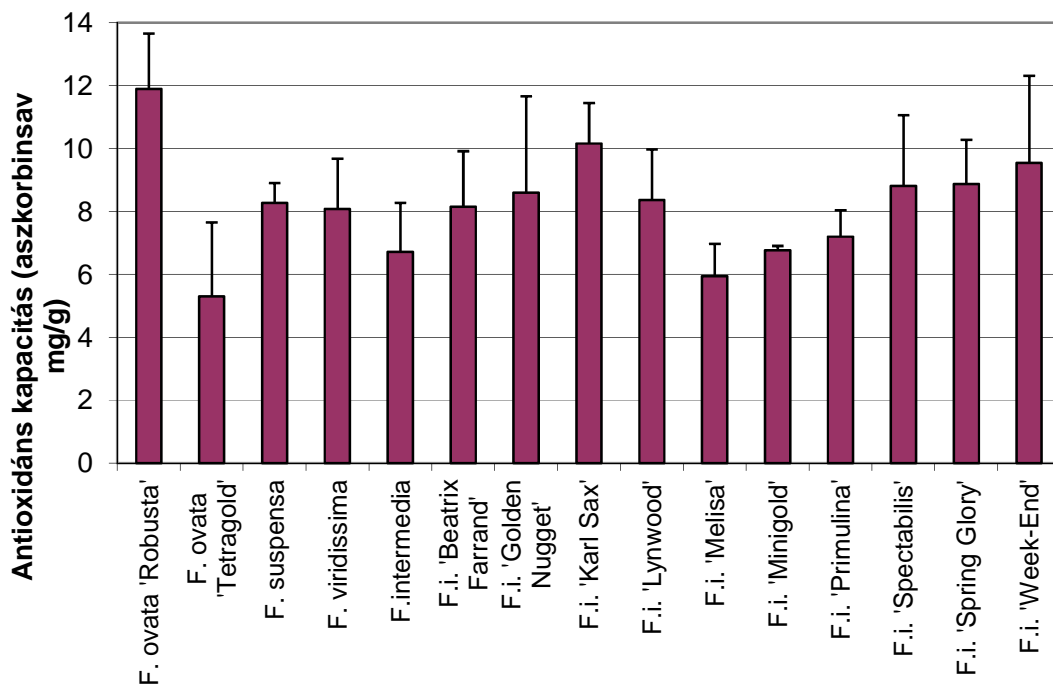
A fenoloid tartalmat Folin-Ciocalteu reagenssel (Singleton és mtsai 1999), az antioxidáns kapacitást FRAP módszerrel vizsgáltuk (Benzie és Strain 1996). A spektrofotometriával mérhető színreakciók eredményeit különböző standardokra vonatkoztatva számolják ki. A fenoloid tartalom meghatározásámál a galluszsavat, az antioxidáns kapacitás mérésénél az aszkorbinsavat választottuk standardnak gyakoriságuk és elterjedt használatuk miatt. Ennek következtében az eltérő módszerek eredményeinek abszolút értékei különböznek, viszont az összesített lignántartalom és a fenoloid tartalom valamint az antioxidáns kapacitás közötti összefüggés vizsgálatára így is lehetőség nyílik.

A fenoloid tartalmat vizsgálva megállapítható, hogy a legnagyobb értékeket (31.07 mg galluszsav g⁻¹) mutató *F. ovata* 'Robusta' minta és a legkisebb értékkel rendelkező (19.44 mg galluszsav g⁻¹) *Forsythia x intermedia* között másfélszeres eltérés volt (6. ábra). Az antioxidáns kapacitásnál a két szélsőérték között több mint kétszeres volt a különbség (*F. ovata* 'Robusta' 11.89 mg aszkorbinsav g⁻¹ és 'Tetragold' 5.29 mg aszkorbinsav g⁻¹) (7. ábra). Az összesített lignántartalom esetén szintén a *F. ovata* 'Robusta' mintánál mértük a legmagasabb értéket (111.71 mg g⁻¹). Ez a legalacsonyabb érték több mint kétszerese (*Forsythia x intermedia* 'Primulina' levél kivonatban 44.5 mg g⁻¹) volt (8. ábra). Az eltérő eljárásokkal nyert adatok eljáráson belüli különbségei hasonló mértékűek, viszont a szélsőértékeket mutató fajokban és fajtákban voltak

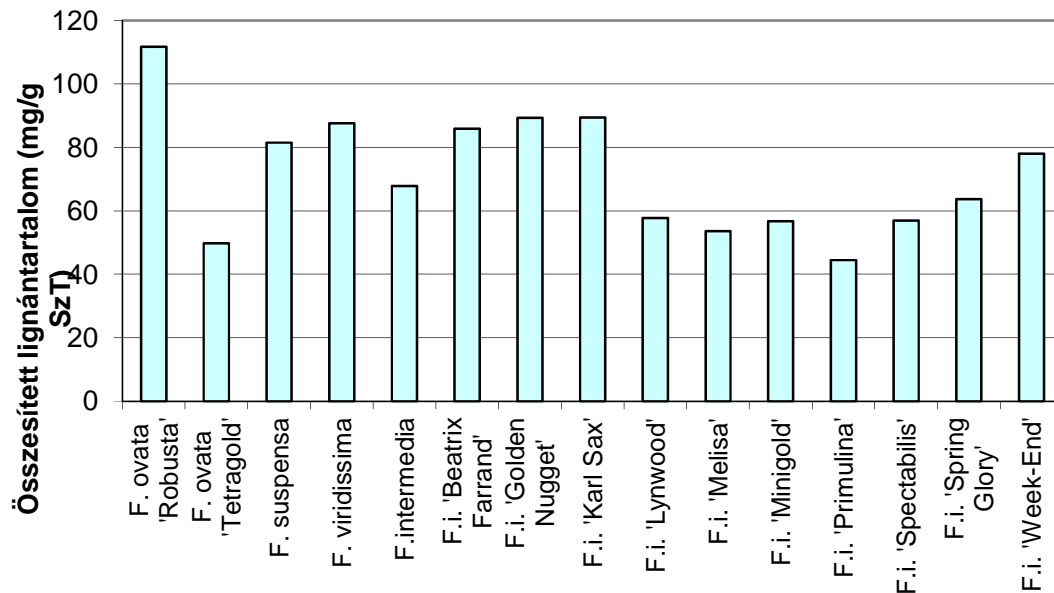
eltérések (5. ábra). A pontosabb értelmezés érdekében a módszerek eredményei közötti összefüggést lineáris regressziós illesztéssel vizsgáltuk.



6. ábra Forsythia fajok és fajták leveleinek fenoloid tartalma. A hibasávok a szórást jelölik.

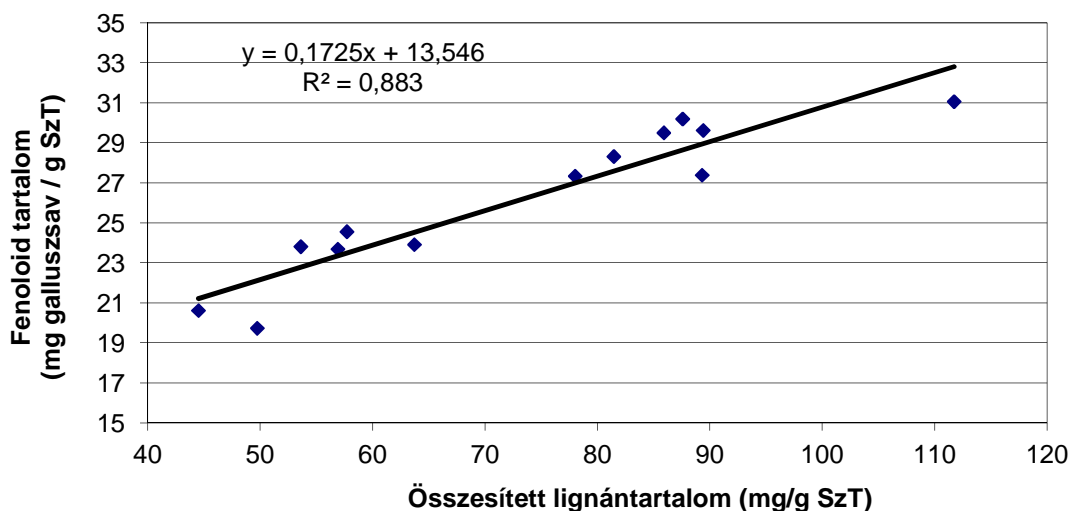


7. ábra Forsythia fajok és fajták leveleinek antioxidáns kapacitása. A hibasávok a szórást jelölik.

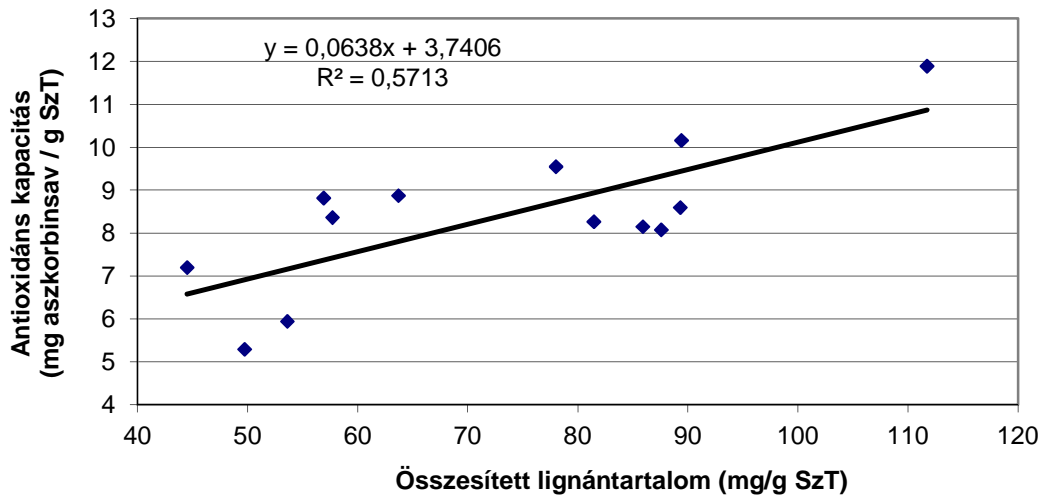


8. ábra Forsythia fajok és fajták leveleinek összesített lignántartalma, a lignán komponensek HPLC-UV készülékkel meghatározott mennyiségének az összege.

A Forsythia mintáknál az összesített lignántartalommal a fenoloid tartalom viszonylag szoros összefüggést mutatott, amit R^2 magas értéke (0.883) jelzett (9. ábra). Ezzel szemben az antioxidáns kapacitás eredményei alacsony korrelációt mutattak, ebben az esetben $R^2 = 0.5713$ volt (10. ábra).



9. ábra Forsythia fajok és fajták fenoloid és összesített lignántartalma közötti korreláció ($n=13$). Az összesített lignántartalom a lignán komponensek HPLC-UV készülékkel meghatározott mennyiségének az összege.



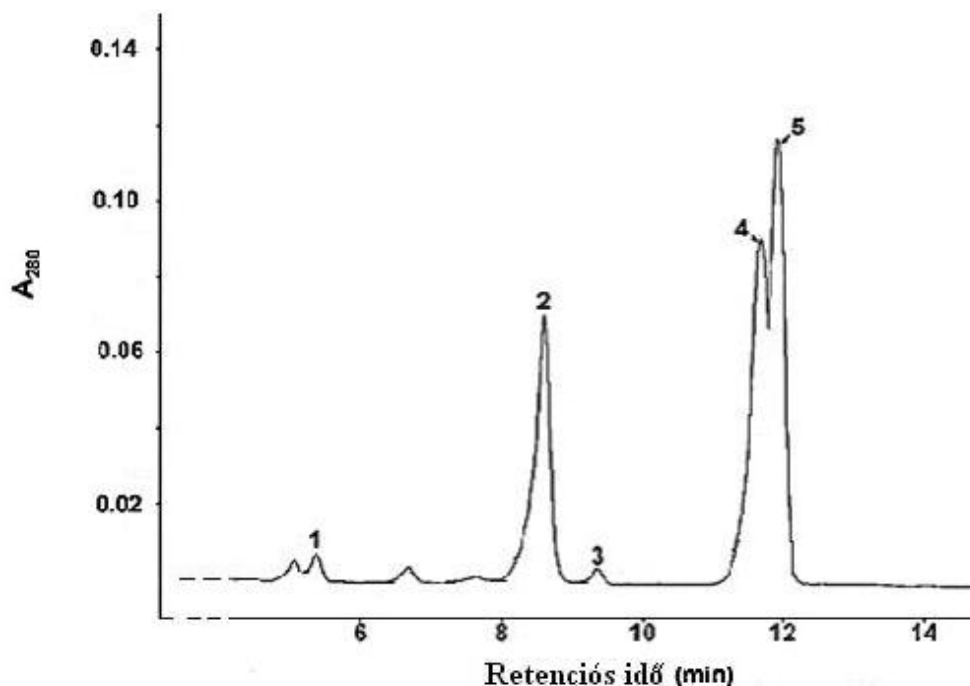
10. ábra *Forsythia* fajok és fajták antioxidáns kapacitása és összesített lignántartalma közötti korreláció ($n=13$). Az összesített lignántartalom a lignán komponensek HPLC-UV készülékkel meghatározott mennyiségének az összege.

V.3.A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása

Az *Arctium lappa* és *Centaurea scabiosa* terméseiben illetve a *Forsythia* fajok leveleiben megtalálható lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztásuk után ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömegspektrometriás (MS) detektálással, illetve gázkromatográfiás (GC) elválasztásukat követően MS detektálással történt.

V.3.1. A lignánösszetétel folyadékkromatográfiás meghatározása

A *Forsythia viridissima* levél kivonat kromatogramján az általunk vizsgált lignánok közül, a matairezinozid kivételével, mindegyiket megtaláljuk, ezt szemlélteti a 11. ábra. A matairezinozid a levél kivonatban nem határozható meg, viszont a *Centaurea scabiosa* termésében azonosítható, a HPLC-vel mért retenciósideje 4.06 perc volt.



11. ábra *Forsythia viridissima* levél kivonat HPLC kromatogramja 280 nm hullámhosszon detektálva az abszorbanciát. Jelzett csúcsok: 1 arktiin; 2 pinorezínol; 3 matairezínol; 4 filligenin; 5 arktigenin.

A lignánok azonosítása standardokkal egyező retenciósi idejük (arktiin, matairezínol, arktigenin) és tömegspektrometriás jellemzőik irodalmi adatokkal történő egyezése alapján történt (Choi és mtsai 2003) (6. Táblázat).

Mindegyik lignán MS spektrumában

- (a) hidratált ionok ($[M+H_2O]^+$) adták a legintenzívebb jelet;
- (b) a hidratált ionok mellett a protonált ($[M+H]^+$) ionok,
- (c) nátrium ($[M+Na]^+$) vagy kálium ionokkal ($[M+K]^+$) képzett ionok,
- (d) a két glikozid (arktiin és matairezínol) esetében pedig még a glükóz lehasadásával keletkezett és protonálódott aglikon (arktigenin és matairezínol) jellemző m/z értékeit kaptuk.

6. Táblázat A HPLC-ESPI-MS készülékkel mért lignánok tömegspektrometriás jellemzői (A glikozidos lignán formáknál a glükózzal együtt protonált iont tartalmazza a táblázat, az aglikonok esetén (*-gal jelöltek) a glükóz nélküli molekulaiont.)

Lignánok	Molekula tömeg (Mw)	Képződött ionok [m/z]			
		[M+H ₂ O] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M-glükóz+H] ⁺ * [M+H] ⁺
Matairezinozid	520	538,3	543,2	559,2	359,2
Arktiin	534	552,3	557,2	573,2	373,2
*Matairezinol	358	376,1	381,1	397,2	359,1
*Arktigenin	372	390,2	395,1	411,2	373,1
*Filligenin	372	390,2		411,1	373,1
*Pinorezinol	358	376,1		397,2	359,2

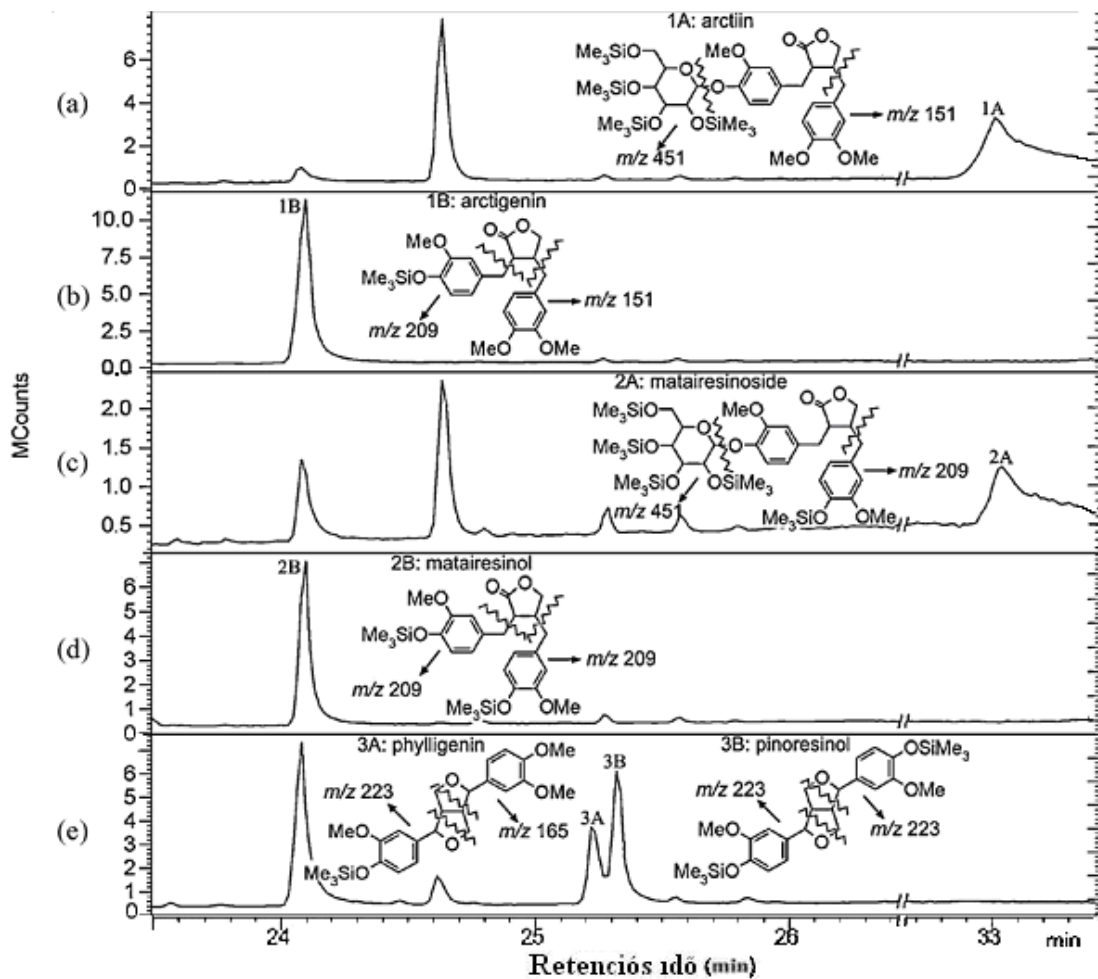
Rövidítés: m/z: tömeg/töltés.

HPLC-UV-val elválaszthatóak voltak a vizsgált lignánok. Viszont az arktigenin és a filligenin nem vált el egymástól alapvonalig, emiatt a mennyiségi meghatározásnál figyelembe kell venni ezen lignánok arányait. Abban az esetben, ha ez a két lignán közel azonos mennyiségben fordul elő, akkor ezek kvantifikálása nem jelent gondot. Viszont, ha a két lignán mennyisége között nagy a különbség, akkor nehézkes a mennyiségi meghatározás. Ennek következtében azokban a mintákban, ahol nagyságrendi eltérést tapasztaltunk a két lignán mennyisége között, GC-MS méréssel is kvantifikáltuk a filligenint és az arktigenint (*Forsythia ovata* 'Robusta' és *Forsythia x intermedia* 'Golden Nugget' levél kivonatai).

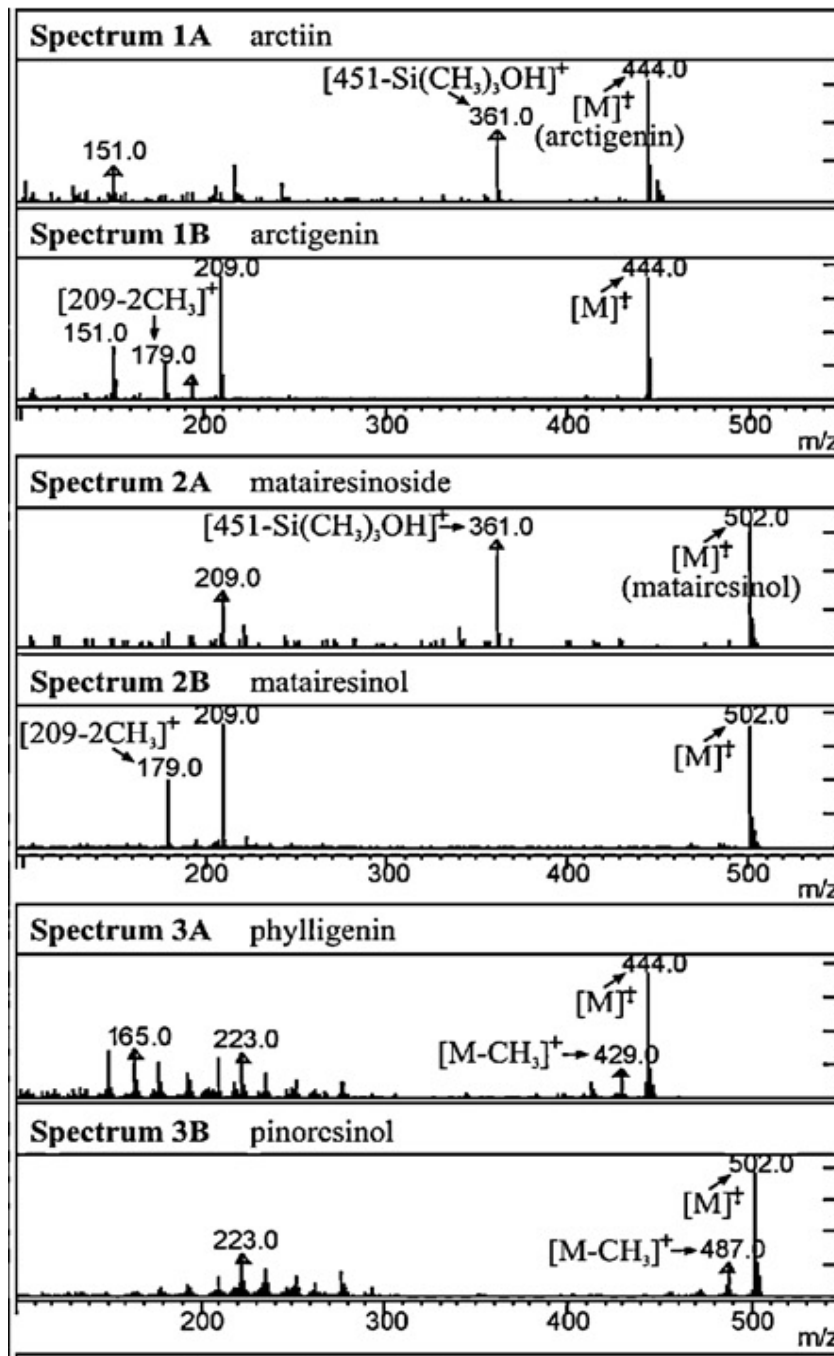
V.3.2. A lignánok összetételének gázkromatográfiás meghatározása

A GC kromatogramokon és tömegspektrumokon (9. és 10. ábra) a *Forsythia viridissima* levél kivonata mellett az *Arctium lappa* és a *Centaurea scabiosa* termésének a kivonatait mutatjuk be, mert az utóbbiakban a vizsgált lignánok nagyobb arányban fordultak elő, mint a levél kivonatban, így könnyebb az adott molekulák azonosítása (Boldizsár et al. 2010). A lignánok glikozidos formáit a natív mintákban mértük, még az aglikonos formák azonosításához a savval hidrolizált mintákat is alkalmaztunk.

