

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

PRACA DOKTORSKA

**Polisacharydy w ziele i kulturach kalusowych
miodownika melisowatego
Melittis melissophyllum L. (*Lamiaceae*)**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816000813

Autor: mgr farm. Ewa Skrzypczak-Pietraszek

Promotor: prof. dr hab. dr h.c. Stanisław Kohlmünzer

Kraków, 1999

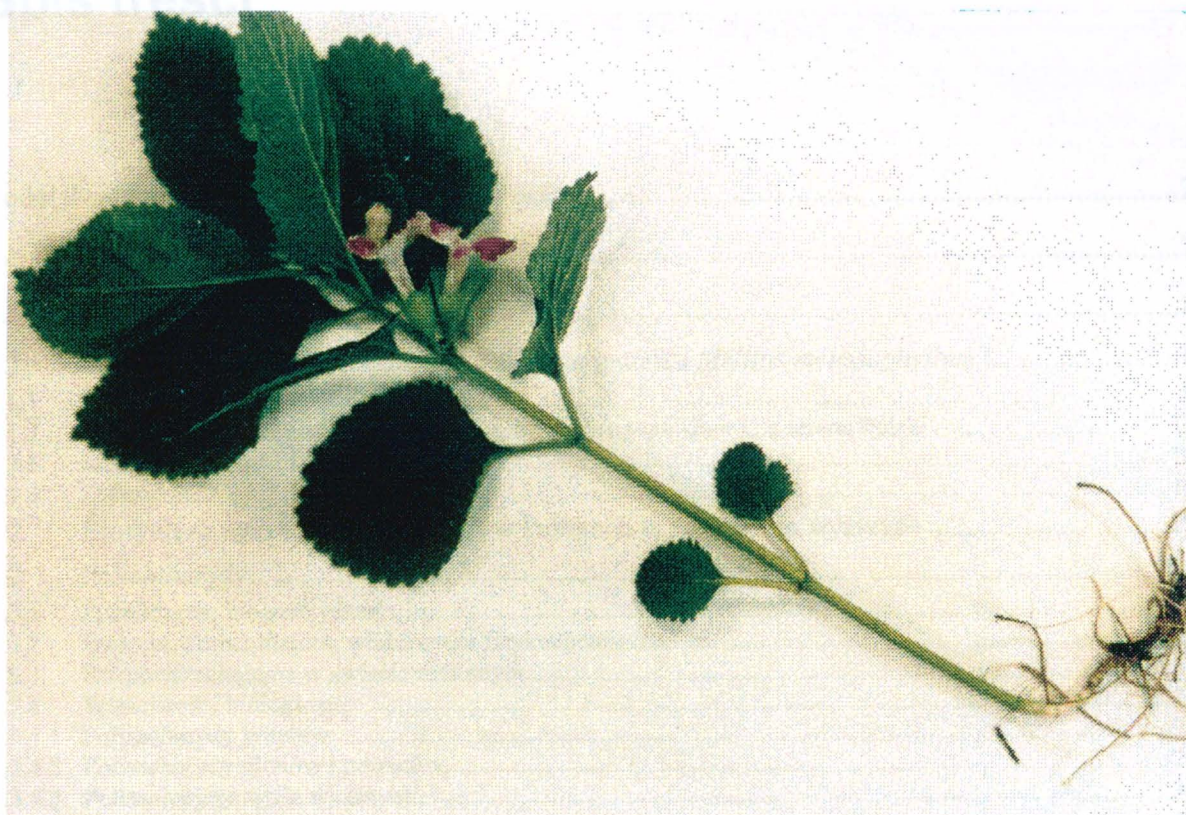
Podziękowania

Składam szczególnie gorące podziękowania Panu Profesorowi Stanisławowi Kohlmünzerowi, kierownikowi Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za wskazanie tematu pracy oraz za okazywaną mi stale życzliwość i pomoc.

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Lutosławie Skrzypczak z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Poznaniu za zainteresowanie mnie gatunkiem *Melittis melissophyllum* L. oraz za serdeczność i życzliwość.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Wolfgangowi Kreisowi z Instytutu Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Erlangen za umożliwienie mi przeprowadzenia części badań w jego Instytucie oraz Panu Doktorowi Andreasowi Henslowi za pomoc, szczególnie w interpretacji widm masowych.

Serdecznie dziękuję mojemu Mężowi, Jackowi za nadanie formy graficznej mojej pracy.



Zdj. 1. *Melittis melissophyllum* L. zebrany ze stanu naturalnego w lesie w Tyńcu k. Krakowa

1. Część doświadczalna	4
1. Kultury kalusowe <i>Melittis melissophyllum</i> L. — optymalizacja warunków	4
1.1 Materiał badawczy i jego przygotowanie	4
1.2 Stwierdzenie potencji	4
1.3 Warunki hodowli	4
1.4 Pomiar wzrostu kultur kalusowych	4
1.5 Wyniki	4
1.6 Podsumowanie wyników, wnioski i dyskusja	4
2. Izolacja i określanie struktury polisacharydów z ziela i tkanki kalusowej <i>Melittis melissophyllum</i> L.	6
2.1 Materiał badawczy	6
2.2 Aparatura, odczynniki i metody	6
2.3 Izolacja polisacharydów z badanego materiału	6
2.4 Oczyszczanie i frakcjonowanie polisacharydów	6
2.4.1 Chromatografia kolumnowa jonowymienności	6
2.4.2 Żelowa chromatografia kolumnowa GPC (gel-permeation chromatography)	7
2.5 Określanie masy cząsteczkowej wyizolowanych polisacharydów	7
2.6 Oznaczanie zawartości kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych	7
2.7 Struktura wyizolowanych polisacharydów	8
2.7.1 Analiza GLC octanów alditoli	8
2.7.1.1 Hydroliza kwasów polisacharydów	8
2.7.1.2 Redukcja	8
2.7.1.3 Acetylowanie	8
2.7.1.4 Wyniki	8
2.7.2 Analiza GLC-MS cząsteczek zmodyfikowanych octanów alditoli	8
2.7.2.1 Redukcja kwasów uronowych w polisacharydach kwaśnych	8
2.7.2.2 Oczyszczanie cząsteczek zmodyfikowanych octanów alditoli	8
2.8 Badanie obecności składników azotanowych we frakcjach polisacharydowych	9
2.9 Oznaczanie zawartości cukrów we frakcjach polisacharydowych metodą Dubois'a	9

Spis treści

Podziękowania	2
1. Wstęp i cel pracy	7
2. Część ogólna.....	8
2.1 Wiadomości farmakobotaniczne dotyczące gatunku <i>Melittis melissophyllum</i> L.	8
2.1.1 Systematyka i występowanie	8
2.1.2 Charakterystyka botaniczna gatunku <i>Melittis melissophyllum</i> L. z terenu Polski	12
2.1.3 Skład chemiczny.....	12
2.1.4 Zastosowanie w lecznictwie	16
2.2 Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach <i>in vitro</i> roślin wyższych	19
2.3 Polisacharydy.....	21
2.3.1 Pochodzenie biogenetyczne	21
2.3.2 Budowa, nomenklatura, właściwości fizykochemiczne.....	22
2.3.3 Rozpowszechnienie w świecie roślinnym.....	25
2.3.4 Właściwości biologiczne	26
2.3.4.1 Polisacharydy grzybów.....	27
2.3.4.2 Polisacharydy glonów i porostów.....	29
2.3.4.3 Polisacharydy roślin wyższych.....	31
2.3.5 Biosynteza w kulturach <i>in vitro</i>	42
3. Część doświadczalna	46
3.1 Kultury kalusowe <i>Melittis melissophyllum</i> L. — optymalizacja warunków	46
3.1.1 Materiał badawczy i jego przygotowanie	46
3.1.2 Stosowane pożywki	46
3.1.3 Warunki hodowli	47
3.1.4 Pomiary wzrostu kultur kalusowych.....	47
3.1.5 Wyniki	47
3.1.6 Podsumowanie wyników, wnioski i dyskusja.....	49
3.2 Izolacja i określanie struktury polisacharydów z ziela i tkanki kalusowej <i>Melittis melissophyllum</i> L.	65
3.2.1 Materiał badawczy	65
3.2.2 Aparatura, odczynniki i metody.....	65
3.2.3 Izolacja polisacharydów z badanego materiału	67
3.2.4 Oczyszczanie i frakcjonowanie polisacharydów	69
3.2.4.1 Chromatografia kolumnowa jonowymienna.....	69
3.2.4.2 Żelowa chromatografia kolumnowa GPC (gel-permeation chromatography).....	71
3.2.5 Określanie masy cząsteczkowej wyizolowanych polisacharydów	77
3.2.6 Oznaczanie zawartości kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych.....	79
3.2.7 Struktura wyizolowanych polisacharydów	82
3.2.7.1 Analiza GLC octanów alditoli	82
3.2.7.1.1 Hydroliza kwaśna polisacharydów	82
3.2.7.1.2 Redukcja.....	83
3.2.7.1.3 Acetylacja.....	83
3.2.7.1.4 Wyniki	83
3.2.7.2 Analiza GLC-MS częściowo zmetylowanych octanów alditoli	84
3.2.7.2.1 Redukcja kwasów uronowych w polisacharydach kwaśnych.....	84
3.2.7.2.2 Otrzymywanie częściowo zmetylowanych octanów alditoli	85
3.2.8 Badanie obecności składników niecukrowych we frakcjach polisacharydowych	91
3.2.9 Oznaczenie zawartości cukrów we frakcjach polisacharydowych metodą Dubois'a	93

4. Podsumowanie wyników i dyskusja.....	97
5. Wnioski	101
6. Piśmiennictwo	102
7. Chromatogramy	114
8. Wykaz rycin, tabel i skrótów użytych w tekście	147

1. Wstęp i cel pracy

Melittis melissophyllum L. – Miodownik melisowaty z rodziny *Lamiaceae* (*Labiatae*) jest byliną występującą w Europie. W Polsce spotyka się ten gatunek w rozproszonych stanowiskach na niżu po dolny regiel górski. Ziele miodownika (*Herba Melittidis*) ma różnorodne zastosowanie w medycynie ludowej m.in. jako środek przeciwzapalny, moczopędny, przeciwskurczowy, uspokajający i nasenny. Dotychczas skład chemiczny miodownika został jedynie częściowo poznany. Analiza dotyczyła frakcji etanolowej lub metanolowej (glukozydy irydoidowe, kwasy fenolowe, flawonoidy) oraz olejku eterycznego, uzyskanego z ziela za pomocą destylacji z parą wodną.

W literaturze nie znaleziono informacji na temat prowadzenia kultur kalusowych *Melittis melissophyllum* L. oraz izolacji i badania frakcji polisacharydowej z ziela rośliny gruntowej tego gatunku.

Obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania polisacharydami otrzymywanymi głównie z grzybów, a także z licznych gatunków roślin wyższych. Mogą one wykazywać cenne i różnorodne właściwości farmakologiczne np. immunostymulujące, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, hipoglikemiczne, hipotensyjne. Kultury *in vitro* mogą być również źródłem związków polisacharydowych o takim działaniu.

W Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie od wielu lat są prowadzone badania nad polisacharydami grzybów, roślin wyższych i ich kultur *in vitro*. Efektem tych prac było m.in. wyizolowanie i określenie struktury tylopilanu – homoglukanu z gatunku *Tylopilus felleus* (Bull.: Fr.) P.Karst. o aktywności immunomodulującej i przeciwnowotworowej.

Celem niniejszej pracy było:

- opracowanie optymalnych warunków prowadzenia kultur kalusowych *Melittis melissophyllum* L. w celu uzyskania materiału do izolacji polisacharydów,
- wyizolowanie, oczyszczenie i określenie struktury rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów z ziela i kultur kalusowych miodownika melisowatego.

2. Część ogólna

2.1 Wiadomości farmakobotaniczne dotyczące gatunku *Melittis melissophyllum* L.

2.1.1 Systematyka i występowanie

Rodzaj *Melittis* należy do rodziny *Lamiaceae* (*Labiatae*). Jest reprezentowany przez jeden gatunek* *Melittis melissophyllum* L.** – miodownik melisowaty (Tutin et al., 1972) – zdj.1. Roślina jest bardzo zmienna pod względem wielkości, kształtu i ząbkowania liści, ogruczenia kielicha, szypułek i górnej części łodygi oraz zabarwienia kwiatów (Pawłowski, 1967; Tutin et al., 1972). Na podstawie tych różnic (Tab. 1) wyodrębniono trzy podgatunki (Tutin et al., 1972):

- *Melittis melissophyllum* subsp. *melissophyllum* – rosnący w Europie Zachodniej i Środkowej,
- *Melittis melissophyllum* subsp. *carpatica* (Klokov) – występujący w Europie Środkowo-Wschodniej,
- *Melittis melissophyllum* subsp. *albida* (Guss.) – spotykany na południu Włoch, na Sycylii i Półwyspie Bałkańskim.

Miodownik melisowaty występuje tylko w Europie (Hegi, 1964; Ryc. 1.). Na północ sięga po Irlandię, południową część Wielkiej Brytanii, północną Francję i Belgię, Niemcy, Polskę. Na wschód jego występowanie rozciąga się po Litwę (do Wilna) i zachodnią Ukrainę. Południowy zasięg miodownika stanowi Grecja, południowe Włochy, Sycylia, Korsyka, wschodnia i środkowa Hiszpania oraz północna część Portugalii.

Melittis melissophyllum L. rośnie na nizinach i w niższych położeniach górskich, zwykle do wysokości 1400 m n.p.m. Występuje na stanowiskach zacienionych, w liściastych lasach i zaroślach, często na ciepłych, zalesionych zboczach (Hegi, 1964; Pawłowski, 1967; Tutin et al., 1972) – zdj.2. Jest gatunkiem wapieniolubnym (Broda, Mowszowicz, 1985).

* W 1957 r. Kłokow wyróżnił w obrębie rodzaju *Melittis* 9 gatunków zebranych w 3 serie. Nowo opisane gatunki różniły się tylko nielicznymi drobnymi cechami i występowało między nimi wiele form przejściowych. Takie ujęcie budziło poważne wątpliwości i dlatego Sóo i Borsos w 1962 r. podjęli się badań, w wyniku których wyodrębnili tylko dwa gatunki: *Melittis melissophyllum* L. – południowo i zachodnioeuropejski oraz *M. grandiflora* Sm. emend. Sóo. Według Pancer-Kotejowej cały zbadany materiał zielnikowy z obszaru Polski należy do gatunku *M. grandiflora* (Pawłowski, 1967). W 1971 r. zostały podjęte kolejne badania, na podstawie których Ball (Tutin et al., 1972) wyróżnił w rodzaju *Melittis* tylko jeden gatunek *Melittis melissophyllum* L. Takie stanowisko jest obecnie uznawane przez botaników (Tutin et al., 1972; Szafer et al., 1988; Mirek et al., 1995; Rutkowski, 1998).

** = *Melittis grandiflora* Sm., = *Melissa sylvestris* Lam. (Hegi, 1964)

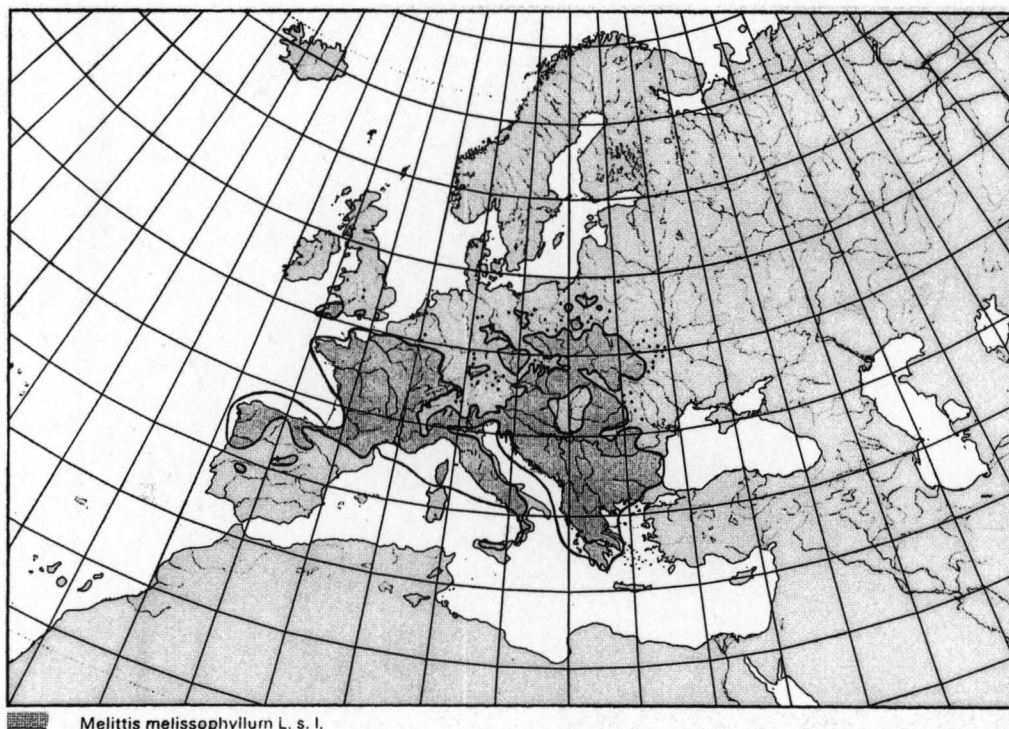
W Polsce rośnie w rozproszonych stanowiskach, głównie w południowej i wschodniej części kraju (Ryc. 2). Na północ sięga po Pojezierze Mazurskie (okolice Lubawy, Mragowa, Elku). Linia Sieradz-Wieluń-Opole stanowi – poza jednym wyjątkiem – zachodnią granicę występowania tego gatunku w Polsce. Miodownik spotykany jest głównie na niżu, w górach rzadziej, sięga tam po regiel dolny: Tatry po 1160 m n.p.m., Pieniny, Gorce po 380 m n.p.m., Sądecczyzna po 550 m n.p.m.

W pracach z lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych podano kilka stanowisk miodownika w Wielkopolsce południowej (Szulczewski, 1951; Pawłowski, 1967). Ostatnie badania prowadzone w latach dziewięćdziesiątych ich nie potwierdzają (Ryc. 2). Jedynie Celka (1998) podaje jedno nowe stanowisko miodownika w Wielkopolsce, na terenie średniowiecznego grodziska (nie uwzględnione na mapie – Ryc. 2.).

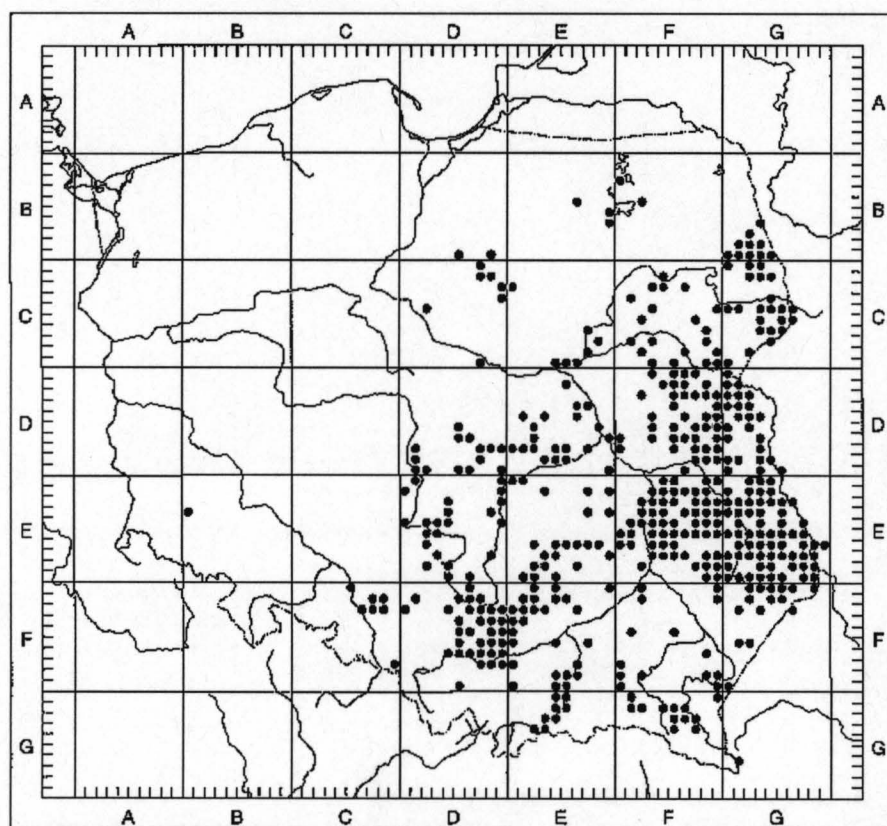
Melittis melissophyllum L. znalazł się na czerwonej liście roślin naczyniowych jako gatunek narażony (na terenie Wielkopolski), a także bezpośrednio zagrożony wymarciem (na Pomorzu Zachodnim) (Żukowski, Jackowiak, 1995). W województwie krakowskim (obecnie małopolskie) w czasie badań w latach 1993-97 odnaleziono szereg nowych stanowisk miodownika, ale wiele wcześniejszych danych uznano za historyczne (Ryc. 3.). Również na tym terenie uznano *Melittis melissophyllum* L. za gatunek rzadki i narażony na wymarcie (Zajac, Zajac, 1998).

Tab. 1. Cechy morfologiczne *Melittis melissophyllum* L. - różnice między podgatunkami (Tutin et al., 1972)

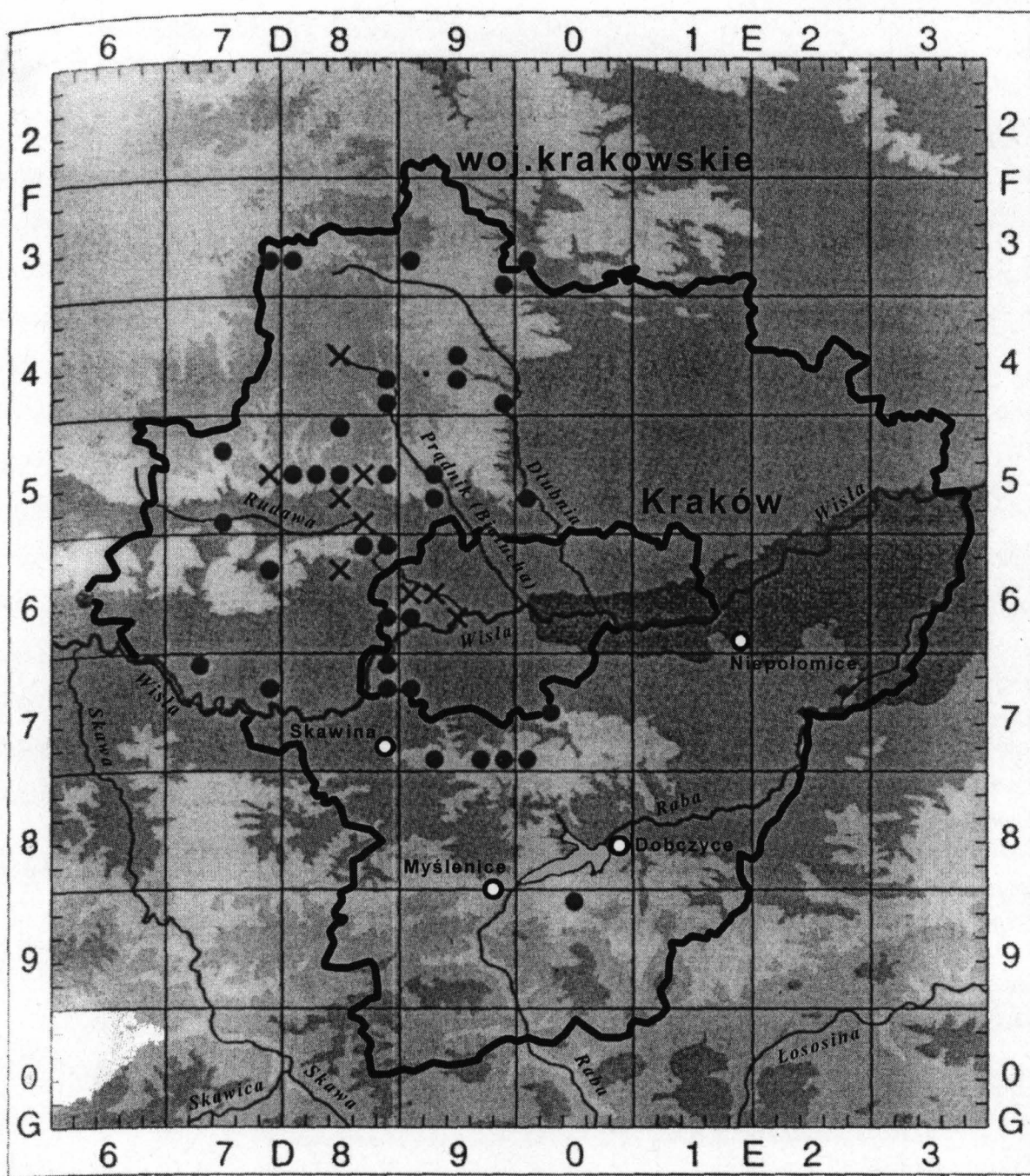
Podgatunek	<i>Melittis melissophyllum</i> subsp. <i>melissophyllum</i>	<i>Melittis melissophyllum</i> subsp. <i>carpatica</i> (Klokov)	<i>Melittis melissophyllum</i> subsp. <i>albida</i> (Guss.)
Łodyga	rzadko ogruczołona lub bez włosków gruczołowych		gęsto pokryta małymi włoskami gruczołowymi
Długość największych liści	5 – 7 cm (max 9 cm)	7 – 15 cm (min 6 cm)	6 – 15 cm
Liczba dużych ząbków po każdej stronie brzegu blaszki liściowej	10 – 20 (max 22)	20 – 32	20 – 30
Korona kwiatu	biała, różowa, purpurowa lub pstra	zwykle biała, czasami z różowymi lub purpurowymi plamkami na dolnej wardze	biała, często z różowymi lub purpurowymi plamkami na dolnej wardze, rzadko purpurowa



Ryc. 1. Występowanie miodownika melisowatego w Europie – bez uwzględnienia podgatunków (Meusel, 1978)



Ryc. 2. Rozmieszczenie stanowisk *Melittis melissophyllum* L. na terenie Polski - według danych na rok 1998 (Zajac, Zajac, manuskrypt).



Ryc. 3. Rozmieszczenie *Melittis melissophyllum* L. na terenie dawnego woj. krakowskiego (Zajac, Zajac, 1998)

- stanowiska aktualne
- x stanowiska historyczne

2.1.2 Charakterystyka botaniczna gatunku *Melittis melissophyllum* L. z terenu Polski

Miodownik melisowaty (zdz.3., 4.) jest byliną o silnym, przyjemnym, cytrynowym zapachu. Ma dość krótkie kłace z licznymi sznurowatymi korzeniami. Łodyga jest pojedyncza, wysokości 30-50 cm (max 80 cm), dość gęsto owłosiona białymi, sztywnymi włoskami. Liście są długie na 5-10 cm (max 16 cm), owłosione, najczęściej eliptyczne lub szeroko eliptyczne (rzadko eliptycznie lancetowate), na wierzchołku zwykle zaokrąglone, karbowane lub ząbkowane. Najniższa para liści jest wyraźnie zmniejszona. Kwiaty są zebrane po 2-6 w nibykółki w kątach górnych i środkowych liści. Kielich (10-20 mm) jest szeroko dzwonekowany, dwuwargowy, o ząbkach szeroko trójkątnie jajowatych. Zwykle kielich i szypułka są niezbyt obficie ogruczone. Korona białawożółta z ciemnymi plamkami i fioletoworóżową środkową klapą wargi dolnej jest długa na 3-5 cm, o rurce prostej, wystającej z kielicha. Wargę górną jest słabo sklepioną. Owocem jest rozłupka długa na 3,5-5 mm, jajowato trójkątna, na szczycie zaokrąglona. Roślina kwitnie w maju i czerwcu (Pawłowski, 1967; Broda, Mowszowicz, 1985; Szafer et al., 1988). Gatunek *Melittis melissophyllum* L. został szczegółowo opisany pod względem morfologicznym i anatomicznym przez Chybowskiego (1979).

2.1.3 Skład chemiczny

Skład chemiczny gatunku *Melittis melissophyllum* L. został dotychczas jedynie częściowo poznany.

Salgues (1942) badał zawartość kumaryny (wzór I) w liściach miodownika melisowatego. W materiale krajowym – w ziele zabranym w okolicach Majdanu (k. Lublina) potwierdzono jej obecność (Świątek, Chybowski, 1982). Związek wyizolowano w postaci krystalicznego osadu, określono temperaturę topnienia i potwierdzono tożsamość metodą spektrofotometryczną w nadfiolecie.

W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu w Rzymie ze świeżego ziele *Melittis melissophyllum* L. wyodrębniono glukozydy irydoidowe: harpagid, octan harpagidu (Scarpati et al., 1965), melitozyd (Scarpati, Esposito, 1967a), monomelitozyd (Scarpati, Esposito, 1967b), ajugol, ajugozyd (Guiso et al., 1974) – wzory II, III, IV. Określono strukturę i konfigurację tych związków metodami spektralnymi (¹³C NMR, UV, IR) i chemicznymi. Świątek i Chybowski (1982) potwierdzili za pomocą chromatografii bibułowej dwukierunkowej obecność wyżej wymienionych glukozydów irydoidowych w materiale krajowym. Dodatkowo stwierdzono obecność

czterech niezidentyfikowanych składników dających reakcje barwne właściwe irydoidom. *Badano* frakcje wyizolowane z liści, kwiatów, części podziemnych i owoców. We wszystkich tych organach stwierdzono identyczny skład jakościowy związków irydoidowych. Kooiman (1972) uzyskał podobne wyniki. Badał zawartość związków irydoidowych w owocach *Melittis melissophyllum* L. i stwierdził obecność harpagidu, octanu harpagidu, melitozydu, monomelitozydu.

Świątek i Chybowski (1982) wyodrębnili z ziela *Melittis melissophyllum* L. frakcję kwasów fenolowych i frakcję flawonoidową. Stwierdzono (za pomocą chromatografii bibułowej dwukierunkowej) obecność następujących kwasów fenolowych: *p*-hydroksybenzoesowego, wanilinowego, syringowego, *o*-kumarowego, *p*-kumarowego, kawowego, ferulowego i melilotowego (wzory V, VI, VII) oraz siedmiu innych niezidentyfikowanych. Występowanie kwasu *o*-kumarowego i melilotowego potwierdzono metodą spektrofotometryczną w nadfiolecie. Kwasy fenolowe występują w ziele zarówno w stanie wolnym, jak i związanym, ponieważ wykryto je w ekstrakcie przed i po przeprowadzonej hydrolizie. Badania przeprowadzone na materiale zebranym we Francji przez Lamaisona i innych (1991) wskazują, że kwiaty miodownika melisowatego nie zawierają kwasu rozmarynowego, a całkowita zawartość pochodnych kwasu hydroksycynamonowego wynosi 0,7 % suchej masy surowca.

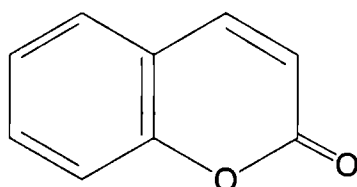
Stwierdzono obecność dwóch flawonów: luteoliny i 7-*O*-glukozydu luteoliny (wzór VIII) oraz pięciu innych nierozpoznanych substancji o charakterze flawonoidów (Świątek, Chybowski, 1982).

Z ziela *Melittis melissophyllum* L. subsp. *albida* Guss. zebranego w Grecji z terenu Peloponezu uzyskano olejek eteryczny za pomocą destylacji z parą wodną (Skaltsa-Diamantidis et al., 1991). Przeprowadzono jego analizę stosując kapilarną chromatografię gazową i spektrometrię masową. Zidentyfikowano 40 związków. Głównymi składnikami olejku są:

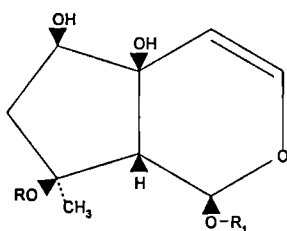
- α -terpineol17,81 %
- octan chryzantenylu.....12,33 %
- tlenek kariofylenu.....10,83 %
- 6,10,14-trimetylopentadekan-2-on6,88 %
- δ -terpineol.....3,67 %
- kamfora.....3,61 %

W wyciągu etanolem z miodownika melisowego stwierdzono obecność cukrów prostych: glukozy i fruktozy (Chybowski, 1979).

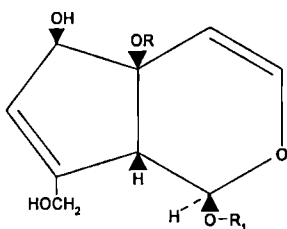
W literaturze nie znaleziono żadnych informacji na temat badania frakcji polisacharydowych *Melittis melissophyllum* L.



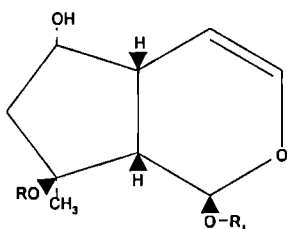
I Kumaryna



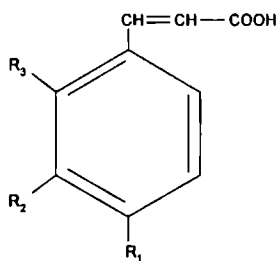
II Octan harpagidu (R=Ac, R₁=glukoza),
harpagid (R=H, R₁=glukoza)



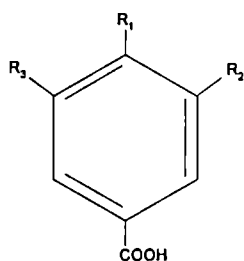
III Monomelitozyd (R=H, R₁=glukoza)
melitozyd (R=R₁=glukoza)



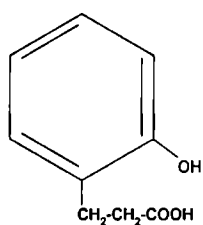
IV Ajugozyd (R=Ac, R₁=glukoza)
ajugol (R=H, R₁=glukoza)



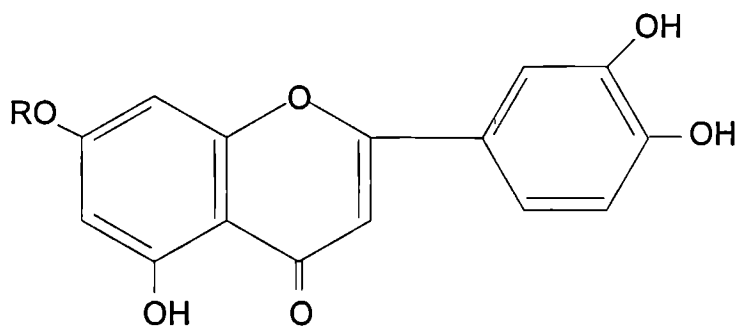
- V Kwas kawowy ($R_1=R_2=OH$, $R_3=H$)
 kwas p-kumarowy ($R_1=OH$, $R_2=R_3=H$)
 kwas o-kumarowy ($R_1=R_2=H$, $R_3=OH$)
 kwas ferulowy ($R_1=OH$, $R_2=OCH_3$, $R_3=H$)



- VI Kwas p-hydroksy-benzoesowy ($R_1=OH$, $R_2=R_3=H$)
 kwas wanilinowy ($R_1=OH$, $R_2=OCH_3$, $R_3=H$)
 kwas syringowy ($R_1=OH$, $R_2=R_3=OCH_3$)



- VII Kwas melilotowy



- VIII Luteolina ($R=H$); 7-O-glukozyd luteoliny ($R=\text{glukoza}$)

2.1.4 Zastosowanie w lecznictwie

Pierwsze wzmianki dotyczące miodownika pochodzą od Pliniusza i Dioskuridesa. W roku 1542 *Melittis* został po raz pierwszy opisany jako roślina lecznicza przez Leonarda Fuchsa pod nazwą *Melissa* lub *Melissophyllum* (Hegi, 1964).

Ziele miodownika (*Herba Melittidis*) znajduje zastosowanie w medycynie ludowej. W piśmiennictwie można znaleźć informacje o stosowaniu tego surowca w wielu różnorodnych schorzeniach.

Madaus (1938) – cytując Leclerc'a – podaje działanie rozkurczowe miodownika (związane z obecnością kumaryny) u pacjentów, którzy nie mogą stosować silniej działających środków. Napar 5% daje dobre rezultaty w leczeniu bezsenności u dzieci i osób starszych. Przyjęty po posiłku ułatwia trawienie i działa uspokajająco, zwłaszcza u chorych skarżących się również na zawroty głowy i stany lękowe. Surowiec zwiększa diurezę i powoduje, że mocz staje się klarowny. Leclerc wysnuwa z tego wniosek, że roślina ma też właściwości antyseptyczne.

Fournier (1948) podaje, że miodownik wykazuje podobne działanie jak inne rośliny zawierające kumarynę (np. *Asperula odorata*, czy *Melilotus officinalis*), a także jak *Melissa officinalis*. W medycynie ludowej stosowany jest jako: antispasmodicum, antidiarrhoicum, digestivum, diureticum, depurativum, emmenagogum, hypnoticum. Ze względu na działanie przeciwzapalne i antyseptyczne zewnętrznie stosowany jest do płukania gardła i do okładów na rany. Roślina zwiększa wydzielanie moczu. Takie działanie wykazują szczególnie kwiaty. Miodownik stosowany jest najczęściej w postaci 5% naparu, 3 razy dziennie po jednej szklance. Odwary przygotowywane są z 50-100g surowca na 1 litr wody.

Hegi (1964) podaje, że *Melittis melissophyllum* używany jest w medycynie ludowej w podobnych zastosowaniach jak melisa, czy majeranek. Uważa się, że przyspiesza gojenie ran, działa moczopędnie i „czyszcząco” na krew. Stosowany jest również w nieżytach górnych dróg oddechowych. Podawany jest zwykle jako napar, a czasem jako napój winopodobny.

Jurkiewicz i Miszenin (1974) podają, że ziele miodownika stosowane jest w leczeniu chorób wrzodowych przewodu pokarmowego oraz jako środek przeciwzapalny i moczopędny.

W artykule „*Secrets et vertus des plantes medicinales*” (1977) podano zastosowanie ziela *Melittis melissophyllum* jako: antisepticum, diureticum, emmenagogum, sedativum do leczenia nieżytu wiosennego spojówek, dny moczanowej, zaburzeń miesiączkowania, stanów niepokoju, zaburzeń snu i równowagi.

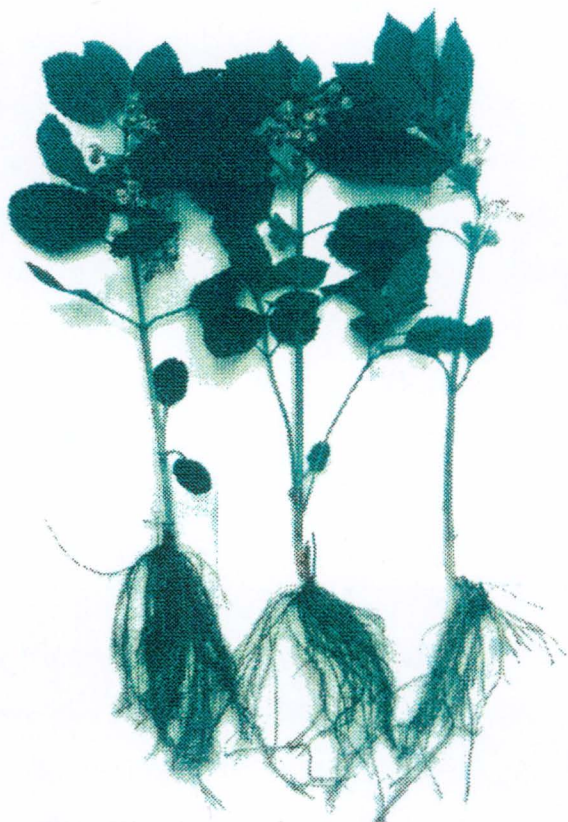
Turowska i Cyunel (1989), a także Broda i Mowszowicz (1985) wspominają o zastosowaniu ziela miodownika melisowatego jako hypotonicum.

Stwierdzono za pomocą testu chemicznego, że kwiaty *Melittis melissophyllum* wykazują właściwości przeciwutleniające (Lamaison et al., 1991).

Ziele miodownika nie jest obecnie surowcem farmakopealnym, ale Imbesi (1964) oraz Penso (1983) wymieniają *Melittis melissophyllum* L. jako roślinę znajdującą się we wcześniejszych wydaniach Farmakopei Francuskiej.



Zdj. 2. *Melittis melissophyllum* L. – roślina na stanowisku naturalnym w lesie w Tyńcu k. Krakowa



Zdj. 3. *Melittis melissophyllum* L. zebrany ze stanu naturalnego



Zdj. 4. *Melittis melissophyllum* L. zebrany ze stanu naturalnego

2.2 Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych

(Furmanowa, 1987; Balandrin, Klocke, 1988; Berlin, 1988; Endress, 1994)

W ciągu ostatnich dwudziestu lat obserwuje się rosnące zainteresowanie wykorzystaniem możliwości produkcji metabolitów wtórnych przez tkanki roślinne hodowane w warunkach kultur *in vitro*. Badania w tym zakresie dotyczą przede wszystkim związków czynnych farmakologicznie. Kultury tkankowe mogą stanowić alternatywne – w stosunku do roślin gruntowych – źródło metabolitów wtórnych. Hodowle *in vitro* posiadają wiele zalet. Umożliwiają prowadzenie badań w ściśle kontrolowanych warunkach, niezależnych od pory roku, czynników klimatycznych i geograficznych. Metoda hodowli *in vitro* umożliwia otrzymywanie związków z roślin niedostępnych (np. egzotycznych, chronionych itp.) lub rzadko występujących na danym terenie. Zdarza się, że w kulturach tkankowych wytwarzane są związki nie występujące w roślinie macierzystej, czasem nawet pojawiają się zupełnie nowe substancje, nie znane w innych gatunkach (Tab. 2).

Biosynteza metabolitów wtórnych może zależeć od stopnia zróżnicowania tkanki. Kultury nie zróżnicowane (kalusowe, zawieszinowe) mogą wytwarzać inne substancje (lub takie same, ale w innych ilościach) niż kultury organów (np. korzeniowe, pędowe) uzyskane z tej samej rośliny. Tworzenie się niektórych związków związane jest z pewnym ukierunkowanym różnicowaniem się tkanki. Formowanie się pączków pędowych i pędów indukuje np. biosyntezę kardenolidów w kulturach kalusowych *Digitalis lanata* Ehrh. oraz monoterpenowych składników olejków lotnych w kulturach *Mentha piperita* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Rosmarinus officinalis* L. Tworzenie się korzeni jest konieczne do biosyntezy w kulturach *in vitro* np. alkaloidów tropanowych (dla *Atropa belladonna* L., *Hyoscyamus niger* L., *Scopolia parviflora*), forskoliny (dla *Coleus forskohlii* Briq.), czy olejków czosnkowych (dla *Allium cepa* L.).

W kulturach tkankowych mogą być wytwarzane wszystkie typy związków występujące w świecie roślinnym. Na ogół jednak hodowle *in vitro* produkują metabolity wtórne w ilości mniejszej niż rośliny gruntowe. Zwiększenie wydajności próbuje się osiągnąć m.in. przez:

- optymalizację składu pożywki i warunków hodowli,
- aktywację i modyfikację dróg biosyntezy pożądaných metabolitów (dodatek prekursorów, elicitorów itp.),
- selekcję wysokowydajnych szczepów.

Tego typu działania przynoszą efekty i niektóre związki wytwarzane są w kulturach tkankowych w ilości równej, a czasem wielokrotnie przewyższającej ich zawartość w roślinie macierzystej (Tab. 3). Przykłady dotyczą biosyntezy metabolitów wtórnych na skalę laboratoryjną. Przy przechodzeniu na skalę przemysłową pojawiają się jednak różnorodne problemy m.in. natury technologicznej i ekonomicznej (opłacalność produkcji). W większości przypadków nie zostały one rozwiązane i dlatego – jak dotychczas – jest tylko kilka przykładów przemysłowego wykorzystywania kultur *in vitro* do pozyskiwania związków czynnych. Wymienić tu trzeba produkcję szikoniny, kwasu rozmarynowego i berberyny. Są również doniesienia na temat pozyskiwania immunologicznie aktywnych polisacharydów z kultur zawiesinowych *Echinacea purpurea* (L.) Moench. (Wagner et al., 1989).

W kulturach tkankowych roślin z rodziny *Lamiaceae* wytwarzane są metabolity wtórne należące do różnych grup chemicznych (Skrzypczak-Pietraszek, Grzybek, 1997): monoterpeny, pochodne fenylopropanu, diterpeny (np. forskolina, sklareol, tanszinony, ferruginol), depsydy (np. kwas rozmarynowy), estry enolowe kwasu kawowego, flawonoidy, antocyjany, fitoekdysteroidy, polisacharydy.

Tab. 2. Przykłady nowych związków znalezionych w kulturach *in vitro*, które nie są wytwarzane w tkankach odpowiednich gatunków roślin gruntowych (wg.: Berlin, 1988)

Związek	Kultura tkankowa wyprowadzona z gatunku:
Epchrozyna	<i>Ochrosia elliptica</i>
Panikulid A	<i>Andrographis paniculata</i> Nees.
Pericyna	<i>Picralima nitida</i> Stapf.
Rutakulina	<i>Ruta graveolens</i> L.
Tarenozyd	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis.
Woafryna A i B	<i>Voacanga africana</i> Stapf.

Tab. 3. Wybrane przykłady metabolitów wtórnych wytwarzanych w kulturach tkankowych w ilościach równych lub większych niż w roślinie gruntowej (wg.: Endress, 1994 – zmodyfikowane)

Związek	Gatunek rośliny	ZK:ZR*
Ajmalicyna	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	3,0
Antrachinony	<i>Cassia tora</i> L. <i>Galium aparine</i> L. <i>Morinda citrifolia</i> L. <i>Rubia fruticosa</i>	10,0 13,5 – 20,0 8,0 8,0
Berberyna	<i>Coptis japonica</i> Mak.	1,7
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.	3,9
Ginsenozydy	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	6
Kofeina	<i>Coffea arabica</i> L.	1
Kwas rozmarynowy	<i>Coleus blumei</i> Benth.	5,0 (7,5)

Związek	Gatunek rośliny	ZK:ZR*
Nikotyna	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	3,6
Serpentyna	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	1,6
Szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc.	9,0 (15,0)
Tryptolid	<i>Trypterygium wilfordii</i>	50,0
Ubichinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	63,0
Wisnadyna	<i>Ammi visnaga</i> Lamarck	10

- * zawartość związku w przeliczeniu na suchą masę:
 Z_K – w kulturze tkankowej
 Z_R – w roślinie gruntowej

2.3 Polisacharydy

2.3.1 Pochodzenie biogenetyczne

Substancje naturalne obecne w roślinach dzielimy na pierwotne i wtórne. Według definicji Kohlmünzera (1998):

„substancje podstawowe, czyli pierwotne, mają charakter metabolitów, które w zasadzie są spotykane w każdej roślinie, spełniają podstawowe funkcje fizjologiczne, stanowiąc substancje energetyczne, budulcowe lub zapasowe. Są to cukry proste, skrobia, tłuszcze, chlorofil, aminokwasy, białka, kwasy nukleinowe. Substancje te są niezbędne do życia rośliny. Substancje wtórne są wytworem wyspecjalizowanej przemiany materii i nie można im przypisać podstawowej funkcji w życiu rośliny. Ich występowanie jest ograniczone do niektórych mniejszych lub większych grup systematycznych świata roślinnego.”

Endress (1994) określa metabolizm wtórny jako syntezę, metabolizm i katabolizm endogennych związków przez wyspecjalizowane białka – enzymy. Rezultatem tych procesów są substancje nazywane metabolitami wtórnymi. Różnicowanie komórek jest podstawowym elementem regulacji metabolizmu u roślin wyższych. Biosynteza metabolitów wtórnych zwykle prowadzona jest przez wyspecjalizowane komórki i zachodzi tylko w określonym stadium rozwoju rośliny.

