



**BIULETYN**  
**Wydziału Farmaceutycznego**  
**Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2011, 1, 1-27  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## ROŚLINNE ZWIĄZKI BARWNE ICH WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE ORAZ MOŻLIWOŚCI WYTWARZANIA W KULTURACH *IN VITRO*

Olga Bołonkowska, Agnieszka Pietrosiuk\*, Katarzyna Sykłowska-Baranek

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

\*autorka korespondująca: tel. +22 5720982, e-mail: agnieszka.pietrosiuk@wum.edu.pl

Otrzymany 17.02.2011, zaakceptowany 19.04.2011, zamieszczony 3.08.2011

### STRESZCZENIE

W pracy opisano występowanie, biosyntezę, budowę chemiczną, właściwości farmakologiczne, zastosowanie oraz biotechnologiczne wytwarzanie w kulturach *in vitro* najważniejszych barwników roślinnych.

**SŁOWA KLUCZOWE:** barwniki roślinne, kultury *in vitro*, działanie biologiczne

### ABSTRACT

PLANT DYES, THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AND PRODUCTION IN *IN VITRO* CULTURES

This work describes occurrence, biosynthesis, chemical structures, pharmacological activity, and application of the most important natural plant dyes. Also the biotechnological methods used for *in vitro* production of plant pigments are presented.

**KEYWORDS:** plant dyes, culture *in vitro*, biological activity

### Spis treści

1. Wstęp .....	2
2. Chlorofile .....	2
3. Karotenoidy .....	3
3.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna karotenoidów .....	3
3.2. Znaczenie karotenoidów w fizjologii roślin .....	3
3.3. Karotenoidy stosowane w przemyśle .....	4
3.4. Właściwości biologiczne karotenoidów .....	4
3.5. Karotenoidy wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	5
4. Betalainy .....	5
4.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna betalain .....	5
4.2. Znaczenie, zastosowanie, właściwości farmakologiczne betalain .....	6
4.3. Betalainy wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	6
5. Ryboflawina .....	8
6. Flawonoidy .....	8
6.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna flawonoidów .....	8
6.2. Znaczenie flawonoidów w fizjologii roślin .....	10
6.3. Właściwości biologiczne flawonoidów .....	10
6.4. Flawonoidy wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	11
7. Antocyjany .....	12
7.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna antocyjanów .....	12
7.2. Znaczenie antocyjanów w fizjologii roślin .....	12
7.3. Antocyjany jako barwniki stosowane w przemyśle .....	12
7.4. Właściwości biologiczne antocyjanów .....	13
7.5. Antocyjany wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	13
8. Związki antrapoходne .....	15
8.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna antronoidów .....	15
8.2. Związki antrapoходne jako barwniki stosowane w przemyśle .....	16
8.3. Właściwości biologiczne związków antrapoходnych .....	16
8.4. Antrachinony wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	17
9. Naftochinony .....	18
9.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna .....	18
9.2. Zastosowanie barwnych naftochinonów w przemyśle .....	19
9.3. Właściwości biologiczne naftochinonów .....	19
9.4. Naftochinony wytwarzane w kulturze <i>in vitro</i> .....	19
10. Benzochinony .....	21
11. Inne barwniki roślinne .....	21
11.1. Indygo .....	21
11.2. Kurkumina .....	21
12. Objasnienia skrótów .....	21
13. Bibliografia .....	21

## 1. Wstęp

Barwniki roślinne pełnią wiele funkcji ważnych dla życia roślin. Chlorofile i karotenoidy biorą udział w procesie fotosyntezy. Inne barwniki uczestniczą w procesach oksydoredukcyjnych, nadają kolor kwiatom, owocom, liściom. Spełniają też funkcję ekologiczną - barwne kwiaty roślin owadopylnych stanowią powabnię dla owadów.

Związki barwne ze względu na swoje właściwości, takie jak barwa czy aktywność biologiczna, znajdują także szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, odzieżowym, w lecznictwie i w przemyśle farmaceutycznym (Kozłowski, 2002a; 2002b; 2002c; 2002d; 2002e).

W komórkach roślinnych barwniki występują rzadko w postaci wolnej, często są związane z cukrami jako glikozydy, rzadziej z białkami. Barwniki, które rozpuszczają się w wodzie (antocyjany, betalainy) znajdują się w soku komórkowym, natomiast te, które rozpuszczają się w tłuszczach występują w plastydach: chlorofil w chloroplastach, a karotenoidy w chromoplastach.

O barwie związku decyduje jego struktura chemiczna. Barwniki stanowią niejednorodną grupę związków pod względem budowy chemicznej. Wyróżnia się wśród nich: chlorofile - barwniki zielone; karotenoidy (karoteny, ksantofile) o zabarwieniu żółtym, pomarańczowym, czerwonym, oraz fioletowym. Związki zawierające azot to: ryboflawina - o barwie żółtej, betalainy, a wśród nich betacyjaniny - o barwie od czerwonej aż do fioletowej oraz żółto-pomarańczowe betaksantyny. Flawonoidy to barwniki żółte. Antocyjany w zależności od pH odznaczają się barwą czerwoną, fioletową lub niebieską. Chinony, wśród których wyróżnia się antrachinony, naftochinony i benzochinony, to związki o barwie żółtej, pomarańczowej, poprzez czerwoną aż do brunatnej. Innymi ważnymi barwnikami pochodzenia roślinnego są indygo oraz kurkumina.

### 1a. Introduction

Most of natural dyes come from plants. Plant dyes are responsible not only for diverse colours of flowers, fruits and leaves but also play a very important physiological role in plants life.

Chlorophylls and carotenoids take part in photosynthesis process. Other natural plant pigments participate in oxidation and reduction reactions. The ecological role of colorful flowering plants is to attract pollinators, for example insects.

Considering their color and biological properties, the natural dye compounds are widely used in food, textile, and pharmaceutical industry (Kozłowski, 2002a; 2002b; 2002c; 2002d; 2002e).

In plant cells pigments very rarely are present in free form. They are very often chemically bounded with sugars as the glycosides or with proteins. Water-soluble dyes (antocyanes, betalaines) occur in the cell sap, whereas dyes which are soluble in fats occur in the plastids: chlorophyll in the chloroplasts, carotenoids in the chromoplasts.

Taking the chemical structure into consideration, the natural pigments are an inhomogeneous group of compounds where their colour is determined by chemical structure.

Chlorophylls are green dyes; carotenoids such as carotenes and xanthophylls are characterized by yellow,

orange, red and violet colors. Among compounds containing nitrogen, riboflavine has yellow color, and among betalaine compounds, there are betacyanines of colours from red up to violet or yellow-orange betaxanthines. Flavonoids are yellow dyes. Antocyanins, depending on pH of environment, have red, violet or blue colors. Quinones - the wide class of natural dyes derived from aromatic compounds - include such groups of compounds as anthraquinones, naphthoquinones and benzoquinones. Among them we can find yellow, orange, red and brown dyes. Other important dyes derived from plants are blue indigo and yellow curcumin.

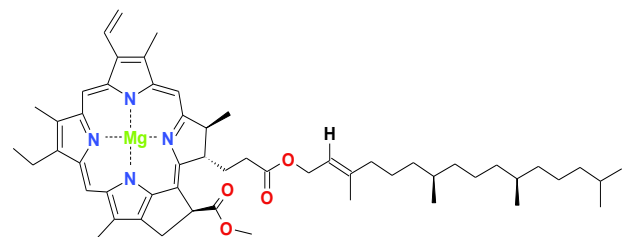
## 2. Chlorofile

Chlorofile to główne barwniki fotosyntetyczne, którym rośliny zawdzięczają zieloną barwę. Mają one zdolność absorbowania promieniowania świetlnego w zakresie widzialnym, dzięki układowi wiązań sprzężonych, czyli występujących po sobie wiązań podwójnych oraz pojedynczych. Ich główne pasma pochłaniania promieniowania słonecznego występują w części czerwonej i niebieskiej widma, tj. od 400 do 800 nm. Istnieje wiele odmian chlorofili, które oznacza się kolejnymi literami alfabetu. U roślin nasiennych występują dwa rodzaje chlorofilu: chlorofil *a* i *b*. Chlorofil *b* stanowi ok.  $\frac{1}{3}$  ilości chlorofilu *a* (Strzałka, 2005).

Pod względem chemicznym chlorofil to ester chlorofiliny (kwasu dwukarboksylowego) z dwoma alkoholami: fitolem i metanolem. Chlorofilina jest magnezoporfiryną zbudowaną z czterech pierścieni pirolowych. Posiada ona centralnie zlokalizowany atom magnezu, który pełni ważną funkcję w agregacji cząsteczek chlorofilu. Łańcuch fitolu posiada właściwości hydrofobowe i jego rolą jest zakotwiczenie i zapewnienie właściwej orientacji chlorofilu w błonie tylakoidów. Chlorofil *a* różni się od chlorofilu *b* jednym z podstawników przy drugim pierścieniu pirolowym: chlorofil *a* posiada grupę metylową, natomiast chlorofil *b* grupę aldehydową (Kozłowska et Politycka, 2007).

Chlorofil (Ryc. 1) pozyskiwany z roślin jest popularnym, zielonym barwnikiem wykorzystywanym do barwienia produktów spożywczych i kosmetycznych. Najczęściej otrzymuje się go z liści pokrzywy i lucerny. Posiada on również właściwości lecznicze, stanowi źródło magnezu oraz usprawnia przemianę materii. Często dodawany jest do dezodorantów, ponieważ posiada zdolności pochłaniania nieprzyjemnych zapachów (Kozłowski, 2002a).

Jako barwnik żywności chlorofil ma oznaczenie E-140, zaś jego bardziej trwałe kompleksy z miedzią oznaczenie E-141 (Wissgott et Bortlik, 1996).

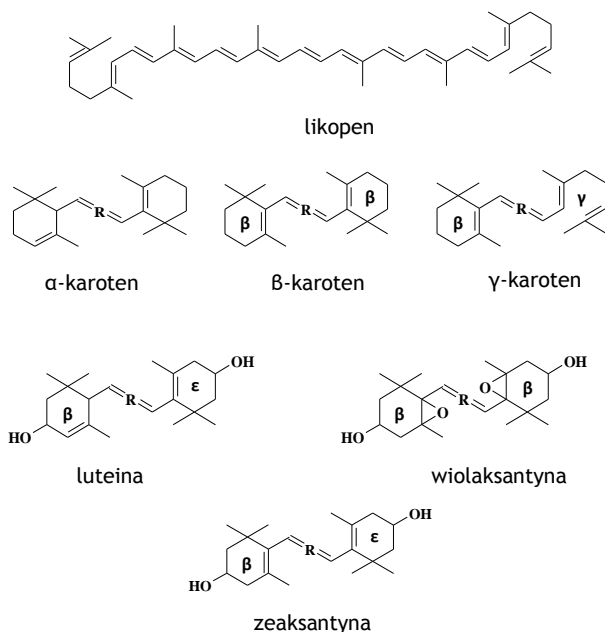


Ryc. 1. Chlorofil.

### 3. Karotenoidy

#### 3.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna karotenoidów

Karotenoidy są obok chlorofilu najbardziej rozpowszechnioną grupą pigmentów roślinnych. Występują one u wszystkich organizmów fotosyntetyzujących. Odpowiedzialne są za barwę owoców i kwiatów. Występują też u skorupiaków oraz ptaków. Zwierzęta nie potrafią syntetyzować karotenoidów *de novo* (Fraser et Bramley, 2004). Rośliny szczególnie bogate w karotenoidy to: *Verbascum phlomoides* L., *Verbascum thapsiforme* Schrad. (Scrophulariaceae), *Zea mays* L. (Poaceae), *Daucus carota* L. (Apiaceae), *Capsicum annuum* L., *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), *Rosa canina* L. (Rosaceae), *Crocus sativus* L. (Iridaceae) (Kozłowski, 2002b). Jest to grupa związków lipofilnych, charakteryzująca się zabarwieniem od żółtego, poprzez pomarańczowe aż do czerwonego. Zawierają zwykle 40 atomów węgla i należą do grupy tetraterpenów (Ryc. 2). Są to wtórne metabolity roślin, które można podzielić na dwie grupy: karoteny o charakterze węglowodorów, takie jak:  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten,  $\gamma$ -karoten i likopen, który jest formą łańcuchową karotenu oraz ksantofile, czyli tlenowe pochodne karotenów. Wyróżnia się tutaj m. in. luteinę, zeaksantynę, wiolaksantynę. Tlen w cząsteczce ksantofili wbudowywany jest na drodze reakcji hydroksylacji, epoksydacji, rzadziej występuje w postaci grupy -okso. Karotenoidy mają charakter wielonienasyconych związków łańcuchowych, posiadających zwykle na obu końcach cząsteczki pierścieniowe, są to układy jononów. Wyróżnia się układ otwarty  $\gamma$ -jononu obecny, np. w  $\gamma$ -karotenie oraz układy zamknięte  $\beta$ , np. wiolaksantyna,  $\beta$ -karoten i  $\epsilon$ -jonon, np. luteina. Największą aktywnością biologiczną odznacza się układ  $\beta$ -jononu, ponieważ razem z łańcuchem nienasyconym tworzy grupę witamin A. W chloroplastach karotenoidy występują w trwałych połączeniach z białkami (Kączkowski, 1992).



Ryc. 2. Struktury chemiczne najczęściej występujących w roślinach karotenów i ksantofili (R = 20-węglowy nienasycony łańcuch węglowodorowy typowy dla karotenoidów).

Karotenoidy są produkowane w plastydach, a ich prekursorem jest difosforan izopentenyłu (IPP). W pierwszym etapie biosyntezy IPP izomeryzowany jest do difosforanu dimetyloallilu (DMAPP), który staje się substratem dla 20-węglowego geranylogeranylodifosforanu (GGPP). Enzymem katalizującym powstawanie GGPP jest syntaza GGPP. Pierwszym krokiem, od którego rozpoczyna się właściwy szlak biosyntezy karotenoidów jest kondensacja dwóch cząsteczek GGPP z wytworzeniem pierwszego 40-węglowego produktu - fitoenu, katalizowana przez syntazę fitoenu. Dwa strukturalnie podobne do siebie enzymy: desaturaza fitoenu i desaturaza  $\zeta$ -karotenowa, dokonują konwersji fitoenu poprzez fitofluen,  $\zeta$ -karoten i neurosporen do likopenu. Enzymy te biorą udział w wytworzeniu chromoforowej części w pigmentach karotenoidowych i zmieniają bezbarwny fitoen w czerwony likopen. Dalsza droga biosyntezy karotenoidów polega na reakcjach cykliczacji likopenu do związków zawierających dwa pierścienie  $\beta$ , np.  $\beta$ -karotenu, zeaksantyny, wiolaksantyny i neoksantyny lub do związków zawierających jeden pierścień  $\beta$  i jeden  $\epsilon$ , np.  $\alpha$ -karotenu i luteiny. Dalsze przemiany polegają na wprowadzaniu do cząsteczek karotenów grup tlenowych i konwersji węglowodorowych  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotenów do podgrupy zwanej ksantofilami. Kolejne przemiany ksantofili obejmują reakcje epoksydacji. Niektóre rośliny mają zmodyfikowane szlaki biosyntezy karotenoidów i związki, które w ich wyniku powstają związane są wyłącznie z rodzajem, a nawet gatunkiem. Sałata (*Lactuca sp.*) obok innych karotenoidów znajdujących się w chloroplastach zawiera laktukaksantynę. Zeinoksantyna występuje natomiast w ziarnach kukurydzy (*Zea mays*). W *Capsicum sp.* znaleźć można: kapsantynę, kapsorubinę i kryptokapsynę, które są odpowiedzialne za różnorodność barw w tym rodzaju (Kopsell et Kopsell, 2006).

Do roku 2004 poznanych zostało 750 naturalnie występujących karotenoidów, ale nadal pojawiają się doniesienia o nowych związkach należących do tej grupy, np. seco-karotenoidy wykryte w gatunku *Pittosporum tobira* z Pittosporaceae (Maoka, 2009).

#### 3.2. Znaczenie karotenoidów w fizjologii roślin

Karotenoidy to grupa barwników roślinnych odpowiedzialna za żółty, pomarańczowy i czerwony kolor wielu owoców i kwiatów. Są one rozpuszczalne w tłuszczach i występują w chromoplastach, które są zwykle pozbawione chlorofilu. Znaczne ilości karotenoidów są obecne również w zielonych częściach roślin, lecz maskowane są przez chlorofil (Stahl et Sies, 2005). Ich główne biochemiczne funkcje związane są z występującym w karotenoidach systemem sprzężonych podwójnych wiązań, który jest również odpowiedzialny za ich kolor (Britton, 1995).

Karotenoidy są barwnikami pomocniczymi w procesie fotosyntezy i z wydajnością 15-90% przenoszą pochłoniętą energię na chlorofil. Spełniają też funkcję ochronną i zabezpieczają chlorofil przed nadmierną intensywnością światła. Natomiast występująca u roślin wyższych i glonów wiolaksantyna pod wpływem naświetlania redukuje się do zeaksantyny, co zapoczątkowuje cykl ksantofilowy, który utrzymuje w chloroplastach równowagę między stężeniem ATP i  $\text{NADPH}_2^+$  (Kączkowski, 1992).

### 3.3. Karotenoidy stosowane w przemyśle

Karotenoidy stosowane jako barwniki żywności mają oznaczenie E-160, a ich roczna produkcja została oszacowana na 100 mln ton (Wissgott et Bortlik, 1996). W przemyśle znalazły zastosowanie następujące związki:

- $\beta$ -karoten (E-160a) - pomarańczowo-żółty barwnik rozpuszczalny w tłuszczach, większość  $\beta$ -karotenu pozyskuje się z glonów (Chattopadhyay et al., 2008);
- annatto (E-160b) - barwnik żółty do pomarańczowego, kolor pochodzi od karotenoidów: biksyny i norbiksyny, otrzymywane z zewnętrznej warstwy ziaren tropikalnego drzewa *Bixa orellana*. Kolor zależy od pH. Dostępne są formy annatto rozpuszczalne w wodzie oraz w tłuszczach (Gloria et al., 1995), wykorzystywane przez ponad dwa stulecia jako barwnik żywności, zwłaszcza do barwienia sera (Haila et al., 1996);
- likopen (E-160d) - czerwony barwnik występujący w m.in. w pomidorach, arbuzie, czerwonym grapefrucie, nie ma go na liście dodatków do żywności w USA (Wissgott et Bortlik, 1996). Jest stabilny w szerokim zakresie temperatury oraz pH (Chattopadhyay et al., 2008);
- luteina (E-161b) - ksantofilowy barwnik żółty;
- kantaksantan (E-161g) - produkowany z alg *Haematococcus lacustris*, barwnik stosowany w kosmetykach i żywności, w szczególności w produktach mlecznych (sery), cukierniczych, rybach i produktach mięsnych, produktach owocowych, napojach, piwie i winie. Jest bardziej stabilny niż  $\beta$ -karoten (Miller et al., 1996).

