



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2017, 7, 60-67
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

EKSTRAKCJA *IN SITU* ROŚLINNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH

Mateusz Kawka^{1,2}, Maciej Pilarek¹, Katarzyna Sykłowska-Baranek^{2,*}, Agnieszka Pietrosiuk²

¹Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Politechnika Warszawska, ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa

²Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autorka korespondująca, tel: +48 22 572 0982, e-mail: katarzyna.syklowska-baranek@wum.edu.pl

Otrzymano 2.08.2017, zaakceptowany 25.09.2017, zamieszczony 25.11.2017

STRESZCZENIE

Ekstrakcja *in situ*, poza izolacją metabolitów roślinnych z układu hodowlanego *in vitro*, pozwala na intensyfikację ich biosyntezy w hodowanej biomase roślinnej. Zgodnie z definicją, proces ten polega na ekstrakcji produkowanych metabolitów wtórnych w czasie trwania hodowli przez ich akumulację w dodatkowej fazie układu hodowlanego. Motywowane potencjalnymi korzyściami takiego rozwiązania poszukiwania ekstrahentów oraz adsorbentów *in situ*, nietoksycznych dla biomasy oraz selektywnych względem metabolitów wtórnych, zaowocowały licznymi opisanymi w literaturze naukowej eksperymentami. Stosunkowo nowym podejściem jest zastosowanie w roli dodatkowej fazy ekstrakcyjnej *in situ* ciekłych perfluorow związków. Znane dotychczas jako efektywne nośniki gazów, charakteryzują się one brakiem istotnych oddziaływań względem rozpuszczonych w nich cząsteczek. Skutkuje to łatwością w uwalnianiu gazów przez granicę faz ciecz-ciecz układu hodowlanego. Ponadto, perfluorowzwiązki są nierozpuszczalne w wodzie, tworząc względem wodnego medium hodowlanego oddzielną, dolną fazę w układzie. Cechy te, w połączeniu z brakiem toksycznego wpływu na żywe komórki oraz selektywnością względem metabolitów roślinnych, uzasadniają rosnące zainteresowanie aplikacją ciekłych perfluorow związków w roli ekstrahenta *in situ*.

SŁOWA KLUCZOWE: ekstrakcja *in situ*, hodowle dwufazowe, ciekłe perfluorowzwiązki.

ABSTRACT

IN SITU EXTRACTION OF PLANT SECONDARY METABOLITES

Besides being a method to isolate plant metabolites from an *in vitro* culture, *in situ* extraction may enhance the biosynthesis of such metabolites in cultured plant biomass. In keeping with its definition, the process is based on the extraction of secondary metabolites, as they are being formed, via their accumulation in an additional phase of the culture system. Driven by the potential benefits attributable to this process, the search for *in situ* extractants and adsorbents that are non-toxic to the biomass and selective for the secondary metabolites yielded numerous candidate materials described in the scientific literature. A relatively new approach is the use of liquid perfluorochemicals (PFC) as the additional *in situ* extraction phase. Previously known as efficient carriers of gases, PFCs do not interact in any significant way with molecules dissolved in them. This results in a facile release of gases across the liquid-liquid interface of the culture system. Moreover, being immiscible with water, PFCs form in the presence of an aqueous culture medium a separate, lower phase. These properties of PFCs, in combination with a lack of toxicity toward living cells and a selectivity for plant metabolites, explain the mounting interest in the application of liquid perfluorochemicals as *in situ* extractants.

KEYWORDS: *in situ* extraction, two-phase cultures, liquid perfluorochemicals.

1. Wstęp

Wytwarzanie roślinnych metabolitów wtórnych z wykorzystaniem metod hodowli *in vitro* biomasy roślinnej, jak pokazują komercyjne sukcesy, może stanowić opłacalną alternatywę dla metod konwencjonalnych. Z punktu widzenia produktywności procesu, kwestią równie ważną co intensyfikacja biosyntezy metabolitów w biomase oraz zwiększenie wydajności przyrostu biomasy, jest dobór właściwej techniki izolacji metabolitów z fazy medium hodowlanego jak i z hodowanych w nim komórek, tkanek czy organów [1]. We wszystkich technikach separacji roślinnych metabolitów wtórnych konieczne jest uwzględnienie właściwości fizykochemicznych izolowanego metabolitu. Roz-

żyć należy także dobór właściwej metodyki zapewniającej zachowanie aktywności biologicznej bioproduktu. Postęp w dziedzinie metod separacji zaowocował opracowaniem szeregu niekonwencjonalnych metod, cechujących się większą wydajnością otrzymanych bioproduktów, możliwą do osiągnięcia w krótszym czasie przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej selektywności metody. Jednym z przykładów takiej techniki jest ekstrakcja *in situ* polegająca na akumulacji metabolitów roślinnych w dodatkowej fazie, ciekłej lub stałej, bezpośrednio w układzie hodowlanym czyli *in situ* [2]. Wspomniane rozwiązanie procesowe, pomimo szeregu zalet, ma także kilka ograniczeń. Najpoważniejszym z nich jest wykazana eksperymentalnie toksycz-

ność stosowanych specyficznych rozpuszczalników organicznych względem hodowanej biomasy roślinnej [3]. Fakt ten skłania badaczy do poszukiwania innowacyjnych faz ciekłych spełniających kryteria wydajnych ekstrahentów metabolitów wtórnych, przy jednoczesnym ograniczeniu negatywnego wpływu względem hodowanej w układzie biomasy roślinnej.

Obiecującym kierunkiem badań z zakresu funkcjonalności układów ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych okazało się wykorzystanie w tym celu ciekłych perfluorowanych pochodnych węglowodorów. Potencjał ciekłych perfluoropochodnych, jako odpowiedniego medium do ekstrakcji bioproduktów pochodzenia roślinnego, wynika z szeregu unikalnych właściwości fizykochemicznych tej grupy związków organicznych [4]. Ponadto udowodnione eksperymentalnie zostało powinowactwo perfluorowanych rozpuszczalników względem kilku farmaceutycznie istotnych roślinnych metabolitów wtórnych [1,5].