A lignánok GC elválasztásához előállított trimetilszilil származékainak (IV.6.2. fejezet) szerkezete a 12. ábrán látható, az MS azonosításuk során keletkező jellemző fragmentum ionok m/z adataival és a szerkezeti képleteken feltüntetett fragmentálódási helyeikkel együtt.



12. ábra *Arctium lappa* hidrolizálatlan (a) és savval hidrolizált (b), *Centaurea scabiosa* hidrolizálatlan (c) és savval hidrolizált (d) terméskivonatának, illetve a *Forsythia viridissima* levél (e) GC-MS kromatogramjai és a lignánok trimetilszilil származékainak szerkezete a fragmentálódásuk helyének megjelölésével. Rövidítések: MCount: beütés szám; m/z : tömeg/töltés.



13. ábra A 9. ábrán lévő lignánokhoz (1A-3B) tartozó tömegspektrumok. Az x tengelyen m/z (tömeg/töltés) értékeket ábrázoltuk, az y tengelyen a relatív intenzitást.

A lignánok azonosítása standardokkal egyező retenciós idejük (arctiin, matairesinol, arctigenin) és tömegspektrometriás jellemzőik alapján történt.

Az aglikonok (arktigenin, matairezinol, filligenin, pinorezinol) esetében a trimetilszilil származékaik, a molekulaionok ($[M]^+$) detektálhatóak (7. Táblázat). Az azonos tömegű molekulaionnal rendelkező arktigenin és filligenin illetve a matairezinol és pinorezinol megkülönböztethető eltérő fragmentumionjaik alapján. Ezek: az arktigeninnél m/z 209 és m/z 151 illetve a filligeninnél m/z 223 és m/z 165 a különbözően szubsztituált aromás részeknek megfelelően. Az azonosan szubsztituált aromás részeknek megfelelően a matairezinolnál m/z 209 és a pinorezinolnál m/z 223 (12. és 13. ábra, 7 Táblázat) voltak a fragmentumionok.

A glikozidok esetében a teljes glikozidok trimetilszilil származékai (molekulaionok) az MS detektor felső méréshatára miatt nem mérhetők. Fragmentumionjaik között a glikozidot felépítő aglikon molekulaionja, aglikon fragmentumionjai és a glükóz trimetilszilil származékának fragmentumionja volt azonosítható. Ezek alapján

(a) aglikon molekulaionként detektáltuk: arktiin esetén az arktigenin molekulaionját: $[M]^+$ m/z 444, matairezinozid esetén a matairezinol molekulaionját: $[M]^+$ m/z 502;

(b) aglikon fragmentumionként azonosítottuk: arktiin esetén az arktigenin m/z 209 és m/z 151, matairezinozid esetén a matairezinol m/z 209 ionjait;

(c) glükóz trimetilszilil származékának fragmentumionja m/z 361 a jellegzetes (9. és 10. ábrákon).

7. Táblázat A GC-MS készülékkel mért lignánok trimetilszilil származékainak molekulaionjai ($[M]^+$) és fragmentumionjai

Lignánok	Molekula tömeg (Mw)	Molekula ionok $[M]^+$ (m/z)	Fragmentum ionok (m/z)
Matairezinozid	520	502	361 és 209
Arktiin	534	444	361 és 209 és 151
Arktigenin	372	444	209 és 151
Matairezinol	358	502	209
Filligenin	372	444	223 és 165
Pinorezinol	358	502	223

A HPLC-UV és GC-MS módszerek felhasználásával a *Forsythia* fajok mintáiban a lignánok azonosítása a leírtak alapján egyértelműen bizonyítást nyert.

A *Forsythia* fajok lignánösszetételét vizsgálva láthatjuk (8. táblázat), hogy a két módszerrel (GC és HPLC) nyert adatok jó egyezést mutatnak (RSD% értékek 2,1 és 11 között változtak), az irodalmilag elfogadott intervallumon belül mozogtak az RSD% értékek, így bizonyítva a kapott eredmények helyességét.

8. táblázat *Forsythia viridissima* levél lignánösszetétele gáz- (GC) és folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel mérve, mg g⁻¹ értékben kifejezve. t_R =retenciós idő, RSD%

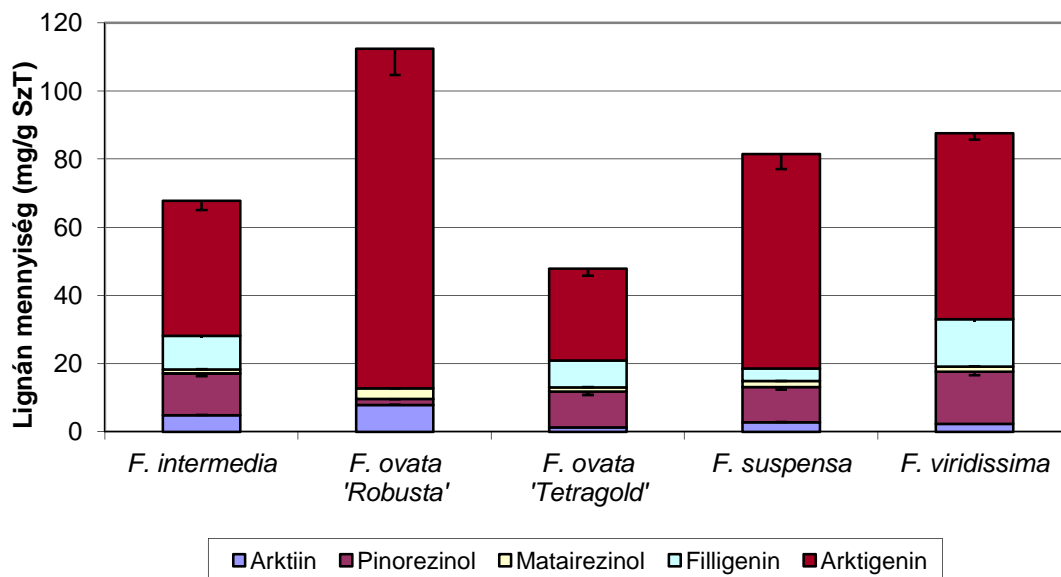
Lignánok	t_R (min)	mg g ⁻¹	RSD%
Arktigenin	GC: 24.08	38.2	11
	HPLC: 12.03	32.5	
Matairezínol	GC: 24.09	0.89	8.2
	HPLC: 9.29	1.00	
Filligenin	GC: 25.22:	19.9	10
	HPLC: 11.67	23.0	
Pinorezínol	GC: 25.32	29.8	5.7
	HPLC: 8.58	27.5	
Arktiin	GC: 33.00	1.34	2.1
	HPLC: 5.42	1.30	

V.3.3. A *Forsythia* fajok lignánösszetételének vizsgálata

A lignántartalom vizsgálata során mennyiségi meghatározás csak a *Forsythia koreana* és a *Forsythia x intermedia* fajoknál történt meg korábban (Rahman és mtsai 1990c; Choi és mtsai 2003), a többi fajnál a lignánokat mennyiségi adatok nélkül azonosították, (2. táblázat). Ezért a lignántartalom összetételét részleteiben vizsgáltuk, HPLC-UV és GC-MS készülékekkel.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az arktigenin fordult elő a legnagyobb mennyiségben mindegyik fajban (14. ábra). Viszont az aránya széles skálán mozgott, a *Forsythia ovata* 'Robusta' 89%-ban tartalmazott arktigenint szemben a *Forsythia ovata* 'Tetragold' 54%-val. A száraz tömegre vonatkoztatott arktigenin

tartalomban is jelentősek voltak az eltérések a fajok és a fajták között is. Ezt részletesebben vizsgáltuk a *Forsythia x intermedia* 11 fajtánál (ld. V.3.4. alfejezetben). A pinorezinol volt a második, a filligenin a harmadik a lignánok mennyiségi eloszlási sorában. Egyetlen kivételt a *Forsythia ovata* 'Robusta' képezett, ahol az arktiin fordult elő a második legnagyobb mennyiségben az arktigenin után, itt a pinorezinol és filligenin mennyisége elenyésző volt. A pinorezinol aránya 1.5%-21% között változott a fajok összlignántartalmához hasonlítva, még a filligenin eloszlása 0.2%-14% között mozgott. Az arktiin a fajok többségében negyedikként fordult elő. Kivételt a *Forsythia ovata* faj jelentett, mert a 'Robusta' fajtában a második volt, viszont a 'Tetragold' esetében ez volt a legutolsó lignán. Az összes fajban a matairezinol mennyisége igen csekély volt.



14. ábra A lignánok összetételének mennyiségi eloszlása a *Forsythia* fajok levelében. A HPLC-vel mért adatok három, egymástól független mérés átlagai, amelyeket száraztömegre vonatkoztattunk; a hibaértékek a szórást jelölik.)

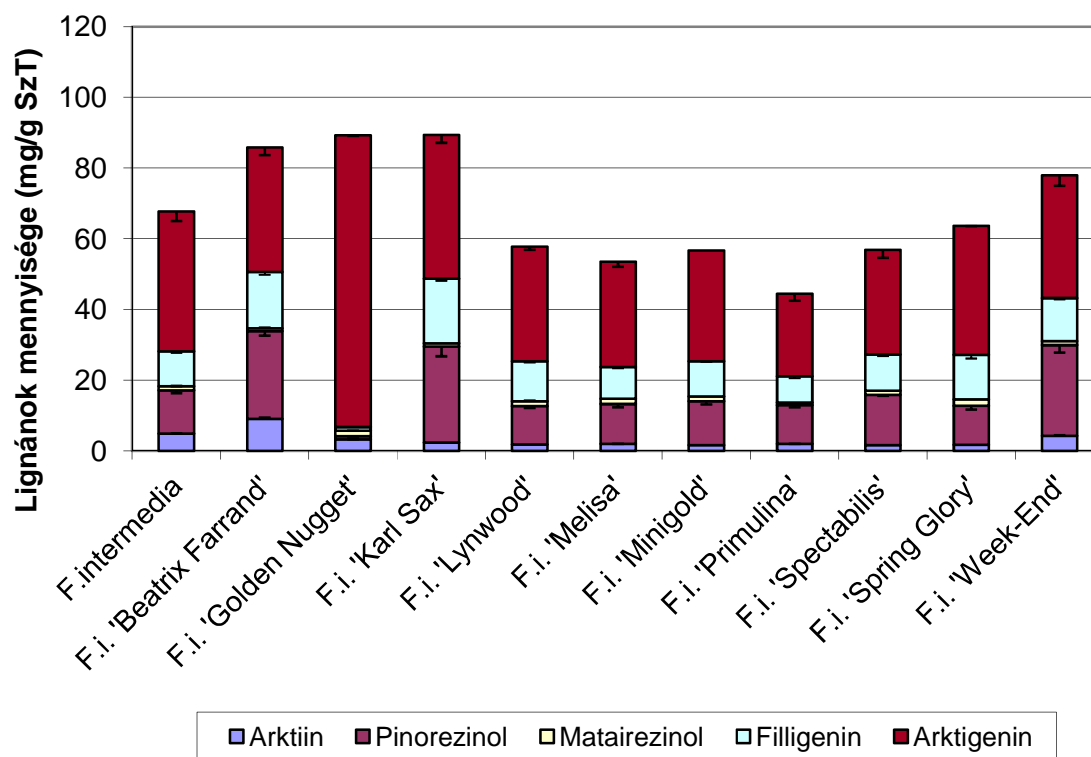
V.3.4. A *Forsythia x intermedia* fajták lignánösszetételének vizsgálata

A *Forsythia* fajok lignánösszetételének vizsgálata során megállapítottuk, hogy nemcsak a fajok, de a fajták között is jelentős különbségek vannak. A fajták közötti lignántartalomban megjelenő eltéréseket kívántuk részletesebben elemezni a *Forsythia x*

intermedia 11 fajtájának mérésével. A lignánokat HPLC-UV és a 'Golden Nugget' fajta levél kivonatában GC-MS készüléssel is mértük.

Az egyes lignán komponensek mennyiségének az összesítésével kapott összlignán tartalomban nagy eltérések mutatkoztak az egyes fajták között (14. és 15. ábra). A 'Karl Sax' és a 'Golden Nugget' fajták összesített lignántartalma volt a legmagasabb (89,4 és 89,3 mg g⁻¹), ami a legalacsonyabbhoz viszonyítva kétszeres eltérés jelentett.

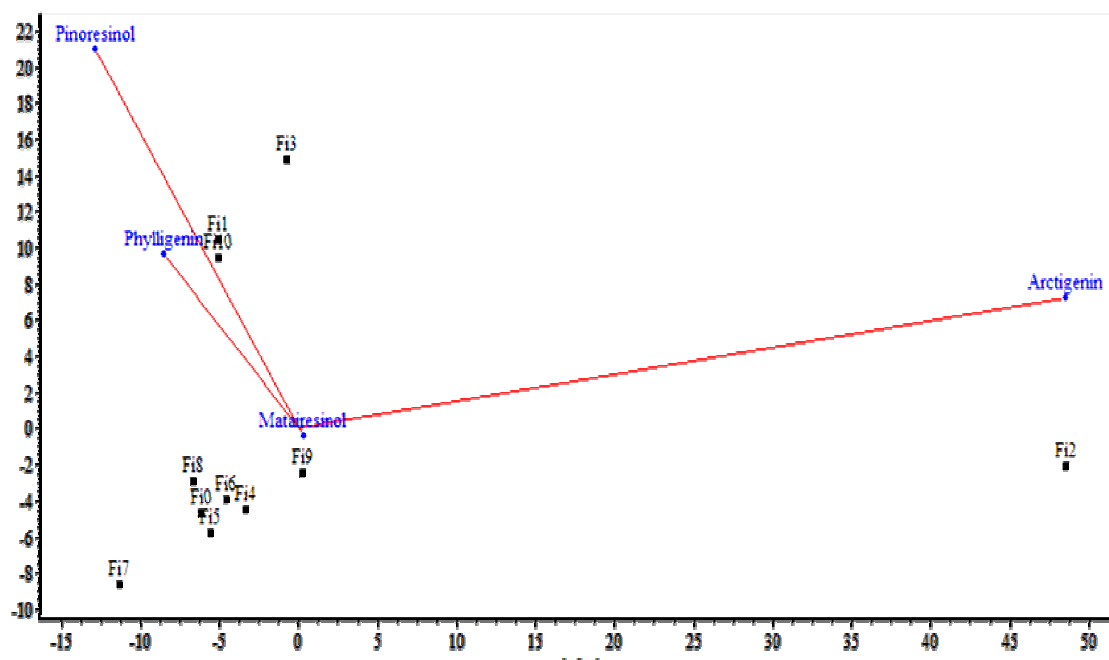
Az egyes lignánok megoszlásában is változatos képet mutatott (15. ábra). Itt elsősorban a 'Golden Nugget' emelkedett ki, aminek a lignán profilja jelentősen eltért a többi fajtától. Az összes fajta levelében, a fajkhoz hasonlóan, a fő lignán komponens az arktigenin volt. Ez a lignán az összlignán tartalom 41%-58%-át teszi ki, szemben a 'Golden Nugget' fajtában mért 92%-kal. A 'Golden Nugget' fajtánál nemcsak az arktigenin aránya, de száraz tömegre vonatkoztatott abszolút értéke is kiemelkedő.



15. ábra *Forsythia x intermedia* fajták leveleinek arktiin, arktigenin, matairezinol, pinorezinol és filligenin tartalma. A HPLC-vel mért adatok három, független mérés átlagai, amelyek száraztömegre vonatkoztattunk; a hibaértékek a szórást jelölik.

A pinorezinol fordul elő a második legnagyobb mennyiségben a legtöbb fajtában, amelynek százalékos aránya 1,1%-31% között volt. A harmadik legjelentősebb lignán a filligenin, amely az összlignán tartalom 1,3%-20%-t éri el. Két fajtában, *F.i.* 'Lynwood'-ban és *F.i.* 'Spring Glory'-ban azonban másodikként fordult elő. Az arktiin az összes fajtában a negyedik a megoszlási sorban. Kivételt a 'Golden Nugget' fajtánál tapasztaltunk, amiben az arktiin volt a második, a matairezinol a harmadik, a filligenin a negyedik és a pinorezinol az utolsó a lignánsorban. A matairezinol mennyisége minden esetben a legalacsonyabb értékeket mutatta.

A *Forsythia x intermedia* fajták lignán összetételén alapuló szelekciójához alkalmaztuk a biplot elemzést (16. ábra). E szerinti a fajták közötti eltéréseket elsősorban az arktigenin tartalomban megjelent különbség okozza, másodikként a pinorezinol mennyisége a meghatározó.



16. ábra A *Forsythia x intermedia* fajták leveleinek biplot analízise. Rövidítések: Növényi minták: *Forsythia x intermedia* Zabel (*Fi0*) és a fajtái 'Beatrix Farrand' (*Fi1*), 'Golden Nugget' (*Fi2*), 'Karl Sax' (*Fi3*), 'Lynwood' (*Fi4*), 'Melisa' (*Fi5*), 'Minigold' (*Fi6*), 'Pimulina' (*Fi7*), 'Spectabilis' (*Fi8*), 'Spring Glory' (*Fi9*) és 'Week-End' (*Fi10*); Lignánok: arktigenin, matairezinol, pinorezinol és filligenin.

Ez az analízis három csoportba osztja a fajtákat. Az első csoportba a 'Golden Nugget' fajta (Fi2) tartozik, a másodikba 'Beatrix Farrand' (Fi1), 'Karl Sax' (Fi3) és a 'Week-End' (Fi10) fajták kerültek. A harmadik csoportot a *Forsythia x intermedia* Zabel (Fi0), 'Lynwood' (Fi4), 'Melisa' (Fi5), 'Minigold' (Fi6), 'Primulina' (Fi7), 'Spectabilis' (Fi8), 'Spring Glory' (Fi9) fajták alkotják. Az első csoport az arktigenin tartalom miatt különül el a többi csoporttól, viszont a második és a harmadik csoport szeparációjának a pinorezinol az oka. A matairezinol mennyisége elenyésző volt, emiatt ez nem befolyásolja a fajták kategorizálását.

V.4. A *Forsythia* fajok és fajták szövettényészeteinek létrehozása és lignántartalmának fokozása

Az intakt növények mellett az *in vitro* növényi sejttényészetek is egyre gyakrabban kiindulópontjai a hatóanyag kinyerésnek, számos előnyüknek köszönhetően. Az intakt növények hatóanyag tartalmához képest az *in vitro* kultúráké általában alacsonyabb, viszont ez fokozható a sejttényészetek tápközegének vagy fenntartási körülményeinek változtatásával, elicitorok illetve prekursorok alkalmazásával.

Hatékony lignán kinyerés és előállítás érdekében a *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttényészeiben a lignántartalom azonosítását és mennyiségi meghatározását valamint a lignántermelés fokozását is elvégeztük egy nagyléptékű fermentációs termelés létrehozása céljából.

V.4.1. A *Forsythia* fajok és fajták szövettényészeteinek létrehozása

A *Forsythia* fajoknak nagyszámú fajtája ismeretes, amelyekből létrehozott sejttényészetek lignántartalma alig ismert az irodalomban (Schmitt és Petersen 2002a). A fajták leveleinek eltérő lignántartalma alapján azt feltételezhetjük, hogy az ezekből elindított *in vitro* kultúrák hatóanyag tartalmában szintén különbözhetnek egymástól. Ezért e fajtákból indítottunk el sejttényészeteket, hogy megtaláljuk a leghatékonyabb lignántermelő *Forsythia in vitro* kultúrát.

Négy *Forsythia* faj és 12 fajtánál B5 kalluszosító táptalajon indítottunk el a kallusz kultúrákat, amely munka során 3 fajból (*F. intermedia*, *F. ovata*, *F. suspensa*) és 6 fajtából (*F. intermedia* Beatrix Farrand, Melissa, Minigold, Primulina és Week-End,

emellett a *F. ovata Robusta* és *Tetragold*) sikerült szekunder kalluszt létrehozni. Lignántermelés szempontjából a szekunder kalluszokból létrehozott szuszpenziós tenyészeteket vizsgáltuk, mivel a későbbi fermentációs termelés szempontjából ez a közvetlen kiindulás.

V.4.2. Az *in vitro* kultúrák táptalaj összetételének módosítása hat a lignántartalomra

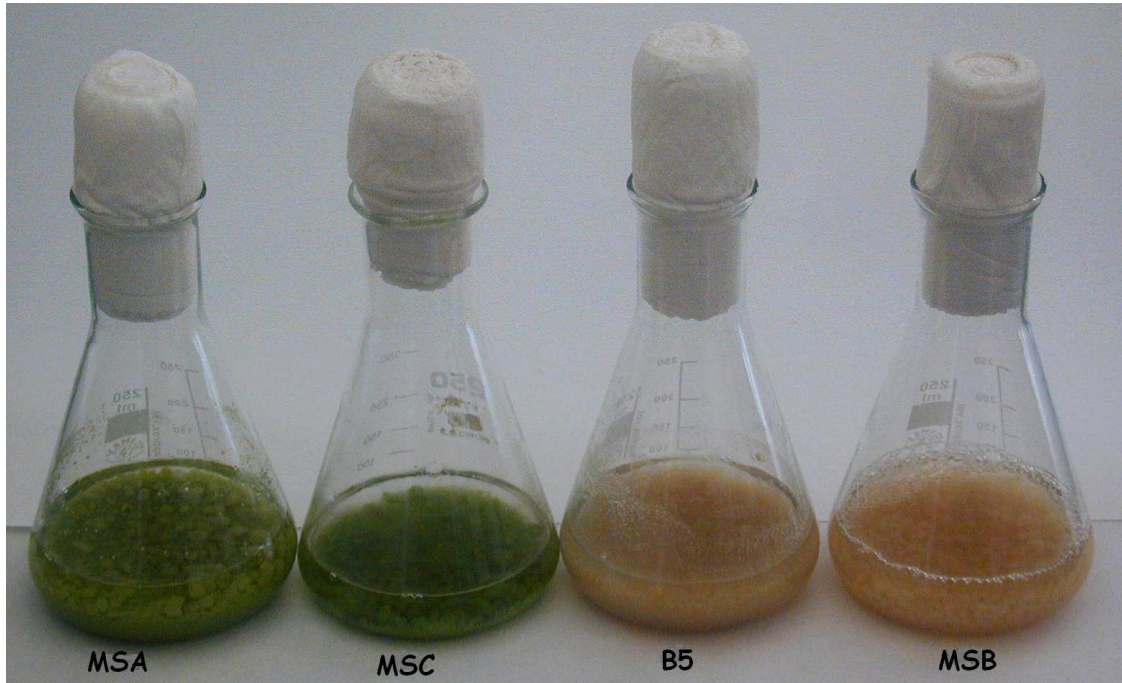
Az irodalom az általunk vizsgált *Forsythia* fajok közül a *Forsythia x intermedia* növényt említi a legnagyobb gyakorisággal a hatóanyagtermelésre használt *in vitro* kultúráknál (Rahman és mtsai 1990b; Schmitt. Előzetes munkámban megállapítottuk, hogy az azonos tápközegen és körülmények között nevelt kallusz és szuszpenziós tenyészetek közül az utóbbi hatóanyag tartalma a magasabb. A korábbi kutatások szerint a *Forsythia x intermedia in vitro* sejttenyészetek lignántartalma fokozható a táptalaj összetevőinek módosításával (Rahman és mtsai 1990b; Schmitt és Petersen 2002a). Ezért munkánk során *Forsythia x intermedia* szuszpenziós tenyészetekkel végeztük el a táptalaj optimalizáció kísérleteit.