### 3.4. Właściwości biologiczne karotenoidów

Nie wszystkie związki karotenoidowe są prekursorami witaminy A. Główne prowitaminy A w diecie to:  $\beta$ -karoten, jak również  $\beta$ -kryptoksantina oraz  $\alpha$ -karoten. Odpowiednie ich spożycie może zapobiec niedoborowi witaminy A i powikłaniom z nim związanym (Stahl et Sies, 2005). Karoteny, aby mogły stać się aktywne, muszą zostać konwertowane do retinolu. Niemal połowa absorbowanych karotenoidów ulega tej konwersji, a tylko 15% z nich jest wykorzystywane przez organizm człowieka (Gertig et Przystawski, 2007).

Witamina A przyczynia się do regeneracji tkanek, zapobiega zwyrodnieniu nabłonka wyścielającego błony śluzowe przewodu pokarmowego oraz gruczołów łzowych i ślinianek, a także dróg moczowych, przez co zapobiega powstawaniu złogów piasku i kamieni. Retinol stabilizuje grupy sulfhydrylowe białek, dzięki czemu przyczynia się do zmniejszenia ztuszczania nabłonka dróg oddechowych i powstawania zakażeń. Witamina A wywiera też ochronną rolę na siatkówkę oka, zapobiega wysychaniu (kseroftalmii) i rozmiękczeniu (kseromalacji) rogówki. Bierze udział w odnawianiu rodopsyny występującej w pręcikach i jodopsyny występującej w czopkach siatkówki oka (Gertig et Przystawski, 2007).

Karotenoidy są pigmentami, które odgrywają ważną rolę w ochronie roślin przed działaniem fotooksydacyjnym. Są efektywnymi antyoksydantami i uczestniczą w wymiataniu tlenu singletowego oraz rodników nadtlenkowych. W organizmie człowieka karotenoidy jako przeciwutleniacze również są częścią systemu obrony przed wolnymi rodnikami. Mogą oddziaływać synergistycznie z innymi antyoksydantami. Najbardziej skuteczne są mieszanki karoteno-

idów. Aktywność antyoksydacyjna karotenoidów wynika z ich struktury chemicznej i związana jest z obecnością wiązań podwójnych, a najbardziej wydajny jest otwarty pierścień karotenoidowy likopenu (Stahl et Sies, 2003).

W zastosowaniach klinicznych,  $\beta$ -karoten poprawia efekty wtórne związane z fotowrażliwym, dziedzicznym zaburzeniem - protoporfią erytropoetyczną (Mathews-Roth, 1993). Sugeruje się, że karotenoidy przechwytyują sekwencję reakcji, które prowadzą do powstawania singletowego tlenu uważanego za czynnik szkodliwy odpowiedzialny za zmiany skórne obserwowane w tej chorobie.

Wśród różnych rodników, które powstają w ludzkim organizmie, karotenoidy najbardziej efektywnie reagują z rodnikami nadtlenkowymi. Są one generowane w procesie peroksydacji lipidów i prowadzą do uszkodzenia kompartmentów lipofilowych. Karotenoidy ze względu na lipofilność i ich szczególne właściwości wymiatania rodników nadtlenkowych odgrywają ważną rolę w ochronie lipoprotein błony komórkowej przed oksydacyjnymi uszkodzeniami (Sies et Stahl, 1995).

Karotenoidy mają ochronny wpływ na oczy nie tylko ze względu na to, że są prekursorami witaminy A. Przeciwdziałają również takim chorobom oczu związanym z wiekiem, jak zaćma i zwyrodnienie plamki żółtej. W badaniach *in vitro* na ludzkich komórkach nabłonka soczewki wykazano, że dodanie likopenu do kultur komórek zapobiega ich wakuolizacji (Mohanty et al., 2002). Natomiast na plamkę żółtą oka, działanie ochronne wywierają luteina i zeaksantyna, które są w niej gromadzone i zapobiegają jej fotooksydacyjnym uszkodzeniom ze względu na ich antyoksydacyjne właściwości (Fraser et Bramley, 2004). Oprócz aktywności przeciwutleniającej, luteina i zeaksantyna odpowiedzialne są za filtrowanie światła niebieskiego o wysokiej energii. Szacuje się, że zmniejszenie niebieskiego światła docierającego do plamki żółtej (zazwyczaj o 40%) może istotnie zmniejszyć stres oksydacyjny w siatkówce (Krinsky et al., 2003).

Suplementy  $\beta$ -karotenu są powszechnie stosowane jako doustne środki chroniące skórę przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych. Ochronny wpływ związany jest z właściwościami przeciwutleniającymi karotenoidów oraz wymiataniem wolnych rodników, które uszkadzają lipidy, białka i DNA oraz są odpowiedzialne za tworzenie rumienia, przedwczesne starzenie się skóry, rozwój fotodermatoz i raka skóry (Stahl et Sies, 2005).

Wstępne wyniki badań, opublikowane przez Palombo et al. (2006) wykazały, że obecność luteiny i zeaksantyny pomaga w utrzymaniu zdrowia i prawidłowych funkcji skóry. Podanie ksantofili zmniejsza peroksydację lipidów, zwiększa sprężystość skóry i jej hydratację oraz korzystnie wpływa na powierzchniową warstwę lipidową skóry.

Prowadzono również badania, które wykazały korzystny wpływ karotenoidów w prewencji nowotworów ze względu na ich antyoksydacyjne właściwości. Na przykład likopen gromadząc się w tkance prostaty zmniejsza ryzyko powstawania raka tego gruczołu. Inne mechanizmy działania likopenu to: indukcja apoptozy, wpływ antyproliferyacyjny na komórki nowotworowe, zwalczanie ognisk przerzutowych oraz pobudzanie syntezy enzymów cytoprotekcyjnych (van Breemen et Pajkovic, 2008).

### 3.5. Karotenoidy wytwarzane w kulturze *in vitro*

Kultury tkankowe *in vitro* wydają się być dobrym źródłem karotenoidów i innych związków barwnych. Jedną z roślin, którą wykorzystuje się do produkcji karotenoidów w kulturach tkankowych, jest szafran (*Crocus sativus* L.). Krocetyna wytwarzana przez *Crocus sativus* jest szeroko stosowana jako żółty barwnik żywności. Komercyjna produkcja tego pigmentu jest ograniczona przez jego wysoką cenę i małą dostępność surowca. Szafran rośnie powoli i rozmnaża się tylko wegetatywnie. Aby uzyskać 1 kg szafranu potrzebne jest 150 000 - 200 000 kwiatów i ponad 400 godzin ręcznej pracy. Roślinne tkanki w kulturach *in vitro* mogą stanowić obiecujące źródło do pozyskiwania krocyny (Chen et al., 2003b). W Tabelach 1 i 2 zestawiono gatunki, rodzaj kultur *in vitro* oraz czynniki wpływające na wytwarzanie karotenoidów w kulturach *in vitro*.

## 4. Betalainy

### 4.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna betalain

Betalainy należą do klasy azotowych barwników roślinnych rozpuszczalnych w wodzie. Występują w soku komórkowym. Wykryto je w większości rodzin rzędu Caryophyllales: Achatocarpaceae, Aizoaceae, Amaranthaceae,

Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Halophytaceae, Hectorellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae i Stegnospermataceae. Tylko dwie rodziny należące do tego rzędu nie produkują betalain: Caryophyllaceae i Molluginaceae, wytwarzają one natomiast antocyjaniny (Mabry, 2001). Betalainy znaleziono również w niektórych gatunkach grzybów z rodzaju *Amanita* i *Hygrocybe* (Zrýd et Christinet, 2004 c.f.; Georgiev et al., 2008).

Obecność w roślinach betalain wyklucza występowanie antocyjanin i odwrotnie, co stanowi bardzo ważną cechę i ma duże znaczenie w taksonomii roślin (Kączkowski, 1993). Najprawdopodobniej rośliny te nie posiadają enzymu - syntetazy antocyjaninowej, która uczestniczy w ostatnim etapie syntezy flawonoidów (Grotewold, 2006).

Betalainy (Ryc. 3) to grupa związków wywodząca się z tyrozyny. Podstawowe składniki ich struktury to kwasy 5,6-dihydroksydihydroindolo-2-karboksylowy i pirydynodikarboksylowy, zwany kwasem betalaminowym. Obie składowe powstają z dwóch cząsteczek 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), z tym, że jedna cząsteczka przekształca się w układ indolowy, a druga w układ pirydynowy. Produktem tej transformacji jest kwas betalaminowy (Kączkowski, 1993). Kwas betalaminowy jest substratem pośrednim w tworzeniu wszystkich betalain.

Tabela 1. Związki barwne z grupy karotenoidów wytwarzane w kulturach *in vitro*.

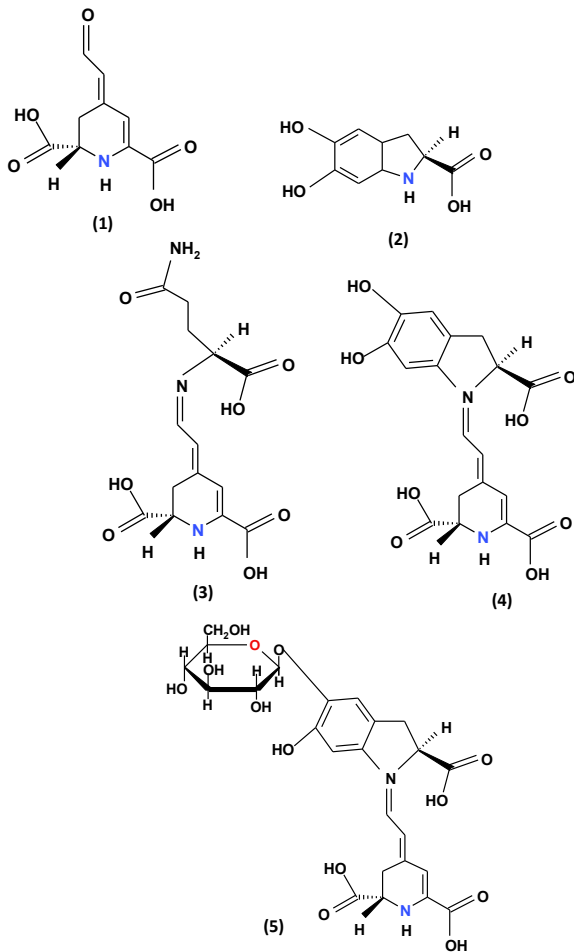
Gatunek	Kultura <i>in vitro</i>	Barwnik	Piśmiennictwo
<i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek	$\beta$ -karoten	Hanchinal et al. (2008)
<i>Crocus sativus</i>	kalus	krocetyna krocyna	Sujata et al. (1990)
<i>Crocus sativus</i>	kalus	krocyna	Chen et al. (2003b)
<i>Crocus sativus</i>	zawiesina komórek	krocetyna	Dufresne et al. (1999)
<i>Crocus sativus</i>	zawiesina komórek	krocetyna	Côté et al. (2001)
<i>Gardenia jasminoides</i>	kalus	krocyna krocetyna	Al-Juboory et al. (1995)
<i>Lycopersicum esculentum</i>	zawiesina komórek	karotenoidy	Fosket et Radin (1983)

Tabela 2. Czynniki wpływające na wytwarzanie karotenoidów w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
jony $Le^{3+}$	+	Chen et al. (2004)
jony $Nd^{3+}$	+	
jony $Ce^{3+}$	+	
pożywka B5	+	Chen et al. (2003b)
światło	-	
kwas indolilo-3-octowy (IAA)	+	
6-benzyloadenina (BA)	+	
temperatura 22°C	+	
hydrolizat kazeiny	+	
kwas $\alpha$ -naftylooctowy (NAA)	+	
pożywka B5	+	Hanchinal et al. (2008)
kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)	+	
kinetyna	+	

(+) wzmacnia; (-) hamuje - wytwarzanie karotenoidów

Konwersja tyrozyny do DOPA jest prowadzona przez tyrozynazę typu fenolooksydazy (Steiner et al. 1999; Strack et al. 2003). Jest to enzym zawierający miedź, katalizujący dwa typy reakcji. Poza uczestniczeniem w tworzeniu się rdzenia kwasu betalaminowego, tyrozynaza ta bierze również udział w utlenieniu DOPA do dopachinu, przyczyniając się do biosyntezy cyklo-DOPA, która kondensuje z kwasem betalaminowym z wytworzeniem betanidyny - jednego z najważniejszych aglikonów betalain (Mabry, 2001). W wyniku kondensacji kwasu betalaminowego z układem indolowym pochodzącym od dihydroksyfenyloalaniny powstają betacyjaniny - związki o barwach od czerwonych po fioletowe, występujące między innymi w czerwonym buraku czy w kwiatach rodzaju *Portulaca*. Natomiast w reakcji kwasu betalaminowego z różnymi aminokwasami, np. serotoniną, waliną, leucyną, izoleucyną, fenyloalaniną lub ich pochodnymi, np. 3-metoksytyraminą powstają żółto-pomarańczowe betaksantyny. Do tej pory nie zidentyfikowano żadnego enzymu, który byłby odpowiedzialny za te etapy biosyntezy betalain, co pozwala przypuszczać, że przebiegają one spontanicznie (Strack et al., 2003). Nie wyjaśniono, w jaki sposób kondensacja kwasu betalaminowego z różnymi pochodnymi zawsze i konsekwentnie prowadzi do uzyskania takich samych związków z tej samej rośliny (Grotewold, 2006).



Ryc. 3. (1) kwas betalaminowy, (2) cyklo-DOPA, (3) vulgaksantyna-I (najważniejszy żółty barwnik w rodzaju *Beta*), (4) betanidyna, (5) betanina (najważniejszy czerwony barwnik w rodzaju *Beta*) (Georgiev et al., 2008).

#### 4.2. Znaczenie, zastosowanie, właściwości farmakologiczne betalain

Betalainy były szeroko stosowane jako naturalne barwniki żywności od wielu stuleci. Ale ze względu na ich wysokie antyoksydacyjne działanie i wymiatanie wolnych rodników dopiero od niedawna zyskały na atrakcyjności jako związki do barwienia środków spożywczych, leków, kosmetyków (Georgiev et al., 2008).

Naturalne czerwone barwniki roślinne coraz częściej stosowane są jako substytuty syntetycznych barwników zarówno żywności, jak i w przemyśle farmaceutycznym.

W większości krajów stosowanie dodatków do żywności, w tym barwników, objęte jest ścisłymi rozporządzeniami. Ustawodawstwo określa barwnik, który może być używany, jego źródła, czystość oraz na jakim etapie produkcji może być dodany do konkretnego produktu. Burak jest jedynym dopuszczonym źródłem betalain, zatwierdzonych dodatków stosowanych w żywności w Stanach Zjednoczonych (Kodeks Przepisów Federalnych - Code of Federal Regulations, 21 CFR 73, 40) oraz w Unii Europejskiej (E-162) (Castellar et al., 2003).

Wszystkie betalainy są rozpuszczalne w wodzie i są trwałe w zakresie pH od 3,5 do 7,0, obejmującym prawie wszystkie produkty żywnościowe (Moreno et al., 2008). Betanina jest wrażliwa na światło i podwyższoną temperaturę, przez co można ją stosować wyłącznie w żywności świeżej, w produktach pakowanych w modyfikowanej atmosferze lub produktach, które nie są poddawane obróbce termicznej.

Działanie farmakologiczne betalain związane jest głównie z ich aktywnością antyoksydacyjną. Natomiast istnieje bardzo mało doniesień o innych rodzajach aktywności biologicznej betalain, niezwiązanych z ich działaniem przeciwrodnikowym. Tylko w jednej pracy opisano antymalaryczne działanie *Amaranthus spinosus* i *Boerhaavia erecta*. Działanie to było związane z obecnością betacyjanin, które posiadają zdolność do chelatowania kationów  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  niezbędnych na różnych poziomach syntezy w komórkach *Plasmodium berghei*, np. jonów  $Fe^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , które u *Plasmodium* są kofaktorami enzymu reduktazy rybonukleinowej (Hilou et al., 2006). Wykazano również hepatoprotekcyjne działanie betalain oraz flawonoidów pochodzących z owoców *Opuntia ficus-indica* (Galati et al., 2005).

#### 4.3. Betalainy wytwarzane w kulturze *in vitro*

Roślinne kultury komórkowe i tkankowe stanowią alternatywne źródło bioaktywnych substancji roślinnych, w tym pigmentów betalainowych (Rao et Ravishankar, 2002; Vanisree et al., 2004). Próby syntezy chemicznej betalain nie są obiecujące, ponieważ wiele etapów przebiega z niską wydajnością (Gandía-Herrero et al., 2006). Ponadto hodowla *in vitro*, w porównaniu z konwencjonalną uprawą roślin, umożliwia utrzymanie aseptycznych i kontrolowanych warunków, niezależnych od warunków klimatycznych oraz właściwości gleby (Vanisree et al., 2004). W Tabeli 3 przedstawiono gatunki i informacje dotyczące wytwarzania związków barwnych z grupy betalain w kulturach *in vitro* ze wskazaniem gatunków, a w Tabeli 4 czynniki wpływające na wytwarzanie betalain w kulturach *in vitro*.

Tabela 3. Związki barwne z grupy betalain wytwarzane w kulturach *in vitro* (c.f. Georgiev et al., 2008).

Gatunek	Rodzaj kultury <i>in vitro</i>	Barwnik	Piśmiennictwo
<i>Beta vulgaris</i> var. Boltardy	korzenie transformowane	betacyjaniny betaksantyny	Hamill et al. (1986)
<i>Beta vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	korzenie transformowane	betanina, wulgaksantyna-I	Taya et al. (1992)
<i>Beta vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	korzenie transformowane	betalainy	Weathers et Zobel (1992)
<i>Beta vulgaris</i> var. lutea	korzenie transformowane	portulaksantyna-II wulgaksantyna-I	Hempel et Böhm (1997)
<i>Beta vulgaris</i> var. Mahyco Red	korzenie transformowane	betalainy	Mukundan et al. (1998)
<i>Beta vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	korzenie transformowane	betacyjaniny	Shin et al. (2002)
<i>Beta vulgaris</i> var. Ruby Queen	korzenie transformowane	betalainy	Thimmaraju et al. (2003)
<i>Beta vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	korzenie transformowane	betacyjaniny betaksantyny	Pavlov et al. (2003)
<i>Beta vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	tkanka kalusowa: fenotyp żółty fenotyp pomarańczowy fenotyp czerwony fenotyp fioletowy	wulgaksantyna-II, miraksantyna-V wulgaksantyna-II, miraksantyna-V betanina, izobetanina betanina, izobetanina	Girod et Zryd (1991)
<i>Gomphrena marocephala</i> St.-Hil.	tkanka kalusowa	betalainy	Vieira et al. (1995)
<i>Mammillaria candida</i>	tkanka kalusowa	modyfikowane betaksantyny	Santos-Díaz et al. (2005)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	tkanka kalusowa	betalainy	Kishima et al. (1995)
<i>Chenopodium rubrum</i> L.	zawiesina komórek	betacyjaniny 80% amarantyna	Berlin et al. (1986)
<i>Chenopodium album</i> L.	zawiesina komórek	betacyjaniny	Rudat et Göring (1995)
<i>Beta vulgaris</i>	zawiesina komórek	betanina, iamprantyna-II	Bokern et al. (1991)
<i>Beta vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	zawiesina komórek fenotyp pomarańczowy fenotyp fioletowy	wulgaksantyna-I betanina	Leathers et al. (1992)
<i>Beta vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	zawiesina komórek	betalainy	Khlebnikov et al. (1995)
<i>Beta vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	zawiesina komórek	betalainy	Rodríguez-Monroy et al. (1994)
<i>Beta vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	zawiesina komórek	betacyjaniny	Akita et al. (2000)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	zawiesina komórek	betacyjaniny	Bhuiyan et Adachi (2003)
<i>Phytolacca americana</i> L.	zawiesina komórek	betanidyna iamprantyna-II	Schliemann et al. (1996)
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	zawiesina komórek	betaksantyny	Böhm et al., 1991
<i>Phytolacca americana</i> L.	zawiesina komórek	betacyjaniny	Sakuta et al. (1991)



Tabela 4. Czynniki wpływające na wytwarzanie betalain w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
jony $\text{Co}^{2+}$ jony $\text{Mo}^{2+}$ jony $\text{Fe}^{2+}$ jony $\text{Cu}^{2+}$	+	Trejo-Tapia et al. (2001)
jony $\text{Ca}^{2+}$	+	Savitha et al. (2006)
sacharoza maltoza, glukoza	+ -	Bhagyalakshmi et al. (2004)
jony $\text{NH}_4^+$	+	Shin et al. (2003)
kwas 2,4-dichloro- fenoksyoctowy	+	Sakuta et al. (1991)
cytokininy	-	Santos-Díaz et al. (2005)
światło	+	Wohlpert et Black (1973) c.f. Georgiev et al. (2008)
jasmonian metylu $\beta$ -glukan	+ +	Bhuiyan et Adachi (2003)
tyrozyna	+	Grajek (2001)

(+) wzmacnia; (-) hamuje wytwarzanie betalain.