2. Techniki izolacji metabolitów z biomasy roślin

Otrzymanie oczyszczonego bioproduktu pochodzenia roślinnego jest procesem wieloetapowym. W przypadku produkcji roślinnych metabolitów wtórnych na drodze hodowli *in vitro* biomasy roślinnej konieczna jest izolacja tych związków z komórek i tkanek roślinnych. Etap ten może mieć zasadniczy wpływ na wydajność całego procesu oczyszczania. Dwa główne czynniki uwzględniane przy wyborze metody separacji metabolitów z biomasy to uzyskiwana wydajność i selektywność metody. Poza nimi istotny jest także rodzaj i właściwości użytego rozpuszczalnika lub adsorbenta oraz trudności procesowe [6].

Jedną z konwencjonalnych metod izolacji metabolitów jest ługowanie, będące rodzajem ekstrakcji w układzie ciało stałe - ciecz. W technice tej składniki biomasy roślinnej, pełniące funkcję nośnika, z fazy stałej przechodzą do fazy ciekłej rozpuszczalnika [7]. Zjawisko to wykorzystywane jest też w aparacie Soxhleta. Innymi rodzajami ekstrakcji są destylacja wodna oraz destylacja z parą wodną. Ich zaletą jest brak wykorzystywania organicznych rozpuszczalników, jednak wysokie temperatury mogą skutkować nieodwracalną utratą lotnych albo termicznie wrażliwych składników bądź termiczną dezaktywacją bioproduktu.

Dla efektywności konwencjonalnych metod ekstrakcyjnych kluczowy staje się dobór ekstrahenta, uwzględniający budowę chemiczną i właściwości fizykochemiczne związku, który ma być izolowany, czyli ich powinowactwo względem siebie. Należy także wziąć pod uwagę możliwość zastosowania mieszaniny rozpuszczalników oraz względy bezpieczeństwa [6].

Głównymi ograniczeniami wyżej omówionych metod ekstrakcji są: stosunkowo długi czas trwania procesu, potrzeba zastosowania drogiego ekstrahenta o wysokiej czystości, niska selektywność i ryzyko degradacji związków wrażliwych pod wpływem rozpuszczalników organicznych lub wysokiej temperatury. Potrzeba przewyższenia tych ograniczeń zaowocowała opracowaniem alternatywnych, niekonwencjonalnych technik separacji. Cechują się one większą wydajnością w krótszym czasie przy zredukowanym zużyciu rozpuszczalnika [8].

Wśród tych technik należy wymienić: (i) ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym; (ii) ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami, wykorzystującą zjawisko kawitacji; (iii) ekstrakcję z wykorzystaniem płynów w sta-

nie nadkrytycznym; (iv) przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem.

Ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym polega na działaniu na biomase mikrofalami w zakresie częstości od 0,3 do 300 GHz. W tym procesie następuje konwersja energii elektromagnetycznej w ciepło, czego efektem jest równomierne ogrzanie próbki [6]. Na skutek stymulowanego przez mikrofałe pęknięcia ścian komórkowych dochodzi do intensyfikacji ekstrakcji i uwolnienia zwiększonej ilości metabolitu. W przypadku związków wrażliwych na wysoką temperaturę możliwe jest zastosowanie rozpuszczalnika o niskiej stałej dielektrycznej, który nie nagrzewa się pod wpływem promieniowania mikrofalowego, co zapewnia ochronę metabolitów przed degradacją. Metoda ta nie jest jednak odpowiednia dla całkowicie wysuszonych próbek biomasy [8]. W przypadku zastosowania tej techniki w izolacji taksanów z biomasy gatunków *Taxus cuspidata* (pol. cis japoński) i *Taxus x media* var. *Hicksii* (pol. cis pośredni odmiana Hicksii) udało się obniżyć zużycie rozpuszczalnika, czas ekstrakcji i koszty procesu przy zachowaniu wydajności izolowanych metabolitów [9].

Przykładem innej techniki jest ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami, wykorzystująca zjawisko kawitacji. Metoda charakteryzuje się powstawaniem pęcherzyków w objętości rozpuszczalnika i ich następczemu zapadaniu się, co generuje energię oraz intensyfikuje proces ługowania. Intensyfikacja wydajności wynika ze zwiększonego transportu masy i dostępu rozpuszczalnika do elementów biomasy roślinnej [6].

Ekstrakcja z wykorzystaniem płynów w stanie nadkrytycznym polega na zastosowaniu w roli rozpuszczalnika płynu w stanie nadkrytycznym, najczęściej nadkrytycznego CO₂. Technika ta uważana jest za nietoksyczny, szybki i selektywny sposób izolacji, co jest powodem jej licznych zastosowań przemysłowych [8]. Cechami płynu w stanie nadkrytycznym są wysoki współczynnik dyfuzyjności i niskie napięcie powierzchniowe oraz lepkość. Zapewnia to lepszą penetrację tkanek roślinnych przez płyny nadkrytyczne oraz dobrą rozpuszczalność metabolitów. Ekstrakcja płynami w stanie nadkrytycznym pozwala na selektywną ekstrakcję niepolarnych związków. Po zastosowaniu dodatkowego rozpuszczalnika o wysokiej stałej dielektrycznej możliwa jest także izolacja substancji polarnych [6]. W przypadku użycia nadkrytycznego ditlenku węgla temperatura w czasie ekstrakcji jest bezpieczna dla wrażliwych termicznie substancji. Przykładem zastosowania tej metody może być izolacja alkaloidów indolowych z liści *Catharanthus roseus* (pol. barwinek różowy) [10]. Największą wadą ekstrakcji nadkrytycznej jest konieczność stosowania stosunkowo drogiej aparatury ciśnieniowej.

Uznawaną za jedną z niekonwencjonalnych technik izolacji bioproduktów jest przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem. Polega ona na zapewnieniu wysokiego ciśnienia oraz wysokiej temperatury procesowi ekstrakcji. Ma to na celu utrzymanie rozpuszczalnika poniżej punktu wrzenia wraz z intensyfikacją transportu masy. W opisanych warunkach dochodzi do obniżenia lepkości ekstrahenta oraz wzrostu jego współczynnika dyfuzji [8]. Ze względu na niekiedy drastyczne warunki ekstrakcji należy wziąć pod uwagę wrażliwość oczyszczanych metabolitów na wysokie temperatury [11]. W porównaniu do metod konwencjonalnych obserwowane jest znaczne obniżenie czasu ekstrakcji oraz zużycia rozpuszczalnika. Przykładem zastosowania przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem może być izolacja

metabolitów wtórnych (hiperycyna, pochodne kwercetyny) z biomasy pochodzącej z hodowli korzeni *Hypericum perforatum* (pol. dziurawiec zwyczajny) [12].