V.4.2.1. A hormonösszetételének változtatása az *in vitro* kultúrák táptalajában

Rahman és munkatársai (1990b) *Forsythia x intermedia in vitro* sejttenyészetekkel végeztek kísérleteket, ami során megállapították, hogy a táptalajban különböző növényi hormonok alkalmazása hatékonyan emeli a sejttenyészetek lignántartalmát. Ezek alapján választottunk ki 4 féle hormonösszetételt a szuszpenziós tenyészet hatóanyag tartalmának fokozására. Szakdolgozati munkámban kimutattam, hogy a fény fokozta a sejttenyészetek hatóanyag tartalmát, ezért kísérleteinkben fényen és sötétben is neveltük a különböző hormonösszetételű táptalajon nevelt kultúrákat. Hatékony lignán termelő sejt kultúra létrehozásához kívántuk kiválasztani a megfelelő hormonösszetételű táptalajt és fenntartási körülményt (fény jelenléte vagy hiánya).

Összehasonlítás képpen bemutatom az eltérő hormonösszetételű tápközegen nevelt kultúrákat (17. ábra), amelyeket azonos körülmények között neveltünk és egyforma időségek. A sejttenyészetek megjelenésében mutatkozó eltérések a tápközeg hormonösszetételében meglévő különbségek okozták. Az MSA és MSC tápközegen

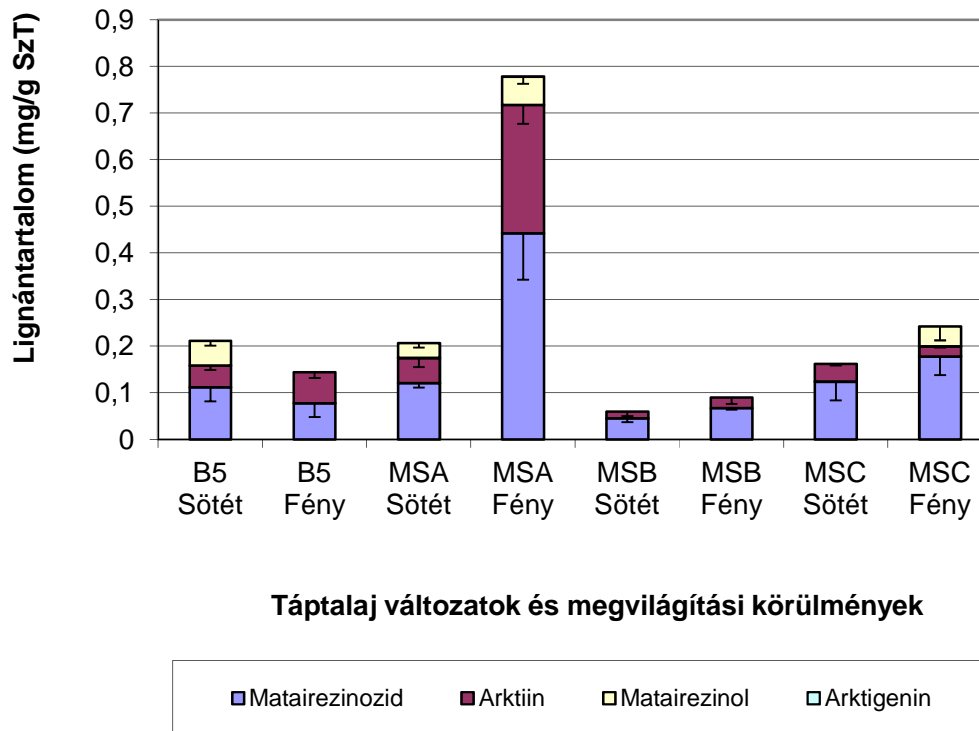
fenntartott szuszpenziós kultúrák zöldek, szemben a B5 és MSB táptalajon neveltekkel. Ezek a sejtenyészetek hatóanyag tartalmában is hasonló eltéréseket tapasztaltunk.



17. ábra *Forsythia x intermedia* különböző hormonösszetételű táptalajokon, természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúrái. A táptalajváltozatok: MSA, MSC, B5, MSB

Az irodalomban leírt, legjobbnak vélt hormonösszetételek alapján hatékony lignán termelő kultúrákat biztosító közeget hoztunk létre. Az alkalmazott tápközeg változatok között a 2 mg l^{-1} naftilecetsavat és 0.2 mg l^{-1} kinetint tartalmazó MSA tápközegen, természetes fényen nevelt szuszpenziós tenyészetnek volt a legjelentősebb az összlignán tartalma (18. ábra). A B5 tápközegen fenntartott sejtenyészeteknél a fény hatása gátló volt, szemben az Murashige Skoog alapú táptalajokkal, ahol mindegyik esetben a fény megemelte a sejtek hatóanyag-termelését. A B5 közeg csak egyféle auxint, a 2,4-D hormont tartalmazta, szemben a Murashige Skoog alapúakkal, amelyek az auxinok közül NAA-t és IAA-t is tartalmaztak a citokinin, a kintein mellett. Legerőteljesebben az MSA táptalajon nevelt kultúra lignántartalma nőtt a megvilágítás hatására, a leggyengébb tápközeg változathoz (MSB Sötét) képest közel a hatszorosára.

A további vizsgálataink során a legnagyobb összlignán tartalmat indukáló tápközeget, az MSA-t alkalmaztuk és a kultúrákat természetes megvilágítás mellett tartottuk fenn.

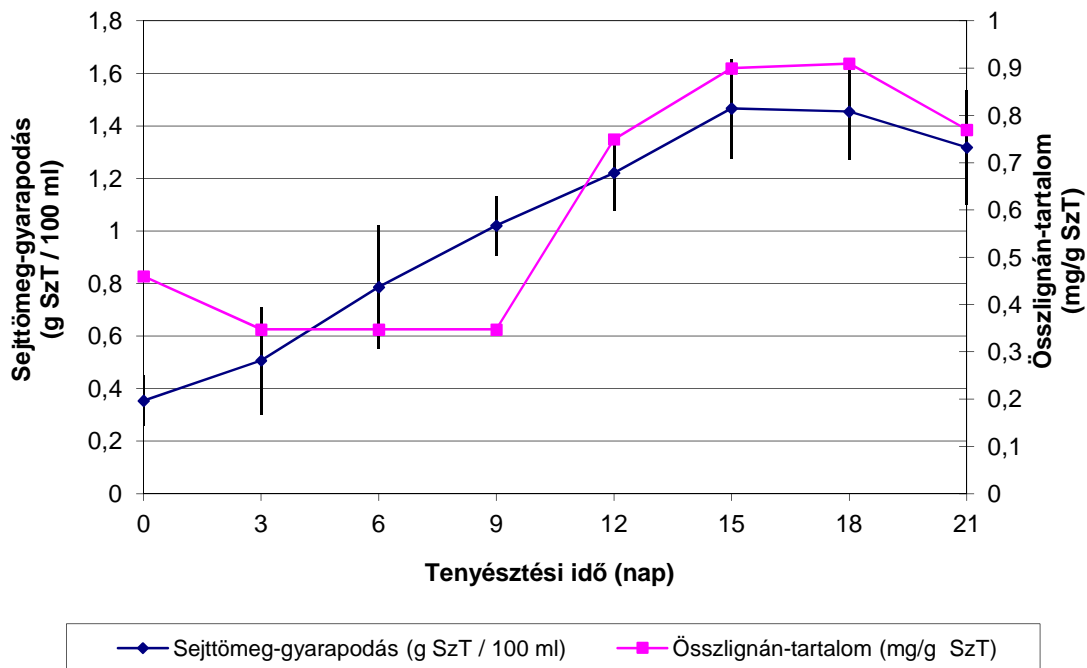


18. ábra *Forsythia x intermedia* különböző hormonösszetételű táptalajokon, természetes fényen és sötétben nevelt szuszpenziós kultúrájának lignántartalma. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A hibásávok szórását jelölik..

A lignántermelés szempontjából optimálisnak talált táptalajon és körülmények között nevelt sejtenyésztettel növekedési görbét készítettük, hogy a sejtenyésztet sejttömeg-gyarapodásának és a hatóanyag-termelésnek a maximumát meghatározzuk.

A 19. ábrát tekintve látható, hogy az össztömeget vizsgáló sejttömeg-gyarapodás folyamatos növekedést mutat két hétig, majd a 15. és 18. nap között lelassul és eléri a maximumát, több mint négyszeres sejttömeg gyarapodással. A 18. nap után csökkenő pályára állt a görbe. Ezek alapján a megfelelő sejt proliferáció elérése és fenntartása érdekében kéthetente oltottuk át a szuszpenziós kultúrákat. Az összlignán tartalmat nézve a sejtenyésztet termelése a 9. napig igen alacsony szintet mutat, majd egy viszonylag

meredek növekedési pályát követve a 15. napon éri el a maximumát. A hatóanyag-termelés görbéje a 18. napig platón mozog, majd ezután a sejtek előregedésének és ebből kifolyólag a lebontó enzimjeiknek felszabadulása következtében csökken a lignántartalom. Emiatt a későbbiekben a 15. napon begyűjtöttük a kultúrákat a lignántartalmuk meghatározásához.



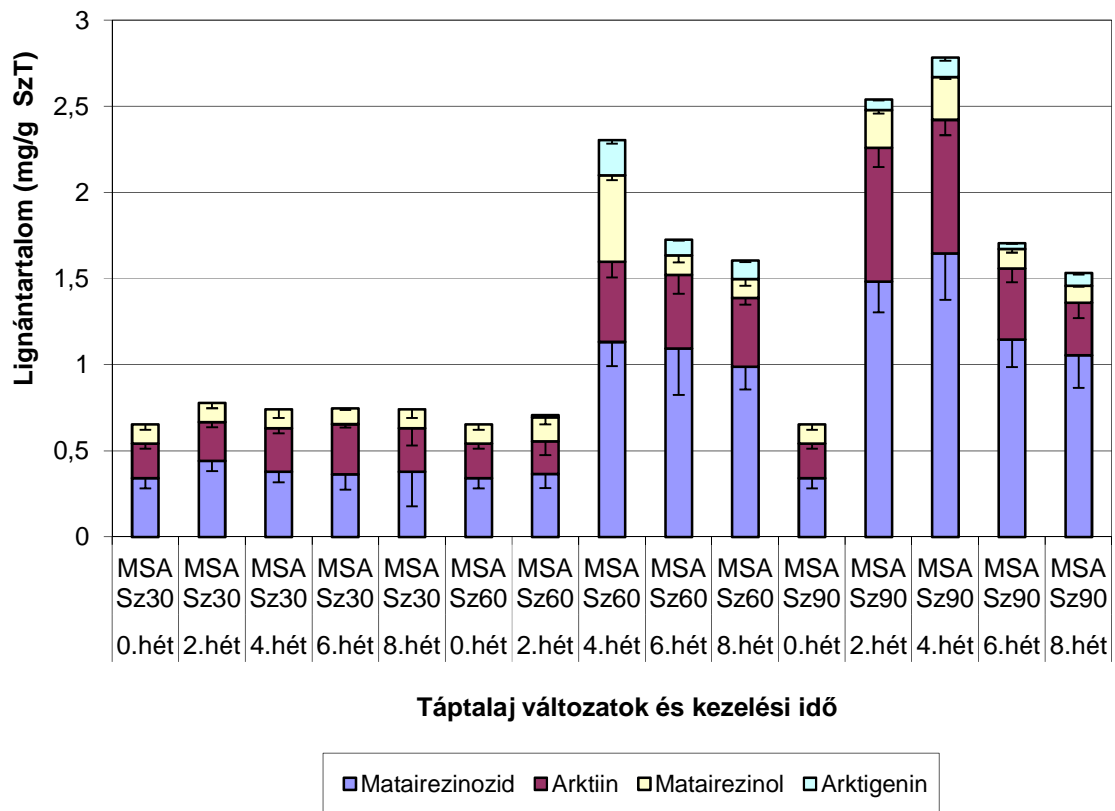
19. ábra *Forsythia x intermedia* MSA táptalajon, természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúra sejttömeg-gyarapodásának és a lignántartalmának a nyomon követése a 21 napos tenyésztés során. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A sejttömeg gyarapodás adatai esetén a szórást tüntettük fel a görbén, az összlignán görbénél a lignán komponensek RSD értékei 3,7 és 27 % között mozogtak.

A további munkákhoz az MSA táptalajt és a természetes megvilágítást használtuk fel kontrollként, illetve úgynevezett fenntartó tápközegként és körülményként. Mivel a sejtenyészet sejttömeg-gyarapodása nagy mértékű volt (több mint négyszeres) és a lignántartalom is rövid fenntartási idő után érte el a maximumát (15. nap), ez a táptalaj

változat és tenyésztési körülmény volt alkalmas a szuszpenziós kultúra biomasszájának gyors növelésére és a lignántartalom további fokozására a további kísérletek során.

V.4.2.2. A szacharóz mennyiségének változtatása az *in vitro* kultúrák táptalajában

Schmitt és Petersen (2002a) kísérletükben a *Forsythia x intermedia* sejttenyészet táptalajában a szacharóz tartalmat növelték, ami hatékonyan fokozta a sejttenyészet lignán tartalmát. Ezt alapul véve törekedtünk olyan táptalaj kiválasztására, amelyben a szacharóz mennyiségének növelése nagymértékben képes fokozni a sejttenyészet hatóanyag-termelését.



20. ábra *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúra lignántartalma, amit különböző szacharóz tartalmú MSA táptalajon, fényen neveltünk. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre vonatkoztattuk. A hibaszávok szórást jelölik. Rövidítések: MSA SZ30: 30 g l⁻¹; MSA 60: 60 g l⁻¹; MSA 90: 90 g l⁻¹.

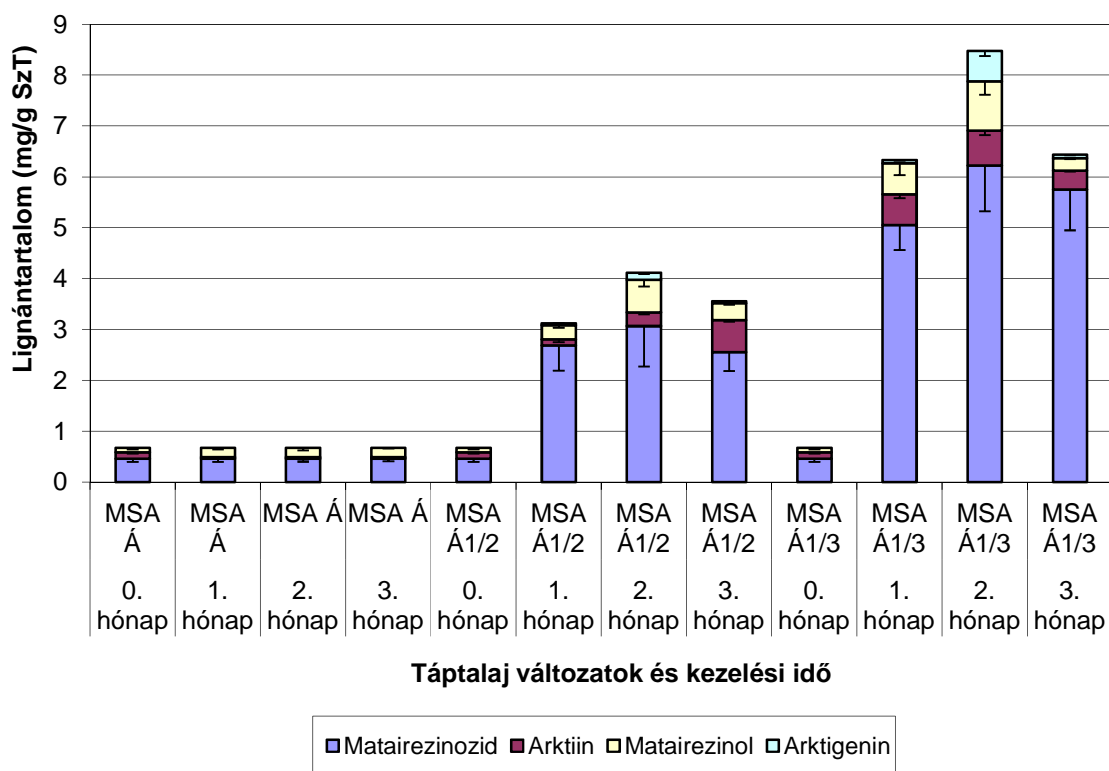
A korábbi kísérleteinkben legjobbnak talált hormonösszetételű táptalajt (MSA) alkalmaztuk. Kontrollnak a 30 g l^{-1} szacharózt tartalmazó tápközeget tekintettük és ehhez képest emeltük a duplájára és háromszorosára a szacharóz mennyiségét a másodlagos anyagcsere termékek produkciójának fokozása érdekében.

A táptalaj cukortartalmának emelése hatékonyan fokozta a szuszpenziós sejt kultúra összlignán tartalmát (20. ábra). A kontroll 30 g l^{-1} szacharózt tartalmazó táptalajhoz képest a kétszeres cukormennyiség a háromszorosára emelte a hatóanyag tartalmát, míg a 90 g l^{-1} cukor közel négyszeresére. Mindkét esetben a kísérlet 4. hetében volt maximális a lignántartalom. Az egyes lignán komponensek közül a lignánok glikozidos formái voltak túlsúlyban, ezek közül erőteljesebben a matairezinozid mennyisége nőtt a kezelés hatására. A matairezinol szintje egyedül a 60 g l^{-1} cukrot tartalmazó tápközegnél emelkedett jelentősebben.

V.4.2.3. Az ásványi anyagok mennyiségének változtatása az *in vitro* kultúrák táptalajában

Rahman és munkatársai (1990b) a *Forsythia x intermedia* sejttenyészet táptalajának az ásványi anyag tartalmát csökkentették, ami fokozta a kultúra összlignán tartalmát. Ebből kiindulva a táptalaj makro- és mikroelemeinek a mennyiségét felére illetve harmadára csökkentve kívántuk emelni a sejttenyészet lignántermelését. A legjobbnak bizonyult hormon összetételű (MSA) és 30 g l^{-1} szacharózt tartalmazó úgynevezett fenntartó táptalajt alkalmaztuk kontrollként, hogy megvizsgáljuk a makro- és mikroelemek mennyiségi változása milyen mértékben befolyásolja a sejttenyészet lignántermelését a szacharóz tartalom módosításától függetlenül.

Az ásványi anyag tartalom csökkentése nagymértékben fokozta a sejttenyészet lignántermelését (21. ábra). A felére csökkentett mikro- és makroelem mennyiség ötszörösére emelte az összlignán szintet, még a harmadára mérsékelt ásványi anyag tartalom 11-szeresére növelte. Mindkét esetben két hónap elteltével jelent meg a maximum az összlignán termelésben. A lignánok közül a matairezinozid fordul elő a legnagyobb arányban a kontroll és kezelt mintákban is.

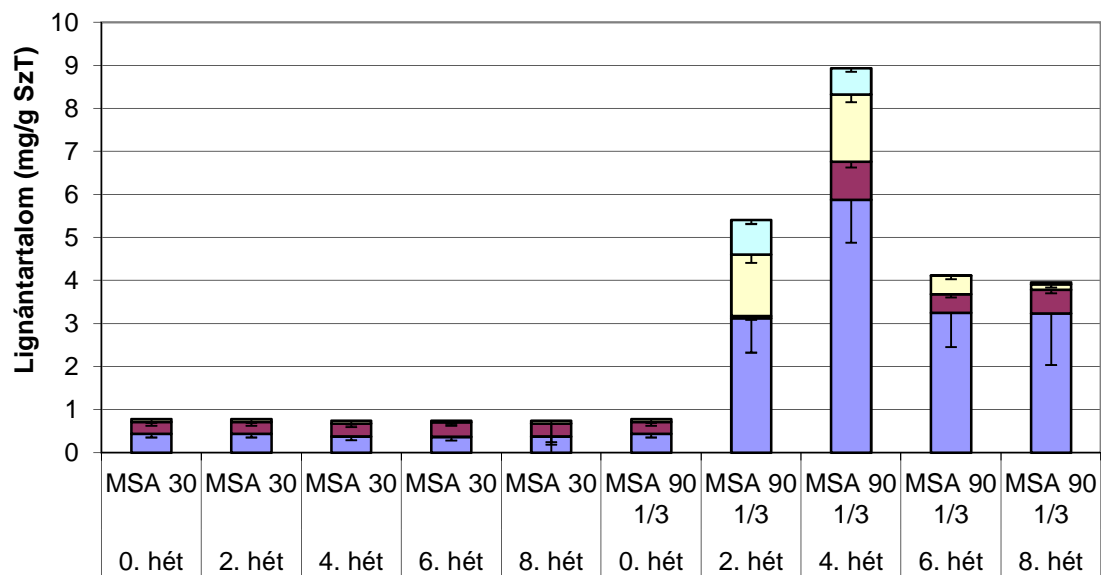


21. ábra *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájának a lignántartalma, amit különböző ásványi anyag tartalmú MSA táptalajon, természetes fényen neveltünk. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A hibásávok szórást jelölik. Rövidítések: Kontroll: MSA Á: MSA táptalaj 30 g l⁻¹ szacharóz és teljes ásványi anyag tartalommal; MSA Á 1/2: MSA SZ30 táptalaj 1/2-nyi ásványi anyag tartalommal; MSA Á 1/3: MSA SZ30 táptalaj 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal.

V.4.2.4. Az *in vitro* kultúrák táptalaj módosításainak együttes hatásának vizsgálata

A táptalaj összetevők különböző módosításai (hormonösszetétel, szacharóz és ásványi anyag mennyisége) külön-külön emelték a *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájának a lignántartalmát. A táptalaj optimalizációnál Rahman és munkatársai (1990b) a hormonösszetétel és a makro- és mikroelemek mennyiségének módosítását, Schmitt és Petersen (2002a) a hormonösszetétel és a szacharóz tartalom változását alkalmazta együttesen a sejtenyészet hatóanyagtartalmának fokozására. Ebből kiindulva feltételeztük, hogy a háromféle táptalaj módosítás kombinációja szintén növelheti az *in vitro* sejt kultúra lignán tartalmát. Emiatt együtt alkalmaztuk a táptalaj szacharóz mennyiségének háromszorosára emelését és az ásványi anyag tartalom mennyiségének a

harmadára csökkentését a korábban megfelelőnek talált hormonösszetétel mellett, hogy megvizsgáljuk a szuszpenziós kultúra lignántermelésére gyakorolt hatását.