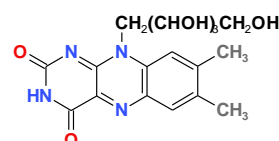
## 5. Ryboflawina

Ryboflawina (witamina  $\text{B}_2$ , laktoflawina; Ryc. 4) jest szeroko rozpowszechniona w świecie roślinnym. Jest to pochodna izoalloksazyny połączona z rybitolem, pięciowodortlenowym alkoholem, wiązaniem N-glikozydowym. Zaliczana jest do grupy flawin i często towarzyszy witaminie  $\text{B}_1$ . Więcej ryboflawiny niż witaminy  $\text{B}_1$  znajduje się w zielonych częściach roślin, a dość duże ilości tego związku występują w pyłkach roślinnych. Jedno z najbogatszych źródeł ryboflawiny stanowią znamiona szafranu (*Crocii stigma*). Witamina  $\text{B}_2$  wchodzi w skład dwóch koenzymów biorących udział w przemianach węglowodanów: mononukleotydu flawinowego (FMN) oraz dinukleotydu adeninoflawinowego (FAD) (Kohlmünzer, 2007).

Ryboflawina spełnia wiele ważnych funkcji w organizmie człowieka. Bierze udział w procesach oksydoredukcyjnych, ponieważ wchodzi w skład flawoprotein (enzymów flawinowych), które jako grupę prostetyczną zawierają FMN lub FAD. Jest również niezbędna w przemianach witamin z grupy  $\text{B}_6$  oraz kwasu foliowego do form koenzymatycznych, jak również do syntezy niacyny z tryptofanu. Ryboflawina pełni też rolę ochronną narządu wzroku: wpływa na przejrzystość tkanki oka, zapobiega powstawaniu zaćmy i uwrażliwia wzrok na odbiór fal krótkich. Niedobory tej witaminy mogą objawiać się wieloma zmianami chorobowymi, które nie zawsze są swoiste, np.: przekrwienie, łuszczenie i pęknięcie warg, zmiany zapalne na języku, pojawienie się trądziku, swędzenie i ogniska zapalne na skórze, pieczenie i uczucie piasku pod powiekami, światłowstręt, łzawienie oczu, szorstkość powiek. Natomiast ze strony układu nerwowego mogą wystąpić: parestezje, szczególnie nóg, osłabienie, zawroty głowy, odczuplaş. Niedobór ryboflawiny może też prowadzić do licznych zaburzeń procesów metabolicznych, sprzyja także powstawaniu

niedokrwistości normocytarnej, charakteryzującej się ograniczeniem tworzenia erytrocytów w szpiku kostnym oraz spadkiem zdolności erytrocytów do pobierania żelaza (Gertig et Przystawski, 2007).

Ryboflawina ma wiele zastosowań jako żółty barwnik żywności. Jej stosowanie dozwolone jest w większości krajów, dodawana jest do dressingów, sorbetów, napojów, lodów, tabletek oraz innych produktów. Ryboflawina ma szczególne powinowactwo do produktów zbożowych, ale jej stosowanie w tej grupie produktów jest dość ograniczone ze względu na jej zapach i naturalnie gorzki smak (Chattopadhyay et al., 2008). Jako barwnik żywności ryboflawina ma oznaczenie E-101 (Gertig et Duda, 2004).



Ryc. 4. Ryboflawina: 7,8-dimetylo-10-(D-1-rybitylo)-izoalloksazyna.

## 6. Flawonoidy

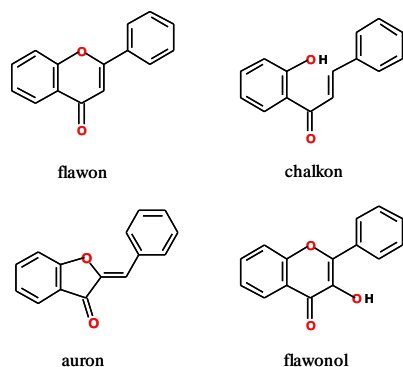
### 6.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna flawonoidów

Flawonoidy to grupa związków charakterystyczna dla roślin kwiatowych. Najczęściej flawonoidy występują jako rozpuszczone w soku komórkowym żółte barwniki kwiatów i liści, rzadziej owoców, kory, drewna, jeszcze rzadziej nasion. Mogą również krystalizować w komórkach epidermy, np. występująca w owocni pomarańczy hesperydyna czy pochodne akacetyny znajdujące się we włoskach okrywających dziewanny (*Verbascum*). Do rodzin botanicznych, obfitych we flawonoidy zaliczmy: Apiaceae, Asteraceae, Betulaceae, Brassicaceae, Ericaceae, Fabaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Polygonaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae (Kohlmünzer, 2007). U dwuliściennych (Dicotyledones), flawonoidy są bardzo często jedynymi metabolitami, dzięki którym dany surowiec roślinny wykazuje działanie farmakologiczne. Z roślin wyekstrahowano i zidentyfikowano ponad 5000 flawonoidów (Arct et Pytkowska, 2008).

Podstawowy szkielet flawonoidów zbudowany jest z 15 atomów węgla, a ich strukturę można w skrócie opisać jako  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$  (Ryc. 5). Tworzą ją, pochodzący od aktywnego octanu pierścien benzenowy A oraz układ fenylopropanu  $\text{C}_6\text{-C}_3$  (pierścien B) i trójwęglowy mostek powstałe w szlaku kwasu szikimowego. Najczęściej między pierścieniami fenyłowymi A i B tworzy się układ  $\gamma$ -pironu (heterocykliczny układ z atomem tlenu), dlatego też flawonoidy mogą uchodzić za pochodne chromonu, czyli benzo- $\gamma$ -pironu (Kohlmünzer, 2007). Tą szeroko rozbudowaną grupę związków, w zależności od stopnia utlenienia układu heterocyklicznego oraz liczby i umiejscowienia grup hydroksylowych przy pierścieniach dzieli się zwykle na 11 klas. Związki barwne występują w następujących klasach: chalcony (barwniki jasnożółte), aurony (barwniki intensywnie żółte), flawony (jasnożółte i kremowe barwniki kwiatów) oraz flawonole (barwniki intensywnie żółte). Również w



obrębie poszczególnych klas obserwuje się szeroką różnorodność polegającą na różnej ilości i lokalizacji grup hydroksylowych, obecnością grup metylowych oraz podstawieniu grup glikozylowych w różnych pozycjach. Grupy metylowe częściej występują w pierścieniu B niż w A w pozycjach C-3, C-7, C-3', rzadziej C-4' oraz C-5'. Flawony i flawonole występują w postaci glikozydów. Najczęściej spotyka się glikozydy zawierające do trzech reszt cukrowych. Najbardziej pospolitymi cukrami wchodzącymi w skład cząsteczki glikozydu są: glukoza, arabinoza, galaktoza, ramnoza oraz ksyloza (Kączkowski, 1993).



Ryc. 5. Podstawowe struktury barwnych flawonoidów.

Prekursorem wszystkich flawonoidów jest chalkon. Związek ten powstaje w wyniku kondensacji jednej cząsteczki 4-kumarylo-CoA (wywodzącej się z fenyloalaniny produkowanej w szlaku kwasu szikimowego) oraz trzech cząsteczek malonylo-CoA. Reakcja ta katalizowana jest przez syntazę chalkonową. Kolejnym enzymem uczestniczącym w przemianach flawonoidów jest izomeraza chalkonowa, która prowadzi do powstania flawanonów. Następną grupą związków, która powstaje na szlaku biosyntezy flawonoidów to flawony, a reakcję ich powstawania katalizuje oksydaza flawanonowa (Lindsay, 2002). Substratem dla tego enzymu może być naryngenina (utleniana do apigeniny) bądź odpowiadający jej chalkon: 7,4'-dihydroksyflawanon (utleniany do 7,4'-dihydroksyflawonu). Enzym ten wymaga obecności jonów  $Fe^{2+}$  oraz współdziałania tlenu. Hydroksylacja pierścieni aromatycznych A i B przeprowadzana jest przez specyficzne hydroksylazy. Natomiast wprowadzanie grup metylowych odbywa się przy udziale S-adenozynometylioniny i katalizowane jest przez metylotransferazy. Glikozydy flawonoidowe powstają w wyniku działalności glikozylotransferaz. Flawonoidy występują w postaci C-glikozydów i O-glikozydów (Kączkowski, 1993).

Tabela 5. Przykłady związków z grupy flawonów, flawonoli, chalkonów oraz auronów najczęściej występujących w roślinach (wg Kączkowski, 1993; Kohlmünzer, 2007).

Grupa związków	Nazwa związku	Występowanie	Nazwa glikozydu
aurony	sulfuretyna	<i>Cosmos sp.</i> (kwiaty)	sulfureina
chalkony	izosalipurpuroid	<i>Helichrysum arenarium</i> (kwiatostany)	
	izolikwirytozyd	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (korzenie)	
flawony	prymetyna	<i>Primula sp.</i> (kwiaty)	
	chryzyna	<i>Populus sp.</i> <i>Passiflora incarnata</i> <i>Pinus sp.</i> (drewno) Propolis	
	apigenina	<i>Chamomilla recutita</i> <i>Anthemie nobilis</i> <i>Dalia variabilis</i>	witeksyna, 7-glukozyd
	akacetyna	<i>Robinia pseudoacacia</i> <i>Ammi visnaga</i>	
	luteolina	<i>Asteraceae</i> (kwiaty) <i>Digitalis purpurea</i> (liście)	5-glukozyd, 7-glukozyd, 7-galaktozyd, glukuronid
	diosmetyna	<i>Lamiaceae</i> <i>Scrophularia nodosa</i> <i>Petroselinum sativum</i>	diosmina, glukozyd, ksylozy
flawonole	kemferol	<i>Camelia sinensis</i> (liście) <i>Prunus spinosa</i> (kwiaty) <i>Consolida regalis</i>	astragalina, robinia, ekwizetryna, 7-ramnozyd
	kwercetyna	<i>Crataegus monogyna</i> (kwiaty) <i>Crataegus oxyacantha</i> <i>Aesculus hippocastanum</i>	kwercytryna, izokwercytryna, awikularyna, spireozyd, hiperozyd, rutozyd, ramnetyna, mirycetyna

## 6.2. Znaczenie flawonoidów w fizjologii roślin

Flawonoidy stanowią żółte barwniki roślin występujące w soku komórkowym. Biorą udział w uatrakcyjnianiu kwiatów zapylanych przez owady i ptaki. Intensyfikacji ich barwy sprzyja podstawienie pierścienia A w pozycji C-6 i C-8 grupami hydroksylowymi. Flawonoicy czasami występują obok antocyjanów i przyczyniają się do pogłębienia barwy kwiatów. Dzięki silnej absorpcji promieniowania UV, związki te mogą spełniać rolę wskaźnika nektarowania i przyczyniać się do przywabiania owadów zapylających. Można znaleźć je też w drewnie czy korze, np. izosalipurpurozyd w korze *Salix purpurea*. Flawonoidy, oprócz roli żółtych barwników, pełnią w roślinach wiele innych funkcji. Jedną z nich jest ochrona roślin przed różnymi czynnikami stresowymi, takimi jak: promieniowanie słoneczne, temperatura, a także, ze względu na zdolność wymiatania wolnych rodników, zmniejszają stres oksydacyjny. Biorą również udział w mechanizmach tolerancji wysokich stężeń metali ciężkich. Niektóre flawonoidy znoszą działanie auksyn, np. naryngenina. Wiele związków z tej grupy hamuje wzrost mikroorganizmów oraz chroni rośliny przed zakażeniem tkanek. Niektóre flawonoidy są odpowiedzialne za nieprzyjemny smak liści, dzięki czemu zabezpieczają rośliny przed zjadaniem przez zwierzęta. Inne zaś działają odstraszająco na owady, np. rutyna i 3-glukozyd kwercetyny zawarte w *Pinus banksiana*, hamują rozwój i zwiększają śmiertelność ćmy brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*). Stosunkowo słabo zbadana jest aktywność flawonoidów jako swoistych przekaźników między gatunkami, dotycząca procesów symbiotycznych i innych form kontaktu rośliny z glebą. Na przykład niskie stężenie azotu w glebie indukuje akumulację flawonoidów, które spełniają rolę atraktantów dla bakterii azotowych. Flawonoidy spełniają więc funkcję cząsteczek sygnałowych we wczesnych stadiach symbiozy między bakteriami z rodzaju *Rhizobium* a roślinami motylkowymi. Indukują również u bakterii ekspresję genów *nod* kontrolujących nodulację, czyli proces tworzenia brodawek. Stymulują też proces mikorizy, czyli zjawiska współżycia korzeni lub innych organów roślinnych z grzybami, np. formononetyna z *Trifolium repens* promuje kolonizację korzeni oraz pobudza do wzrostu komórki grzyba (Kączkowski, 1993; Gould et al., 2006).

## 6.3. Właściwości biologiczne flawonoidów

Flawonoidy stanowią różnorodną grupę nie tylko pod względem chemicznym, ale również pod względem działania farmakologicznego. Najważniejszą cechą tych związków, ze względu na ich polifenolowy charakter, jest ich antyoksydacyjne działanie, z którego wynika wiele farmakologicznych zastosowań, a przede wszystkim hamowanie rakotwórczości. Istnieje wiele raportów potwierdzających skuteczność flawonoidów w prewencji nowotworów. Działanie takie wykazują między innymi: kwercetyna (Al-Fayez et al., 2006), genisteina (Banerjee et al., 2008), 5,7-dimetoksyflawon i 5,7,4'-trimetoksyflawon (Walle et al., 2007), apigenina i trycyna (Al-Fayez et al., 2006). Oprócz wymiatania wolnych rodników, w tym tlenu singletowego, flawonoidy wywierają wpływ na wiele kluczowych mechanizmów biorących udział w patogenezie nowotworów. Kwercetyna, kemferol i apigenina hamują cytochrom P-450 podrodziny CYP1A, enzymy biorące udział w aktywacji wie-

lu kancerogenów, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy aminy heterocykliczne. Natomiast naryngenina i kwercetyna blokują enzym CYP3A4. Wykazano, że związki flawonoidowe występujące w herbacie zwiększają aktywność kilku enzymów biorących udział w detoksykacji organizmu: peroksydazy i reduktazy glutationowej oraz katalazy (Marchand, 2002). Flawonoidy charakteryzują się też zdolnością chelatowania jonów metali, szczególnie  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , co wpływa na wiele procesów oksydacyjnych w organizmie, w tym reakcje związane ze stresem oksydacyjnym. Związki te hamują utlenianie lipoprotein o małej gęstości i zapobiegają uszkodzeniom DNA oraz starzeniu się skóry (Arct et al., 2008).

Kolejnym działaniem niektórych flawonoidów jest hamowanie enzymów biorących udział w przemianach kwasu arachidonowego: cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2) oraz lipooksygenazy 5 i 12 (LOX-5 i LOX-12). Dzięki temu wykazują one działanie przeciwzapalne (Chi et al., 2001). Flawonoidy są też inhibitorami takich enzymów jak: tyreoperoksydaza, dejodynaza wątrobowa (Ferreira et al., 2002a), hialuronidaza (Kuppusamy et al., 1990), enzym konwertujący angiotensynę ACE oraz adenozyndeaminazy (Kohlmünzer, 2007).

Niektóre związki z tej grupy działają na naczynia krwionośne zwiększając ich drożność oraz uszczelniając i wzmacniając ich ściany. W związku z tym stosowane są jako środki zapobiegające żylakom, krwawieniom, wybroczynom, jak również w miażdżycy (Kohlmünzer, 2007). Już w 1936 roku wykazano korzystny wpływ flawonoidów wyizolowanych z soku cytrynowego na leczenie niektórych chorób układu krwionośnego związanych ze zmniejszonym oporem naczyniowym. Działanie takie wykazuje także O-( $\beta$ -hydroksyetylo)-rutozyd (Di Carlo et al., 1999), katechina, epikatechina i hesperydyna (Arct et al., 2008). Podstawowe mechanizmy ochronnego wpływu flawonoidów na układ krwionośny to: promocja powstawania NO w endotelium naczyń (działanie spazmolityczne na mięśnie gładkie naczyń), hamowanie syntezy tromboksanu w płytkach krwi i leukotrienów w neutrofilach, stymulowanie produkcji lipoprotein, zabezpieczenie witaminy C przed rozkładem, hamowanie działalności metaloprotein rozkładających elastynę i kolagen oraz zapobieganie utlenianiu adrenaliny (Arct et al., 2008; Di Carlo et al., 1999).

Flawonolignany występujące w *Sylibum marianum* mają działanie chroniące wątrobę, natomiast związki flawonoidowe z *Sophora subprostrata* zapobiegają wrzodom żołądka. Naryngenina i kwercetyna również wykazują taką aktywność. Kwercetyna oraz inne flawony i flawanony hamują wzrost *Helicobacter pylori* (Di Carlo et al., 1999). Flawonoidy wykazują również działanie przeciwko innym mikroorganizmom. Należą do nielicznej grupy związków, które wybiórczo hamują proliferację takich wirusów jak wirus opryszczki *Herpes simplex* oraz wirus Polio (Arct et al., 2008).

Niektóre flawonoidy charakteryzują się też właściwościami przeciwalergicznymi. Astragalina, fisetyna, kemferol, myricetyna, kwercetyna i rutyna wpływają na komórki mastocytów i hamują wytwarzanie mediatorów stanu zapalnego: histaminy oraz prozapalnych cytokin: TNF- $\alpha$ , interleukiny 1 $\beta$ , 6 i 8 (Park et al., 2008). Verbeek et al.

(2004) wykazali, że flawony (luteolina, apigenina) występujące w roślinach hamują potencjalnie patogenne funkcje limfocytów T, które ujawniają się w chorobach autoimmunizacyjnych.