Opisane wyżej metody pozwalają na izolację wewnątrzkomórkowych metabolitów wtórnych z biomasy roślinnej po zakończeniu hodowli, bez wykazywania jednoczesnego wpływu na wydajność biosyntezy tych związków w hodowli *in vitro*. Techniki pozwalające na separację związków naturalnych z kultur *in vitro* w czasie trwania hodowli określa się mianem metod ekstrakcji *in situ*. Doświadczalnie stwierdzono, iż przez wprowadzenie do układu hodowlanego dodatkowej, biozgodnej z hodowanymi komórkami fazy ciekłej lub stałej wykazującej powinowactwo do izolowanych roślinnych metabolitów wtórnych, możliwe jest uzyskanie zwiększonej produktywności danego metabolitu w hodowlach *in vitro* komórek, tkanek i zintegrowanych organów roślinnych [13]. W wyniku ekstrakcji i przejścia metabolitów do fazy rozpuszczalnika następuje obniżenie ich stężenia w pożywce, co może prowadzić do zwiększonego wydzielania związków naturalnych z komórek roślinnych. Przez takie działanie możliwe staje się uniknięcie zjawisk obniżających wydajność akumulacji roślinnych metabolitów wtórnych, np. ich toksyczności, inhibicji produktem, degradacji związków naturalnych czy też lotności [14]. Ekstrakcję *in situ* można więc uznać za metodę efektywnej izolacji oraz jednocześnie za właściwą metodę zwiększania wydajności biosyntezy otrzymywanych bioproduktów.

3. Funkcjonalność układów ekstrakcyjnych stosowanych w biotechnologii roślin

Istotą ekstrakcji *in situ* jest suplementacja układu hodowlanego dodatkową fazą, której funkcją jest akumulacja wydzielanych przez komórki roślinne metabolitów wtórnych.

Jedną z technik oczyszczania *in situ* metabolitów jest zachodząca w układzie hodowlanym adsorpcja cząsteczek metabolitu do ziaren fazy stałej po dodaniu stałego sorbenta do układu hodowlanego. Przykładem jest zastosowanie żywicy Amberlite® XAD-7 do izolacji antrachinonów w hodowli zawiesiny komórek *Cinchona ledgeriana* (pol. chinowiec ledgeriana), dające piętnastokrotny wzrost wydajności produkcji tych związków [15]. Innym zastosowaniem wymienionego sorbenta są badania z udziałem korzeni włóśnikowych *C. roseus*, w których dodatkowo użyto DMSO w celu permeabilizacji ścian komórkowych oraz elicytora jako stymulatora biosyntezy alkaloidów. W efekcie zaobserwowano ponad trzykrotny wzrost akumulacji alkaloidów indolowych względem hodowli z użyciem samego adsorbenta, co świadczy o synergistycznym działaniu użytych technik [2]. Mniejszy wzrost wydajności, ok. 65 - 70%, odnotowano w przypadku wydzielania *in situ* taksanów w hodowli węgłębnej komórek roślinnych *T. cuspidata*, w której użyto jako adsorbenta Amberlite® XAD-4 [16]. W innym procesie z zastosowaniem tego samego złoża zauważono około dwukrotny wzrost akumulacji ajmalicyny w hodowli węgłębnej komórek *C. roseus* przy jednoczesnej utracie specyficzności metody względem konwencjonalnej ekstrakcji rozpuszczalnikiem [17]. Wyboru odpowiedniego adsorbenta dokonuje się biorąc pod uwagę głównie polarność izolowanego metabolitu [13]. Ze stosowaniem adsorbentów wiąże się ryzyko braku specyficzności - poza toksycznymi składnikami medium hodowlanego mogą one również akumulować związki niezbędne komórkom do wzrostu [2].

Przykłady innych rodzajów stosowanych adsorbentów to modyfikowane żele krzemionkowe oraz węgiel aktywny [14]. Zastosowanie węgla aktywnego w układzie *in situ* pozwoliło na ponad dwukrotne zwiększenie wydajności taksanów w hodowli zawiesiny komórek *Taxus baccata* [18].

Alternatywnym rozwiązaniem jest wprowadzenie do układu hodowlanego dodatkowej fazy ciekłej poprzez dodatek niemieszającego się z wodą, hydrofobowego rozpuszczalnika organicznego. Obserwowanym efektem jest wzrost wydajności sekrecji metabolitów wtórnych, co może mieć związek z oddziaływaniem fazy ekstrakcyjnej na ściany komórek roślinnych oraz akumulację w fazie organicznej metabolitów.

Jednym z rodzajów cieczy organicznych o możliwym zastosowaniu w formie dodatkowej fazy w układzie ekstrakcji *in situ* są preparaty triglicerydowe o komercyjnej nazwie Miglyol®. Stanowią je mieszaniny triacylogliceroli, których szkielety glicerynowe podstawione są resztami kwasów tłuszczowych o 8 - 10 atomach węgla w cząsteczce. Mieszaniny te cechują się niską lepkością oraz silnie lipofilowymi właściwościami [2]. Zastosowanie Miglyolu® w hodowli komórek roślinnych *Thuja occidentalis* (pol. żywotnik zachodni) skutkowało dwukrotnym wzrostem wydajności wyizolowanych monoterpenoidów względem ekstrakcji dichlorometanem [19]. W badaniach, dotyczących hodowli półciąglej immobilizowanych komórek roślinnych *Cruciata glabra* (pol. przytulinka wiosenna) z jednoczesnym zastosowaniem Miglyolu® uzyskano znaczący, bo 49-krotny wzrost wydajności antrachinonów [20]. W przytoczonych badaniach nośnik do immobilizacji komórek wykonano z żelu chitozanowego, który jednocześnie pełnił funkcje elicytora. Znacznie mniejszy, dwukrotny wzrost produktywności monoterpenów przy użyciu Miglyolu® zaobserwowano podczas hodowli pędów *Mentha canadensis* (pol. mięta kanadyjska) [2].