Precyzyjny podział na substancje pierwotne i wtórne nie zawsze jest możliwy, gdyż np. niekiedy metabolity wtórne odgrywają jakąś fizjologiczną rolę w roślinie (Kohlmünzer, 1998). Nie można jednoznacznie określić, czy polisacharydy – jako cała grupa związków – są produktami pierwotnego, czy wtórnego metabolizmu. Tylko niektóre z nich: np. podstawowe materiały budulcowe komórek roślinnych (celuloza, hemiceluloza), czy materiały energetyczne i zapasowe (skrobia, inulina) można bez żadnych wątpliwości zaliczyć do

metabolitów pierwotnych. Inne liczne polisacharydy (np. śluzы roślinne) – o skomplikowanej budowie, często charakterystyczne tylko dla określonej grupy systematycznej, bez wyraźnej roli fizjologicznej w roślinie – mają cechy metabolitów wtórnych.

Polisacharydy biogenetycznie wywodzą się z metabolizmu podstawowego cukrów prostych. Istotną rolę w ich biosyntezie odgrywają aktywowane formy cukrów prostych w postaci odpowiednich nukleotydodifosforanów: urydynodifosforanu (UDP), guanidynodifosforanu (GDP) lub adenzynodifosforanu (ADP), rzadziej w postaci tymidynodifosforanu (TDP) i dezoksyurydynodifosforanu (dUDP). Za pośrednictwem tych połączeń i przy udziale odpowiednich enzymów zachodzi tworzenie polimerów – polisacharydów (Kohlmünzer, 1998).

2.3.2 Budowa, nomenklatura, właściwości fizykochemiczne

(Aspinall, 1970; Harborne, 1973; Bojarski, 1989; Kohlmünzer, 1998)

Polisacharydy, czyli wielocukry, stanowią spolimeryzowane cząsteczki złożone z co najmniej 10 cukrów prostych (najczęściej heksoz lub pentoz). Zwykle są to związki o bardzo dużej masie cząsteczkowej, o budowie liniowej, rozgałęzionej lub pierścieniowej. Poszczególne cząsteczki cukrów są połączone wiązaniami α - lub β -glikozydowymi. Przy tworzeniu takiego wiązania cząsteczka jednego cukru łączy się półacetalową grupą hydroksylową (przy węglu C_1) z dowolną grupą alkoholową (przy C_2 , C_3 , C_4 lub C_6) drugiego cukru; powstały dwucukier łączy się grupą półacetalową z grupą alkoholową następnego cukru itd. Przy tej reakcji wydzielą się cząsteczka wody. W czasie polimeryzacji niektóre cukry mogą być podstawione w dwóch pozycjach, tworząc w ten sposób rozgałęzioną strukturę łańcucha. Wiązanie może mieć konfigurację α lub β , w zależności od budowy stereochemicznej cukrów prostych i oba typy wiązań mogą występować w tej samej cząsteczce.

Najbardziej ogólny wzór sumaryczny polisacharydów jako przedstawicieli węglowodanów jest następujący:



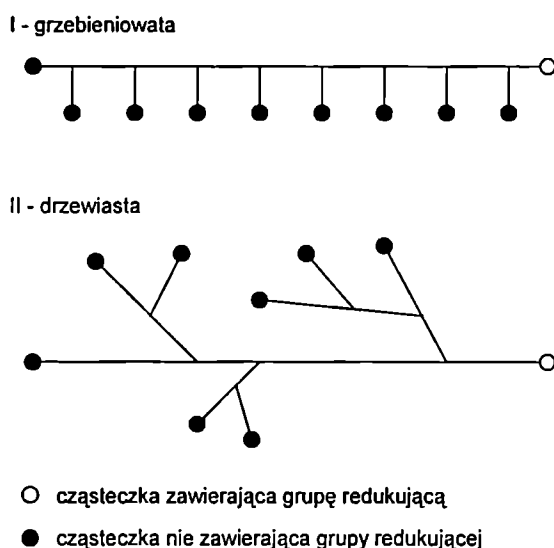
Zdarza się, że niektóre związki zawierają w cząsteczce wodór i tlen w trochę innym stosunku niż w cząsteczce wody, a także nieraz inne pierwiastki np. azot lub siarkę.

Większość polisacharydów posiada na jednym końcu redukującą grupę monosacharydową (aldehydową lub ketonową). Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej zanikają jednak właściwości redukcyjne. Istnieją również związki polisacharydowe o budowie pierścieniowej, które nie posiadają żadnej grupy redukującej.

Ze względu na budowę chemiczną polisacharydy dzielimy na:

- homopolisacharydy – składające się z jednego rodzaju cukrów prostych np.
 - z cząsteczek glukozy – glukany (np. skrobia, glikogen, celuloza),
 - z cząsteczek fruktozy – fruktany (np. imulina),
 - z cząsteczek arabinozy, ksylozy, mannozy, galaktozy itd. odpowiednio arabany, ksylany, mannany, galaktany,
- heteropolisacharydy – zbudowane z cząsteczek różnych cukrów prostych

Najprostszym przykładem homopolisacharydów o budowie liniowej jest celuloza. U polisacharydów o budowie rozgałęzionej boczne łańcuchy mogą tworzyć różne struktury np. grzebieniowate (I) lub drzewiaste (II) – Ryc. 4. W przypadku polisacharydów (szczególnie heteroglikanów) o bardzo rozgałęzionym łańcuchu trudno jest ustalić kompletną sekwencję cukrów prostych. Często tylko określa się z jakich powtarzających się podjednostek oligosacharydowych składa się makrocząsteczka.



Ryc. 4. Struktury tworzone przez polisacharydy (wg.: Aspinall, 1970)

Nazwy heteropolisacharydów o skomplikowanej budowie złożonych z licznych monosacharydów możemy tworzyć od nazw cukrów prostych, wymieniając je w porządku alfabetycznym np. arabinogalakto-glukoksylan. Aby jednak uniknąć tak skomplikowanego nazewnictwa, dla bardzo złożonych polisacharydów często stosujemy nazwy utworzone od gatunku rośliny, z której wyizolowano związek. Inną możliwością – często stosowaną – jest wymienienie tylko jednego lub dwóch cukrów prostych występujących w największej ilości w polisacharydzie.

W skład polisacharydów oprócz cukrów prostych (pentoz i heksoz) mogą wchodzić pochodne heksoz, takie jak:

- kwasy uronowe (np. galakturonowy, glukuronowy),
- dezoksyheksozy,
- heksozaminy,
- pochodne metylowe.

Polisacharydy mogą mieć charakter obojętny lub kwaśny (gdy w ich skład wchodzi reszty kwasowe np. SO_4^{2-} lub kwasy uronowe).

Aspinall (1970) podaje definicję polisacharydów jako polimerów cukrowych zbudowanych z periodycznie powtarzających się, ściśle określonych jednostek strukturalnych, w których dominującymi, ale nie wyłącznymi są wiązania *O*-glikozydowe.

Zgodnie z tą definicją do polisacharydów zaliczymy również:

- proteoglikany – w których periodycznie powtarzające się sekwencje reszt cukrowych tworzą polisacharydowe podjednostki związane z białkami za pomocą różnych typów wiązań chemicznych,
- peptydoglikany – posiadają łańcuchy polisacharydowe kowalencyjnie związane mostkami peptydowymi,
- lipopolisacharydy – mają łańcuchy polisacharydowe kowalencyjnie połączone z jednostkami lipidowymi,
- połączenia z grupy kwasu tejchonowego.

Ogólną reakcją barwną wskazującą na obecność polisacharydów jest reakcja Molischa: do badanej próbki dodajemy alkoholowy roztwór α -naftolu lub tymolu i kilka kropli stężonego kwasu siarkowego. W obecności związków węglowodanowych pojawia się zabarwienie czerwone lub czerwono fioletowe.

Właściwości fizykochemiczne wielocukrów różnią się znacznie od właściwości mono- i oligosacharydów: wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej polisacharydów maleje ich rozpuszczalność w wodzie oraz zanika słodki smak.

Polisacharydy nie tworzą roztworów właściwych, niektóre mogą tworzyć roztwory koloidalne. Ogrzewanie wodnego roztworu powoduje depolimeryzację związków i – na skutek tego – zmniejszenie jego lepkości.

Również pod wpływem hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej zachodzi rozkład polisacharydów na cukry prostsze o mniejszej cząsteczce, czasem dwucukry. Drastyczne warunki hydrolizy prowadzą do uzyskania cukrów prostych. Hydroliza enzymatyczna często

zachodzi w organizmach żywych: w organach roślinnych i narządach zwierzęcych. Dzięki temu polisacharydy zapasowe mogą być wykorzystane jako źródło energii.

2.3.3 Rozpowszechnienie w świecie roślinnym

(Aspinall, 1970; Harborne, 1973; Franz, 1991)

Polisacharydy są bardzo rozpowszechnionymi naturalnymi związkami organicznymi. Najbardziej znanymi wielocukrami roślinnymi są:

- celuloza – podstawowy materiał budulcowy ściany komórkowej,
- skrobia – podstawowy materiał zapasowy i energetyczny.

W świecie roślinnym występują powszechnie liczne inne typy polisacharydów, przedstawione w Tab. 4. Niektóre wielocukry są charakterystyczne dla określonej grupy systematycznej. Materiałem zapasowym roślin z rodziny *Asteraceae* i *Campanulaceae* jest inulina. Natomiast rośliny niższe, np. grzyby, zawierają glikogen zamiast skrobi.

W skład ściany komórkowej oprócz celulozy wchodzi m.in. hemicelulozy, które możemy podzielić na trzy główne typy: ksyłany, glukomannany i arabinogalaktany. Struktura ich jest bardzo złożona i można wśród nich znaleźć również inne typy polisacharydów. Hemicelulozy występujące w rodzinie *Poaceae* zawierają duże ilości ksylozy i mniejsze – arabinozy, galaktozy i kwasów uronowych, podczas gdy w rodzinie *Fabaceae* podstawowymi składnikami tej frakcji są: kwasy uronowe, galaktoza i arabinoza, a ksyloza występuje w ilościach śladowych.

Głony należące do trzech gromad: *Chlorophyta*, *Phaeophyta* i *Rhodophyta* bardzo różnią się między sobą składem frakcji polisacharydowej (Tab. 4).

Tab. 4. Podstawowe klasy polisacharydów występujące w roślinach wyższych, glonach i grzybach (wg.: Harborne, 1973)

Nazwa	Skład: monosacharydy	Wiązanie	Występowanie w świecie roślinnym
Rośliny wyższe			
celuloza	glukoza	β 1→4	powszechne – podstawowy materiał budulcowy ściany komórkowej
skrobia – amyloza	glukoza	α 1→4	powszechne – podstawowy materiał zapasowy
skrobia – amylopektyna	glukoza	α 1→4, α 1→6	powszechne – podstawowy materiał zapasowy
inulina – fruktan	fruktoza (niewielka ilość glukozy)	β 2→1	materiał zapasowy w rodzinie <i>Asteraceae</i> , <i>Campanulaceae</i>
ksylan	ksyloza (niewielka ilość arabinozy i kwasów uronowych)	β 1→4	szeroko rozpowszechnione, np. u traw
glukomannan	glukoza, mannoza	β 1→4	szeroko rozpowszechnione, ale szczególnie u <i>Pinatae</i>

Nazwa	Skład: monosacharydy	Wiązanie	Występowanie w świecie roślinnym
arabinogalaktan	arabinoza, galaktoza	1→3, 1→6	szeroko rozpowszechnione, ale szczególnie u <i>Pinatae</i>
pektyna	kwas galakturonowy (i kilka innych cukrów)	α 1→4	szeroko rozpowszechnione
galaktomannan	mannoza, galaktoza	β 1→4, α 1→6	jako śluz w nasionach
guma	arabinoza, ramnoza, galaktoza, kwas glukuronowy	silnie rozgałęzione	w rodzaju <i>Acacia</i> i <i>Astragalus</i>
Glony			
laminaran	glukoza	β 1→3	<i>Phaeophyta</i>
polisacharydy z grupami siarczanowymi	fukoza (i inne cukry)	–	<i>Phaeophyta</i>
kwas alginowy	kwas mannuronowy i guluronowy	–	<i>Phaeophyta</i>
amylopektyna	glukoza	α 1→4, α 1→6	<i>Rhodophyta</i>
galaktan	galaktoza	1→3, 1→4	<i>Rhodophyta</i>
skrobia	glukoza	α 1→4, α 1→6	<i>Chlorophyta</i>
polisacharydy z grupami siarczanowymi	ramnoza, ksyloza, kwas glukuronowy	–	<i>Chlorophyta</i>
Grzyby			
chityna	N-acetyloglukozamina	β 1→4	szeroko rozpowszechnione
chitozan	glukozamina	β 1→4	u <i>Zygomycetes</i>
β-glukan	glukoza	β 1→3, β 1→6	szeroko rozpowszechnione
α-glukan	glukoza	α 1→3, 1→4	szeroko rozpowszechnione
mannan	mannoza	α 1→2, 1→6, 1→3	głównie u <i>Ascomycetes</i>

2.3.4 Właściwości biologiczne

Polisacharydy mają bardzo różnorodne zastosowania w farmacji:

- jako środki odżywcze (*nutrientia*) i dietetyczne (*diaetetica*) np. skrobia, inulina;
- jako środki pomocnicze w technologii postaci leku:
 - substancje wypełniające lub spęczniające przy produkcji np. tabletek;
 - substancje chłonne, ochronne, łagodzące, przeciwzapalne w zasypkach, pudrach, maściach;
- jako środki zastępcze krwi (np. dekstrany);
- jako substancje przeciwzakrzepowe – mukopolisacharydy (heparyna).

Polisacharydy o charakterze śluzów są naturalnymi koloidami, tworzącymi z wodą galaretowate żele i gęste, kleiste zole. W lecznictwie śluzы używane są jako środki powlekające, ochronne i zmiękczejące (*emollientia*). Działanie to jest wyłącznie miejscowe. Stosowane są w stanach zapalnych przewodu pokarmowego (pomocniczo – w chorobie

wrzodowej żołądka), dróg oddechowych (*antibechica, expectorantia*) oraz zewnętrznie – na skórę. Ze względu na zdolność do pęcznienia podawane są jako środki przeczyszczające (*laxantia*), a także mają zastosowanie w leczeniu otyłości (Ożarowski, 1980; Kohlmünzer, 1998).

Stwierdzono, że surowce polisacharydowe mogą wykazywać różnorodną aktywność biologiczną, nie związaną z ich właściwościami powlekającymi, czy zdolnością do pęcznienia. Tym zagadnieniom jest poświęcona dalsza część niniejszego rozdziału.

2.3.4.1 Polisacharydy grzybów

(Whistler et al., 1976; Wagner, Proksch, 1985; Franz, 1987; Kohlmünzer, 1988; Franz, 1989; Grzybek, 1992)

Intensywne badania w celu znalezienia nietoksycznych substancji przeciwnowotworowych wykazały, że wyciągi wodne z niektórych grzybów z klasy *Basidiomycetes* działają hamująco na rozwój pewnych przeszczepialnych nowotworów. Substancjami aktywnymi okazały się polisacharydy (Tab. 5). Dalszymi badaniami objęto liczne inne gatunki grzybów, również z klasy *Ascomycetes*. Z niektórych z nich wyizolowano polisacharydy, które także wykazywały działanie przeciwnowotworowe. Aktywne związki są zwykle glukanami, posiadającymi różne typy połączeń między cząsteczkami monosacharydów. Najczęściej w głównym łańcuchu występują wiązania $\beta(1\rightarrow3)$, a rozgałęzienia są tworzone poprzez wiązanie $\beta(1\rightarrow6)$. Szczególnie aktywne są polisacharydy o budowie liniowej, bez długich łańcuchów bocznych, o dużej cząsteczce (np. *Lentinan* – ok. 500 kDa), rozpuszczalne w wodzie. Ważna jest też struktura przestrzenna związków. Polisacharydy nie wykazywały aktywności cytotoksycznej lub cytostatycznej w testach *in vitro* w stosunku do komórek nowotworowych. Przyjęto hipotezę, że związki te mogą działać pośrednio – poprzez organizm gospodarza (tzw. *host mediated action*) – aktywując układ immunologiczny. Badania potwierdziły tę teorię. Stwierdzono, że polisacharydy działają immunostymulująco, powodując zwiększenie naturalnej niespecyficznej odporności immunologicznej. Związki izolowano zarówno z owocników grzybów, jak i z kultur mycelialnych.

Obecnie w klinicznym użyciu (głównie w Japonii) są trzy polisacharydy pochodzenia grzybowego: *Schizophyllan*, *Lentinan*, *Krestin*. Związki te są stosowane w leczeniu m.in. nowotworów płuc, przewodu pokarmowego, piersi, macicy. Polisacharydy podawane są oddzielnie lub w połączeniu z chemio- i/lub radioterapią, najczęściej po chirurgicznym usunięciu pierwotnego guza. W rezultacie poprawiają się parametry immunologiczne

Polisacharyd	Struktura chemiczna	Pochodzenie
	β -(1→4); β -(1→3); β -(1→6) glukan + kompleks białkowy (25-38%)	
KS-2	α -mannan	<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.
Grifolan	β -(1→3); β -(1→6) glukan	<i>Grifola frondosa</i> (Dick.: Fr.) S.F. Gray
HA	β -(1→3); α -(1→4) glukan	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Fr.) Quel.
Tylopilan	β -(1→3); β -(1→6) glukan	<i>Tylopilus felleus</i> (Bull. ex Fr.) P.Karst.
Klasa: Ascomycetes		
Zymozan	heteroglukan: głównie β -(1→3) glukan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen
Mannozym	glukomannan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen
Skleroglukan	β -(1→3); β -(1→6) glukan	<i>Sclerotium gluconicum</i>
YPS	glukomannan	<i>Candida utilis</i> (Henneberg) Rodden et Kreyervan Rey
A ₁ Glukan	β -(1→3); β -(1→6) glukan	<i>Phytophthora parasitica</i>
PS 1426	β -(1→3); β -(1→6) glukan	<i>Pseudoplectania nigrella</i>
—	heteroglukan: β -(1→3); α -(1→4) glukan + białko	<i>Peziza vesiculosa</i> Bull.: Fr.

2.3.4.2 Polisacharydy glonów i porostów

Glukany o wiązaniach (1→3), (1→4), izolowane z porostów (np. lichenan, izolichenan) wykazują aktywność immunologiczną i przeciwnowotworową (test na Sarcoma 180) – analogicznie jak związki o podobnej budowie uzyskane z grzybów. Pustulan - β (1→6) glukan – jest mało aktywny. Częściowa O-acetylacja tego związku wyraźnie zwiększa jego aktywność przeciwnowotworową.

Związki izolowane z glonów mają bardzo różnorodną budowę i aktywność biologiczną (Tab.6). Laminarin i laminaran, wyizolowane z *Laminaria* sp. są β (1→3); β (1→6) glukanami i wykazują działanie immunostymulujące.

Polisacharydy zawierające grupy siarczanowe (np. karagen, fukoidan lub fukan) otrzymane z glonów morskich, mogą wykazywać aktywność antykoagulacyjną i antytrombotyczną (Franz et al., 1998).

Polisacharydy wyizolowane z glonów często zbudowane są głównie z cząsteczek galaktozy lub mannozy, połączonych grupą OH odpowiednio przy C₄ lub C₃. Do galaktozy zwykle przyłączona jest grupa siarczanowa (Wagner, Proksch, 1985).

Ksylomannan wyizolowany z glonu *Nothogenia fastiginata* posiada łańcuch główny zbudowany z cząsteczek α -(1→3)-D-mannozy, do których w pozycji 2 i 6 przyłączone są grupy siarczanowe (Kolender et al., 1997). Łańcuchy boczne stanowią pojedyncze cząsteczki

β -(1→2)-*D*-ksylozy. Stwierdzono, że związek ten wykazuje aktywność przeciwwirusową i nie przejawia działania antykoagulacyjnego.

Galaktan wyizolowany z *Grateloupia doryphora* oraz arabinogalaktan z *Codium fragile*, zawierające grupy siarczanowe, wykazują działanie antyproliferacyjne.

Tab.6. Budowa i właściwości biologiczne polisacharydów wyizolowanych z glonów i porostów – przykłady.

Gatunek	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
<i>Ascophyllum nodosum</i> (L.) Le Jolis	<i>Fucaceae</i>	fukan (α -(1,2) i α (1,3) 4-sulfurylofukoza)	- antykoagulacyjna	Chaubet, 1998
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	<i>Parmeliaceae</i>	galaktomannan	—	Gorin, Iacomini, 1984
			- immunostymulująca	Ingolfssdottir et al., 1994
			- immunomodulująca	Olafsdottir et al., 1997
		lichenan: β (1→3); β (1→4) D-glukan	- przeciwnowotworowa - immunostymulująca	Whistler et al., 1976 Ingolfssdottir et al., 1994
		izolichenan: α (1→3); α (1→4) D-glukan	- immunomodulująca - antykomplementarna - przeciwnowotworowa	Whistler et al., 1976 Olafsdottir et al., 1998
<i>Chondrus crispus</i> (L.) Stackh.	<i>Gigartinaceae</i>	karagen (kwaśny galaktan – grupy siarczanowe)	- antykoagulacyjna - antytrombotyczna	Franz et al., 1998
<i>Codium fragile</i>	<i>Codiaceae</i>	kwaśne arabinogalaktany (grupy siarczanowe)	- antyproliferacyjna	Murano et al., 1998a
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	<i>Usneaceae</i>	lichenan: β (1→3); β (1→4) D-glukan	- przeciwnowotworowa - immunostymulująca	Whistler et al., 1976
<i>Gigartina mamilliosa</i> (Good. et Woodw.) Ag.	<i>Gigartinaceae</i>	karagen (kwaśny galaktan – grupy siarczanowe)	- antykoagulacyjna - antytrombotyczna	Franz et al., 1998
<i>Gloiopeltis tenax</i>	<i>Endocladaceae</i>	funoran (kwaśny heteroglikan)	- przeciwnowotworowa - immunostymulująca - hipotensyjna	Ren et al., 1995
<i>Grateloupia doryphora</i>	<i>Grateloupiaceae</i>	kwaśny galaktan (grupy siarczanowe)	- antyproliferacyjna	Murano et al., 1998b
<i>Gyrophora esculenta</i> Miyoshi	<i>Umbilicariaceae</i>	półsyntetyczny (częściowo O-acetylowany pustulan) β -(1→6)- <i>D</i> -glukan	- przeciwnowotworowa - immunostymulująca	Whistler et al., 1976
<i>Laminaria digitata</i> (Huds.) Lamour.	<i>Laminariaceae</i>	Laminarin: β -(1→3); β -(1→6) glukan	- immunostymulująca	Dalmo, 1998
<i>Laminaria hyperborea</i> (Gunn.) Foslie	<i>Laminariaceae</i>	Laminaran: β -(1→3); β -(1→6) glukan	- immunostymulująca	Dalmo, 1998
<i>Nostoc commune</i>	<i>Nostocaceae</i>	kwaśne heteroglikany	- antykomplementarna	Paulsen et al., 1998
<i>Nothogenia fastigiata</i>		kwaśne ksylomannany (grupy siarczanowe)	- przeciwwirusowa	Kolender et al., 1997

Gatunek	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
<i>Porphyra subtextumens</i> J.Ag. ex Laing	<i>Bangiaceae</i>	—	- hamowanie PCR (potencjalna aktywność przeciwnowotworowa i przeciwwirusowa)	Falshaw et al., 1998
<i>Ramalina usnea</i> (L.) R.H. Howe	<i>Ramalinaceae</i>	galaktomannan	—	Gorin, Iacomini, 1984
<i>Schizymenia dubyi</i>	<i>Gymnophlaeaceae</i>	kwaśny glukuronogalakatan (grupy siarczanowe)	- antykoagulacyjna - przeciwwirusowa (anty- HIV) - antykomplementarna - przeciwnowotworowa	Alban et al., 1998

2.3.4.3 Polisacharydy roślin wyższych

Polisacharydy izolowane z roślin wyższych są zwykle heteroglikanami o skomplikowanej budowie. Najczęściej wykazują działanie immunostymulujące lub immunomodulujące (Tab.7). Związki te mogą również przejawiać aktywność biologiczną innego typu np. hipoglikemiczną, przeciwnowotworową, antykoagulacyjną, fibrynolityczną, przeciwwirusową, przeciwzapalną, antymutageną. W Tab.7 przedstawiono przykłady różnych polisacharydów wyizolowanych z roślin wyższych.

• • •

Polisacharydy grzybowe: (1→3)-β-D-glukany oraz (1→3)-β-D-glukany rozgałęzione w pozycji 6 (np. lentinan, pachymaran) wykazują aktywność immunomodulującą – antykomplementarną (zob. rozdz. 2.3.4.1.). Z korzeni *Angelica acutiloba* Kitagawa wyizolowano polisacharyd o zupełnie innej budowie, też wykazujący taką aktywność. Był to 3,6-arabinogalakatan (Yamada et al., 1984). Podjęto badania mające na celu ustalenie zależności pomiędzy budową chemiczną a aktywnością antykomplementarną polisacharydów izolowanych z roślin wyższych (Yamada et al., 1985). Testom biologicznym poddano siedemnaście rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów wyizolowanych z różnych gatunków roślin. Związkiem kontrolnym stosowanym w badaniach był arabinogalakatan uzyskany z korzeni *Angelica acutiloba* Kitagawa. Stwierdzono, że trzy związki wykazują wyraźną aktywność antykomplementarną:

- arabinan wyizolowany z owoców *Zizyphus jujuba* var. *inermis* (główny łańcuch zbudowany z cząsteczek α-L-arabinofuranozy połączonych wiązaniami 1→5; boczne łańcuchy przyłączone wiązaniami 1→2)
- panikulatan wyizolowany z kory *Hydrangea paniculata* Sieb. (o skomplikowanej budowie, silnie rozgałęziony, częściowo O-acetylowany, kwaśny polisacharyd o charak-

terze śluzu, zbudowany z cząsteczek α -L-ramnopiranozy połączonych wiązaniem 1→2, boczne łańcuchy zawierają galaktozę, kwas glukuronowy i galakturonowy),

- polisacharyd o charakterze śluzu wyizolowany z nasion *Plantago asiatica* L. (o skomplikowanej budowie, silnie rozgałęziony, częściowo O-acetylowany, kwaśny polisacharyd, zbudowany z cząsteczek β -D-ksylopiranozy połączonych wiązaniami 1→4, boczne łańcuchy zawierają arabinozę, kwas glukuronowy i galakturonowy).

Związki te różnią się rodzajem cukrów prostych, masą cząsteczkową, skręcalnością optyczną, zawartością grup acetylowych. Cechą wspólną jest duże rozgałęzienie cząsteczek. Stwierdzono, że panikulatan aktywuje układ komplementu klasyczną drogą, podczas gdy pozostałe dwa związki – zarówno drogą klasyczną, jak i alternatywną. Wszystkie trzy polisacharydy są dobrze rozpuszczalne w wodzie. W wyniku długiego przechowywania panikulatan staje się trudno rozpuszczalny i jednocześnie obniża się jego aktywność. Znane są nierozpuszczalne w wodzie polisacharydy o działaniu antykomplementarnym (np. lentinan, pachymaran), z tym, że aktywują one układ komplementu drogą alternatywną.

Inne polisacharydy z roślin wyższych, wykazujące słabą aktywność antykomplementarną, mają zwykle łańcuch główny zbudowany z (1→2)- α -L-ramnopiranozy i kwasu (1→4)- α -D-galakturonowego. Glukomannany i pektyny również nie wykazują wyraźnej aktywności (Yamada et al., 1985).



Z wielu gatunków roślin wyizolowano polisacharydy o charakterze arabinogalaktanów, wykazujące aktywność immunostymulującą, w tym – szczególnie antykomplementarną. Związki takie uzyskano z wspomnianego już wcześniej gatunku *Angelica acutiloba* Kitagawa, a także np. z *Atractylodes lancea*, *Calendula officinalis* L., *Echinacea purpurea* (L.) Moench., *Epimedium violaceum*, *Hibiscus sabdariffa* L., *Malva verticillata* L., *Nerium oleander* L., *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Plantago major* L., *Urtica dioica* L. i innych (Tab.7). Arabinogalaktanom wyizolowanym np. z *Plantago major* L., czy *Yucca glauca* Nutt. przypisuje się aktywność przeciwnowotworową. W niektórych przypadkach, np. *Malva verticillata* L., obok działania antykomplementarnego stwierdzono również aktywność hipoglikemiczną tych związków. Aktywne biologicznie arabinogalaktany izolowano z różnych organów roślinnych: z korzeni, kłączy, liści, ziela, kwiatów, owoców. Niektóre z polisacharydów zbudowane są wyłącznie z arabinozy i galaktozy, inne zawierają dodatkowo inne cukry proste w mniejszej ilości, czy też kwas galakturonowy. Często są to 3,6-arabinogalaktany. W przypadku *Angelica acutiloba* Kitagawa główny łańcuch zbudowany

jest z cząsteczek galaktopiranozy połączonych wiązaniami (1→6). Arabinoza występuje jako α-L-furanoza w zakończeniach bez grupy redukującej oraz w bocznych łańcuchach. Nie każdy jednak 3,6-arabinogalaktan wykazuje aktywność antykomplementarną. Związek wyizolowany z drewna *Larix* sp. był pozbawiony takiego działania (Yamada et al., 1985).

Z ziela *Echinacea purpurea* (L.) Moench. wyizolowano arabinoramnogalaktan o masie cząsteczkowej 450 kDa. Związek ten wykazuje dużą aktywność immunostymulującą. Z przeprowadzonych testów biologicznych wynika, że polisacharyd silnie stymuluje fagocytozę oraz aktywuje limfocyty T i B (Wagner, Proksch, 1985).

Na rynku farmaceutycznym znajdują się różne preparaty wytwarzane z *Echinacea purpurea* L. o działaniu immunostymulującym. Przykładem może być Echinacin® (firmy Madaus AG). Jest to stabilizowany etanolem sok wyciśnięty ze świeżego ziela *E. purpurea*. W preparacie znajdują się różnego rodzaju związki m.in. pochodne kwasu kawowego (kwas cykoriowy, echinakozyd), flawonoidy, fitosterole, polisacharydy itd. Podjęto szczegółowe badania frakcji polisacharydowej. Materiałem do analizy był świeży sok wyciśnięty z ziela *E. purpurea*, a także gotowy preparat – Echinacin®. Zarówno w soku, jak i w preparacie stwierdzono obecność różnych heteroglikanów o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa, inuliny, a także kwaśnego, silnie rozgałęzionego arabinogalaktanu o masie cząsteczkowej 70 kDa. Temu ostatniemu związkowi przypisuje się aktywność immunomodulującą (Blaschek et al., 1998).

• • •

Stwierdzono (Tomoda et al., 1989), że polisacharydy o charakterze śluzów wyizolowane z trzech gatunków z rodzaju *Hibiscus* (*Abelmoschus esculentus* Moench = *Hibiscus esculentus* L.: owoce, korzenie; *Hibiscus moscheutos* L.: korzenie i liście; *Hibiscus syriacus* L.: liście i kwiaty) wykazują zarówno aktywność antykomplementarną, jak i hipoglikemiczną. Związki wyizolowane z korzeni *Abelmoschus esculentus* oraz z korzeni i z liści *Hibiscus moscheutos* zbudowane są z powtarzających się elementów trójcukrowych, stanowiących zasadniczą część głównego łańcucha: (1→4)-[O-β-(kwas D-glukopiranozylo-uronowy)-(1→3)]-O-α-(kwas D-galaktopiranozylo-uronowy)-(1→2)-O-α-L-ramnopiranoza, podczas gdy wyizolowane z liści i kwiatów *Hibiscus syriacus* zawierają elementy dwucukrowe: (1→4)-O-α-(kwas D-galaktopiranozylo-uronowy)-(1→2)-O-α-L-ramnopiranoza. Polisacharydy mają liczne boczne łańcuchy, utworzone m.in. z obojętnych cukrów przyłączonych do ramnozy w pozycji 4. Najsilniejszą aktywność antykomplementarną wykazują związki wyizolowane z korzeni *Abelmoschus esculentus*, liści *Hibiscus moscheutos*

oraz liści i kwiatów *Hibiscus syriacus*, co – według autorów (Tomoda et al., 1989) – może być związane z bardzo rozgałęzioną strukturą cząsteczek. Wszystkie badane polisacharydy wykazują aktywność hipoglikemiczną z tym, że w przypadku *Hibiscus moscheutos* i *Hibiscus syriacus* zależna jest ona od zastosowanej dawki związku. Polisacharyd wyizolowany z korzeni *Abelmoschus esculentus* wykazuje szczególnie znaczącą aktywność. Zarówno ten związek, jak i polisacharyd uzyskany z korzeni *Hibiscus moscheutos* posiadają wcześniej już wspomniany trójcukrowy, powtarzający się element, tworzący główny łańcuch. Mimo tego podobieństwa, polisacharyd z *Abelmoschus esculentus* wykazuje wyraźnie większą zdolność do obniżania poziomu cukru we krwi zwierząt doświadczalnych. Związki różnią się budową łańcuchów bocznych i to może wpływać na ich aktywność.

• • •

Stosowanie związków antymutagennych i antykarcynogennych jako dodatków do żywności mogłoby stać się cenną metodą profilaktyczną w celu zapobiegania chorobom nowotworowym i genetycznym. Przeprowadzono testy biologiczne mające na celu zbadanie potencjalnych właściwości antymutagennych polisacharydów należących do trzech różnych klas (Hensel, Meier, 1998). Związkami tymi były:

- fukoidan – silnie kwaśny polisacharyd wyizolowany z *Fucus vesiculosus* L., zbudowany z cząsteczek $\alpha(1\rightarrow3)$ fukozy, zawierający grupy siarczanowe,
- galaktoksyloglukan – obojętny polisacharyd otrzymany z nasion *Tropaeolum majus* L., główny łańcuch zbudowany z $\beta(1\rightarrow4)$ glukozy, łańcuchy boczne utworzone z ksylozy i galaktozy,
- kwaśne ramnogalakturoniany – typowe pektyny, szeroko rozpowszechnione w owocach i warzywach.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że galaktoksyloglukan i ramnogalakturoniany wykazują wyraźne działanie antymutagenne, podczas gdy fukoidan jest całkowicie nieaktywny. Rezultaty te wskazują, że codzienne spożywanie bogatych w pektyny warzyw i owoców może być ważną metodą w profilaktyce chorób nowotworowych.

• • •

Przeprowadzono test biologiczny mający na celu ustalenie potencjalnych możliwości stosowania polisacharydów w celu zapobiegania i leczenia infekcji bakteryjnych (Guggenbichler et al., 1997). Zdolność adhezji bakterii do komórek nabłonkowych jest uważana za główny patogenny czynnik indukujący zakażenie. To zjawisko zostało dobrze zbadane w przypadku szczepu *Escherichia coli* wywołującego biegunkę: bakterie muszą najpierw przyczepić się do powierzchni komórek nabłonka jelit, tam namnażają się i gdy ich

toksyny osiągną odpowiednie stężenie zaczyna się proces chorobowy. Podobny mechanizm jest w przypadku zakażeń układu moczowego. Na powierzchni bakterii są białkowe, włoskopodobne struktury, które łączą się z receptorowymi cząsteczkami glikoprotein (część cukrowa: 1 cz. glukozy, trzy cz. galaktozy) znajdującymi się na komórkach nabłonkowych.

Celem opisywanego badania było ustalenie zdolności polisacharydów do blokowania adhezji bakterii *E. coli* na komórkach nabłonkowych. Jako modelu testowego użyto komórek nabłonkowych z układu moczowego. Z korzeni marchwi wyizolowano frakcję polisacharydową, rozdzielono ją na kolumnie. Najbardziej aktywną frakcję poddano hydrolizie w warunkach analogicznych do tych, jakie panują w żołądku. Hydrolizat rozdzielono na kolumnie i uzyskane frakcje poddano testom biologicznym.

Najbardziej aktywna w blokowaniu adhezji bakterii do komórek nabłonkowych okazała się frakcja o najmniejszym ciężarze cząsteczkowym, zawierająca 76% kwasu galakturonowego. Badaniom poddano również inne roślinne polisacharydy, kwas pektynowy (komercyjnie otrzymywany z jabłek), kwas poligalakturonowy (z pomarańczy) oraz kwasy mono-heksagalakturonowe. Kwasy pektynowy i poligalakturonowy przy stężeniu 0,2% całkowicie blokowały adhezję komórek bakteryjnych, a kwas poligalakturonowy jeszcze przy stężeniu 0,005% blokował ją w 72%.

Kwasy oligogalakturonowe zastosowano w stężeniu 0,005%. Najbardziej aktywny okazał się kwas trigalakturonowy. Kwasy monogalakturonowe były całkowicie pozbawione aktywności.

Zupa marchwiowa jest już od 1908 r. stosowana w leczeniu biegunek, ale dopiero te ostatnie badania wyjaśniły, która frakcja jest odpowiedzialna za takie działanie.

Kwasy oligogalakturonowe mogą być pozyskiwane w dużych ilościach ze źródeł naturalnych tj. z różnego rodzaju owoców i warzyw. Zastosowanie ich jako środków blokujących adhezję bakterii do komórek nabłonkowych może stać się użyteczną metodą w profilaktyce, a także dodatkowym sposobem leczenia zakażeń bakteryjnych.

• • •

Galaktomannany są często spotykanym składnikiem nasion, szczególnie w rodzinie *Fabaceae* (Aspinall, 1970; Kooiman, 1971). Łańcuch główny zbudowany jest zwykle z cząsteczek $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-mannopiranozy}$, rozgałęzienia tworzy $\alpha\text{-D-galaktopiranoza}$. Stosunek molowy cząsteczek galaktozy do mannozy waha się od 1:1,2 do 1:5. Galaktomannany są dobrze rozpuszczalne w wodzie, tworzą lepkie roztwory. Jest niewiele doniesień literaturowych na temat aktywności biologicznej tych związków.

Badano właściwości fibrynolityczne i antykoagulacyjne czterech galaktomannanów oraz ich siarczanowych pochodnych (Hussein, Helmy, 1998). Polisacharydy wyizolowano z nasion *Leucaena* sp., *Medicago sativa* L., *Glycine max* (L.) Merr. oraz *Phoenix dactylifera* L. Galaktomannany poddano chemicznym modyfikacjom – utworzono ich polialdehydowe (poprzez utlenianie), a potem (poprzez redukcję) polialkoholowe pochodne. Następnie do związków wyjściowych i do ich pochodnych przyłączono grupy siarczanowe. Wszystkie polisacharydy – również te modyfikowane – poddano badaniom biologicznym. Związki wyizolowane z *Leucaena* sp. oraz z *Phoenix dactylifera* wykazywały wyraźne właściwości fibrynolityczne i wszystkie zastosowane modyfikacje zwiększały tę aktywność. Polisacharydy otrzymane z *Glycine max* i *Medicago sativa* działały antykoagulacyjnie. Utworzone pochodne nie wykazywały większej aktywności.

Z wcześniejszych doniesień (Liping et al., 1994) wynika, że galaktomannan wyizolowany z grzyba *Pleurotus citrinopileatus* (*Agaricaceae*) działał przeciwwirusowo w stosunku do szczepu wirusa Coxacki B5. Siarczanowe pochodne tego polisacharydu wykazywały większą aktywność.

Galaktomannan wyizolowany z porostu *Cetraria islandica* (L.) Ach. (Ingolfssdottir et al., 1994) działa immunostymulująco poprzez pobudzenie fagocytozy. Jest to rozgałęziony polisacharyd, którego główny łańcuch zbudowany jest z cząsteczek (1→6)- α -D-galaktopiranozy.

• • •

Polisacharydy zawierające grupy siarczanowe mogą wykazywać bardzo różnorodną aktywność biologiczną taką jak: antykoagulacyjną, antytrombotyczną, antyangiogeniczną, przeciwwirusową, antyarteriosklerotyczną, przeciwnowotworową, przeciwzapalną i antykomplementarną.

Mimo, że heparyna od ponad 60 lat jest stosowana jako środek antykoagulacyjny, jej struktura nie jest jeszcze w pełni określona. Związek często jest niehomogeny, czasem zawiera pewne zanieczyszczenia, w efekcie czego mogą występować pewne efekty uboczne w postaci krwawień, czy trombocytopenii. Aby to wyeliminować, podjęto badania w celu uzyskania związków o ściśle określonej strukturze, podobnych do heparyny w działaniu i budowie (Schauerte et al., 1996). Do polisacharydów o wcześniej ustalonej już budowie (β -1,3-glukan, β -1,4-glukan, α -1,4/1,6-glukan), wyizolowanych z roślin i bakterii, przyłączono grupy siarczanowe. Otrzymane pochodne poddano testom biologicznym i stwierdzono, że wykazują aktywność antykoagulacyjną i fibrynolityczną, lecz o różnym

nasileniu. Dalsze badania w tym zakresie mogą przyczynić się do ustalenia optymalnej budowy związków.

Stwierdzono, że siarczanowe pochodne β -1,3-glukanów, działające antykoagulacyjnie i antytrombotycznie, wykazują jednocześnie aktywność przeciwzapalną.

Aby ustalić zależności pomiędzy budową polisacharydu, a aktywnością antykomplementarną, przetestowano siarczanowe pochodne różnych β -1,3-glukanów (Stibich et al., 1995). Stwierdzono, że na działanie związku ma wpływ masa cząsteczkowa, ilość grup siarczanowych i miejsce ich przyłączenia do glukozy.

W celu zbadania właściwości siarczanowych pochodnych węglowodanów zastosowano różne modyfikacje testu CAM (na zarodku kurzym) dla β -1,3-glukanu, LAM S5, o dokładnie określonej budowie, zawierającego dużo grup siarczanowych (Paper et al., 1998). Stwierdzono, że polisacharyd działa przeciwzapalnie oraz hamuje angiogenezę i efekty te zależne są od dawki związku. W porównaniu ze standardowymi lekami przeciwzapalnymi w teście CAM glukan działa silniej niż fenylobutazon i diklofenak i prawie tak skutecznie jak hydrokortyzon. Do uzyskania całkowitego zahamowania angiogenezy potrzebne są wyższe dawki polisacharydu i wtedy zaczyna pojawiać się działanie embriotoksyczne. Podobne testy przeprowadzono dla β -1,4-galaktanu oraz różnych wyizolowanych z roślin oligosacharydów, które przekształcono w ich siarczanowe pochodne (Paper et al., 1996; Käsbauer et al., 1998). Pochodne galaktanu i niektórych z oligosacharydów wykazywały wyraźne działanie antyangiogenne, ale w tym przypadku nie było efektu embriotoksycznego.



O dużym zainteresowaniu aktywnymi biologicznie polisacharydami świadczą m.in. międzynarodowe konferencje naukowe poświęcone wyłącznie temu tematowi. We wrześniu roku 1998 w Sundøya (Norwegia) odbyła się konferencja pt. „*Bioactive carbohydrate polymers*” zorganizowana przez Phytochemical Society of Europe. Obejmowała zagadnienia dotyczące polisacharydów izolowanych głównie z roślin wyższych i glonów.

Badania nad możliwym mechanizmem działania polisacharydów wykazały, że oprócz wpływu tych związków na kaskadę komplementu i indukowanie cytokinin, jako ważny czynnik trzeba brać pod uwagę stymulowanie leukocytów. Aby wyjaśnić mechanizm działania potrzebne są badania farmakologiczne i kliniczne. Wstępnie, konieczne jest przeprowadzenie testów biologicznych. Opracowano metody znakowania polisacharydów związkami promieniotwórczymi, fluorescencyjnymi, czy złotem, a także wytwarzania poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał przeciw polisacharydom w celu ułatwienia

detekcji i oznaczania ilościowego tych związków w płynach oraz materiale biologicznym (Wagner, Kraus, 1998).

Tab.7. Przykłady polisacharydów wyizolowanych z roślin wyższych: budowa, aktywność biologiczna.