Ciekawymi właściwościami odznaczają się bezbarwne izo-flawony, w tym genisteina, która ma silne estrogenne działanie. Właściwości te związane są z obecnością grupy hydroksylowej w pozycji 5 szkieletu fenylo-3-chromonu (Kohlünzer, 2007).

#### 6.4. Flawonoidy wytwarzane w kulturze *in vitro*

W ostatnich latach prowadzono badania dotyczące wytwarzania flawonoidów w roślinnych kulturach komórkowych ze względu na ich różnorodne zastosowanie oraz

wartość komercyjną. Uważa się, że synteza metabolitów wtórnych, również flawonoidów, przez rośliny jest ich odpowiedzią na stres pochodzący ze środowiska, w którym żyją. Podobnie wytwarzanie wtórnych metabolitów przez rośliny, ich komórki bądź organy hodowane *in vitro* związane jest z odpowiedzią na stres wywołany czynnikami biotycznymi lub abiotycznymi. Czynniki te mogą wywoływać zmiany w metabolizmie, wpływające na zwiększenie biosyntezy wtórnych metabolitów w kulturach roślinnych. W Tabeli 6 przedstawiono przykłady związków flawonoidowych wytwarzanych w kulturach *in vitro* ze wskazaniem gatunków, a w Tabeli 7 wymieniono czynniki wpływające na ich otrzymywanie tą metodą.

Tabela 6. Przykłady związków flawonoidowych wytwarzanych w kulturach *in vitro*.

Gatunek	Kultura <i>in vitro</i>	Barwnik	Piśmiennictwo
<i>Artemisia judaica</i>	pędy	flawonoidy	Liu et al. (2004)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	korzenie transformowane	flawonoidy izoprenylo-	Asada et al. (1998)
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	kalus	flawonoidy	Ayabe et al. (1986) c.f. Mulabagal et Tsay (2004)
<i>Hypericum perforatum</i>	kalus	pochodne luteoliny	Dias et al. (1998)
<i>Iris esnata</i>	kalus	żółte i czerwone związki flawonoidowe	Boltenkov et al. (2004)
<i>Iris ensata</i>	kalus	związki flawonowe	Boltenkov et al. (2005)
<i>Polygonum hydropiper</i>	zawiesina komórkowa	flawonole	Nakao et al. (1999)
<i>Saussurea involucreta</i>	korzenie transformowane	apigenina	Li et al. (2006)
<i>Saussurea medusa</i>	kalus	flawonoidy	Yuan et al. (2002) Guo et al. (2007)
<i>Scutelallaria baicalensis</i>	korzenie transformowane	związki flawonowe	Zhou et al. (1997) Nishikawa et al. (1999)
<i>Scutelallaria baicalensis</i>	korzenie transformowane	flawony: wogonina baikaleina	Kuzovkina et al. (2001)
<i>Stevia rebaudiana</i>	kalus	flawonoidy	Tadhani et al. (2007)
<i>Crataegus monogyna</i>	zawiesina komórkowa czerwony i żółty fenotyp	związki flawonoidowe	Froehlicher et al. (2009)
<i>Ginkgo biloba</i>	kalus	flawonoidy	Hao et al. (2009)
<i>Hemidesmus indicus</i>	kalus pędy	lupeol rutyna, wanillina	Misra et al. (2005)
<i>Passiflora quadrangularis</i>	kalus	C-glikozydy apigeniny, luteoliny i inne	Antognoni et al. (2007)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	korzenie transformowane	flawanole	Trotin et al. (1993) c.f. Giri et Narasu (2000)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	korzenie transformowane	rutyna	Lee et al. (2007)
<i>Cephalocereus senilis</i>	zawiesina komórkowa	flawonoidy	Liu et al. (1993) c.f. Matkowski (2008)
<i>Medicago truncatula</i>	zawiesina komórkowa	flawonoidy	Farag et al. (2007)
<i>Citrus</i> sp.	kalus	naringenina limonina	Barthe et al. (1987) c.f. Mulabagal et Tsay (2004)
<i>Daucus carota</i>	korzenie transformowane	flawonoidy	Bel-Rhlid et al. (1993) c.f. Giri et Narasu (2000)

Tabela 7. Czynniki wpływające na wytwarzanie flawonoidów w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
chityna	+	Liu et al. (1993) c.f. Matkowski (2008)
kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)	+	Boltenkov et al. (2004)
6-aminobenzylpuryna (6-BAP)	+	
kinetyna	+	
kwas $\alpha$ -naftylooctowy (NAA)	-	
kwas indolilo-3-octowy (IAA)	-	
jasmonian metylu	+	Antognoni et al. (2007)
światło UV-B	+	
jony $Le^{3+}$	+	Yuan et al. (2002)
jony $Nd^{3+}$	+	
jony $Ce^{3+}$	+	
jony $Ca^{2+}$	+	
		Nakao et al. (1999)

(+) wzmacnia; (-) hamuje wytwarzanie flawonoidów

## 7. Antocyjany

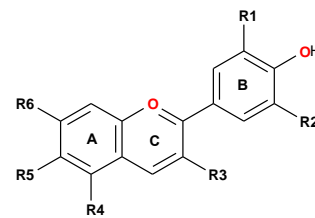
### 7.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna antocyjanów

Antocyjany (Ryc. 6), często nazywane też ze względu na swój glikozydowy charakter antocyjanozydami, stanowią grupę wielofenolowych barwników roślinnych rozpuszczalnych w wodzie. Przez niektórych autorów zaliczane są do grupy flawonoidów. Przyjmują kolor czerwony przy kwaśnym pH soku komórkowego, niebieski lub fioletowy przy alkalicznym pH, i nadają zabarwienie kwiatom, owocom, często liściom, łodygom, a także, choć rzadziej, korzeniom lub drewnu. Antocyjany są bardzo rozpowszechnioną grupą w świecie roślinnym, występują w mchach, paprotnikach, roślinach kwiatowych. Wyjątek stanowi rząd *Caryophyllales*, w którym występują betalainy. Niektóre rodziny charakteryzują się występowaniem acetylowanych antocyjanów, np. Brassicaceae, Lamiaceae, Solanaceae, Iridaceae. Natomiast w innych antocyjanidyny występują w połączeniach z kwasem cynamonowym lub fenolokwasami. Mogą również tworzyć kompleksy z metalami np.  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ , co przyczynia się do nasilenia barwy niebieskiej (Kohlmünzer, 2007).

Podstawową strukturą antocyjanów jest antocyjanidyna (część aglikonowa), składająca się z aromatycznego pierścienia A połączonego z heterocyklicznym pierścieniem C, który zawiera tlen. Pierścień C połączony jest wiązaniem węgiel-węgiel z trzecim pierścieniem aromatycznym B (Konczak et Zhang, 2004). Część cukrowa najczęściej przyłączona jest w pozycji C-3, rzadziej C-5 lub C-7 i składa się z jednej do trzech cząsteczek cukrów prostych. Zazwyczaj jest to glukoza, rzadziej galaktoza, bardzo rzadko ramnoza, ksyloza oraz arabinoza (Kohlmünzer, 2007). Istnieje ogromna różnorodność antocyjanów występujących w przyrodzie. Główne różnice pomiędzy nimi wiążą się z liczbą grup hydroksylowych, rodzajem, liczbą oraz miejscem przyłączenia do ich struktury cukrów oraz podstawników alifatycznych lub aromatycznych występujących w cząsteczkach cukrów (Kong et al., 2003). Obecnie istnieją doniesienia o ponad 500 naturalnie występujących antocyjanach i 23 antocyjanidynach (Andersen et Jordheim, 2006), z których tylko sześć jest najbardziej powszechnych w roślinach naczyniowych: pelargonidyna, peonidyna, cyjanidyna, malwidyna, petunidyna i delphinidyna (Clifford,

2000). Wzory i nazwy najczęściej występujących antocyjanidyn umieszczono w Tabeli 8.

Biosynteza antocyjanów, tak jak biosynteza flawonoidów, przebiega poprzez kwas choryzmowy i szikimowy z wytworzeniem pierścienia aromatycznego B oraz łańcucha trójwęglowego. Natomiast pierścień aromatyczny A tworzy się z jednostek  $C_3$  aktywnego malonianu. Końcowe etapy biosyntezy obejmują reakcje glikozydacji oraz metylacji lub acetylacji grup hydroksylowych (Kohlmünzer, 2007).



Ryc. 6. Podstawowa struktura antocyjanin - jon flawyliowy.

### 7.2. Znaczenie antocyjanów w fizjologii roślin

Najbardziej znaczącą funkcją antocyjanów jest ich zdolność do nadawania kolorów roślinom i organom roślinnym, w których występują. Odgrywają one istotną rolę w uatrakcyjnianiu roślin owadopylnych, ułatwiając ich zapylanie. Antocyjany i 3-deoksyantocyjanidyny mogą spełniać też inną rolę w kwitnących roślinach niż tylko rola atraktantów. Mogą one działać jako przeciwutleniacze, fitoaleksyny lub jako czynniki antybakteryjne. Antocyjany wraz z innymi flawonoidami mogą być również istotnymi czynnikami biorącymi udział w odporności roślin na atak insektów (Harborne, 1988, Kong et al., 2003).

### 7.3. Antocyjany jako barwniki stosowane w przemyśle

Antocyjany stanowią grupę barwników rozpuszczalnych w wodzie o barwie od czerwonej do niebieskiej i jako barwniki żywności mają oznaczenie E-163 (Wissgott et Bortlik, 1996). Jako źródło antocyjanów stosowany jest m.in. sok winogronowy dostępny w różnych kolorach: czerwonym, purpurowym i żółtym. Nadaje on kolor wielu produktom żywnościowym: napojom, deserom, przetworom owocowym i warzywnym oraz słodczom. Potencjalnym źródłem antocyjanów może być też roślina *Oxalis triangularis*

(Alexandra et al., 2001), jak również acetylowane antocyjany otrzymywane z różnych jadalnych warzyw, np. czarnej marchwi (Giusti et Wrolstad, 2003). Antocyjany jako barwniki żywności dodatkowo wykazują działanie chroniące produkty spożywcze przed zepsuciem, ponieważ wykazują antagonistyczną aktywność wobec niektórych bakterii, wirusów i grzybów (Bridle et Timberlake, 1997).

Poziom antocyjanin jest także wykorzystywany jako wskaźnik do oceny jakości kolorowej żywności (Boyles et Wrolstad, 1993, Chattopadhyay et al., 2008). Ponieważ niektóre owoce zawierają charakterystyczne związki antocyjanowe, dlatego też oznaczanie profilu antocyjanów jest wykorzystywane do określenia jakości dżemów owocowych (Garcia-Viguera et al., 1997) oraz wykrywania zafałszowania win (Revilla et al., 2001, Castañeda-Ovando et al., 2009).

#### 7.4. Właściwości biologiczne antocyjanów

Antocyjany wykazują także działanie farmakologiczne i są wykorzystywane w celach terapeutycznych. Podobnie jak flawonoidy, związki antocyjanowe uszczelniają naczynia włosowate, zapobiegają obrzękom i posiadają aktywność przeciwzapalną (Kong et al., 2003). Możliwe jest, że antocyjany, szczególnie wyciągi z *Vaccinium myrtillus*, mogą zastąpić rutynę i jej pochodne w leczeniu chorób związanych z zapaleniem tkanek lub pękaniem naczyń kapilarnych (Kong et al., 2003). Antocyjany poprzez polepszenie ukrwienia w obrębie tęczówki oka wpływają korzystnie na ostrość widzenia, szczególnie w złych warunkach oświetlenia. Czasami kojarzone są z karotenoidami albo flawonoidami. Szczególnie aktywne są: malwina i cyjanina (Kohlmünzer, 2007).

Istnieje wiele doniesień o antyoksydacyjnym działaniu antocyjanów, co wiąże się z ich wieloma właściwościami farmakologicznymi. Jako wymiatacze wolnych rodników zapobiegają peroksydacji lipidów oraz mają duże znaczenie w prewencji chorób nowotworowych (Kong et al., 2003). Najnowsze raporty wykazują wiele korzyści wynikających ze spożycia owoców jagodowych, ze względu na wy-

soką w nich zawartość antocyjanów, w tym zmniejszenie podatności na stres oksydacyjny i redukcję niedokrwienych uszkodzeń mózgu. Antocyjany działają ochronnie na neurony po ich uszkodzeniach wywołanych przez udar mózgu i odwracają związane z wiekiem zmiany w mózgu. Obecne badania wskazują na hamowanie proteasomu jako dodatkowy mechanizm, dzięki któremu antocyjany i ich aglikony, antocyjanidyny, mogą wywierać korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Aktywność ta może przyczynić się do ich antykancerogenego, antyoksydacyjnego, antyzapalnego i neuroprotektoryjnego działania oraz zapobiegania i leczenia chorób przewlekłych, w tym neurodegeneracyjnych (Dreiseitel et al., 2008).

Wykazano również, że antocyjany zawarte w *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* i *Ziziphus mucronata* wykazują aktywność przeciwko tworzeniu się krwinek sierpowatych i mogą mieć znaczenie w leczeniu anemii sierpowatej (Mpiana et al., 2008).

#### 7.5. Antocyjany wytwarzane w kulturze *in vitro*

Lista roślin, które wytwarzają związki antocyjanowe w kulturach *in vitro* różnych komórek, tkanek i organów zawiera około 30 gatunków (Tabela 9). Najczęściej wykorzystywanymi producentami antocyjanów są: *Daucus carota*, *Vitis vinifera*, *Perilla frutescens*, *Aralia cordata* oraz *Fragaria ananasa* (Grajek, 2001).

Większość badań wykazała korzystny wpływ światła na wytwarzanie antocyjanin w kulturach *in vitro*, istnieją jednak wyjątki. Otrzymano linie komórkowe charakteryzujące się wysoką wydajnością produkcji antocyjanin podczas prowadzenia hodowli w ciemności, np. kultury komórkowe *Aralia cordata*. Różny jest również wpływ hormonów roślinnych. Dotychczas przeprowadzone badania wykazują, że auksyny stymulują akumulację barwników antocyjanowych. Jednak w kulturach kalusowych *Oxalis linearis* produkcja antocyjanów jest promowana przez cytokininy, a hamowana przez auksyny, np. NAA i 2,4-D (Chattopadhyay et al., 2008).

Tabela 8. Naturalnie występujące antocyjanidyny (Kong et al., 2003). Położenia podstawników pokazano na Ryc. 6.

Nazwa związku	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Barwa
Apigeninidyna	H	H	H	OH	H	OH	pomarańczowa
Aurantynidyna	H	H	OH	OH	OH	OH	pomarańczowa
Kapensynidyna	OMe	OMe	OH	OMe	H	OH	niebieskavo-czerwona
Cyjanidyna	OH	H	OH	OH	H	OH	pomarańczowo-czerwona
Delfinidyna	OH	OH	OH	OH	H	OH	niebieskavo-czerwona
Europinidyna	OMe	OH	OH	OMe	H	OH	niebieskavo-czerwona
Hirsutinidyna	OMe	OMe	OH	OH	H	OMe	Niebieskavo-czerwona
6-hydroksycyjanidyna	OH	H	OH	OH	OH	OH	czerwona
Luteolinidyna	OH	H	H	OH	H	OH	pomarańczowa
Malwidyna	OMe	OMe	OH	OH	H	OH	niebieskavo-czerwona
5-metylocyjanidyna	OH	H	OH	OMe	H	OH	pomarańczowo-czerwona
Pelargonidyna	H	H	OH	OH	H	OH	pomarańczowa
Peonidyna	OMe	H	OH	OH	H	OH	pomarańczowo-czerwona
Petunidyna	OMe	OH	OH	OH	H	OH	niebieskavo-czerwona
Pulchellidyna	OH	OH	OH	OMe	H	OH	niebieskavo-czerwona
Rosinidyna	OMe	H	OH	OH	H	OMe	czerwona
Tricetinidyna	OH	OH	H	OH	H	OH	czerwona

OMe - grupa metoksyłowa -OCH<sub>3</sub>

Tabela 9. Związki barwne z grupy antocyjanin wytwarzane w kulturach *in vitro*.

Gatunek	Kultura <i>in vitro</i>	Barwnik	Piśmiennictwo
<i>Catharanthus roseus</i>	kalus	związki malwinidyny petunidyny hirsutidyny	Carew et Kueger (1976)
<i>Catharanthus roseus</i>	kultura tkankowa	j.w.	Berglund et al. (1993a)
<i>Catharanthus roseus</i>	zawiesina komórek	j.w.	Knobloch et al. (1982) Filippini et al. (2003)
<i>Crataegus monogyna</i>	zawiesina komórek czerwony fenotyp	antocyjany	Froehlicher et al. (2009)
<i>Prunus cerasus</i>	kalus	związki peonidyny cyjanidyny malwinidyny	Blando et al. (2005)
<i>Rudbeckia hirta</i>	kalus	związki cyjanidyny	Łuczkiwicz et Cisowski (2001)
<i>Ajuga reptans</i>	kalus	acetylowane zw. cyjanidyny delfinidyny	Callebaut et al. (1997)
	zawiesina komórek	j.w.	
<i>Ajuga reptans</i>	zawiesina komórek	acetylowane zw. cyjanidyny delfinidyny	Terahara et al. (2001)
<i>Ajuga pyramidalis</i>	kalus	antocyjany	Saito et Mizukami (2002)
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	zawiesina komórek	antocyjany	j.w.
<i>Malus pumila</i>	zawiesina komórek	antocyjany	j.w.
<i>Daucus carota</i>	kalus	związki cyjanidyny	Narayan et Venkataraman (2000)
<i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek	antocyjany	Narayan et al. (2005)
<i>Daucus carota</i>	kalus	antocyjany	Rajendran et al. (1992)
<i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek	antocyjanowe związki dime- rowe	Abe et al. (2008)
<i>Aralia cordata</i>	kalus	antocyjany	Sakamoto et al. (1994)
<i>Glehnia littoralis</i>	kalus	antocyjany	Kitamura et al. (2002)
<i>Hyacinthus orientalis</i>	kultura tkankowa	związki cyjanidyny pelargonidyny	Hosokawa et al. (1996)
<i>Hyoscyamus muticus</i>	kalus	antocyjany	Basu et Chand (1996)
<i>Perilla frutescens</i>	zawiesina komórek	antocyjany	Zhong et Yoshida (1995) Wang et al. (2004)
<i>Ipomoea batatas</i>	zawiesina komórek	zw. peonidyny cyjanidyny	Konczak-Islam et al. (2003)
<i>Vaccinium pahalae</i>	zawiesina komórek	antocyjany	Fang et al. (1998) Meyer et al. (2002)
<i>Oxalis linearis</i>	kalus	antocyjany	Meyer et van Staden (1995)
<i>Oxalis reclinata</i>	kalus	zw. cyjanidyny	Makunga et al. (1997)
<i>Vitis vinifera</i>	zawiesina komórek	antocyjany	Zhang et al. (2002)
<i>Camptotheca acuminata</i>	zawiesina komórek	zw. cyjanidyny	Pasqua et al. (2005)
<i>Hypericum perforatum</i> var. <i>angustifolium</i>	kalus	zw. cyjanidyny	Mulinacci et al. (2008)
<i>Eugenia myrtifolia</i>	pędy	związki malwinidyny	Longo et al. (2007)
<i>Fragaria ananasa</i>	zawiesina komórek	antocyjany	Kurata et al. (2000) Mori et al. (2001) Takeda et al. (2003) Sato et al. (1996)