Innym rozpuszczalnikiem używanym w badaniach nad układami do ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych jest n-heksadekan. Aplikacja w hodowli komórek roślinnych *L. erythrorhizon* wywołała ponad siedmiokrotny wzrost wydajności izolacji szikoniny [21]. Podobny trend zaobserwowano dla hodowli komórek *Arnebia euchroma* również badanej pod kątem produkcji tej grupy naftochinonów [22]. W cytowanych badaniach zwrócono uwagę na zjawisko ograniczenia wzrostu na skutek zbyt dużej objętości dodanego rozpuszczalnika oraz pozytywny dla procesu ekstrakcji wpływ mieszania. Istotny okazał się również czas wprowadzenia rozpuszczalnika organicznego do układu - maksymalny, ponad dwukrotny wzrost wytwarzania szikoniny uzyskano, gdy n-heksadekan dodano po 12 dniach prowadzenia hodowli węgłębnej komórek *A. euchroma* [22].

Kolejnym przykładem rozpuszczalnika stosowanego w procesie ekstrakcji *in situ* jest jednonienasycony kwas oleinowy. Wyniki badań nad jego zastosowaniem do izolacji paklitakselu z hodowli węgłębnej komórek *Taxus chinensis* (pol. cis chiński) prowadzonej w bioreaktorze wskazują, iż największy, ponad trzykrotny wzrost zawartości produktu osiągnięto przy 8% stężeniu kwasu oleinowego w układzie [23].

Zbliżony efekt dało zastosowanie oleju silikonowego w hodowli korzeni włóśnikowych *C. roseus*. Olej silikonowy składa się ze spolimeryzowanych siloksanów z węglowodorowymi łańcuchami bocznymi. Ze względu na stosunkowo niską gęstość i nierozpuszczalność w wodzie olej silikonowy tworzył w układzie odrębną, górną fazę. Stwierdzono kil-

kukrotny wzrost produkcji wybranych alkaloidów indolowych. Co ważne, stosowany rozpuszczalnik nie wykazywał widocznego negatywnego wpływu na wzrost tkanki oraz zawartość składników odżywczych w fazie wodnej [24].

Do grupy silikonów należy także poli(dimetylosiloksan) (PDMS). Swoim właściwościom zawdzięcza on szerokie i uniwersalne zastosowania. Jest bezbarwny i przezroczysty, przepuszczalny dla gazów, silnie hydrofobowy i niepalny. W dodatku uważany jest za polimer nietoksyczny i chemicznie obojętny [2]. Zastosowanie PDMS w roli dodatkowej fazy ciekłej w okresowej hodowli zawiesiny komórek *Polygonum tinctorium* (pol. rdest barwierski) dało maksymalny 2,6-krotny wzrost produkcji indirubiny. Porównano także produktywności 14-dniowych hodowli prowadzonych w małej skali (tzn. w kolbach Erlenmayera o pojemności 0,2 dm³) i bioreaktorze o pojemności roboczej 0,5 dm³ przy 50% stężeniu objętościowym PDMS. Uzyskano wzrosty wydajności indirubiny wynoszące odpowiednio 123% i 14%. Po uwzględnieniu, że przy braku PDMS hodowla bioreaktorowa była o 17 % wydajniejsza od tej w kolbie, wyraźnie widoczny jest różnicowany wpływ zastosowanego rozpuszczalnika. Wyjaśnieniem obserwowanych różnic może być odmienne ukształtowanie dodatkowej fazy w obu przypadkach. PDMS w kolbie tworzył rozproszone w pożywce krople, natomiast w bioreaktorze występował jako odrębna warstwa, niemieszająca się z fazą pożywki. Było to powodem ograniczeń w transporcie masy między fazami [25].

Interesującym podejściem okazało się zastosowanie oleju parafinowego w roli dodatkowej fazy ekstrakcyjnej. Stanowi on mieszaninę długotańcuchowych alkanów, co determinuje jego lipofilowe właściwości. Cechuje się gęstością wynoszącą ok. 0,8 g/cm³. Dodatek ciekłej parafiny do układu hodowlanego komórek *Matricaria chamomilla* (pol. rumianek pospolity) skutkowało akumulacją metabolitów wtórnych przy jednoczesnym braku widocznego negatywnego oddziaływania na przyrost biomasy [2]. W innym doświadczeniu olej parafinowy został dodany do hodowli zawiesiny komórek *Lithospermum erythrorhizon* powodując ponad dwukrotny wzrost produkcji i sekrecji szikoniny [26]. Niezależnie od wspomnianych badań zaobserwowano, że 85% metabolitów produkowanych przez kultury komórkowe *L. erythrorhizon* akumulowanych było w fazie organicznej przy produktywności wynoszącej 1 g/dm³ [27].

Innym gatunkiem zbadanym przy użyciu ciekłej parafiny w układach do ekstrakcji *in situ* jest *Echium italicum* (pol. żmijowiec włoski). Badania hodowli zawiesin komórek tego gatunku pokazują, że obecność oleju parafinowego w układzie hodowlanym intensyfikuje biosyntezę szikoniny i jej zewnątrzkomórkowe wydzielanie. Sugerowaną przyczyną takiego stanu rzeczy jest znaczne powinowactwo lipofilowego rozpuszczalnika względem hydrofobowych cząstek szikoniny [28]. W cytowanych badaniach efektywna ekstrakcja metabolitów wtórnych z ciekłej parafiny została uzyskana przy użyciu kolumny chromatograficznej z odwróconą fazą Sep-Pak. Interesujący okazał się również wynik zastosowania tej fazy ekstrakcyjnej w hodowli komórek *A. euchroma*. Przy zastosowaniu dwóch różnych frakcji parafiny, lekkiej i ciężkiej, osiągnięto odpowiednio 49% i 73% wzrost produktywności naftochinonów. Korzystnemu efektowi towarzyszył jednak negatywny wpływ na wzrost komórek, spowodowany prawdopodobnymi ograniczeniami w wymianie gazów oddechowych w układzie hodowlanym [29].