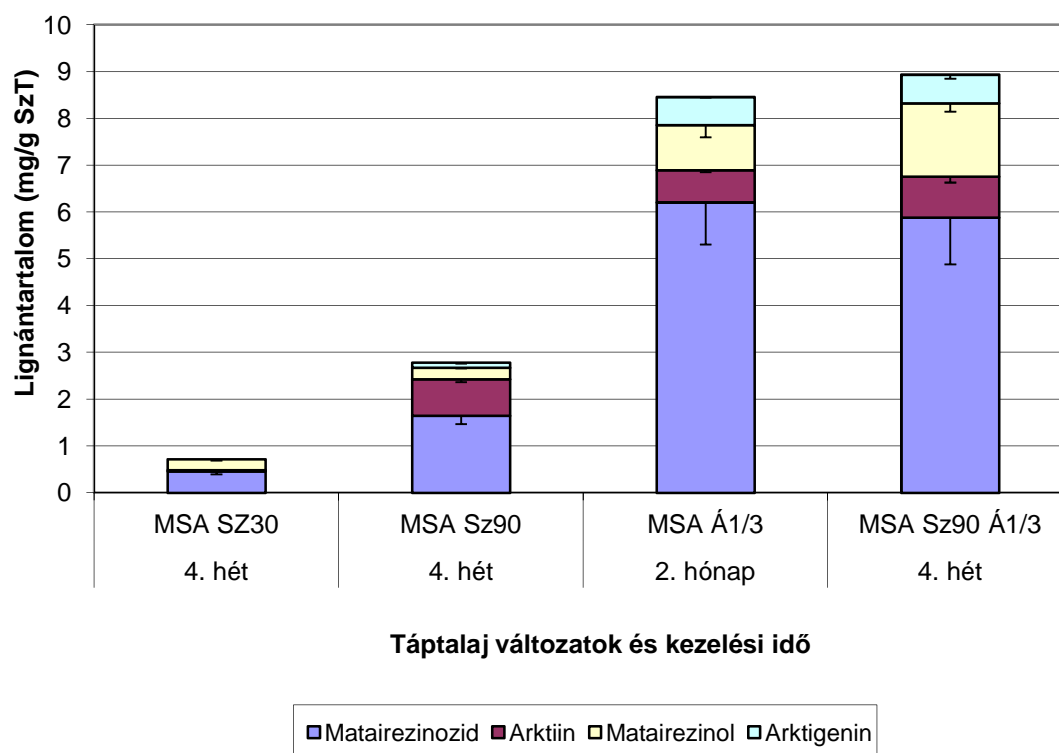
Táptalaj változatok és kezelési idő

■ Matairezinozid ■ Arktiin □ Matairezinol □ Arktigenin

22. ábra *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájának a lignántartalma, amit kontroll, és háromszorosára növelt szacharóz és harmadára csökkentett ásványi anyag tartalmú MSA táptalajon, természetes fényen neveltük. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A hibasávok szórást jelölik.. Rövidítések: MSA Sz30: MSA táptalaj 30 g l⁻¹ szacharóz tartalommal. MSA Sz90 Á 1/3: MSA táptalaj 90 g l⁻¹ szacharóz és 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal.

A szacharóz mennyiség növelése és az ásványi anyag tartalom egyidejű csökkentése a táptalajban jelentősen fokozta a sejtenyészet lignántermelését (22. ábra). A változtatások együttes alkalmazása szinergista módon hatott. A szuszpenzió összlignán tartalmának a szintje megegyezett a harmadára mérsékelt ásványi anyag tartalmú (MSA Á1/3) táptalajon nevelt sejtenyészet hatóanyag tartalmával (23. ábra). Viszont a kezelési idő a felére csökkent, csak 4 hetet vett igénybe a maximális lignántartalom elérése, hasonlóan a háromszoros szacharózt tartalmazó tápközeghez (MSA Sz90). A gazdaságossági szempontok miatt a sejtenyésztési idő lerövidülése kiemelkedő

fontosságú az *in vitro* technológiát alkalmazó hatóanyag termelésénél. A sejtenyészetben a lignánok közül a matairezinozid fordult elő nagy többségben az MSA Sz90 Á1/3 tápközegnél is, viszont a glikozidos formák mellett a matairezinol és az arktigenin is megjelentek nagyobb arányban. A tápközeg optimalizáció során MSA Sz90 Á1/3 tápközeg változat fokozta a legnagyobb mértékben és a legrövidebb fenntartási idő mellett a szuszpenziós tenyészet lignántermelését, emiatt ezt a tápközeg változatot választottuk ki az úgynevezett lignántermelő tápközegnek.



23. ábra *Forsythia x intermedia* eltérő táptalaj változatokon fényen nevelt szuszpenziós kultúrájának a lignántartalma. Rövidítések: MSA SZ30; MSA SZ90: MSA táptalaj 90 g l⁻¹ szacharóz tartalommal; MSA Á1/3: MSA táptalaj 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal; MSA Sz90 Á1/3: MSA táptalaj 90 g l⁻¹ szacharóz és 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre vonatkoztattuk. A hibasávok a szórást jelölik.

V.4.3. A fény hatása az *in vitro* kultúrák sejt differenciációjára és lignántartalmára

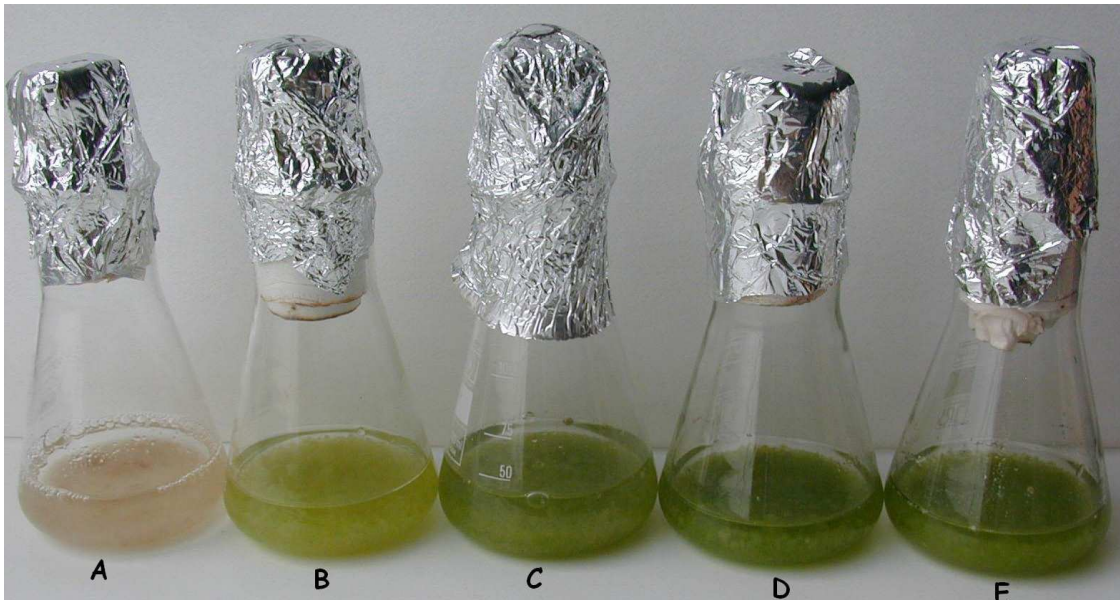
A *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájával végzett kísérletek során tapasztaltuk, hogy a természetes fényen nevelt kultúra lignántartalma meghaladta a sötétben tartott kultúráét. Feltételeztük, hogy a fény hatására a fotoszintetikus apparátus differenciálódásával együtt olyan sejt differenciálódási folyamatok is elindulnak, amelyek a lignántermelést serkentik (Smollny és mtsai 1998). A fény intenzitása és a megvilágítási idő befolyásolja lignántermelést a növényi sejkultúrákban, illetve a megfelelő fény-sötét megvilágítási periódus ugyanolyan mértékben képes fokozni a sejtenyészetek hatóanyag-termelését, mint a folyamatos megvilágítás, emellett energia takarékosabb és gazdaságosabb is (Fischer és Alfermann 1995). Ezért a sejtenyészetekben a fény hatását részletesebben vizsgáltuk többféle megvilágítási periódus alkalmazásával.

A *Forsythia* fajok és fajták közül a *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúrájának volt a legstabilabb zöld színe az előzetes kísérletek során (hónapokon át azonos színerősség). Ezért ezt a fajtát választottuk ki erre a kísérletsorozatra. Ennek során előnevelésként sötétben, MSA SZ30 tápközegen (ún. fenntartó táptalajon) neveltük a sejkultúrát a kísérlet elindításához. Az úgynevezett lignántermelő, MSA SZ90 Á1/3 táptalajon neveltük tovább szuszpenziós tenyészeteket, sötétben és „Laborfényen” illetve háromféle fény/sötét periódust (4/20; 8/16; 12/12 óra) alkalmaztunk (9. Táblázat, 24. ábra). E körülmények között 6 héten át tartottuk fenn a sejtenyészeteket, kéthetente vettünk mintát. Meghatároztuk a sejtenyészetek klorofill tartalmát és a fotoszintetikus apparátusuk klorofill-protein komplexei arányát 77 K fluoreszcencia spektroszkópiával, valamint fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel a sejtek ultrastruktúráját. Párhuzamosan mindegyik minta lignán tartalmát HPLC-vel mértük.

9. Táblázat Kísérleti elrendezés a fény hatásának vizsgálatára a *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúráinak a fejlődésére. Az ötféle kezelésnél háromszor vettünk mintát, 2., 4. és 6. héten.

Előnevelés (4 hét)	Megvilágítás típusai (6 hét)
MSA SZ30 Sötét	MSA SZ90 Á1/3 Sötét
	MSA SZ90 Á1/3 Természetes fény
	MSA SZ90 Á1/3 Fény/Sötét periódus (óra)
	4F20S: 4/20 8F16S: 8/16 12F12S: 12/12

Rövidítések: MSA SZ30; MSA táptalaj 30 g l⁻¹ szacharóz tartalommal; MSA Á1/3: MSA táptalaj 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal; MSA Sz90 Á1/3: MSA táptalaj 90 g l⁻¹ szacharóz és 1/3-nyi ásványi anyag tartalommal. Fénycsővel végzett megvilágításnál 4F/20S=napi 4/20; 8F/16S= napi 8/16; illetve 12F/12S= napi 12/12 óra Fény/Sötét periódus.



24. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA Sz90 Á1/3 táptalajon nevelt szuszpenziós kultúrái a kísérlet 4. hetében. A sejtenyészeteket különböző megvilágítások mellett tartottunk fenn. A kezelés előtt sötétben, MSA Sz30 táptalajon neveltük a sejtenyészeteket. A megvilágítási típusok a következők voltak: A=Sötét; B=napi 4/20; C=napi 8/16; illetve D= napi 12/12 óra Fény/Sötét periódus, E= természetes fény..

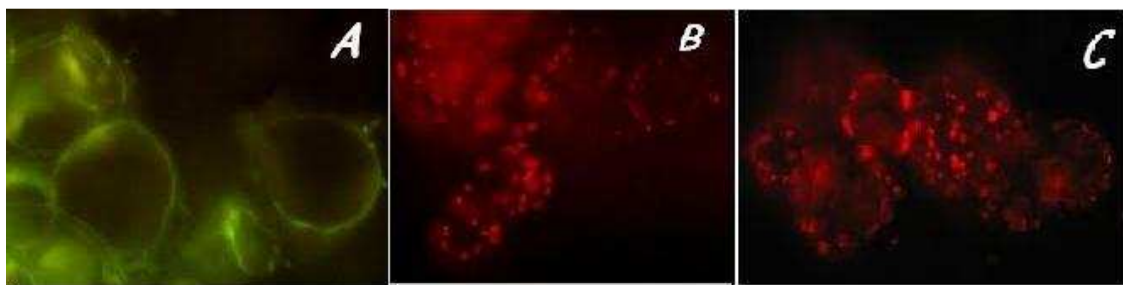
A fény hatására a *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós sejtenyészei megzöldültek. A megvilágítási időtartam hosszának növelésével

párhuzamosan egyre zöldebbek lettek a kultúrák. A sötétben nevelt sejttenyészet világosbarna volt (24./A ábra), a legzöldebb pedig a természetes fényen tartott kultúra (24./E ábra). A többi tenyészet átmeneti színű volt (24./B, C és D ábra).

V.4.3.1. A sötétben nevelt szuszpenziós kultúra klorofill tartalmának, fotoszintetikus apparátusának, ultrastruktúrájának és lignántartalmának vizsgálata

A sötétben MSA SZ30 táptalajon nevelt szuszpenziós tenyészetet MSA SZ90 Á1/3, úgynevezett lignántermelő táptalajra helyeztük át és vizsgáltuk a hatóanyag tartalom és a sejtdifferenciációs szint változását. Így elemeztük, hogy a megfelelő fenntartó tápközeg mellett a fenntartási körülmény, ebben az esetben a megvilágítás, milyen mértékben befolyásolja a sejttenyészet hatóanyag-termelését. Megvizsgáltuk, hogy a fény jelenléte szükséges-e a *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta sejttenyészetében a vizsgált lignánok termelődéséhez vagy elégséges a hatóanyag teremlésre optimalizált táptalaj használata.

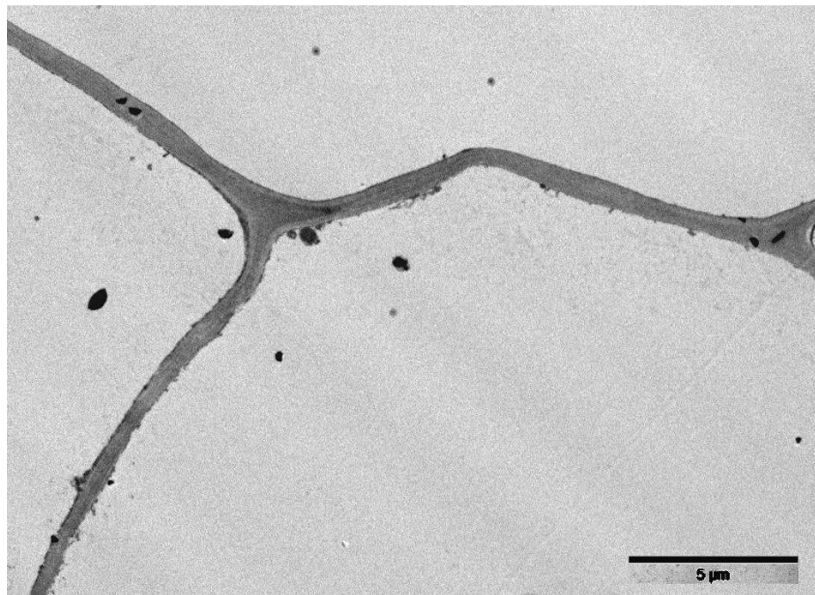
A kísérletek során mikroszkópos vizsgálatokkal nyomon követtük a sejtek differenciálódási folyamatait. Mivel ebben a kísérletsorozatban a fotoszintetikus apparátust vizsgáltuk, a klorofill vörös autofluoreszcenciája alapján fluoreszcencia mikroszkópos képeket készítettünk.



25. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt, háromféle módon megvilágított szuszpenziós kultúrájának fluoreszcencia mikroszkópos felvételei. Jelölések: A) Sötétben nevelt minta; B) Sötétről indított természetes fényen nevelt minta; C) Sötétről mesterséges fényre helyezett és napi 12/12 óra Fény/Sötét periódussal megvilágított minta.

Ezek a képek azt mutatták, hogy a szuszpenziós kultúrákra jellemző kerek sejtek nem tartalmaztak kloroplasztiszokat a sötétben fenntartott tenyészetekben (25. ábra A). A fényen nevelt kultúrákban viszont a képeken megjelenő intenzív vörös szín a kloroplasztiszok nagy mennyiségére utal (25. ábra B és C). A többi kísérletekben a sejttenyészetek sejtjeiről készült fluoreszcencia mikroszkópos képek nagyon hasonlóak, ezért ezeket nem mutatjuk be.

Az ultrastrukturális vizsgálatok azt mutatták, hogy a sötétben nevelt kultúráknál a sejtek nagy vakuóllummal és vékony citoplazma réteggel rendelkeztek, amiben kloroplasztiszokat nem találtunk (26. ábra). Ez jó összhangban volt azzal, hogy a sejt kultúra barna színű volt (24. ábra), kloroplasztiszok nem voltak kimutathatóak a tenyészet sejtjeiben és a 77 K fluoreszcencia emissziós spektrum alapvonalat adott (28. ábra „S” görbe). Ráadásul a sejttenyészet lignántartalma sem volt mérhető mennyiségű.



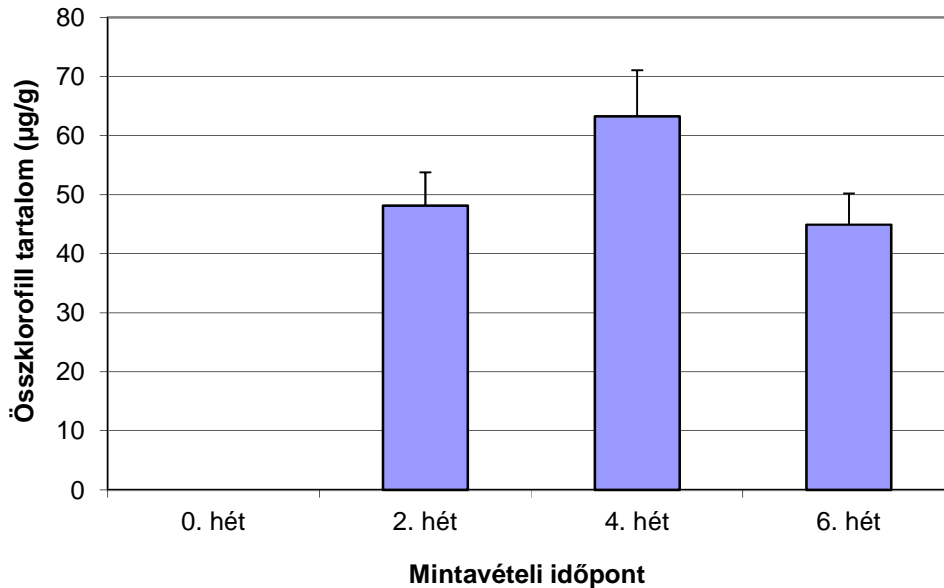
26. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon, sötétben nevelt szuszpenziós kultúra sejtjeinek ultrastrukturája.

V.4.3.2. A természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúra klorofill tartalmának, fotoszintetikus apparátusának, ultrastrukturájának és lignántartalmának vizsgálata

A sötétben, MSA SZ30 táptalajon fenntartott sejttenyészetet áthelyeztük MSA SZ90 Á1/3 táptalajra és természetes fényen neveltük 6 héten keresztül. Ennek következtében kialakulhattak a sejttenyészetekben a kloroplasztiszok, a szuszpenziós

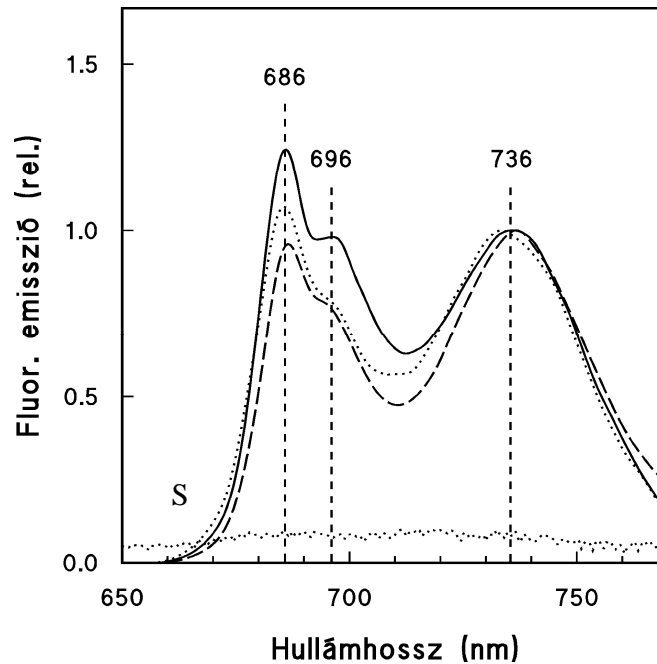
kultúra zöld színű lett előkísérleteinknek megfelelően és a klorofilltartalom mérhetővé vált (24. ábra).

Az összklorofill tartalom mérése (27. ábra) azt mutatta, hogy a megvilágítás hatására a 4. hétig nőtt a klorofill mennyisége, majd ez a 6. hétre lecsökkent.



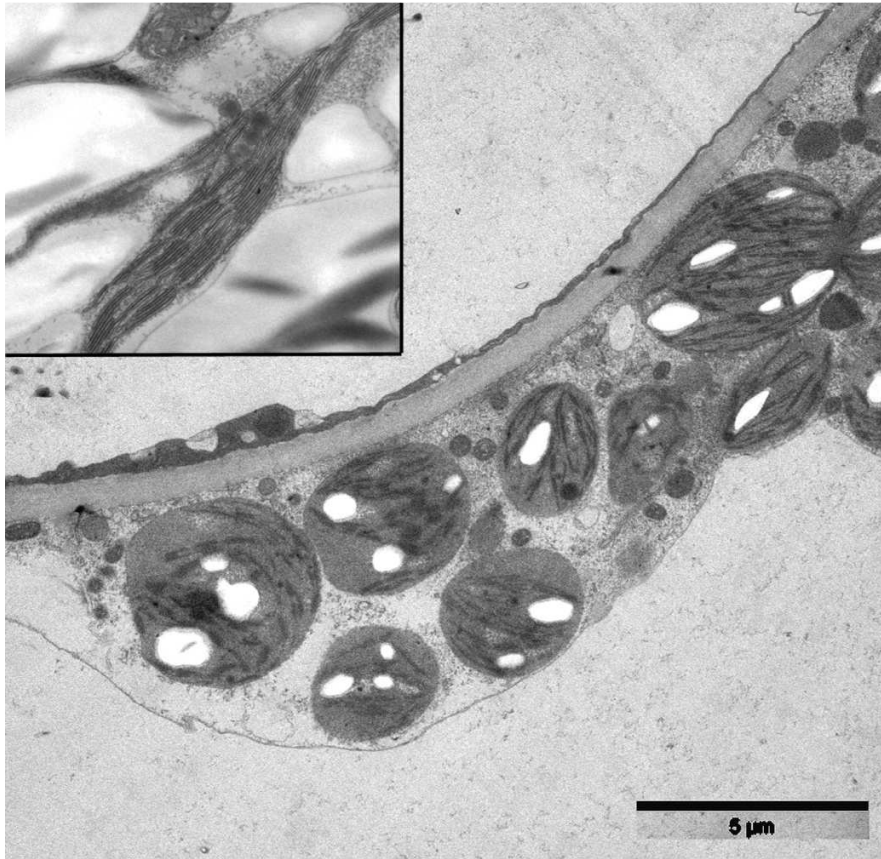
27. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt szuszpenziós kultúrájának összklorofill tartalma. A kezelés előtt sötétben, MSA SZ30 táptalajon neveltük a sejtenyészeteket, majd különböző ideig tartottuk természetes fényen a mintákat. Az adatok friss tömegre vonatkoznak. A hibasávok a szórást jelölik.

A fluoreszcencia spektrumok azt bizonyították, hogy a sötétben tartott szuszpenziókban nem alakultak a fotoszintetikus apparátus klorofill-protein komplexei, mert a 650-770 nm-es spektrum tartományban nem jelentek meg emissziós sávok (28. ábra "S" görbe). A megvilágítás hatására azonban, a megvilágítás módjától függetlenül, valamennyi minta spektrumában emissziós sávok jelentek meg 686, 696 és 736 nm-nél, amelyek a differenciálódott fotoszintetikus apparátusra jellemzőek (28. ábra).