Tabela 10. Czynniki wpływające na wytwarzanie antocyjanów w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
światło	+	Saito et Mizukami (2002)
kwas $\alpha$ -naftylooctowy (NAA)	+	
kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)	+	
jony $\text{NO}_3^-$	-	
jony $\text{NH}_4^+$	+	
jony fosforanowe	-	
kinetyna	+	Pasqua et al. (2005)
6-benzyloadenina (BA)	-	
kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)	+	
sacharoza	+	
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy	+	Piovan et Filippini (2007)
feniloalanina	+	
kwas giberelinowy ( $\text{GA}_3$ )	+	
kwas indolilo-3-octowy (IAA)	+	Narayan et al. (2005)
kinetyna	+	
temperatura 25°C	+	
kwas jasmonowy (JA)	+	Blando et al. (2005)
kwas p-kumarowy	+	Plata et al. (2003)

(+) wzmacnia; (-) hamuje wytwarzanie antocyjanów

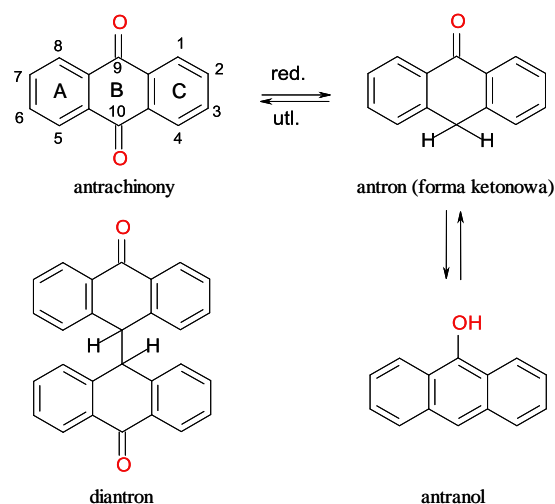
## 8. Związki antrapochnodne

### 8.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna antronoidów

Związki antrapochnodne, określane inaczej jako antranoidy, to trójcykliczne pochodne antracenu. Najczęściej występują, w postaci utlenionej, jako antrachinony oraz jako antrony i antranole na niższym stopniu utlenienia (Ryc. 7). W roślinach można je znaleźć w postaci monomerów lub też diantronów, czyli związków złożonych z dwóch cząsteczek (Kozłowski, 2002c). Połączenia diantronowe mogą składać się z dwóch takich samych cząsteczek antrazwiązku, wówczas są to połączenia symetryczne tzw. izodiantrony, lub z dwóch różnych cząsteczek, wtedy są to połączenia niesymetryczne - heterodiantrony. Antrazwiązki występują w postaci wolnej, jak również w połączeniach z cukrami tworząc formy glikozydowe, tzw. antraglikozydy. Wyróżniamy cztery typy antraglikozydów: glikozydy antronowe, biantronowe, antrachinonowe oraz aloinozydy, kaskarozydy (pochodne 10-glikozyloantronu). Antraglikozydy są substancjami stałymi o barwie czerwonej lub pomarańczowej, czasami żółtej (Kohlmünzer, 2007). Najważniejsze antrazwiązki monomeryczne i diantrony oraz ich glikozydy przedstawiono w Tabeli 11.

Wśród roślin wyższych antrachinony występują w wielu rodzinach. Szczególnie duże ilości tych związków występują w gatunkach z rodzin: Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Scrophulariaceae oraz Fabaceae (Kohlmünzer, 2007). Część związków antranoidowych spełnia rolę barwników kwiatów, np. nadozyna w kwiatach strączyńca - *Cassia nodosa* lub hiperycyna (barwa ciemnoczerwona) w kwiatach *Hypericum perforatum* (Kączkowski, 1993). Natomiast w rodzinie Rubiaceae antrachinony występują głównie w korzeniach, np. alizaryna w *Rubia tinctoria* (Han et al., 2001). Ciekawym zjawiskiem, zaobserwowanym u niektórych gatunków roślin, jest wydzielanie do podłoża innych związków antrachinowych niż te, które występują w macierzystej roślinie, np. 3-

metylpurpuryna z *Digitalis lanata* czy lucydyna z *Morinda citrifolia* (Kączkowski, 1993).



Ryc. 7. Podstawowe struktury antranoidów.

U roślin wyższych chinony pochodzą od różnych prekursorów i powstają w różnych szlakach biosyntezy. W przypadku antrachinonów wyróżnia się dwie drogi biosyntezy: szlak poliketydowy i szlak kwasu choryzmowego/osukcy-nylobenzoosowego.

Biosynteza poliketydowa występuje głównie u grzybów oraz niektórych roślin wyższych z rodziny Fabaceae, Rhamnaceae i Polygonaceae. Tą drogą antrachinony formowane są z jednej cząsteczki acetylo-CoA i siedmiu jednostek malonylo-CoA. Produktem pośrednim jest poliketyd, który charakteryzuje się zdolnością do sfaldowania łańcucha węglowego w różny sposób, a więc różnych typów cyklizacji. W ten sposób powstają między innymi chryzofanol i emodyna w rodzaju *Rumex* i *Rhamnus* (Kączkowski, 1993; Han et al., 2001).

Tabela 11. Najważniejsze antrazwiązki monomeryczne i diantrony oraz ich glikozydy.

Grupa	Nazwa związku	Występowanie	Glikozydy
antrazwiązki monomeryczne	chryzofanol	gatunki z rodzajów: <i>Rheum</i> , <i>Polygonum</i> , <i>Rumex</i> , <i>Rhamnus</i>	
	aloemodyna	<i>Aloë sp.</i>	aloina A i B, aloinozydy A i B
	reina	<i>Rheum palmatum</i> gatunki z rodzajów: <i>Rheum</i> , <i>Cassia</i> , <i>Rumex</i> , <i>Polygonatum multiflorum</i>	
	emodyna	gatunki z rodzajów: <i>Rheum</i> , <i>Polygonum</i> , <i>Rumex</i> , <i>Rhamnus</i> , <i>Frangula</i> , <i>Cassia</i> , <i>Polygonatum</i>	glukofrangulina A i B frangulina A i B
	alizaryna	<i>Rubia tinctoria</i>	
	rubiadyna	<i>Rubia tinctoria</i>	
diantrony	sennidyna A i B	<i>Cassia angustifolia</i> , <i>Cassia acutifolia</i>	sennozydy A i B
	palmidyna A i B	<i>Rheum palmatum</i>	
	reidyna A, B i C	<i>Rheum sp.</i>	
	hyperycyna	<i>Hypericum perforatum</i>	

Druga droga biosyntezy antrachinonów dotyczy głównie roślin z rodziny Rubiaceae. Pierścienie A i B syntetyzowane są z kwasu choryzomowego, natomiast pierścień C powstaje z difosforanu izopentyli drogą terpenoidową (Han et al., 2001). Kwas choryzomowy, który powstaje na szlaku szkimowym jest najpierw skonwertowany do kwasu izochoryzomowego. Reakcja ta jest katalizowana przez enzym hydroksymutazę (syntazę) izochoryzomową (Poulsen et Verpoorte, 1991). Kwas izochoryzomowy jest następnie konwertowany do kwasu o-sukcynylobenzoowego (OSB) w obecności  $\alpha$ -ketoglutaranu i difosforanu tiaminy oraz enzymu syntazy OSB. Kolejnymi etapami są: aktywacja OSB poprzez utworzenie OSB-CoA oraz zamknięcie pierścienia (Simantiras et Leistner, 1992).

Większość antrachinonów posiada grupy metylowe, metoksyłowe i hydroksylowe przy pierścieniu C. Wprowadzane są one w dalszych etapach biosyntezy, w reakcjach hydroksylacji i metylacji. Natomiast cząsteczki cukrów przyłączane są w reakcjach glikozylacji katalizowanych przez specyficzne glikozylotransferazy (Han et al., 2001).

### 8.2. Związki antrapochodne jako barwniki stosowane w przemyśle

Niektóre rośliny bogate w związki antranoidowe znalazły szerokie zastosowanie w barwiarstwie. Alkanina, czyli mieszanina pochodnych antracenu otrzymywana z kory kłaczki i korzeni *Alkanna tinctorum*, choć dziś jej znaczenie zmalało, od starożytności wykorzystywana była do wyrobu szminek, barwienia produktów spożywczych, a także farbowania tkanin. Z kory *Frangula alnus* otrzymuje się natomiast ramnotoksynę, którą stosuje się do barwienia naturalnych włókien. Kolejnym barwnikiem antrachinonowym jest alizaryna występująca w gatunku *Rubia tinctorum*, szeroko wykorzystywana w przemyśle farbiarskim oraz jako odczynnik w młeczarnictwie (Kączkowski, 1993; Kozłowski, 2002c).

### 8.3. Właściwości biologiczne związków antrapochodnych

Antranoidy są również szeroko wykorzystywane w lecznictwie szczególnie jako środki łagodnie (*laxantia*) lub też silnie (*purgantia*) przeczyszczające. Siła ich działania zależy od budowy związku oraz liczby cząsteczek cukru występujących w glikozydzie. Im więcej cząsteczek cukru, tym silniejsze działanie. Najsilniejszym działaniem przeczyszczającym charakteryzują się antrony i diantrony. Diantrony posiadają również inne właściwości farmakologiczne, np. rubiadyna ze względu na kompleksowanie jonów  $Ca^{2+}$  stosowana jest w zapobieganiu tworzenia się kamieni nerkowych, natomiast hyperycyna działa pobudzająco na układ nerwowy i stosowana jest w leczeniu psychoz i depresji. Natomiast aloiny A i B silnie hamują wydzielanie histaminy (Kohlmünzer, 2007).

Doniesienia z ostatnich lat wskazują na szereg innych ciekawych właściwości farmakologicznych tej grupy związków, m. in.: właściwości antyoksydacyjne, antybakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrybicze i przeciwnowotworowe (Smolarz et Wegiera, 2004). Właściwości przeciwutleniające antrapochodnych związków są między innymi ze zdolnością wymiatania wolnych rodników oraz silnymi właściwościami redukującymi. Szczególnie wysoką aktywnością charakteryzują się antrony (Yen et al., 2000). Emodyna hamuje namnażanie nadtlenkowych lipidów, alizaryna i jej kompleks wymiatają wolne rodniki lepiej niż  $\alpha$ -tokoferol, hamują proces peroksydacji lipidów. Również pozytywny wpływ na lipidy wywiera aloina poprzez unieczynnienie askorbazy  $Fe^{2+}$ -zależnej (Huang et al., 1995). Wykazano również przeciwnowotworowe działanie antrachinonów. Aloeemodyna aktywuje kaspazę 3, 8 i 9 przez co indukuje apoptozę szczepu CH27 ludzkiego raka płaskokomórkowego płuc (Lee et al., 2001). Natomiast emodyna i aloemodyna charakteryzują się wysoką cytotoxycznością wobec ludzkiej odmiany raka płaskokomórkowego jamy ustnej oraz szczepu ludzkiego nowotworu gruczołów ślinowych (Shi et al., 2001). Emodyna wykazuje również efekt immunosupresyjny poprzez wytwarzanie nadtlenku wodoru z semichino-

nu oraz regulowanie przemian kwasu arachidonowego (Huang et al., 1992).

Różne związki antranooidowe wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Reina, emodyna oraz aloemodyna stanowią silne środki bakteriostatyczne dla *Streptococcus viridans* oraz są inhibitorami *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Aloeemodyna wykazuje efektywność w leczeniu zakażeń wirusem *Herpes simplex* typu 1 i 2, a chryzofanol hamuje w warunkach *in vitro* replikację dwóch typów 2 i 3 wirusa *Polio*. Niektóre pochodne antracenu, w tym alizaryna, kwinalizaryna oraz reina posiadają antywirusową aktywność wobec ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV), także odmian opornych na gancyklovir (Barnard et al., 1992; Smolarz et Wegiera, 2004). Antrachinony wykazują też właściwości przeciwgrzybiczne. Pochodne antrachinonu z *Rheum emodi* hamują rozwój *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* oraz *Trichophyton mentagrophytes* (Agarwal et al., 2000).

Natomiast antrachinony wyizolowane z gatunków rodzaju *Xyris* wykazują aktywność wobec grzybów: *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus niger* (Cota et al., 2004).

#### 8.4. Antrachinony wytwarzane w kulturze *in vitro*

Rośliny należące do rodziny Rubiaceae zawierają znaczne ilości związków antrachinonowych, szczególnie alkaniny, rubiadyny, lucydyny, purpuryny oraz ich pochodnych. Miejscem akumulacji tych związków są głównie korzenie roślin. Również kultury komórkowe i tkankowe *in vitro* roślin z tej rodziny stanowią dobre źródło barwników antrachinonowych. Szczególnie często wykorzystywane są rośliny z gatunków: *Galium* sp., *Cinchona* sp., *Rubia* sp. oraz *Morinda* sp. W niektórych przypadkach zawartość antrachinonów w hodowlach komórkowych przekracza stężenie występujące w macierzystej roślinie (Han et al., 2001).

Tabela 12. Związki barwne z grupy antrachinonów wytwarzane w kulturach *in vitro*.

Gatunek	Kultura <i>in vitro</i>	Piśmiennictwo
<i>Cinchona ledgeriana</i>	zawiesina komórek	Van der Leer et al. (1991) c.f. Han et al. (2001)
<i>Cinchona robusta</i>	zawiesina komórek	Ramos-Valdivia et al. (1997) Schripsema et al. (1999) Han et al. (2002)
<i>Morinda elliptica</i>	zawiesina komórek	Abdullah et al. (1998) Jasril et al. (2000) Chong et al. (2004)
<i>Morinda citrifolia</i>	zawiesina komórek	Bassetti et al. (1996) Hagendoorn et al. (1997) Van der Plas et al. (1998) Komaraiah et al. (2005)
<i>Morinda officinalis</i>	zawiesina komórek	Xiang et Guo (1997)
<i>Cassia acutifolia</i>	zawiesina komórek	Nazif et al. (2000)
<i>Cassia obtusifolia</i>	korzenie transformowane	Asamizu et al. (1988) c.f. Giri et Narasu (2000)
<i>Cruciata glabra</i>	zawiesina komórek	Dörnenburg et Knorr (1996)
<i>Isoplexis isabelliana</i>	zawiesina komórek	Arrebola et al. (1999)
<i>Rubia cordifolia</i>	kalus	Mischenko et al. (1999) Bulgakov et al. (2002)
<i>Rubia cordifolia</i>	korzenie transformowane	Shin et Kim (1996)
<i>Rubia tinctorum</i>	zawiesina komórek	Vasconsuelo et al. (2003) Perassolo et al. (2007)
<i>Rubia tinctorum</i>	korzenie transformowane	Sato et al. (1991) Van der Heijden et al. (1994) Mantrova et al. (1999)
<i>Rubia tinctorum</i>	kalus	Stara et al. (1995)
<i>Rubia akane</i>	zawiesina komórek	Mizutani et al. (1997) Endo et al. (1997) Shim et al. (1999)
<i>Rubia peregrina</i>	korzenie transformowane	Lodhi et Charlwood (1996)
<i>Galium verum</i>	kalus	Banthorpe et White (1995)
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	zawiesina komórek	Kitajima et al. (1998)

Tabela 13. Czynniki wpływające na wytwarzanie antrachinonów w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
jasmonian metylu	+	Bulgakov et al. (2002)
kwas salicylowy	+	
kantarydyna	+	
chitozan	+	Vasconsuelo et al. (2003)
ultradźwięki	+	Komaraiah et al. (2005)
jasmonian metylu	+	
salicylany	+	
nitroprusydek sodu	+	
kwas linolowy (LA)	+	
kwas $\alpha$ -linolenowy (ALA)	+	
kwas jasmonowy (JA)	+	Chong et al. (2005)
kwas kawowy	+	Han et al. (2002)
lovastatyna	-	
klomazon	-	
Tween 80	+	Shim et al. (1999)
chitozan	+	
prolina	+	Perassolo et al. (2007)
kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP)	+	

(+) wzmacnia; (-) hamuje wytwarzanie antrachinonów

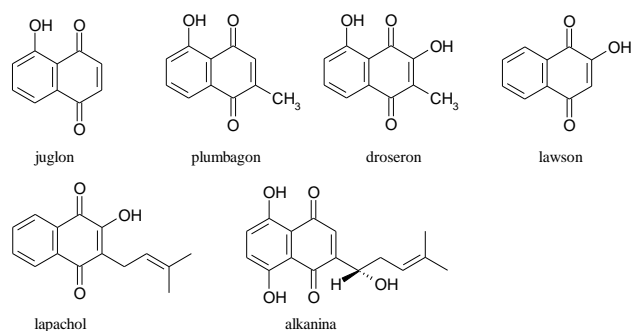
## 9. Naftochinony

### 9.1. Występowanie, biosynteza, budowa chemiczna

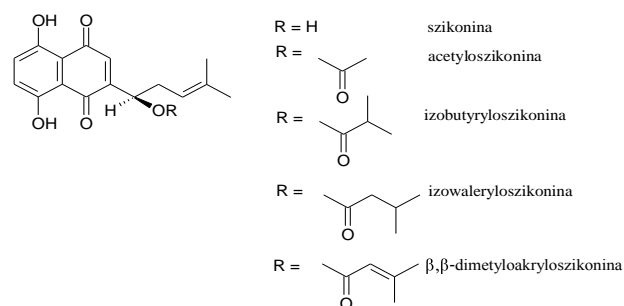
Naftochinony to pochodne naftalenu (Ryc. 8), zazwyczaj 1,4-naftochinony albo 1,4-naftohydrochinony, często z wbudowaną grupą fenolową. Ich rozpowszechnienie w świecie roślinnym jest dość ograniczone, choć czasami stanowią składniki czynne niektórych surowców roślinnych, np. ziela rosziczki (*Droserae herba*). Najważniejsze barwniki naftochinonowe to: juglon występujący w liściach, a także owocni, gałązkach i korzeniach *Juglans regia*; plumbagon (plumbagina) - żółty barwnik korzeni różnych gatunków *Plumbago* oraz rosziczek *Drosera*; droseron - pochodna plumbagonu, żółty barwnik podziemnych części *Drosera sp.*; lapachol - żółty barwnik występujący w drewnie licznych drzew z rodziny *Bignoniaceae*, m.in. gatunku *Tecoma stans*; lawson - żółty barwnik liści *Lawsonia inermis* (Kohlmünzer, 2007); alkanina - związek o czerwonym zabarwieniu obecny m.in. w korzeniach *Alkanna tinctoria* i liściach gatunku *Plagyobotrys arizonicus* oraz jej stereoizomer szikonina (Ryc. 9) występująca w postaci estrów w warstwie korowej korzeni wielu roślin z rodziny *Boraginaceae*, m.in. *Lithospermum eythrorhizon* (Saito et Mizukami, 2002). Pochodne szikoniny to: acetyloszikonina, deoksyshikonina, propioniloszikonina, izowaleryloszikonina,  $\beta$ -hydroksyizowaleryloszikonina,  $\alpha$ -metylobutyryloszikonina, terakryloszikonina oraz  $\beta,\beta$ -dimetyloakryloszikonina (Papageorgiou et al., 1999).