Dzięki licznym badaniom doświadczalnym układów do ekstrakcji *in situ* z zastosowaniem wielu rozpuszczalników organicznych, pełniących funkcję dodatkowej fazy, możliwe stało się określenie czynników wpływających na aplikacyjność takiego rozwiązania. Podstawową kwestią, którą należy wziąć pod uwagę, jest toksyczność fazy organicznej względem komórek roślinnych, determinująca przyrost biomasy. Korzystną właściwością może być brak reaktywności (inertność) i powinowactwa względem składników medium hodowlanego. Cecha ta skutkuje brakiem wpływu dodatkowej fazy na zawartość składników odżywczych w pożywce. Ponadto pożądana jest możliwość adsorpcji bądź rozpuszczenia jak największej ilości metabolitów wtórnych, czemu sprzyja wzrost powierzchni międzyfazowej oraz zdolność specyficznego i odwracalnego wiązania wybranych metabolitów. Dodatkowo wymagane jest, aby zastosowany adsorbent bądź rozpuszczalnik cechował się odpornością na warunki związane ze sterylizacją termiczną, tak aby mógł być sterylizowany wraz z pożywką [2].

Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań wykazały, że kolejnym ważnym czynnikiem z punktu widzenia wydajności procesu ekstrakcji *in situ* jest moment wprowadzenia fazy organicznej do układu hodowlanego. W przypadku izolacji metabolitów wtórnych, których biosynteza nie jest związana z przyrostem biomasy, korzystne jest późne wprowadzenie ekstrahenta do układu. Potwierdzono to w hodowli zawiesiny komórek *T. chinensis* [30]. Dodatek dibutyloftalanu na późnym etapie wzrostu logarytmicznego komórek pozwolił na uzyskanie wysokiej wydajności paklitakselu przy minimalnym osłabieniu wzrostu biomasy. Podobny trend zaobserwowano po zastosowaniu adsorbenta w postaci silikonu w hodowli wglębnej *T. cuspidata* [31]. Maksymalny zaobserwowany, 45-krotny wzrost produktywności taksonów osiągnięto wprowadzając adsorbent siódmego dnia hodowli. Najwyższa wydajność taksonów została osiągnięta w przypadku 10% stężenia. Zarówno wyższe jak i niższe stężenia adsorbenta cechował spadek produktywności metabolitów. Sugeruje to konieczność eksperymentalnego dobrania optymalnej ilości użytego ekstrahenta.

Omówione przykłady ekstrakcji *in situ* można podzielić na dwie grupy ekstrahentów lub adsorbentów, różniące się właściwościami fizykochemicznymi, biokompatybilnością względem biomasy roślinnej oraz powinowactwem do wybranych metabolitów. Pierwszą z omówionych były adsorbenty stanowiące w układzie hodowlanym fazę stałą. W zależności od materiału, z którego są zbudowane, wykazują różnicowany stopień hydrofilowości bądź hydrofobowości, co sprawia, że mogą być zastosowane do izolacji szerokiej grupy metabolitów wtórnych. Dodatkowo, stały stan skupienia i brak rozpuszczalności adsorbentów w pożywce pozwalają zasadniczo pominąć problem toksyczności względem komórek oraz ułatwiają ich usunięcie z układu. W przypadku faz ciekłych cechujących się silną lipofilowością, utrudniona jest ekstrakcja polarnych metabolitów, co ogranicza zakres ich stosowalności. Doświadczalnie zaobserwowany został również problem toksyczności organicznych rozpuszczalników obniżający aktywność metaboliczną i żywotność komórek. Przyczyną był negatywny wpływ ekstrahentów na sprawność funkcjonowania błon komórkowych [2].

Ekstrakcja *in situ* stanowi obiecującą technikę izolacji syntezowanych przez komórki roślinne metabolitów wtórnych powodującą jednocześnie wzrost ich produktywności. Selektywna akumulacja bioproduktów w odrębnej, łatwej

do wyodrębnienia z układu hodowlanego fazy pozwala również znacząco ułatwić procesy oczyszczania ekstrahowanych związków. Wyniki wielu doświadczeń wskazują na możliwość połączenia ekstrakcji *in situ* z innymi metodami optymalizacji produktywności roślinnych metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro* biomasy roślinnej. Wyzwaniem jest uzyskanie układów ekstrakcyjnych, nietoksycznych dla komórek roślinnych i selektywnych względem wartościowych metabolitów.

Przykłady zastosowań ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych przedstawiono w tabeli 1.

4. Ciekłe perfluoropochodne jako rozpuszczalniki do ekstrakcji *in situ*

Perfluoropochodne węglowodorów dzięki swoim unikalnym właściwościom zyskały zainteresowanie naukowców z różnych dziedzin biotechnologii. Związki te otrzymuje się przez zastąpienie atomów wodoru atomami fluoru. Większe rozmiary chmury elektronowej molekuł, w skład których wchodzi fluor zamiast wodoru, powodują, że cząsteczki perfluoropochodnych są większe od węglowodorów odpowiadających im długością łańcucha i mają sztywniejszą strukturę. Wiązanie C-F cechuje się wysoką stabilnością i energią (~485 kJ/mol), rosnącą wraz z kolejnymi podstawnikami w postaci atomów fluoru (-531 kJ/mol dla wiązań w

grupie CF₃). Konsekwencją tego faktu jest bardzo wysoka stabilność termiczna, chemiczna oraz obojętność biologiczna tych związków [33]. Niska polarność atomu fluoru skutkuje słabymi siłami van der Waalsa między cząsteczkami, co z kolei prowadzi do niskiego napięcia powierzchniowego, wysokiego ciśnienia par, niskiej stałej dielektrycznej, niezwykle słabej rozpuszczalności w wodzie oraz bardzo dobrej rozpuszczalności gazów. Dodatkowo związki te cechują się stosunkowo dużą gęstością [34]. Właściwość wyróżniająca perfluoropochodne to ich jednoczesna hydrofobowość i lipofobowość. Spośród nielicznych procesowych zastosowań perfluoropochodnych korzystne może być ich użycie w hodowlach komórkowych i tkankowych biomasy roślinnej.