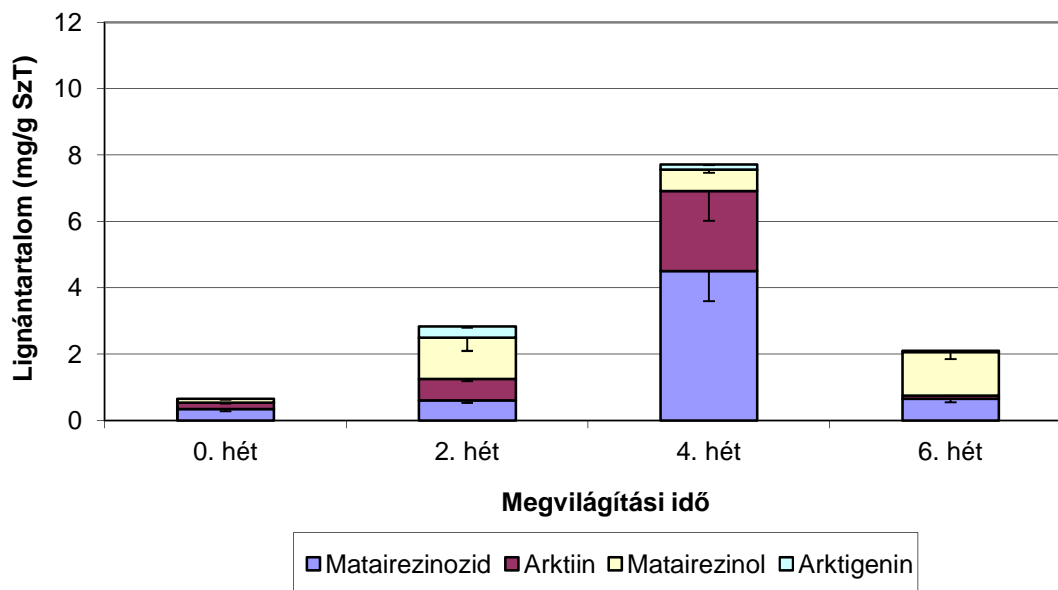
28. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt szuszpenziós kultúrájának 77 K fluoerszcencia emissziós spektrumai, amelyeket 736 nm-es sáv intenzitásra normáltunk, kivéve a sötétben nevelt mintánál. A kezelés előtt sötétben, MSA SZ30 táptalajon neveltük a sejttenyészeteket, majd különböző ideig tartottuk természetes fényen a mintákat. Folytonos vonal = 2. hét; Szaggatott vonal = 4. hét; Pontozott vonal = 6. hét mintavételi időpont; Pontozott vonal (S) = Sötét.

A fluoreszcencia spektroszkópai mérésekkel összhangban voltak az elektronmikroszkópos vizsgálatok. A fejlett kloroplasztiszokban gránumos tilakoid struktúrák kiépülését figyelhettük meg a fényen nevelt sejtekben (29. ábra). A sötétben nevelt kultúrák sejtjeihez képest a nagy központi vakuólum körül, a vastagabb rétegű citoplazmában jellegzetes volt a kloroplasztisz jelenléte, amelyek változó mennyiségű és méretű keményítőszemcsét és sok gránumot tartalmaztak.



29. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon, 4 hétig természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúra sejtjeinek ultrastruktúrája. A beszúrt ábra egy kloroplasztisz részletét emeli ki; jól láthatóak a gránumok és a nagyméretű keményítő szemcsék.

A természetes fénynek a lignántartalomra gyakorolt hatása igen erőteljes. A sötétben nevelt szuszpenziós kultúrában nem voltak detektálhatóak a vizsgált lignánok, ezzel szemben a természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúrájának lignántartalma magas volt (30. ábra). A legmagasabb értéket a 4 hetes megvilágítási időszak esetén mértük, a glikozidok túlsúlya, hasonlóan a táptalaj optimalizációs kísérletekhez, itt is megfigyelhető volt.



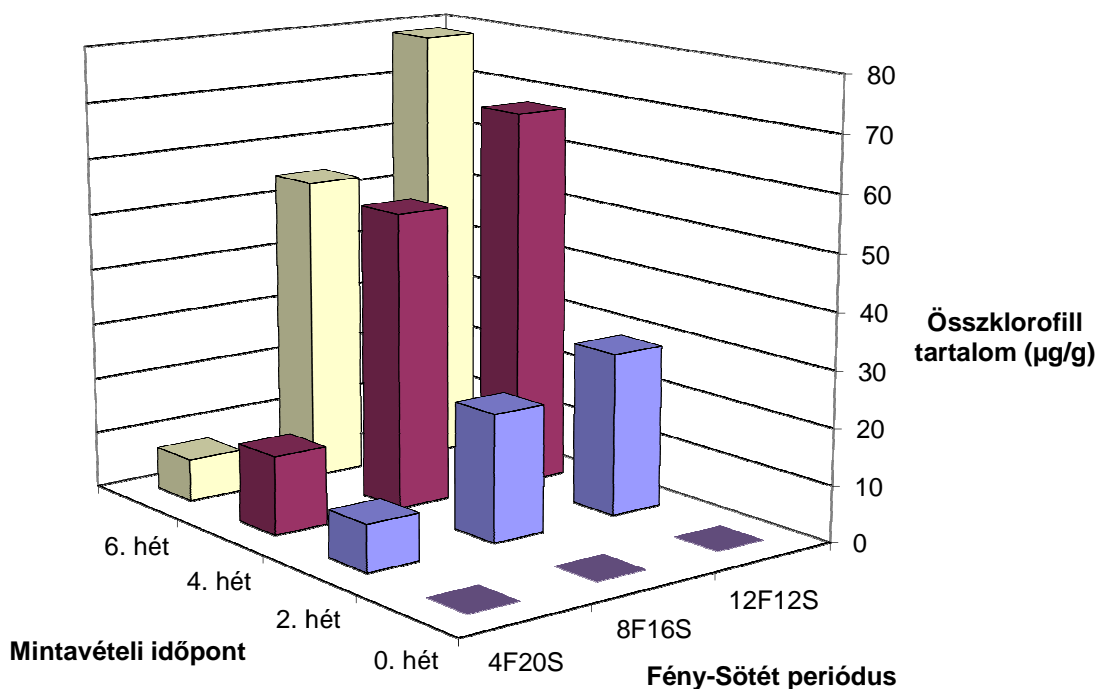
30. ábra *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta, MSA SZ90 Á1/3 táptalajon, természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúrájának lignántartalma. A kezelés előtt sötétben neveltük a sejtenyészeteket, majd 3 különböző időtartam (2, 4 és 6 hét) után vizsgáltuk a mintákat. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattunk. A hibasávok a szórást jelölik..

V.4.3.3. A mesterséges fényen nevelt szuszpenziós kultúra klorofill tartalmának, fotoszintetikus apparátusának, ultrastruktúrájának és lignántartalmának vizsgálata

Az előző kísérletsorozat egyértelműen mutatta a fény serkentő hatását az *in vitro* kultúra sejtdifferenciálódására és lignántartalmára. A továbbiakban a serkentés folyamatát tanulmányoztuk, azaz hogy azonos fényintenzitás mellett a megvilágítási periódus változtatásával a sejtenyészet lignántartalma tovább emelhető-e. Ebben az esetben az előzetesen MSA SZ30 táptalajon, sötétben nevelt sejtenyészetet helyeztük át MSA SZ90 Á1/3 táptalajra, majd fénycsövek alatt háromféle megvilágítási periódust alkalmaztunk, 4/20 és 8/16 illetve 12/12 óra Fény/Sötét periódust. E körülmények között 6 héten át tartottuk fenn a sejtenyészeteket, mintát 2 hetenként vettünk.

A kísérlet előtt a szuszpenziós kultúrát ebben az esetben sötétben is tartottuk fenn, emiatt a kísérlet indításakor nem volt detektálható a klorofilltartalom. A klorofill bioszintézis a kísérlet elindításakor különböző intenzitással kezdődhetett meg a megvilágítás időtartamától függően. Ennek következtében az összklorofill tartalomban

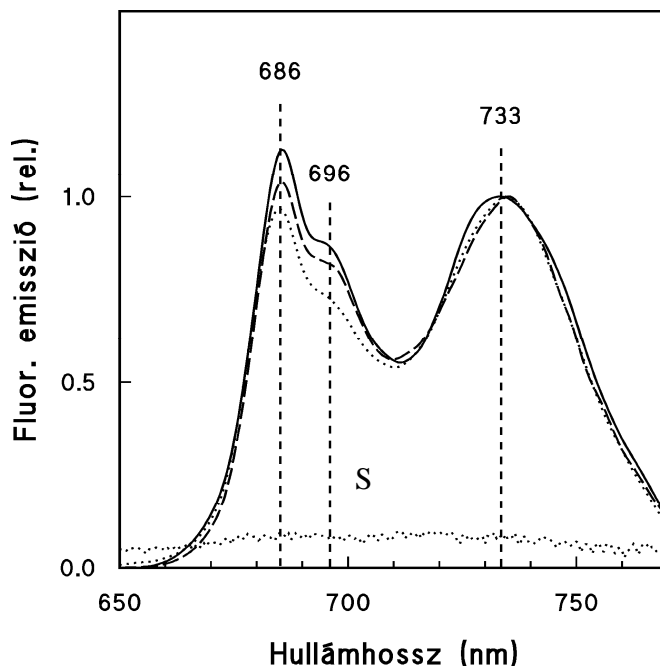
nagyobb eltérések keletkeztek, mint a „Laborfényen” nevelt sejttenyészet esetében (27. és 31. ábra). A legrövidebb periódus idejű, a napi 4/20 óra Fény/Sötét megvilágítási periódus mellett volt a legalacsonyabb az összklorofill tartalom, még a leghosszabb megvilágítás, a 12/12 óra Fény/Sötét periódus okozta a legmagasabb összklorofill értékeket. A megvilágítási periódusidő hosszával tehát párhuzamosan nőtt az összklorofill tartalom.



31. ábra *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúrájának összklorofill tartalma MSA SZ90 Á1/3 táptalajon. A kísérletindítás előtt sötétben neveltük a sejttenyészeteket, majd 3 különböző időpontban (2, 4 és 6 hét után) vizsgáltuk a mintákat. A fénycsővel történt megvilágítás típusai a következők voltak: 4F20S = napi 4/20 óra Fény/Sötét, 8F16S = napi 8/16 óra Fény/Sötét, 12F12S = napi 12/12 óra Fény/Sötét. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket friss tömegre vonatkoztattuk. RSD értékek 5,3-14% között mozogtak.

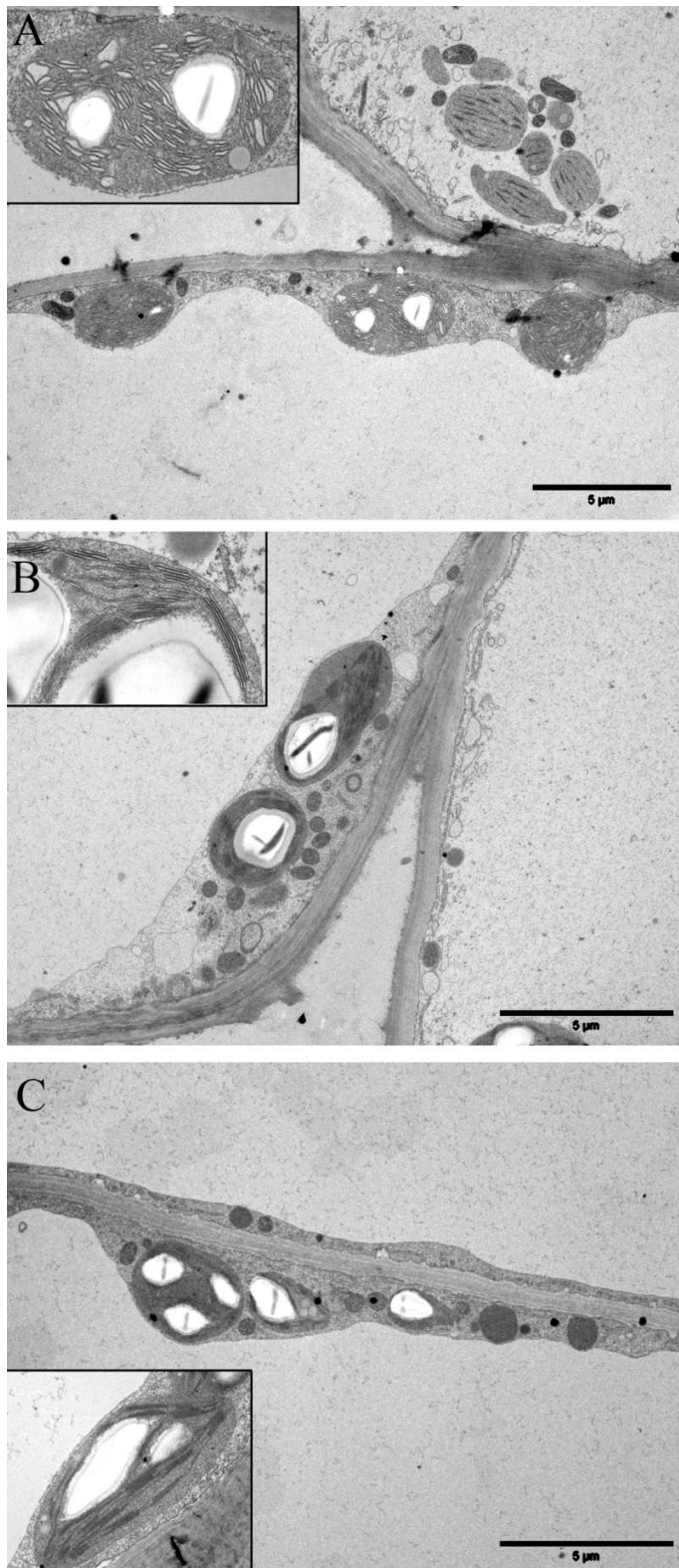
A spektrumokat ebben az esetben is a hosszú hullámhosszú (733 nm-es) sáv intenzitásán normáltuk (32. ábra). Emiatt az ábra a különböző klorofill-protein

komplexek egymáshoz viszonyított arányait mutatja. A spektrumok eltérései minimálisak. Hasonlóan a természetes fényen fenntartott kultúrákhoz, a fluoreszcencia emissziós spektrumokban 686 és 696 nm-rel jelzett sávok a PSII klorofill-protein komplexet jelzik, ezen kívül a 733 nm-es a PSI komplexet.



32. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt szuszpenziós kultúrájának 77 K fluoreszcencia spektrumai, amelyeket 733 nm-es sáv intenzitására normáltunk. Sötétből mesterséges fényre helyeztük át a sejtenyészetet, amit napi 8/16 óra Fény/Sötét periódussal világítottunk meg. A mintákat 2 hetente vizsgáltuk. Jelölések a spektrumon: Folytonos vonal = 2. hét; Szaggatott vonal = 4. hét; Pontozott vonal = 6. hét; Pontozott vonal (S)= Sötét.

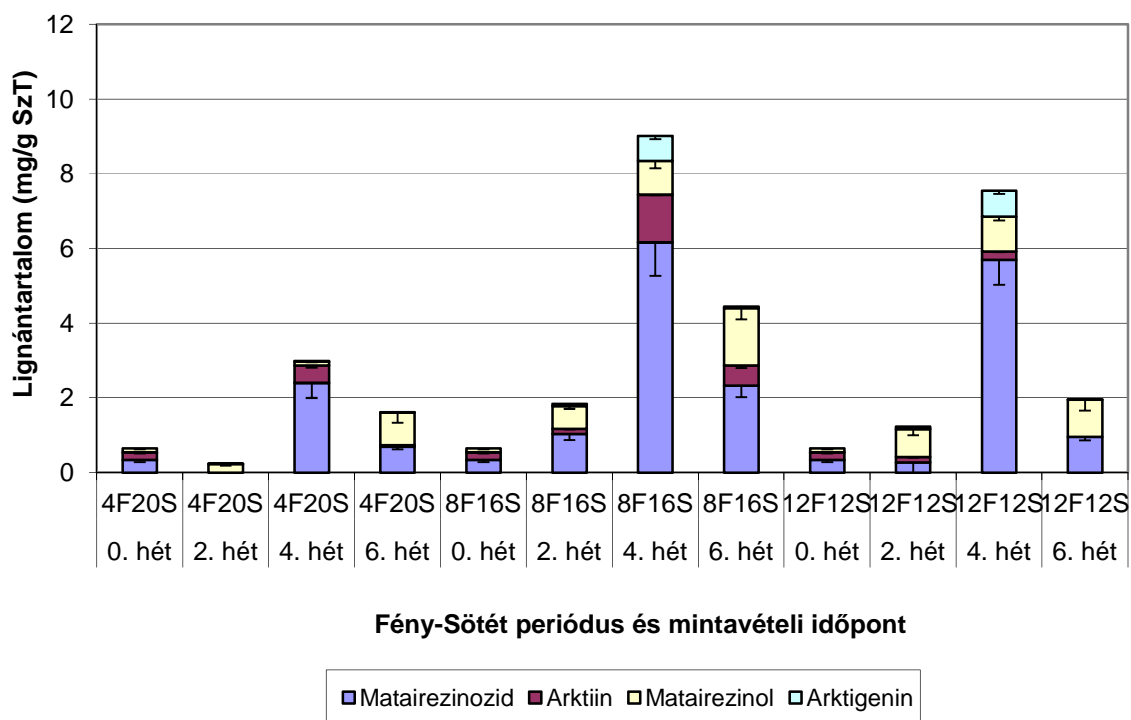
Az elektronmikroszkópos fotók (33. ábra) ebben az esetben is alátámasztották a klorofilltartalom mérés és a fluoreszcencia spektrumok adatait, amelyek szerint mindegyik fény/sötét megvilágítási periódusnál a fotoszintetikus apparátus kiépült. Az elektronmikroszkópos fotókon látható sejtekben nagy központi vakuólum körül viszonylag vastag citoplazma réteg volt, amiben sejtenként néhány kloroplasztisztaláltunk a mitokondriumok mellett. A kloroplasztiszokban keményítőszemcse előfordult és a tilakoid membrán rendszer is tartalmazott már gránumszerű sztekkelt membránokat.



33. ábra A *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt, sötétről fénycső alá helyezett szuszpenziós kultúra sejtjeinek ultrastruktúrája. 4 hét után vettük a mintákat. Jelölések: A) napi 4/20 óra Fény/Sötét megvilágítási periódus; B) napi 8/16 óra Fény/Sötét megvilágítási periódus; C) napi 12/12 óra Fény/Sötét megvilágítási periódus.

A megvilágítási periódusok közötti különbség megmutatkozott a kloroplasztizok fejlettségében is. A napi 4/20 óra Fény/Sötét megvilágítási periódussal kezelt kultúra sejtjeiben tágulatos tilakoid membránok voltak (33. ábra A), viszont a napi 8/16 óra és 12/12 óra Fény/Sötét megvilágítási periódusoknál már gránumok is kialakultak (33. ábra B és C).

A napi 8/16 óra Fény/Sötét megvilágítási idővel kezelt szuszpenziós kultúra lignántartalma volt a legnagyobb, 4 hetes kezelési időszak elteltével (34. ábra). Ez az érték meghaladja a természetes fényen nevelt szuszpenziós kultúra hatóanyagtartalmát. A szuszpenziós mintákban a matairezinozid fordult elő nagyobb mennyiségben valamint a matairezinol és az arktigenin is megjelent. A napi 8/16 óra Fény/Sötét megvilágítás alkalmazása során nagy mennyiségű arktiin termelődött.



34. ábra MSA SZ90 Á1/3 táptalajon nevelt és háromféle fény/sötét periódussal megvilágított *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúrájának lignántartalma. A kísérlet előtt sötétben neveltük a sejttenyészeteket, majd 3 különböző időpontban (2, 4 és 6 hét) vizsgáltuk a mintákat. A Fény/Sötét megvilágítási periódusok a következők voltak: 4F20S = napi 4/20 óra, 8F16S = napi 8/16 óra, 12F12S = napi 12/12 óra. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A hibasávok a szórást jelölik.

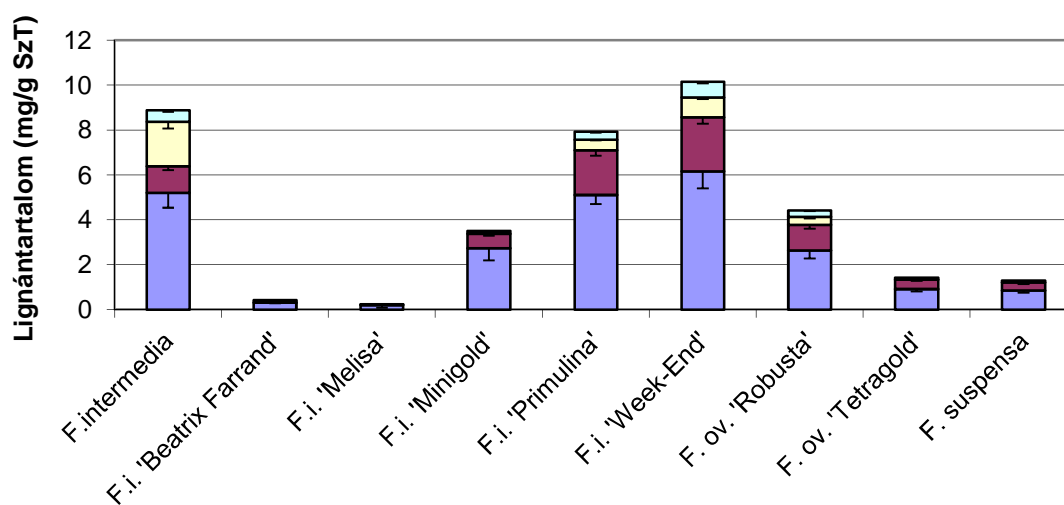
V.4.4. *Forsythia* fajok és fajták közti különbség az *in vitro* kultúrák lignántartalmában (Az optimalizációs kísérletek eredményeinek alkalmazására)

Célunk egy hatékony lignántermelő *Forsythia in vitro* sejttenyészet létrehozása volt nagyléptékű fermentációs termelés érdekében. A *Forsythia* fajoknak nagyszámú fajtái ismeretesek és a levelek összlignán tartalmában és összetételében is jelentős különbségek mutatkoztak nemcsak a fajok, hanem a fajták között is. Ezért az *in vitro* sejttenyészeteknél is megvizsgáltuk a fajok és fajták közötti, a lignántartalomban és összetételben megjelenő eltéréseket, a legmagasabb hatóanyag produkció elérése érdekében.

A munka során a 4 *Forsythia* faj és 12 fajta közül 3 fajtából (*F. intermedia*, *F. ovata*, *F. suspensa*) és 6 fajtából (*F. intermedia* Beatrix Farrand, Melissa, Minigold, Primulina és Week-End, emellett a *F. ovata* Robusta és Tetragold) sikerült szuszpenziót létrehozni.

A maximális hatóanyag tartalom eléréséhez a munkánkban a létrehozott szuszpenziós kultúrákat a lignántermelő MSA SZ90 Á1/3 táptalajon neveltük, az optimális 8/16 órás mesterséges megvilágítás mellett.

A munka során 3 fajtából és 6 fajtából létrejött sejttenyészetek összlignán tartalma közül 2 fajé és 2 fajtáé elhanyagolható, három fajtáé viszont kiemelkedő (35. ábra). A *F. intermedia* 'Week-End' fajta lignántartalma a legmagasabb, 15-szöröse a legalacsonyabb sejttenyészetének (*F. intermedia* 'Melisa'). A lignánösszetétel nagyon hasonló a szuszpenziókban. A matairezinozid mennyisége döntő, emellett arktiin fordul elő szuszpenziós kultúrákban, az aglikonok mennyisége mindegyikben elenyésző.