Biosynteza naftochinonów, podobnie jak i antrachinonów, w komórkach roślinnych przebiega różnymi drogami. W przypadku pochodnych naftalenu można wyróżnić co najmniej trzy szlaki syntezy. Naftochinony zawarte w roślinach z rodziny rosziczkowatych (*Droseraceae*), np. plumbagina, powstają na drodze poliketydowej z jednej cząsteczki acetylo-CoA i pięciu jednostek malonylo-CoA. Natomiast związki występujące w rodzinie *Pirolaceae*, np. chimafilina, formowane są z metabolitu pośredniej drogi kwasu szikimowego - *p*-hydroksyfenylopirogonianu oraz

jednostki hemiterpenowej  $C_5$ , a grupy  $CH_3$  pochodzą od  $\beta$ -tyrozyny (przy pierścieniu chinoidowym) i IPP (przy pierścieniu benzenowym) (Kączkowski, 1993).



Ryc. 8. Wzory najważniejszych barwników naftochinonowych.



Ryc. 9. Szikonina i jej pochodne.

Alkanina i szikonina oraz ich pochodne, które znaleźć można w rodzinie szorstkolistnych i wilczomleczowatych, charakteryzują się jeszcze inną drogą biosyntezy. Prekursorami tych związków w komórkach roślinnych są: kwas *p*-hydroksybenzoesowy (PHB), wywodzący się ze szlaku szikimowego oraz pirofosforan geranylu (GPP), pochodzący ze szlaku izoprenoidowego. PHB jest produktem transformacji fenyloalaniny, która poprzez przekształcenie w kwas cynamonowy, a następnie kwas kumarowy daje ostatecznie PHB. Enzymami, które uczestniczą w przemianach fenylo-

alaniny są: liza fenylalaninowa oraz 4-hydroksylaza cynamonowa. GPP natomiast powstaje z acetylo-CoA poprzez kwas mewalonowy. Enzymem odpowiedzialnym za syntezę GPP jest syntaza GPP. Połączenie dwóch prekursorów GPP i PHB z wytworzeniem kwasu *m*-geranylohydroksybenzoesowego katalizowane jest przez geranylotransferazę PHB. Kwas *m*-geranylohydroksybenzoesowy przekształcany jest do *m*-geranylohydrochinonu, a następnie powstaje pierwsza pochodna szikoniny - deoksyzikonina, która jest jej prekursorem (Papageorgiou et al., 1999). Kolejne przekształcenia szikoniny i tworzenie jej pochodnych polegają na reakcjach hydroksylacji i estryfikacji w pozycji C<sub>1</sub> (Okamoto et al., 1995).

### 9.2. Zastosowanie barwnych naftochinonów w przemyśle

Szikonina powszechnie stosowana jest w przemyśle kosmetycznym, zwłaszcza do produkcji szminek. Znalazła również zastosowanie jako barwnik spożywczy oraz do barwienia tkanin (Papageorgiou et al., 1999). Kolejnymi pochodnymi naftochinonowymi, które mają zastosowanie w kosmetyce są lawson, który w postaci wyciągu stosowany jest jako farba do włosów (henna) oraz juglon, który dodawany jest do kremów samoopalających (Kohlmünzer, 2007).

### 9.3. Właściwości biologiczne naftochinonów

Pochodne naftochinonu wykazują wielokierunkową aktywność farmakologiczną, szczególnie dużo leczniczych właściwości posiada szikonina. Jej właściwości przeciwzapalne oraz przyspieszające gojenie ran znane są już od dawna i wykorzystywane do leczenia ciężkich owrzodzeń i oparzeń skóry, egzemy oraz odleżyn (Papageorgiou et al., 1999). Przeciwzapalne działanie szikoniny i jej pochodnych związane jest wieloma mechanizmami, m.in. hamowaniem biosyntezy leukotrienu B<sub>4</sub> i kwasu 5-hydroksyeikozatetraenowego - mediatorów stanu zapalnego (Wang et al., 1994), zmniejszeniem produkcji TNF- $\alpha$ , interleukiny 1-b i tlenu azotu, a także inhibicją cyklooksigenazy-2 (Nam et al., 2008). Również zapobieganie degranulacji bazofili i hamowanie uwalniania histaminy przyczynia się do przeciwzapalnego działania szikoniny (Takano-Ohmuro et al., 2008).

Szikonina i jej pochodne wykazują też aktywność antybakteryjną i to zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus* (także opornych na wankomycynę - VRE i na metycylinę - MRSA), *Enterococcus faecium* i *Bacillus subtilis* (Shen et al., 2002; Pietrosiuk et al., 2003), jak również Gram-ujemnych: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Karyagina et al., 2001). Natomiast plumbagina wykazuje działanie przeciwko *Helicobacter pylori* (Wang et Huang, 2005). Szikonina i jej pochodna deoksyzikonina, charakteryzują się właściwościami hamującymi wzrost dermatofitów (Honda et al., 1988 c.f. Papageorgiou et al., 1999), a acetyloszikonina i  $\beta$ -hydroksyzowaleryloszikonina są aktywne wobec *Candida crusei* dorównując skutecznością flukonazolowi (Sasaki et al., 2002).

Działanie przeciwdrobnoustrojowe naftochinonów nie ogranicza się tylko do bakterii i grzybów, posiadają one również aktywność przeciwwirusową. Metanolowy ekstrakt z *Arnebia euchroma* działa przeciwko wirusowi zapalenia wątroby HCV (Ho et al., 2003). Szikonina posiada działanie supresyjne na wirusa HIV-1 (Chen et al., 2003a). Zmniejszenie replikacji tego wirusa powodują również plumbagon i juglon poprzez hamowanie aktywności rybonukleazy H (Min et al., 2002). Niektóre naftochinony wykazują skuteczność wobec pasożytów takich jak: *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* oraz malarii (Ferreira et al., 2002b). Szikonina posiada również działanie larwobójcze na *Culex pipensis*, który jest wektorem wirusa Zachodniego Nilu (Michaelakis et al., 2009).

W wielu doniesieniach udowodniono przeciwnowotworowe właściwości szikoniny i jej pochodnych. Działanie to wynika z kilku mechanizmów, m.in.: hamowania proliferacji komórek nowotworowych (Sankawa et al., 1981), inhibicji DNA topoizomerazy-I (Ahn et al., 1995), indukcji apoptozy (Gao et al., 2002), hamowania angiogenezy (Pietrosiuk et al., 2004a), a także inhibicji telomerazy (Lu et al., 2002). Również juglon i plumbagina indukują zjawisko apoptozy (Babula et al., 2009).

Pochodne szikoniny wywierają korzystny wpływ na układ krwionośny. Wykazują one działanie przeciwzakrzepowe poprzez hamowanie agregacji płytek i powstawanie trombosanu B<sub>2</sub>. Najsilniejszą aktywnością przeciwzakrzepową charakteryzuje się acetyloszikonina (Ko et al., 1995). Ze względu na antyoksydacyjne działanie i zdolność wymiatania wolnych rodników, pochodne szikoniny zapobiegają peroksydacji lipidów (Gao et al., 2000).

Związki te okazały się również inhibitorami ludzkiej acetylotransferazy cholesterolowej hACAT i przyczyniają się do ograniczenia rozwoju miażdżycy. Szczególnie aktywne są związki posiadające w grupie arylovej trzy lub cztery atomy węgla (An et al., 2007). Plumbagon zaś wykazuje niewielkie działanie przeciwkrwotoczne (Kohlmünzer, 2007).

Wyizolowane z korzeni *Lithospermum erythrorhizon* pochodne szikoniny posiadają zdolność pochłaniania, szkodliwego dla skóry, promieniowania UVA i UVB (Feng et al., 2007), zapobiegają stanom zapalnym keratynocytów oraz uszkodzeniom skóry wywołanym przez promieniowanie UVB (Ishida et Sakaguchi, 2007).

Szikonina i jej pochodne stymulują wychwytywanie glukozy poprzez wykorzystanie drogi zależnej od kinazy tyrozynowej (Kamei et al., 2002). Wykazują również działanie immunomodulujące - w małych dawkach pochodne szikoniny stymulują, a w dużych działają supresyjnie na układ odpornościowy (Pietrosiuk et al., 2004b).

Droseron, który występuje w podziemnych częściach *Drosera* sp. wykazuje działanie spazmolityczne i odpowiedzialny jest za przeciwkaszlowe działanie preparatów z rośniczek (Kohlmünzer, 2007).

Droseron, który występuje w podziemnych częściach *Drosera* sp. wykazuje działanie spazmolityczne i odpowiedzialny jest za przeciwkaszlowe działanie preparatów z rośniczek (Kohlmünzer, 2007).

### 9.4. Naftochinony wytwarzane w kulturze *in vitro*

Głównymi barwnikami naftochinonowymi, którym poświęcono wiele publikacji (Tabela 14), jest para chiralna: szikonina i alkanina. Istnieje wiele doniesień o produkcji tych związków w roślinnych kulturach *in vitro*. Tabata et al. (1974) wskazali na obecność szikoniny w tkance kalusowej *Lithospermum erythrorhizon* hodowanej na pożywce LS. Szikonina i jej pochodne są bardzo cennymi związkami ze względu na swoją szeroką aktywność biologiczną, dlatego też prowadzono wiele badań dotyczących optymalizacji warunków hodowli (Tabela 15), składu pożywek oraz otrzymywania wysokoproduktywnych linii komórkowych (Fujita, 1988).

Tabela 14. Związki z grupy naftochinonów wytwarzane w kulturach *in vitro*.

Gatunek	Kultura <i>in vitro</i>	Barwnik	Piśmiennictwo
<i>Alkanna tinctoria</i>	zawiesina komórek	alkanina	Urbanek et al. (1996)
<i>Arnebia euchroma</i>	zawiesina komórek	szikonina	Fu et Lu (1999)
<i>Arnebia euchroma</i>	zawiesina komórek	pochodne szikoniny	Sharma et al. (2008)
<i>Arnebia euchroma</i>	kultura komórkowa	szikonina	Ge et al. (2006)
<i>Echium lycopsis</i>	kultura komórkowa	szikonina i jej pochodne	Fukui et al. (1983) c.f. Papageorgiou et al. (1999)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	kalus	szikonina	Tabata et al. (1974) c.f. Fujita (1988), Chung et al. (2006)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	zawiesina komórek	szikonina	Fujita (1988), Gaisser et Heide (1996), Yamamoto et al. (2000)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	pędy	szikonina	Touno et al. (2005)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	korzenie transformowane	szikonina	Sommer et al. (1999), Sim et Chang (1993)
<i>Lithospermum canescens</i>	korzenie transformowane	pochodne szikoniny	Pietrosiuk et al. (2006a)
<i>Onosma echioides var. hispidum</i>	kalus	$\beta, \beta$ -dimetyloaryloszikonina	Lattoo et al. (2005)
<i>Onosma echioides var. hispidum</i>	kalus	acetyloszikonina	Koul et al. (1993)
<i>Onosma paniculatum</i>	zawiesina komórek	szikonina i jej pochodne	Qi et al. (2008)
<i>Onosma paniculatum</i>	kalus	szikonina	Yang et al. (1999), Yang et al. (2003), Ding et al. (2004), Liu et al. (2006)
<i>Sesamum indicum</i>	korzenie transformowane	naftochinony	Ogasawara et al. (1993) c.f. Giri et Narasu (2000)
<i>Dionaea muscipula</i>	zawiesina komórek	plumbagina	Hook (2001)
<i>Dionaea muscipula</i>	rośliny <i>in vitro</i>	plumbagina, ramentaceon	Królicka et al. (2008)
<i>Drosera rotundifolia</i>	zawiesina komórek	7-metylojuglon	Hook (2001)
<i>Drosera capensis</i>	zawiesina komórek	7-metylojuglon	Hook (2001)
<i>Drosera capensis</i>	rośliny <i>in vitro</i>	plumbagina, ramentaceon	Królicka et al. (2008)
<i>Drosera aliciae</i>	rośliny <i>in vitro</i>	ramentaceon	Królicka et al. (2009)
<i>Plumbago indica</i>	korzenie transformowane	plumbagina	Gangopadhyay et al. (2008)
<i>Plumbago rosea</i>	zawiesina komórek	plumbagina	Komaraiah et al. (2002)
<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	zawiesina komórek	plumbagina	Nahalka et al. (1996)

Tabela 15. Czynniki wpływające na wytwarzanie naftochinonów w kulturach *in vitro*.

Czynnik	Efekt	Piśmiennictwo
sacharoza	+	Saito et Mizukami (2002)
jony $\text{Cu}^{2+}$	+	
agar (agaropektyna)	+	
oligogalakturonid	+	
jasmonian metylu	+	
światło	-	
lumiflawina	-	
kwas 2,4-dichlorofe-noksyoctowy (2,4-D)	-	
jony $\text{NH}_4^+$	-	
giberelina $\text{A}_3$ ( $\text{GA}_3$ )	-	
glutamina	-	
jony $\text{Fe}^{3+}$	-	Mizukami et al. (1977)
jony $\text{Ca}^{2+}$	-	
siarczan streptomycyny	+	
kwas askorbinowy	+	
kwas indolilo-3-octowy (IAA)	+	Tabata et al. (1974)
kwas indolilo-3-masłowy (IBA)	+	Zhou et Zhang (1993)
niska temperatura	+	
etylen	+	Touno et al. (2005)
ultradźwięki o niskim natężeniu	+	Lin et Wu (2002)
promieniowanie $\gamma$	+	Chung et al. (2006)
jony $\text{Le}^{3+}$	+	Ge et al. (2006)
jony $\text{Nd}^{3+}$	+	
jony $\text{Ce}^{3+}$	+	

(+) wzmaga; (-) hamuje wytwarzanie naftochinonów



## 10. Benzochinony

Benzochinony są substancjami barwnymi występującymi głównie w grzybach. Charakteryzują się barwą od fioletowej do brunatnej, choć istnieją też związki o barwie pomarańczowej, jak na przykład aurancjacyna izolowana z grzyba *Hydnellum aurantiacum*. Natomiast przykładem związku benzochinonowego, który występuje w świecie roślin, jest tymochinon. Stanowi on składnik niektórych olejków eterycznych, m.in. nasion czarnuszki siewnej. Tymochinon posiada właściwości przeciwbakteryjne. W lecznictwie nie są stosowane żadne surowce farmakognostyczne, które zawierają związki z tej grupy (Kohlmünzer, 2007).

Brunatny benzochinon - hydroksyechinofuran B odnaleziono również w korzeniach *Lithospermum erythrorhizon* (Fukui et al., 1997).

## 11. Inne barwniki roślinne

### 11.1. Indygo

Indygo jest niebieskim barwnikiem, który pod względem chemicznym jest pochodną indolu i indoksyłu. Związek ten stanowi najstarszy i najważniejszy barwnik roślinny, od stuleci wykorzystywany do farbowania tkanin, jak również do celów kosmetycznych oraz w obrzędach kulturowych. Rośliny, które służą do otrzymywania indygo to: *Indigofera tinctoria*, *Indigofera guatemanensis*, *Indigofera fruticosa* (Fabaceae), *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae) oraz *Isatis tinctoria* (Brassicaceae). W przemyśle wykorzystywane są również różne pochodne indyga: purpura tyryjska (dibromoindygo), indygo jaskrawe B (tetrachlorek indyga) oraz indygo karmin (sulfonowa pochodna indyga) (Kozłowski, 2002e).

### 11.2. Kurkumina

Kurkumina jest dimeryczną pochodną kwasu ferulowego o silnie żółtym zabarwieniu, występującą w korzeniach *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Ze względu na działanie żółtopędne i przeciwzapalne, stanowi składnik niektórych preparatów mających zastosowanie w chorobach wątroby i pęcherzyka żółciowego (Kohlmünzer, 2007). Kurkumina jako barwnik żywności ma oznaczenie E-100 (Wisgott et Bortlik, 1996).

## 12. Objaśnienia skrótów:

IPP	- difosforan izopentenylu
DMAPP	- difosforan dimetyloallilu
GGPP	- geranylogeranyldifosforanu
GPP	- pirofosforan geranylu
PHB	- kwas p-hydroksybenzoesowy
ATP	- adenylozotryfosforan
NADPH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
IAA	- kwas indolilo-3-octowy
IBA	- kwas indolilo-3-mastowy
BA	- 6-benzyladenina
NAA	- kwas α-naftyloctowy
2,4-D	- kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
6-BAP	- 6-aminobenzylpuryna
GA3	- kwas giberelinowy
JA	- kwas jasmonowy
pożywka B5	- żywka wg Gamborga

pożywka LS	- żywka wg Leinsmaiera i Skooga
DOPA	- 3,4-dihydroksyfenylalanina
FMN	- mononukleotyd flawinowy
FAD	- dinukleotyd adeninoflawinowy
OSB	- kwas o-sukcynlobenzoesowy
LA	- kwas linolowy
ALA	- kwas α-linolenowy
AIP	- kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy
CYP1A	- cytochrom P450 1A1
CYP3A4	- cytochrom P450 3A4
COX-1	- cyklooksyzgenaza 1
COX-2	- cyklooksyzgenaza 2
LOX-5	- lipooksyzgenaza 5
LOX-12	- lipooksyzgenaza 12
TNF-α	- (Tumor Necrosis Factor) czynnik martwicy nowotworu
HCMV	- (Human Cytomegalovirus) ludzki wirus cytomegalii
hACAT	- (human Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase) ludzka acetylotransferaza cholesterolowa
VRE	- (Vancomycin-Resistant Enterococcus) enterokoki odporne na wankomycynę
MRSA	- (methicillin-resistant Staphylococcus aureus) szczep gronkowca złościstego odporny na metycylinę

## 13. Bibliografia

1. Abdullah M.A., Ali A.M., Marziah M., Lajis N.H., Ariff A.B. (1998). Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 173-182
2. Abe Y., Sawada A., Momose T., Sasaki N., Kawahara N., Kamakura H., Goda Y., Ozeki Y. (2008). Structure of an anthocyanin-anthocyanin dimer molecule in anthocyanin-producing cells of a carrot suspension culture. *Tetrahedron Letters*, 49: 7330-7333
3. Agarwal S.K., Singh S.S., Verma S., Kumar S. (2000). Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72 (1-2): 43-46
4. Ahn B.Z., Baik K.U., Kreon G.R., Lim K., Hwang B.D. (1995). Acylshikonin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase I. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 1044-1047
5. Akita T., Hina Y., Nishi T. (2000). Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 1807-1812
6. Alexandra P.E., Monica G.M., Wrolstad R.E., Gloria M.B.A. (2001). Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75: 211-216
7. Al-Fayez M., Cai H., Tunstall R., Steward W.P., Gescher A.J. (2006). Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58: 816-825
8. Al-Juboory K.H., Skirvin R.M., Williams D.J. (1998). Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 72: 171-178
9. An S., Park Y.D., Paik Y.K., Leong T.S., Lee W.S. (2007). Human ACAT inhibitory effects of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 1112-1116
10. Andersen Ø.M., Jordheim M. (2006). The anthocyanins. In *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Ed. by Ø.M. Andersen, K.R. Markham. CRC Press: 471-553
11. Antognoni F., Zheng S., Pagnucco C., Baraldi R., Poli F., Biondi S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Paspiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78:345-352
12. Arct J., Pytkowska K. (2008). Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*, 26: 347-357
13. Arrebola M.L., Ringom T., Verpoorte R. (1999). Anthraquinones from *Isoplexis isabelliana* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 52: 1283-1286