Jednym z czynników warunkujących przyrost biomasy w hodowli *in vitro* jest dostępność gazów oddechowych. Ze względu na niską rozpuszczalność tlenu w wodzie uzasadnione staje się wykorzystanie w hodowlach węglbnych ciekłych nośników tlenu. Zaliczane do tej grupy związków ciekłe perfluoropochodne cechuje rozpuszczalność tlenu cząsteczkowego około 20-krotnie przewyższająca tę wartość dla wody [35].

Określono efekty zastosowania nasyconej powietrzem perfluorodekaliny w hodowlach różnych rodzajów komórek.

Tabela 1. Przykłady zastosowań ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych.

Faza ekstrakcyjna	Wydzielany metabolit	Gatunek rośliny	Układ hodowlany	Wzrost wydajności	Bibl.
Amberlite® XAD-7	antrachinony	<i>Cinchona ledgeriana</i>	zawiesina komórek	15x	[15]
Amberlite® XAD-7	alkaloidy indolowe	<i>Catharanthus roseus</i>	korzenie włośnikowe	3x	[2]
Amberlite® XAD-4	taksany	<i>Taxus cuspidata</i>	zawiesina komórek	1,7x	[16]
Amberlite® XAD-4	ajmalicyna	<i>Catharanthus roseus</i>	zawiesina komórek	2x	[17]
węgiel aktywny	taksany	<i>Taxus baccata</i>	zawiesina komórek	2x	[18]
Miglyol®	monoterpenoidy	<i>Thuja occidentalis</i>	zawiesina komórek	2x	[19]
Miglyol®	antrachinony	<i>Cruciata glabra</i>	immobilizowane komórki	49x	[20]
Miglyol®	monoterpeny	<i>Mentha canadensis</i>	pędy	2x	[2]
n-heksadekan	szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	zawiesina komórek	7x	[21]
n-heksadekan	szikonina	<i>Arnebia euchroma</i>	zawiesina komórek	2x	[22]
kwas oleinowy	paklitaksel	<i>Taxus chinensis</i>	zawiesina komórek	3x	[23]
olej silikonowy	alkaloidy indolowe	<i>Catharanthus roseus</i>	korzenie włośnikowe	5x	[24]
PDMS	indirubina	<i>Polygonum tinctorium</i>	zawiesina komórek	2,6x	[25]
olej parafinowy	-	<i>Matricaria chamomilla</i>	zawiesina komórek	-	[2]
olej parafinowy	szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	zawiesina komórek	2x	[26]
olej parafinowy	szikonina	<i>Echium italicum</i>	zawiesina komórek	2x	[28]
olej parafinowy	naftochinony	<i>Arnebia euchroma</i>	zawiesina komórek	1,73x	[29]
dibutylo-ftalan	paklitaksel	<i>Taxus chinensis</i>	zawiesina komórek	6x	[30]
silikon	paklitaksel	<i>Taxus cuspidata</i>	zawiesina komórek	45x	[31]
perfluoro-dekalina	naftochinony	<i>Arnebia euchroma</i>	zawiesina komórek	1,5x	[5]
perfluoro-dekalina	paklitaksel	<i>Taxus x media var. Hicksii</i>	korzenie włośnikowe	3,5x	[32]

Większy przyrost biomasy przy zastosowaniu perfluorozwiązku zamiast środowiska wodnego uzyskano w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz komórek roślinnych *Nicotiana tabacum* (pol. tytoń szlachetny). Wyznaczone eksperymentalnie współczynniki transportu masy dla napowietrzania z użyciem perfluorodekaliny były o około 50% większe niż dla konwencjonalnej metody aeracji barbotażowej. Co więcej, wzrost współczynnika transportu masy może być uzyskany dzięki zwiększeniu powierzchni międzyfazowej i zmniejszeniu napięcia powierzchniowego, np. przez dodatek surfaktantu i wytworzeniu emulsji. W przypadku komórek roślinnych *N. tabacum*, nasycenie perfluorodekaliny czystym tlenem powodowało spadek przyrostu biomasy. Powodem był wzrost stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach w stopniu niemożliwym do zniwelowania przez wewnątrzkomórkowe enzymy (katalazy i peroksydazy). Użycie powietrza zamiast tlenu nie powodowało takich niekorzystnych efektów, ponadto większemu przyrostowi biomasy towarzyszyła wydłużona w czasie faza logarytmicznego wzrostu dla hodowli [36]. Wysoka gęstość perfluorodekaliny powodowała jej lokalizację w układzie hodowlanym jako dolnej fazy. Dla hodowli prowadzonych w bioreaktorze oznacza to możliwość odebrania odgazowanej ciekłej perfluoropochodnej z dna naczynia, nasycenia jej powietrzem i ponownego użycia.

Poszukiwania optymalnej metody dostarczania gazów oddechowych hodowanej w głąbnie biomasy roślinnej wykazały ograniczenia stosowalności do tego celu perfluorozwiązków. W przypadku hodowli korzeni włośnikowych *Atropa belladonna* (pol. pokrzyk wilcza jagoda) użycie nasyconej powietrzem emulsji perfluorowanej nie spowodowało znaczącego zwiększenia przyrostu biomasy. Analizowaną przyczyną nieefektywności był brak wpływu tych cieczy na transport tlenu przez granicę faz ciec-ciało stałe. Natomiast na granicy fazy gaz-ciecz perfluorowazwiązki tworzą cienką warstwę, modyfikując wartość napięcia powierzchniowego oraz wielkość powierzchni międzyfazowej i tym samym ułatwiają przenikanie gazów [37]. Doświadczenia wykazały, iż wzrost rozpuszczalności gazów w perfluorowazwiązkach rośnie liniowo ze wzrostem ciśnienia cząstkowego danego gazu, zgodnie z prawem Henry'ego, co stoi w opozycji do sigmoidalnej zależności obserwowanej dla biologicznych przenośników gazów oddechowych takich jak hemoglobina [38]. Omawianą grupę perfluorowanych związków cechuje również zdolność dynamicznego uwalniania gazów, co jest konsekwencją braku reaktywności i oddziaływań z ich cząsteczkami [39].