Gatunek (material)	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
Klasa: Magnoliatae (Dicotyledoneae)				
<i>Annona muricata</i> L. (semen)	Annonaceae	galaktomannan	— *	Kooiman, 1971
<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa (radix)	Apiaceae	heteroglikan (głównie: arabinoza, galaktoza, ramnoza, kwas galakturonowy; α-1,5-arabino-3,6-galaktan)	- antykomplementarna	Yamada et al., 1984 Kiyohara et al., 1988 Kiyohara et al., 1989 Kiyohara, Yamada, 1989
			- mitogenna	
<i>Bupleurum falcatum</i> L. (radix)	Apiaceae	ramnogalakturonian	- indukowanie interferonu	Yamada et al., 1990
			- przeciwnowotworowa	
			- przeciwwrzodowa	Sakurai et al., 1996
<i>Pimpinella saxifraga</i> L. (radix)	Apiaceae	heteroglikan	- przeciwwrzodowa	Yamada, 1998
			- mitogenna (stymulowanie blastogenezy limfocytów B)	
<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	glukuronian, kwaśny arabino-galaktan	—	Janeczko, Podolak, 1998
<i>Acanthopanax senticosus</i> (Rupt et Maxim.) Harms (radix)	Araliaceae	heteroglikan (galaktoza, glukoza, arabinoza)	- immunostymulująca	Ren-sheng et al., 1980
		kwaśny heteroksylan	- immunostymulująca	Fang et al., 1985
<i>Eleutherococcus senticosus</i> Maxim. (radix)	Araliaceae	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Wagner et al., 1985b
			- hipoglikemiczna	Srivastava, Kulshreshtha, 1989
<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer (folium) (radix)	Araliaceae	arabinogalaktan, ramnogalakturonian	- antykomplementarna	Gao et al., 1991
			- stymulacja makrofagów	Yamada, 1998
		panaksan A (α 1-6) glukan	- hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1984 Srivastava, Kulshreshtha, 1989
<i>Achyrocline satureioides</i> DC. (herba)	Asteraceae	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a
<i>Arctium lappa</i> L. (radix)	Asteraceae	—	- immunostymulująca	Wagner, Proksch, 1985
<i>Arnica montana</i> L. (flos)	Asteraceae	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany	- przeciwnowotworowa	Franz, 1991
<i>Artemisia</i> sp. (herba)	Asteraceae	ramnogalakturonian	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a
<i>Artemisia princeps</i> Pamp (folium)	Asteraceae	heteroglikany	- antykoagulacyjna	Srivastava, Kulshreshtha, 1989
<i>Artemisia vulgaris</i> L. (folium)	Asteraceae	heteroglikany	- antykomplementarna	Yamada et al., 1985
<i>Artemisia vulgaris</i> L. (folium)	Asteraceae	—**	- antykomplementarna	Barsett et al., 1998
<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi (rhizoma)	Asteraceae	atraktany: A–C	- hipoglikemiczna	Konno et al., 1985
<i>Atractylodes lancea</i> (rhizoma)	Asteraceae	arabino-3,6-galaktan	- modułowanie jelitowego układu immunologicznego	Yamada, 1998
<i>Bidens tripartitus</i> L. (folium)	Asteraceae	—	- immunostymulująca	Mścisiz et al., 1997

Gatunek (material)	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
<i>Calendula officinalis</i> L. (flos)	<i>Asteraceae</i>	ramnoarabinogalaktan, arabinogalaktan	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Varljen et al., 1989
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	<i>Asteraceae</i>	heteroglikan	- immunostymulująca	Wagner, Proksch, 1985
<i>Chamomilla recutita</i> L. Rauscher (flos)	<i>Asteraceae</i>	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Wagner et al., 1985b
<i>Echinacea angustifolia</i> DC. (herba; radix)	<i>Asteraceae</i>	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench. (herba; radix)	<i>Asteraceae</i>	kwaśne, rozgałęzione heteroglikany (arabinoramnogalaktan)	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Wagner et al., 1985b Wagner, Proksch, 1985
(herba)		4-O-metyloglukuroarabino- ksylan	- immunostymulująca	Proksch, Wagner, 1987
(herba – succus)		kwaśny arabinogalaktan	- immunomodulująca	Blaschek et al., 1998
<i>Eupatorium cannabinum</i> L. (herba)	<i>Asteraceae</i>	kwaśne, rozgałęzione hetero- glikany (metyloglukuronoksy- lany)	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Vollmar et al., 1986
<i>Eupatorium perfoliatum</i> L. (herba)	<i>Asteraceae</i>	kwaśne, rozgałęzione hetero- glikany (metyloglukuronoksy- lany)	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Wagner et al., 1985b Vollmar et al., 1986
<i>Solidago</i> sp. (herba)	<i>Asteraceae</i>	β 1,2-fruktan; galakturonian	- przeciwnowotworowa	Kraus et al., 1986 Franz, 1987
<i>Vernonia kotschyana</i> Sch. bip. (radix)	<i>Asteraceae</i>	heteroglikan (dużo fruktozy)	- antykomplementarna	Sogn et al., 1998
<i>Epimedium violaceum</i> .	<i>Berberidaceae</i>	arabinogalaktan	- immunostymulująca	Wagner, Proksch, 1985
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc. (radix)	<i>Boraginaceae</i>	litospermany: A–C heteroglikany	- hipoglikemiczna	Konno et al., 1985
<i>Gleditsia triacanthos</i> L. (semen)	<i>Caesalpiniaceae</i>	galaktomannan	—	Pourrat et al., 1966
<i>Convolvulus tricolor</i> L. (semen)	<i>Convolvulaceae</i>	galaktomannan	—	Kooiman, 1971
<i>Bryonia alba</i> L. (radix)	<i>Cucurbitaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Bryonia dioica</i> Jacq. (radix)	<i>Cucurbitaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim. (radix)	<i>Cucurbitaceae</i>	trichozany: A-E (heteroglikany)	- hipoglikemiczna	Hikino et al., 1989
<i>Drosera binata</i> (folium)	<i>Droseraceae</i>	kwaśne heteroglikany (arabi- noza, ksyloza, galaktoza, man- noza, kwas galakturonowy)	—	Gowda, 1982
<i>Astragalus aitosensis</i> Ivann. (radix)	<i>Fabaceae</i>	heteroglikan	—	Ionkova, 1995
<i>Astragalus gummifer</i> Labill. (GT) (radix)	<i>Fabaceae</i>	kwaśny heteroglikan	- immunostymulująca	Ionkova, 1995
<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> (radix)	<i>Fabaceae</i>	astragalan I, II, III – hetero i homoglikany (I – glukoza, galaktoza, arabinoza; II, III – glukoza)	- immunostymulująca	Ionkova, 1995
<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge (radix)	<i>Fabaceae</i>	surowa frakcja	- przeciwnowotworowa	Wang et al., 1994
		glukany i heteroglikany	- immunostymulująca	Ionkova, 1995
<i>Baptisia tinctoria</i> (L.) R.Br. (radix)	<i>Fabaceae</i>	kwaśny rozgałęziony heteroglikan	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a Wagner, Proksch, 1985
<i>Cassia angustifolia</i> L. (folium)	<i>Fabaceae</i>	kwaśny heteroglikan (ramno- za, arabinoza, galaktoza, kwas galakturonowy)	- przeciwnowotworowa	Müller et al., 1989
<i>Coronilla scorpioides</i> L.	<i>Fabaceae</i>	heteroglikan (głównie	—	Abougren, Ammer, 1998

Gatunek (material)	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
(semen)		galaktoza, glukoza, mannoza)		
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (semen)	<i>Fabaceae</i>	galaktomannan	- antykoagulacyjna	Hussein, Helmy, 1998
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch et DC. (radix)	<i>Fabaceae</i>	ramnogalakturonian	- antykomplementarna - mitogenna	Kiyohara et al., 1996
<i>Medicago sativa</i> L. (semen)	<i>Fabaceae</i>	galaktomannan	- antykoagulacyjna	Hussein, Helmy, 1998
<i>Phaseolus radiatus</i> L. var. aurea Prain (semen)	<i>Fabaceae</i>	arabinany	—	Ukai et al., 1978
<i>Sophora japonica</i> L. (semen)	<i>Fabaceae</i>	galaktomannan	—	Kooiman, 1971
<i>Trifolium pratense</i> L.	<i>Fabaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Ramonda myconi</i> Reichenb. (folium)	<i>Gesneriaceae</i>	kwaśne heteroglikany (arabinoza, galaktoza, ramnoza, kwas galakturonowy)	—	Cañigual et al., 1994
<i>Viscum album</i> L. (fructus) (folium)	<i>Loranthaceae</i>	arabinogalakany 1,4 galakturonian	- immunostymulująca - immunostymulująca	Edlund et al., 1997
<i>Abelmoschus esculentus</i> Moench (fructus, radix)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany	- antykomplementarna - hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1989
<i>Abelmoschus manihot</i> <i>Medicus</i> (radix)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany	- antykomplementarna - hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1989
<i>Alcea rosea</i> L. (folium; flos)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany (głównie kwas glukuronowy i galakturonowy, ramnoza, galaktoza)	—	Classen, Blaschek, 1998
<i>Althaea officinalis</i> L.	<i>Malvaceae</i>	ramnogalakturonian; glukan	- immunostymulująca	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Hibiscus moscheutos</i> L. (folium, radix)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany	- antykomplementarna - hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1989
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (flos)	<i>Malvaceae</i>	arabinan; arabinogalaktan	- immunomodulująca	Müller et al., 1992
<i>Hibiscus syriacus</i> L. (folium, flos)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany	- antykomplementarna - hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1989
<i>Malva silvestris</i> L. (folium; flos)	<i>Malvaceae</i>	kwaśne heteroglikany (głównie kwas glukuronowy i galakturonowy, ramnoza, galaktoza)	—	Classen, Blaschek, 1998
<i>Malva verticillata</i> L. (semen)	<i>Malvaceae</i>	β -1,3 glukan; α -1,5 arabino-3,6-galaktan	- antykomplementarna - hipoglikemiczna	Tomoda et al., 1990
<i>Melia azadirachta</i> (L.) Adleb.	<i>Meliaceae</i>	arabinoglikan	- immunostymulująca	Franz, 1991
<i>Trichilia glabra</i> L. (folium)	<i>Meliaceae</i>	surowa frakcja	przeciwwirusowa	Benencia et al., 1997
<i>Morus alba</i> L. (radix)	<i>Moraceae</i>	moran A (glikoproteina)	- hipoglikemiczna	Hikino et al., 1985
<i>Papaver somniferum</i> L. (fructus)	<i>Papaveraceae</i>	kwaśny heteroglikan	—	Paulsen et al., 1978
<i>Plantago asiatica</i> L. (semen)	<i>Plantaginaceae</i>	glukuronoarabinoksylan	- antykomplementarna	Yamada et al., 1986
<i>Plantago major</i> L. (folium)	<i>Plantaginaceae</i>	pektyna; arabinogalaktan	- antykomplementarna - przeciwnowotworowa	Samuelsen et al., 1995 Samuelsen, 1998 Michaelsen et al., 1998
(semen)		heteroksylan	- antykomplementarna	Samuelsen, 1998

Gatunek (material)	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
<i>Rumex acetosella</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux (radix)	<i>Ranunculaceae</i>	akonitany: A–D (heteroglikany; akonitan A: głównie α(1-6)D glukan	- hipoglikemiczna	Konno et al., 1985 Tomoda et al., 1986
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> (fructus)	<i>Rhamnaceae</i>	arabinan	- antykomplementarna	Yamada et al., 1985
<i>Crataegus</i> sp. (folium cum flore)	<i>Rosaceae</i>	arabinogalakтан (β(1,3) galaktan, arabinoza – boczne łańcuchy)	—	Hensel et al., 1997
<i>Salix alba</i> L. (lignum)	<i>Salicaceae</i>	glukomannan, α-glukan	—	Karacsonyi, Pátka, 1975
<i>Hydrangea paniculata</i> Sieb. (cortex)	<i>Saxifragaceae</i>	panikulatan (kwaśny heteroglikan)	- antykomplementarna	Yamada et al., 1985 Tomoda et al., 1989
<i>Digitalis purpurea</i> L., <i>Digitalis lanata</i> Ehrh. (folium)	<i>Scrophulariaceae</i>	heteroglikany	—	Hensel, Kreis, 1997
<i>Tropaeolum majus</i> L. (semen)	<i>Tropaeolaceae</i>	galaktoksyloglukan	- antymutagenna	Hensel, Meier, 1998
<i>Ulmus glabra</i> Huds. (cortex)	<i>Ulmaceae</i>	kwaśny heteroglikan (głównie: ramnoza, galaktoza, kwas glukuronowy i galakturonowy)	—	Barsett, Paulsen, 1985
<i>Urtica dioica</i> L. (rhizoma)	<i>Urticaceae</i>	glukanogalakuronian, kwaśny arabinogalakтан	- immunostymulująca	Franz, 1991
		glukan	- przeciwzapalna - immunostymulująca	Kraus et al., 1997
Klasa: <i>Liliatae</i> (<i>Monocotyledoneae</i>)				
<i>Arenga saccharifera</i> Labill.(semen)	<i>Arecaceae</i>	galaktomannan	—	Kooiman, 1971
<i>Cocos nucifera</i> L. (semen)	<i>Arecaceae</i>	galaktomannan	—	Kooiman, 1971
<i>Phoenix dactylifera</i> L. (semen)	<i>Arecaceae</i>	galaktomannan	- fibrynolityczna	Hussein, Helmy, 1998
<i>Sabal serrulata</i> Roem. et Schult. (fructus)	<i>Arecaceae</i>	kwaśne rozgałęzione heteroglikany (np. kwaśny arabino-galakтан)	- immunostymulująca	Wagner et al., 1985a
<i>Allium sativum</i> L. (bulbus)	<i>Liliaceae</i>	D-fruktan	—	Das, Das, 1978
<i>Aloe arborescens</i> Mill. var. <i>natalensis</i> Berger (folium)	<i>Liliaceae</i>	β-D-mannan	- przeciwnowotworowa (testy na Sarcoma 180)	Yagi et al., 1977
<i>Aloe barbadensis</i> Mill. (= <i>Aloe vera</i> (L.) Webb. et Berth.) (folium)	<i>Liliaceae</i>	heteroglikan (głównie mannoza, glukoza, galaktoza)	- antykomplementarna	't Hart et al., 1989
			- stymulowanie makrofagów - stymulowanie fibroblastów	Qiu et al., 1998
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (rhizoma)	<i>Liliaceae</i>	anemarany: A–D (heteroglikany)	- hipoglikemiczna	Takahashi et al., 1985
<i>Colchicum autumnale</i> L.	<i>Liliaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Lilium testaceum</i> (bulbus)	<i>Liliaceae</i>	β-1,4-glukomannan	—	Wozniowski, Franz, 1994
<i>Yucca glauca</i> Nutt. (flos)	<i>Liliaceae</i>	arabinogalakтany	- przeciwnowotworowa	Ali et al., 1978
<i>Yucca schidegera</i>	<i>Liliaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991

Gatunek (material)	Rodzina	Polisacharyd	Aktywność biologiczna	Piśmiennictwo
<i>Avena sativa</i> L.	<i>Poaceae</i>	—	- immunostymulująca	Franz, 1989
<i>Hordeum vulgare</i> L. (fructus caryopsis)	<i>Poaceae</i>	(1→3),(1→4) β- <i>D</i> glukany	—	Woodward et al., 1983
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrader (folium)	<i>Poaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Poaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Triticum sativum</i> Lam.	<i>Poaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
<i>Saccharum officinarum</i> L.	<i>Poaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
		sacharan A-F	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa - hipoglikemiczna	Srivastava, Kulshreshtha, 1989
Podgromada: <i>Gymnospermae</i> (<i>Coniferophytina</i>)				
<i>Ephedra distachya</i> L. (herba)	<i>Ephedraceae</i>	efedryny: A-E; heteroglikany (ramnoza, fukoza, arabinoza, ksyloza, mannoza, galaktoza, glukoza)	- hipoglikemiczna	Konno et al., 1985
<i>Ginkgo biloba</i> L. (folium)	<i>Ginkgoaceae</i>	—	- immunostymulująca - przeciwnowotworowa	Wagner, Proksch, 1985 Franz, 1991
		heteroglikan (glukoza, ramnoza)	- mitodepresyjna	Grzybek et al., 1994

* – nie badano aktywności biologicznej

** – nie określono budowy polisacharydów

2.3.5 Biosynteza w kulturach *in vitro*

W kulturach *in vitro* roślin wyższych zachodzi biosynteza polisacharydów. Przykłady przedstawione są w tabeli Tab. 8. W przypadku hodowli zawieszinowych związki te często wydzielane są do pożywki. Kultury są filtrowane, oddziela się komórki, a polisacharydy są strącane poprzez dodatek etanolu do pożywki.

Najlepiej zbadane są związki wyizolowane z kultur zawieszinowych *Echinacea purpurea* (L.) Moench. W pożywce stwierdzono obecność dwóch typów polisacharydów: obojętnego fukogalaktoksyloglukanu o masie cząsteczkowej od 10 do 25 kDa i kwaśnego arabinogalaktanu o masie cząsteczkowej 75 kDa (Wagner et al., 1988). Przeprowadzono testy biologiczne, które wykazały, że oba związki działają immunostymulująco. Stwierdzono, że kwaśny arabinogalaktan jest jednym z najbardziej aktywnych polisacharydów wyizolowanych z roślin wyższych w zakresie stymulowania makrofagów i granulocytów (Schöllhorn, 1993). Związek pobudza syntezę interferonu i stosowany profilaktycznie u myszy zapobiega infekcjom wywołanym przez *Candida albicans*, *Leishmania*, *Listeria* (Wagner, 1997). Główny łańcuch tego związku zbudowany jest z cząsteczek β-D-galaktopiranozy połączonych wiązaniami (1→3), boczne łańcuchy utworzone są z arabinozy, a także z ramnozy połączonej

z kwasem galakturonowym (Wagner et al., 1988). Podobne, bardzo złożone polisacharydy były wyizolowane np. z roślin takich jak *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Viscum album* L., *Hibiscus* sp. (Tab. 8). Z ziela *Echinacea purpurea* (L.) Moench. uzyskano również arabinogalakтан (dokładniej: arabinoramnogalakтан), który jednak wykazuje tylko niewielkie podobieństwo do związku otrzymanego z kultur zawiesinowych. Polisacharyd wyizolowany z rośliny gruntowej ma masę cząsteczkową 450 kDa. Główny łańcuch zbudowany jest z ramnozy i galaktozy w stosunku molowym 1:1. Cząsteczki ramnozy łączą się z sąsiednimi cukrami poprzez grupę OH przy C₁ i C₂, natomiast cząsteczki galaktozy – poprzez grupę OH przy C₁ i C₄. Związek jest silnie rozgałęziony. Łańcuchy boczne są przyłączone poprzez grupę OH przy C₁ do prawie co drugiej cząsteczki ramnozy. W łańcuchach bocznych występują m.in. cząsteczki arabinozy i kwasu glukuronowego (Wagner, Proksch, 1985). Drugim związkiem wyizolowanym z ziela *Echinacea purpurea* (L.) Moench. był heteroksylan (4-O-metyloglukuronoarabinoksylan – Proksch, Wagner, 1987) – zupełnie odmienny od fukogalakтокsyloglukanu otrzymanego z kultur zawiesinowych.

Uważa się, że polisacharydy izolowane z kultur tkankowych są składnikami pierwotnej ściany komórkowej. Zgodnie z tą teorią fukogalakтокsyloglukan byłby włączony do warstwy celulozowej, podczas gdy arabinogalakтан mógłby być uważany za element łączący hemicelulozę z częścią glikoproteinową (Wagner et al., 1988). Podobne związki jak z hodowli *in vitro* *E. purpurea* uzyskano z kultur zawiesinowych *Acer pseudoplatanus* L. oraz *Phaseolus vulgaris* L.

Ze względu na obecność bardzo aktywnego immunologicznie arabinogalakтанu kultury zawiesinowe *E. purpurea* prowadzone są na skalę przemysłową w 75.000 litrowych biofermentorach w firmie Diversa z Hamburga (Wagner et al., 1989).

Z kultur zawiesinowych *Nicotiana tabacum* L. wyizolowano z pożywki arabinoksyloglukan. Szczegółowe badania strukturalne wykazały, że związek ten ma bardzo podobną budowę do polisacharydu wchodzącego w skład frakcji hemicelulozowej, wyizolowanego z liści tego gatunku (Akiyama, Kato, 1982).

Badano zawartość polisacharydów w kilku gatunkach z rodzaju *Astragalus*, a także w hodowli *in vitro* (Ionkova, 1995). Prowadzono kultury kalusowe, korzeniowe oraz kultury korzeni włóśnikowatych. Polisacharydy badano zarówno w pożywce, jak i w uzyskanej tkance. Stwierdzono, że niezróżnicowana tkanka kalusowa wytwarza bardzo niewielkie ilości tych związków. Zauważono natomiast, że w kulturach korzeni włóśnikowatych znaczne ilości polisacharydów są wydzielane do pożywki. Stwierdzono duże różnice w składzie monosacharydowym u polisacharydów wyizolowanych z roślin gruntowych i tkanek

uzyskanych w warunkach kultur *in vitro*. Związki otrzymane z roślin gruntowych charakteryzowały się większą różnorodnością cukrów prostych.

Cebule *Lilium testaceum* zawierają oprócz skrobi duże ilości β -1,4-glukomannanów (Wozniowski, Franz, 1994). Prowadzono hodowle *in vitro* tego gatunku: kultury zawieszinowe i kultury organów (cebulek). Polisacharydy izolowano z uzyskanej tkanki. Kultury zawieszinowe wytwarzały bardzo małe ilości tych związków. Natomiast w cebulkach stwierdzono zawartość ok. 10% (w przeliczeniu na sucha masę) glukomannanów. Szczegółowe badania wykazały, że związki te są identyczne z polisacharydami wytwarzanymi przez cebule roślin gruntowych.

Dotychczas jest niewiele opublikowanych wyników badań porównujących zawartość polisacharydów w roślinach gruntowych i w kulturach *in vitro* tych samych gatunków. Z przytoczonych wcześniej przykładów może wynikać, że biosynteza polisacharydów zależy od stopnia zróżnicowania tkanki. Zazwyczaj kultury zawieszinowe, czy kalusowe albo wytwarzają polisacharydy w bardzo małych ilościach (np. *Lilium testaceum*, *Astragalus* sp.), albo związki te bardzo różnią się od izolowanych z roślin gruntowych (np. *Echinacea purpurea* (L.) Moench.; również – Bräutigam, Franz, 1985). Jedynie polisacharydy uzyskane z kultur zawieszinowych *Nicotiana tabacum* L. wykazywały duże podobieństwo do związków izolowanych z liści tego gatunku.

Biosynteza polisacharydów w korzeniach włośnikowatych – organach transformowanych genetycznie za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* – jest odmienna niż w roślinach gruntowych (np. *Astragalus* sp.).

Kultury organów roślinnych – cebulek – wytwarzały identyczne związki, jak cebule roślin gruntowych (np. *Lilium testaceum*).

W Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie prowadzono badania nad polisacharydami wyizolowanymi z tkanek kalusowych *Basella alba* L., *Holarrhena antidysenterica* (Roxb.) Wall., *Ginkgo biloba* L., *Silene vulgaris* L. (Tab. 8).

Tab. 8. Biosynteza polisacharydów w kulturach *in vitro* roślin wyższych – przykłady.

Gatunek	Rodzina	Rodzaj kultury <i>in vitro</i>	Polisacharyd	Piśmiennictwo
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	<i>Aceraceae</i>	kultura zawieszinowa	ramnogalakuronian	Stevenson et al., 1988
			fukoksyloglukan, arabinogalaktan	Aspinall et al., 1969 (wg. Karácsonyi, Pašteka, 1975) Paull, Jones, 1978
<i>Polianthes tuberosa</i> L.	<i>Agavaceae</i>	kultura kalusowa	glukuronomannan	Honda et al., 1996

Gatunek	Rodzina	Rodzaj kultury <i>in vitro</i>	Polisacharyd	Piśmiennictwo
<i>Daucus carota</i> L.	<i>Apiaceae</i>	kultura zawieszinowa	pektyny	Asamizu et al., 1984
<i>Holarrhena antidysenterica</i> (Roxb.) Wall.	<i>Apocynaceae</i>	kultura kalusowa	heteroglikany (glukoza, arabinoza)	Ekiert, Kohlmünzer, 1998
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	<i>Asteraceae</i>	kultura zawieszinowa	fukogalaktoksylogluka- ny, kwaśny arabinogala- ktan	Wagner et al., 1987 Wagner et al., 1988 Wagner et al., 1989 Schöllhorn et al., 1993
<i>Basella alba</i> L.	<i>Basellaceae</i>	kultura kalusowa	heteroglikany	Cyunel et al., 1995
<i>Symphytum officinale</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	kultura kalusowa	fruktan	Abou-Mandour et al., 1987
<i>Silene vulgaris</i> L.	<i>Caryophyllaceae</i>	kultura kalusowa	heteroglikany	Michalek, 1991
<i>Drosera capensis</i>	<i>Droseraceae</i>	kultura zawieszinowa	kwaśny heteroglikan	Hook, Paper, 1996
<i>Astragalus gummifer</i> Labill. (GT)	<i>Fabaceae</i>	kultura kalusowa, kultura korzeniowa, korzenie włośnikowate	heteroglikany	Ionkova, 1995
<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	<i>Fabaceae</i>	korzenie włośnikowate	heteroglikany	Ionkova, 1995
<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	<i>Fabaceae</i>	korzenie włośnikowate	heteroglikany	Ionkova, 1995
<i>Glycine max.</i> (L.) Merr.	<i>Fabaceae</i>	kultura zawieszinowa	ksyloglukan	Hayashi, Matsuda, 1981
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Fabaceae</i>	kultura zawieszinowa	kwaśne heteroglikany	Mante, Boll, 1978
<i>Ginkgo biloba</i> L.	<i>Ginkgoaceae</i>	kultura kalusowa	heteroglikany	Grzybek et al., 1994
<i>Mentha arvensis</i> L. x <i>Mentha spicata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	kultura zawieszinowa	kwaśne heteroglikany	Uchiyama et al., 1993
<i>Lilium testaceum</i>	<i>Liliaceae</i>	kultura zawieszinowa	heteroglikan	Wozniowski, Franz, 1994
		kultura organów (cebulki)	β-1,4-glukomannan	
<i>Althaea officinalis</i> L.	<i>Malvaceae</i>	korzenie włośnikowate	heteroglikan	Ionkova, Alfermann, 1994
<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	<i>Scrophulariaceae</i>	kultura zawieszinowa	ksyloglukan, arabinogalaktan	Hensel et al., 1997
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	kultura zawieszinowa	arabinoksyloglukan	Akiyama, Kato, 1982 Eda et al., 1983a Eda et al., 1983b

3. Część doświadczalna

3.1 Kultury kalusowe *Melittis melissophyllum* L. — optymalizacja warunków

3.1.1 Materiał badawczy i jego przygotowanie

Materiałem do zapoczątkowania kultury *in vitro* gatunku *Melittis melissophyllum* L. były owoce (rozłupki) pochodzące z europejskich ogrodów botanicznych.

Przygotowanie materiału do badań obejmowało następujące etapy:

- chłodzenie owoców,
- izolowanie nasion,
- pęcznienie,
- sterylizację.

W celu przerwania stanu spoczynku nasion, całe owoce umieszczano w temp. +4 °C na okres ok.14 dni. Następnie izolowano nasiona poprzez usunięcie twardej owocni i pozostawiano je przez 4 godz. w jałowej wodzie destylowanej w temp. 25 °C w celu spęcznienia. Po tym czasie nasiona sterylizowano: 70 % (v/v) etanolem przez 30 sekund, a następnie 5 % wodnym roztworem podchlorynu wapnia przez 5 min. Po kilkakrotnym przepłukaniu nasion jałową wodą destylowaną materiał przenoszono na uprzednio przygotowaną sterylną pożywkę zawierającą kwas giberelinowy (GA₃) – 0,5 mg/l i kinetynę (Kin) – 0,25 mg/l (Tab.9). Po upływie 7-10 dni nasiona kiełkowały (50%) i wyrastały z nich siewki.

Materiałem do zapoczątkowania kultury kalusowej były siewki a także roślinki uzyskane w wyniku mikrorozmnazania*.

3.1.2 Stosowane pożywki

Do badań stosowano zestaloną agarą (0,8 %) pożywkę podstawową wg Murashige i Skoog'a – MS (Murashige, Skoog, 1962), uzupełnioną różnymi roślinnymi substancjami wzrostowymi (Tab.9.). W pożywkach pH doprowadzano do wartości 5,7-5,8 przed autoklawowaniem. Pożywki sterylizowano w autoklawie przez 20 min w temp. 121 °C pod ciśnieniem 0,2 MPa.

* Metoda mikrorozmnazania *Melittis melissophyllum* L. została wcześniej opisana w publikacji (Skrzypczak, Skrzypczak, 1993)

3.1.3 Warunki hodowli

Kultury kalusowe prowadzono w kolbkach Erlenmeyera (100 ml) lub na szalkach Petriego zawierających odpowiednio 50 i 10 ml podłoża. Kolbki i szalki umieszczano w pokoju hodowlanym w temp. $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, przy ciągłym oświetleniu lampami jarzeniowymi o natężeniu ok. 2000 lx. Pasaży dokonywano co 4-5 tygodni.

Wszystkie czynności związane z zakładaniem kultury *in vitro* i pasażowaniem materiału roślinnego przeprowadzano w warunkach sterylnych, w łóży z nawiewem laminarnym.

3.1.4 Pomiary wzrostu kultur kalusowych

W celu pomiaru wzrostu kultur kalusowych oznaczano wagowo świeżą masę po dokładnym oddzieleniu tkanki kalusowej od agarowego podłoża. Wskaźnik przyrostu (W_p) obliczano wg wzoru:

$$W_p = \frac{M_k - M_p}{M_p}$$

M_k – masa końcowa [g]; masa kalusa po określonym okresie wzrostu (4-5 tygodni),

M_p – masa początkowa [g]; masa pasażowanego kalusa (masa inokulum).

3.1.5 Wyniki

Eksplantatami były fragmenty siewek: korzonki, hypokotyle, liścienie, listki, pączki szczytowe oraz fragmenty roślinek uzyskanych w wyniku mikrorozmnażania (Skrzypczak, Skrzypczak, 1993): kawałki korzeni, liści, łodyżek. W celu zapoczątkowania kalusowania umieszczano je na pożywce MS uzupełnionej zwykle auksyną 2,4-D w różnych stężeniach (Tab.9.), również w połączeniu z innymi regulatorami wzrostu. Po upływie 1-2 tygodni na wszystkich wariantach pożywki MS, na wszystkich eksplantatach (szczególnie na fragmentach łodyżek i korzonków), zaczynała się tworzyć tkanka kalusowa o kolorze jasnozielonym lub jasnożółtym – zdj.5-8. Najlepiej ten proces zachodził na pożywkach uzupełnionych:

- 2,4-D – 0,25 mg/l i BAP – 1 mg/l (wariant C),
- 2,4-D – 0,5 mg/l i Kin – 1 mg/l (wariant E).

Tkankę kalusową pasażowano na świeże pożywki, takie same jak wyjściowe. Tkanka przyrastała powoli, część z niej brązowieła i obumierała. Do pasażu wybierano tylko żywe fragmenty kalusa. Po 4-5 pasażach stwierdzono, że – porównując z innymi stosowanymi pożywkami (B–J) – pożywka H zawierająca 2,4-D – 1mg/l i Kin – 0,1 mg/l jest najodpowiedniejsza do prowadzenia hodowli. Obserwowano tu stały, powolny przyrost jasnozielonej

lub jasnożółtej, nieodróżnianej tkanki kalusowej – zdj.9. Celem prowadzenia kultur kalusowych było uzyskanie odpowiedniej ilości materiału do izolacji polisacharydów. Chcąc zoptymalizować hodowlę i zwiększyć przyrost biomasy przetestowano inne warianty pożywki MS (Tab.9). Po 2–3 pasażach zaobserwowano pozytywne rezultaty – tkanki przeniesione z pożywek B–J na pożywki K–P zaczęły wyraźnie lepiej i szybciej rosnąć. Część materiału z wariantu H pasażowano na taką samą pożywkę. Na pożywce uzupełnionej BAP (1 mg/l), NAA (0,5 mg/l), GA₃ (0,25 mg/l) – pożywka P – zaczęła się tworzyć szybko rosnąca tkanka kalusowa – najpierw jasnozielona lub zielonożółtawa (zdj.10.), potem – po kolejnych pasażach – ciemnozielona (zdj.11.), o pewnym zróżnicowaniu. Jej struktura była zwarta. Na powierzchni widoczne były twory przypominające pączki pędowe. Nie zachodziła jednak całkowita organogeneza. Analiza mikroskopowa wykazała obecność elementów tkanki przewodzącej – naczyń.

W celu porównania szybkości przyrostu biomasy na pożywkach H oraz K–P, odważoną ilość tkanki kalusowej (ok. 0,50 g) wykładano na każdą z pożywek. Po upływie 4-5 tygodni tkankę ponownie ważono i obliczano wskaźnik przyrostu W_p (zob. 3.1.4) – zdj.10-13. Dla każdej z pożywek przeprowadzono po 5 serii badań: w każdej serii było po 20 kolbek (Tab. 10–Tab. 18). Wszystkie wartości średnie współczynników przyrostu tkanki kalusowej ($\bar{W}_p$) były statystycznie znamienne.

Dla wariantów H, K-P przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (Tab. 19) weryfikując hipotezę o równości średnich poszczególnych wariantów [Greń, 1987]. Dla powyższej analizy obszar krytyczny, wyznaczony przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ z rozkładu statystyki F o 6 i 693 stopniach swobody, zawiera wartości większe od wartości krytycznej $F_{95\%} = 2,11$. Obliczona wartość statystyki $F = 2213,80$, więc hipotezę o równości wartości średnich należy odrzucić, co oznacza, że z prawdopodobieństwem błędu 0,05 można stwierdzić wyraźne różnice wpływu pożywek na wartości wskaźnika wzrostu. Ocenami tego wpływu są odpowiednie wartości średnie (Tab. 18, Ryc.5).

Na podstawie uzyskanych wyników (Tab.11–Tab. 18) pożywkę P uzupełnioną BAP, NAA i GA₃ wybrano jako podłoże do namnażania tkanki kalusowej – zdj.14. Stwierdzono, że czas prowadzenia kultury nie powinien być krótszy niż jeden miesiąc (gdyż przyrost biomasy byłby zbyt mały), ani dłuższy niż półtora miesiąca (ze względu na wyczerpywanie się substancji w pożywce znacznie zwiększa się procent obumarłej tkanki). Po upływie 4-5 tygodni część tkanki pasażowano na świeżą pożywkę P, a pozostałą część zbierano, zamrażano i następnie liofilizowano. W wyniku liofilizacji tkanka kalusowa traci ok. 90 %

swojej pierwotnej masy. Ogółem do grudnia roku 1997 uzyskano ok. 240 g wysuszonego materiału. Część zliofilizowanej tkanki kalusowej posłużyła jako surowiec do izolacji polisacharydów.

3.1.6 Podsumowanie wyników, wnioski i dyskusja

Dobór wariantów pożywki podstawowej MS (Tab.9.) prowadzono na podstawie danych literaturowych (m.in. Wareing, Phillips, 1976; Zenkteler, 1984), a także własnych, wcześniejszych doświadczeń z prowadzeniem kultur *in vitro* roślin leczniczych: *Gentiana* sp. (Skrzypczak et al., 1993; Skrzypczak-Pietraszek, 1993), *Oenothera* sp. (Skrzypczak et. al., 1994; Thiem, 1994), *Exacum affine* Balf. f. (Skrzypczak-Pietraszek, Szewczyk, 1996).

W wyniku przeprowadzonych badań (Tab.9.) wybrano najkorzystniejsze warunki do prowadzenia kultury kalusowej gatunku *Melittis melissophyllum* L.:

- zapoczątkowanie kalusowania:

eksplantaty:.....fragmenty łodyżek i korzonków

podłoże: modyfikacje pożywki podstawowej MS zawierające

2,4-D – 0,25 mg/l, BAP – 1 mg/lpożywka C

2,4-D – 0,5 mg/l, Kin – 1 mg/lpożywka E

- namnażanie tkanki kalusowej:

podłoże: pożywka podstawowa MS uzupełniona

BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l, GA₃ – 0,25 mg/l pożywka P

czas hodowli:.....4–5 tygodni

Pożywki C i E, które były najbardziej efektywne do inicjowania kalusowania nie okazały się właściwe do namnażania tkanki kalusowej.

Dla pożywek L, M i N, będących modyfikacjami pożywki K (dodatek mezoinozytolu, kazeiny), średni wskaźnik przyrostu dla serii I–V — $\overline{W}_{p(I-V)}$ (Tab. 18.) był wyższy niż dla wariantu K.

Wartość $\overline{W}_{p(I-V)}$ dla wariantów H, K i O była zbliżona, chociaż w poszczególnych seriach (Tab.11, Tab.13, Tab.17) występowały pewne różnice.

Wartość $\overline{W}_{p(I-V)}$ dla pożywki P była 4–5 krotnie wyższa niż dla pozostałych wariantów. Ta różnica jest znamienna statystycznie.

Tkanka kalusowa uzyskana na pożywce P morfologicznie wyraźnie różniła się od niezróżnicowanych, żółtawych lub jasnozielonych tkanek rosnących na innych pożywkach. Była ciemnozielona, o zwartej strukturze. Obserwowano jej wyraźne zróżnicowanie,

przejawiające się obecnością uwypukleń na powierzchni tkanki, przypominających tworzące się pączki pędowe. Analiza mikroskopowa wykazała obecność elementów tkanki przewodzącej (naczyni) w preparatach mikroskopowych. Porównując wartość $\overline{W}_{p(I-V)}$ dla różnych wariantów pożywki podstawowej MS (Tab. 18.) można wysnuć wniosek, że w przypadku gatunku *Melittis melissophyllum* L. pewne zróżnicowanie tkanki kalusowej sprzyja intensyfikacji jej wzrostu.

Tab.9. Modyfikacje pożywki podstawowej MS stosowane w kulturze in vitro *Melittis melissophyllum* L.

Etap kultury <i>in vitro</i>	Materiał wyjściowy	Rezultat	Wariant pożywki	Roślinne substancje wzrostowe [mg/l pożywki]						Inne dodatki [g/l pożywki]	
				GA ₃	NAA	Kin	BAP	2,4-D	IAA	m-in.	kaz.
I	nasiona	siewki	A	0,5		0,25					
II	fragmenty siewek oraz roślinek uzyskanych w wyniku mikrorozmnażania	tkanka kalusowa	B			1		0,25			
			C				1	0,25			
			D					0,5			
			E			1		0,5			
			F					1			
			G			1		1			
			H			0,1		1			
			I				1		1		
			J		1		1				
III	tkanka kalusowa	przyrost tkanki kalusowej	B			1		0,25			
			C				1	0,25			
			D					0,5			
			E			1		0,5			
			F					1			
			G			1		1			
			H			0,1		1			
			I				1		1		
			J		1		1				
			K			0,5		1			
			L			0,5		1		0,5	0,5
			M			0,5		1		0,5	
			N			0,5		1			
			O			0,5		1			0,5
			P		0,5		1	0,5			
				0,25							

Stosowane skróty:

- MS

-

pożywka podstawowa wg Murashige i Skoog'a (Murashige, Skoog, 1962)
- BAP

-

6-benzylaminopuryna
- 2,4-D

-

kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
- GA₃

-

kwas giberelinowy
- IAA

-

kwas indoliloctowy
- kaz.

-

kazeina
- Kin

-

kinetyna
- m-in.

-

mezoinozytol
- NAA

-

kwas α-naftalenooctowy

Tab. 10. Czas wzrostu tkanki kalusowej

Seria	Pasaż	Czas wzrostu [dni]
I	piąty	30
II	szósty	28
III	siódmy	31
IV	ósmy	30
V	dziewiąty	29

Tab. 11. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l i Kin – 0,1 mg/l (wariant H) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	4,50	2,96	4,48	4,07	3,39
2	3,96	3,77	3,76	2,16	3,33
3	4,11	3,66	5,11	2,74	3,12
4	5,01	3,06	3,62	4,23	4,78
5	4,87	3,81	3,74	3,86	4,69
6	4,31	3,83	4,23	4,62	3,14
7	3,20	3,79	4,16	4,84	4,13
8	5,09	4,41	3,22	4,40	3,88
9	4,61	3,84	4,90	3,64	3,38
10	4,70	4,14	3,47	4,90	3,08
11	4,49	3,44	4,33	4,63	4,40
12	3,51	4,35	3,42	4,07	4,28
13	3,19	3,73	4,27	4,18	3,90
14	3,29	4,96	4,49	4,55	4,22
15	2,55	3,94	4,46	3,93	4,72
16	3,10	4,77	3,62	4,13	4,37
17	4,11	2,30	3,88	3,32	3,12
18	3,10	3,81	4,10	3,76	3,23
19	3,21	3,72	2,98	5,31	3,27
20	4,67	4,36	4,64	3,96	2,82
$\overline{W}_p$	3,98	3,83	4,04	4,06	3,76
σ_{W_p}	0,77	0,52	0,56	0,78	0,59
t	5,17	7,35	7,17	5,21	6,33
$t_{1-\alpha, f-1}$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

Tab. 12. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l i GA₃ – 0,25 mg/l (wariant P) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	21,01	17,52	18,09	17,86	16,12
2	15,79	23,08	15,53	17,07	16,87
3	16,41	19,44	19,76	15,68	22,48
4	20,69	15,31	21,95	20,15	16,37
5	15,41	17,92	19,86	15,26	19,54
6	23,52	18,33	19,28	17,35	23,77
7	20,89	19,25	14,73	16,88	15,89
8	18,30	18,84	17,30	23,42	18,61
9	17,21	18,60	12,24	16,04	20,74
10	14,90	18,51	18,31	16,35	18,56
11	19,11	16,56	17,94	15,50	19,74
12	16,79	16,30	16,97	18,72	16,29
13	17,81	17,24	15,63	19,24	20,09
14	18,70	19,87	23,98	16,82	19,43
15	17,41	17,35	17,49	18,96	19,37
16	17,21	15,01	15,64	21,28	16,86
17	17,29	19,13	18,32	16,87	16,14
18	16,31	18,37	16,67	19,09	15,56
19	18,80	13,71	18,96	21,95	15,00
20	21,40	17,35	22,74	18,97	16,93
$\overline{W}_p$	18,25	17,89	18,07	18,17	18,22
σ_{W_p}	2,27	1,88	3,00	2,21	2,43
t	8,03	9,53	6,03	8,22	7,48
$t_{1-\alpha, f-1}^*$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

Tab.13. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l i Kin – 0,5 mg/l (wariant K) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	4,71	3,82	4,15	4,18	4,02
2	5,10	3,99	3,98	4,00	3,68
3	4,61	4,36	4,10	2,93	3,59
4	4,19	4,47	4,16	4,73	3,52
5	3,40	3,27	4,60	3,58	5,75
6	5,41	4,04	4,62	4,85	4,94
7	4,79	4,95	5,15	4,85	4,12
8	4,60	2,12	4,23	2,66	4,07
9	3,60	4,92	4,00	4,14	4,13
10	3,41	5,00	2,97	3,79	3,60
11	3,59	4,27	3,24	5,62	4,03
12	3,51	3,66	3,76	4,48	4,70
13	4,87	3,05	3,22	5,39	4,99
14	4,20	4,01	5,77	3,29	3,26
15	3,21	3,79	4,60	3,20	4,12
16	5,11	3,61	3,49	3,92	3,22
17	4,29	4,37	4,25	3,51	4,12
18	4,91	4,32	3,01	4,75	3,54
19	5,09	3,80	5,15	4,38	4,73
20	4,23	4,53	3,62	4,79	4,14
$\overline{W}_p$	4,34	4,02	4,10	4,15	4,11
σ_{W_p}	0,68	0,80	0,75	0,88	0,69
t	6,36	5,03	5,46	4,72	5,93
$t_{1-\alpha, f-1}^{**}$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

Tab. 14. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin – 0,5 mg/l, m-in. – 0,5 g/l i kaz. – 0,5 g/l (wariant L) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	5,00	3,15	3,27	2,95	3,74
2	3,81	3,29	4,09	3,61	4,16
3	3,30	4,08	3,48	3,51	3,44
4	3,64	3,34	4,91	5,42	5,85
5	4,90	4,52	4,53	4,97	5,41
6	3,70	4,08	3,83	4,09	5,42
7	4,56	3,63	3,89	4,87	3,40
8	4,19	3,56	2,72	3,34	3,89
9	5,70	5,13	5,53	4,35	4,51
10	4,30	4,66	3,75	3,22	5,24
11	4,13	3,81	3,10	3,96	4,80
12	3,60	4,81	4,72	3,11	4,52
13	4,64	3,88	3,65	5,22	4,80
14	3,70	5,10	4,28	4,07	5,62
15	4,60	4,10	4,24	4,56	4,90
16	5,00	4,59	4,24	5,93	4,39
17	4,08	3,72	3,18	4,60	4,64
18	3,87	3,96	4,36	4,51	4,82
19	3,24	3,19	4,54	2,50	3,47
20	5,43	5,51	3,71	3,11	3,40
$\overline{W_p}$	4,27	4,11	4,00	4,10	4,52
σ_{W_p}	0,69	0,67	0,76	0,81	0,82
t	6,17	6,15	5,26	5,04	5,53
$t_{1-\alpha, f-1}^*$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$



Tab.15. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin. – 0,5 mg/l i m-in. – 0,5 g/l (wariant M) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	4,00	2,99	4,05	4,03	5,17
2	3,06	3,86	3,53	3,38	3,55
3	5,90	4,48	4,76	5,74	4,60
4	4,86	4,00	3,49	4,02	5,08
5	5,70	5,10	5,95	5,05	4,76
6	5,21	5,11	5,46	2,68	5,00
7	3,51	4,34	5,07	4,33	3,94
8	4,29	5,99	4,65	3,98	4,67
9	4,61	4,21	4,63	4,10	4,93
10	5,49	5,65	4,55	2,70	5,64
11	4,30	6,48	4,65	4,38	5,32
12	4,90	4,14	5,56	6,36	5,44
13	5,51	3,86	3,47	2,15	5,63
14	4,39	4,31	3,33	4,52	4,13
15	4,01	3,93	3,89	5,00	4,21
16	3,90	4,69	3,99	5,21	4,53
17	3,70	3,62	4,44	3,30	5,81
18	2,81	5,31	4,92	3,68	5,41
19	5,42	4,05	3,36	4,11	4,15
20	3,50	4,37	3,74	5,32	3,37
$\overline{W}_p$	4,45	4,52	4,37	4,20	4,77
σ_{W_p}	0,91	0,95	0,84	1,15	0,63
t	4,92	4,78	5,20	3,64	7,60
$t_{1-\alpha, f-1}^*$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

Tab.16. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin. – 0,5 mg/l i kaz. – 0,5 g/l (wariant N) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	5,19	4,04	5,08	5,06	6,22
2	4,40	4,14	4,33	3,99	4,06
3	4,11	5,41	4,34	4,05	4,49
4	4,61	4,49	3,89	4,34	4,45
5	5,00	4,41	3,20	4,76	3,39
6	5,31	5,08	5,11	6,47	3,91
7	5,49	6,86	4,64	4,27	4,54
8	4,61	3,84	4,20	3,87	5,41
9	5,60	4,69	4,60	4,59	5,43
10	4,21	4,16	4,14	5,35	5,23
11	4,00	4,34	3,98	4,29	4,55
12	4,31	4,51	5,27	4,09	5,11
13	4,19	2,64	3,81	5,29	4,87
14	6,31	4,39	4,03	4,18	5,17
15	4,91	5,00	4,99	4,69	5,09
16	4,79	4,94	3,77	4,76	4,37
17	3,70	4,21	5,37	5,85	5,43
18	4,00	3,47	4,27	3,38	4,06
19	3,21	5,26	4,26	5,05	3,92
20	5,26	3,96	4,33	5,35	4,79
$\overline{W}_p$	4,66	4,49	4,38	4,68	4,72
σ_{W_p}	0,74	0,93	0,57	0,72	0,73
t	6,30	4,85	7,68	6,53	6,51
$t_{1-\alpha, f-1}^*$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

Tab.17. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 0,5 mg/l, BAP – 1 mg/l (wariant O) dla serii I–V

Kolbka	Seria				
	I	II	III	IV	V
1	5,49	2,63	3,84	4,98	3,96
2	4,34	3,96	3,18	4,82	5,02
3	4,68	2,84	2,34	4,76	4,01
4	3,48	3,57	4,20	4,02	3,79
5	2,89	5,50	3,82	3,82	4,04
6	3,10	4,65	4,02	4,08	3,56
7	4,20	4,21	3,78	3,28	3,44
8	5,46	4,40	3,68	3,04	3,65
9	2,33	4,37	2,85	4,51	4,04
10	4,99	3,74	5,67	4,01	4,40
11	4,04	3,76	3,09	4,43	4,67
12	3,40	3,74	6,11	3,04	3,83
13	2,91	4,94	4,65	3,55	3,98
14	3,73	3,93	3,83	4,70	4,29
15	3,99	4,18	4,14	2,81	3,86
16	4,03	4,82	4,78	3,57	4,96
17	4,63	4,62	4,81	4,48	4,47
18	4,45	4,88	4,44	3,46	3,37
19	4,41	5,63	4,17	4,17	3,30
20	4,29	5,66	3,77	4,58	4,60
$\overline{W}_p$	4,04	4,30	4,06	4,01	4,06
σ_{W_p}	0,84	0,76	1,02	0,66	0,43
t	4,79	5,66	3,99	6,06	9,45
$t_{1-\alpha, f-1}$ *	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09

* wartość krytyczna odczytana z tablic dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i stopni swobody $f = 19$

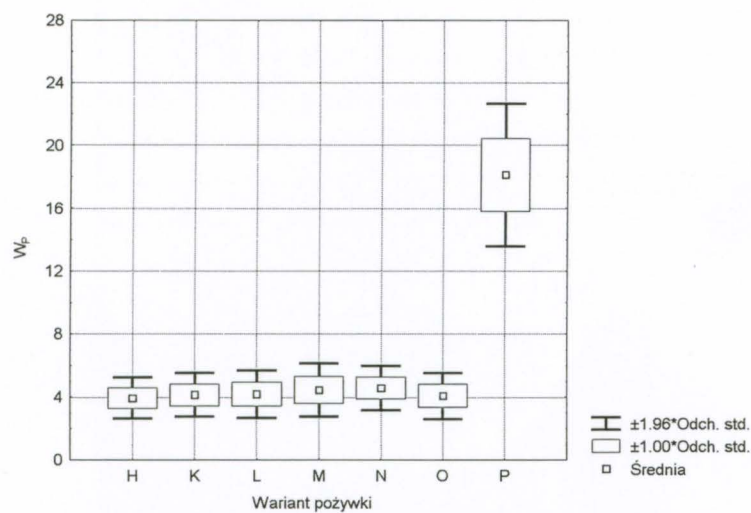
Tab. 18. Porównanie przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywkach H, K-P. (Opis pożywek zob. Tab.9)

Seria	Wartość średnia wskaźnika przyrostu dla pożywek						
	H	K	L	M	N	O	P
I	3,98 ± 0,77	4,34 ± 0,68	4,27 ± 0,69	4,45 ± 0,91	4,66 ± 0,74	4,04 ± 0,84	18,25 ± 2,27
II	3,83 ± 0,52	4,02 ± 0,80	4,11 ± 0,67	4,52 ± 0,95	4,49 ± 0,93	4,30 ± 0,76	17,89 ± 1,88
III	4,04 ± 0,56	4,10 ± 0,75	4,00 ± 0,76	4,37 ± 0,84	4,38 ± 0,57	4,06 ± 1,02	18,07 ± 3,00
IV	4,06 ± 0,78	4,15 ± 0,88	4,10 ± 0,81	4,20 ± 1,15	4,68 ± 0,72	4,01 ± 0,66	18,17 ± 2,21
V	3,76 ± 0,59	4,11 ± 0,69	4,52 ± 0,82	4,77 ± 0,63	4,72 ± 0,73	4,06 ± 0,43	18,22 ± 2,43
$\overline{W}_{P(I-V)}^*$	3,94	4,15	4,20	4,46	4,59	4,09	18,12
$\sigma_{\overline{W}_p}^{**}$	0,07	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07	0,23
$\sigma_{W_p}^{***}$	0,67	0,71	0,77	0,87	0,72	0,75	2,31
Min 95%	2,16	2,74	2,68	2,73	3,17	2,61	13,53
Max 95%	5,31	5,55	5,72	6,19	6,01	5,58	22,71
Liczność	100	100	100	100	100	100	100