Forsythia fajok és fajták

■ Matairezinozid ■ Arktiin □ Matairezinol □ Arktigenin

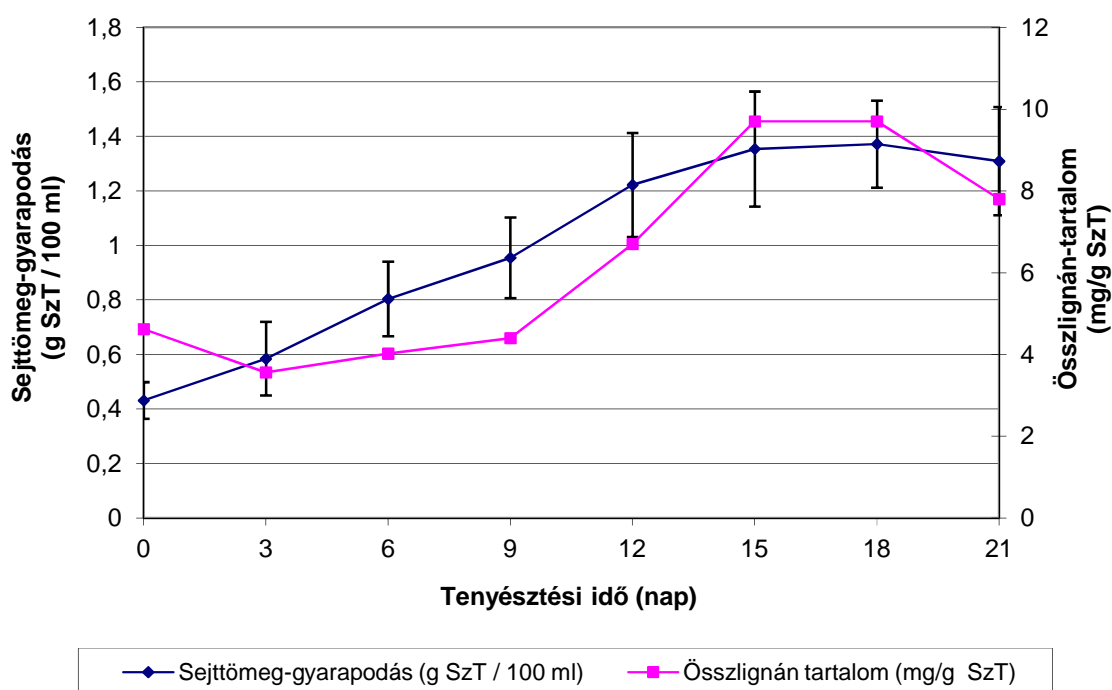
35. ábra Forsythia fajok és fajták szuszpenziós kultúrájának az összlignántartalma és lignán összetétele. A sejt kultúrát MSA SZ90 Á1/3 táptalajon neveltünk, napi 8/16 óra Fény/Sötét periódussal világítottuk meg. A mintákat 4 hét elteltével szüreteltük. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A hibasávok a szórást jelölik.

V.4.5. A leghatékonyabb lignántermelő szuszpenziós kultúra növekedési görbéje

Az *Forsythia in vitro* sejttenyészetekkel végzett kísérleteink összegzéseként a legmagasabb lignántermelés elérésére alkalmas *Forsythia* fajtát, tápközeg változatot és megvilágítási módot alkalmaztuk és vizsgáltuk a szuszpenziós kultúra sejttömeggyarapodását és az összlignántartalom változását a három hetes tenyésztési idő alatt. *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúráját MSA SZ90 Á1/3 táptalajon, napi 8/16 óra Fény/Sötét periódussal világítottuk meg, a 3 hetes tenyésztési idő alatt a 3 mintát 3 naponta gyűjtöttünk be a növekedési görbe felvételéhez.

Forsythia x intermedia 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúrájának növekedési görbéjén látható, hogy a kultúra sejttömege már az első naptól kezdve folyamatosan növekszik a 18. napig (36. ábra). A maximumot a 18. napon éri el majd ezt követően

lassú csökkenés tapasztalható. A maximum érték a kiindulási mennyiség több mint kétszerese. Az összlignán tartalom az első 3 nap folyamán csökkent, majd nagyon lassú növekedést mutatott a 3. és 9. nap között. Ezután a 15. napig erőteljes, gyors növekedésbe kezdett, így érte el a maximumot a 15. és 18. nap közötti platón, ekkor a kezdeti összlignán tartalom több mint a kétszeresére emelkedett. Az optimalizált *Forsythia* fajta, tápközeg és megvilágítási mód esetén a maximális lignántartalom kinyerése érdekében a szuszpenziós kultúrákat a 15. és 18. nap között érdemes begyűjteni.



36. ábra *Forsythia x intermedia* 'Week-End' fajta szuszpenziós kultúrájának össztömeg-gyarapodása és a tenyészet összlignántartalma. A kultúrákat MSA SZ90 Á1/3 táptalajon, napi 8/16 óra Fény/Sötét periódussal világítottuk meg. A 3 hetes tenyésztési idő alatt a 3 mintát 3 naponta gyűjtöttünk be. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A sejttömeg gyarapodás adatai esetén a standard hibaértékeket tüntettük fel a görbén, az összlignán görbénél az RSD értékek 5,9 és 21 % között mozogtak.

VI. Megbeszélés

VI.1. A lignán extrakció optimalizálása *Forsythia x intermedia* fajban

Az irodalomban nem volt egységes feltárási módszer a *Forsythia* fajokban fellelhető arktigeninre és arktiinre vonatkozóan (Bevezetés 2. Táblázat) és a meglévő módszerek egymással nem voltak összevethetőek. Ezért volt szükség az extrakciós módszerek optimalizálására és összehasonlítására. Így a három leggyakrabban használt módszert (ultrahangos dezintegrálás, refluxálás és SFE) hasonlítottuk össze, kombinálva négyféle kivonó eleggyel (100 % és 60 % etanol és metanol).

A 12 féle metodikát összevetve több mint kétszeres különbséget találtunk a legkevésbé megfelelő és a leghatékonyabb módszer között. A eljárásokon belüli eltérés hasonló nagyságú volt az eljárások között tapasztalhoz, mert a kivonás hatékonyságát az oldószer ugyanolyan mértékben befolyásolta, mint a kivonás módszere. Ezek az adatok is megerősítették a különböző feltárási módszerek összehasonlításának szükségességét, kiemelve nemcsak az alkalmazott módszerek, de a kivonószerek szerepét is. Megállapításaink egybeesnek Choi és mtsai (2003) által leírtakkal. Az általuk alkalmazott, 100 % metanollal végzett ultrahangos dezintegráláshoz képest az SFE-vel történt lignán kivonásuk hatékonysága 66 % volt, viszont a metanollal együtt végzett SFE 110 %-os. A mi kivonásainkban a 100 % metanollal végzett ultrahangos dezintegráláshoz viszonyítva a 100 % metanolt is használó SFE hatékonysága közel azonos volt, hasonlóan Choi és mtsai eredményeihez. Viszont ezt a hatékonyságot is sikerült tovább növelnünk, 137%-ra, az SFE esetén a 60 %-os metanol alkalmazásával.

Munkánkban a lignán extrakció optimalizálása során a 60%-os etanos SFE 50%-kal rosszabb hatásfokú volt a 60%-os metanos SFE eljárásnál. Choi és munkatársai (2002) ehhez hasonló eredményt kaptak a lignánokhoz hasonló polaritású diterpén glikozidok (stevioside és rebaudioside) kinyerése során a *Stevia rebaudiana* Bertoni fajnál. Az SFE eljárással végzett kivonás optimalizálása során a széndioxidhoz adagolt kivonószerek minőségét és elegyítési arányait is vizsgálták. A széndioxidhoz 5, 10 és 20%-os arányban adtak etanolt, metanolt valamint 80%-os metanolt. Ebben az összehasonlításban a 20%-os arányban alkalmazott kivonószerek voltak a

leghatásosabbak. Az kivonószerek közül a 80%-os metanol volt a leghatékonyabb, amelyhez képest a metanol hatásfoka 70%, az etanolé 40% volt.

A három metodika összehasonlításában azonban, ha figyelembe vesszük a hatékonyság mellett a költség igényt, a hasznos információ tartalmát, az egy időben feldolgozható mintaszámot és az ehhez szükséges minimális időt is, megváltozik az alkalmasság sorrendje. A három kivonási eljárás közül a refluxálás a legalkalmasabb szelekcióra. Mivel ezzel a módszerrel dolgozható fel magas mintaszám, rövid idő alatt, minimális eszköz és alacsony vegyszer igénnyel, amellet, hogy a vizsgált molekulák extrahálhatóak így. Az ultrahangos dezintegrálás az szelekciót követő munkafázisban ajánlható. Ez az eljárás hosszabb időt igényel, emiatt alacsonyabb mintaszám esetén érdemes ezt választani. Az eszköz igénye magasabb, mint a refluxálásé, viszont még mindig alacsonynak tekinthető és a vegyszer felhasználása is alacsony, a kivonható molekulák széles köre miatt általánosan alkalmazott kivonási eljárás. Az SFE elsősorban metodika fejlesztéshez és az ipari léptékű kinyerés előzetes vizsgálatához kiváló. Ez az eljárás igényel a legtöbb időt 1-1 minta feldolgozásához, emiatt alacsony mintaszám esetén ajánlott. Az eszközigénye nagy (drága a készülék beszerzése), viszont a vegyszer igénye alacsony. A molekulák változatos köre vonható ki ezzel a készülékkel, ráadásul az egyes komponensek szelektív kinyerésére is ez a módszer a legalkalmasabb. Ezek alapján a levelekből történő kivonást, a leghatékonyabb módszerrel és kivonó eleggyel, SFE készülékkel 60%-os metanollal végeztük, mert ebben az esetben viszonylag alacsony mintaszámmal dolgoztunk. Az *in vitro* kultúráknál viszont viszonylag nagy mintaszám feldolgozására volt szükségünk, emiatt a magas hatékonyságú 100%-os metanollal történő refluxálást alkalmaztuk. Ezek alapján az arktigenin és arktiin extrakciójának kiválasztása során szükséges figyelembe venni a hatékonyság mellett a metodika többi paraméterét is.

VI.2. A *Forsythia* fajok és fajták leveleinek fenoloid és lignántartalma, illetve antioxidáns kapacitása

A színreakción alapuló spektrofotometriás mérések nagy számú minta gyors feldolgozására alkalmasak. Emiatt a magas lignántartalmú fajok, illetve fajták kiválasztásának gyorsítása érdekében a nagyobb pontosságú, viszont időigényesebb

kromatográfiás módszerek használata előtt, mintaszám csökkentő szelekcióra kívántuk alkalmazni a spektrofotometriás színreakciókat.

Mivel az összlignán tartalom mérésére nem ismert spektrofotometriás színreakció, így a fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás meghatározását választottuk ki munkánkban, hogy megvizsgáljuk alkalmasak-e ezek a módszerek az előszelekcióra.

A másodlagos anyagcseretermékek között a lignánok a fenoloidok egyik csoportját alkotják a flavonoidok és fenilpropanoidok mellett. A lignánok nagy mennyiségű előfordulásáról számoltak be a kutatók (2 táblázat) a *Forsythia* fajokban. Emiatt feltételeztük, hogy előszelekciós módszerként a lignánok HPLC készülékkel mért összesített lignántartalmának a becslésére alkalmas lehet a fenoloid tartalom meghatározása. Erre a célra a gyakran alkalmazott, a fenoloidok viszonylag széles körét kimutató, Folin-Ciocalteou reagenssel végzett spektrofotometriás módszert használtuk (Turkmen és mtsai 2006)

A *Forsythia* fajokban nagy mennyiségben termelődő lignánok antioxidáns kapacitását mindegyik lignán komponens esetén igazolták a kutatók (Kim és mtsai 2003; Yamauchi és mtsai 2006; Chen és mtsai 1999; Jong és mtsai 1998). Irodalmi adatok alapján a fenoloidok csoportján belül az antioxidáns hatású lignánok jelentős mennyiségben vannak jelen a *Forsythia* fajokban (2 Táblázat). Ebből kiindulva feltételeztük, hogy az antioxidáns kapacitást vizsgáló színreakció alkalmas lehet a *Forsythia* fajok lignánjainak HPLC készülékkel mért összesített mennyiségének a becslésére. Az antioxidáns kapacitás mérésére az egyszerű, gyors és olcsó FRAP módszert választottuk (Benzie és Strain 1996).

A fenoloid tartalom és az antioxidáns kapacitás mérését döntően az élelmiszerek, elsősorban a gyümölcsök és zöldségek esetén használják a kutatók (Fu és mtsai 2011). Ennek következtében kevés az eredményeinkkel összevethető irodalmi adat. Ráadásul a metodikák közötti eltérések szintén nehezítik az eredmények összehasonlítását. A fekete és maté teára vonatkozó összfenoloid adatokkal (Turkmen és mtsai 2006) egybeesnek a *Forsythia* fajok és fajták levél kivonataiban mért fenoloid értékeink. Az antioxidáns kapacitás esetén Li és munkatársai (2008) 45 gyógynövény vizsgálata során standardként FeSO₄ oldatot használtak az általunk alkalmazott aszkorbinsavval szemben, emiatt ezek az értékek csak közelítőleg vethetők össze eredményeinkkel. A 45 vizsgált növényfajhoz

viszonyítva a *Forsythia suspensa* közepes erősségű antioxidáns kapacitást mutat. Tadhani és munkatársai (2007) aszkorbinsavra vonatkoztatva közölték *Stevia rebaudiana* levelének gyökfogó képességét, amely adat nagyságrendileg egybeesik az általunk mért eredményekkel.

A *Forsythia* fajokat és a fajtákat tekintve az összesített lignántartalommal a fenoloid tartalom mutatott szoros korrelációt, az antioxidáns kapacitás nem. Ezek alapján a *Forsythia* fajok és a fajták esetén a Folin-Ciocalteou reagenssel végzett spektrofotometriás módszer alkalmas az előszelekcióra.

Az antioxidáns kapacitás esetén az összefüggés hiánya részben az alkalmazott mérési módszerek pontossága közötti különbségből adódhatott. Ezen felül a spektrofotometriás színreakciónál a lignánokon kívüli vegyületsoportok is befolyásolhatták a méréseket. Valószínűleg a mintákban jelenlevő flavonoidok, fenilpropanoidok és fenolsavak erős antioxidáns kapacitása csökkentette oly mértékben a korrelációt, hogy emiatt ez a módszer nem alkalmas az előszelekcióra. A *Forsythia* minták fenolsav, illetve flavonoid tartalmára vonatkozóan irodalmi és saját mérési adatok is rendelkezésre állnak. Kitagawa és munkatársai (1984 és 1988) fenilpropanoidok és egy flavonoid, a rutin jelenlétéről számolt be *Forsythia* fajokban. Nishibe (1994) szintén fenilpropanoid komponenseket mutatott ki. Guo és mtsai (2007) számos fenilpropanoidot és a rutint írtak le a *Forsythia suspensa* fajban. Munkánkban fenilpropanoidot, klorogén savat valamint a flavonoidok közül quercetint mértünk (Sedlák és mtsai 2008a; Boldizsár és mtsai 2010). Emellett spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk az összflavonoid tartalmat, ami alacsony flavonoid mennyiségre utalt (Sedlák és mtsai 2008b).

VI.3. *Forsythia* fajok és fajták lignánösszetételének azonosítása és mennyiségi meghatározása

A *Forsythia* fajokban megtalálható lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztásuk után ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömegspektrometriás (MS) detektálással, illetve gázkromatográfiás (GC) elválasztásukat követően MS detektálással történt.

A vizsgált lignánok azonosítása standardokkal egyező retenció idejük (arktiin, matairezinol, arktigenin) és tömegspektrometriás jellemzőik alapján történt (Choi és mti 2003; Boldizsár és mti 2010).

A lignánok alacsony illékonysága miatt a GC elválasztásához trimetilszilil származékokat állítottunk elő. Néhány lignán molekulaionja megegyezett (arktigenin a filligeninnel és a matairezinol a pinorezinollal), ezért szükséges volt a fragmentum ionjaik vizsgálata is és ezek segítségével történt az azonosításuk.

A lignánok analitikai vizsgálata során a butirolakton és furofurán típusú lignánok együtt mérhetőek mindhárom készülékkel. Viszont a HPLC-UV mérés során az arktigenin és a filligenin nem választható el egymástól alapvonalig. Ennek következtében azokat a mintákat, amelyekben a két lignán mennyisége között nagyságrendi volt az eltérés, GC-MS készülékkel is mértük (Sedlák és mti 2008a). Az irodalomban leírtakkal (Slanina és Glatz 2004) összehangban megállapítottuk vizsgálataink során, hogy a különféle kromatográfiai módszerek egyidejű alkalmazása fokozza a vizsgálatok pontosságát és megbízhatóságát.

A korábbi kutatásokban az általunk vizsgált fajok közül egyedül a *Forsythia x intermedia* levelének lignántartalmát határozták meg mennyiségileg (Rahman és mtsai 1990a), ezekkel az adatokkal döntően egybeestek az általunk mért értékek. Az összlignán tartalomban megjelent eltérések jelentősek voltak a fajok és a fajták között is. A gyógynövények és az élelmiszer növények hatóanyag tartalom szeirnti szelekciójánál a fajtákra is figyelmet fordítanak, szemben a *Forsythia* nemzetség tagjainak vizsgálatával. A fenoloidokat gyömbér fajtákban (Ghasemzadeh és mtsai 2010) és Tagetes fajtákban vizsgálták (Li és mtsai 2007), a lignántartalmat különböző fajtához tartozó szezám magokban (Hemalatha S, Ghafoorunissa 2004) valamint számos búza fajtában (Dinelli és mtsai 2007). A *Forsythia* nemzetségnél a natív növényi minták elemzése során a fajtákat csak két kutatócsoport vette figyelembe. Az egyik csoport a *Forsythia* nemzetség filogenetikai vizsgálatában (Kim 1999), a másik a *Forsythia x intermedia* levelének gomba patogénekkal szembeni ellenálló képesség elemzésénél nevezte meg az alkalmazott fajtákat (Orlikowski és Ptaszek 2008). A kutatócsoportok korábban nem fordítottak figyelmet a fajtákra a hatóanyagtartalom meghatározásánál, így a munkánk során először határoztuk meg a fajon belül a fajták közötti ligántartalomban megjelenő

eltéréseket. A lignánösszetételt vizsgálva megállapítható, hogy az arktigenin volt a fő lignán mindegyik fajban és fajtában, viszont ezek összlignán tartalomhoz viszonyított aránya nagyon változó (41%-92%) nemcsak a fajok, de a fajták között is. Így a nemzetség további felhasználása során szükséges a fajták elemzése is a fajok mellett.

A fajták közötti szelekció megkönnyítésére alkalmaztuk a biplot elemzést. A gyógynövények hatóanyag-tartalom szerinti optimális fajta kiválasztásához alkalmazták a biplot elemzést a zsálya esetén (Böszörményi és mtsai 2009). Ebben az analízisben a pinorezinolt és a filligenint ábrázoló vektorok közel párhuzamosak voltak. Ezek alapján a *Forsythia x intermedia* fajták lignán összetétel szerinti csoportosításánál a pinorezinol és filligenin együttes mennyiségi meghatározása redundáns, ehhez elegendő az egyik lignán mérése. Viszont az arktigenin vektora merőleges a pinorezinolt és filligenint ábrázoló vektorra, ez mutatja, hogy az arktigenin független ennek a két lignánnak a mennyiségétől. Ezért az elemzés szerint, az arktigenin mennyiségi meghatározása szükséges a fajták lignán összetétel szerinti kategorizálásához.

VI.4. *Forsythia* fajok és fajták szövettanyészeteinek létrehozása és lignántartalmának fokozása

Számos előnyüknek köszönhetően az *in vitro* növényi sejttanyészetek egyre gyakrabban kiindulópontjai a hatóanyag kinyerésnek. Mivel steril körülmények között hozható létre és tartható fenn a kultúra, így kiküszöbölhetőek a különféle szennyeződések és az igényeknek megfelelően alakítható az anyagcsere termékek előállítására. Az intakt növények hatóanyag tartalmához képest az *in vitro* kultúrák általában alacsonyabb, viszont ez fokozható a sejttanyészetek tápközegének vagy fenntartási körülményeinek változtatásával, elicitorok illetve prekursorok alkalmazásával.

A *Forsythia* fajoknak nagyszámú fajtái is ismeretesek, amelyekből létrehozott sejttanyészetek lignántartalma alig ismert az irodalomban (2. Táblázat). Viszont a levelek eltérő lignántartalma alapján az *in vitro* kultúrák hatóanyag tartalmában szintén különbözhetnek egymástól, ezért a fajtákból is indítottunk el *in vitro* tanyészeteket.

Célunk egy hatékony lignán termelő *Forsythia in vitro* sejttanyészet létrehozása és a hatóanyag-termelésének a fokozása egy nagyléptékű fermentációs termelés létrehozása érdekében.

VI.4.1. *Forsythia* fajok és fajták szövettanyészeteinek létrehozása

A *Forsythia* fajoknak nagyszámú fajtája ismeretes, amelyekből létrehozott sejttanyészetek lignántartalma alig ismert az irodalomban (Schmitt és Petersen 2002a). A levelek eltérő lignántartalma alapján az *in vitro* kultúrák hatóanyag tartalma szintén különbözhet egymástól. Ezért e fajtákból is indítottunk el sejttanyészeteket a leghatékonyabb lignántermelő *Forsythia in vitro* kultúra kiválasztása céljából.

A *Forsythia* nemzetségen belül 3 fajból (*F. intermedia*, *F. ovata*, *F. suspensa*) és 6 fajtából (*F. intermedia* Beatrix Farrand, Melissa, Minigold, Primulina és Week-End, emellett a *F. ovata Robusta* és *Tetragold*) sikerült kalluszt, majd szuszpenziós tenyészeteket létrehozni lignántermelés céljából. A *Forsythia ovata* faj esetén még nem írták le az *in vitro* kultúra létrehozását. A korábbi munkákban a *Forsythia* a sejttanyészeteket lignántermelésre két kutatócsoport alkalmazta. Ezek közül a fajon belüli fajtát Schmitt és Petersen (2002 a és b) feltüntette, viszont Rahman és munkatársai (1990b) nem. Emiatt kiemelkedő, hogy a kísérleteinkben figyelmet fordítottunk az eredetre és a sejttanyészeteket azonos körülmények között neveltük, így azok lignántermelése összehasonlíthatóvá vált.

VI.4.2. Az *in vitro* kultúrák táptalaj összetételének módosítása hat a lignántartalomra

Az *in vitro* tenyészetek hatóanyag tartalma általában elmarad az intakt növényekétől, ezért szükséges a sejttanyészetés optimalizálása a nagyobb lignántermelés elérése érdekében. A korábbi kutatások szerint a *Forsythia x intermedia in vitro* sejttanyészeteinek lignántartalma fokozható a táptalaj összetevőinek módosításával (Rahman és mtsai 1990b; Schmitt és Petersen 2002a).

A szuszpenziós kultúrák lignán összetételét vizsgálva megállapítottuk, hogy a glikozidos formák túlsúlyban vannak. Ez egybeesik a kutatócsoportok korábbi eredményeivel, amelyben Yamamoto és munkatársai (1998) a *Forsythia viridissima* faj kallusz kultúrájában, Schmitt és Petersen (2002a) *Forsythia x intermedia* szuszpenziókban valamint Kim és munkatársai (2009) *Forsythia koreana* szuszpenzió tenyészetben találták dominánsnak a glikozidos formát.