14. Asada Y., Li W., Yoshikawa T. (1998). Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, 47(3): 389-392
15. Asamizu T., Abiyam K., Yasuda I. (1988). Anthraquinones production by hairy root culture in *Cassia obtusifolia*. *Yakagaku Zasshi*, 108: 1215-1218
16. Ayabe S., Iida K., Furuya T. (1986). Induction of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. *Plant Cell Reports*, 3: 186-189
17. Banerjee S., Li Y., Wang Z., Sarkar F.H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, 269: 226-242
18. Banthorpe D.V., White J.J. (1995). Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*. *Phytochemistry*, 36(1): 107-111
19. Barnard D.L., Huffman J.H., Morris J.L.B., Wood S.G., Hughes B.G., Sidwell R.W. (1992). Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 17: 63-77
20. Barthe G.A., Jourdan P.S., Macintosh C.A., Mansell R.L. (1987). Naringin and limonin production in callus cultures and regenerated shoots from *Citrus* sp. *Journal of Plant Physiology*, 127: 55-65
21. Bassetti L., Pijnenburg J., Tramper J. (1996). Silicone-stimulated anthraquinone production and release by *Morinda citrifolia* in a two-liquid-phase system. *Biotechnology Letters*, 18: 377-382
22. Basu P., Chand S. (1996). Anthocyanin accumulation in *Hyoscyamus muticus* L. tissue cultures. *Journal of Biotechnology*, 52: 151-159
23. Bel-Rholid R., Chabot S., Piche Y., Chenevert T. (1993). Isolation and identification of flavanoids from Ri T-DNA transformed roots (*Daucus carota*) and their significance in vesicular-arbuscular *Mycorrhiza*. *Phytochemistry*, 35: 381-383
24. Berglund T., Ohlsson A.B., Rydström J. (1993). Nicotinamide increases glutathione and anthocyanin in tissue culture of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*, 141: 596-600
25. Berlin J., Sieg S., Strack D., Bokern M., Harms H. (1986). Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5: 163-174
26. Bhagyalakshmi N., Thimmaraju R., Narayan M.S. (2004). Various hexoses and di-hexoses differently influence growth, morphology and pigment synthesis in transformed root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 183-195
27. Bhuiyan N.H., Adachi T. (2003). Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1117-1124
28. Blando F., Scardino A.P., De Bellis L., Nicoletti I., Giovinazzo G. (2005). Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International*, 38: 937-942
29. Böhm H., Böhm L., Rink E. (1991). Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26: 75-82
30. Bokern M., Heuer S., Wray V., Witte L., Macek T., Vanek T., Strack D. (1991). Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 30: 3261-3265
31. Boltenkov E.V., Rybin V.G., Zarembo E.V. (2004). Specific features of cultivation of *Iris ensata* Thunb. callus tissue. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(2): 206-212
32. Boltenkov E.V., Rybin V.G., Zarembo E.V. (2005). Flavones from callus tissue of *Iris ensata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(5): 539-541
33. Boyles M.J., Wrolstad R.E. (1993). Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors. *Journal of Food Science*, 58: 1135-1141
34. Bridle P., Timberlake C.F. (1997). Anthocyanins as natural food colour-selected aspects. *Food Chemistry*, 58: 103-109
35. Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation function. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9: 1551-1558
36. Bulgakov V.P., Tchernodod G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *roC* genes. *Journal of Biotechnology*, 97: 213-221
37. Callebaut A., Terahara N., de Haan M., Declaire M. (1997). Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 195-201
38. Carew D.P., Krueger R.J. (1976). Anthocyanidins of *Catharanthus roseus* callus cultures. *Phytochemistry*, 15: 442
39. Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. de L., Páez-Hernández M.A., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859-871
40. Castellar R., Obón J.M., Alacid M., Fernández-López J.A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2772-2776
41. Chattopadhyay P., Chatterjee S., Sen S.K. (2008). Biotechnological potential of natural food grade biocolourants. *African Journal of Biotechnology*, 7(17): 2972-2985
42. Chen S., Wang X., Zhao B., Yuan X., Wang Y. (2003b). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnology Letters*, 25: 1235-1238
43. Chen S., Zhao B., Wang X., Yuan X., Wang Y. (2004). Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. *Biotechnology Letters*, 26: 27-30
44. Chen X., Yang L., Hang N., Turbin J.A., Buckheit R.W., Sterling C., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. (2003a). Shikonin, a component of Chinese herbat medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses Human Immunodeficiency Virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9): 2810-2816
45. Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P. (2001). Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*, 62: 1185-1191
46. Chong T.M., Abdullah M.A., Fadzillah N.M., Lai O.M., Lajis N.H. (2004). Anthraquinones production, hydrogen peroxide level and antioxidant vitamins in *Morinda elliptica* cell suspension cultures from intermediary and production medium strategies. *Plant Cell Reports*, 22: 951-958
47. Chong T.M., Abdullah M.A., Lai O.M., Nor'Aini F.M., Lajis N.H. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*, 40: 3397-3405
48. Chung B.Y., Lee Y.B., Baek M.H., Kim J.H., Wi S.G., Kim J.S. (2006). Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. *Radiation Physics and Chemistry*, 75: 1018-1023
49. Clifford M.N. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 1063-1072
50. Cota B.B., de Oliveira A.B., Guimarães K.G., Mendonça M.P., de Souza Filho J.D., Braga F.C. (2004). Chemistry and antifungal activity of *Xyris* species (Xyridaceae): a new anthraquinone from *Xyris pilosa*. *Biological Systematics and Ecology*, 32: 391-397
51. Côté F., Cormier F., Dufresne C., Willemot C. (2001). A highly specific glucosyltransferase is involved in the synthesis of crocetin glucosylesters in *Crocus sativus* cultured cells. *Journal of Plant Physiology*, 15: 553-560
52. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65 (4): 337-353
53. Dias A.C.P., Tomás-Barberán F.A., Fernandes-Ferreira M., Ferreres F. (1998). Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48(7): 1165-1168
54. Ding J., Shi S., Jiang B.-H., Yang Y.-H., Huang J., Shen H.-G., Xia K., Hang J., Jiang X. (2004). Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40: 581-585
55. Dörnenburg H., Knorr D. (1996). Semicontinuous process for anthraquinone production with immobilized *Cruciata gabra* cell cultures in a three-phase system. *Journal of Biotechnology*, 50: 55-62
56. Dreiseitel A., Schreier P., Oehme A., Locher S., Rogler G., Piberger H., Hajak G., Sand P.G. (2008). Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 57-61
57. Dufresne C., Cormier F., Dorion S., Niggli U.A., Pfister S., Pander H. (1999). Glycosylation of encapsulated crocetin by a *Crocus sativus* L. cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 24: 453-462
58. Endo M., Sakata K., Katayama A. (1997). The pigments in the callus of *Rubia akane* and their dyeing properties. *Nippon Sanshigaku Zasshi*, 66: 107-112
59. Fang Y., Smith M.A.L., Pépin M.F. (1998). Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahalae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 113-122
60. Farag M.A., Hulman D.V., Lei Z., Sumer L.W. (2007). Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids

- in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry*, 68: 342-354
61. Ferreira A.C.F., Lisboa P.C., Oliveira K.J., Lima L.P., Barros I.A., Carvalho D.P. (2002a). Inhibition of thyroid type 1 deiodinase activity by flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 913-917
  62. Ferreira R.A., Oliveira A.B., Gualberto S.A., Vitor R.W.A. (2002b). Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, in vitro and in murine model of infection. *Parasite*, 9: 261-269
  63. Filippini R., Caniato R., Piovan A., Cappelletti E.M. (2003). Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus*. *Fitoterapia*, 74: 62-67
  64. Fosket D., Radin D. (1983). Induction of carotenogenesis in cultured cells of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Science Letters*, 30:165-75
  65. Fraser P.D., Bramley P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43: 228-265
  66. Froehlicher T., Hennebelle T., Martin-Nizard F., Cleenewerck P., Gilbert J.-L., Trocin F., Grec S. (2009). Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry*, 115: 897-903
  67. Fu X.Q., Lu D.W. (1999). Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and in situ extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24: 243-246
  68. Fujita Y. (1988). Shikonin: Production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (ed. by Y.P.S. Bajaj). *Medicinal and Aromatic Plants II*, 3,4: 225-236
  69. Fukui H., Hasan A.F.M.F., Ueoka T., Kyo M. (1998). Formation and secretion of a new Brown benzoquinone by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 47 (6): 1037-1039
  70. Fukui H., Tsukada M., Miaukami H., Tabata M. (1983). Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus culture. *Phytochemistry*, 22(2): 453-456
  71. Gaisser S., Heide L. (1996). Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry*, 41(4): 1065-1072
  72. Galati E.M., Mondello M.R., Laurian E.R., Taviano M.F., Galluzzo M., Miceli N. (2005). *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury. *Phytotherapy Research*, 19: 796-800
  73. Gándia-Herrero F., García-Carmona F., Escribano J. (2006). Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochemical Analysis*, 17: 262-269
  74. Gangopdhyay M., Sircar D., Mitra A., Bhattacharya S. (2008). Hairy root culture of *Plumbago indica* as a potential source for plumbagin. *Biologia Plantarum*, 52(3): 533-537
  75. Gao D., Hiromura M., Yasui H., Samuray H. (2002). Direct reaction between shikonin and thiols induces apoptosis in HL60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(7): 827-832
  76. Garcia-Viguera C., Zafrilla P., Tomas-Barberan F.A. (1997). Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 73: 207-213
  77. Ge F., Wang X., Zhao B., Wang Y. (2006). Effects of rare earth elements on the growth of *Arnebia euchroma* cells and the biosynthesis of shikonin. *Plant Growth Regulation*, 48: 283-290
  78. Georgiev V., Ilieva M., Bley T., Pavlov A. (2008). Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiologica Plantarum*, 30: 581-593
  79. Gertig H., Duda G. (2004). *Żywność a zdrowie i prawo*. Wyd. II uzupełnione. PZWL, Warszawa
  80. Gertig H., Przystawski J. (2007). *Bromatologia: zarys nauki o żywności i żywieniu*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 110-117
  81. Giri A., Narasu M.L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18: 1-22
  82. Girod P.A., Zryd J.P. (1991). Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25: 1-12
  83. Giusti M.M., Wrolstad R.E.A. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225
  84. Gloria M.B.A., Vale S.R., Bobbio P.A. (1995). Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chemistry*, 52: 389-391
  85. Gould K.S., Lister C. (2006). Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Ed. by Ø.M. Andersen, K.R. Markham. CRC Press: 397-443
  86. Grajek W. (2001). *Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro*. *Metabolity wtórne wytwarzane przez rośliny*. Barwniki roślinne. W: *Biotechnologia roślin*. Praca zbiorowa pod redakcją Stefana Malepszego. PWN, Warszawa: 310-314
  87. Grotewold E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 761-780
  88. Guo B., Liu Y.-G., Yan Q., Liu C.-Z. (2007). Spectral composition of irradiation regulates the cell growth and flavonoids biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim. *Plant Growth Regulation*, 52: 259-263
  89. Hagendoorn M.J.M., Jamar D.C.L., Meykamp B., Van der Plas L.H.W. (1997). Cell division versus secondary metabolite production in *Morinda citrifolia* cell suspensions. *Journal of Plant Physiology*, 150: 325-330
  90. Haila K.M., Lievonon S.M., Heinonen M.I. (1996). Effects of lutein, lycopene, annatto and  $\alpha$ -tocopherol on autooxidation of triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2096-2100
  91. Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C. (1986). Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 5: 111-114
  92. Han Y.-S., Van der Heijden R., Verpoorte R. (2001). Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 201-220
  93. Han Y.-S., van der Heijden R., Verpoorte R. (2002). Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona* 'Robusta' by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. *Biotechnology Letters*, 24: 705-710
  94. Hanchinal V.M., Survase S.A., Sawant S.K., Annapure U.S. (2008). Response surface methodology in media optimization for production of  $\beta$ -carotene from *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 123-132
  95. Hao G., Du X., Zhao F., Shi R., Wang J. (2009). Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97: 175-185
  96. Harborne J.B. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*, third ed. Academic Press, London
  97. Hempel J., Böhm H. (1997). Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *Lutea* and its alteration by feeding of aminoacids. *Phytochemistry*, 44: 847-852
  98. Hilou A., Nacoulma O.G., Guiguemde T.R. (2006). In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 236-240
  99. Ho T.Y., Wu S.L., Lai I.L., Cheng K.S., Kao S.T., Hsiang C.Y. (2003). An in vitro system combined with an in-house quantitation assay for screening hepatitis C virus inhibitors. *Antiviral Research*, 58: 199-208
  100. Honda G., Sakakibara F., Mazaki K., Tabata M. (1988). Isolation of deoxyshikonin, an antidermatophytic principle from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 51(1): 152-154
  101. Hook I.L.I. (2001). Naphthoquinone contents of in vitro cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures*, 67: 281-285
  102. Hosokawa K., Fukunaga Y., Fukushi E., Kawabata J. (1996). Production of acylated anthocyanins by blue flower of *Hyacinthus orientalis* regenerated in vitro. *Phytochemistry*, 41(6): 1531-1533
  103. Huang H.C., Chang J.H., Tung S.F., Wu R.T., Foegh M.L., Chu S.H. (1992). Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *European Journal of Pharmacology*, 211 (3): 359-364
  104. Huang S.-S., Yeh S.-F., Hong C.-Y. (1995). Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure-activity relationship. *Journal of Natural Products*, 58 (9): 1365-1371
  105. Ishida T., Sakaguchi I. (2007). Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(5): 928-934
  106. Jasril, Lajis N.H., Abdullah M.A., Ismail N.H., Ali A.M., Marziah M., Ariff A.B., Kitajima M., Takayama H., Aimi N. (2000). Anthraquinones from cell suspension culture of *Morinda elliptica*. *Natural Product Sciences*, 6: 40-43
  107. Kamei R., Kitagawa Y., Kadokura M., Hattori F., Hazeki O., Emina Y., Nishihara T., Oikawa S. (2002). Shikonin stimulates glucose up-

- take in 3T3-L1 adipocytes via an insulin-independent tyrosine kinase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 642-651
108. Karyagina T.B., Arzumanyan V.G., Timchenko T.V., Bairamashvili D.I. (2001). Antimicrobial activity of shikonin preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35: 30-31
  109. Kączkowski J. (1992). *Biochemia roślin. Tom I: Przemiany typowe. Wyd. V zmienione.* PWN, Warszawa: 120-124, 139-143
  110. Kączkowski J. (1993). *Biochemia roślin. Tom II: Metabolizm wtórny. Wyd. II zmienione.* PWN, Warszawa: 84-90, 266-283, 295-297
  111. Khlebnikov A., Dubuis B., Kut O.M., Prenosil J.E. (1995). Growth and productivity of *Beta vulgaris* cell culture in fluidized bed reactors. *Bioprocess Engineering*, 14: 51-56
  112. Kishima Y., Shimaya A., Adachi T. (1995). Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca callus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43: 67-70
  113. Kitajima M., Fischer U., Nakamura M., Ohsawa M., Ueno M., Takayama H., Unger M., Stöckigt J., Aimi N. (1998). Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell cultures. *Phytochemistry*, 48: 107-111
  114. Kitamura Y., Ohta M., Ikenaga T., Watanabe M. (2002). Responses of anthocyanin-producing and non-producing cells of *Glehnia littoralis* to radical generators. *Phytochemistry*, 59: 63-68
  115. Knobloch K.H., Bast G., Berlin J. (1982). Medium- and light induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 21(3): 591-594
  116. Kohlünzer S. (2007). *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wyd. V unowocześnione.* PZWL, Warszawa: 150-198, 253-277, 377-379, 531
  117. Komaraiah P., Kishor P.B.K., Carlsson M., Magnusson K.-E., Mandenius C.-F. (2005). Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science*, 168: 1337-1344
  118. Komaraiah P., Naga Amrutha R., Kavi Kishor P.B., Ramakrishna S.V. (2002). Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 634-639
  119. Konczak I., Zhang W. (2004). Anthocyanins-more than naturés colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 239-240
  120. Konczak-Islam I., Okuno S., Yoshimoto M., Yamakawa O. (2003). Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 155-161
  121. Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933
  122. Kopsell D.A., Kopsell D.E. (2006). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in Plant Science*, 11 (10): 499-507
  123. Koul S., Sambyal M., Khajuria R.K., Jain S.M. (1993). Acetylshikonin from callus cultures of *Onosma echiooides* var. *hispidum*. *Fitoterapia*, 64(6): 552-553
  124. Kozłowska M., Politycka B. (2007). Fotosynteza i aktywność fotosyntetyczna roślin. Faza świetlna procesu. W: *Fizjologia roślin: od teorii do nauk stosowanych pod redakcją Moniki Kozłowskiej.* Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań: 215-222
  125. Kozłowski J. (2002a). Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część I. *Wiadomości zielarskie*, 5: 9-12
  126. Kozłowski J. (2002b). Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część II. *Wiadomości zielarskie*, 6: 13-15
  127. Kozłowski J. (2002c). Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część III. *Wiadomości zielarskie*, 7: 19-20
  128. Kozłowski J. (2002d). Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część IV. *Wiadomości zielarskie*, 8-9: 35
  129. Kozłowski J. (2002e). Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część V. *Wiadomości zielarskie*, 10: 17-19
  130. Krinsky N., Landrum J., Bone R. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition*, 23: 171-201
  131. Królicka A., Szpitter A., Gilgenast E., Romanik G., Kamiński M., Łojkowska E. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 216-221
  132. Królicka A., Szpitter A., Maciąg M., Biskup E., Gilgenast E., Romanik G., Kamiński M., Wegrzyn G., Łojkowska E. (2009). Antibacterial and antioxidant activity of the secondary metabolites from in vitro cultures of *Drosera aliciae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53: 175-184
  133. Kuppusamy U.R., Khoo H.E., Das N.P. (1990). Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochemical Pharmacology*, 40: 397-401
  134. Kurata H., Mochizuki A., Okuda N., Seki M., Furusaki S. (2000). Intermittent light irradiation with second- or hour-scale periods controls anthocyanin production by strawberry cells. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 621-629
  135. Kuzovkina I.N., Guseva A.V., Alterman I.E., Karnachuk R.A. (2001). Flavonoid production in transformed *Scutellaria baicalensis* roots and ways of its regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 448-452
  136. Lattoo S.K., Koul S., Dhar M.K., Khajuria R.K., Gupta D.K., Dhar A.K., Qazi G.N. (2005). Production of B-B, dimethylacrylshikonin in callus cultures of *Onosma echiooides* var. *hispidum* Clarke. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14 (2): 193-195
  137. Leathers R.R., Davin C., Zryd J.P. (1992). Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L var *Bikores* Monogerm (Red Beet). In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 28: 39-45
  138. Lee H.Z., Hsu S.L., Liu M.C., Wu C.H. (2001). Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *European Journal of Pharmacology*, 431: 287-295
  139. Lee S.Y., Cho S.I., Park M.H., Kim Y.K., Choi J.E., Park S.U. (2007). Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37: 239-246
  140. Li F.X., Jin Z.P., Zhao D.X., Cheng L.Q., Fu C.X., Ma F. (2006). Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry*, 67: 553-560
  141. Lin L., Wu J. (2002). enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizoni* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(1): 81-88
  142. Lindsay D.G. (2002). The potential contribution of plant biotechnology to improving food quality. The phenylpropanoid pathway. Flavonoids and isoflavonoids. In: *Plant biotechnology and transgenic plants.* Ed. by K.-M. Oksman-Caldentey, W. Barz. CRC Press: 212-216
  143. Liu C.Z., Murch S.J., EL-Demerdash M., Sabena P.K. (2004). *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. *Journal of Biotechnology*, 110: 63-71
  144. Liu Q., Dixon R.A., Mabry T.J. (1993). Additional flavonoids from elicitor-treated cell cultures of *Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry*, 34: 167-170
  145. Liu Z., Qi J.-L., Chen L., Zhang M.-S., Wang X.-Q., Pang Y.-J., Yang Y.-H. (2006). Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 39-46
  146. Lodhi A.H., Charlwood B.V. (1996). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Rubia peregrina* L: In vitro accumulation of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46: 103-108
  147. Longo L., Scardino A., Vasapollo G., Blando F. (2007). Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 329-332
  148. Łuczkiwicz M., Cisowski W. (2001). Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 57-68
  149. Mabry T.J. (2001). Selected topics from forty years of natural products research: betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. *Journal of Natural Products*, 64: 1596-1604
  150. Makunga N.P., van Staden J., Cress W.A. (1997). The effect of light and 2,4-D on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus. *Plant Growth Regulation*, 23: 153-158
  151. Mantrova O.V., Dunaeva M.V., Kuzovkina I.N., Schneider B., Müller-Uri F. (1999). Effect of methyl jasmonate on anthraquinone biosynthesis in transformed madder roots. *Russ. Journal of Plant Physiology*, 46: 276-279
  152. Maoka T. (2009). Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483: 191-195
  153. Marchand L.L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56: 296-301
  154. Mathews-Roth M.M. (1993). Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691: 127-138