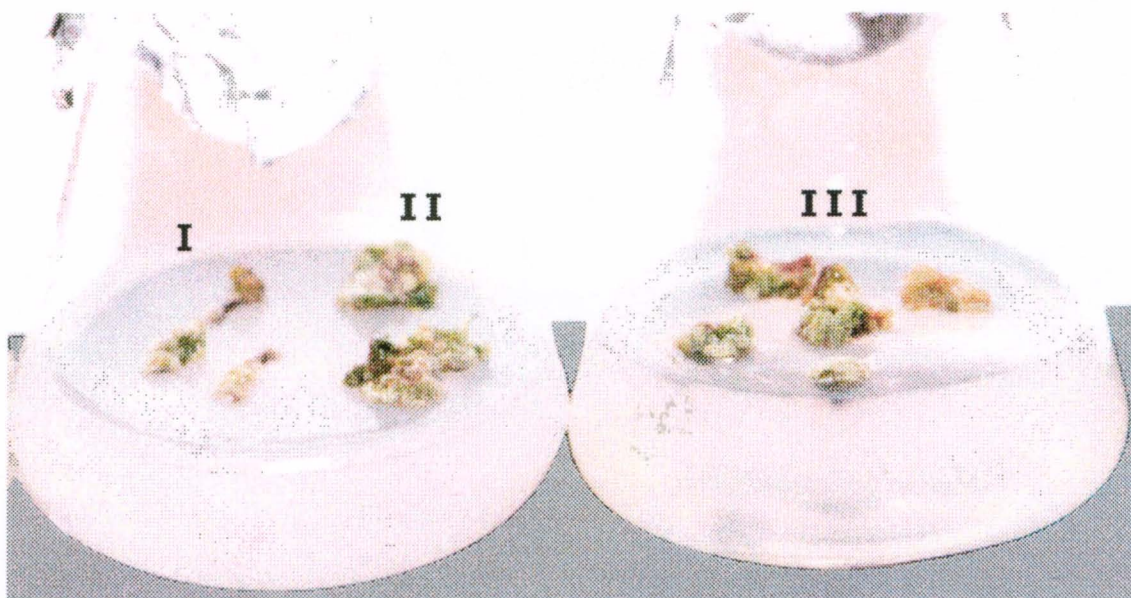
* jako populację statystyczną przyjęto wszystkie eksplantaty danego wariantu
** odchylenie standardowe wartości średniej (błąd standardowy)
*** odchylenie standardowe populacji

Tab. 19. Analiza wariancji wskaźnika przyrostu tkanki kalusowej dla pożywek H, K-P

Źródło zmienności	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Wariancja z próby	Statystyka F	Krytyczny poziom istotności α	Wartość krytyczna $F_{95\%}$
Pomiędzy grupami	16544,58	6	2757,43	2213,80	0,00	2,11
W obrębie grup	863,18	693	1,25	—	—	—
Razem	17407,76	699	—	—	—	—



Ryc.5. Porównanie wartości średnich wskaźnika W_p dla wariantów pożywek H, K-P

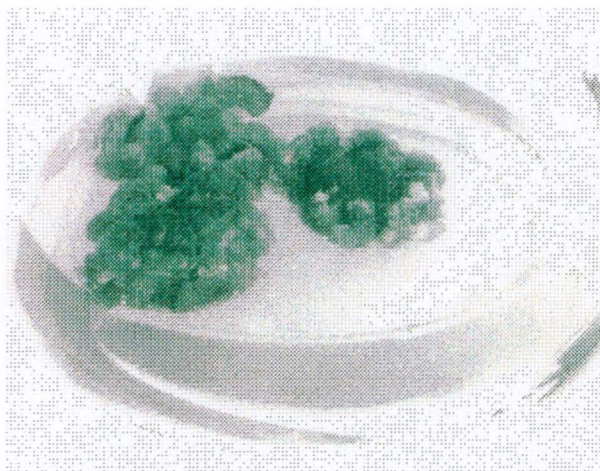


Zdj. 5. Kalusujące fragmenty korzonków (I), liści (II) i łodyżek (III)
na pożywkach:

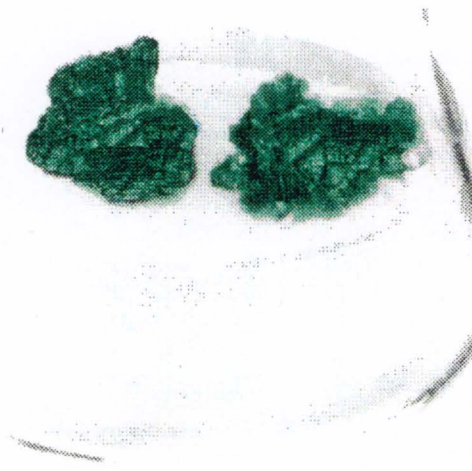
- MS 2,4-D – 0,25 mg/l, BAP – 1 mg/l (I, II)
- MS 2,4-D – 0,5 mg/l, Kin – 1 mg/l (III)



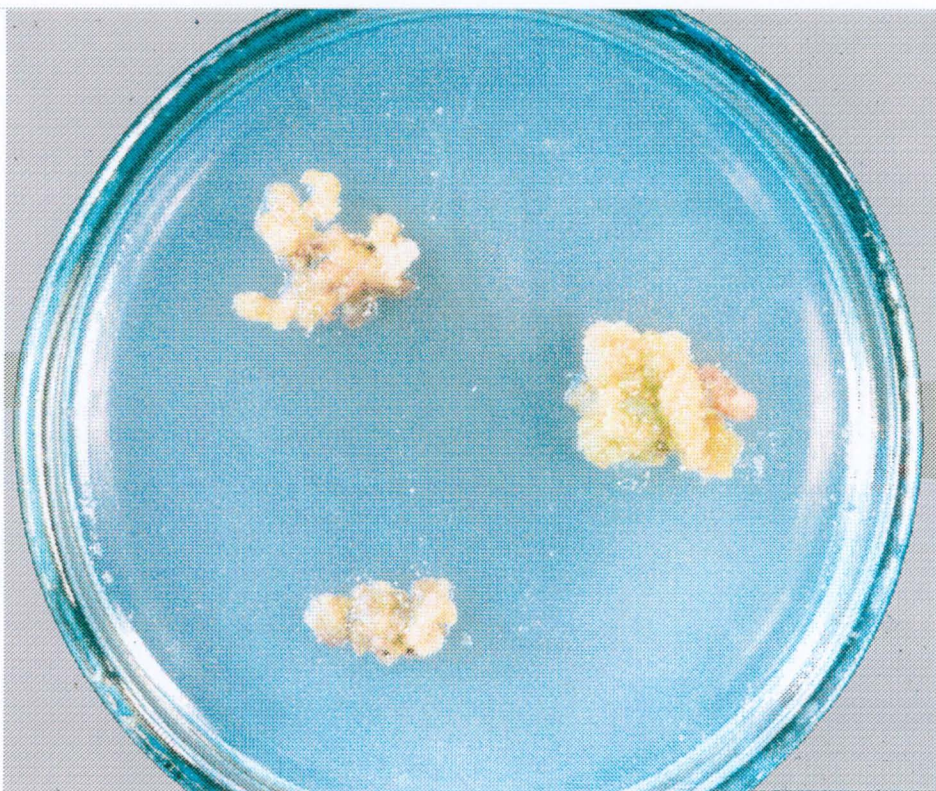
Zdj. 6. Kalusujące fragmenty korzonków na pożywce MS 2,4-D – 0,5 mg/l i Kin – 1 mg/l



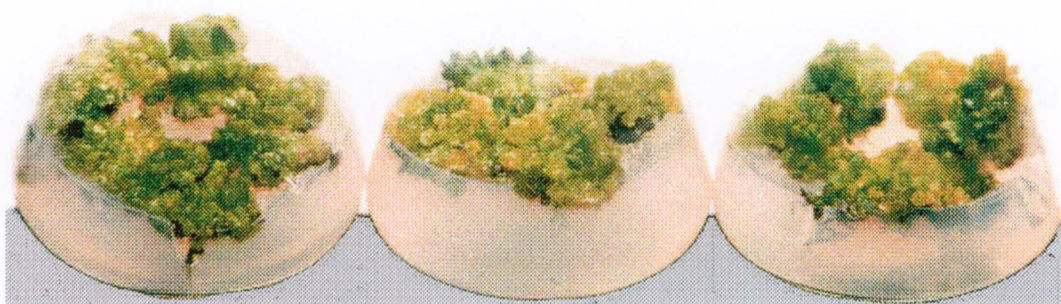
Zdj. 7. Kalusujące fragmenty liści na pożywce MS BAP – 1 mg/l, IAA – 1 mg/l



Zdj. 8. Kalusujące fragmenty liści na pożywce MS BAP – 1 mg/l, NAA – 1 mg/l



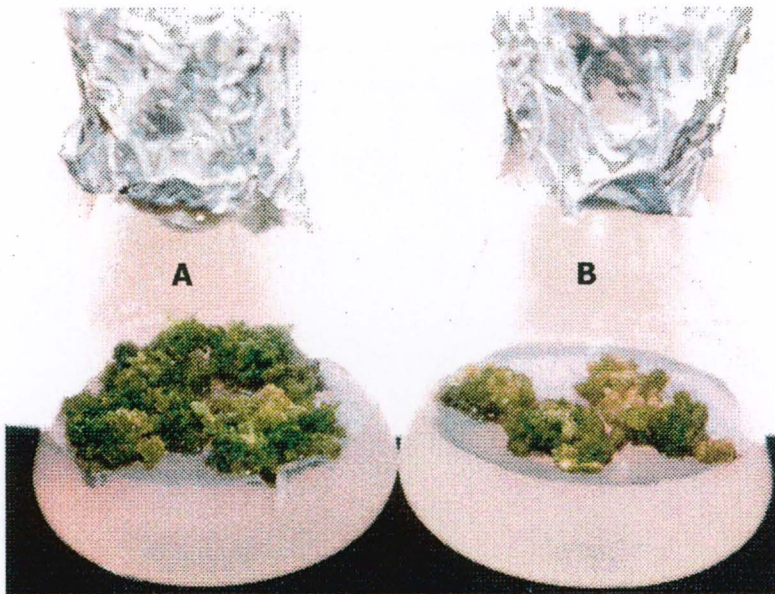
Zdj. 9. Tkanka kalusowa na pożywce MS 2,4-D – 1 mg/l, Kin – 0,1 mg/l



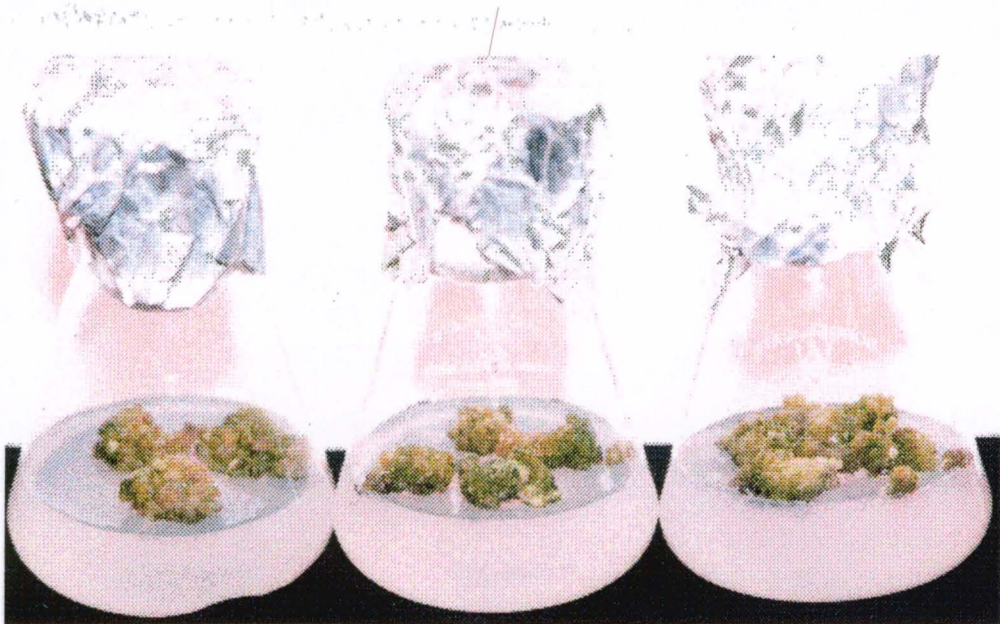
Zdj. 10. Jasnozielona i zielonożółtawa tkanka kalusowa na pożywce MS BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l, GA₃ – 0,25 mg/l po 30-dniowym okresie wzrostu (seria I – piąty pasaż; masa początkowa tkanki 0,5 g)



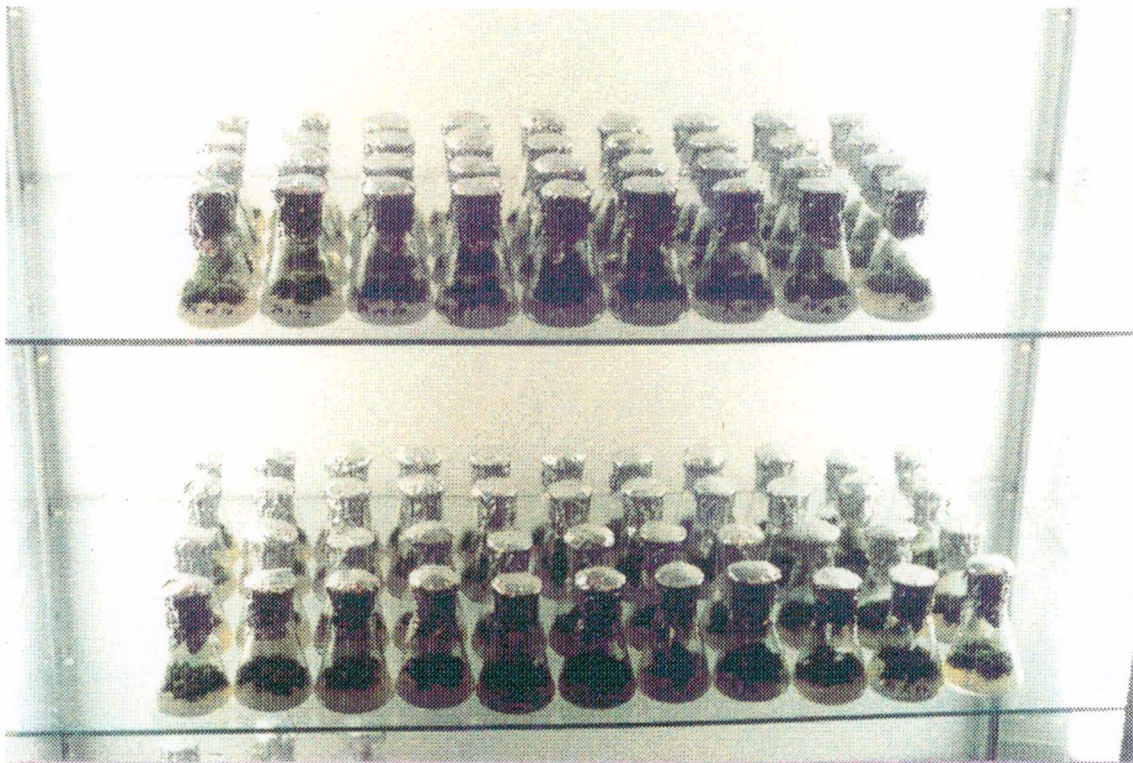
Zdj. 11. Ciemnozielona tkanka kalusowa na pożywce MS BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l, GA₃ – 0,25 mg/l po 28-dniowym okresie wzrostu (seria II – szósty pasaż; masa początkowa tkanki 0,5 g)



Zdj. 12. Tkanka kalusowa po 28-dniowym okresie wzrostu na pożywce:
 A – MS BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l, GA₃ – 0,25 mg/l
 B – MS 2,4-D – 1 mg/l, Kin – 0,1 mg/l
 (seria II – szósty pasaż; masa początkowa tkanki 0,5 g)



Zdj. 13. Tkanka kalusowa na pożywce MS 2,4-D – 1 mg/l, Kin – 0,1 mg/l po 28-dniowym okresie wzrostu (szósty pasaż; masa początkowa tkanki 0,5 g)



Zdj. 14. Tkanka kalusowa na pożywce MS BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l, GA₃ – 0,25 mg/l (namnażanie tkanki w celu uzyskania materiału do izolacji polisacharydów)

3.2 Izolacja i określanie struktury polisacharydów z ziele i tkanki kalusowej *Melittis melissophyllum* L.

3.2.1 Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły:

- ziele *Melittis melissophyllum* L. zebrane ze stanu naturalnego* w maju roku 1994 w lesie w Majdanie k/Lublina i wysuszone w temperaturze pokojowej; egzemplarze zielnikowe są przechowywane w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie,
- tkanka kalusowa *Melittis melissophyllum* L. wyhodowana w warunkach kultury in vitro (rozdz.3.1) w roku 1997 na pożywce MS uzupełnionej roślinnymi regulatorami wzrostu: BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l i GA₃ – 0,25 mg/l. Tkanę przemyto wodą destylowaną, zamrożono i zliofilizowano.

3.2.2 Aparatura, odczynniki i metody

Aparatura

- Liofilizator
producent.....Labconco (USA)
typ..... Freeze Dry System (Free Zone® 4,5)
temperatura..... –50 °C
ciśnienie (próżnia)..... 1,5 Pa
- Chromatograf gazowy
producent..... Hewlett-Packard
typ..... HP 6890 sprzężony z selektywnym detektorem masy
temperatura pracy..... 220 °C
gaz nośny.....hel (ciśnienie 0,13 MPa)
kwarcowa kolumna kapilarnaHP-225
długość kolumny 30 m
średnica wewnętrzna kolumny 0,25 mm
pokrycie kolumny..... film fazy stacjonarnej o grubości 0,25 µm
- Wirówka
typ.....MPW 342
prędkość obrotowamax 4500 obr/min

* Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi T. Krzaczkowi i Pracownikom Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Lublinie za pomoc w zebraniu surowca.

- Mikrowirówka
 producent..... Eppendorf
 typ..... 5416
 prędkość obrotowamax 15000 obr/min
- Piec muflowy
 producent..... Czyłok (Polska)
 typ..... FCF-2,5 S
 temperatura pracy..... max 1150 °C

Odczynniki

- Wszystkie stosowane w badaniach odczynniki były cz.d.a.
- DMSO – bezwodny odczynnik, przechowywany nad sitem molekularnym 4 Å.
- KH – ze względu na dużą reaktywność (w środowisku wodnym następuje samozapalenie i wybuch) przechowywany jest w postaci 20% zawiesiny w oleju parafinowym.
- Roztwór NaBH₄ w DMSO – DMSO osuszano przez 24 godz. nad sitem molekularnym 4 Å. Następnie 1 g NaBH₄ rozpuszczano w 50 ml osuszonego DMSO w temperaturze 100 °C przez 30 min. Po ochłodzeniu odczynnik przechowywano w temperaturze +4 °C.

Metody

- chromatografia kolumnowa jonowymienna
 wypełnienie kolumny DEAE-Sephacel
 (Pharmacia-Biotech)
 wysokość wypełnienia..... 27 cm
 średnica kolumny 2,7 cm
 szybkość wypływu eluatu (wypływ grawitacyjny) 0,4 ml/min
- żelowa chromatografia kolumnowa GPC
 wypełnienie kolumny Sephacryl S-300
 (Pharmacia-Biotech)
 wysokość wypełnienia..... 78 cm
 średnica kolumny 1,7 cm
 szybkość wypływu eluatu..... 10 ml/godz. ≈ 0,17 ml/min
 (wypływ wymuszony pompą perystaltyczną)
- zagęszczanie – wszystkie roztwory zawierające polisacharydy były zagęszczane na rotacyjnej wyparce próżniowej, przy temperaturze łaźni wodnej poniżej 40 °C.

- całkowita zawartość polisacharydów – oznaczana we frakcjach eluowanych z kolumny za pomocą reakcji barwnej z fenolem i kwasem siarkowym (Dubois et al., 1956): do 0,2 ml eluatu dodawano 2 ml stężonego kwasu siarkowego (98%, cz.d.a.) i 1 ml 2,5 % wodnego roztworu fenolu. Po zmieszaniu mierzono absorpcję przy $\lambda = 490$ nm.
- dializa – roztwory polisacharydów wyeluowane z kolumn oczyszczano z soli nieorganicznych za pomocą dializy stosując błonę Spectra Por 3 firmy Serva o MWCO 3,5 kDa. Dializę prowadzono przez 48 godzin w wodzie destylowanej (ciągłe mieszanie, wielokrotne wymienianie wody) w temp. +4 °C.
MWCO – (*ang. molecular weight cut off*) nominalny punkt odcięcia

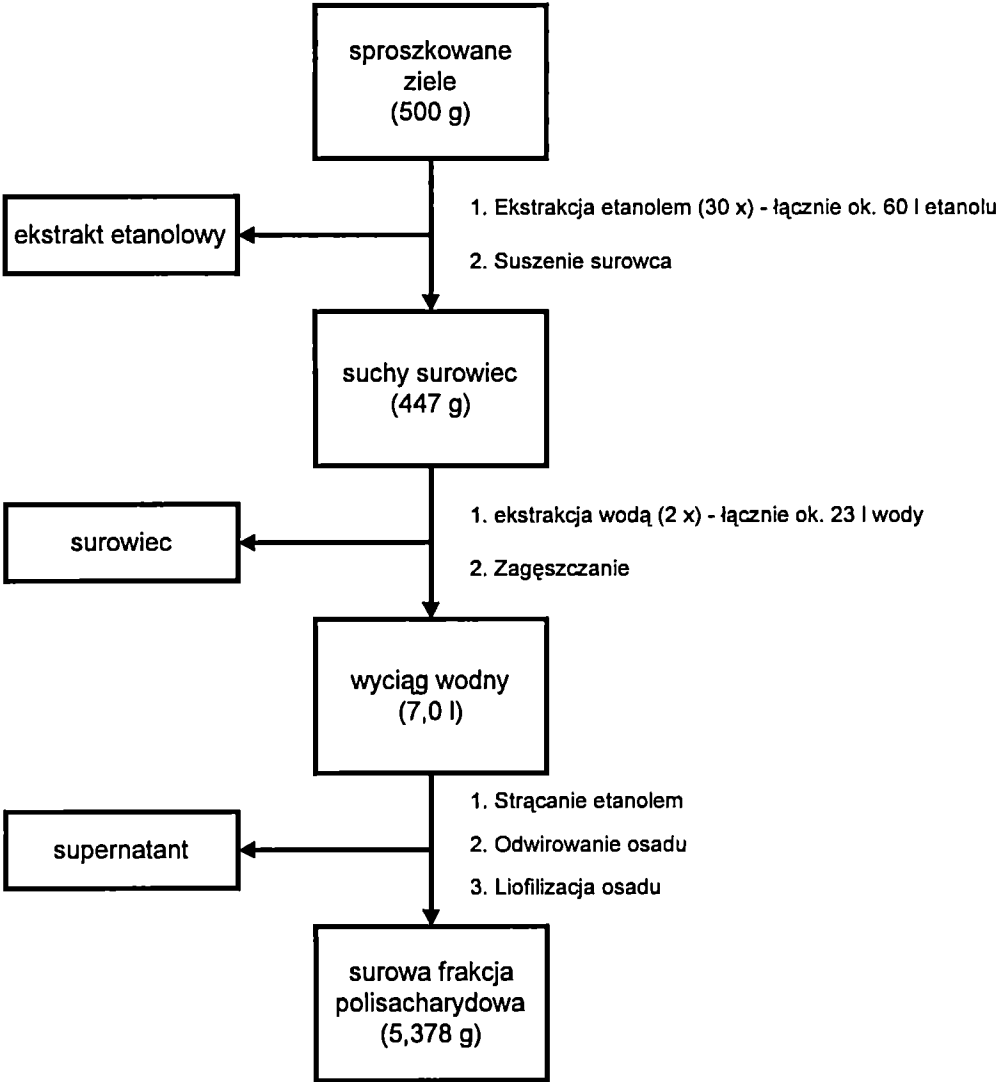
3.2.3 Izolacja polisacharydów z badanego materiału

Materiał sproszkowano i wyczerpująco ekstrahowano etanolem absolutnym w temperaturze pokojowej, aż do uzyskania bezbarwnego wyciągu (Schemat 1 i 2). Następnie surowiec wysuszono (w temperaturze pokojowej) i dwukrotnie ekstrahowano wodą destylowaną w temperaturze 35 °C po 24 godziny. Wyciągi wodne połączono i zagęszczano na wyparce próżniowej do $\frac{1}{3}$ pierwotnej objętości. Zagęszczony wyciąg wodny dodawano kroplami do etanolu absolutnego (1 cz. wyciągu : 2 cz. etanolu), ciągle mieszając, uzyskując końcowe stężenie etanolu ok. 70% (v/v). W celu całkowitego strącenia polisacharydów, mieszaninę umieszczono na 48 godzin w temperaturze 4 °C. Następnie osad odwirowano, zamrożono i zliofilizowano.

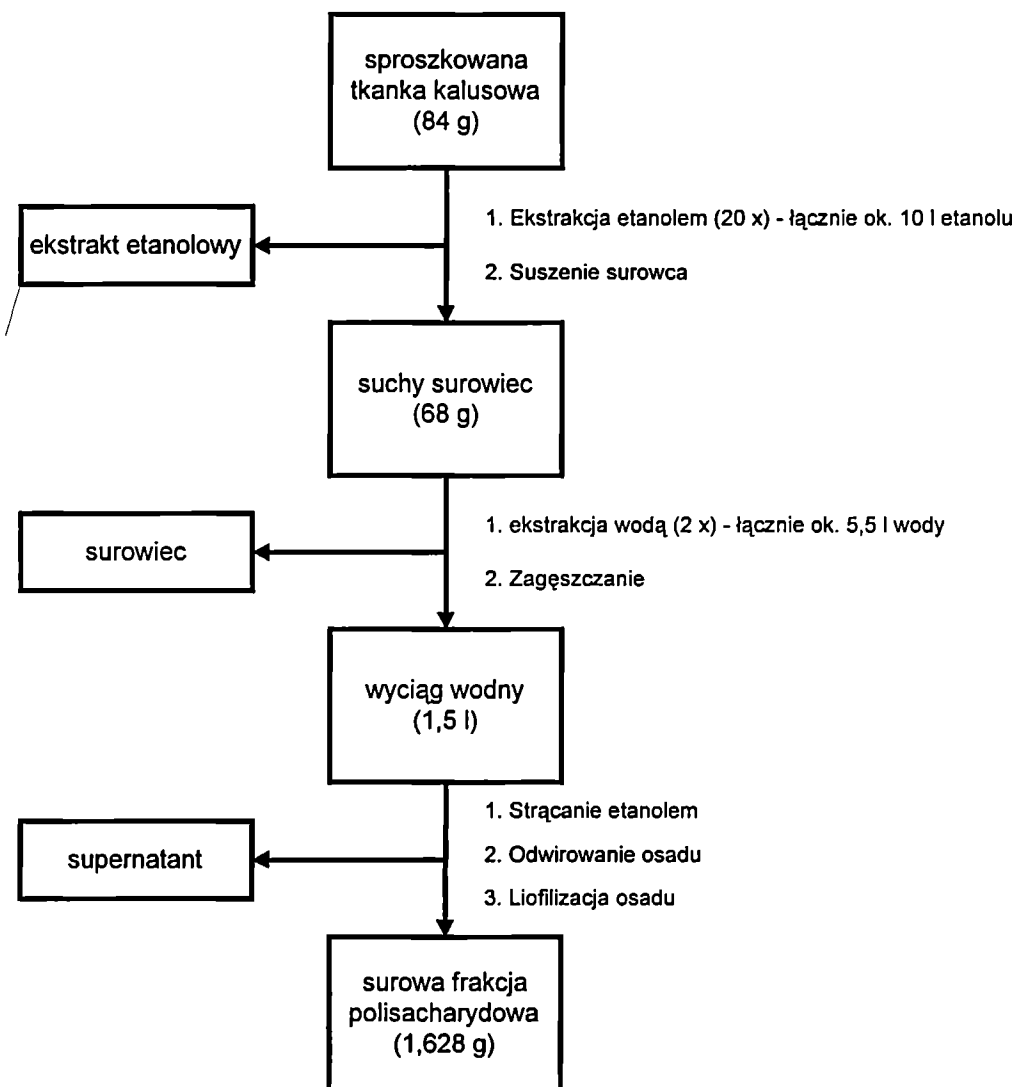
Uzyskano następujące ilości surowych polisacharydów:

- z ziela 5,378 g (wydajność: 1,1%),
- z tkanki kalusowej 1,682 g (wydajność: 2,0%).

Schemat 1. Izolacja surowej frakcji polisacharydowej z ziele *Melittis melissophyllum* L. (szczegóły w tekście)



Schemat 2. Izolacja surowej frakcji polisacharydowej z tkanki kalusowej *Melittis melissophyllum* L. (szczegóły w tekście)



3.2.4 Oczyszczanie i frakcjonowanie polisacharydów

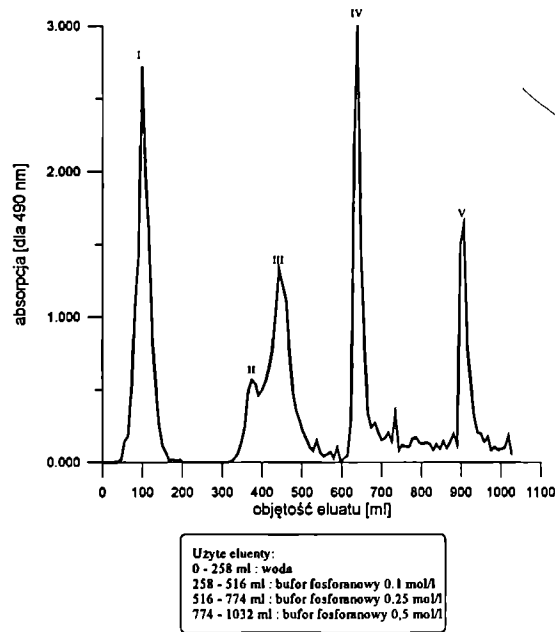
3.2.4.1 Chromatografia kolumnowa jonowymienna

Nieoczyszczone, surowe polisacharydy w ilości 1 g rozpuszczono w 100 ml wody destylowanej i naniesiono na kolumnę DEAE-Sephacel (rozdz.3.2.2). Kolumnę przemywano najpierw wodą, następnie buforem fosforanowym (pH = 6,0) o wzrastającej sile jonowej: 0,1 mol/l; 0,25 mol/l; 0,5 mol/l; 1 mol/l, a potem 0,2 mol/l wodnym roztworem NaOH. Dla każdego eluentu zbierano po 60 frakcji (ogółem 360 frakcji) o objętości po 4,3 ml i badano w nich obecność polisacharydów, pobierając po 0,2 ml eluatu do reakcji barwnej z kwasem siarkowym i roztworem fenolu (Dubois et al., 1956). Frakcje zawierające polisacharydy odpowiednio łączono (Tab. 20), zagęszczano na wyparce próżniowej, dializowano

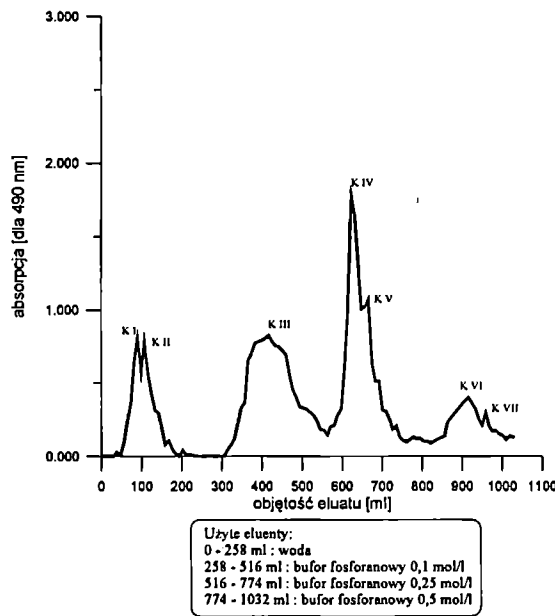
i liofilizowano. We frakcjach wyeluowanych buforem 1 mol/l, a potem 0,2 mol/l roztworem NaOH nie stwierdzono obecności polisacharydów.

Polisacharydy wyizolowane z ziela rozdzielono na pięć frakcji (Ryc. 7; Tab. 20): jedną obojętną i cztery kwaśne, a polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej na siedem frakcji (Ryc. 7; Tab. 20): dwie obojętne i pięć kwaśnych.

Ryc. 6. Profil wymywania z kolumny DEAE Sephacel polisacharydów wyizolowanych z ziela



Ryc. 7. Profil wymywania z kolumny DEAE Sephacel polisacharydów wyizolowanych z tkanki kalusowej



Tab. 20. Łączenie frakcji wyeluowanych z kolumny DEAE-Sephacel

Fracja		Numery połączonych frakcji od – do	Zebrany eluat od – do [ml]	Objętość połączonych frakcji [ml]
polisacharydy z ziela	fr. I	13 – 35	51,6 – 150,5	98,9
	fr. II	76 – 91	322,5 – 391,3	68,8
	fr. III	92 – 120	391,3 – 516,0	124,7
	fr. IV	143 – 156	610,6 – 670,8	60,2
	fr. V	207 – 219	885,8 – 941,7	55,9
polisacharydy z tkanki kalusowej	fr. K I	12 – 23	47,3 – 98,9	51,6
	fr. K II	24 – 37	98,9 – 159,1	60,2
	fr. K III	77 – 120	326,8 – 516,0	189,2
	fr. K IV	139 – 151	593,4 – 649,3	55,9
	fr. K V	152 – 169	649,3 – 726,7	77,4
	fr. K VI	199 – 220	851,4 – 946,0	94,6
	fr. K VII	221 – 235	946,0 – 1010,5	64,5

Tab. 21. Frakcje uzyskane po rozdziale surowych polisacharydów na kolumnie DEAE Sephacel

Polisacharydy	Fracje obojętne		Fracje kwaśne wyeluowane buforem fosforanowym					Ogółem
			bufor 0,1 mol/l		bufor 0,25 mol/l		bufor 0,5 mol/l	
ziele	fr. I 90 mg		fr. II 26 mg	fr. III 187 mg	fr. IV 165 mg		fr. V 83 mg	551 mg
wydajność	9%		2,6%	18,7%	16,5%		8,3%	55,1%
tkanka kalusowa	fr. K I 68 mg	fr. K II 75 mg	fr. K III 128 mg		fr. K IV 65 mg	fr. K V 44 mg	fr. K VI 60 mg	463 mg
wydajność	6,8%	7,5%	12,8%		6,5%	4,4%	6,0%	46,3%

3.2.4.2 Żelowa chromatografia kolumnowa GPC (gel-permeation chromatography)

Dalsze frakcjonowanie polisacharydów przeprowadzono na kolumnie Sephacryl S-300 (rozdz.3.2.2), na którą наносzono oddzielnie po 20 mg każdej wyizolowanej w poprzednim etapie frakcji (polisacharydy z ziela – 5 frakcji; polisacharydy z tkanki kalusowej – 7 frakcji). Przed naniesieniem na kolumnę polisacharydy rozpuszczono w 1 ml 0,15 mol/l roztworu NaCl. Kolumnę przemywano 0,15 mol/l roztworem NaCl. Zebrano po 100 kolejnych frakcji

o objętości 2 ml każda i badano w nich obecność polisacharydów, pobierając po 0,2 ml eluatu do reakcji barwnej z kwasem siarkowym i roztworem fenolu. Frakcje zawierające polisacharydy odpowiednio łączono (Tab. 22, Tab. 23), zagęszczano na wyparce próżniowej, dializowano i liofilizowano.

Ostatecznie wyizolowano z ziela 11 jednorodnych frakcji polisacharydowych: 3 obojętne i 8 kwaśnych, a z tkanki kalusowej 9 frakcji: 4 obojętne i 5 kwaśnych (Ryc. 8, Ryc. 9, Schemat 3). W celu uzyskania ilości oczyszczonych polisacharydów wystarczających do dalszej analizy, dla kilku frakcji (fr. I, V, K I, K II) powtórzono rozdział na kolumnie Sephacryl S-300, nanosząc nowe porcje po 20 mg.

Tab. 22. Łączenie frakcji wyeluowanych z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z ziela.

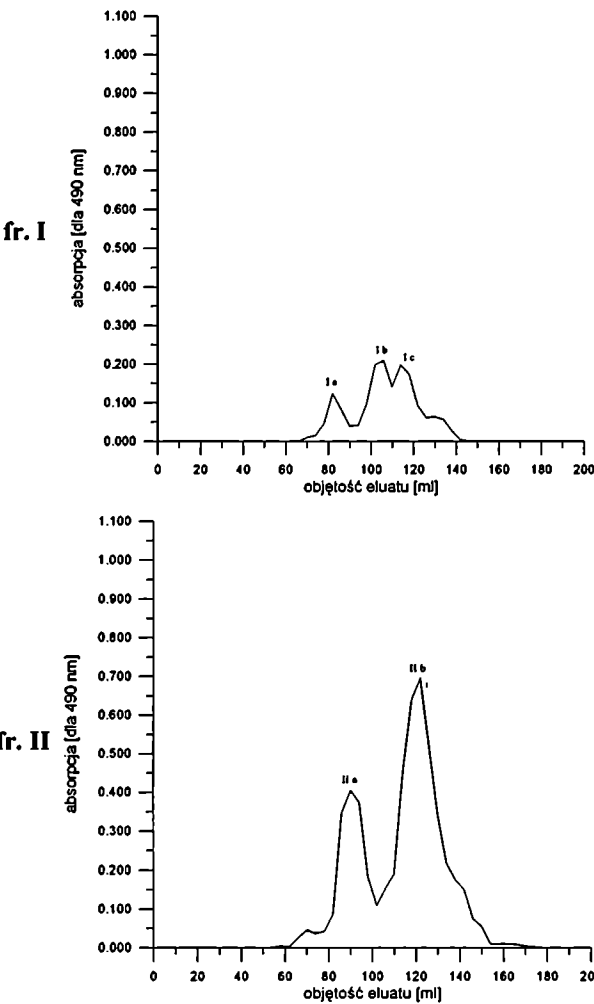
Frakcja	Numery połączonych frakcji od – do	Zebrany eluat od – do [ml]	objętość połączonych frakcji [ml]
I a	36 – 46	70,0 – 92,0	22,0
I b	47 – 56	92,0 – 112,0	20,0
I c	57 – 63	112,0 – 126,0	14,0
II a	39 – 51	76,0 – 102,0	26,0
II b	52 – 77	102,0 – 154,0	52,0
III a	37 – 53	72,0 – 106,0	34,0
III b	54 – 70	106,0 – 140,0	34,0
IV a	36 – 50	70,0 – 100,0	30,0
V a	34 – 45	66,0 – 90,0	24,0
V b	46 – 55	90,0 – 110,0	20,0
V c	56 – 63	110,0 – 126,0	16,0

Tab. 23. Łączenie frakcji polisacharydów wyeluowanych z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z tkanki kalusowej.

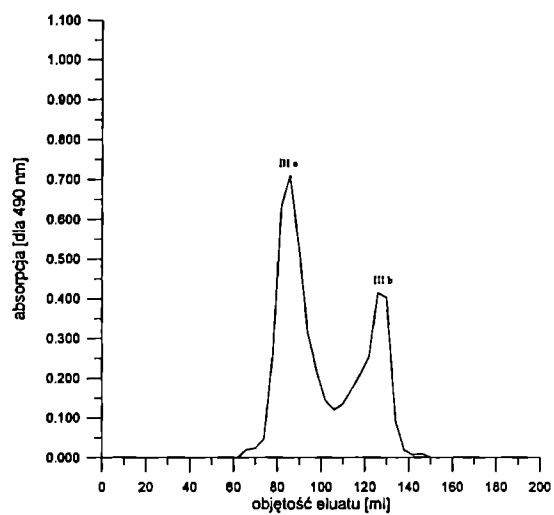
Frakcja	Numery połączonych frakcji od – do	Zebrany eluat od – do [ml]	objętość połączonych frakcji [ml]
K I a	49 – 63	96,0 – 126,0	30,0
K I b	64 – 72	126,0 – 144,0	18,0
K II a	50 – 63	98,0 – 126,0	28,0
K II b	64 – 73	126,0 – 146,0	20,0

Frakcja	Numery połączonych frakcji od – do	Zebrany eluat od – do [ml]	objętość połączonych frakcji [ml]
K III a	31 – 59	60,0 – 118,0	58,0
K IV a	30 – 59	58,0 – 118,0	60,0
K V a	31 – 56	60,0 – 112,0	52,0
K VI a	31 – 54	60,0 – 108,0	48,0
K VII a	31 – 59	60,0 – 118,0	58,0

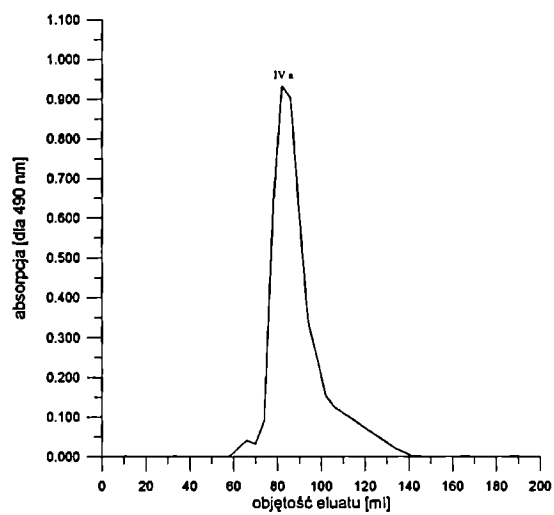
Ryc. 8. Chromatografia kolumnowa GPC frakcji I, II, III, IV, V (polisacharydy wyizolowane z ziela)



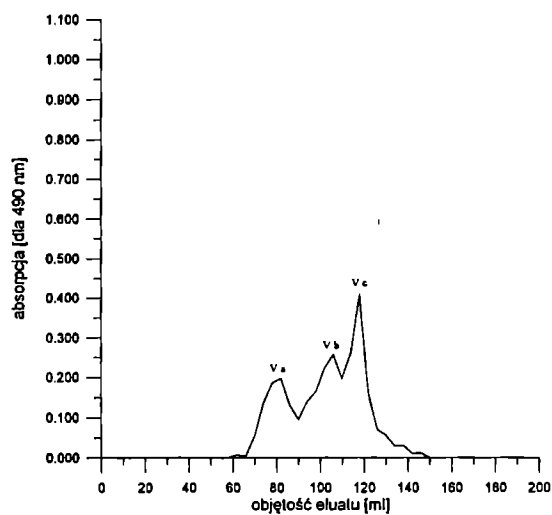
fr. III



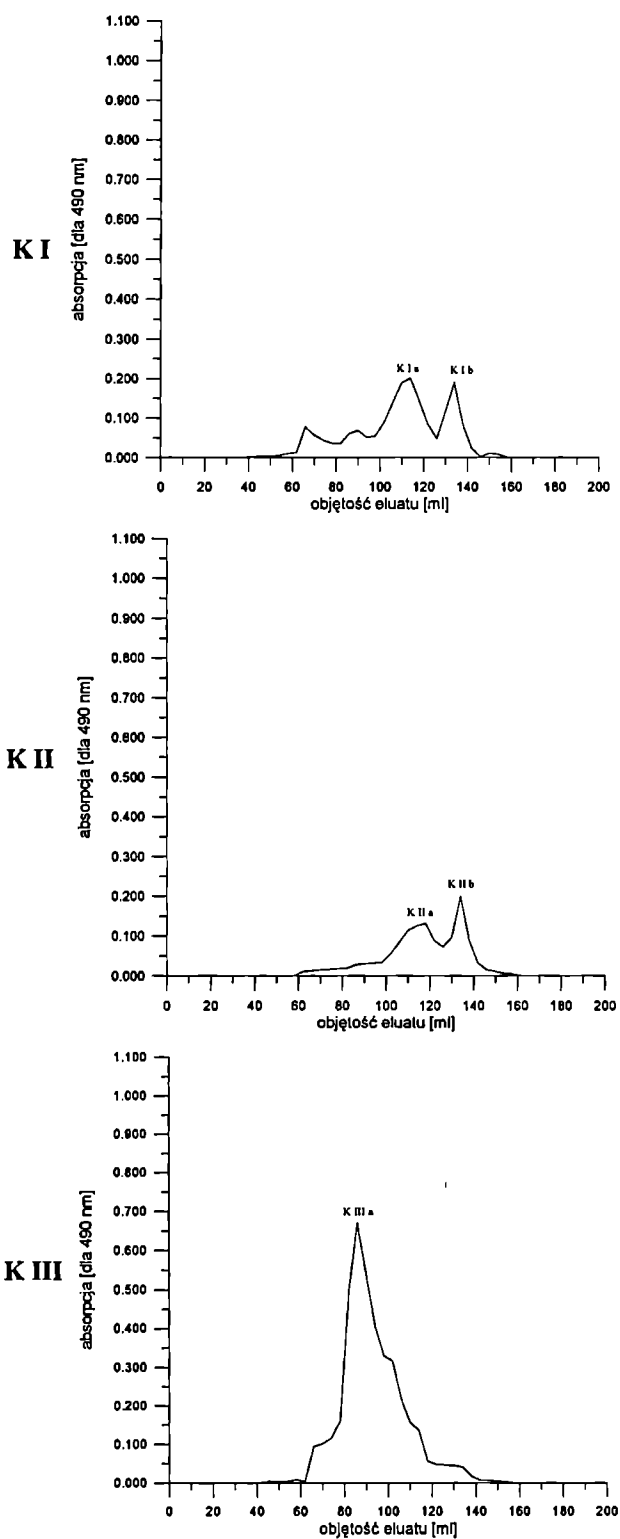
fr. IV

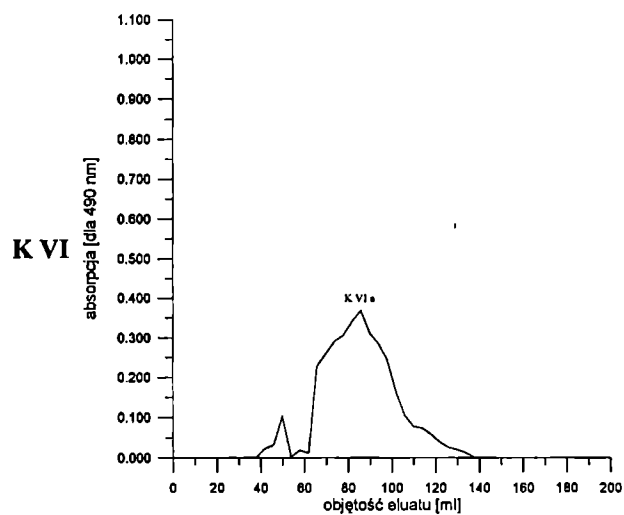
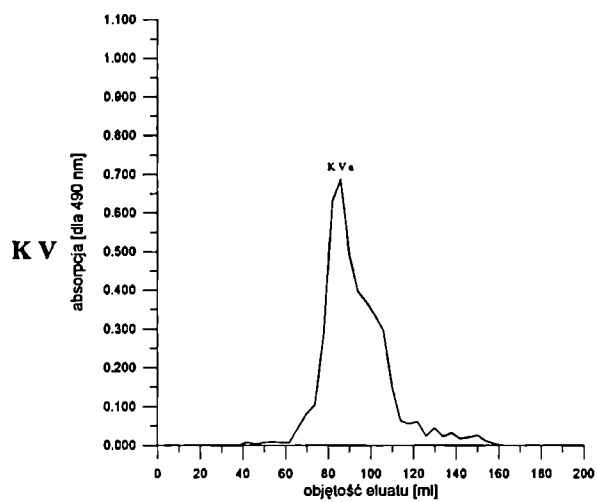
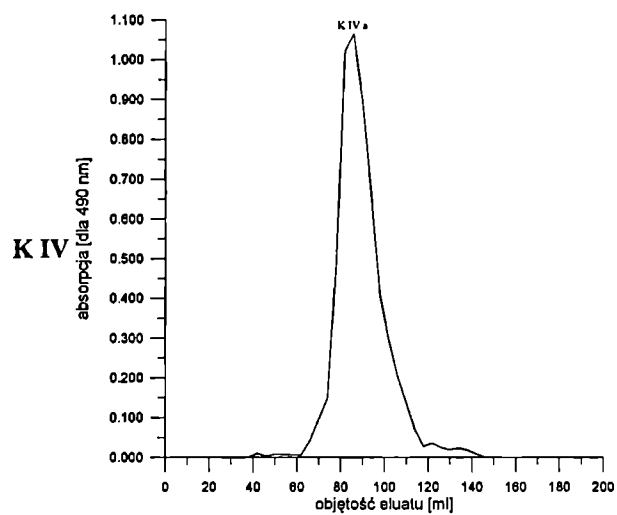


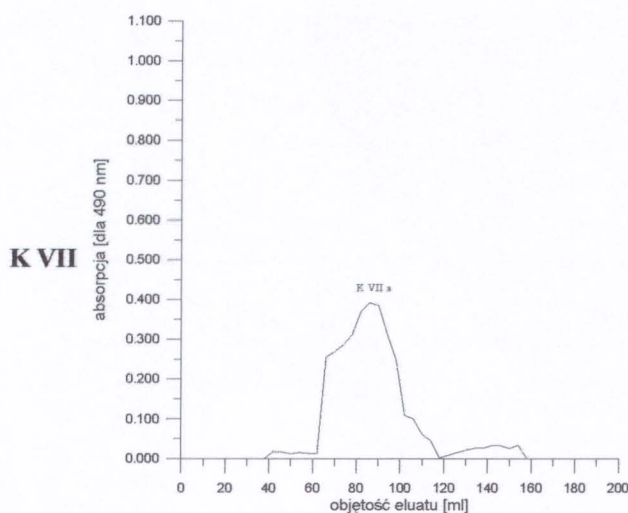
fr. V



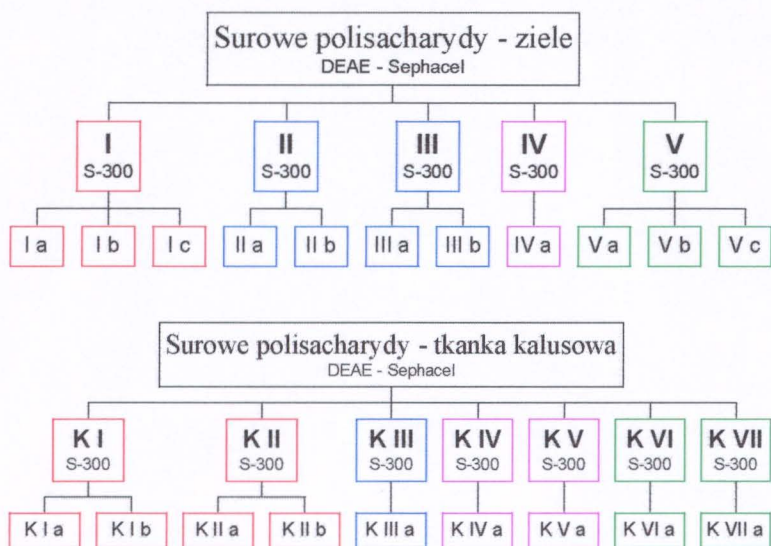
Ryc. 9. Chromatografia kolumnowa GPC frakcji K I, K II, K III, K IV, K V, K VI, K VII
(polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej)







Schemat 3. Frakcjonowanie polisacharydów za pomocą chromatografii kolumnowej jonowymiennej (wypełnienie kolumny – DEAE-Sephacel) i żelowej chromatografii kolumnowej GPC (wypełnienie kolumny Sephacryl S-300)



kolor: czerwony – frakcje obojętne
niebieski – frakcje kwaśne wyeluowane z kolumny DEAE-Sephacel buforem fosforanowym 0,1 mol/l
różowy – frakcje kwaśne wyeluowane z kolumny DEAE-Sephacel buforem fosforanowym 0,25 mol/l
zielony – frakcje kwaśne wyeluowane z kolumny DEAE-Sephacel buforem fosforanowym 0,5 mol/l

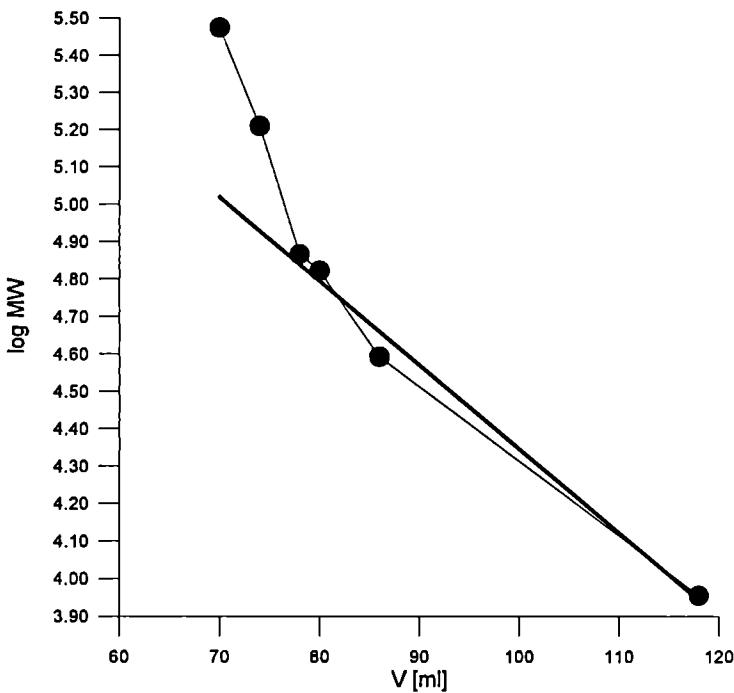
3.2.5 Określanie masy cząsteczkowej wyizolowanych polisacharydów

Na kolumnę Sephacryl S-300 наносzono roztwory wzorcowych dekstranów o znanych masach cząsteczkowych i eluowano ją 0,15 mol/l roztworem NaCl, zachowując takie same warunki, jak dla frakcji badanych (rozdz. 3.2.4.2). Wykreślono krzywą wzorcową (Tab. 24; Ryc. 10) jako zależność wartości logarytmu z masy cząsteczkowej od objętości eluatu.