Előzetes kísérletek eredményei alapján (Sedlák 2006) a szuszpenziós tenyészetek hatékonyabb lignán termelők voltak, mint a kallusz kultúrák, emiatt a munkánk további részében a szuszpenziós tenyészetek használtuk. A *Forsythia x intermedia* szuszpenziós tenyészetekkel végeztük el a táptalaj optimalizáció kísérleteit, amely során a tápközeg szacharóz, ásványi anyag illetve hormon mennyiségi összetételének változtatása jelentősen fokozta a szuszpenziós kultúrák lignántartalmát.

A tápközeg hormon (2 mg g⁻¹ NAA és 0.2 mg g⁻¹ kinetin) és ásványi anyag (makro- és mikroelemek harmadára csökkentése) tartalmának módosítása fokozta a sejttenyészet lignántartalmát, így sikerült megerősítenünk Rahman és munkatársai (1990b) eredményeit. Az alkalmazott hormon kombináció valószínűleg elősegítette a szuszpenziós kultúrában a sejtdifferenciációt, ami közvetetten fokozta a lignántermelést. Viszont a magas sejttömeg-gyarapodás arra utalt, hogy egyidőben a sejtproliferációt is serkentette ez a hormon kombináció, tehát ez a hormon összetételű tápközeg megfelelő ún. fenntartó táptalajnak. A hatóanyag-termelésre használt növényi sejttenyészeteknél általában az tekinthető optimálisnak, ha viszonylag magas sejtproliferáció mellett viszonylag magas sejtdifferenciációt érnek el a gazdaságos termelés érdekében (Payne és mtsai 1987).

A táptalaj szacharóz tartalmának emelése (90 g l⁻¹) szintén fokozta a szuszpenziós kultúra hatóanyag-termelését, hasonlóan Schmitt és Petersen (2002a) munkájához. A táptalaj cukor mennyiségének növelése feltehetőleg fokozza a szuszpenziós kultúra sejteiben az ozmotikus stresszt, ami közvetetten növeli a hatóanyag-termelést (Schmitt és Petersen 2002a). Emellett a sejtekben a megnövekedett szacharóz koncentráció befolyásolhatja a „hexóz-foszfát söntöt”. Így növelheti a pentóz-foszfát úton keresztül a fenoloidok előanyagaként szolgáló eritróz-4 P mennyiségét.

A *Forsythia x intermedia* szuszpenziós tenyészetekben a lignántermelés fokozására irányuló munkákban a táptalaj optimalizáció során a hormon összetétel módosítását vagy a cukor vagy az ásványi anyagok mennyiségének változtatásával kombinálták (Rahman és mtsai 1990b; Schmitt és Petersen 2002a). Munkánkban elsőként mindhárom féle módosítást együtt használtuk a *Forsythia* sejttenyészet lignán termelésének a fokozására. Ezeknek a módosításoknak az együttes alkalmazása (MSA SZ90 Á1/3) ugyanolyan mértékben fokozta a lignántermelést, mint az együttes hormon és

ásványi anyag tartalom változtatás, viszont a maximális produkció eléréséhez szükséges idő a felére csökkent. Így jelentősen gyorsítható a lignántermelés és csökkenthetőek az ehhez szükséges költségek.

VI.4.3. A fény hatása az *in vitro* kultúrák sejt differenciációjára és lignántartalmára

A fény intenzitása és a megvilágítási idő befolyásolja lignántermelést a növényi sejkultúrákban, illetve a megfelelő fény-sötét megvilágítási periódus ugyanolyan mértékben képes fokozni a sejtenyészetek hatóanyag-termelését, mint a folyamatos megvilágítás, emellett energiatakarékosabb és gazdaságosabb is (Fischer és Alfermann 1995). Ezért a sejtenyészetekben a fény hatását részletesebben vizsgáltuk többféle megvilágítási periódus alkalmazásával. A *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájával végzett kísérletek során tapasztaltuk, hogy a természetes fényen nevelt kultúra lignántartalma meghaladta a sötétben tartott kultúráét. Feltételeztük, hogy a fény hatására a fotoszintetikus apparátus differenciálódásával együtt olyan sejt differenciálódási folyamatok is elindulnak, amelyek a lignántermelést serkentik (Smollny és mtsai 1998).

A természetes fényen nevelt minták mindegyik fluoreszcencia emissziós spektrumában a 686 és 696 nm-en maximumot mutató sáv a PSII klorofill-protein komplexhez tartozott, emellett 735 nm-rel jelzett sáv a PSI komplexhez. A spektrumok megmutatták, hogy a PSI és PSII klorofill-protein komplexek milyen arányban voltak jelen a sejtenyészet sejtjeiben. A szuszpenziós kultúra összklorofill tartalmában megjelent különbségek jelentősek voltak szemben a fluoreszcencia emissziós spektrumok közötti eltérésekkel, emiatt a sávarányok közti különbségekből nem következtethettünk a fotoszintetikus apparátus állapotában levő eltérésekre.

A fénycsöves megvilágítás mellett történő nevelésnél az összklorofill tartalomban jelentős különbségek jelentek meg a természetes fényen tartott tenyészetekhez viszonyítva, az eltérő mértékű megvilágításnak köszönhetően. Az összklorofill tartalom nőtt a megvilágítási periódusidő hosszával. Egy adott mintavételi pontban vizsgált minták fotoszintetikus apparátusai között jelentek meg különbségek a megvilágítási idő következtében. Ezen felül a kísérlet időtartama során is változott ez az arány. A

legrövidebb, 4 órás fény periódus már képes volt kiépíteni egy működőképes fotoszintetikus apparátust, de ennek fejlettségi szintje még alacsony. Viszont a hosszabb, 8 illetve 12 órás fényperiódus már fejlettebb fotoszintetikus apparátust hozott létre a szuszpenziós kultúra sejtjeiben. A legfejlettebb struktúra a természetes megvilágítás következtében alakult ki.

Az összklorofill tartalom és a 77 K fluoreszcencia spektrumok alapján megállapítható, hogy az összes fényen nevelt szuszpenziós sejttenyészetben, bár alacsony szintű volt a klorofillt tartalom, a fotoszintetikus apparátus teljesen kiépült. Természetesen a differenciált szöveti (levél) struktúrában megjelenő fotoszintetikus aktivitást nem közelíti meg az alacsonyabb differenciáltsági szinten álló sejt kultúra.

Az ultrastrukturális vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a kloroplasztiszok fejlettsége a megvilágítási periódushosszal párhuzamosan nőtt. A sötétben fenntartott sejttenyészet sejtjeiben nem volt detektálható kloroplasztisz, amit az összklorofill tartalom mérés és a 77 K fluoreszcencia spektrumok is alátámasztottak. Ezzel szemben a megvilágítás mellett nevelt sejttenyészetek sejtjeiben megjelentek a különböző mértékben struktúrált kloroplasztiszok. A 8/16 illetve a 12/12 Fény/Sötét megvilágításnál a tenyészetek kloroplasztiszai már sztekkelt tilakoid membránokkal rendelkeztek, ellentétben a 4/20 órás Fény/Sötét megvilágításnál nevelt sejtek kloroplasztiszáival, amelyekben kevésbé struktúrált tilakoid membránok voltak megfigyelhetőek.

Az ultrastrukturális vizsgálatok a *Forsythia* fajok és fajták esetében megerősítették azt a megállapítást, miszerint a szuszpenziós kultúrák hatóanyag-termelésének a feltétele a magasabb szintű sejt differenciáció.

A *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrájában a lignántermeléshez nem volt elégséges az úgy nevezett hatóanyag termelő táptalaj alkalmazása, a fény jelenléte is szükséges volt. Ezt támasztotta alá, hogy a sötétben nevelt kultúrában nem volt detektálható mennyiségben lignántermelés, viszont a megvilágítás mellett mindegyik esetben mérhető volt a lignán produkció. Eredményeink egybeesnek Morimoto és munkatársai (2011) megállapításaival, akik *Forsythia koreana* transzgénikus sejttenyészetében vizsgálták a fény lignántermelésre gyakorolt hatását és megállapították, hogy a különböző hullámhosszú fények között a kék fény serkentette a legnagyobb mértékben a hatóanyag produkciót. A munkánkban alkalmazott fénycső által kibocsátott

fény döntő többsége ebbe a hullámhossz tartományba esett, így érthetünk el fokozott lignán bioszintézist a *Forsythia x intermedia* szuszpenziós kultúrában. A megvilágítás idejével és módjával gyenge összefüggést mutatott a lignántermelés. A maximális lignán mennyiségeket a negyedik héten mértük, emiatt ebben az időpontban vetettük össze az összlignán és az összklorofill tartalmat. A megvilágítási periódushosszal egy ideig nőtt a lignántartalom, majd csökkenni kezdett. A 8/16 Fény/Sötét megvilágításnál fenntartott tenyészetek lignántartalma volt a maximális, a 4/20 és a 12/12 Fény/Sötét megvilágításhoz viszonyítva is.

A megvilágítás lignántermelést fokozó hatásának a részletesebb elemzése során megállapítottuk, hogy a klorofill tartalom mennyisége és a kloroplasztizok fejlettségének mértéke jól jelzi a sejtdifferenciáció fokát, viszont nem mutat szoros összefüggést a lignántermeléssel. A lignán és lignin bioszintézis kezdeti szakaszában, a fenilalanin képzéséhez szükséges eritróz-4-P molekula nagyobb mennyiségben termelődik intenzívebb fotoszintézis esetén (Lewis és Sarkanen 1998). Így a megvilágítás a differenciáltabb fotoszintetikus apparátus segítségével tudta közvetve növelni a sejttenyészet lignántermelését. A megvilágítás hatása általánosan növelte meg a lignánok mennyiségét, specifikusan nem fokozta egyes lignánok termelését, mivel az a bioszintézis útvonal kezdeti lépéseinél fejt ki hatását.

VI.4.4. *Forsythia* fajok és fajták közti különbség az *in vitro* kultúrák lignántartalmában

A levelekben nemcsak a fajok, hanem a fajták között is jelentős eltérések mutatkoztak az összlignán tartalomban és összetételben is. Ezért az *in vitro* sejttenyészeteknél is megvizsgáltuk a lignántartalmat. A munka során 3 fajból és 6 fajtából sikerült szuszpenziót létrehozni, amelyek lignántartalma nem függött össze a levelek a hatóanyagtartalmával. Emiatt a sejttenyészetek esetén önállóan is szükséges a fajták vizsgálata.

Az irodalom Schmitt és Petersen (2002a és b) munkájától eltekintve nem határozták meg a fajon belüli fajtákat. Így a munkánk során először vizsgáltuk meg a fajták közötti az *in vitro* kultúrák lignán tartalmában megjelenő különbségeket. Mivel a fajták között közel akkora eltérést tapasztaltunk, mint amekkora mértékkel sikerült a

lignántermelést fokozni a táptalaj összetevők mennyiségének módosításával, fontos ezt a szempontot is figyelembe venni a hatóanyag-termelés optimalizálása során. A lignántermelés fokozásának egyik újabb fontos eszköze lehet a fajon belüli megfelelő fajta kiválasztása.

VII. Következtetések

A növényi másodlagos anyagcsere termékek között a lignánok gyógyászati szempontból igen jelentős csoport, viszont nagy hatékonyságú kinyerésük és előállításuk nem minden esetben megoldott. A magas lignántartalom és a kedvező összetétel elérése céljából a munkánkban ezért a lignántartalmat intakt növényi mintákban és *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészeiben vizsgáltuk.

1. A lignánok vizsgálatánál használt hatékony módszerek kidolgozása során a következőket állapítottuk meg:
 - a) az arktigenin és arktiin megfelelő extrakciójának kiválasztása során szükséges figyelembe venni a hatékonyság mellett a metodika többi paraméterét is. A kisebb mintaszám esetén az SFE készülékkel 60%-os metanollal végzett kivonás volt a megfelelő, nagy mintaszámnál a 100% metanolt alkalmazó refluxálás.
 - b) az időigényesebb kromatográfias módszerek használatát megelőző, mintaszám csökkentő szelekcióra alkalmas spektrofotometriás mérést kerestünk a *Forsythia* nemzetségen belüli magas lignántartalmú fajok és fajták kiválasztásának gyorsítása érdekében. A *Forsythia* fajok és fajták leveleinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a fenoloid tartalom (Folin Ciocaletu reagenst alkalmazó spektrofotometriás módszer) szoros korrelációt mutat a HPLC mérésekkel nyert összesített lignántartalommal, emiatt ez a reakció alkalmas az előszelekcióra. A *Forsythia* fajoknál és fajtáknál az antioxidáns kapacitás (FRAP módszer) meghatározása nem megfelelő módszer az előszelekcióra, az összesített lignántartalommal mért alacsony korreláció miatt.

- c) pontos analitikai módszerek esetén a butirolakton és furofurán típusú lignánok együtt mérhetőek GC-MS és HPLC-ESPI-MS készülékekkel *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Forsythia* fajokban. A HPLC-UV erre nem minden esetben alkalmas, mert az arktigenin és a filligenin megbízhatóan nem mindig választható el egymástól. A pontosság és a megbízhatóság növelése érdekében ajánlott az eltérő kromatográfiás metodikák együttes alkalmazása.
2. Elsőként állapítottuk meg, hogy a *Forsythia* nemzetségen belül a levelek lignántartalmát tekintve az összmenyiség és az összetétel szempontjából is jelentős különbség mutatkozik nemcsak a fajok, hanem a fajták között is. Ennek részletesebb elemzéséhez alkalmaztuk a biplot analízist, amely alkalmas statisztikai módszer volt a fajták lignán összetétel szerinti szelekciójához. Ezek alapján e nemzetség további felhasználása során szükséges a fajták elemzése is.
3. Munkánk alapján megállapítható, hogy a *Forsythia* nemzetségen belül mind a fajokból, mind a fajtákból létrehozhatóak *in vitro* kallusz, illetve szuszpenziós kultúrák, amely megerősíti és kibővíti a korábbi irodalmi adatokat. A levelekből létrehozott sejttenyészetek lignántartalma minőségileg és mennyiségileg is eltér a levelektől. A levelek hatóanyagtartalmából nem következtethetünk az azokból elindított sejttenyészetek pontos hatóanyagtartalmára, szükséges az utóbbiak önálló elemzése is. Annak ellenére, hogy az *in vitro* szövet- és sejt kultúrák lignántartalma csak töredéke az intakt levélmintákénak, a lignánok *in vitro* termelése előnyös módszer a hatóanyagok előállítására, a termelés fokozhatósága, egyes hatóanyagok célzott termeltetése és az *in vitro* kultúrák általános előnyei miatt. A sejtszintű és szöveti differenciáció befolyásolja a lignántermelést a levelekben és az *in vitro* tenyészetekben egyaránt.
- a) mivel az *in vitro* tenyészetek hatóanyag tartalma elmarad az intakt növényekétől, a nagyobb lignántermelés elérése érdekében szükséges a sejttenyésztés optimalizálása a tápközegek

módosításával. A tápközeg cukor, ásványi anyag illetve hormon összetételének változtatása jelentősen fokozza a szuszpenziós kultúrák lignántartalmát. E hatások együttes alkalmazása szinergista módon növeli a sejttenyészetek hatóanyag tartalmát és felgyorsítja a termelést.

b) Elsőként mutattuk ki, hogy a szuszpenziós tenyészetek lignántermelésében is jelentős az eltérés a fajták között. A lignántermelés fokozásának egyik újabb eszköze lehet a megfelelő fajták kiválasztása.

4. A fény indukálta sejtdifferenciáció és lignántartalom növekedés között összefüggés állapítható meg a *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetet vizsgálva. A megvilágítás lignántermelést fokozó hatásának a részletesebb elemzése során megállapítottuk, hogy a klorofilltartalom mennyisége és a kloroplasztiszok fejlettségének mértéke jól jelzi a sejtdifferenciáció fokát, viszont nem mutat szoros összefüggést a lignántermeléssel. A megvilágítás elősegítette a sejtdifferenciációt, ezáltal tudta közvetve növelni a sejttenyészet lignántermelését. A lignántermelés nagymértékben, de általánosan fokozható a megvilágítás alkalmazásával, tehát szelektíven egyes lignánok bioszintése így nem befolyásolható.

Az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és a *Forsythia* fajok és fajták alkalmasak lehetnek a vizsgált lignánok gyógyszeripari célú felhasználására. Az *Arctium lappa* termése az arktiin, a *Forsythia* levelek elsősorban az arktigenin, pinorezinol és filligenin kinyerésére, a *Centaurea scabiosa* termése és a *Forsythia in vitro* kultúrák főleg a matairezinozid előállítására a legmegfelelőbbek.

VIII. Összefoglalás

A növényi másodlagos anyagcseretermékek között az utóbbi időben a lignánok kerültek a kutatások előterébe igen változatos és jelentős gyógyászati tulajdonságaiknak köszönhetően.

Doktori munkámban a lignántartalom azonosítását és mennyiségi meghatározását vizsgáltuk magas lignántartalmú intakt növényi mintákban a hatékony lignán kinyerés és előállítás érdekében. Emellett tanulmányoztuk a lignántermelés fokozásának lehetőségeit *Forsythia* fajok és fajták *in vitro* sejttenyészetekben nagyléptékű fermentációs termelés előkészítése céljából. Munkánk során a hatóanyag-tartalmat spektrofotometriás és kromatográfiás módszerekkel vizsgáltuk, illetve a sejtek differenciálódását spektrofluorimetriás, fluoreszcencia- és elektronmikroszkópos módszerekkel követtük nyomon.

A lignánok vizsgálatához optimális kivonási eljárásokat, valamint előszelekczióra alkalmas spektrofotometriás módszert és többféle kromatográfiás módszer alkalmazhatóságát határoztunk meg.

Kvalitatív és kvantitatív különbségeket állapítottunk meg a lignántartalomban a *Forsythia* fajoknál és fajtáknál a levelek és a sejttenyészetek esetén egyaránt.

Forsythia kallusz- és szuszpenziós kultúrákat hoztunk létre illetve az optimalizációs kísérletek során fokoztuk a szuszpenziós kultúrák lignántartalmát a tápközeg cukor, ásványi anyag illetve hormon tartalmának változtatásával.

Megállapítottuk, hogy a fény indukálta sejtdifferenciáció és a lignántartalom növekedés között összefüggés van a *Forsythia* szuszpenziós sejttenyészetben. A megvilágítás alkalmazásával az összlignántermelés nagymértékben fokozható, viszont ez az eljárás specifikusan egyes lignánok mennyiségének növelésére nem alkalmas.

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa* és a *Forsythia* fajok és azok fajtái alkalmasak lehetnek a vizsgált lignánok gyógyszeripari célú felhasználására. Az *Arctium lappa* termése az arktiin, a *Forsythia* levelek elsősorban az arktigenin, pinorezinol és filligenin kinyerésére, a *Centaurea scabiosa* termése és a *Forsythia in vitro* kultúrák főleg a matairezinozid előállítására a legmegfelelőbbek.

IX. Summary

Among the plant secondary metabolites, the lignans have got special interest recently, due to their various and remarkable pharmaceutically and medicinally important properties.

In this thesis, lignan identification and quantification methods were examined in intact plant samples with high amounts of lignan content in order to produce and extract them efficiently. In addition, we studied the opportunities of stimulation of *in vitro* lignan production in cell cultures of *Forsythia* species and cultivars for scale-up production by fermentation technology. The secondary metabolite content was measured with spectrophotometric and chromatographic methods and the cell differentiation was observed with spectrofluorometer and fluorescence- and electron microscopy.

We worked out optimal extraction methods and studied spectrophotometric methods feasible for sample pre-selection and tested the suitability of several chromatographic methods for lignan analysis.

We evaluated qualitative and quantitative differences in lignan contents among *Forsythia* species and cultivars in leaf and *in vitro* cell culture samples.

Forsythia callus and suspension cultures were established. In optimization experiments, we stimulated the lignan production of suspension cultures via hormone, sugar, macro- and micro element contents modifications of culture media.

We found correlation between the light-induced cell differentiation and the increase of lignan contents in *Forsythia* cell cultures. The illumination enhanced the lignan production in general but it is not suitable for selective stimulation of the biosynthesis of selected lignans separately.

We have demonstrated that *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* and *Forsythia* species and cultivars are suitable for production of the studied lignans for the pharmaceutical industry. The fruit of *Arctium lappa* is a good source of arctiin while the leaf of *Forsythia* is suitable for arctigenin, pinoresinol and phylligenin extraction. The fruit of *Centaurea scabiosa* and *in vitro* cultures of *Forsythia* can be applied for matairesinoid production.

X. Irodalomjegyzék

Andersen AB., Lam J., Wrang P. (1977) Polyunsaturated compounds of *Centaurea scabiosa* Phytochemistry 16 (11): 1829-1831.

Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Özyurt D. (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 12(7): 1496-1547.

Arroo R.R.J., Alfermann A.W., Medarde M., Petersen M., Pras N, Woolley J.G. (2002). Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. Phytochemistry Reviews 1: 27-35

Awale S, Lu J, Kalauni SK, Kurashima Y, Tezuka Y, Kadota S, Esumi H. (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. Can. Res. 66: 1751-1757.

Ayres DC, Chater RB (1969) Lignans and related phenols. Classification of the principal groups of lignans by gas chromatography. Tetrahedron 25: 4093-8.

Ayres DC, Loike JD. (1990) Chemistry and Pharmacology of natural products: Lignans: Chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press

Bader, SM, Cachita-Cosma, D, Osvath T, Deliu C. (1982) Modification of some morphophysiological variables in the cauline callus of *Forsythia suspensa* grown in vitro in a varied hormonal balance medium. Revue roumaine de biologie. 27(1): 23-28.

Benzie IFF, Strain JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76.

Boldizsár I, Zs. Füzfai, F. Tóth, É. Sedlák, L. Borsodi, I. Molnár-Perl (2010) Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: Their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts J. Chrom. A 1217: 1674-1682.

Böszörményi A, Héthelyi E, Farkas A, Horváth G, Papp N, Lemberkovics E, Szoke E. (2009) Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.) J Agric Food Chem. 57(11): 4663-4667.

Burlat V, Kwon M, Davin LB, Lewis NG. (2001) Dirigent proteins sites in lignifying tissues. Phytochem. 57: 883-897.

Cabral MMO, Kelecom A, Garcia ES (1999) Effects of the lignan, pinoresinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* and of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* Fitoterapia 70: 561-567.

Cao G és PriorRL. (1998) Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clinical Chemistry 44(6): 1309-1315.

Chen CC, Chen HY, Shiao MS, Lin YL, Kuo YH, Ou JC. (1999) Inhibition of low density lipoprotein oxidation by tetrahydrofuran lignans from *Forsythia suspensa* and *Magnolia coco*. Planta Med. 65(8): 709-711.

Chen X, Zhang J, Xue C, Chen X, Hu Z (2004). Simultaneous determination of some active ingredients in anti-viral preparations of traditional Chinese medicine by micellar electrokinetic chromatography. Biomed Chromatogr. 18: 673-680.

Cho MK, Jang YP, Kim YC, Kim SG. (2004) Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition. Int. Immuno. Pharmacol. 4: 1419-1429.

Choi YH, Kim J, Jeon SH, Yoo KP, Lee HK. (1998). Optimum SFE condition for lignans of *Schisandra chinensis* fruits. Chromatog 48: 695-699.

Choi YH, Kim J, Yoo K. (2003) Lignans and flavonoids of *Forsythia koreana*. Chromatog. 57: 73-79.

Clavel T, Borrmann D, Braune A, Doré J, Blautt M. (2006) Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. Anaerobe 12: 140-147.

Cockayne TO. (1961) Leech book of Bald: Leechdom, Wortcunnings and Satrcraft of Early England, vol II. The Holland Press, London. 313.