155. Matkowski A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26: 548-560
156. Meyer J.E., Pépin M.-F., Smith M.A.L. (2002). Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment. *Journal of Biotechnology*, 93: 45-57
157. Michaelakis A., Strongilos A.T., Bouzas E.A., Koliopoulos G., Couladouros E.A. (2009). Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives against the West Nile virus *Victor Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 104: 657-662
158. Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384: 240-242
159. Min B.S., Miyashiro H., Hattori M. (2002). Inhibitory effects of quinones on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research*, 16: 57-62
160. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Glazunov V.P., Chernoded G.K., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. (1999). Anthraquinone production by callus cultures of *Rubia cordifolia*. *Fitoterapia*, 70: 552-557
161. Misra N., Misra P., Datta S.K., Mehrotra S. (2005). In vitro biosynthesis of antioxidants from *Hemidesmus indicus* R. BR. cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41: 285-290
162. Mizukami H., Konoshima M., Tabata M. (1977). Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum callus* cultures. *Phytochemistry*, 16: 1183-1186
163. Mizutani H., Hashimoto O., Nakashima R., Nagai J. (1997). Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Rubia akane* NAKAI. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61: 1743-1744
164. Mohanty I., Joshi S., Trivedi D., Srivastava S., Gupta S.K. (2002). Lycoper prevents sugar-induced morphological changes and modulates antioxidant status of human lens epithelial cells. *British Journal of Nutrition*, 88: 347-54
165. Moreno D.A., García-Viguera C., Gil J.I., Gil-Izquierdo A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Review*, 7: 261-280
166. Mori T., Sakurai M., Sakuta M. (2001). Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science*, 160: 355-360
167. Mpiana P.T., Mudogo V., Tshibangu D.S.T., Kitwa E.K., Kanangila A.B., Lumbu J.B.S., Ngbolua K.N., Atibu E.K., Kakule M.K. (2008). Antisickling activity of anthocyanins from *Bombax pentadrum*, *Ficus capensis* and *Ziziphus mucronata*: Photodegradation effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 413-418
168. Mukundan U., Bhide V., Singh G., Curtis W. R. (1998). pH-mediated release of betalains from transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 241-245
169. Mulabagal V., Tsay H.-S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1): 29-48
170. Mulinacci N., Giaccherini C., Santamaria A.R., Caniato R., Ferrari F., Valletta A., Vincieri F.F., Pasqua G. (2008). Anthocyanins and xanthenes in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 414-420
171. Nahálka J., Blánek P., Gemeiner P., Matúšová E., Partlová I. (1996). Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. *Journal of Biotechnology*, 49: 153-161
172. Nakao M., Ono K., Takio S. (1999). The effect of calcium on flavanol production in cell suspension cultures of *Polygonum hydropiper*. *Plant Cell Reports*, 18: 759-763
173. Nam K.N., Son M.-S., Park J.-H., Lee E.H. (2008). Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF- $\kappa$ B: neuroprotective implications. *Neuropharmacology*, 55 (5): 819-825
174. Narayan M.S., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N. (2005). Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry*, 40: 351-358
175. Narayan M.S., Venkataraman L.V. (2000). Characterisation of anthocyanins derived from carrot (*Daucus carota*) cell culture. *Food Chemistry* 70: 361-363
176. Nazif N.M., Rady M.R., Seif El-Nasr M.M. (2000). Stimulation of anthraquinone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. *Fitoterapia*, 71: 34-40
177. Nishikawa K., Furukawa H., Fujioka T., Fujii H., Mihashi K., Shimomura K., Ishimaru K. (1999). Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Phytochemistry*, 52: 885-890
178. Ogasawara T., Cheba K., Tada M. (1993). Production in high-yield of a naphthoquinone by a hairy root culture of *Sesamum indicum*. *Phytochemistry*, 33: 1095-1098
179. Okamoto T., Yakazaki K., Tabata M. (1995). Biosynthesis of shikonin derivatives from L-phenylalanine via deoxyshikonin in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures and cell-free extracts. *Phytochemistry*, 38(1): 83-88
180. Palombo P., Fabrizi G., Ruocco V. et al. (2006). New evidence of lutein/zeaxanthin in skin health. *Beyond Beauty Paris Conference, Paris (Abstract)*
181. Papageorgiou V.P., Assimpoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaiu K.C. (1999). The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie International Editio*, 38: 270-300
182. Park H.-H., Lee S., Son H.-Y., Park S.-B., Kim M.S., Choi E.-J., Singh T.S.K., Ha J.-H., Lee M.-G., Kim J.-E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H., Kim S.-H. (2008). Flavonoids Inhibit Histamine Release and Expression of Proinflammatory Cytokines in Mast Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 31 (10): 1303-1311
183. Pasqua G., Monacelli B., Mulinacci N., Rinaldi S., Giaccherini C., Innocenti M., Vincieri F.F. (2005). The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 293-298
184. Pavlov A., Georgiev V., Kovatcheva P. (2003). Relationship between type and age of the inoculum cultures and betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* hairy root culture. *Biotechnology Letters*, 25: 307-309
185. Perassolo M., Quevedo C., Busto V., Ianone F., Giuliatti A.M., Rodriguez Talou J. (2007). Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 181-185
186. Pietrosiuk A., Kędzia B., Holderna-Kędzia E., Wiedenfeld H., Malinowski M., Furmanowa M. (2003). Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Lithospermum canescens* Lehm. *Herba Polonica*, 49(3/4): 209-215
187. Pietrosiuk A., Skopińska-Różewska E., Furmanowa M., Wiedenfeld H., Sommer E., Skolnicka I., Rogala E., Radomska-Leśniewska D., Bany J., Malinowski M. (2004b). Immunomodulatory effect of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum canescens* on cellular and humoral immunity in Balb/c mice. *Die Pharmazie*, 59(8): 640-642
188. Pietrosiuk A., Sykłowska-Baranek K., Wiedenfeld H., Wolinowska R., Furmanowa M., Jaroszyk E. (2006a). The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. *Plant Cell Reports*, 25: 1052-1058
189. Piovano A., Filippini R. (2007). Anthocyanins in *Catharanthus roseus* in vivo and in vitro: a review. *Phytochemistry Review*, 6: 235-242
190. Plata N., Konczak-Islam I., Jaram S., McClelland K., Woolford T., Franks P. (2003). Effect of methyl jasmonate and p-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 171-177
191. Poulsen C., Verpoorte R. (1991). Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and anthranilate synthase in plants. *Phytochemistry*, 30: 377-386
192. Qi J.-L., Zhang W.-J., Liu S.-H., Wang H., Sun D.-Y., Xu G.-H., Shi M.-W., Liu Z., Zhang M.-S., Zhang H.-M., Yang Y.-H. (2008). Expression analysis of light-regulated genes isolated from a full-length-enriched cDNA library of *Onosma paniculatum* cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 165 (14): 1474-1482
193. Rajendran L., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V., Prathibha K.R. (1992). Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters*, 14: 707-712
194. Ramos-Valdivia A.C., van der Heijden R., Verpoorte R. (1997). Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. *Planta*, 203: 155-161
195. Rao S.R., Ravishankar G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153
196. Revilla E., García-Beneytez E., Cabello F., Martín-Ortega G., Ryan J. M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography*, 915(1-2): 53-60
197. Rodríguez-Monroy M., Jiménez-Aparicio A., Dávila-Ortiz G., Sepúlveda-Jiménez G. (1994). Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnology Letters*, 16: 853-858

198. Rudat A., Göring H. (1995). Induction of betacyanin formation in cell cultures of *Chenopodium album* under UV-light irradiation. *Journal of Experimental Botany*, 46: 129-134
199. Saito K., Mizukami H. (2002). Plant cell cultures as producers of secondary compounds. Production of plant pigments. In: *Plant biotechnology and transgenic plants*. Ed. by Oksman-Caldentey K.-M., Barz W. CRC Press: 84-94
200. Sakamoto K., Lida K., Sawamura K., Hajiro K., Asada Y., Yoshikawa Y. (1994). Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 21-36
201. Sakuta M., Hirano H., Komamine A. (1991). Stimulation by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of betacyanin accumulation in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, 83: 154-158
202. Sankawa U., Otsuka H., Kataoka Y., Iitaka Y., Hoshi A., Kuretani K. (1981). Antitumor activity of shikonin, alkannin and their derivatives. II. X-Ray analysis of cyclo-alkannin leucoacetate, tautomerism of alkannin and cyclo-alkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 29(1): 116-122
203. Santos-Díaz M.S., Velásquez-García Y., González-Chávez M.M. (2005). Pigment production by callus of *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia*, 39: 619-626
204. Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. (2002). In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5): 669-670
205. Sato K., Nakayama M., Shigeta J. (1996). Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science*, 113: 91-98
206. Sato K., Yamazaki T., Okuyama E., Yoshihira K., Shimomura K. (1991). Anthraquinones production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry*, 30: 1507-1509
207. Savitha B.C., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Ravishankar G.A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41: 50-60
208. Schliemann W., Joy R.W. 4th, Komamine A., Metzger J.W., Nimtz M., Wray V., Strack D. (1996). Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry*, 42: 1039-1046
209. Schripsema J., Ramos-Valdivia A., Verpoorte R. (1999). Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry*, 51: 55-60
210. Sharma N., Kumar Sharma U., Malik S., Bhushan S., Kumar V., Verma S.C., Sharma N., Sharma M., Sinha A.K. (2008). Isolation and purification of acetylshikonin and B-acetoxyisovalerylshikonin from cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using rapid preparative HPLC. *Journal of Separation Science*, 31(4): 629-635
211. Shen C.C., Syu W.J., Li S.Y., Lin C.H., Lee G.H., Sun C.M. (2002). Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 65(12): 1857-1862
212. Shim J.J., Shin J.H., Pai T., Chung I.S., Lee H.J. (1999). Permeabilization of elicited suspension culture of madder (*Rubia akane* Nakai) cells for release of anthraquinones. *Biotechnology Techniques*, 13: 249-252
213. Shin K.S., Chakrabarty D., Ko J.Y., Han S.S., Paek K.Y. (2003). Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. *Plant Growth Regulation*, 39: 187-193
214. Shin K.S., Murthy H.N., Ko J.Y., Paek K.Y. (2002). Growth and betacyanin production by hairy roots of *Beta vulgaris* in airlift bioreactors. *Biotechnology Letters*, 24: 2067-2069
215. Shin S., Kim Y. (1996). Production of anthraquinone derivatives by hairy roots of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. *Saengyak Hakhoehi*, 27: 301-308
216. Sies H., Stahl W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1315S-1321S
217. Sim S.J., Chang H.N. (1993). Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor. *Biotechnology Letters*, 15(2): 145-150
218. Simantiras M., Leistner E. (1992). O-succinylbenzoate:coenzyme A ligase from anthraquinone producing cell suspension cultures of *Galium mollugo*. *Phytochemistry*, 31: 2329-2335
219. Smolarz H.D., Wegiera M. (2004). Antrachinony - składniki roślinne o właściwościach nie tylko leczniczych. *Postępy Fitoterapii*, 4 (14): 169-172
220. Sommer S., Köhle A., Mazaki K., Shimomura K., Bechthold A., Heine L. (1999). Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial *ubiC* gene. *Plant Molecular Biology*, 39: 683-693
221. Stahl W., Sies H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345-351
222. Stahl W., Sies H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 101-107
223. Stara D., Suchy V., Blanarik P. (1995). Tissue culture of *Rubia tinctorum* and production of anthraquinones. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 44: 167-1695
224. Steiner U., Schliemann W., Böhm H., Strack D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208: 114-124
225. Strack D., Vogt T., Schliemann W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62: 247-269
226. Strzałka K. (2005). Przemiany związków organicznych i energii u roślin. Fotosynteza i chemosynteza. Budowa i funkcja błon fotosyntetycznych. W: *Fizjologia roślin pod redakcją Jana Kopcewicza i Stanisława Lewaka*. PWN, Warszawa: 278-291
227. Sujata V., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. (1990). Induction of crocin, crocetin, picrocrocin and safranal synthesis in callus cultures of saffron (*Crocus sativus* L.). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12: 336-340
228. Tabata M., Miaukami H., Hiraoka N., Konoshima M. (1974). Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 13: 927-932
229. Tadhani M.B., Patel V.H., Subhash R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 323-329
230. Takano-Ohmuro H., Yoshida L.S., Yuda Y., Morioka K., Kitani S. (2008). Shikonin inhibits IgE-mediated histamine release by human basophils and Syk kinase activity. *Inflammation Research*, 57: 484-488
231. Takeda T., Inomata M., Matsuoka H., Hikuma M., Furusaki S. (2003). Release of anthocyanin from strawberry cultured cells with heating treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 15: 205-210
232. Taya M., Mine K., Kino-Oka M., Tone S., Ichi T. (1992). Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73: 31-36
233. Terahara N., Callebaut A., Ohba R., Nagata T., Ohnishi-Kameyama M., Suzuki M. (2001). Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry*, 58: 493-500
234. Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Narayan M. S., Ravishankar G. A. (2003). Food-grade chemical and biological agents permeabilize red beet hairy roots, assisting the release of betalains. *Biotechnology Progress*, 19: 1274-1282
235. Touno K., Tamaoka J., Ohashi Y., Shimomura K. (2005). Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 101-105
236. Trejo-Tapia G., Jimenez-Aparicio A., Rodriguez-Monroy M., De Jesus-Sanchez A., Gutierrez-Lopez G. (2001). Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 19-23
237. Trotin F., Moumou Y., Vasseur J. (1993). Flavonol production by *Fagopyrum esculentum* hairy roots and normal root cultures. *Phytochemistry*, 33: 929-931
238. Urbanek H., Bergier K., Saniewski M., Patykowski J. (1996). Effect of jasmonates and exogenous polysaccharides on production of alkannin pigments in suspension cultures of *Alkanna tinctoria*. *Plant Cell Reports*, 15: 637-641
239. Van Breemen R.B., Pajkovic N. (2008). Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Letters*, 269: 339-351
240. Van der Heijden R., Verpoorte R., Hoekstra S.S., Hoge J.H.C. (1994). Nordamnacanthal, a major anthraquinone from an Agrobacterium rhizogenes induced root culture of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32: 399-404
241. Van der Leer T., Wijnsma R., Van der Heijden R., Verpoorte R., Svendsen A.B. (1991). A comparative study of the effects of L-tryptophan and tryptamine on a nonalkaloid producing cell suspension culture of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29: 91-98
242. Van der Plas L.H.W., Hagendoorn M.J.M., Jamar D.C.L. (1998). Anthraquinones glycosylation and hydrolysis in *Morinda citrifolia* cell suspensions: regulation and function. *Journal of Plant Physiology*, 152: 235-241



243. Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y., Tsay H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 1-22
244. Vasconsuelo A., Giuletti A.M., Picotto G., Rodriguez-Talou J., Boland R. (2003). Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. *Plant Science*, 165: 429-436
245. Verbeek R., Plomp A.C., van Tol E.A.F., van Noort J.M. (2004). The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochemical Pharmacology*, 68: 621-629
246. Vieira C.C., Braga M.R., Figueiredo-Ribeiro R.C. (1995). Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 233-238
247. Walle T., Ta N., Kawamori T., Wen X., Tsuji P.A., Walle U.K. (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids - methylated versus unmethylated flavones. *Biochemical Pharmacology*, 73: 1288 - 1296
248. Wang J.W., Xia Z.H., Chu J.H., Tan R.X. (2004). Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 651-656
249. Wang W.J., Bai J.Y., Liu D.P., Xue L.M., Zhu X.Y. (1994). The anti-inflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B4 biosynthesis. *Yaoxue Xuebao*, 29: 161-165
250. Wang Y.-C., Huang T.-L. (2005). High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. *Journal of Chromatography A*, 1094: 99-104
251. Weathers P. J., Zobel R. W. (1992). Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. *Biotechnology Advances*, 10: 93-115
252. Wissgott U., Bortlik K. (1996). Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 298-302
253. Wohlpart A., Black S.M. (1973). Accumulation of betanin in disks of *Beta vulgaris* leaves. *Phytochemistry*, 12: 1325-1329
254. Xiang H., Guo Y. (1997). Studies on the production of anthraquinone by plant cell suspension culture. *Huanan Ligong Daxue Xuebao*, Ziran Kexueban, 25: 62-67
255. Yamamoto H., Yazaki K., Inoue K. (2000). Simultaneous analysis of shikimate-derived secondary metabolites in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 738: 3-15
256. Yang Y.-H., Huang J., Ding J. (2003). Interaction between exogenous brassinolide, IAA and BAP in secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Growth Regulation*, 39: 253-261
257. Yang Y.-H., Zhang H., Cao R.-Q. (1999). Effect of brassinolide on growth and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18: 89-92
258. Yen G.-C., Duh P.-D., Chuang D.-Y. (2000). Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry*, 70: 437-441
259. Yuan X., Wang Q., Zhao B., Wang Y. (2002). Improved cell growth and total flavonoids of *Saussurea medusa* on solid culture medium supplemented with rare earth elements. *Biotechnology Letters*, 24: 1889-1892
260. Zhang W., Curtis C., Kikuchi M., Franco C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162: 459-468
261. Zhong J.-J., Yoshida T. (1995). High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 1073-1079
262. Zhou R., Zhang Z. (1993). Organogenesis and pigmentation in cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1(3): 57-63
263. Zhou Y., Hirotani M., Yoshikawa T., Furuya T. (1997). Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Phytochemistry*, 44(1): 83-87
264. Zrýd J.P., Christinet L. (2004). Betalains. In: Davies K. (eds) *Plant pigments and their manipulation*, Annual Plant Review, Vol 14. CRC Press/Blackwell, Oxford: 185-213