Na podstawie krzywej wzorcowej obliczono średnie masy cząsteczkowe wyizolowanych polisacharydów (Tab. 25, Tab. 26), wykonując obliczenia dla frakcji o najwyższym stężeniu polisacharydów w eluacie.

Tab. 24. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – wzorcowe dekstrany

Dekstran	Frakcja o najwyższym stężeniu polisacharydów w eluacie		Masa cząsteczkowa [kDa]
	numer	[ml]	
1	35	70	298,0
2	37	74	162,0
3	39	78	73,5
4	40	80	66,3
5	43	86	39,1
6	59	118	9,0



Ryc. 10. Wyznaczenie krzywej wzorcowej dla standardowych dekstranów

Równanie regresji liniowej dla krzywej wzorcowej (Ryc. 10) przedstawione jest wzorem:

$$\log M_{cz} = -22,413 \cdot 10^{-3} \cdot V + 6,587$$

gdzie:

M_{cz} – masa cząsteczkowa [Da] ($M_{cz} = MW$),

V – objętość eluatu [ml].

Współczynnik korelacji wartości zmierzonych i aproksymowanych $R^2 = 0,988$.

Tab. 25. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z ziela

Frakcje	Frakcja o najwyższym stężeniu polisacharydów w eluacie		Wartość odczytana z krzywej wzorcowej log M _{cz}	Średnia masa cząsteczkowa [kDa]
	numer	[ml]		
I a	42	84	4,704	50,6
I b	54	108	4,166	14,7
I c	58	116	3,987	9,7
II a	45	90	4,570	37,1
II b	61	122	3,853	7,1
III a	43	86	4,659	45,6
III b	63	126	3,763	5,8
IV a	41	82	4,749	56,1
V a	41	82	4,749	56,1
V b	53	106	4,211	16,3
V c	59	118	3,942	8,8

Tab. 26. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z tkanki kalusowej

Frakcje	Frakcja o najwyższym stężeniu polisacharydów w eluacie		Wartość odczytana z krzywej wzorcowej log M _{cz}	Średnia masa cząsteczkowa [kDa]
	numer	[ml]		
K I a	57	114	4,032	10,8
K I b	67	134	3,584	3,8
K II a	59	118	3,942	8,8
K II b	67	134	3,584	3,8
K III a	43	86	4,659	45,6
K IV a	43	86	4,659	45,6
K V a	43	86	4,659	45,6
K VI a	43	86	4,659	45,6
K VII a	43	86	4,659	45,6

3.2.6 Oznaczanie zawartości kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych

Przygotowanie roztworów kwasu galakturonowego do wyznaczenia krzywej wzorcowej

Odważono 10 mg kwasu galakturonowego cz.d.a., przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 1 mg/ml. Z roztworu podstawowego sporządzono roztwory o stężeniach 0,5 ; 0,25 ; 0,1 ; 0,075 ; 0,05 ; 0,025 ; 0,01 ; 0,005 ; 0,0025 ; 0,001 mg/ml.

Przygotowanie roztworów badanych frakcji polisacharydowych

Odważono dokładnie po 4–5 mg każdej frakcji kwaśnej (Tab. 28, Tab. 29), przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 10 ml, uzupełniono wodą, otrzymując roztwory o stężeniach 0,4–0,5 mg/ml.

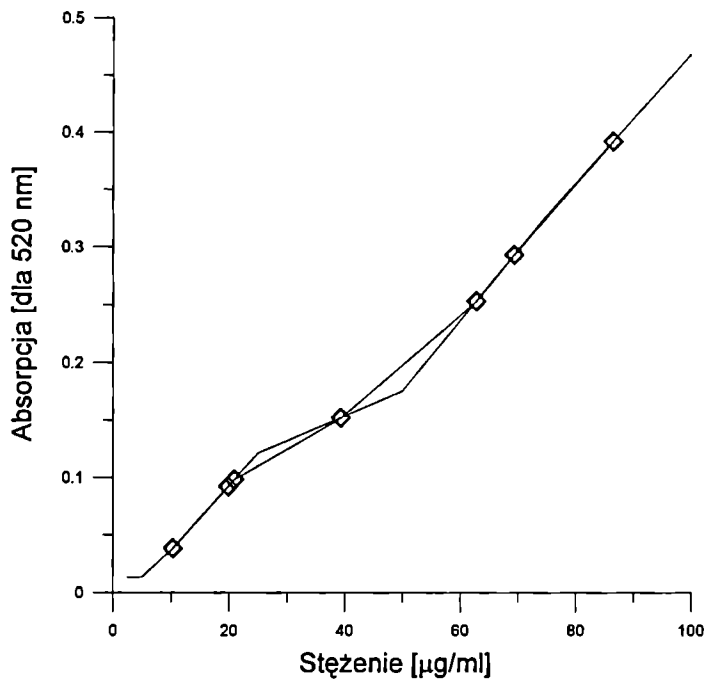
Oznaczanie zawartości kwasów uronowych (Blumenkrantz, Asboe-Hansen, 1973)

Do probówek odmierzone po 0,2 ml każdego z roztworów wzorcowych i badanych, dodano po 1,25 ml roztworu czteroboranu sodu (12,5 mmol/l roztwór $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ w stężonym H_2SO_4), zmieszano, wstawiono do wrzącej łaźni wodnej na 5 min. Następnie probówki umieszczono na 10 min w lodzie. Potem dodano po 20 μl roztworu *o*-hydroksydifenylu (0,15% roztworu *o*-hydroksydifenylu w 0,5% NaOH), zmieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie zmierzono absorpcję przy $\lambda = 520 \text{ nm}$, używając jako odnośnika ślełą próbę.

Sporządzono krzywe wzorcowe (Ryc. 11, Ryc. 12) jako zależność absorpcji od stężenia roztworu wzorcowego. Z krzywej tej odczytano stężenie kwasów uronowych w próbkach w przeliczeniu na kwas galakturonowy, a następnie obliczono ich procentową zawartość w badanych frakcjach (Tab. 28, Tab. 29).

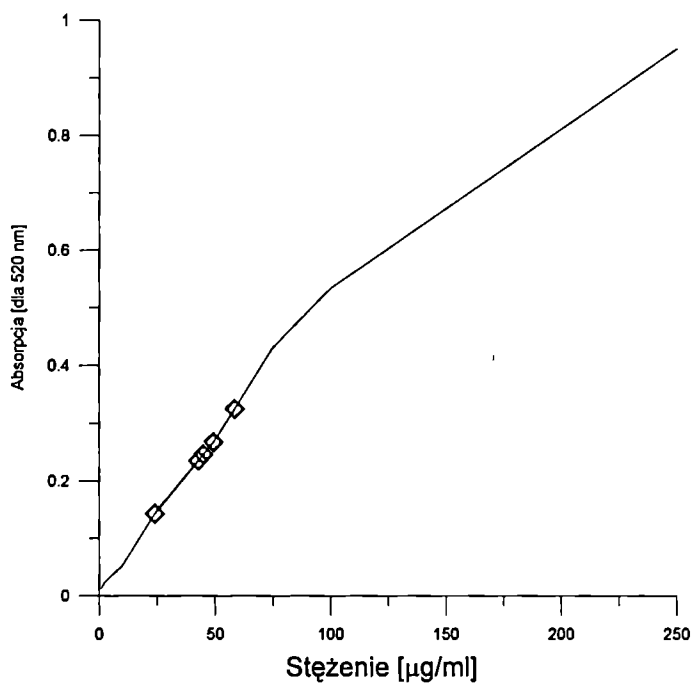
Tab. 27. Wartości absorpcji dla różnych stężeń roztworu wzorcowego kwasu galakturonowego

Stężenie $\mu\text{g/ml}$	Absorpcja wartości dla Ryc. 11	Absorpcja wartości dla Ryc. 12
1,0	—	0,012
2,5	0,013	0,022
5,0	0,016	0,032
10	0,036	0,051
25	0,121	0,148
50	0,175	0,270
75	0,327	0,430
100	0,468	0,533
250	—	0,950



Ryc. 11. Kwasy uronowe – krzywa wzorcowa (dla frakcji polisacharydowych wyizolowanych z ziela)

Punkty zaznaczone na wykresie odpowiadają stężeniom kwasów uronowych w badanych frakcjach.



Ryc. 12. Kwasy uronowe – krzywa wzorcowa (dla frakcji polisacharydowych wyizolowanych z tkanki kalusowej)

Punkty zaznaczone na wykresie odpowiadają stężeniom kwasów uronowych w badanych frakcjach.

Tab. 28. Zawartość kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych - polisacharydy wyizolowane z ziela

Frakcja	Badana próbka* [mg]	Absorpcja	Wartość odczytana z krzywej wzorcowej [µg/ml]	Zawartość kwasów uronowych we frakcji [%]
II a	4,0	0,038	10,4	2,6
II b	4,1	0,039	10,7	2,6
III a	4,6	0,098	20,9	4,6
III b	4,3	0,092	19,9	4,6
IV a	4,7	0,253	62,8	13,4
V a	4,0	0,152	39,4	9,9
V b	4,3	0,293	69,4	16,1
V c	4,3	0,392	86,5	20,1

* ilość polisacharydów rozpuszczona w 10 ml wody destylowanej

Tab. 29. Zawartość kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych - polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej

Frakcja	Badana próbka* [mg]	Absorpcja	Wartość odczytana z krzywej wzorcowej [µg/ml]	Zawartość kwasów uronowych we frakcji [%]
K III a	4,0	0,142	24,1	6,0
K IV a	4,2	0,267	49,1	11,8
K V a	4,8	0,246	45,1	9,4
K VI a	5,0	0,235	42,8	8,6
K VII a	4,4	0,325	58,6	13,3

* ilość polisacharydów rozpuszczona w 10 ml wody destylowanej

3.2.7 Struktura wyizolowanych polisacharydów

(Blakeney et al., 1983)

3.2.7.1 Analiza GLC octanów alditoli*

3.2.7.1.1 Hydroliza kwaśna polisacharydów

Do szklanych próbek ze szlifem odważono po 2-5 mg każdego z wyizolowanych polisacharydów (20 próbek). Dodano po 1 ml 2 M kwasu trójfluorooctowego (TFA), zamieszano, próbki zamknięto szklanymi korkami i wstawiono do autoklawu na 1 godzinę (temperatura 121 °C, ciśnienie 0,2 MPa). Następnie do hydrolizatów dodano po 2 ml wody i odparowano do sucha na wyparce próżniowej (temperatura łaźni wodnej 50 °C). W celu

* Analizę GLC wykonano w Instytucie Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Erlangen

całkowitego usunięcia z próbek kwasu TFA, dodawanie wody i odparowywanie powtórzono jeszcze dwukrotnie.

3.2.7.1.2 Redukcja

Do suchych, zhydrolizowanych próbek dodano po 100 μ l 1 M NH_3 i 1 ml roztworu NaBH_4 w DMSO^{*)}. Następnie zamieszano i zamknięte próbówki wstawiono na 90 minut do cieplarki o temperaturze 40 °C. Po upływie tego czasu reakcję przerwano dodając po 100 μ l lodowatego kwasu octowego.

3.2.7.1.3 Acetylacja

Do próbek dodano po 0,2 ml 1-metyloimidazolu jako katalizatora oraz po 2 ml bezwodnika kwasu octowego. Zamieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie próbówki wstawiono do lodu i dodano po 5 ml wody.

Po ochłodzeniu dodano po 2 ml dichlorometanu, wytrząsano, a następnie odpipetowano dolną organiczną warstwę. Czynności te powtórzono jeszcze dwukrotnie uzyskując po 6 ml frakcji dichlorometanowej. Następnie dodano do niej po 1 ml 0,05 M H_2SO_4 , zamieszano i ponownie odpipetowano dolną, organiczną warstwę. Próbki pozostawiono do odparowania na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dosuszono je w strumieniu gazowego azotu. Próbki rozpuszczono w kilku kroplach dichlorometanu i użyto do analizy GLC.

3.2.7.1.4 Wyniki

Wzorcowe cukry proste poddano redukcji i acetylacji. Dla otrzymanych octanów alditoli wykonano analizę GLC.

Piki na chromatogramach badanych próbek identyfikowano na podstawie czasów retencji porównywanych z czasami retencji wzorcowych octanów alditoli cukrów obojętnych. Aby uwzględnić zawartość kwasów uronowych w cząsteczkach polisacharydów wyniki przeliczono, włączając wcześniej uzyskane dane (zob. rozdz.3.2.6).

Wyniki analizy GLC zebrano w tabeli Tab. 30 i Tab. 31. Chromatogramy zamieszczono na końcu pracy (zob. rozdz. 7).

^{*)} Opis – rozdz. 3.2.2

Tab. 30. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z ziela – stosunki molowe cukrów prostych i kwasów uronowych (mol %)

<i>Frakcja</i>	I a	I b	I c	II a	II b	III a	III b	IV a	V a	V b	V c
<i>Składnik cukrowy</i>											
ramnoza						3,1	5,4	2,1	10,6	n.b.**	46,8
arabinoza	33,0	32,0	28,0	26,3	32,1	24,1	17,1	9,8	12,6	n.b.**	12,2
ksyloza							1,2		1,7	n.b.**	
mannoza					śl.*		5,7	śl.*		n.b.**	
galaktoza	67,0	68,0	72,0	71,1	65,3	68,2	63,4	74,7	61,8	n.b.**	20,9
glukoza			śl.*				2,6	śl.*	3,4	n.b.**	
kwasy uronowe				2,6	2,6	4,6	4,6	13,4	9,9	16,1	20,1

* śl. = ilości śladowe
** nie badano

Tab. 31. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z tkanki kalusowej – stosunki molowe cukrów prostych i kwasów uronowych (mol %)

<i>Frakcja</i>	K I a	K I b	K II a	K II b	K III a	K IV a	K V a	K VI a	K VII a
<i>Składnik cukrowy</i>									
ramnoza					4,0	5,0	5,0	4,0	5,0
arabinoza	21,0	16,0	49,0	42,0	30,0	32,0	17,6	8,4	9,7
ksyloza									
mannoza									
galaktoza	79,0	84,0	51,0	58,0	60,0	51,2	68,0	79,0	72,0
glukoza									
kwasy uronowe					6,0	11,8	9,4	8,6	13,3

3.2.7.2 Analiza GLC-MS częściowo zmetylowanych octanów alditoli**

3.2.7.2.1 Redukcja kwasów uronowych w polisacharydach kwaśnych

(Taylor, Conrad, 1972)

Odważono po 3 mg każdej frakcji kwaśnej, rozpuszczono w 1 ml wody i doprowadzono pH roztworów do wartości 4,75. Następnie dodano po 43,2 mg karbodiimidu i cały czas mieszając mieszađłami magnetycznymi doprowadzono pH do 4,75, dodając kroplami 0,01 M HCl lub 0,01 M NaOH. Aby zaszła laktonizacja, wartość pH = 4,75 musi

** Analizę GLC-MS wykonano w Instytucie Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Erlangen

utrzymywać się bez zmian przez 2 godziny. W związku z tym wartość pH była kontrolowana wielokrotnie i roztwory cały czas mieszano.

Następnie, w celu przeprowadzenia redukcji, do próbek dodawano kroplami 1 ml 2 mol/l roztworu NaBD₄, ciągle mieszając próbkę i utrzymując pH = 7. Przez następne 4 godziny nie zmieniano warunków reakcji, kontynuując mieszanie i sprawdzanie wartości pH, która przez cały czas była równa 7. Po upływie 4 godzin polisacharydy strącono, dodając do próbek czterokrotną objętość etanolu absolutnego i pozostawiono w temperaturze 4 °C przez 24 godziny. Strącone polisacharydy dokładnie przeniesiono do probówek ze szlifem, odwirowano, dodano po kilka kropli wody, zamrożono i zliofilizowano. Po liofilizacji probówki przeniesiono do eksykatora.

3.2.7.2.2 Otrzymywanie częściowo zmetylowanych octanów alditoli

(Harris et al., 1984; Ryc. 13)

Przygotowanie próbek

Do szklanych probówek ze szlifem odważono po 2–5 mg każdego z wyizolowanych obojętnych polisacharydów (7 próbek) i przechowywano w eksykatorze nad P₂O₅ przez 16 godzin w celu całkowitego osuszenia. Przygotowanie próbek polisacharydów kwaśnych opisano wcześniej (zob. rozdz. 3.2.7.2.1).

Przygotowanie mieszaniny metylującej

W celu usunięcia oleju parafinowego, 5 g zawiesiny wodorku potasu (zawierającej 1 g KH; zob. rozdz. 3.2.2) przemywano czterokrotnie porcjami po 20 ml heksanu. Za każdym razem po sedymentacji KH dekantowano płyn znad osadu. Po ostatnim przemyciu i dekantacji pozostałość heksanu usunięto strumieniem argonu i szczelnie zamkniętą probówkę z wodorkiem potasu chłodzono w lodzie (ze względu na wysoką reaktywność KH – szczególnie z wodą – wszystkie czynności wykonywano bardzo ostrożnie). Następnie do probówki z KH dodawano powoli 13 ml bezwodnego DMSO, ciągle mieszając i utrzymując mieszaninę reakcyjną w atmosferze argonu. Po dodaniu całej porcji DMSO mieszaninę pozostawiono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, mieszając strumieniem argonu. Po tym czasie reakcja była zakończona. Uzyskano zielonożółtawy roztwór zawierający karboanion metylosulfinylowy (Dimsyl-K).

Premetylacja

W celu dobrego rozpuszczenia polisacharydy poddano dwóm szybkim, wstępnym metylacjom. Do wszystkich przygotowanych wcześniej próbek dodano po 200 μ l bezwodnego DMSO, mieszając je mieszadłami magnetycznymi. Następnie dodano po 20 μ l roztworu karboanionu metylosulfinylowego (Dimsyl-K), zmieszano, próbówki chłodzono w lodzie, dodano po 5 μ l CH_3J (uprzednio oziębionego w lodzie) i znów zmieszano. Kolejno dodano po 60 μ l roztworu Dimsyl-K, zmieszano, próbówki chłodzono w lodzie, dodano po 15 μ l CH_3J (oziębionego w wodzie), zmieszano. Tak przygotowane, rozpuszczone próbki poddano właściwej metylacji.

Metylacja

Do rozpuszczonych próbek dodano po 200 μ l roztworu Dimsyl-K, mieszano mieszadłami magnetycznymi i przepuszczano strumień argonu. Po 30 minutach próbówki umieszczono w lodzie i dodano po 150 μ l oziębionego w lodzie CH_3J . Pozostawiono na 30 minut w temperaturze pokojowej, ciągle mieszając. Następnie dodano po 3 ml mieszaniny dichlorometan-metanol 2:1 (V/V), zmieszano, potem dodano po 2 ml wody, ponownie zmieszano. Po rozdzieleniu się faz górne, wodne fazy odpipetowano i usunięto. Przemywanie wodą i odpipetowanie górnej fazy powtórzono czterokrotnie, za każdym razem dodając do próbek po 2 ml wody. Następnie, po usunięciu ostatniej porcji wody, do próbek dodano po 2 ml 2,2-dimetoksypropanu i po 20 μ l lodowatego kwasu octowego, zmieszano. Potem rozpuszczalnik odparowywano na łaźni wodnej o temperaturze 90 °C do uzyskania w próbówkach pozostałości o objętości ok. 200 μ l. Resztki rozpuszczalnika usunięto, przepuszczając strumień argonu. Pozostałości w próbówkach miały oleistą konsystencję.

Hydroliza

Do próbek ze zmetylowanymi polisacharydami dodano po 0,5 ml 2M kwasu trójfluorooctowego (TFA), zmieszano, próbówki zamknięto szklanymi korkami i wstawiono do autoklawu na 1 godzinę (temperatura 121 °C, ciśnienie 0,2 MPa). Następnie do hydrolizatu dodano po 2 ml wody i odparowano do sucha na wyparce próżniowej (temperatura łaźni wodnej 40 °C). W celu całkowitego usunięcia z próbek kwasu TFA, dodawanie wody i odparowywanie powtórzono jeszcze dwukrotnie.

Redukcja

Do suchych, zhydrolizowanych próbek dodano po 1 ml świeżo przygotowanego 0,5 M roztworu NaBH_4 w 2 M NH_3 . Zmieszano i zamknięte próbki wstawiono na 60 minut do cieplarki o temperaturze 60 °C. Po upływie tego czasu reakcję zakończono, dodając po 0,5 ml acetonu. Probówki umieszczono na łaźni wodnej o temperaturze 40 °C i rozpuszczalnik odparowano do sucha w strumieniu gazowego azotu.

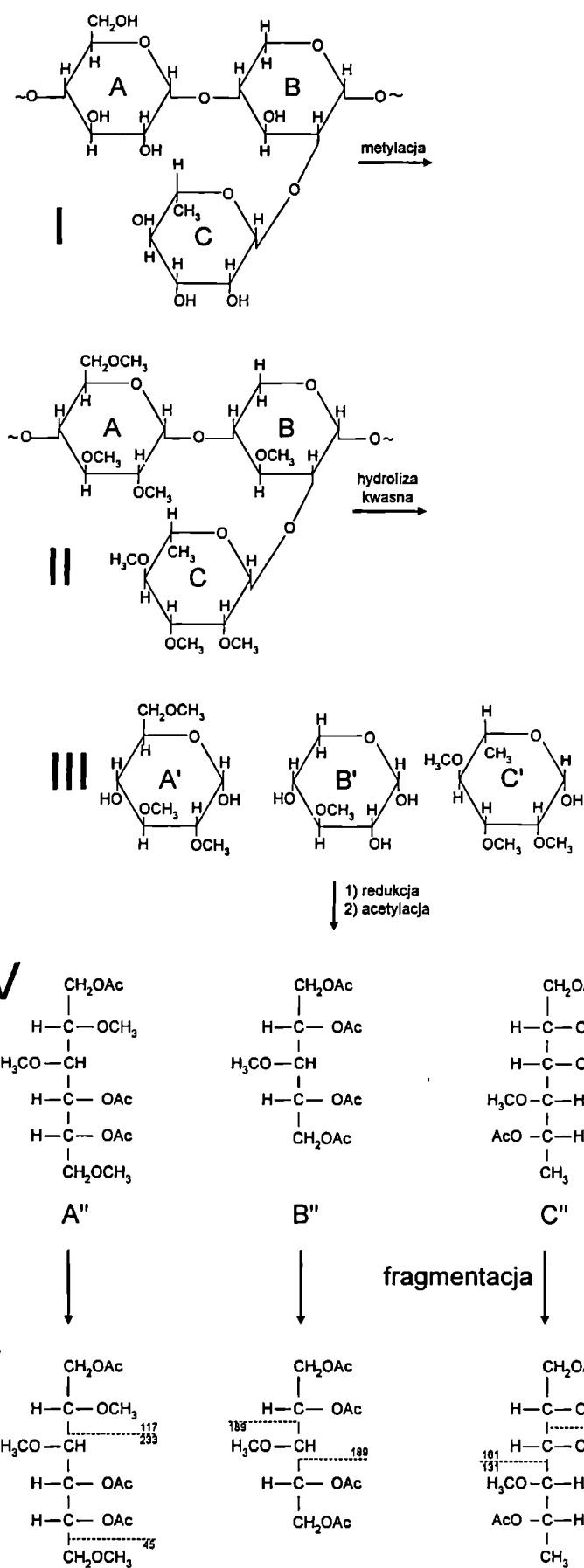
Acetylacja

Suchą pozostałość rozpuszczono w 0,2 ml 18 M lodowatego kwasu octowego, dodano po 1 ml octanu etylu, po 3 ml bezwodnika kwasu octowego, po 100 μl kwasu nadchlorowego i zmieszano. Po 10 minutach próbki wstawiono do lodu, dodano po 10 ml wody, po 200 μl 1-metyloimidazolu, zmieszano i pozostawiono ponownie na 10 minut. Następnie dodano po 1 ml dichlorometanu, po 1 ml 0,05 M H_2SO_4 i zmieszano. Po rozdzieleniu się faz odpipetowano dolną, organiczną warstwę. Do pozostałej górnej fazy dodawano jeszcze trzykrotnie po 1 ml CH_2Cl_2 i odpipetowano dolną warstwę, uzyskując w rezultacie po 4 ml frakcji dichlorometanowej. CH_2Cl_2 odparowano, pozostawiając próbki na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dosuszono je w strumieniu gazowego azotu. Próbkę rozpuszczono w kilku kroplach dichlorometanu i użyto do analizy GLC-MS.

Wyniki

Piki na chromatogramach GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli identyfikowano na podstawie czasów retencji oraz widm masowych (spektrometr masowy sprzężony z GLC). Przy interpretacji korzystano z danych zawartych w piśmiennictwie (Björndal et al., 1970; Jansson et al., 1976).

Wyniki analizy GLC-MS zebrano w tabelach Tab. 32 i Tab. 33. Chromatogramy i widma masowe zamieszczono na końcu pracy (zob. rozdz. 7).



Ryc. 13. Otrzymywanie częściowo zmetylowanych octanów alditoli (wg. Jansson et al., 1976; zmodyfikowane)

-
- I Substrat – fragment hipotetycznego, przykładowego heteroglikanu, składający się z cząsteczki glukozy (A), ksylozy (B) i ramnozy (C)
- II Substrat po metylacji – wodór we wszystkich grupach hydroksylowych jest zastąpiony grupą CH₃
- III Częściowo zmetylowane cukry proste uzyskane w wyniku hydrolizy:
2,3,6-tri-*O*-metyloglukoza (A')
3-*O*-metyloksyloza (B')
2,3,4-tri-*O*-metyloramnoza (C')
- IV Częściowo zmetylowane octany alditoli analizowane za pomocą GLC
2,3,6-tri-*O*-metylo-1,4,5-tri-*O*-acetyloglucitol (A'')
3-*O*-metylo-1,2,4,5-tetra-*O*-acetyloksylitol (B'')
2,3,4-tri-*O*-metylo-1,5-di-*O*-acetyloramnitól (C'')
- V Częściowo zmetylowane octany alditoli poddane selektywnej fragmentacji za pomocą spektrometrii masowej sprzężonej z GLC (zaznaczono tylko masy pierwotnych jonów fragmentacyjnych)

Tab. 32. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z tkanki kalusowej – stosunki molowe cukrów prostych i kwasu galakturonowego (mol %) – z uwzględnieniem typów wiązań (na podstawie analizy GLC-MS)

Składnik cukrowy	Typ wiązania	K I a n.b. **	K I b	K II a	K II b n.b. **	K III a	K IV a	K V a	K VI a	K VII a n.b. **
galaktoza	1–		35			17	15		1	
	1,3–		8	10		10	9	19		
	1,4–		16	2						
	1,6–			5		2	2	4	44	
	1,3,6–		18	29		27	23	43	27	
	1,4,6–		8			2	2	2	5	
arabinoza	1–		10	23		22	26	15	3	
	1,3–			9		3	4	2	3	
	1,2–		4	3						
	1,3,5–		1	18		3	2	1		
ksyloza	1,2–									
ramnoza	1–					4				
	1,2,4–						5	4	4	
glukoza	1,4,6									
kwas galaktu- ronowy*	1–									
	1,4–					10	12	10	13	

* oznaczony jako deuterowane reszty galaktozowe
** nie badano

Tab. 33. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z ziela – stosunki molowe cukrów prostych i kwasu galakturonowego (mol %) – z uwzględnieniem typów wiązań (na podstawie analizy GLC-MS)

Składnik cukrowy	Typ wiązania	I a	I b	I c	II a	II b n.b.**	III a n.b.**	III b	IV a	V a	V b n.b.**	V c n.b.**
galaktoza	1–			6								
	1,3–	7	3	8	8			6	11	15		
	1,4–	5		7	2			18				
	1,6–	11	18	19	6			13	7	6		
	1,3,6–	47	48	30	60			35	57	42		
	1,4,6–											
arabinoza	1–	20	18	18	6			10	4	8		
	1,3–	1	4	4	1			1	2	2		
	1,2–	9	9	8	4			4				
	1,3,5–				4			2	3	3		
ksyloza	1,2–									1		
ramnoza	1–				1			2		4		
	1,2,4–				5			1	2	7		
glukoza	1,4,6							2				
kwas galakturo- nowy*	1–							6				
	1,4–				3				14	12		

* oznaczony jako deuterowane reszty galaktozowe

** nie badano

3.2.8 Badanie obecności składników niecukrowych we frakcjach polisacharydowych

Analizom poddano surowe frakcje polisacharydowe wyizolowane z ziela i tkanki kalusowej, a także niektóre frakcje uzyskane po oczyszczeniu i frakcjonowaniu surowych polisacharydów na kolumnie jonowymiennej DEAE-Sephacel (frakcje: I, III, IV, V oraz K I, K II, K III, K IV, K VI).

Oznaczenie zawartości substancji mineralnych

Analizę przeprowadzono metodą wagową wg FP V (1990).

Do wyprażonych do stałej masy tygli porcelanowych odważono (z dokładnością do 0,1 mg) po 10 mg polisacharydów z poszczególnych frakcji i wyprażono je w piecu muflowym w temperaturze 600 °C do stałej masy. Z różnicy mas naważek obliczono procent

zawartości popiołu w badanych frakcjach. Zawartość popiołu dla frakcji surowych polisacharydów wyizolowanych z ziela wynosiła 6%, a dla wyizolowanych z tkanki kalusowej 5%. W pozostałych frakcjach substancje mineralne występowały w ilościach śladowych – poniżej 1% (różnica mas mniejsza niż 0,1 mg).

Oznaczenie jakościowe zawartości fosforu

Próbki popiołu po mineralizacji polisacharydów rozpuszczono w kilku kroplach stężonego kwasu azotowego. Następnie dodano 2–3 krople mieszaniny nasyconych roztworów azotanu amonowego i molibdenianu amonu w stosunku 1:1.

W przypadku obecności fosforu powstaje żółte zabarwienie, potem osad fosforomolibdenianu amonowego, który krystalizuje w postaci igieł po odparowaniu na łaźni wodnej.

Wszystkie reakcje były negatywne.

Oznaczanie jakościowe zawartości azotu

Analizę przeprowadzono wg metody Lassaigne'a.

Próbki poszczególnych frakcji w ilości ok. 10 mg stopiono z metalicznym sodem w małych fiolkach w płomieniu palnika (aż do czerwonego żaru). Gorące fiolki wrzucano do parowniczek zawierających ok. 5 cm³ wody destylowanej (fiolka powinna pęknąć; jeżeli nie pęka, rozbija się ją szklaną bagietką). Przesączono roztwory powstałe z wylugowania wodą pozostałości po stopieniu i każdy rozdzieliło na dwie części. Do części każdego roztworu dodano po kilka kryształków FeSO₄ i ogrzewano do wrzenia. Po oziębieniu zakwaszano 25% kwasem solnym, a następnie dodawano po kilka kropli 1% wodnego roztworu FeCl₃.

W przypadku obecności azotu pojawia się zielononiebieskie zabarwienie, a po chwili wydziela się osad błękitu pruskiego (cyjanożelazynu żelazowego).

Wszystkie reakcje były negatywne.

Oznaczenie jakościowe zawartości siarki

Do drugiej części przesączu (uzyskanego po stopieniu polisacharydów z metalicznym sodem) dodano kilka kropli świeżo przygotowanego 1% roztworu nitroprusydku sodu.

W przypadku obecności siarki w badanej próbce powstaje zabarwienie fioletowoczerwone (barwa jest nietrwała).

Wszystkie reakcje były negatywne.

Badania jakościowe obecności białka

- **Reakcja ksantoproteinowa**

Do próbek frakcji polisacharydów w parowniczkach dodano kilka kropli stężonego HNO_3 i stężonego amoniaku. W obecności białka powinno powstać żółte zabarwienie.

- **Reakcja biuretowa**

Do próbek frakcji w parowniczkach dodano po kilka kropli 5% NaOH oraz po 2–3 krople 0,5% CuSO_4 . W przypadku obecności białka powstaje fioletowe zabarwienie.

Obie reakcje dla wszystkich badanych frakcji były negatywne.

Badanie jakościowe obecności wolnych aminokwasów

Do roztworów frakcji dodano 0,2% wodny roztwór ninhydryny. Próbkę ogrzewano przez 2 minuty na łaźni wodnej. W przypadku obecności wolnych aminokwasów pojawia się czerwono-różowa barwa.

Wszystkie reakcje były negatywne.

3.2.9 Oznaczenie zawartości cukrów we frakcjach polisacharydowych metodą Dubois'a

(Dubois et al., 1956)

Przygotowanie roztworów wzorcowych cukrów prostych do wyznaczenia krzywej wzorcowej

Odważono 7 mg galaktozy cz.d.a. i 3 mg arabinozy cz.d.a., przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełniono wodą destylowaną. Otrzymano roztwór podstawowy wzorcowych cukrów prostych o stężeniu 0,1 mg/ml. Z roztworu podstawowego sporządzono roztwory o stężeniach: 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,07 mg/ml.

Przygotowanie roztworów badanych frakcji polisacharydowych

Z każdej frakcji uzyskanej na różnych etapach oczyszczania polisacharydów wyizolowanych z ziela i tkanki kalusowej odważono dokładnie po 4–5 mg, przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 100 ml, uzupełniono wodą destylowaną. Otrzymano roztwory o stężeniach 0,04–0,05 mg/ml.

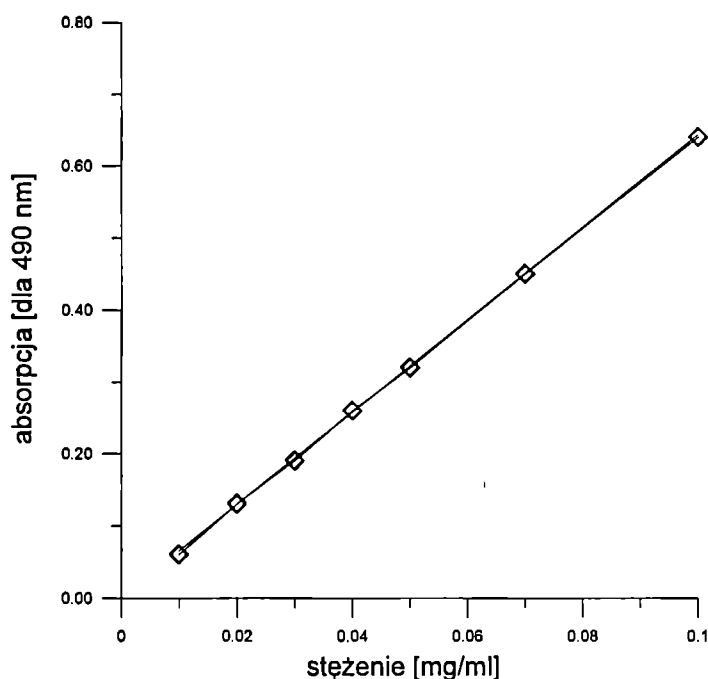
Dla frakcji polisacharydów kwaśnych (uzyskanych po rozdziale na kolumnie Sephacryl S-300) użyto roztwory tych frakcji pozostałe po oznaczaniu kwasów uronowych

(zob. rozdz. 3.2.6). W celu uzyskania odpowiednich stężeń, roztwory rozcieńczono wodą w stosunku 1:9.

Oznaczanie zawartości cukrów

Do probówek odmierzone po 2 ml każdego z roztworów wzorcowych i badanych oraz wodę destylowaną jako próbę ślepą. Dodano po 1 ml 5% wodnego roztworu fenolu i zmieszano. Następnie dodano po 5 ml stężonego kwasu siarkowego (98%), zmieszano i pozostawiono na 10 minut. Potem zmieszano ponownie i probówki wstawiono na 20 minut do łaźni wodnej o temperaturze 30 °C. Następnie zmierzono absorpcję przy $\lambda=490$ nm, używając jako odnośnika ślełą próbę.

Sporządzono krzywą wzorcową (Ryc. 14) jako zależność absorpcji od stężenia roztworu wzorcowego. Z krzywej wzorcowej odczytano stężenie cukrów w próbkach w przeliczeniu na ekwiwalenty galaktozowoarabinozowe, a następnie obliczono ich procentową zawartość w badanych frakcjach (Tab. 35, Tab. 36).



Ryc. 14. Krzywa wzorcową – oznaczanie zawartości cukrów

Równanie linii regresji liniowej jest dane wzorem:

$$y = 6,432 \cdot x$$

gdzie:

x – wartość stężenia [mg/ml],

y – wartość absorpcji.

Tab. 34. Wartości absorpcji dla różnych stężeń roztworu wzorcowego

Stężenie mg/ml	Absorpcja
0,01	0,06
0,02	0,13
0,03	0,19
0,04	0,26
0,05	0,32
0,07	0,45
0,10	0,64

Tab. 35. Zawartość cukrów we frakcjach polisacharydowych wyizolowanych z ziela

Frakcja	Stężenie* [mg/ml]	Absorpcja	Wartość odczytana z krzywej wzorcowej [mg/ml]	Zawartość cukrów we frakcji [%]
Z**	0,050	0,219	0,0340	68,0
I	0,045	0,285	0,0443	98,4
III	0,049	0,312	0,0485	99,0
IV	0,049	0,311	0,0484	98,8
V	0,040	0,253	0,0394	98,5
I a	0,040	0,257	0,0399	99,8
I b	0,040	0,254	0,0395	98,8
I c	0,040	0,255	0,0397	99,3
II a	0,040	0,256	0,0398	99,5
II b	0,041	0,260	0,0405	98,8
III a	0,046	0,293	0,0456	99,1
III b	0,043	0,275	0,0427	99,3
IV a	0,047	0,300	0,0466	99,1
V a	0,040	0,254	0,0395	98,8
V b	0,043	0,275	0,0428	99,5
V c	0,043	0,273	0,0425	98,8

* przygotowane stężenie badanej frakcji
 ** surowa frakcja polisacharydowa

Tab. 36. Zawartość cukrów we frakcjach polisacharydowych wyizolowanych z tkanki kalusowej

Frakcja	Stężenie* [mg/ml]	Absorpcja	Wartość odczytana z krzywej wzorcowej [mg/ml]	Zawartość cukrów we frakcji [%]
K**	0,050	0,232	0,0360	72,0
K I	0,040	0,252	0,0392	98,0
K II	0,040	0,255	0,0397	99,3
K III	0,050	0,316	0,0491	98,2
K IV	0,045	0,289	0,0449	99,8
K V	0,040	0,255	0,0397	99,3

Frakcja	Stężenie* [mg/ml]	Absorpcja	Wartość odczytana z krzywej wzorcowej [mg/ml]	Zawartość cukrów we frakcji [%]
K VI	0,043	0,274	0,0426	99,1
K I a	0,038	0,244	0,0379	99,7
K I b	0,039	0,250	0,0388	99,5
K II a	0,038	0,243	0,0378	99,5
K II b	0,040	0,255	0,0397	99,3
K III a	0,040	0,254	0,0395	98,8
K IV a	0,042	0,266	0,0414	98,6
K V a	0,048	0,306	0,0475	99,0
K VI a	0,050	0,319	0,0496	99,2
K VII a	0,044	0,279	0,0434	98,6

* przygotowane stężenie badanej frakcji
 ** surowa frakcja polisacharydowa

4. Podsumowanie wyników i dyskusja

W wyniku przetestowania licznych wariantów pożywki Murashige-Skoog'a (zob. rozdz. 3.1) wybrano wariant optymalny dla przyrostu tkanki kalusowej, zawierający benzyloaminopurynę (1 mg/l pożywki), kwas naftalenooctowy (0,5 mg/l) oraz kwas giberelinowy (0,25 mg/l) – wariant P. Uzyskana tkanka była ciemnozielona, o zwartej strukturze. Obserwowano jej wyraźne zróżnicowanie, przejawiające się obecnością uwypukleń na powierzchni, przypominających tworzące się pączki pędowe. Morfologicznie wyraźnie różniła się od niezróżnicowanych, żółtawych lub jasnozielonych tkanek rosnących na innych wariantach pożywki. Wartość średniego wskaźnika przyrostu (zob. rozdz. 3.1.4) dla wariantu P była 4–5 razy wyższa niż dla pozostałych wariantów.

Frację polisacharydową wyizolowano z ziela i tkanki kalusowej *Melittis melissophyllum* L. uzyskanej na wariancie P pożywki MS. Materiał wstępnie ekstrahowano etanolem, a następnie wodą w temperaturze 35 °C. Zagęszczone wyciągi wodne dodawano kroplami do etanolu absolutnego, uzyskując strącone brązowe surowe frakcje polisacharydowe (SPS) z wydajnością 1,1% (z ziela) i 2% (z tkanki kalusowej). Uzyskane frakcje zawierały niewielki procent składników mineralnych (6% – SPS z ziela; 5% – SPS z tkanki kalusowej; zob. rozdz. 3.2.8) i ok. 70% związków cukrowych, oznaczonych metodą Dubois'a (ziele – 68,0%; tkanka kalusowa – 72,0%; zob. rozdz. 3.2.9). Frakcje nie zawierały fosforu, siarki, azotu, składnika białkowego, czy wolnych aminokwasów. Surowe polisacharydy oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej jonowymiennej (DEAE-Sephacel; zob. rozdz. 3.2.4.1), poprzez eluowanie z kolumny najpierw wodą, a następnie buforem fosforanowym o wzrastającej sile jonowej. Polisacharydy wyizolowane z ziela rozdzielono na pięć frakcji (jedną obojętną i cztery kwaśne), a polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej na siedem frakcji (dwie obojętne i pięć kwaśnych). Wszystkie frakcje uzyskane po oczyszczeniu na kolumnie DEAE-Sephacel były barwy białej, zbudowane w 98–99% z cukrów (metoda Dubois'a – zob. rozdz. 3.2.9), nie zawierały składników niecukrowych (fosforu, siarki, azotu, białka ani wolnych aminokwasów – zob. rozdz. 3.2.8). Frakcje (każda osobno) były dalej oczyszczane za pomocą żelowej chromatografii kolumnowej GPC (zob. rozdz. 3.2.4.2; wypełnienie kolumny – Sephacryl S-300). Ostatecznie z ziela uzyskano 11 jednorodnych frakcji polisacharydowych: 3 obojętne i 8 kwaśnych, a z tkanki kalusowej – 9 frakcji: 4 obojętne i 5 kwaśnych (zob. Schemat 3 w rozdz. 3.2.4.2). Ziele i tkanka kalusowa najbardziej różnią się ilością kwaśnych frakcji wyeluowanych buforem fosforanowym 0,1 mol/l: otrzymano cztery takie frakcje z ziela (II a, II b, III a, III b)

i tylko jedną z tkanki kalusowej (K III a). Wszystkie frakcje uzyskane po oczyszczeniu na kolumnie Sephacryl S-300 były barwy białej i zawierały 98–99% składników cukrowych oznaczonych metodą Dubois’a (zob. rozdz. 3.2.9). Według danych literaturowych (Hodge, Hofreiter, 1962) błąd tej metody wynosi $\pm 2\%$. Pomiar absorpcji był wykonywany dla $\lambda = 490$ nm. Przy tej długości fali maksimum absorpcji wykazują tylko barwne pochodne heksoz, a dla pentoz i kwasów uronowych maksimum przypada przy $\lambda = 480$ nm. Z wcześniej przeprowadzonych analiz wynikało, że polisacharydy wyizolowane z ziela i tkanki kalusowej są arabinogalaktanami, a niektóre frakcje zawierają również kwas galakturonowy. Krzywą wzorcową do metody Dubois’a przygotowano dla mieszaniny arabinoza-galaktoza 3:7. Proporcja ta nie odzwierciedla składu każdej z frakcji. To może być przyczyną, dlaczego uzyskano zawartość cukrów 98–99% a nie 100%.