Unikalne właściwości perfluoropochodnych stwarzają również szansę na ich wykorzystanie w roli ekstrahenta w procesie ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych. Jednym z powodów atrakcyjności takiego rozwiązania jest całkowita nietoksyczność i obojętność biologiczna tych substancji względem komórek i tkanek [36]. Nie występuje tu więc rozpatrywany wcześniej negatywny wpływ wprowadzonego rozpuszczalnika na przyrost biomasy lub aktywność metaboliczną komórek, częsty w przypadku użycia organicznych rozpuszczalników. Ponadto, dzięki stabilności termicznej jaką prezentują perfluoropochodne, możliwa jest ich sterylizacja wraz z pożywką.

Przykładem pomyślnej aplikacji perfluoropochodnej jako ekstrahenta w procesie ekstrakcji *in situ* mogą być wyniki badań z udziałem hodowli zawiesiny komórek *A. eichroma* [5]. Dla prób przeprowadzonych z użyciem perfluorodekaliny nasyconej powietrzem i odgazowanej zaobser-

wowano większy przyrost suchej biomasy w drugim i trzecim tygodniu hodowli, osiągając jednak na koniec czwartego tygodnia wartości zbliżone do próby kontrolnej. Wyraźny wzrost był za to obserwowany dla wydajności biosyntezy przez komórki naftochinonów. Użycie nasyconej powietrzem perfluorowanej fazy dało 50% wzrost całkowitej zawartości tych metabolitów, podczas gdy dla odgazowanej perfluorodekaliny wynosił on tylko 10%. Kolejną zaobserwowaną różnicą względem próby kontrolnej była większa sumaryczna zawartość naftochinonów w fazie wodnej i perfluorowanej niż wewnątrz komórek *A. eichroma*, co świadczy o zwiększonym wydzielaniu tych metabolitów do medium hodowlanego. W przypadku nasycenia perfluorowanej fazy etylenem, będącym inhibitorem podziałów mitotycznych, miał miejsce zdecydowanie niższy przyrost biomasy w hodowli i związanej z tym obniżonej zawartości naftochinonów. Fakt ten jest sprzeczny z wykazanym w hodowlach pędów *L. erythrorhizon* stymulującym biosyntezę naftochinonów działaniem etylenu [40].

Na możliwość zastosowania perfluoropochodnej w ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych wskazują badania z udziałem korzeni włośnikowych *Taxus x media* var. *Hicksii*, zawierających gen kodujący syntazę taksadienową, biorącą udział w biosyntezie taksanów [32]. Wprowadzenie do hodowli fazy perfluoropochodnej powodowało spadek przyrostu biomasy w kulturach w porównaniu do próby kontrolnej (brak perfluoropochodnej, pożywka bez elicytora i prekursora), prezentującej 1,9-krotny przyrost biomasy. Niewielką różnicę wzrostu zaobserwowano po użyciu odgazowanej perfluorodekaliny w 14 dniu hodowli (1,85-krotny wzrost wydajności), podczas gdy dla hodowli prowadzonych z nasyconą powietrzem fazą ekstrakcyjną wprowadzoną na początku lub po dwóch tygodniach hodowli otrzymano najmniejsze przyrosty biomasy (odpowiednio 1,1-krotny i 1,4-krotny wzrost). Ponadto w doświadczeniu istotny był dodatek jednego z dwóch elicytorów: jasmonianu metylu lub koronatyny. Zauważono, że pierwszy z wymienionych elicytorów stymulował inhibicję wzrostu biomasy zarówno bez jak i w obecności napowietrzonej lub odgazowanej perfluorodekaliny. Zaobserwowano również osłabienie negatywnego wpływu elicytacji na wzrost biomasy w przypadku użycia perfluorowanej fazy ekstrakcyjnej. Za przypuszczalny powód takiego stanu rzeczy uznano brak bezpośredniego kontaktu tkanek korzenia z użytym elicytorem oraz syntezowanymi fitoaleksynami o toksycznych właściwościach, spowodowany ich akumulacją w ekstrahencie.

Wyraźnie zauważalną korzyścią płynącą z użycia perfluorodekaliny w omawianych badaniach był wzrost wydajności produkcji taksanów. Maksymalne zawartości paklitakselu zanotowano dla prób z dodatkiem elicytora - jasmonianu metylu i odgazowanej perfluorodekaliny wprowadzonej przy inokulacji lub 14 dnia hodowli. Uzyskane wartości były 3,5-krotnie wyższe od wydajności uzyskiwanych bez udziału perfluorowanej fazy. Wykazano również, iż obecność koronatyny w większym stopniu intensyfikowała akumulację bakkatyny III. Obserwowany był także 64-krotny wzrost wydajności względem elicytacji jasmonianem metylu. Efektem użycia koronatyny była ponadto zwiększona produkcyjność paklitakselu przy jednoczesnym wzroście stopnia jego wydzielania do medium hodowlanego. Wszystkie próby z użyciem nasyconej powietrzem perfluorodekaliny prezentowały niższe produkcyjności taksanów niż przy aplikacji odgazowanej fazy. Co ważne, we wszystkich pró-

bach przeprowadzonych bez użycia elicytora nie stwierdzono obecności taksanów.

Przedstawione wyżej przykłady wykorzystania perfluorozwiązków w hodowlach komórek i tkanek roślinnych uzasadniają przydatność tej metody. Wyróżnić można dwie główne korzyści płynące z użycia perfluorowanych cieczy w hodowlach *in vitro*. Po pierwsze, napowietrzona perfluorozwiązki pozwalają na wydajniejsze dostarczanie i odprowadzanie gazów oddechowych w hodowlach. Po drugie, umożliwiają izolację *in situ* metabolitów wtórnych, skutkującą zwiększeniem ich produktywności.