Dános B. Farmakobotanika, A gyógynövénytan alapjai, Kemotaxonómia. Argumentum, Budapest, 1997. 287. és 316-320.

Davin LB, Bedgar DL, Katayama T, Lewis NG. (1992) On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochem* 31(11): 3869-3874.

Davin LB, Lewis NG. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* 123(2): 453-462.

Dewick PM (1994) *Biotechnology and Agriculture and Forestry Vol 28. Medicinal and Aromatic Plants VII* (ed. by Bajaj YPS)

Diaz AML, Abad MJM, Fernandez C, Recuerdo C, Villaescusa L, Silvan S Bermejo P. (2001). Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity. *Planta Med* 67: 219-223.

Dinelli G, Marotti I, Bosi S, Benedettelli S, Cortacero-Ramírez S, Carrasco-Pancorbo A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2007) Lignan profile in seeds of modern and old Italian soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars as revealed by CE-MS analyses. *Electrophor. Capillary electromigration methods in food and beverage analysis*. 28(22): 4212–4219.

Dinkova-Kostova AT, Gang DR, Davin LB, Bedgar DL, Chu A, Lewis NG. (1996) (+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reductase from *Forsythia intermedia*. *J. Biological Chemistry* 271: 29473-29482.

EMA/HMPC/246764/2009. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Arctium lappa* L., radix.

Ferguson CA, Nahar L, Finnie D, Kumarasamy Y, Reid R, Mir-Babayev NF, Sarker SD. (2003) *Centaurea scabiosa*: a source of dibenzylbutyrolactone lignans. *Biochem. System. and Ecol.* 31: 303–305.

Ferracane R., Graziani G., Gallo M., Fogliano V., ritieni a. (2010) Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *J. Pharm. biomed. anal* 51(2): 399.404.

Fini L, Hotchkiss E, Fogalio V, Grasiani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR, Ricciardiello L. (2008) Chemopreventive properties of pinoretinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogen.* 29(1): 139-46.

Fischer U, Alfermann A W (1995) Cultivation of photoautotrophic plant cell suspension in the bioreactor: influence of culture conditions. *J. of Biotechnology* 41: 19-28.

Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* (2011), doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008

Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, Li HB (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129 (29): 345-350.

Fuss E. (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochem Reviews* 2: 307-320.

Füzfai Zs, Molnár-Perl I (2007). Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *Chromatogr A* 1149: 88-101.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151.

Gang DR, Costa MA, Fujita M, Dinkova-Kostova AT, Wang H-B, Burlat V, Martin W, Sarkanen S, Davin LB, Lewis NG. (1999) Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem Biol* 6:143–151.

Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. (2010) Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids Content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale*). *Molecules* 15: 4324-4333.

Guo H, Liu AH, Li L, Guo DA. (2007) Simultaneous determination of 12 major constituents in *Forsythia suspensa* by high performance liquid chromatography--DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (3): 1000-1006.

Hansel R, Schulz H, Leuckert Ch. (1964) Das Lignan glykosid Arctiin als chemotaxonomisches Merkmal in der Familie der Compositae. *Z. Naturforsch.* 19b: 727-734.

Hausott B, Greger H, Marian B. (2003) Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129: 569-576.

Heinonen S, Nurmi T, Luikkonen K, Poutanen K, Wahala K, Deyama T, Nishibe S, Adlercreutz H (2001) In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3178-3186.

Hemalatha S. és Ghafoorunissa (2004) Lignans and tocopherols in Indian sesame cultivars. *J. Am. Oil Chemist' Soc.* 8(5): 467-470.

Hirano T, Gotoh M, Oka K. (1994) Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Science* 55(13): 1061-1069.

Hirobumi Yamamoto, Katsuhiko Yoshida, Yukie Kondo and Kenichiro Inoue (1998) Production of cornoside in *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures *Phytochemistry* 48 (2): 273-277.

Hoon HB., Hwa KY., Ok YH., Park MK. (1994) A butyrolactone lignan dimer from *Arctium lappa*. *Phytochemistry* 37(4): 1161-1163.

Howarth RD. (1936) Natural resins. Annual Report Progress Chemistry 33: 266-279.

Iizuka T, Sakai H, Moriyama H, Suto N, Nagai M, Bagchi D. (2009) Vasorelaxant effects of forsythide isolated from the leaves of *Forsythia viridissima* on NE induced aortal contraction. Phytomedicine 16(4): 386-390.

Imbert TF. (1998) Discovery of podophyllotoxins. Biochem. 80: 207-222.

Ishida J, Wang HK, Oyama M, Cosentino ML, Hu CQ, Lee KH. (2001) Anti-AIDS Agents. 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. J. Nat. Prod. 64: 958-960.

Jang YP, Kim SR, Choi YH, Kim J, Kim SG, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. (2002) Arctigenin protects cultured cortical neurons from glutamate-induced neurodegeneration by binding to kainate receptor. J. Neurosci. Res. 68(2): 233-240.

Jin SK, Zhao YF, Nakamura N, Akao T, Kakiuchi N, Hattori M. (2007) Isolation and characterization of a human intestinal bacterium, *Eubacterium* sp. ARC-2, capable of demethylating arctigenin, in the essential metabolic process to enterolactone. Biol. Pharm. Bull. 30(5): 904-911.

Jong TT, Chau SW. (1998) Antioxidative activities of constituents isolated from *Pandanus odoratissimus*. Phytochem. 49: 2145-2148.

Jung HW, Mahesh R, Lee JG, Lee SH, Kim YS, Park YK (2010) Pinoresinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia Neuroscience Letters 480: 215–220.

Kang HS, Lee JY, Kim CJ. (2008) Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae fructus*. J. Ethnopharmacol. 116: 305-312.

Kang K, Lee HJ, Kim CY, Lee SB, Tunsag J, Batsuren D, Nho CW. (2007) The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. Biol. Pharm. Bull. 30: 2352-2359.

- Katayama T, Davin LB, Lewis NG. (1992) An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochem* 31(11): 3875-3881.
- Kelly MG, Hartwell JL. (1954) *Podophyllum pelatum*. *J. Nat. Canc. Inst.* 14: 967-1010.
- Kim HJ, Ono E, Morimoto K, Yamagaki T, Okazawa A. (2009) Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture. *Plant Cell Physiol.* 50(12): 2200-2209.
- Kim KJ. (1999) Molecular phylogeny of *Forsythia* (Oleaceae) based on chloroplast DNA variation. *Plant Syst. Evol.* 218: 113-123.
- Kim SH, Jang YP, Shung SH, Kim CJ, Kim JW, Kim YC. (2003) Hepatoprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera* against CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 26(8): 1202-1205.
- Kitagawa S, Hisada S, Nishibe S. (1984) Phenolic compounds from *Forsythia* leaves I. *Phytochem.* 23: 1635-1636.
- Kitagawa S, Nishibe S, Benecke R, Thieme H. (1988) Phenolic compound from *Forsythia* leaves II. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 3667-3670.
- Kitarou O, Sachiko H, Toshihiko H, Takashi N, Kunio H. (1989c) New lignan and immunosuppressive agent containing the same lignan as active ingredient. Patent abstracts of Japan. 05032580 A.
- Kitarou O, Toshihiko H, Masayuki K, Kunio H. (1989a) Antitumor agent. Patent abstracts of Japan. 01031717 A.
- Kitarou O, Toshihiko H, Masayuki K, Kunio H. (1989b) Cardiotonic agent. Patent abstracts of Japan. 01031716 A.
- Koubaa I, Damak M, McKillop A, Simmonds M. (1999) Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia* 70: 212-213.

Koulman A, Kubbinga ME, Batterman S, Woerdenbag HJ, Pras N, Woolley JG, Quax WJ (2003) A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of *Anthriscus*. *Planta Med* 69(8): 733-738.

Kuang, H.X.; Xia, Y.G.; Yang, B.Y.; Liang, J.; Zhang, Q.B.; Li, G.Y. (2009) A new caffeyol phenylethanoid glycoside from the unripe fruits of *Forsythia suspensa*. *Chin. J. Nat. Med.* 7: 278–282.

Kwon M, Davin LB, Lewis NG. (2001) In situ hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: implications for heartwood formation and other forms of vascular tissue preservation. *Phytochem.* 57(6): 899-914.

Lampe JW, Atkinson C, Hullar MA. (2006) Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans. *J. AOAC Int.* 89: 1174-1181.

Lavie D, Levy EC, Cohen A, Ebenari M, Gutterman Y. (1974) New germination inhibitor from *Aegilops ovata*. *Nature* 249: 388.

Lewis NG és Sarkanen S (1998). Lignin and lignan biosynthesis. American Chemical Society. Vol. 697.

Li W, Gao Y, Zhao J, Wang Q. (2007) Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. *J Agric Food Chem.* 55 (21): 8478–8484.

Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses *Food Research International* 41(4): 363-370.

Liu H., Zhang Y, Sun Y., Wang X., Zhai y., Sun Y., Sun S., Yu A., Zhang h., Wang Y. (2010) Determination of the major constituents in fruit of *Arctium lappa* L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection. *J Chromatogr. B.* 878(28): 2707-11.

- Liu YQ, Tang XC, Cai DT. (2003) Studies on callus growth and phillyrin accumulation of *Forsythia suspensa* Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 28(4):321-3.
- Lojková L, Slanina J, Mikesová M, Táborská E, Vejrosta J (1997) Supercritical fluid extraction of lignans from seeds and leaves of *Schizandra chinensis*. Phytochem Anal. 8: 261-268.
- Miyazawa M, Kasahara H, Kameoka H (1992) Phenolic lignans from flower buds of *Magnolia fargesii*. Phytochemistry 31(10): 3666-3668.
- Morimoto K, Kim HJ, Ono E, Kobayashi A, Okazawa A, Satake H. (2011) Effects of light on production of endogenous and exogenous lignans by *Forsythia koreana* wildtype and transgenic cells. Plant Biotech. 28: 331-337.
- Moss GP. (2000) Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendation 2000) Pure Appl. Chem. 72: 1493-1523.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Nan-Jun S, Ching-Jer C, Cassady JM. (1987) A cytotoxic tetralone derivative from *Pararistolochia flos-avis* Phytochemistry 26 (11): 3051-3053
- Nishibe S, Fujimoto T, Nose M, Takeda T, Ogihara Y, Xu G. (1993) Lignans from *Trachelospermum axillare*. Phytochemistry 32 (6): 1579-1581.
- Nishibe S. (1994) Bioactive phenolic compounds in traditional medicines. Pure & Appl. Chem. 66: 2263-2266.
- Nose M, Fujimoto T, Nishibe S, Ogihara Y. (1993) Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract; II. Serum concentration of lignans and their metabolites. Planta Med. 59 (2): 131-134.
- Nose M, Fujimoto T, Takeda T, Nishibe S, Ogihara Y. (1992) Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract. Planta Med. 58: 520-523.

Okunishi T, Sakakibara N, Suzuki S, Umezawa T, Shimada M (2004) Stereochemistry of matairesinol formation by *Daphne* secoisolariciresinol dehydrogenase. *Journal of Wood science* 55 (1): 77-81.

Orbán N, Boldizsár I, Szőcs Z, Dános B. (2008) Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. *Dyes and Pigments*, 77 (1): 249-257.

Orlikowski LB, Ptaszek M. (2008) Phytophthora cryptogea and P. citrophthora; New pathogens of *Forsythia x intermedia* in polish ornamental hardy nursery stocks. *J Plant Protect. Res.* 48(4): 495-501.

Ozawa S, Davin LB, Lewis NG. (1993) Formation of (-)-arctigenin in *Forsythia intermedia*. *Phytochem.* 32(3): 643-652.

Pan L, Sinden M R, Kennedy A H, Chai H, Watson L E, Graham T L, Kinghom A D. (2009) Bioactive constituents of *Helianthus tuberosum* (Jerusalem artichoke). *Phytochem Letters* 2: 15-18.

Páska Cs, Innocenti G, Kuvári M, László M, Szilágyi L. (1999) Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochem.* 52: 879-883.

Payne GF, Shuler ML, Brodelius p (1987) Large scale plant cell culture in Large scale cell culture technology Ed.: Lydersen BK; Hanser Publishers

Pellegrini N, Valtuena S, Ardigo D, Brighenti F, Franzini L, Del Rio D, Scazzia F, Piatti PM, Zavaroni I (2010) Intake of the plant lignans matairesinol, secoisolariciresinol, pinoresinol, and lariciresinol in relation to vascular inflammation and endothelial dysfunction in middle age-elderly men and post-menopausal women living in Northern Italy. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 20: 64-71.

Petersen M és Alfermann AW (1988). Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 43: 501–504.

Petersen, A.W. Alfermann (2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 135-142

Piao XL, Jang MH, Cui J, Piao X. (2008) Lignans from the fruits of *Forsythia suspensa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18(6): 1980-1984.

Podani, J. (1997). SYN-TAX 5.1: A new version for PC and Macintosh computers. *Coenoses* 12: 149-152.

Porra RJ, Thompson WA and Kriedmann PA (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384–394.

Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb J, Farmer PJ, Stanley LA & Burke MD (2002) A cancer preventive agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br. J. Canc.* 86: 774–778.

Raffaelli B, Hoikkala A, Leppala E, Wahala K. (2002) Enterolignans. *J. Chrom. B* 777: 29-43.

Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. (1990a) Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. *Phytochem.* 29(6): 1841-1846.

Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. (1990b) Production of lignans in *Forsythia intermedia* cell cultures. *Phytochem.* 29(6): 1861-1866.

Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, Lucas JA. (1990c) Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochem.* 29(6): 1971-1980.

Rouf ASS, Ozaki Y, Rashid MA, Rui J. (2001) Dammarane derivatives from the dried fruits of *Forsythia suspensa*. *Phytochem.* 56: 815-818.

Saarinen NM, Penttinen PE, Smeds AI, Humerinta TT, Makela SI. (2005) Structural determination of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses *in vivo*. J. Steroid Biochem. and Molec. Biol. 93: 209-219.

Schmitt J, Petersen M (2002a) Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* cell suspension culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68: 91–98.

Schmitt J, Petersen M (2002b) Influence of methyl jasmonate and coniferyl alcohol on pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* suspension culture. Plant Cell Rep. 20: 885–889.

Schroeder FC, del Campo ML, Grant JB, Weibel DB, Smedley SR, Bolton KL, Meinwald J, Eisner T (2006) Pinoresinol: A lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. PNAS 103: (42) 15947- 15501

Schröder HC, Merz H, Steffen R, Müller WEG, Sarin PS, Trumm S. (1990) Differential *in vitro* anti-HIV activity of natural lignans. Z. Naturforsch. 45c: 1215-1221.

Sedlák É (2006) *Forsythia x intermedia* sejt- és szövettanyúesztése, fenoloid tartalom vizsgálata (Szakdolgozat, ELTE)

Sedlák É, Boldizsár I, Borsodi L, Füzfai Zs, Molnár-Perl I, Preininger É, Gyurján I. (2008a) Identification and quantification of lignans, carboxylic acids and sugars in the leaves of *Forsythia* species and cultivars. Chromatographia 68 (S1): 35-41.

Sedlák É, Borsodi L, Boldizsár I, Preininger É, László M, Szőke É, Gyurján I. (2008b) Biologically active phenols in leaves of *Forsythia* species. Int. J. of Horticult. Sci. 14 (3): 57-9.

Seigler DS. (1998) Phenylpropanoids In: Plant secondary metabolism 117-120. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA

Shain L, Hillis WE. (1971) Formation of Oleoresin and lignans in *S. ipwood* of *White Spruce* in response to wounding. Phytopathol. 61: 841-845.

Shoeb M, MacManus SM, Jaspars M, Kong-Tho-Lin P, Nahar L, Celik S, Darker SD. (2007) Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17: 155-159.

Simon T. A magyarországi edényes flóra határozója, Harasztok – Virágos nyövények. Tankönyvkiadó, Budapest, 1992. 320, 518. és 524-530.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuella-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzimology* 299: 152-178.

Slanina J és Glatz Z. (2004) Separation procedures applicable to lignan analysis. *J Chromatogr. B* 812: 215-229.

Smollny T, Wichers H, Kalenberg S, Shamsavari A, Petersen M, Alfermann AW (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album* *Phytochemistry* 48 (6): 975-979

Suzuki S, Umezawa T, Shimada M. (2002) Stereochemical diversity in lignan biosynthesis of *Arctium lappa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(6): 1262-1269.

Suzuki S. és Umezawa T. (2007) Biosynthesis of lignans and norlignans. *J Wood Sci* 53: 273-284.

Tadhani 2007

Takasaki M, Konoshima T, Komatsu K, Tokuda H, Nishino H. (2000) Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. *Cancer Lett.* 158: 53-59.

Tanaka K, Kim TJ, Yamamoto H. (2008) Analysis of the seiridium canker infected *Cupressocyparis leylandii* by tree compounds. *Bull. Col. Edu. Ibaraki Univ. (Nat. Sci.)* 57: 85-96.

Tokar M, Klimek B (2004) Isolation and identification of biologically active compounds from *Forsythia viridissima* flowers. Acta Pol Pharm 61(3):191-197.

Tokar M. és Klimek B. (1998) Biologically active compounds from the flowers of *Forsythia suspensa* Vahl. Acta Pol. Pharm. 55(6): 499-504.

Turkmen N, Sari F, Velioglu Y S (2006) Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry 99: 835-841.

Umezawa T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. Phytochemistry Reviews 2: 371-390.

van der Schouw YT, de Kleijn MJJ, Peeters PHM & Grobbee DE. (2000) Phytoestrogens and cardiovascular disease risk. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 10: 154–167.

Vidigal MCS, Cavalheiro AJ, Kato MJ, Yoshida M. (1995) Lignans from kenels of *Virola michelii* Heckel Phytochemistry 40 (4):1259-1261

Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. (1998) Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Planta Med. 64(2): 97-109.

Wang FN., Ma ZQ., Liu Y., Guo YZ., Gu ZW. (2009) New phenylethanoid glycosides from the fruits of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. Molecules 14: 1324-1331.

Wang J, Zhao S, Tang Cl, Zuo Lj, Chen Lf (2010) Industrialized seedling technique of tissue culture of *Forsythia suspensa* Jinbia Hebei Journal of Forestry and Orchard Research DOI CNKI:SUN:HBL Y.0.2010-03-019

Wang LQ. (2002) Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. J. Chrom. B 777: 289-309.

Willför SM, Smeds AI, Holmbom BR. (2006) Chromatographic analysis of lignans. J. of Chromatogr. A 1112: 64-77.

Xia ZQ, Costa MA, Pélisser HC, Davin LB, Lewis NG. (2001) Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning and functional expression. *J Biological Chemistry* 276(16): 12614-12623.

Xia ZQ, Costa MA, Proctor J, Davin LB, Lewis NG (2000) Dirigent mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry*, 55 (6): 537-549.

Yamamoto H, Yoshida K, Kondo Y, Inoue K. (1998) Production of cornoside in *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures. *Phytochem.* 48: 273-277.

Yamauchi S, Sugahara T, Nakashima Y, Okada A, Akiyama K, Kishida t, Maruyama m, Masuda T. (2006) Radical and superoxide scavenging activities of matairesinol and oxidized matairesinol. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 70(8): 1934-1940.

Yang CS, Landau JM, Huang MT & Newmark HL. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann. Rev. Nutr.* 21: 381–406.

Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, Tunsag J, Nho CW. (2010) Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/B-catecin signaling. *Food and Chem. Tox.* 48: 2247-2252.

Zhao YM, Li FR, Yang JX, Liang J, Zhang LS. (2005) Study on the reducing blood lipid and anti- oxidation effects of phillyrin. *Nat Prod Res Dev* 17:157–159.

Saját publikációk jegyzéke

Sedlák É, Boldizsár I, Borsodi L, Füzfai Zs, Molnár-Perl I, Preininger É, Gyurján I. (2008) Identification and quantification of lignans, carboxylic acids and sugars in the leaves of *Forsythia* species and cultivars. *Chromatographia* 68 (S1): 35-41.

Sedlák É, Borsodi L, Boldizsár I, Preininger É, László M, Szőke É, Gyurján I. (2008) Biologically active phenols in leaves of *Forsythia* species. *Int. J. Horticult. Sci.* 14 (3): 57-9.

Boldizsár I, Zs. Füzfai, F. Tóth, É. Sedlák, L. Borsodi, I. Molnár-Perl (2010) Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: Their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts *J. Chrom. A* 1217: 1674-1682.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Böddi Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette doktori munkám elvégzését a Növény szerkezettani Tanszéken. Emellett témavezetőként fáradságot nem kímélve segítette a munkámat: segítséget adott a kísérleti eredmények összerendezésében, megvitatásában és a disszertáció megírásában.

Hálásan köszönöm Dr. Gyurján István egyetemi tanárnak, hogy témavezetőként kiemelt figyelemmel irányította munkámat, ellátott ötletekkel, és a kísérletek során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában mindig készséggel segítségemre volt.

Köszönöm dr. Preininger Éva egyetemi adjunktusnak a laboratóriumi munkában és a mikroszkópiában nyújtott segítségét.

Köszönöm Borsodi-Szokol Lillának PhD hallgatónak támogató bátorítását és hogy a segítségemre volt a laboratóriumi munkában és társzerzőként részt vett a disszertációban bemutatott munkákból írt publikációkban.

Köszönöm dr. Boldizsár Imre tanársegédnek, hogy megtanított a HPLC berendezés használatára, és az eredmények kiértékelésére.

Köszönet illeti Dr. Perlné Molnár Ibolya professzor asszonyt és dr. Fűzfai Zsófia tanársegédet (ELTE Analitikai Kémia Tanszék) a kromatográfiás mérésekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm dr. László Miklós tudományos főmunkatársnak a fermentációs technológia megismertetését.

Köszönöm a Növényrendszertani és Ökológiai Tanszéken Mészáros Szófiának a SYN-TAX program használatában nyújtott segítségét.

Köszönöm Kálmán Ágnes, Seres Adrienne és Jónás Csilla asszisztenseknek, hogy az elmúlt évek során a laborban mindig mindenben segítségemre voltak, precíz és lelkiismeretes munkájukkal jelentős mértékben hozzájárultak a kísérletek eredményességéhez.

Köszönöm a Növény szerkezettani Tanszék minden munkatársának, hogy szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Köszönetet mondok családomnak és barátaimnak a kitartó és folyamatos támogatásért.

Függelék

1. táblázat Gamborg B5 és MS (Murashige Skoog) táptalaj összetevők

Táptalaj összetevők		B5 (mg l⁻¹)	MS (mg l⁻¹)
<u>Makroelemek</u>	NH ₄ NO ₃	-	1650
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-
	KNO ₃	2500	190
	CaCl ₂ x2H ₂ O	150	440
	MgSO ₄ x7H ₂ O	250	1370
	KH ₂ PO ₄	-	170
	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	150	-
	Fe-EDTA	40	40
<u>Mikroelemek</u>	H ₃ BO ₃	3	6,2
	MnSO ₄ x4H ₂ O	-	22,3
	MnSO ₄ xH ₂ O	10	-
	ZnSO ₄ x4H ₂ O	-	8,6
	ZnSO ₄ x7H ₂ O	2	-
	KI	0,75	0,83
	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25
	CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,025
<u>Vitaminok</u>	Mio-inozit	100	100
	Tiamin	10	0,1
	Nikotinsav	1	0,5
	Piridoxin	1	0,5
<u>Aminosav</u>	Glicin	-	2
<u>Cukor</u>	Szaharóz	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹
<u>*Agar</u>		8 g l ⁻¹	8 g l ⁻¹

*Megjegyzés: * -gal jelölt táptalaj összetevő csak a kalluszok fenntartásánál alkalmazott szilárd táptalajban található meg.*