Na podstawie krzywej wzorcowej dla dekstranów o znanych masach cząsteczkowych określono średnie masy otrzymanych związków: od 6 do 56 kDa dla polisacharydów wyizolowanych z ziela, od 4 do 46 kDa dla polisacharydów wyizolowanych z tkanki kalusowej (zob. rozdz. 3.2.5). Zauważono pewne różnice pomiędzy frakcjami wyizolowanymi z ziela, a wyizolowanymi z tkanki kalusowej. Polisacharydy obojętne uzyskane z ziela mają wyraźnie większą średnią masę cząsteczkową (od 10 kDa do 51 kDa) niż związki otrzymane z tkanki kalusowej (od 4 kDa do 11 kDa). Polisacharydy kwaśne wyizolowane z ziela mają zróżnicowaną masę cząsteczkową (od 6 kDa do 56 kDa), podczas gdy polisacharydy kwaśne tkanki kalusowej są pod tym względem jednorodne (45,6 kDa – każda frakcja).

Dla frakcji kwaśnych oznaczono zawartość kwasów uronowych w przeliczeniu na kwas galakturonowy. We frakcjach wyizolowanych z ziela wynosi ona od 3% do 20%, a z tkanki kalusowej od 6% do 13%.

Na podstawie analizy GLC octanów alditoli stwierdzono, że głównymi monocukrami budującymi cząsteczki są galaktoza i arabinoza. W niektórych frakcjach występują w niewielkich ilościach ksyloza, mannoza lub glukoza. Wszystkie frakcje kwaśne zawierają dodatkowo ramnozę (od 2 do 50 mol%). Najbardziej zróżnicowane pod względem składu monocukrowego są frakcje III b, IV a, V a, wyizolowane z ziela. Stosunek molowy arabinozy do galaktozy we frakcjach obojętnych i słabo kwaśnych wynosi najczęściej od 1:1 do 1:2, podczas gdy we frakcjach zawierających więcej kwasów uronowych wyraźnie zwiększa się zawartość galaktozy i proporcja waha się od 1:4 do 1:8.

Na podstawie wyników analizy GLC-MS częściowo zmetylowanych octanów alditoli można stwierdzić, że wszystkie frakcje wyizolowane z ziela *Melittis melissophyllum* L.

składają się z podobnych arabinogalaktanów, gdzie główny łańcuch najprawdopodobniej stanowi 1,3- i 1,3,6-galaktoza, a łańcuchy boczne zbudowane są z przyłączonych do galaktozy w pozycji 6 takich cząsteczek jak: 1-arabinoza, arabinoza(1→3)arabinoza, ramnoza(1→4)-kwas galakturonowy(1→6)-galaktoza lub ramnoza(1→4)kwas galakturonowy. Takie struktury kwaśnych arabinogalaktanów są podobne do znanych z literatury (zob. rozdz. 2.3.4.3) arabinogalaktanów typu II izolowanych z roślin wyższych, posiadających łańcuch główny złożony z cząsteczek galaktozy połączonych wiązaniami β , oraz łańcuchy boczne zawierające arabinozę i ramnozę o wiązaniach α . Można więc przypuszczać, że polisacharydy *Melittis melissophyllum* L. mają analogiczne wiązania. Potrzebne byłoby potwierdzenie tych przypuszczeń za pomocą analizy ^{13}C NMR. Dla niektórych frakcji istnieją pewne różnice w zawartości cukrów, szczególnie ramnozy, występujące pomiędzy wynikami analiz GLC i GLC-MS. Ramnoza połączona bezpośrednio z kwasem uronowym tworzy bardzo stabilne połączenie (tzw. kwas aldobiuronowy), odporne na hydrolizę (Aspinall, 1970). Wiązanie to ulega rozerwaniu tylko w bardzo drastycznych warunkach hydrolizy albo po redukcji grupy karboksylowej (ta ostatnia sytuacja ma miejsce przy przygotowaniu próbek do analizy GLC-MS).

Analiza GLC-MS frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej wykazuje duże podobieństwo tych polisacharydów do związków wyizolowanych z ziela. Główny łańcuch stanowią również cząsteczki (1→3) galaktozy, a boczne łańcuchy przyłączone są w pozycji 6. Jedynie struktura związku we frakcji K VI a jest trochę inna. W przeciwieństwie do innych wyizolowanych polisacharydów zawiera on obok galaktozy o wiązaniach w pozycjach 1,3,6 (ok.30%) duże ilości cząsteczek galaktozy o wiązaniach w pozycjach 1,6 (ok.40%). Sugeruje to, że do głównego szkieletu zbudowanego z łańcucha (1→3) galaktozy przyłączone są w pozycji 6 łańcuchy boczne złożone głównie z (1→6) galaktozy.

Autorka już wcześniej podjęła próbę izolacji polisacharydów z ziela i kalusa miodownika melisowatego (Skrzypczak-Pietraszek, 1997a; Skrzypczak-Pietraszek, 1997b). Izolację przeprowadzono metodą Chihary (Chihara et al., 1970). Materiał ekstrahowano wrzącą wodą i polisacharydy strącano etanolem absolutnym z zagęszczonego wyciągu. Związki oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej i dializy. Uzyskane frakcje były trudno rozpuszczalne w wodzie. Próbowano je zhydrolizować, by określić ich skład monocukrowy. Polisacharydy uległy hydrolizie dopiero po zastosowaniu bardzo drastycznych warunków. Na podstawie analizy chromatograficznej (TLC i PC) hydrolizatów stwierdzono, że są to heteropolisacharydy zbudowane prawdopodobnie z reszt galaktozy, ramnozy i arabinozy.

W celu potwierdzenia tego składu, a także ustalenia proporcji między cukrami przeprowadzono chromatografię gazową ich sylilowanych pochodnych. Wzorce cukrów prostych – użyte w analizie GLC – były traktowane identycznymi warunkami, jak analizowane frakcje w czasie hydrolizy. Po sylilacji pojawiły się jednak zbyt liczne pochodne. Z tego powodu nie można było potwierdzić składu monosacharydów, ani – tym bardziej – ustalić proporcji molowych pomiędzy nimi. Analizę powtórzono, z takim samym, niezadowalającym rezultatem. Zastosowana w niniejszej pracy metoda izolacji, oczyszczania i analizy frakcji polisacharydowej (od wielu lat rutynowo stosowana w Instytucie Botaniki i Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Erlangen) dała dużo lepsze efekty. Uzyskano jednorodne, dobrze oczyszczone frakcje polisacharydowe. Są one dobrze rozpuszczalne w wodzie, co umożliwia m.in. przekazanie ich do badań farmakologicznych. Potwierdzono uzyskany wcześniej (Skrzypczak-Pietraszek, 1997a; Skrzypczak-Pietraszek, 1997b) przypuszczalny podstawowy skład monocukrowy (galaktoza, arabinoza, ramnoza), uzyskując teraz szczegółowe wyniki, dzięki zastosowaniu m.in. analizy GLC i GLC-MS.

Polisacharydy izolowane z kultur *in vitro* najczęściej bardzo różnią się od związków roślin gruntowych (zob. rozdz.2.3.5). W przypadku *Melittis melissophyllum* L., mimo pewnych omówionych wcześniej różnic, budowa polisacharydów wyizolowanych z ziela i tkanki kalusowej wykazuje duże podobieństwo. Być może ma to związek z wyraźnym zróżnicowaniem tkanki kalusowej lub z zastosowanym składem pożywki.

5. Wnioski

- Optymalnym wariantem pożywki MS (najlepszym spośród przetestowanych) dla przyrostu tkanki kalusowej jest wariant P, zawierający benzyloaminopurynę (1 mg/l pożywki), kwas naftalenooctowy (0,5 mg/l), kwas giberelinowy (0,25 mg/l). Uzyskano tkankę ciemnozieloną, o wyraźnym zróżnicowaniu. Wskaźnik przyrostu wynosił 18.
- W przypadku gatunku *Melittis melissophyllum* L. zróżnicowanie tkanki kalusowej sprzyja intensyfikacji jej wzrostu: wartość średniego wskaźnika przyrostu dla wariantu P była 4–5 krotnie wyższa niż dla pozostałych wariantów, na których uzyskiwano żółtawą lub jasnozieloną niezróżnicowaną tkankę kalusową.
- Dominującymi strukturami znalezionymi we wszystkich frakcjach wyizolowanych zarówno z ziela, jak i z tkanki kalusowej są arabinogalakty zbudowane z głównego łańcucha galaktozowego o wiązańach 1→3, z bocznymi łańcuchami zawierającymi głównie arabinozę i galaktozę. We frakcjach kwaśnych dodatkowo występuje ramnoza i kwas galakturonowy.
- Nie znaleziono znaczących różnic w budowie pomiędzy polisacharydami wyizolowanymi z ziela i z tkanki kalusowej.
- Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wyizolowane arabinogalakty mają budowę podobną do niektórych polisacharydów wyizolowanych z roślin wyższych (zob. rozdz. 2.3.4.3), wykazujących stwierdzoną aktywność biologiczną. Celowe byłoby wyizolowanie z *Melittis melissophyllum* L. większych ilości polisacharydów i przekazanie ich do testów i badań farmakologicznych (np. badania immunologiczne).
- Surowe frakcje polisacharydowe wyizolowano z badanego materiału z wydajnością 1,1% – dla ziela i 2% – dla tkanki kalusowej. Wyniki te wskazują, że kultury *in vitro* *Melittis melissophyllum* L. mogą być potencjalnym źródłem pozyskiwania tych związków.

6. Piśmiennictwo

1. Abougren M.E., Ammer M.N., 1998, Polysaccharide and fatty acids content of *Coronilla scorpioides* seeds, Book of Abstracts of 7th Conference on the Application of Chromatographic Methods in Phytochemical and Biomedical Research, Lublin, 53.
2. Abou-Mandour A.A., Czygan F.C., Haass D., Franz G., 1987, Fructan synthesis in tissue cultures of *Symphytum off.* L. – initiation, differentiation and metabolic activity, *Planta Med.*, 4, 395-408.
3. Akiyama Y., Kato K., 1982, An arabinoxyloglucan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured tobacco cells, *Phytochemistry*, 21, 2112-2114.
4. Alban S., Bourgougnon N., Lahaye M., Chermann J.-C., Franz G., 1998, Annual variation of the chemical structure and the anticoagulant and anti-HIV activity of a sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales), Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Wiedeń, J 48.
5. Ali M.S., Sharma G.C., Asplund R.O., Nevins M.P., Garb S., 1978, Isolation of antitumor polysaccharide fractions from *Yucca glauca* Nutt. (Liliaceae), *Growth*, 42, 213-223.
6. Asamizu T., Nakayama N., Nishi A., 1984, Pectic polysaccharides in carrot cells growing in suspension culture, *Planta Med.*, 469-473.
7. Aspinall G.O., 1970, Polysaccharides, Pergamon Press, Oxford, New York.
8. Balandrin M.F., Klocke J.A., 1988, Medicinal, Aromatic and Industrial Materials from Plants, w: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.4., Medicinal and Aromatic Plants I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 3-36.
9. Barsett H., Magnussen A.C., Paulsen S.B., 1998, Anticomplementary polysaccharides from the leaves of *Artemisia vulgaris*, mugwort, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
10. Barsett H., Paulsen B.S., 1985, Separation of acidic polysaccharides from *Ulmus glabra* Huds. on Mono PTM, *Journal of Chromatography*, 329, 315-320.
11. Benencia F., Courreges M.C., Coulombie F.C., 1997, Antiviral activity of crude polysaccharides from *Trichilia glabra* leaves, *Fitoterapia*, 68, 173-176.
12. Berlin J., 1988, Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and Its Impact on Pharmacy, w: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.4., Medicinal and Aromatic Plants I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 37-59.
13. Björndal H., Hellerqvist C.G., Lindberg B., Svensson S., 1970, Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharides, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 9, 610-619.
14. Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A., 1983, A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.*, 113, 291-299.
15. Blaschek W., Döll M., Franz G., 1998, Echinacea-Polysaccharide. Analytische Untersuchungen an Preßsaft und am Fertigarzneimittel Echinacin, *Zeitschrift für Phytotherapie*, 19, 255-262.
16. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973, New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids, *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
17. Bojarski J., 1989, *Chemia organiczna*, Wyd. IV, AM Kraków.

-
18. Bradford M.M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
 19. Bräutigam M., Franz G., 1985, Versuche zur Gewebekultur von schleimbildenden pflanzlichen Geweben, *Sci. Pharm.*, 53, 237-246.
 20. Broda B., Mowszowicz J., 1985, Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych, Wyd. IV, PZWL, Warszawa, 583.
 21. Cañigueral S., Müller B.M., Salvia M.J., Iglesias J., Franz G., 1994, Analysis of Hydrosoluble Polysaccharides from *Ramonda myconi* Leaves, *Planta Med.*, 60, 73-76.
 22. Celka Z., 1998, Grodziska Wielkopolski jako ostoje roślin naczyniowych, Materiały sympozjum i obrad sekcji 51 Zjazdu PTB, Gdańsk, 73.
 23. Chaubet F., 1998, Relationships between chemical characteristics and anticoagulant activity of low molecular weight fucans from marine algae, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 24. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y., Fukuoka F., 1970, Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom), *Cancer Res.*, 30, 2776-2781.
 25. Chybowski J., 1979, Badania farmakobotaniczne *Melittis melissophyllum* L., Praca doktorska, A.M. Lublin.
 26. Classen B., Blaschek W., 1998, High Molecular Weight Acidic Polysaccharides from *Malva sylvestris* and *Alcea rosea*, *Planta Med.*, 64, 640-644.
 27. Cyunel E., Ekiert H., Grzybek J., Kałużny J., Wyżykowska M., 1995, Badania chemiczne polisacharydów oraz histochemiczne innych metabolitów kultury kalusowej *Basella alba* L., XVI Zjazd Nauk. „Nauka i praktyka farmaceutyczna w ochronie zdrowia”, Warszawa, 114.
 28. Czarnecki R., Grzybek J., 1995, Antiinflammatory and Vasoprotective Activities of Polysaccharides Isolated from Fruit Bodies of Higher Fungi P.1. Polysaccharides from *Trametes gibbosa* (Pers.: Fr) Fr. (*Polyporaceae*), *Phytother. Res.*, 9, 123-127.
 29. Dalmo R.A., 1998, Immunostimulatory $\beta(1,3)$ -D-glucans; prophylactic drugs against threatening infectious diseases, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe “Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 30. Das N.N., Das A., 1978, Structure of the D-fructan isolated from garlic (*Allium sativum*) bulbs, *Carbohydr. Res.*, 64, 155-167.
 31. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
 32. Eda S., Akiyama Y., Kato K., Ishizu A., Nakano J., 1983a, Methylation analysis of cell wall polysaccharides from suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1783-1789.
 33. Eda S., Kodama H., Akiyama Y., Mori M., Kato K., Ishizu A., Nakano J., 1983b, An arabinoxyloglucan from the cell walls of suspension-cultured *Tobacco* cells, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1791-1797.
 34. Edlund U., Hensel A., Scheffler A., Pfüller U., 1997, Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the
-

Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, D03.

35. Ekiert H., Kohlmünzer S., 1998, Izolowanie i wstępne badania chemiczne polisacharydów tkanki kalusowej *Holarrhena antidysenterica* (Roxb.) Wall., *Herba Pol.*, 44, 16-21.
36. Endress R., 1994, Plant Cells as Producers of Secondary Compounds, w: *Plant Cell Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 121-242.
37. Falshaw R., Hemmingson J.A., Broom J.E., Nelson W.A., Knight G.A., 1998, Inhibition of Taq DNA Polymerase by Extracts from New Zealand Red Seaweeds, *Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”*, Sundøya.
38. Fang J.N., Proksch A., Wagner H., 1985, Immunologically active polysaccharides of *Acanthopanax senticosus*, *Phytochemistry*, 24, 2619- .
39. Farmakopea Polska V, 1990, vol.I, PZWL, Warszawa, 73.
40. Fournier P., 1948, *Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France*, Vol.2, 503-504.
41. Franz G. (ed.), 1991, *Polysaccharide*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
42. Franz G., 1987, Structure-activity relation of polysaccharides with antitumor activity, *Farmaceutische Tijdschrift voor België*, 301-311.
43. Franz G., 1989, Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts, *Planta Med.*, 55, 493-497.
44. Franz G., Paper D., Alban S., 1998, Pharmacological Activities of Sulfated Carbohydrate Polymers, *Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe “Bioactive Carbohydrate Polymers”*, Sundøya.
45. Furmanowa M., 1987, Kierunki rozwoju biotechnologii roślin, *Farmacja Polska*, 43, 377-384.
46. Gao Q-P., Kiyohara H., Cyong J-C., Yamada H., 1991, Chemical Properties and Anti-Complementary Activities of Heteroglycans from the Leaves of *Panax ginseng*, *Planta Med.*, 57, 132-136.
47. Gorin P.A.J., Iacomini M., 1984, Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*, *Carbohydr. Res.*, 128, 119-132.
48. Gowda D.C., Reuter G., Schauer R., 1982, Structural features of an acidic polysaccharide from the mucin of *Drosera binata*, *Phytochemistry*, 21, 2297-2300.
49. Greń J., 1987, *Statystyka matematyczna – podręcznik programowany*, PWN, Warszawa.
50. Grzybek J., 1992, Kultury mycelialne grzybów wyższych źródłem substancji leczniczych, *Biotechnologia*, 4(19), 37-40.
51. Grzybek J., Cyunel E., Kałużny J., 1994, Polysaccharides from leaves and callus cultures of *Ginkgo biloba* L., *Europ. J. Pharm. Scien. (Posters)*, 2, 125.
52. Grzybek J., Szafranek J., Kaczmarek J., Gajdus J., Czaja M., 1992, Mitostatic and mitodepressive activities of polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* Meyen T-411 strain and their preliminary chemical studies, *Acta Pol. Pharm.*, 49, 35-42.
53. Grzybek J., Zgórniak-Nowosielska I., Kasprowicz A., Zawilińska B., Kohlmünzer S., 1994, Antitumor activity of a fungal glucan tylopolan and *Propionibacterium acnes* preparation, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 63, 293-298.
54. Guggenbichler J.P., De Bettignies-Dutz A., Meissner P., Schellmoser S., Jurenitsch J., 1997, Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *Escherichia*

-
- coli* on uroepithelial cells, Pharm. Pharmacol. Lett., 7, 35-38.
55. Guiso M., Marini-Bettolo R., Agostini A., 1974, Iridoids-XIII: Ajugoside and ajugol: Structure and configuration, Gazz. Chim. Ital., 104, 25-33.
 56. Harborne J.B., 1973, Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, Londyn, 255-269.
 57. Harris P.J., Henry R.J., Blakeney A.B., Stone B.A., 1984, An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides, Carbohydr. Res., 127, 59-73.
 58. Hart L.A., 't, van den Berg A.J.J., Kuis L., van Dijk H., Labadie R.P., 1989, An Anti-Complementary Polysaccharide with Immunological Adjuvant Activity from the Leaf Parenchyma Gel of *Aloe vera*, Planta Med., 55, 509-512.
 59. Hayashi T., Matsuda K., 1981, Biosynthesis of xyloglucan in suspension – cultured soyabean cells. Synthesis of xyloglucan from UDP-Glucose and UDP-xylose in the cell-free system, Plant Cell Physiol., 22, 517-523.
 60. Hegi G., 1964, Illustrierte Flora von Mittel-Europa, Bd. V/4, Carl Hanser Verlag, München, 2468-2472.
 61. Hensel A., Kreis W., 1997, Water soluble and cell wall polysaccharides from the genus *Digitalis*, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, O07.
 62. Hensel A., Kurzmann M., Kreis W., 1997, Studies on polysaccharide extractability from *Crataegi folium cum flore*, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, D02.
 63. Hensel A., Meier K., 1998, Pectins and xyloglucans as an explanation for cancer chemoprevention by foods and vegetables: inhibition of the activity of direct acting mutagens in *Salmonella typhimurium*, Abstract of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Wiedeń, J 49.
 64. Hensel A., Schmidgall J., Kreis W., 1997, Extracellular Polysaccharides Produced by Suspension – Cultured Cells from *Digitalis lanata*, Planta Med., 63, 441-445.
 65. Hikino H., Mizuno T., 1989, Hypoglycemic Actions of Some Heteroglycans of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies, Planta Med., 55, 385.
 66. Hikino H., Mizuno T., Oshima Y., Konno C., 1985, Isolation and Hypoglycemic Activity of Moran A, a Glycoprotein of *Morus alba* Root Barks, Planta Med., 2, 159-160.
 67. Hikino H., Yoshizawa M., Suzuki Y., Oshima Y., Konno C., 1989, Isolation and Hypoglycemic Activity of *Trichosans* A, B, C, D and E: Glycans of *Trichosanthes kirilowii* Roots, Planta Med., 55, 349-350.
 68. Hodge J.E., Hofreiter B.T., 1962, Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates, w: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol.I, Ac. Press New York, 380-392.
 69. Honda Y., Inaoka H., Takei A., Sugimura Y., Otsuji K., 1996, Extracellular polysaccharides produced by tuberosa cells, Phytochemistry, 41, 1517-1521.
 70. Hook I., Paper D.H., 1996, Sugar composition of the mucin produced by *Drosera capensis* cell cultures, Book of Abstracts of 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Praga, P 115, 87.
 71. Hussein M.M., Helmy W.A., 1998, Biological activities of some galactomannans and their modified forms, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th
-

-
- Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Wiedeń, J 50.
72. Imbesi A., 1964, Index Plantarum, Messanae, 470.
 73. Ingolfssdottir K., Jurcic K., Fischer B., Wagner H., 1994, Immunologically Active Polysaccharide from *Cetraria islandica*, *Planta Med.*, 60, 527-531.
 74. Ionkova I., 1995, *Astragalus* Species (Milk Vetch): In Vitro Culture and the Production of Saponins, Astragaline and Other Biologically Active Compounds, w: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.33, Medicinal and Aromatic Plants VIII, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 97-137.
 75. Ionkova I., Alfermann A.W., 1994, *Althaea officinalis* L. (Marshmallow): In Vitro Cultures and Production of Biologically Active Compounds, w: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.28, Medicinal and Aromatic Plants VII, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 13-42.
 76. Janeczko Z., Podolak I., 1998, Chemical composition of water soluble saccharide fraction from *Pimpinella saxifraga* L. roots, *Book of Abstracts of 7th Conference on the Application of Chromatographic Methods in Phytochemical and Biomedical Research*, Lublin, 15.
 77. Jansson P.E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J., 1976, A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates, *Chem. Commun. Univ. Stockholm*, 8, 1-75.
 78. Jurkiewicz I.D., Miszenin I.D., 1974, *Lekarstwienne rastienija i ich primienienije*, Izd. Nauka i Technika, Mińsk.
 79. Kalinowska E., 1995, *Badania chemiczne polisacharydów Ginkgo biloba* L., praca magisterska, CM UJ Kraków.
 80. Karácsonyi Š., Pašteka M., 1975, Isolation and structural characteristics of neutral polysaccharides from white willow (*Salix alba* L.), *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 40, 1240-1246.
 81. Käsbauer C.W., Paper D.H., Franz G., 1998, Production of derivatives of natural occurring oligosaccharides and their effect on angiogenesis, *Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research*, Wiedeń, J 52.
 82. Kiyohara H., Cyong J.-C., Yamada H., 1988, Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, 182, 259-275.
 83. Kiyohara H., Cyong J.-C., Yamada H., 1989, Relationship between structure and activity of an anticomplementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, 193, 193-200.
 84. Kiyohara H., Matsumoto T., Takemoto N., Kawamura H., Komatsu Y., Yamada H., 1995, Effect of Oral Administration of a Pectic Polysaccharide Fraction from a Kampo (Japanese Herbal) Medicine „Juzen-Taiho-To” on Antibody Response of Mice, *Planta Med.*, 61, 429-434.
 85. Kiyohara H., Takemoto N., Zhao J.-F., Kawamura H., Yamada H., 1996, Pectic Polysaccharides from Roots of *Glycyrrhiza uralensis*: Possible Contribution of Neutral Oligosaccharides in the Galacturonase-Resistant Region to Anti-Complementary and Mitogenic Activities, *Planta Med.*, 62, 14-19.
 86. Kiyohara H., Yamada H., 1989, Structure of the neutral carbohydrate side-chains in anti-complementary acidic polysaccharides from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, 187, 255-265.
-

-
87. Kohlmünzer S., 1988, Polisacharydy grzybowe jako związki biologicznie czynne, *Wszechświat*, 89, 10-13.
 88. Kohlmünzer S., 1998, Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji, Wyd.V (unowocześnione), Wyd.Lekarskie PZWL.
 89. Kohlmünzer S., Grzybek J., Tanaka M., 1980, Antitumor and cytotoxic activity of polysaccharides from *Tylopilus felleus*, *Planta Med.*, 39, 231-232.
 90. Kohlmünzer S., Grzybek J., Węgiel J., 1992, Biological activity of polysaccharides from the mycelial culture of *Tylopilus felleus* (Bull.: Fr.) P.Karst, *Acta Pol. Pharm.*, 49, 31-34.
 91. Kohlmünzer S., Sodzawiczny K., Wong E., Defaye J., 1985, Structure of Tylopilan, A Branched Antitumor Polysaccharide from the *Basidiomycete Tylopilus felleus*, Abstracts of the 3rd European Symposium on Carbohydrates, Grenoble.
 92. Kohlmünzer S., Węgiel J., Rudek R., 1992, Polysaccharides from fruitbodies and mycelial culture of the fungus *Trametes hirsuta* (Wulf. ex Fr.) Lloyd, *Acta Pol. Pharm.*, 49, 27-29.
 93. Kolender A., Pujol C., Damonte E., Matulewicz M., Cerezo A., Anton R., 1997, Antiviral activity of the system of xylo-mannan sulfates extracted from *Nothogenia fastigiata*, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, A 05.
 94. Konno C., Mizuno T., Hikino H., 1985a, Isolation and Hypoglycemic Activity of Ephedrans A, B, C, D and E, Glycans of *Ephedra distachya* Herbs, *Planta Med.*, 2, 162-163.
 95. Konno C., Mizuno T., Hikino H., 1985b, Isolation and Hypoglycemic Activity of Lithospermans A, B and C, Glycans of *Lithospermum erythrorhizon* Roots, *Planta Med.*, 2, 157-158.
 96. Konno C., Murayama M., Sugiyama K., Arai M., Murakami M., Takahashi M., Hikino H., 1985, Isolation and Hypoglycemic Activity of Aconitans A, B, C and D, Glycans of *Aconitum carmichaeli* Roots, *Planta Med.*, 2, 160-161.
 97. Konno C., Suzuki Y., Oishi K., Munakata E., Hikino H., 1985, Isolation and Hypoglycemic Activity of Atractans A, B and C, Glycans of *Atractylodes japonica* Rhizomes, *Planta Med.*, 2, 102-103.
 98. Kooiman P., 1971, Structures of the galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*, *Carbohydr. Res.*, 20, 329-337.
 99. Kooiman P., 1972, The occurrence of iridoid glycosides in the *Labiatae*, *Acta Bot. Neerl.*, 21 (4), 417-427.
 100. Kraus J., Schneider M., Franz G., 1986, Antitumorpolysaccharide aus *Solidago* sp., *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126, 2046-2049.
 101. Kraus S., Andersson Dunstan C., Wagner H., 1997, A Chemotactic Glucan isolated from the rhizomes of *Urtica dioica* L., Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, O22.
 102. Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C., Duband F., Carnat A.P., 1991, Rosmarinic acid content and antioxidant activity in French *Lamiaceae*, *Fitoterapia*, 62, 166-171.
 103. Liping Z., Yishen Z., Fei S., Zhongyan L., 1994, The influence of sulfation on the conformation and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus citrinopileatus*, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, 26, 417-421.
-

-
104. Madaus G., 1938, Lehrbuch der Biologischen Heilmittel, Bd.I, Georg Thieme Verlag, Leipzig, 640.
 105. Mante S., Boll W.G., 1978, Effect of either 2,4-D or kinetin on production and composition of various fractions from extracellular polysaccharides produced by cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. *contender*), Canadian Journal of Botany, 56, 1816-1822.
 106. Meusel H. (ed.), 1978, Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora, Gustav Fischer Verlag, Jena, 375.
 107. Michaelsen T.E., Gilje A., Samuelsen A.B., Wold J.K., Høgåsen K., Paulsen B.S., 1998, Interactions between human complement and a polysaccharide PMII, from the leaves of *Plantago major* L., Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 108. Michałek A., 1991, Polisacharydy w hodowli tkankowej *Silene vulgaris*, praca magisterska, AM Kraków.
 109. Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M., 1995, Vascular plants of Poland. A checklist (Krytyczna lista roślin naczyniowych Polski), Polish botanical studies. Guidebook series, No.15., PAN–W.Szafer Institute of Botany, Kraków, 126.
 110. Mścisz A., Górecki P., Lutomski J., Latała B., Kędzia B., Jankowiak J., Krzyżaniak M., 1997, *Bidens tripartita* L. – chemical and pharmacological investigations, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, G15.
 111. Müller B.M., Franz G., 1992, Chemical Structure and Biological Activity of Polysaccharides from *Hibiscus Sabdariffa*, Planta Med., 58, 60-67.
 112. Müller B.M., Kraus J., Franz G., 1989, Chemical Structure and Biological Activity of Water-Soluble Polysaccharides from *Cassia angustifolia* Leaves, Planta Med., 55, 536-539.
 113. Murano E., Samuelsen A.B., Khan R., Toffanin R., Hoffman R., 1998, Sulphated arabinogalactans with anti-proliferative activity from the green alga *Codium fragile*, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 114. Murano E., Toffanin R., Coradini D., Paoletti S., Pintus G., Ventura C., 1998, Anti-proliferating activity of the sulphated galactan from the red alga *Grateloupia doryphora*, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 115. Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.
 116. Olafsdottir E.S., Ingolfssdottir K., Barsett H., Paulsen B.S., Jurcic K., Wagner H., 1998, Immunologically active (1→3)-(1→4)- α -D-glucan from *Cetraria islandica*, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 117. Olafsdottir E.S., Petersen A.B., Ingolfssdottir K., Gizurarson S., 1997, Immunomodulatory effects of polysaccharides from *Cetraria islandica* on immune response in mice after vaccination, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, G 14.
 118. Ożarowski A. (red.), 1980, Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy, PZWL, Warszawa.
 119. Paper D.H., Marchesan M., Hoffman R., Franz G., 1998, Anti-angiogenic, anti-inflammatory and embryotoxic effects of the β -1,3-glucan sulphate LAM S5 in various
-

-
- CAM-assays, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Wiedeń, J 53.
120. Paper D.H., Vogl H., Franz G., 1996, β -1,4-Galactansulphates as Angiogenesis Inhibitors, Book of Abstracts of 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Praga, SL 26, 27.
 121. Paull R.E., Jones R.L., 1978, Regulation of synthesis and secretion of fucose-containing polysaccharides in cultured sycamore cells, Aust. J. Plant Physiol., 5, 457-467.
 122. Paulsen B.S., Cohen E.H., Huang Z., Thomas-Oates J., Brüll L., 1998, Polysaccharides produced by the filamentous blue-green alga *Nostoc commune* vaucher, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 123. Paulsen B.S., Johansen B., Wold J.K., 1978, Identification of neutral oligosaccharides from a partial, acid hydrolysate of the water-soluble polysaccharide of the opium poppy, Carbohydr. Res., 65, 320-325.
 124. Pawłowski B. (red.), 1967, Flora Polska, tom XI, PWN, Warszawa-Kraków, 131-132.
 125. Penso G., 1983, Index plantarum medicinalis totus mundi eorumque synonymorum, O.E.M.F.-Milano.
 126. Pourrat H., Pouget A., Pourrat A., 1966, Préparation et contrôle des galactomannanes des graines de *Gleditschia triacanthos* L., Annales pharmaceutiques françaises, 24, 69-72.
 127. Proksch A., Wagner H., 1987, Structural analysis of a 4-O-methylglukuronoarabinoxylan with immuno-stimulating activity from *Echinacea purpurea*, Phytochemistry, 26, 1989-1993.
 128. Qiu Z., Wylie M., Jones K., 1998, Activation and Characterization of *Aloe barbadensis* Gel and the Purified Polysaccharide with Immunostimulating and Immunomodulating Activities, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 129. Ren D.L., Wang J.Z., Noda H., Amano H., Ogawa S., 1995, The Effects of an Algal Polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on Transplantable Tumors and Immune Activities in Mice, Planta Med., 61, 120-125.
 130. Ren-sheng X., Sheng-chu F., Zhi-yun F., 1980, Studies on the polysaccharides of *Acanthopanax senticosus*, Planta Med., 39, 278-279.
 131. Robertson J.A., Ryden P., Ring S.G., 1998, Extractability of cell wall-related polysaccharides with potential bioactivity and their persistence during fermentation, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 132. Rutkowski L., 1998, Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej, PWN, Warszawa, 390.
 133. Sakurai M.H., Matsumoto T., Kiyohara H., Yamada H., 1996, Detection and Tissue Distribution of Anti-Ulcer Pectic Polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by Polyclonal Antibody, Planta Med., 62, 341-346.
 134. Salgues R., 1942, Les variations du taux de la coumarine chez le *Melittis melissophyllum* L., Rev. gener. Sci., 52, 35-41.
 135. Samuelsen A.B., 1998, Biologically active polysaccharide fractions from *Plantago major* L., Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe
-

-
- „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
136. Samuelsen A.B., Paulsen B.S., Wold J.K., Otsuka H., Yamada H., Espevik T., 1995, Isolation and partial characterisation of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L., *Phytother. Res.*, 9, 211-218.
 137. Scarpati M.L., Esposito P., 1967a, Iridoidi (III). Struttura e configurazione del *Melittoside*, *Gazz. Chim. Ital*, 97, 1209-1230.
 138. Scarpati M.L., Esposito P., 1967b, Iridoidi - IV. Monomelittoside, *Ric. Sci.*, 37, 840-845.
 139. Scarpati M.L., Guiso M., Panizzi L., 1965, Iridoids I. Harpagide acetate from *Melittis melissophyllum*, *Tetrahedron Lett.*, 3439-3443.
 140. Schauerte A., Alban S., Franz G., 1996, Anticoagulant and fibrinolytic activity of new heparinoids synthesised using natural polysaccharides as starting polymers, *Book of Abstracts of 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research*, Praga, P 77, 70.
 141. Schöllhorn C., Schecklies E., Wagner H., 1993, Immunochemical investigations of polysaccharides from *Echinacea purpurea* cell suspension cultures, *Planta Med.* (Supplement), 59.
 142. *Secrets et vertus des plantes médicinales*, 1977, Selection du Reader's Digest, 197.
 143. Skaltsa-Diamantidis H., Tsitsa-Tzardi E., Tzakou O., Argyriadou N., 1991, Analysis of the Essential Oil of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *albida* Guss., *J. Ess. Oil. Res.*, 3, 367-368.
 144. Skrzypczak E., Skrzypczak L., 1993, The tissue culture and chemical analysis of *Melittis melissophyllum* L., *Acta Horticulturae*, 330, 263-267.
 145. Skrzypczak L., Skrzypczak-Pietraszek E., Lamer-Zarawska E., Hojden B., 1994, Micropropagation of *Oenothera biennis* L. and an assay of fatty acids, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, Vol. 63 (2), 173-177.
 146. Skrzypczak L., Wesołowska M., Skrzypczak E., 1993, *Gentiana* Species: In Vitro Culture, Regeneration and Production of Secoiridoid Glucosides. W: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.21, Medicinal and Aromatic Plants IV, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 172-186.
 147. Skrzypczak-Pietraszek E., 1994, Callus cultures of *Melittis melissophyllum* L. and their preliminary chemical analysis, *Symposium: Plant Cell, Tissue and Organ Cultures in Liquid Media*, Book of abstracts, Praga, 151-153.
 148. Skrzypczak-Pietraszek E., 1997a, Polisacharydy w ziele miodownika melisowatego *Melittis melissophyllum* L., 6th Conference on the Application of Chromatographic Methods in Phytochemical and Biomedical Research, Lublin, P-8.
 149. Skrzypczak-Pietraszek E., 1997b, Polysaccharides in *Melittis melissophyllum* L. callus culture, 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, D-04.
 150. Skrzypczak-Pietraszek E., Grzybek J., 1997, Metabolity wtórne kultur tkankowych gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae*, *Biotechnologia*, 2 (37), 93-110.
 151. Skrzypczak-Pietraszek E., Skrzypczak L., Wesołowska M., 1993, *Gentiana tibetica* King from tissue culture, *Scientia Pharm.*, 61, 287-296.
 152. Skrzypczak-Pietraszek E., Szewczyk A., 1996, Tissue culture of *Exacum affine* Balf.f., 44th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Abstracts of lectures and poster presentations, Praga, 86.
-

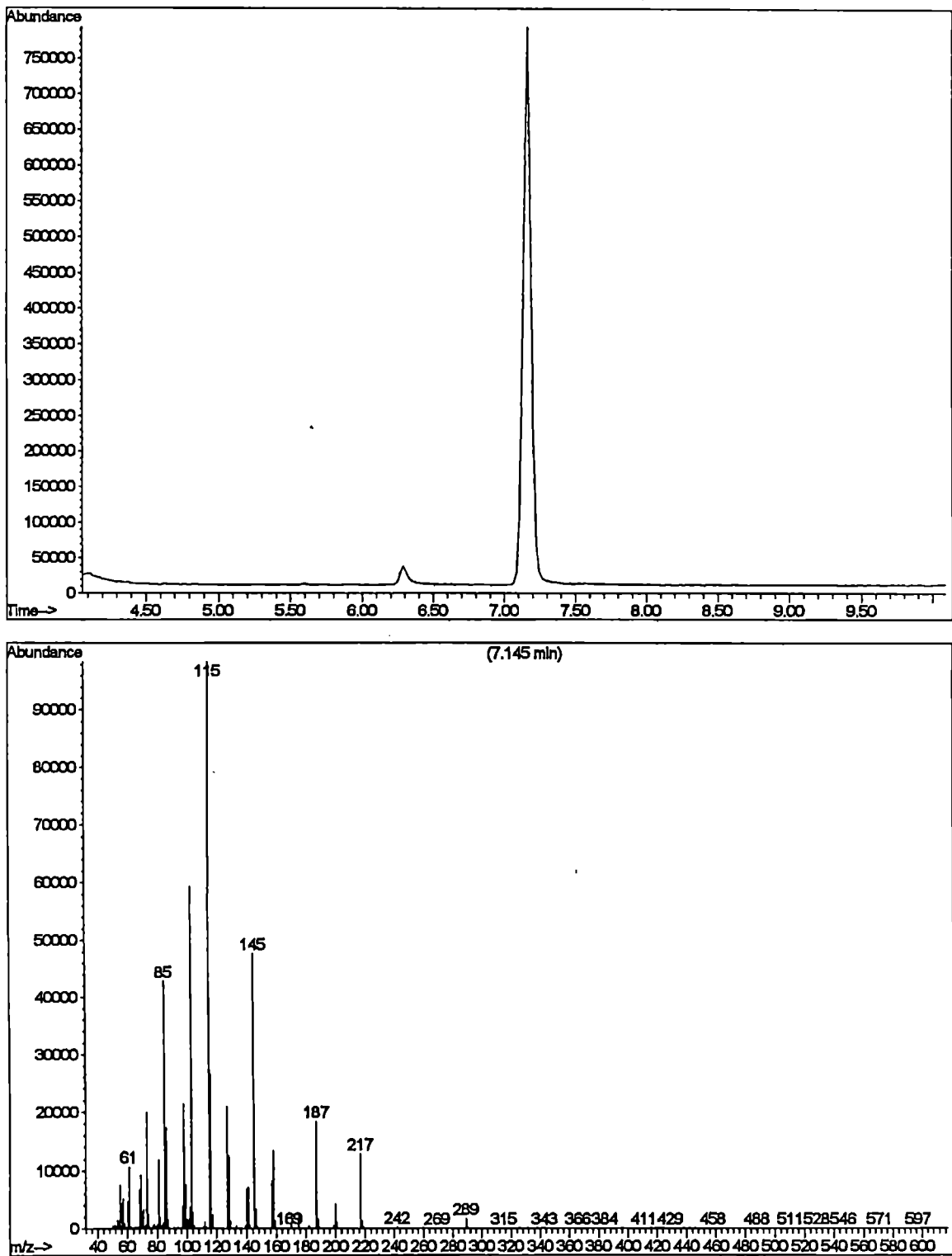
-
153. Sogn C., Paulsen B.S., Diallo D., Barsett H., 1998, Bioactive polysaccharides in Malien medicinal plants *Vernonia kotschyana*, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 154. Srivastava R., Kulshreshtha D.K., 1989, Bioactive polysaccharides from plants, *Phytochemistry*, 28, 2877-2883.
 155. Stefański M., 1994, Badania biologiczno-chemiczne polisacharydów *Ginkgo biloba* L., praca magisterska, CM UJ Kraków.
 156. Stevenson T.T., Darvill A.G., Albersheim P., 1988, Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II, *Carbohydr. Res.*, 182, 207-226.
 157. Stibich H., Alban S., Franz G., 1998, Anticomplementary activity of β -1,3-glucan sulfates, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters of 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Wiedeń, J 51.
 158. Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B., 1988, *Rośliny polskie*, Wyd.VI, PWN, Warszawa, 573.
 159. Szulczewski J.W., 1951, Wykaz roślin naczyniowych w Wielkopolsce dotąd stwierdzonych, *Prace Komisji Biologicznej Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego*, tom XII/6, Poznańskie Tow. Przyjaciół Nauk, Poznań, 101.
 160. Świątek L., Chybowski J., 1982, Identyfikacja niektórych składników chemicznych w *Melittis melissophyllum* L., *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia*, Vol.37, 20, 163-170.
 161. Takahashi M., Konno C., Hikino H., 1985, Isolation and Hypoglycemic Activity of Anemaran A, B, C and D, Glycans of *Anemarrhena asphodeloides* Rhizomes, *Planta Med.*, 2, 100-102.
 162. Taylor R.L., Conrad H.E., 1972, Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides following Reduction of Their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups, *Biochem.*, 11, 1383-1388.
 163. Thiem B., Skrzypczak-Pietraszek E., Skrzypczak L., 1994, *In vitro* cultures of some *Oenothera* species, Abstracts of VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florencia, 7.
 164. Tomoda M., Shimada K., Konno C., Murakami M., Hikino H., 1986, Structure of aconitan A, a hypoglycemic glycan of *Aconitum carmichaeli* roots, *Carbohydr. Res.*, 147, 160-164.
 165. Tomoda M., Shimada K., Konno C., Sugiyama K., Hikino H., 1984, Partial Structure of Panaxan A, a Hypoglycaemic Glycan of *Panax ginseng* Roots, *Planta Med.*, 5, 436-438.
 166. Tomoda M., Shimizu N., Gonda R., Kanari M., Yamada H., Hikino H., 1989, Anticomplementary and hypoglycemic activity of Okra and Hibiscus mucilages, *Carbohydr. Res.*, 190, 323-328.
 167. Tomoda M., Shimizu N., Gonda R., Kanari M., Yamada H., Hikino H., 1990, Anti-Complementary and Hypoglycemic Activities of the Glycans from the Seeds of *Malva verticillata*, *Planta Med.*, 56, 168-170.
 168. Turowska I., Cyunel E., 1989, *Rośliny nasienne*, Wyd. IV, skrypt AM Kraków, 192.
 169. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (eds.), 1972, *Flora Europaea*, Vol.3., University Press, Cambridge, 143.
 170. Uchiyama T., Numata M., Terada S., Hosino T., 1993, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 32, 153-159.
-

-
171. Ukai S., Hara C., Kiho T., Hirose K., 1978, Polysaccharides of Azuki Beans.I. Neutral Homopolysaccharides „Arabinans” from Alkaline Extract of the Seeds of *Phaseolus radiatus* L. var. aurea Prain, Chem. Pharm. Bull., 26, 1729-1736.
 172. Varljen J., Liptak A., Wagner H., 1989, Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*, Phytochemistry, 28, 2379-2383.
 173. Vollmar A., Schafer W., Wagner H., 1986, Immunologically active polysaccharides of *Eupatorium cannabinum* and *Eupatorium perfoliatum*, Phytochemistry, 25, 377-381.
 174. Wagner H., 1986, Immunostimulation und Phytotherapeutika, Zeitschrift für Phytotherapie, 7, 91-98.
 175. Wagner H., 1997, Recent Advances in the Experimental Research and Clinic of Plant Immunostimulants, Book of Abstracts of 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, PL 04.
 176. Wagner H., Kraus S., 1998, News from immunologically active plant polysaccharides, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 177. Wagner H., Proksch A., 1985, Immunostimulatory Drugs of Fungi and Higher Plants, w: Wagner H., Hikino H., Farnsworth N.R. (eds.), Economic and Medicinal Plant Research, Vol.I, Academic Press, Londyn, 113-153.
 178. Wagner H., Proksch A., Riess-Maurer J., Vollmar A., Odenthal S., Stuppner H., Jurcic K., Le Turdu M., Fang J.N., 1985a, Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen, Arzneim.-Forsch./Drug Res., 35, 1069-1075.
 179. Wagner H., Proksch A., Vollmar A., Kreutzkamp B., Bauer J., 1985b, In-vitro-Phagozytose-Stimulierung durch isolierte Pflanzensstoffe gemessen im Phagozytose-Chemolumineszenz-(CL)-Modell, Planta Med., 2, 139-144.
 180. Wagner H., Stuppner H., Puhlmann J., Brümmer B., Deppe K., Zenk M.H., 1989, Gewinnung von immunologisch aktiven Polysacchariden aus Echinacea-Drogen und – Gewebekulturen, Zeitschrift für Phytotherapie, 10, 35-38.
 181. Wagner H., Stuppner H., Puhlmann J., Jurcic K., Zenk M.H., Lohmann-Matthes M.L., 1987, Immunostimulierend wirkende Polysaccharide aus Zellkulturen von *Echinacea purpurea* (L.) Moench, Zeitschrift für Phytotherapie, 8, 125-126.
 182. Wagner H., Stuppner H., Schäfer W., Zenk M., 1988, Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, Phytochemistry, 27, 119-126.
 183. Wareing P.F., Phillips I.D.J., 1976, Regulacja wzrostu i różnicowania u roślin, PWN, Warszawa.
 184. Whistler R.L., Bushway A.A., Singh P.P., Nakahara W., Tokuzen R., 1976, Noncytotoxic, Antitumor Polysaccharides, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32, 235-275.
 185. Woodward J.R., Fincher G.B., Stone B.A., 1983, Water-Soluble (1→3),(1→4)-β-D-Glucans from Barley (*Hordeum vulgare*) Endosperm. II. Fine Structure, Carbohydr. Polymers, 3, 207-225.
 186. Wozniowski T., Franz G., 1994, Lilium testaceum: In Vitro Culture and the Production of Glucomannans and Other Secondary Metabolites, w: Bajaj Y.P.S. (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.26, Medicinal and Aromatic Plants VI, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 206-218.
 187. Yagi A., Makino K., Nishioka I. Kuchino Y., 1977, Aloe mannan, polysaccharide from *Aloe arborescens* var. natalensis, Planta Med., 31, 17-20.
-