5. Bibliografia

- Kawka M., Ekstrakcja *in situ* naftochinonów w hodowli korzeni *Rindera graeca* (*In situ* extraction of naphthoquinones in *Rindera graeca* transformed hairy root cultures). Praca dyplomowa na stopień magistra inżyniera wykonana w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej i w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2016.
- Malik S., Hossein Mirjalili M., Fett-Neto A. G., Mazzafera P. & Bonfill M., Living between two worlds: Two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33, 1-22.
- Murthy H. N., Lee E.-J. & Paek K.-Y., Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 118, 1-16.
- Pilarek M., Liquid perfluorochemicals as flexible and efficient gas carriers applied in bioprocess engineering: An updated overview and future prospects, *Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa*, 2014, 35, 463-487.
- Syklowska-Baranek K., Pilarek M., Cichosz M. & Pietrosiuk A., Liquid perfluorodecalin application for *in situ* extraction and enhanced naphthoquinones production in *Arnebia euchroma* cell suspension cultures, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172, 2618-2627.
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N. & Omar A. K. M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials - A review, *Journal of Food Engineering*, 2013, 117, 426-436.
- Ciborowski J., Inżynieria procesowa, Warszawa : Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1973.
- Kukuła-Koch W., Koch W. & Glowiniak K., Novel extraction techniques towards the recovery of plant derived secondary metabolites - A review, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DDD: Pharmacia*, 2011, 24, 83-94.
- Incorvia Mattina M. J., Iannucci Berger W. A. & Denson C. L., Microwave-assisted extraction of taxanes from *Taxus* biomass, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 4691-4696.
- Verma A., Hartonen K. & Riekkola M.-L., Optimisation of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology - Comparison with other extraction techniques, *Phytochemical Analysis*, 2008, 19, 52-63.
- Ruffoni B., Pistelli L., Bertoli A. & Pistelli L., Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production. W: Giardi M. T., Rea G., Berra B., *Bio-Farms for nutraceuticals* (s. 203-221), *Advances in experimental medicine and biology* 2010.
- Bertoli A., Giovannini A., Ruffoni B., Di Guardo A., Spinelli G., Mazzetti M. & Pistelli L., Bioactive constituent production in *St. John's Wort in vitro* hairy roots. Regenerated plant lines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 5078-5082.
- Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. W: Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin* (s. 306-340), Wydawnictwo Naukowe PWN 2007.
- Ramachandra Rao S. & Ravishankar G. A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 2002, 20, 101-153.
- Robins R. J. & Rhodes M. J. C., The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1986, 24, 35-41.
- Kwon I. C., Yoo Y. J., Lee J. H. & Hyun J. O., Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product, *Process Biochemistry*, 1998, 33, 701-707.
- Hussain M. S., Fareed S., Ansari S., Rahman M. A., Ahmad I. Z. & Saeed M., Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2012, 4, 10-20.
- Kajani A. A., Mofid M. R., Abolfazli K. & Tafreshi S. A. H., Encapsulated activated charcoal as a potent agent for improving taxane synthesis and recovery from cultures, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2010, 56, 71-76.
- Berlin J., Witte L., Schubert W. & Wray V., Determination and quantification of monoterpenoids secreted into the medium of cell cultures of *Thuja occidentalis*, *Phytochemistry*, 1984, 23, 1277-1279.
- Dörnenburg H. & Knorr D., Semicontinuous processes for anthraquinone production with immobilized *Cruciata glabra* cell cultures in a three-phase system, *Journal of Biotechnology*, 1996, 50, 55-62.
- Kim D. J. & Chang H. N., Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by *in situ* extraction and calcium alginate immobilization, *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36, 460-466.
- Xuqing F. & Dewei L., Enhancement of shikonin production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* employing two-liquid-phase systems, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 1998, 6, 86-90.
- Yuan Y.-J., Wei Z.-J., Wu Z.-L. & Wu J.-C., Improved Taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairai* by *in situ* extraction combined with precursor feeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor, *Biotechnology Letters*, 2001, 23, 1659-1662.
- Tikhomiroff C., Allais S., Klvana M., Hisiger S. & Jolicoeur M., Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor, *Biotechnology Progress*, 2002, 18, 1003-1009.
- Bae G. W., Chung C. S., Kim K. I., Park C. H., Lee H. J., Chae Y. A. & Chung I. S., Improved indirubin production in a two-phase suspension culture of *Polygonum tinctorium* using dimethylpolysiloxane, *Biotechnology Techniques*, 1998, 12, 843-845.
- Lin L. & Wu J., Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78, 81-88.
- Deno H., Suga C., Morimoto T. & Fujita Y., Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* - VI. Production of shikonin derivatives by a two-layer culture containing an organic solvent, *Plant Cell Reports*, 1987, 6, 197-199.
- Zare K., Nazemiyeh H., Movafeghi A., Khosrowshahli M., Motallebi-Azar A., Dadpour M. & Omid Y., Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: Induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2010, 100, 157-164.
- Kumar R., Sharma N., Malik S., Bhushan S., Sharma U. K., Kumari D., Sinha A. K., Sharma M. & Ahuja P. S., Cell suspension culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston - a potential source of naphthoquinone pigments, *Journal of Medicinal Plant Research*, 2011, 5, 6048-6054.
- Wang C., Wu J. & Mei X., Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding, *Biotechnology Progress*, 2001, 17, 89-94.
- Kim C.-H., Hong S.-H., Son S.-H. & Chung I.-S., Improved paclitaxel production in a two-phase suspension culture of *Taxus cuspidata*

- using silicone cubes, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1999, 4, 273-276.
32. Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., Bonfill M., Kafel K. & Pietrosiuk A., Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* carrying a taxadiene synthase transgene, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 120, 1051-1059.
 33. Krafft M. P., Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47, 209-228.
 34. Krafft M. P. & Riess J. G., Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses dedicated to the memory of Professor Guy Ourisson, a true renaissance man, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2007, 45, 1185-1198.
 35. Lowe K. C., Davey M. R. & Power J. B., Perfluorochemicals: Their applications and benefits to cell culture, *Trends in Biotechnology*, 1998, 16, 272-278.
 36. Pilarek M. & Szewczyk K. W., Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 41, 38-42.
 37. Kanokwaree K. & Doran P. M., Application of membrane tubing aeration and perfluorocarbon to improve oxygen delivery to hairy root cultures, *Biotechnology Progress*, 1998, 14, 479-486.
 38. Pilarek M., Grabowska I., Senderek I., Wojasiński M., Janicka J., Janczyk-Ilach K. & Ciach T., Liquid perfluorochemical-supported hybrid cell culture system for proliferation of chondrocytes on fibrous polylactide scaffolds, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37, 1707-1715.
 39. Lowe K. C., Perfluorochemical respiratory gas carriers: Benefits to cell culture systems, *Journal of Fluorine Chemistry*, 2002, 118, 19-26.
 40. Touno K., Tamaoka J., Ohashi Y. & Shimomura K., Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43, 101-105.