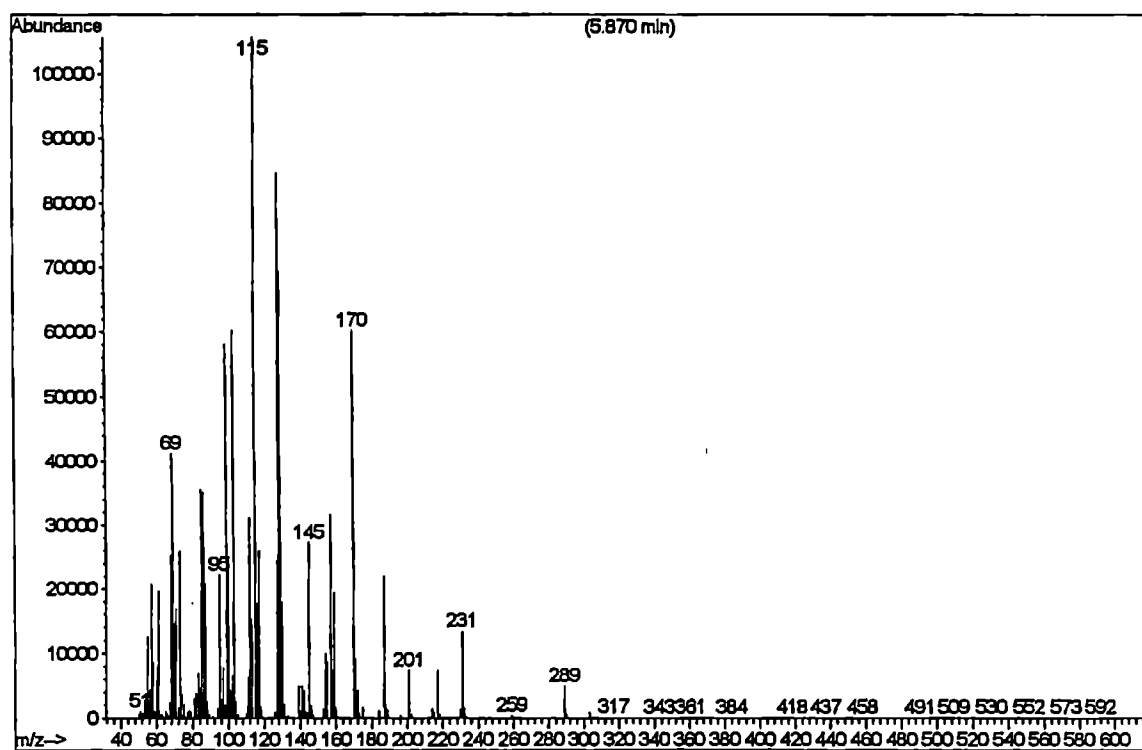
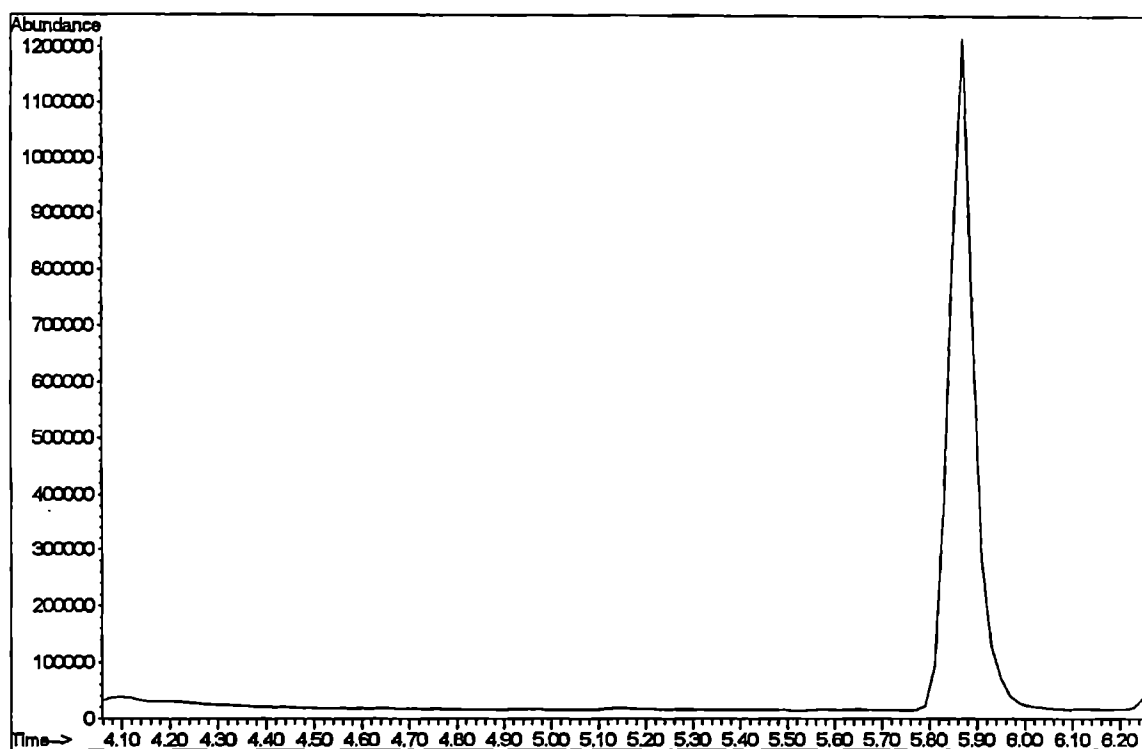
-
188. Yamada H., 1998, Bioactive plant polysaccharides from Japanese and Chinese traditional herbal medicines, Book of Abstracts of the Conference of the Phytochemical Society of Europe „Bioactive Carbohydrate Polymers”, Sundøya.
 189. Yamada H., Kiyohara H., Cyong J.-C., Kojima Y., Kumazawa Y., Otsuka Y., 1984, Studies on Polysaccharides from *Angelica acutiloba*, *Planta Med.*, 50, 163-167.
 190. Yamada H., Komiyama K., Kiyohara H., Cyong J.-C., Hirakawa Y., Otsuka Y., 1990, Structural Characterization and Antitumor Activity of a Pectic Polysaccharide from the Roots of *Angelica acutiloba*, *Planta Med.*, 56, 182-186.
 191. Yamada H., Nagai T., Cyong J.-C., Otsuka Y., Tomoda M., Shimizu N., Shimada K., 1985, Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 144, 101-111.
 192. Yamada H., Nagai T., Cyong J.-C., Otsuka Y., Tomoda M., Shimizu N., Gonda R., 1986, Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, Plantago-mucilage A, from the seed of *Plantago asiatica*, *Carbohydr. Res.*, 156, 137-145.
 193. Yamada H., Ohtani K., Kiyohara H., Cyong J.-C., Otsuka Y., Ueno Y., Omura S., 1985, Purification and Chemical Properties of Anti-Complementary Polysaccharide from the Leaves of *Artemisia princeps*, *Planta Med.*, 2, 121-125.
 194. Zając A., Zając M. (red.), Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce – Distribution atlas of vascular plants in Poland (manuskrypt).
 195. Zając M., Zając A. (red.), 1998, Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w woj. krakowskim. Gatunki prawnie chronione, ginące, narażone i rzadkie, Pracownia Chorologii Komputerowej Instytutu Botaniki UJ, Kraków, 67.
 196. Zenkteler M. (red.), 1984, Hodowla komórek i tkanek roślinnych, PWN, Warszawa.
 197. Żukowski W., Jackowiak B. (red.), 1995, Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Zachodniego i Wielkopolski, Prace Zakładu Taksonomii Roślin UAM w Poznaniu, Nr 3, Wydawnictwo Naukowe Bogucki, Poznań, 51.

7. Chromatogramy

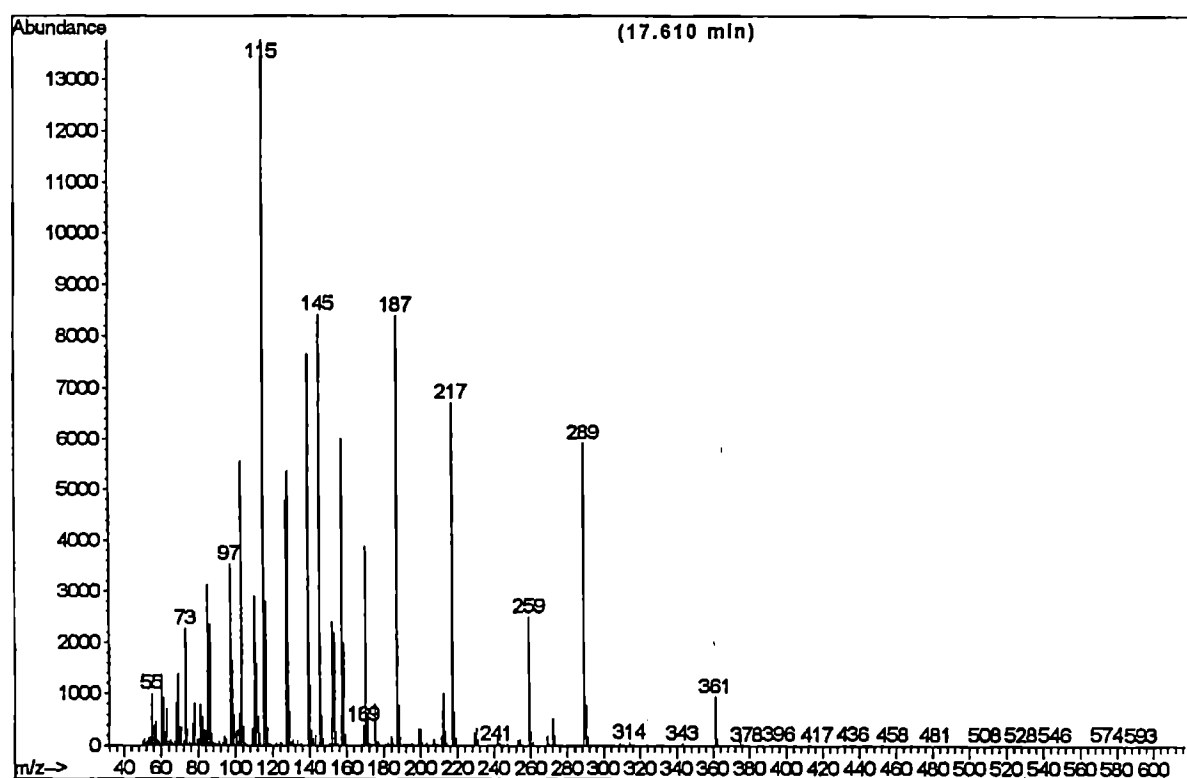
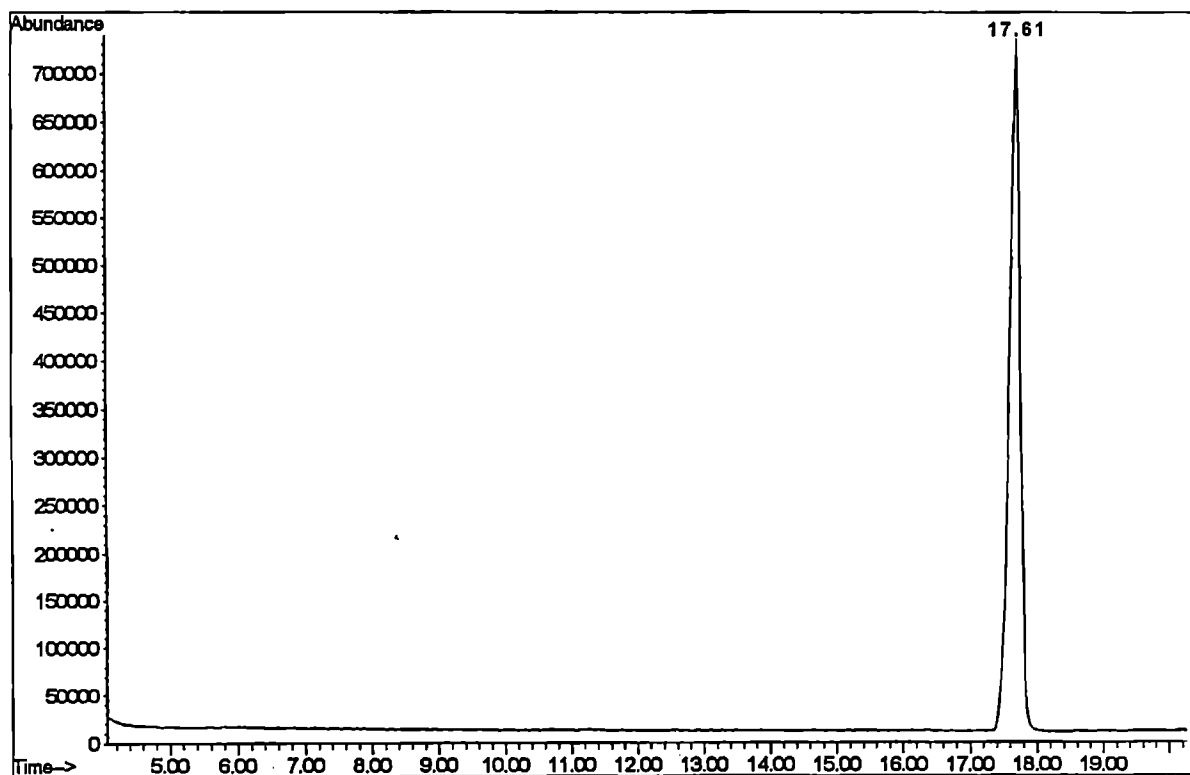
Ryc. 15. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy pochodnych wzorcowych cukrów prostych (dla frakcji wyizolowanych z ziela)



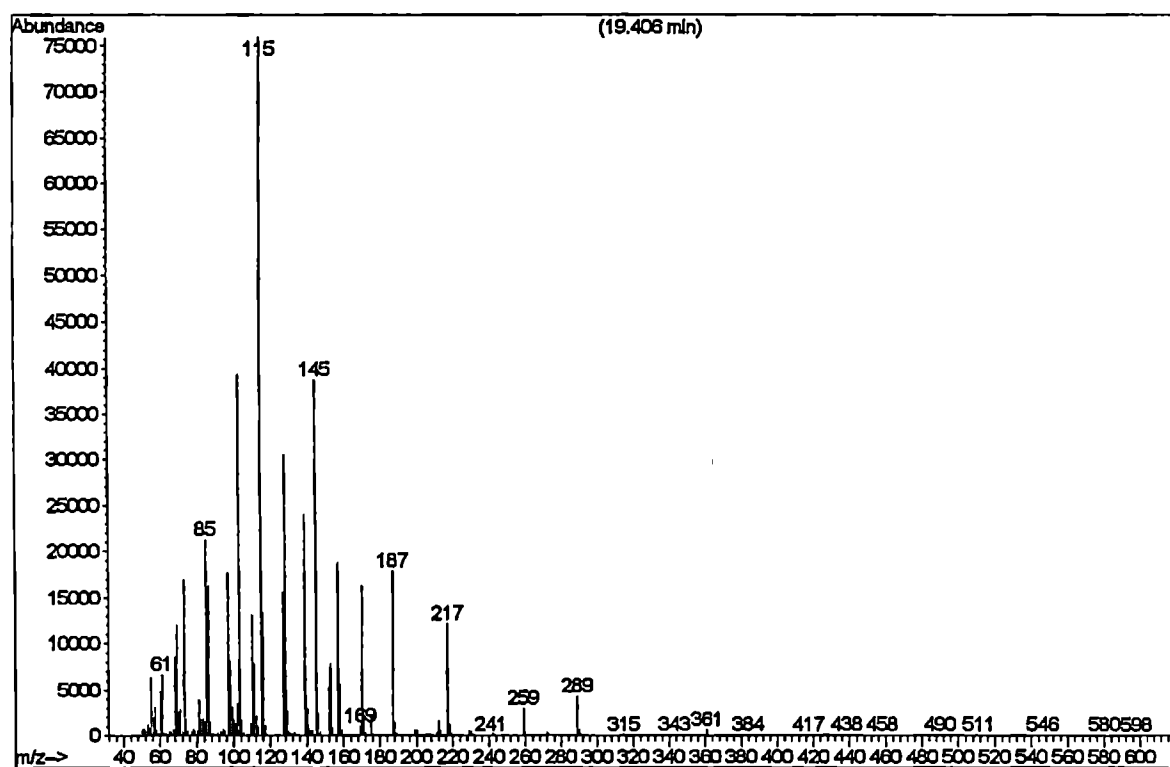
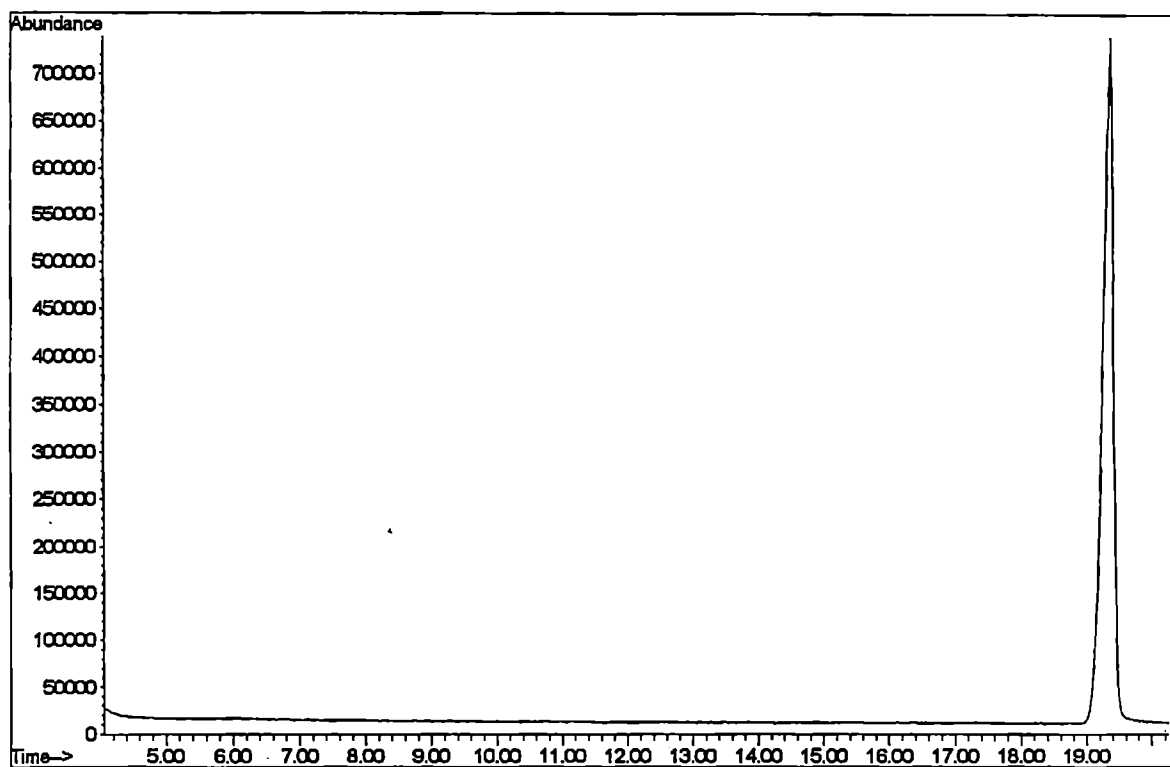
Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna arabinozy (wzorzec)



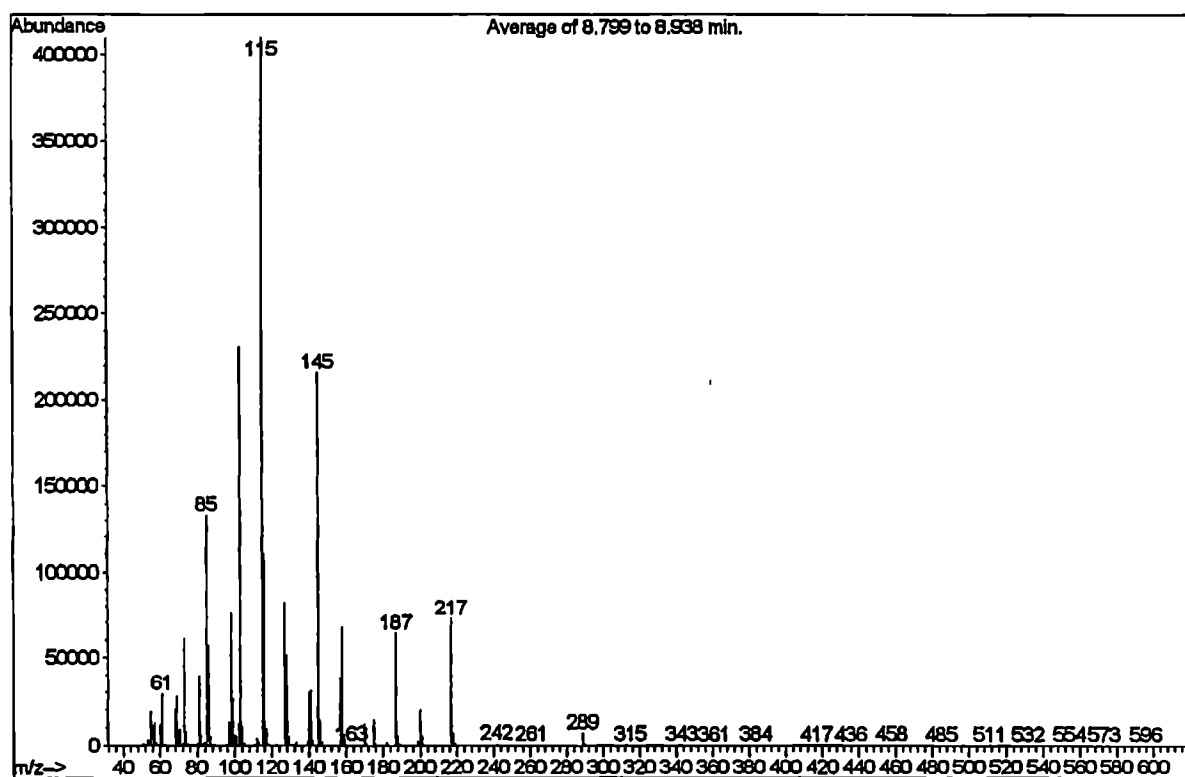
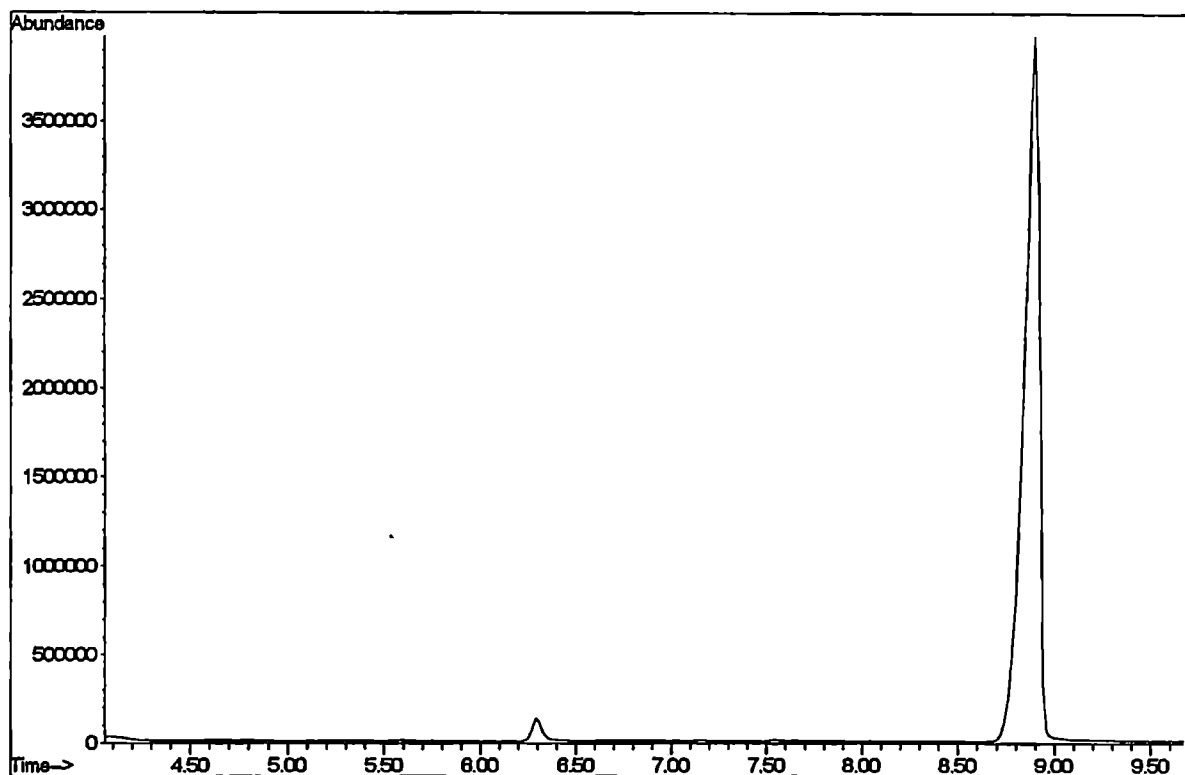
Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna fukozy (wzorzec)



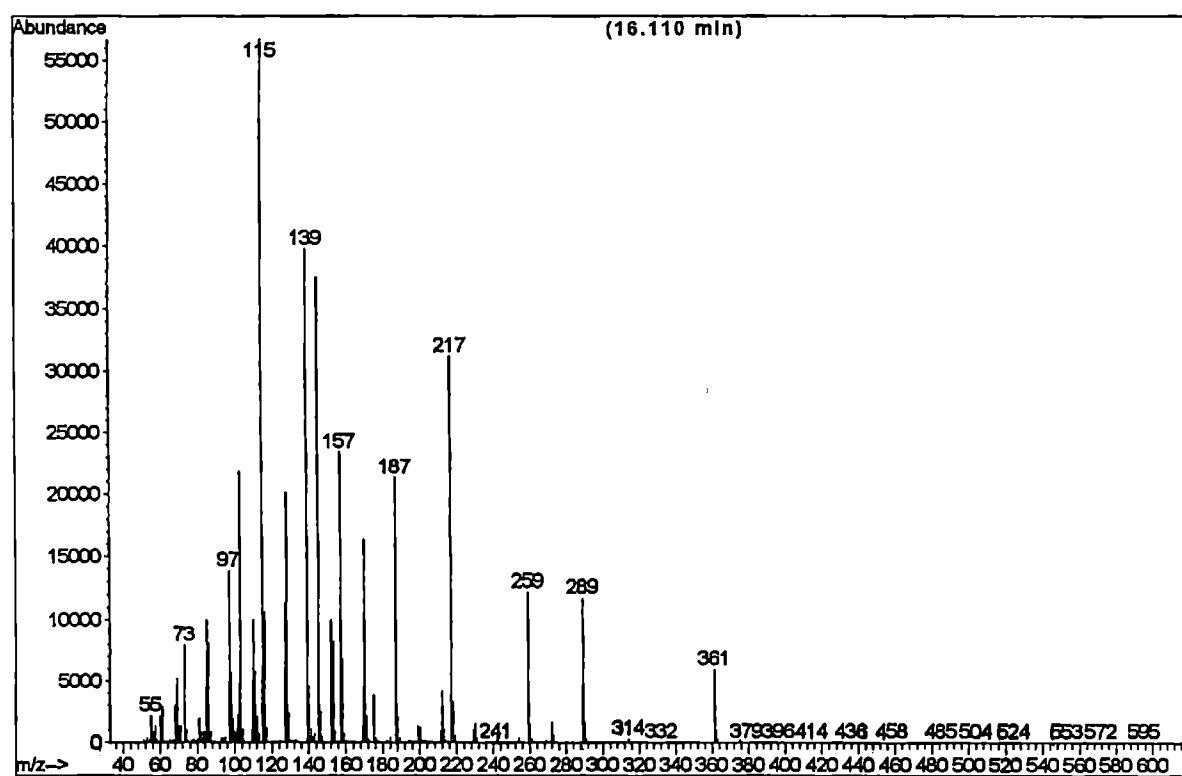
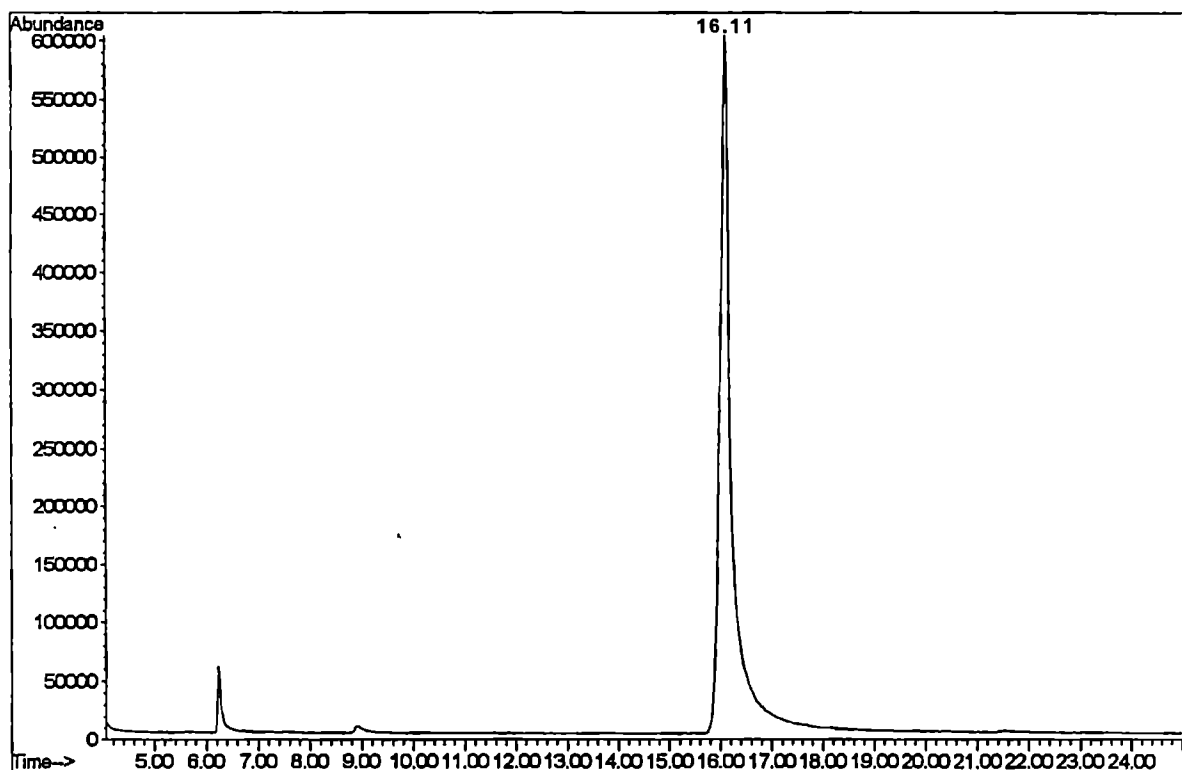
Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna galaktozy (wzorzec)



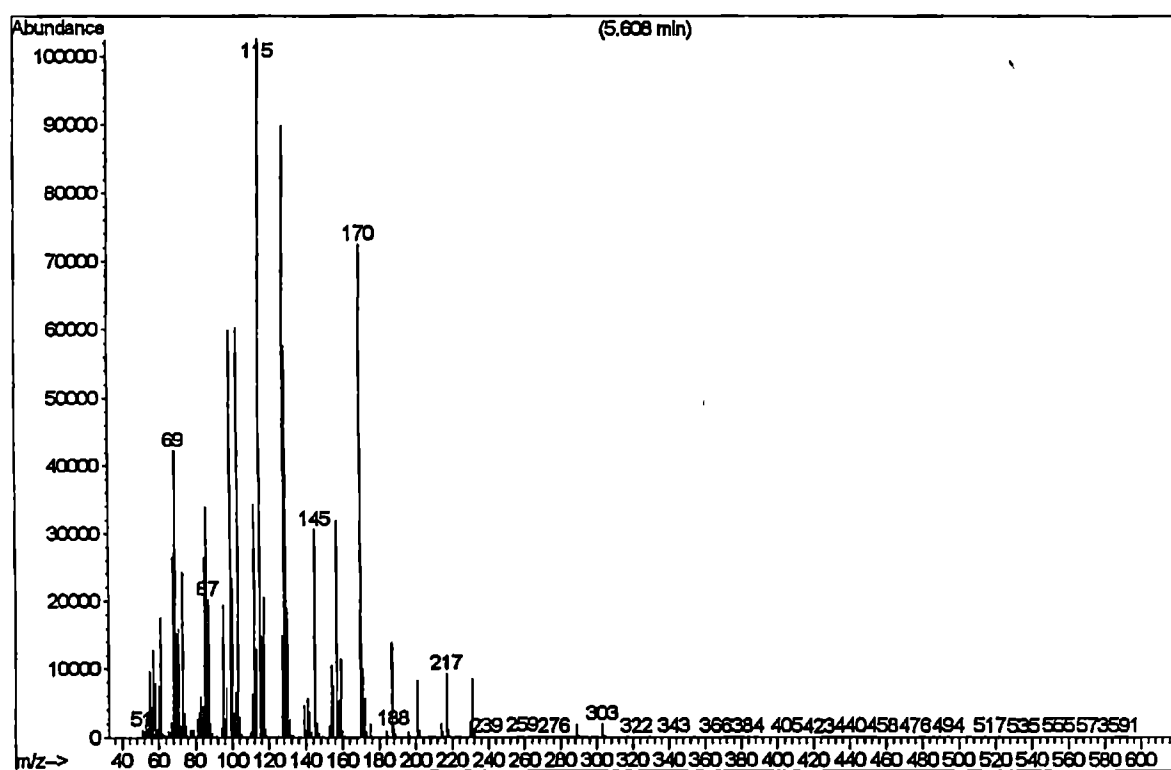
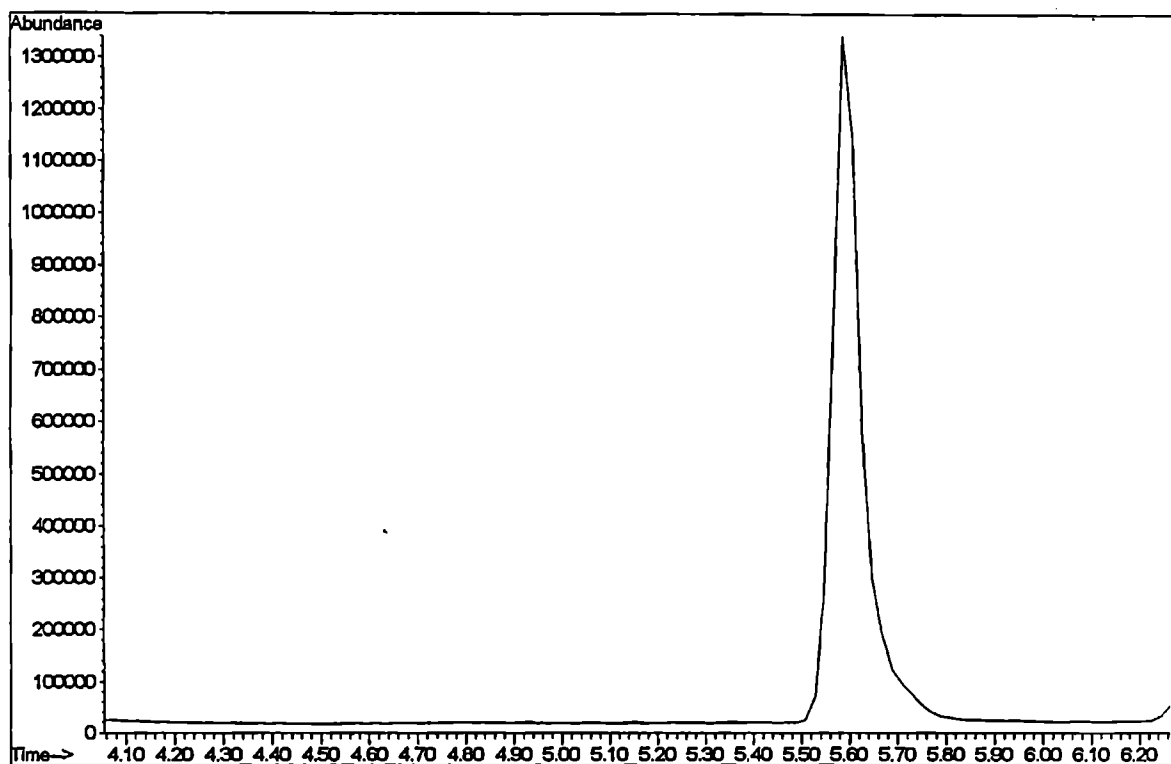
Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna glukozy (wzorzec)



Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna ksylozy (wzorzec)



Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna mannozy (wzorzec)

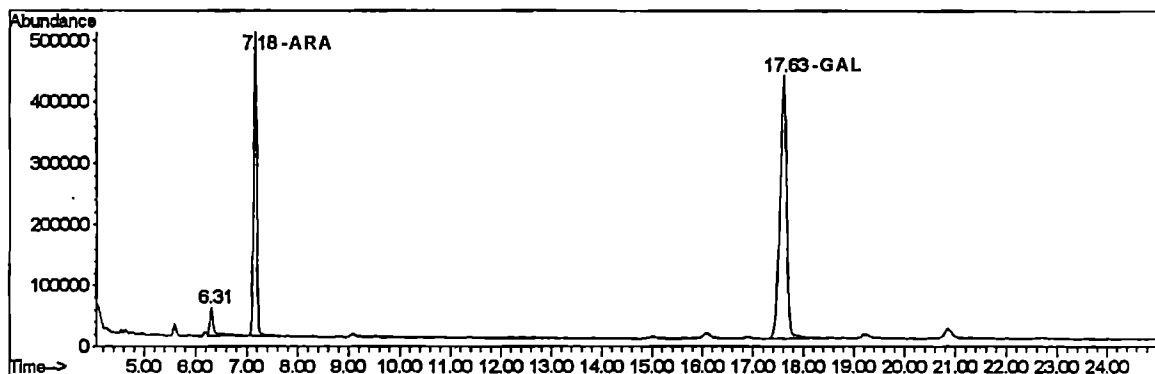


Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna ramnozy (wzorzec)

Ryc. 16. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z ziela

Zastosowane skróty:

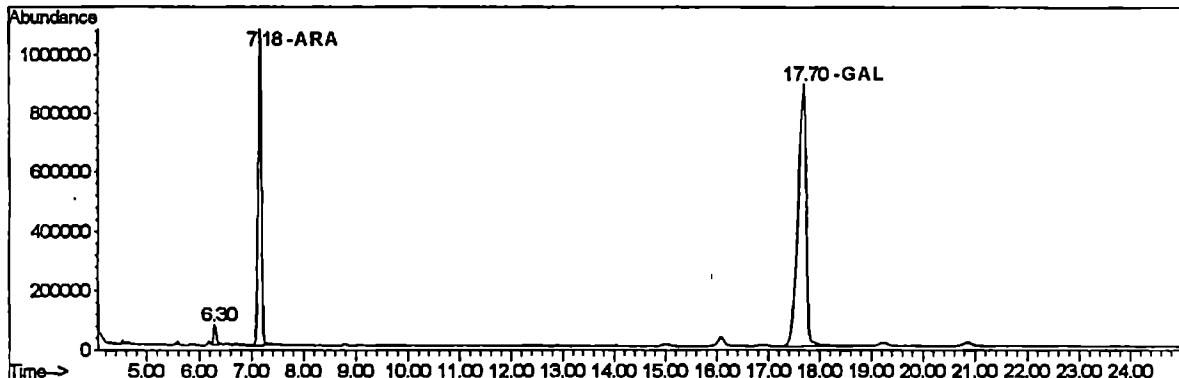
ARA – pochodna arabinozy
 GAL – pochodna galaktozy
 GLU – pochodna glukozy
 KSY – pochodna ksylozy
 MAN – pochodna mannozy
 RAM – pochodna ramnozy



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
6.313	2358956	3.739	5.789
7.176	19981148	31.671	49.033
17.633	40750478	64.590	100.000

↑

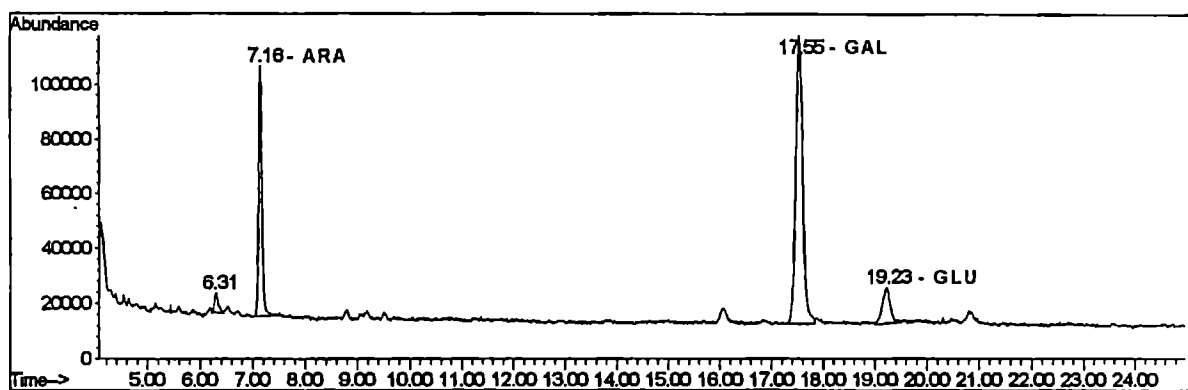
Chromatogram GLC – frakcja I a



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
6.304	2669796	1.841	2.750
7.180	45247018	31.206	46.609
17.705	97078095	66.953	100.000

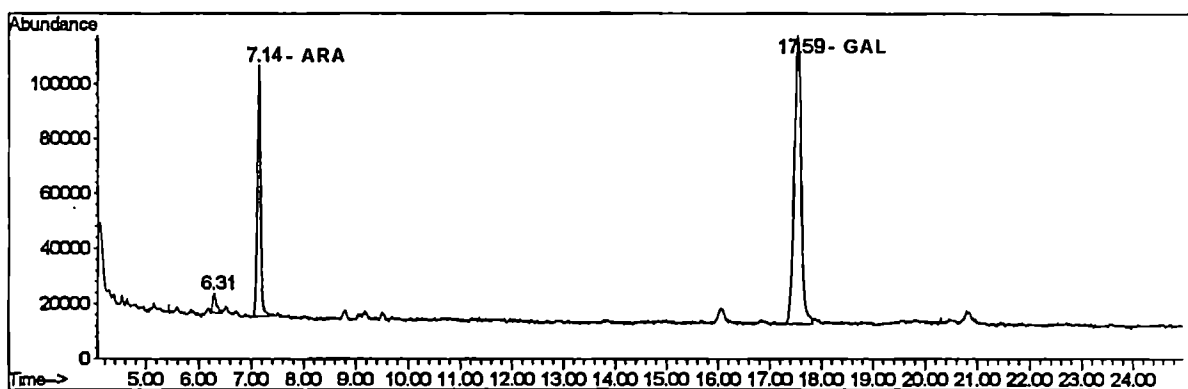
↑

Chromatogram GLC – frakcja I b



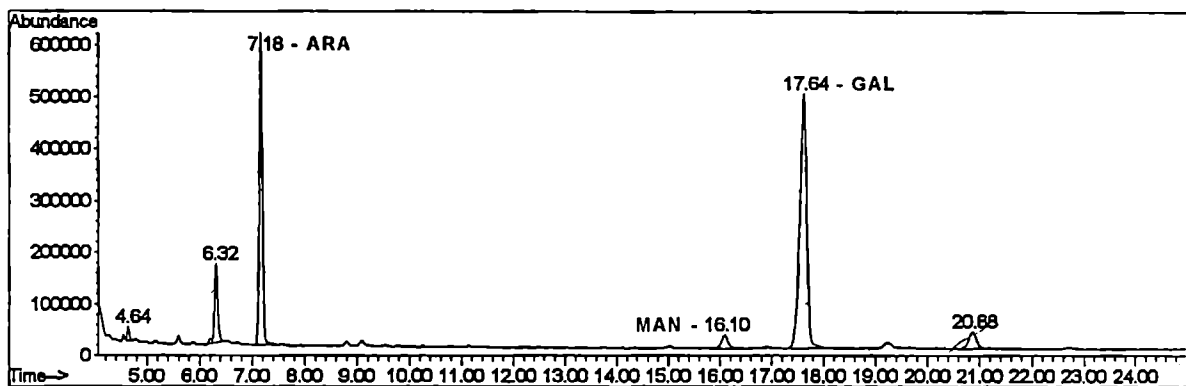
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
6.309	349332	2.283	3.563
7.155	3773731	24.664	38.490
17.552	9804325	64.077	100.000
19.233	1373379	8.976	14.008

Chromatogram GLC – frakcja I c



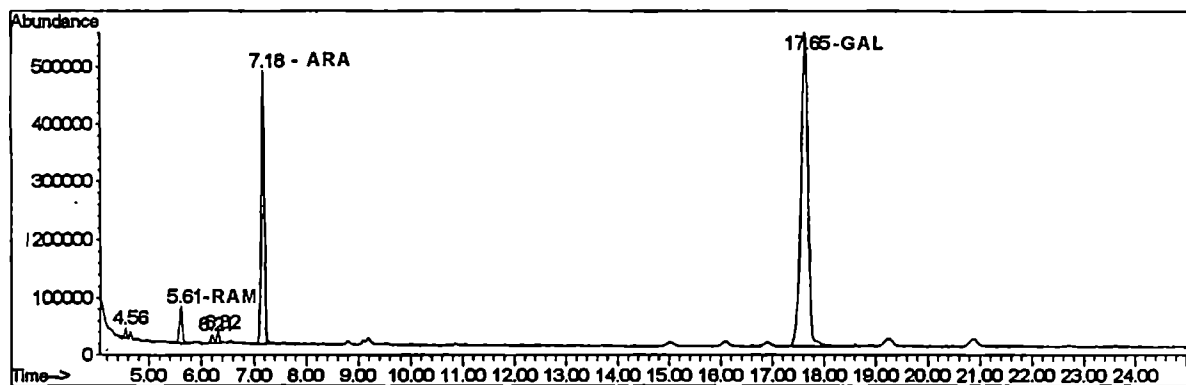
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
6.308	257302	1.893	2.650
7.137	3624451	26.662	37.318
17.591	9712315	71.445	100.000

Chromatogram GLC – frakcja II a



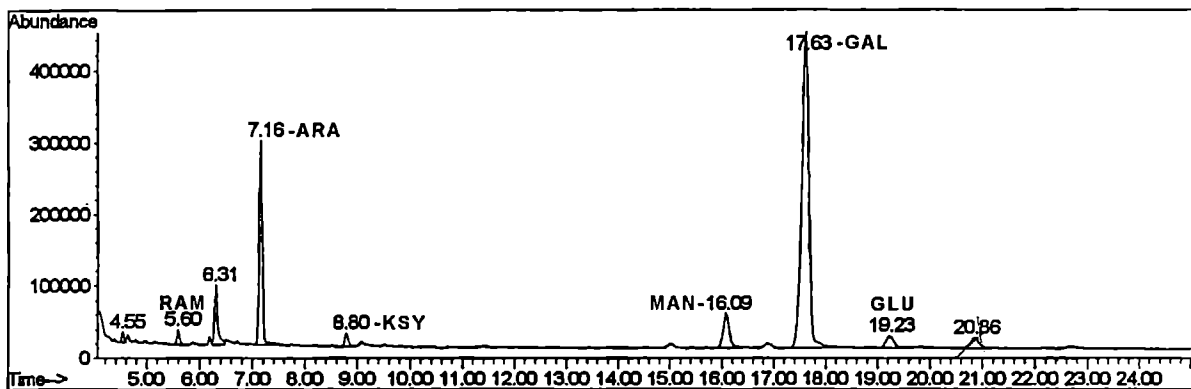
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
4.645	806092	0.953	1.679
6.316	6185828	7.315	12.886
7.178	23685195	28.010	49.341
16.098	2510315	2.969	5.230
17.642	48002756	56.767	100.000
20.876	3370155	3.986	7.021

Chromatogram GLC – frakcja II b



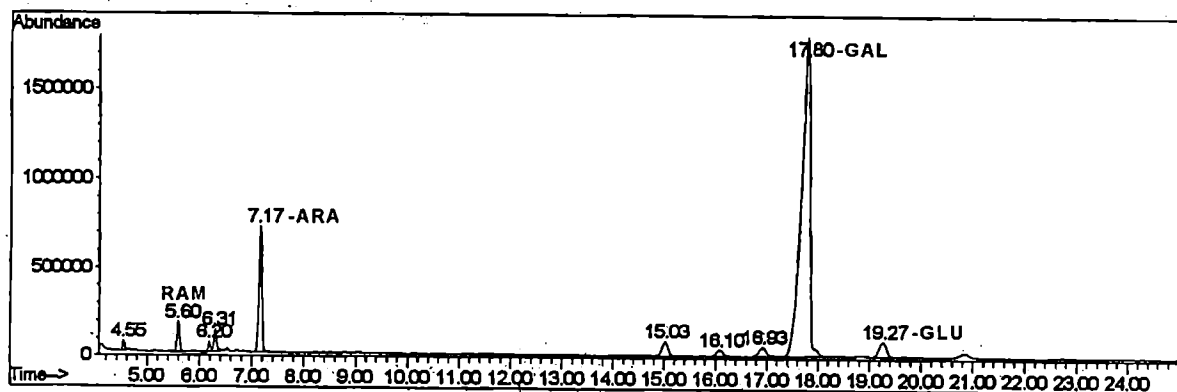
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
4.560	267468	0.357	0.509
5.614	2334898	3.116	4.444
6.211	504508	0.673	0.960
6.317	721665	0.963	1.374
7.179	18559460	24.771	35.328
17.654	52535395	70.119	100.000

Chromatogram GLC – frakcja III a



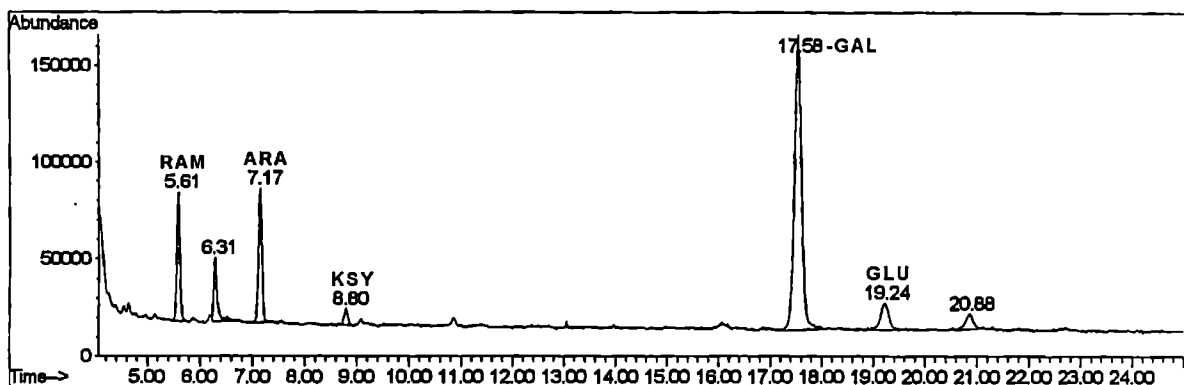
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
4.549	400781	0.599	0.946
5.600	773237	1.156	1.825
6.309	3683891	5.509	8.693
7.164	11531091	17.245	27.209
8.797	842475	1.260	1.988
16.092	3887484	5.814	9.173
17.633	42379985	63.379	100.000
19.231	1745061	2.610	4.118
20.860	1623930	2.429	3.832

↑
Chromatogram GLC – frakcja III b



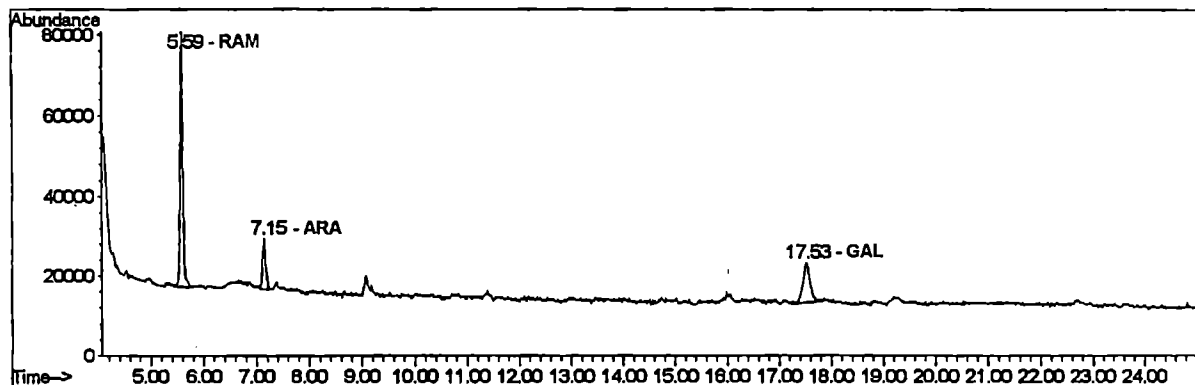
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
4.547	1438372	0.520	0.681
5.602	5938107	2.147	2.811
6.197	1656744	0.599	0.784
6.307	4991606	1.804	2.363
7.172	27598549	9.977	13.065
15.026	6618058	2.392	3.133
16.095	3304370	1.195	1.564
16.925	5237462	1.893	2.479
17.802	211240160	76.365	100.000
19.271	8596627	3.108	4.070

↑
Chromatogram GLC – frakcja IV a



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.611	2587498	10.332	17.288
6.307	1602912	6.401	10.709
7.167	3054094	12.195	20.405
8.804	417240	1.666	2.788
17.578	14967314	59.766	100.000
19.241	1600990	6.393	10.697
20.878	813173	3.247	5.433

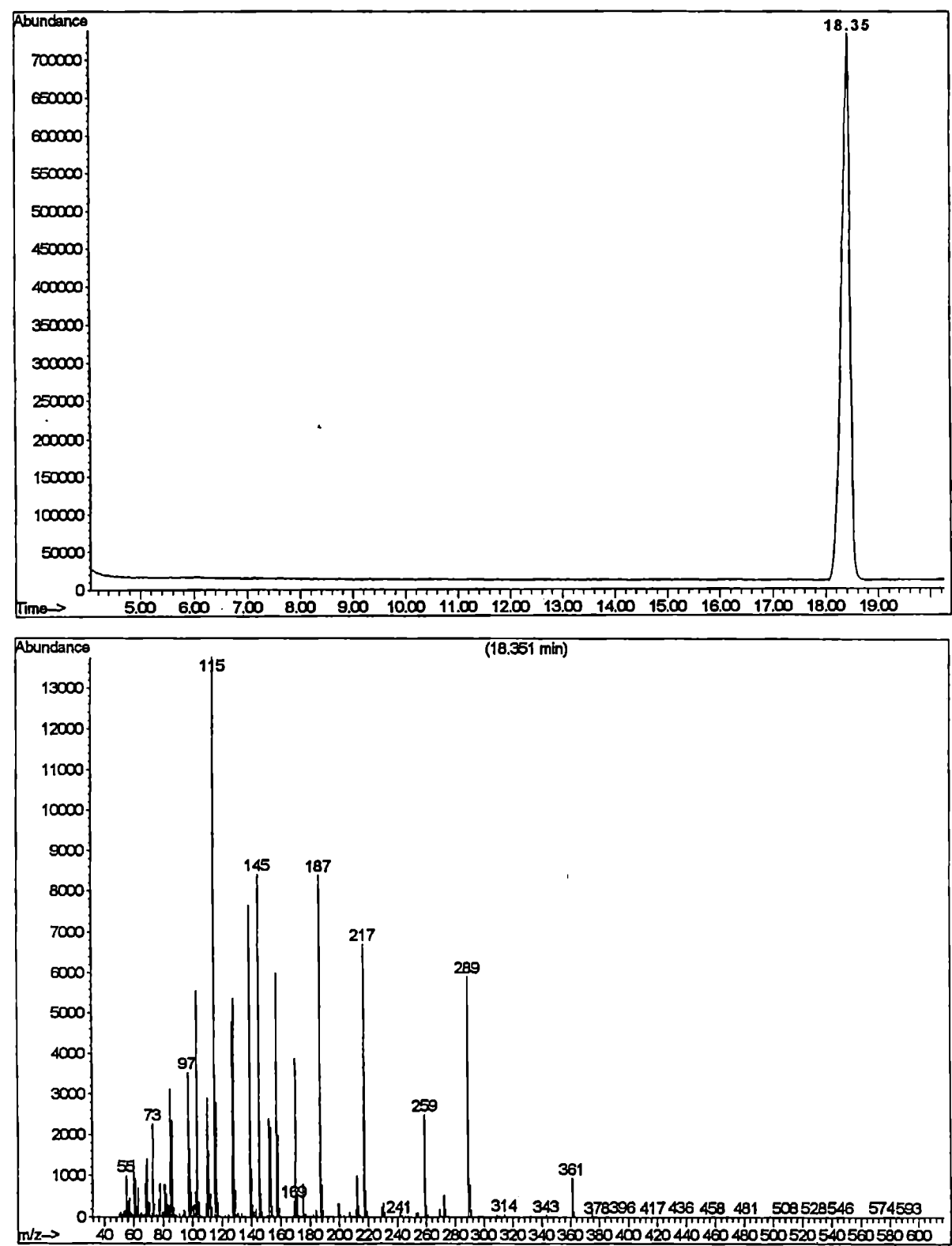
Chromatogram GLC – frakcja V a



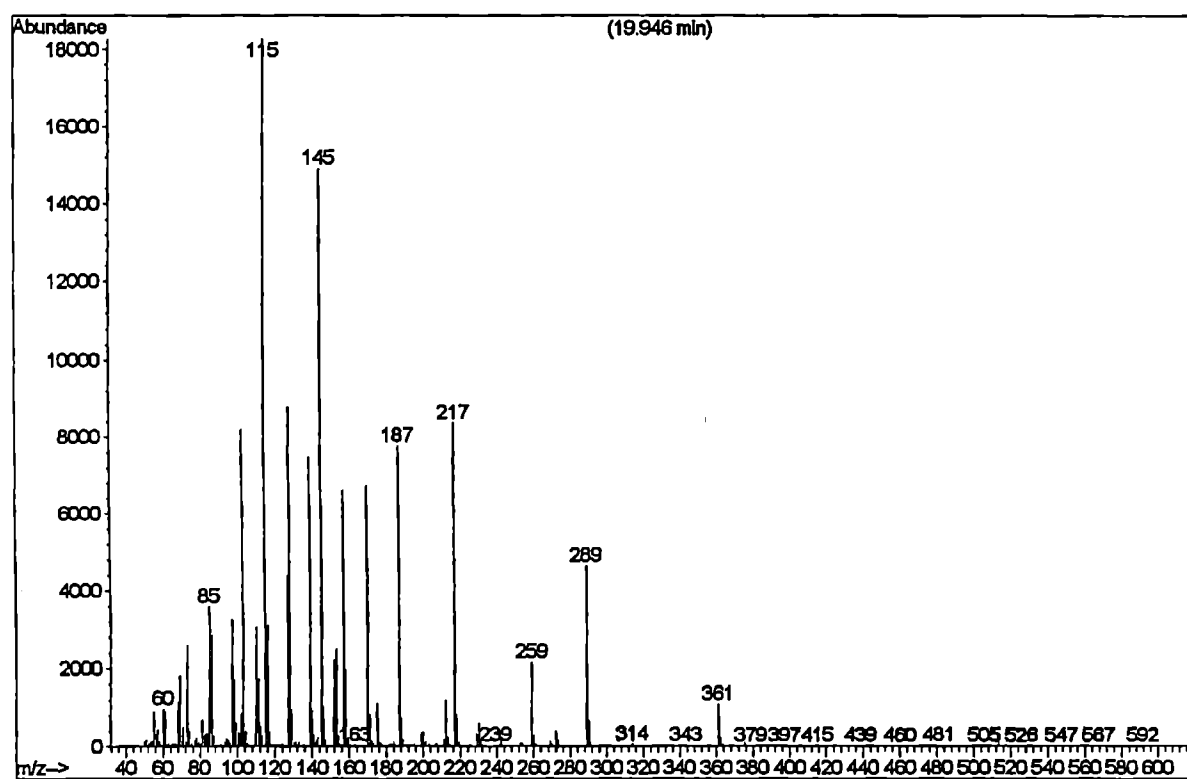
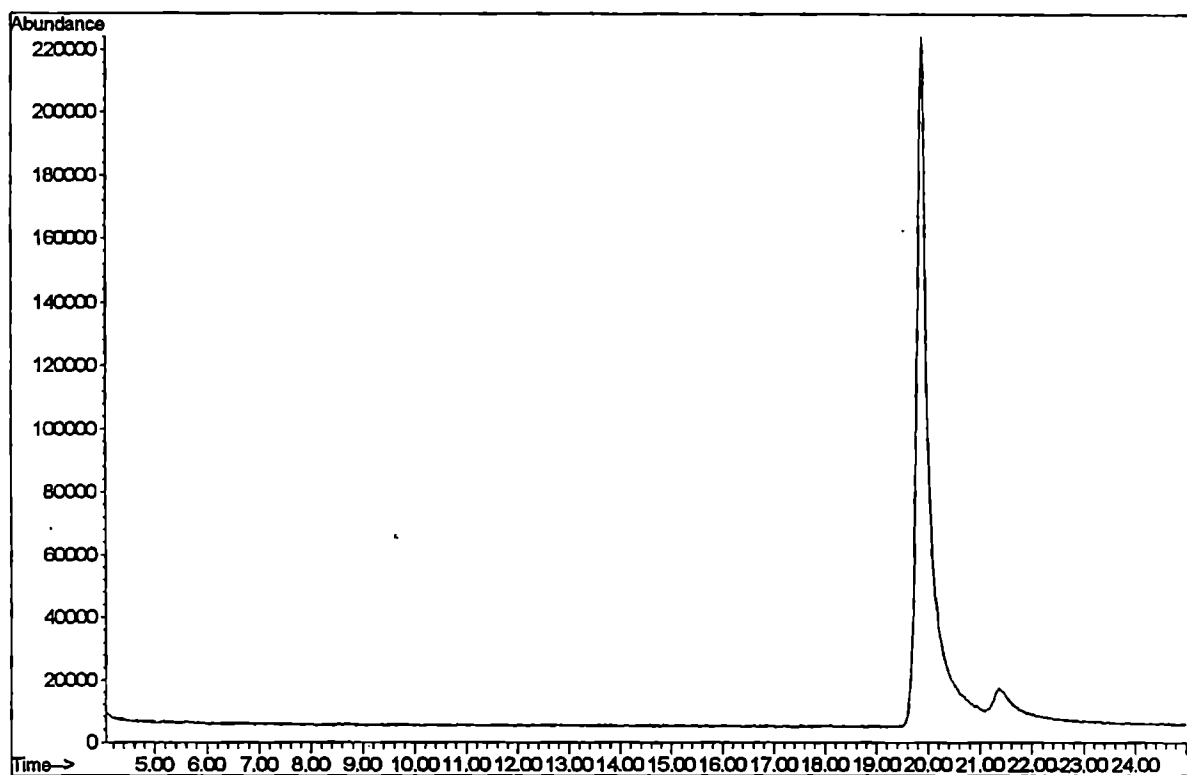
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.594	2136670	58.573	100.000
7.148	556987	15.269	26.068
17.527	949942	26.158	44.459

Chromatogram GLC – frakcja V c

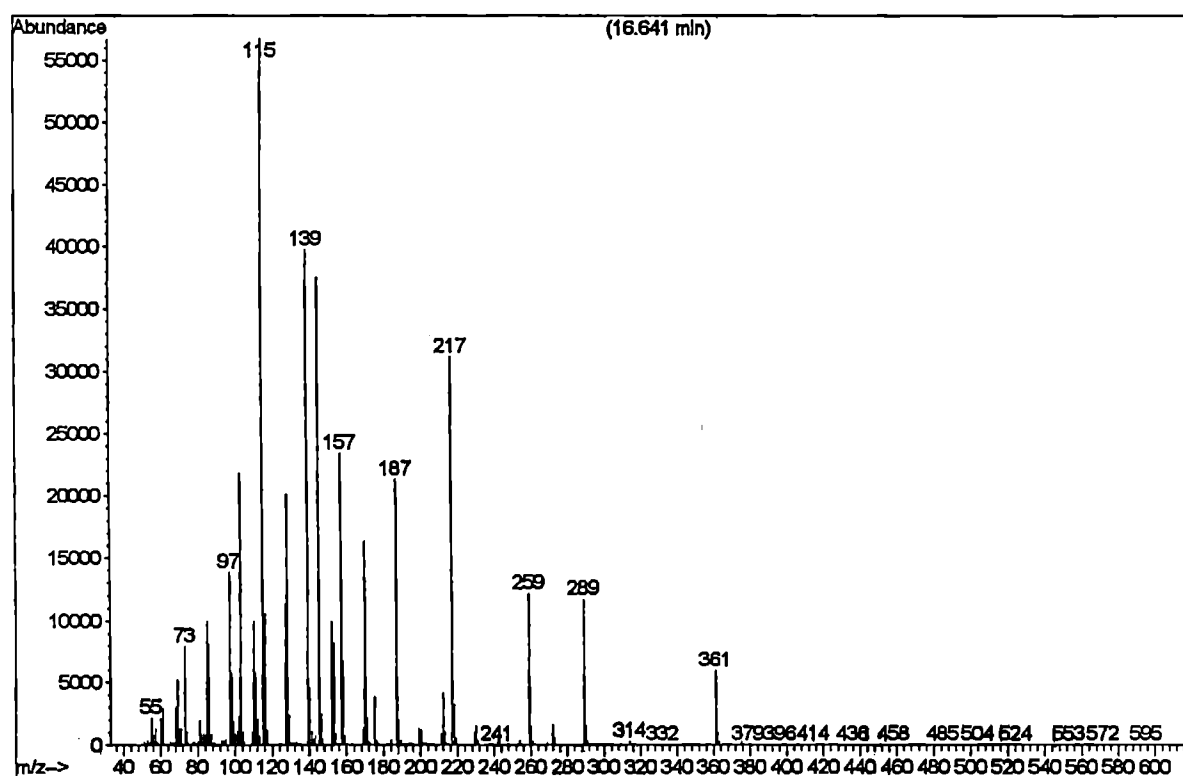
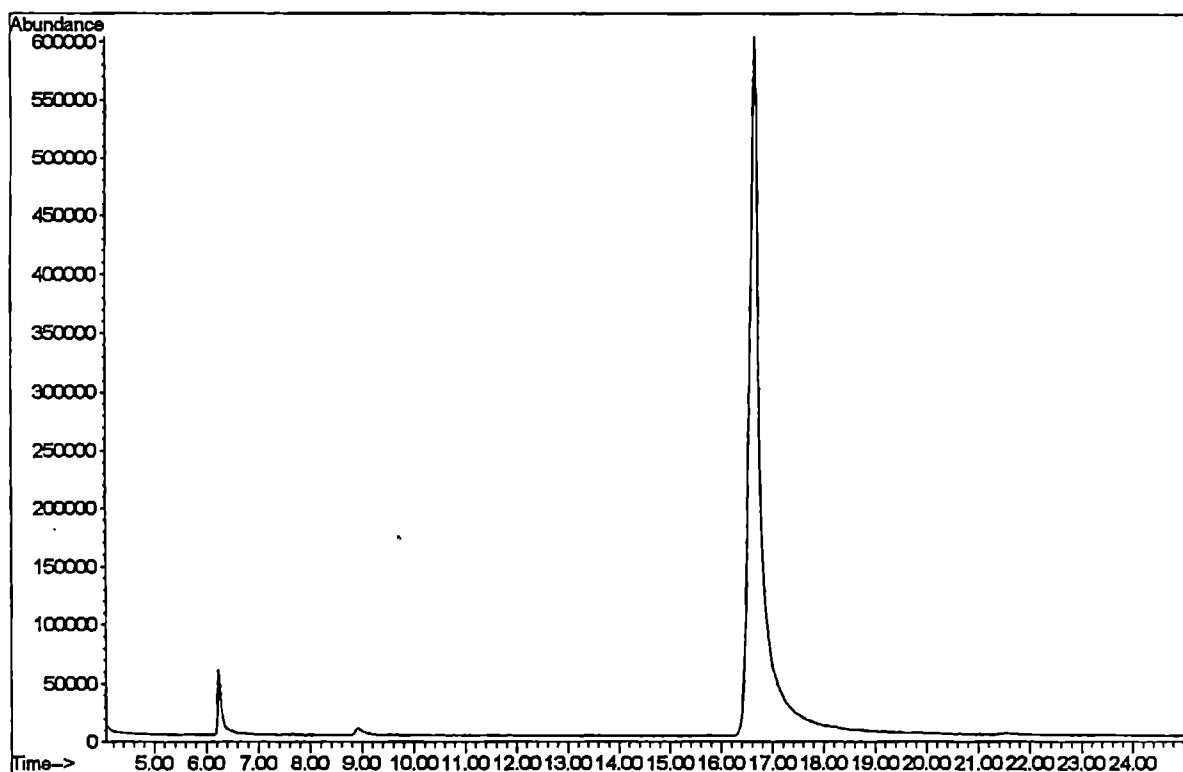
Ryc. 17. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy pochodnych cukrów prostych (dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej): galaktozy, glukozy, mannozy. Pozostałe wzorce analogiczne, jak dla frakcji z ziela.



Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna galaktozy (wzorzec)



Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna glukozy (wzorzec)



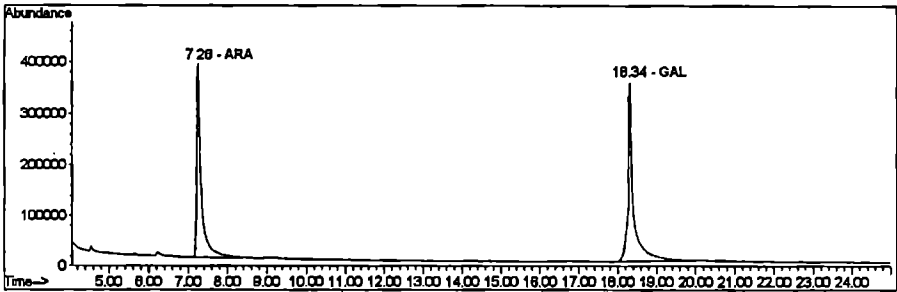
Chromatogram GLC i widmo masowe – pochodna mannozy (wzorzec)

Ryc. 18. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej

Zastosowane skróty:

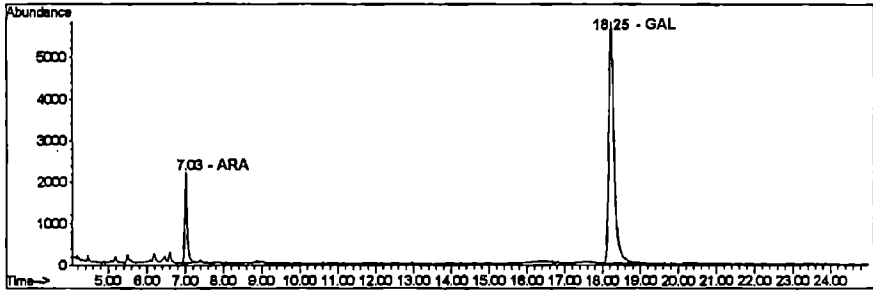
- ARA – pochodna arabinozy
- GAL – pochodna galaktozy
- GLU – pochodna glukozy
- KSY – pochodna ksylozy
- MAN – pochodna mannozy
- RAM – pochodna ramnozy

Chromatogram GLC – frakcja K I a



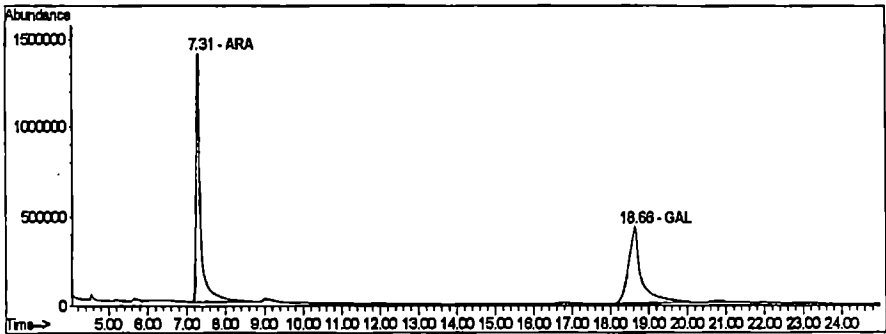
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
7.260	10421204	21.035	26.638
18.345	39121572	78.965	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K I b



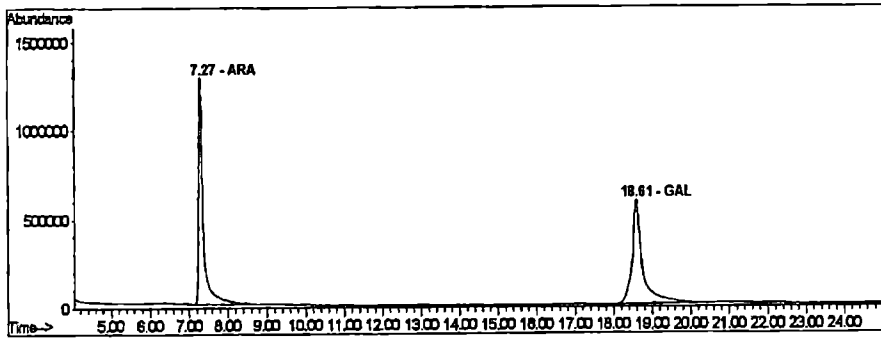
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
7.031	20213	16.029	19.089
18.254	105893	83.971	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K II a



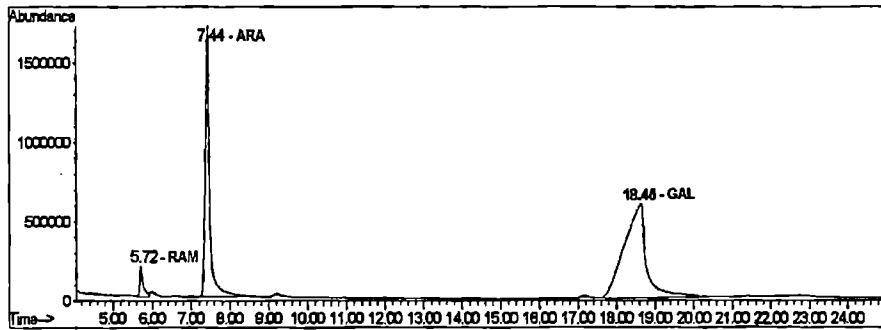
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
7.314	106977836	48.963	95.936
18.661	111509585	51.037	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K II b



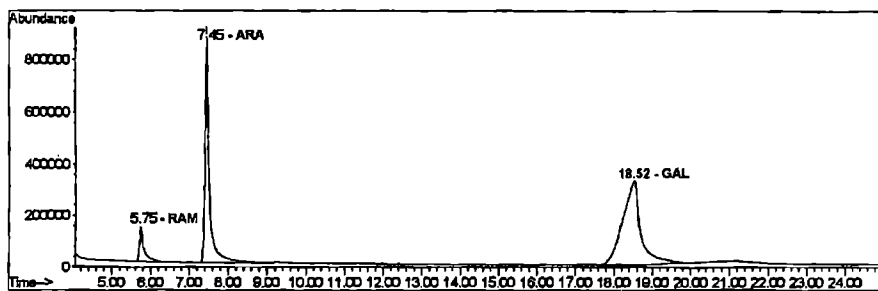
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
7.271	99428603	42.011	72.446
18.614	137245125	57.989	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K III a



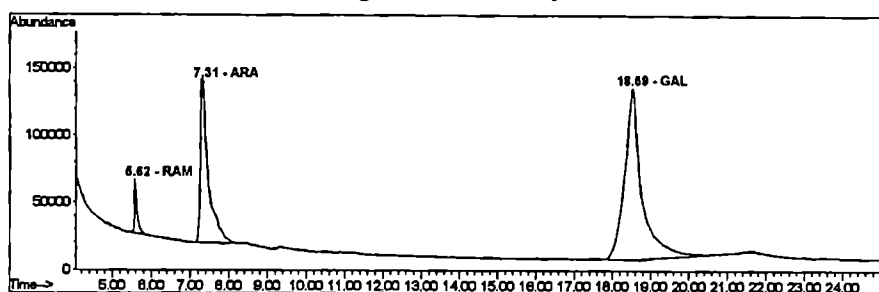
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.715	15732063	4.255	6.666
7.436	118002272	31.915	50.000
18.452	236004543	63.830	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K IV a



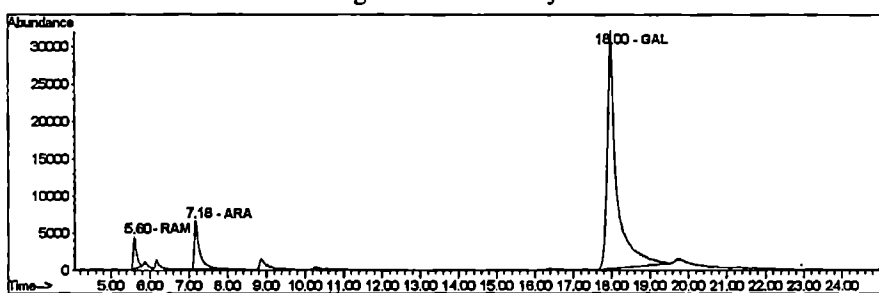
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.746	1200624	5.669	9.766
7.454	63933696	36.281	62.500
18.523	102293914	58.050	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K V a



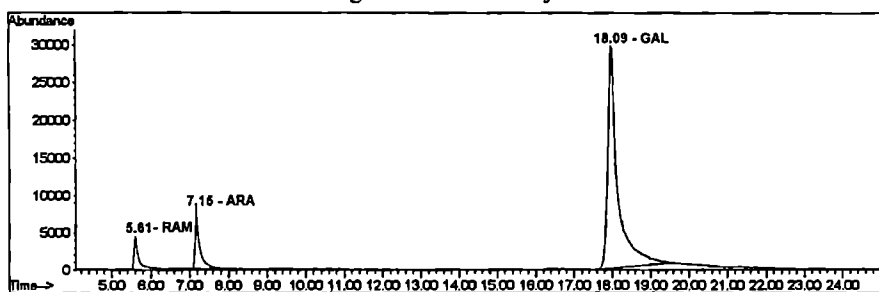
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.624	2757283	5.519	7.353
7.310	9705425	19.426	25.882
18.591	37498747	75.055	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K VI a



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
115.00 amu			
5.603	277035	4.377	5.064
7.182	581697	9.190	10.633
18.002	5470672	86.433	100.000

Chromatogram GLC – frakcja K VII a

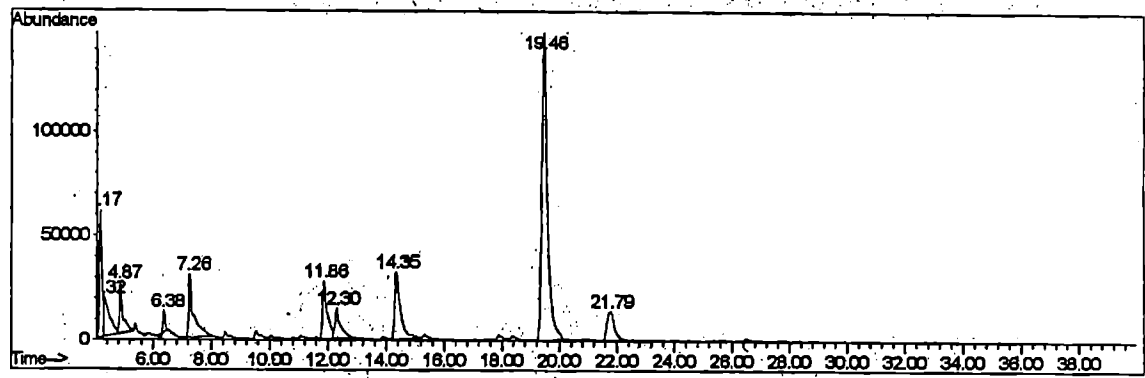


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
5.611	357611	5.767	6.944
7.154	693798	11.188	13.472
18.090	5149923	83.045	100.000

Tab. 37. Zestawienie czasów retencji dla analizy GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli (wykorzystane przy interpretacji chromatogramów (zestawienie przygotowane na podstawie piśmiennictwa: Björndal et al., 1970; Jansson et al., 1976 oraz danych z wcześniejszych analiz zebranych w Instytucie Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Erlangen)

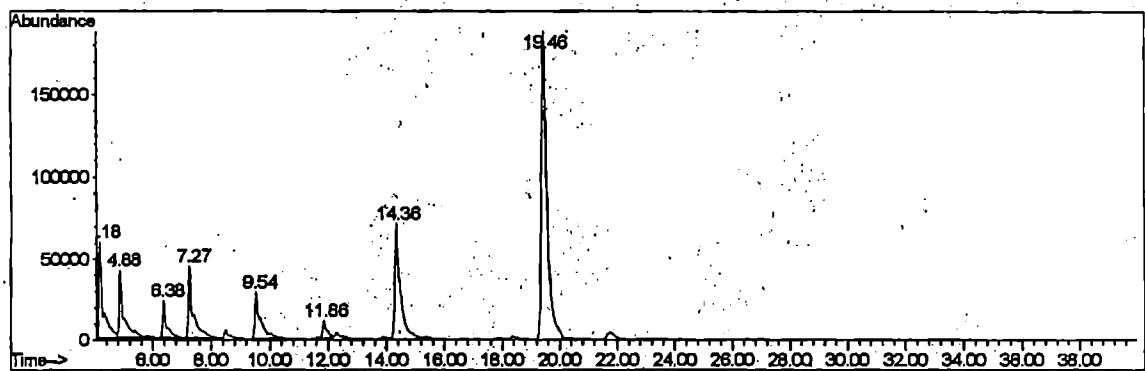
Związek	Czas retencji [min]
Pochodne arabinozy	
1,4-di- <i>O</i> -acetylo-2,3,5-tri- <i>O</i> -metyloarabitol	4,217
1,3,5-tri- <i>O</i> -acetylo-2,4-di- <i>O</i> -metyloarabitol	6,371
1,2,4-tri- <i>O</i> -acetylo-3,5-di- <i>O</i> -metyloarabitol	7,265
1,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetylo-2- <i>O</i> -metyloarabitol	10,081
Pochodne galaktozy	
1,5-di- <i>O</i> -acetylo-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metylogalakcitol	7,751
1,3,5-tri- <i>O</i> -acetylo-2,4,6-tri- <i>O</i> -metylogalakcitol	11,842
1,4,5-tri- <i>O</i> -acetylo-2,3,6-tri- <i>O</i> -metylogalakcitol	12,290
1,5,6-tri- <i>O</i> -acetylo-2,3,4-tri- <i>O</i> -metylogalakcitol	14,345
1,4,5,6-tetra- <i>O</i> -acetylo-2,3-di- <i>O</i> -metylogalakcitol	18,424
1,3,5,6-tetra- <i>O</i> -acetylo-2,4-di- <i>O</i> -metylogalakcitol	19,459
Pochodne ksylozy	
1,2,5-tri- <i>O</i> -acetylo-3,4-di- <i>O</i> -metyloksylitol	7,624
Pochodne ramnozy	
1,5-di- <i>O</i> -acetylo-6-dezoksy-2,3,4-tri- <i>O</i> -metyloheksitol	4,883
1,2,4,5-tetra- <i>O</i> -acetylo-6-dezoksy-3- <i>O</i> -metyloheksitol	7,371
Pochodne glukozy	
1,3,5-tri- <i>O</i> -acetylo-2,4,6-tri- <i>O</i> -metyloglucitol	11,620
Pochodne kwasu galakturonowego (jako deuterowane pochodne galaktozy)	
1,5-di- <i>O</i> -acetylo-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metylogalakcitol	7,751
1,4,5-tri- <i>O</i> -acetylo-2,3,6-tri- <i>O</i> -metylogalakcitol	12,290

Ryc. 19. Analiza GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z ziela



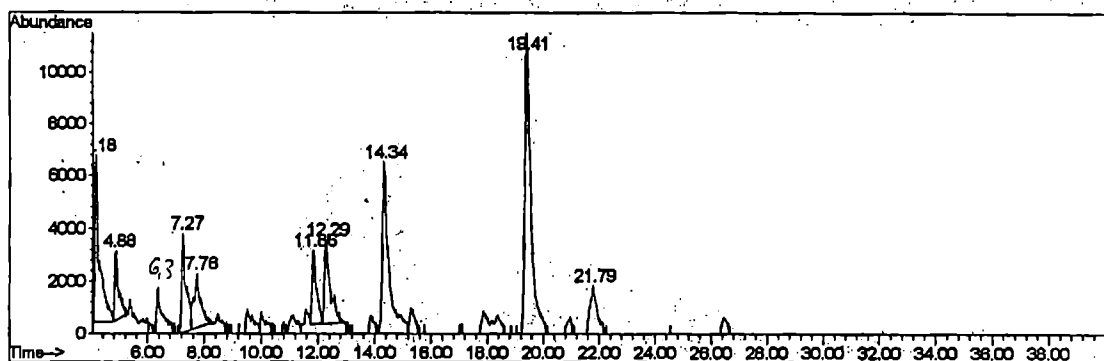
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.169	3685810	8.345	18.902
4.325	2730228	6.182	14.001
4.870	2104101	4.764	10.791
6.378	376170	0.852	1.929
7.263	3696877	8.371	18.959
11.861	3077018	6.967	15.780
12.299	2016988	4.567	10.344
14.346	4428517	10.027	22.711
19.462	19499550	44.151	100.000
21.786	2550162	5.774	13.078

Chromatogram GLC – frakcja I a



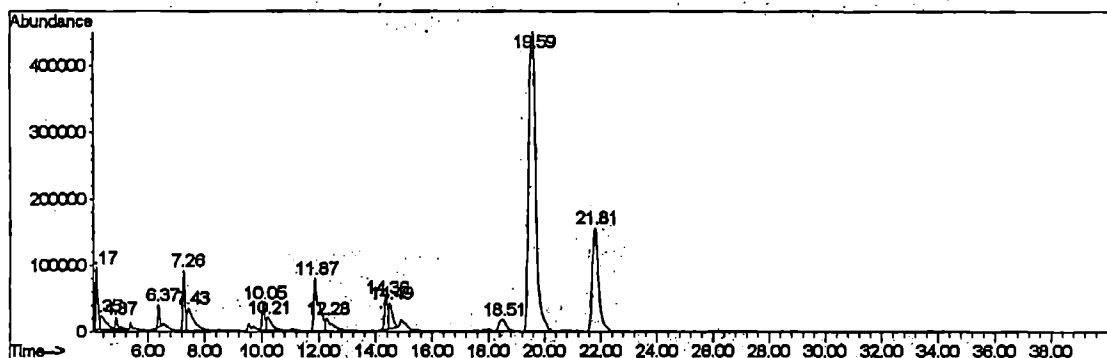
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.175	5513215	9.724	21.817
4.878	4490641	7.921	17.770
6.381	2070934	3.653	8.195
7.268	4971376	8.769	19.673
9.544	3799765	6.702	15.036
11.862	1101472	1.943	4.359
14.356	9477542	16.717	37.504
19.457	25270482	44.572	100.000

Chromatogram GLC – frakcja I b



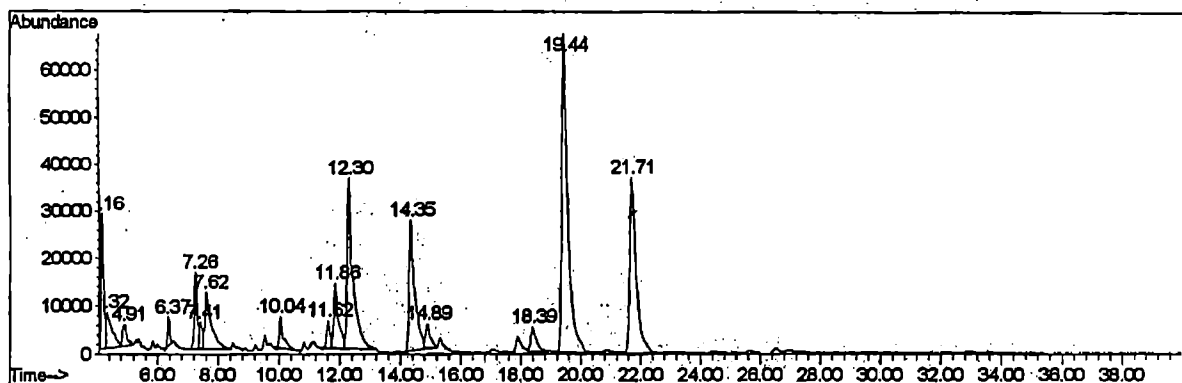
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.175	697682	12.649	41.143
4.881	267447	4.849	15.772
7.266	395699	7.174	23.335
7.756	335966	6.091	19.812
11.855	304603	5.522	17.963
12.294	451283	8.182	26.613
14.343	1046853	18.980	61.734
19.414	1695744	30.744	100.000
21.790	320411	5.809	18.895

Chromatogram GLC - frakcja I c



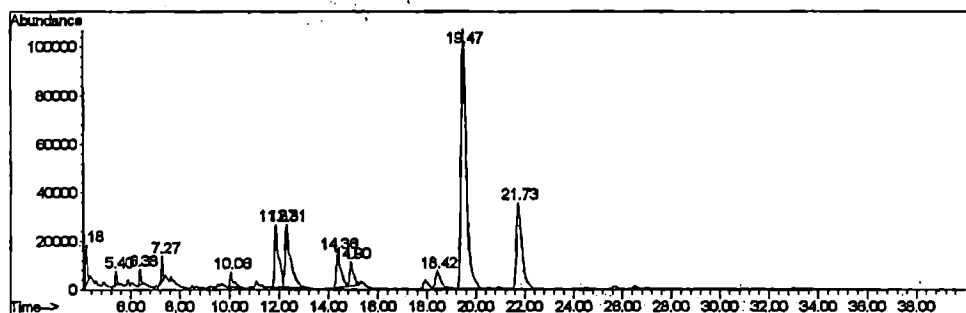
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.166	4634816	3.041	5.948
4.349	3054961	2.005	3.920
4.869	1282218	0.841	1.645
6.375	1117375	0.733	1.434
7.264	5028941	3.300	6.453
7.430	5722768	3.755	7.344
10.050	2672374	1.754	3.429
10.209	2781333	1.825	3.569
11.872	10062485	6.603	12.913
12.284	3288596	2.158	4.220
14.363	3194533	2.096	4.099
14.491	4102222	2.692	5.264
18.511	3102350	2.036	3.981
19.592	77927178	51.136	100.000
21.807	24418633	16.024	31.335

Chromatogram GLC - frakcja II a



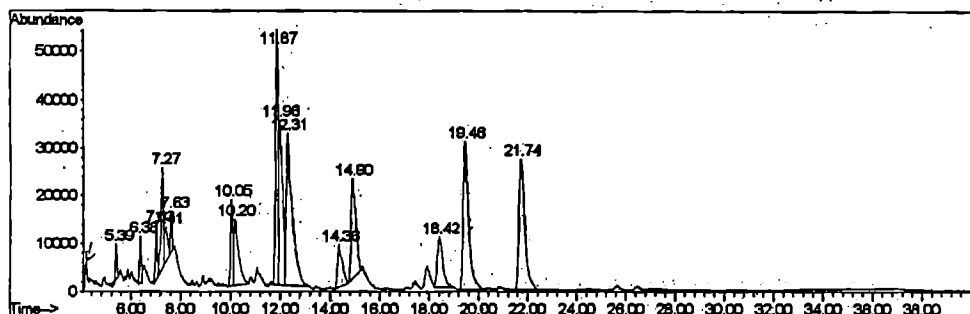
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.157	1611284	4.867	17.715
4.324	1015435	3.067	11.164
4.910	435060	1.314	4.783
6.367	259189	0.783	2.850
7.257	1055571	3.188	11.606
7.406	394123	1.190	4.333
7.616	1723425	5.205	18.948
10.038	595228	1.798	6.544
11.620	416314	1.257	4.577
11.855	1485997	4.488	16.338
12.298	4763030	14.386	52.367
14.346	3474573	10.495	38.201
14.894	581446	1.756	6.393
18.392	656560	1.983	7.219
19.443	9095404	27.472	100.000
21.714	5545452	16.750	60.970
		79	

Chromatogram GLC – frakcja III b



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
4.176	746595	2.193	4.805
5.396	212198	0.623	1.366
6.381	275165	0.808	1.771
7.272	492829	1.448	3.172
10.056	574049	1.686	3.695
11.873	2917538	8.571	18.779
12.306	3886862	11.419	25.018
14.362	1828913	5.373	11.772
14.902	1029910	3.026	6.629
18.425	1036864	3.046	6.674
19.470	15536320	45.643	100.000
21.727	5501765	16.163	35.412

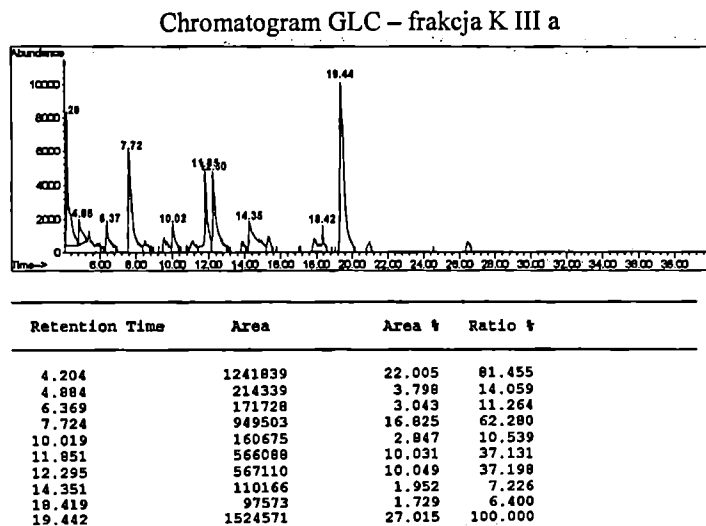
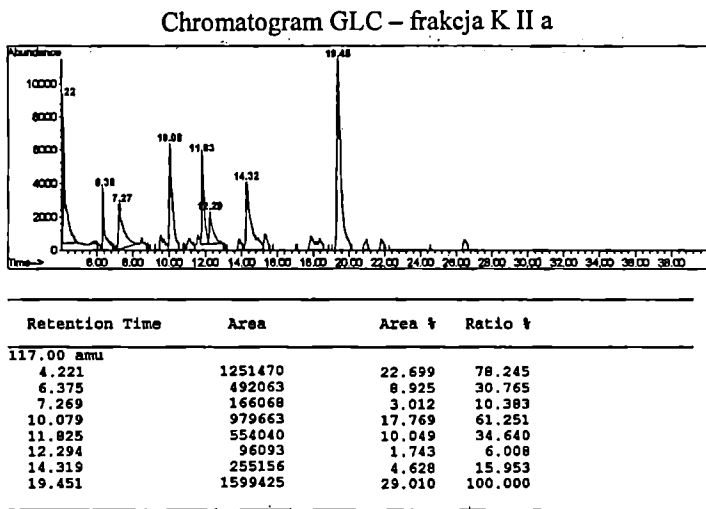
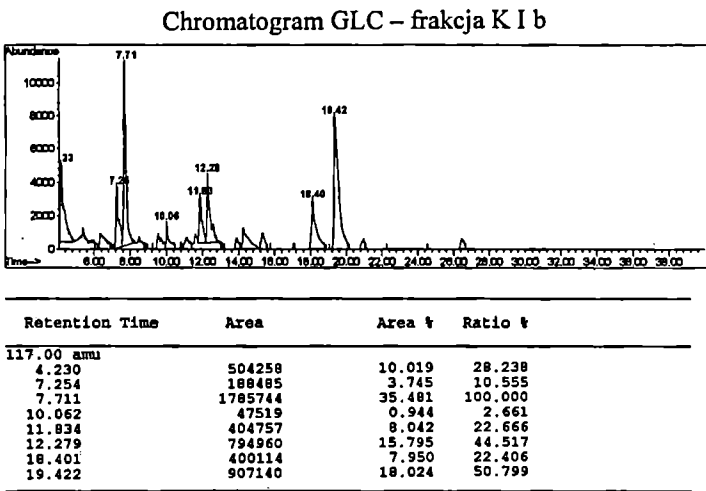
Chromatogram GLC – frakcja IV a



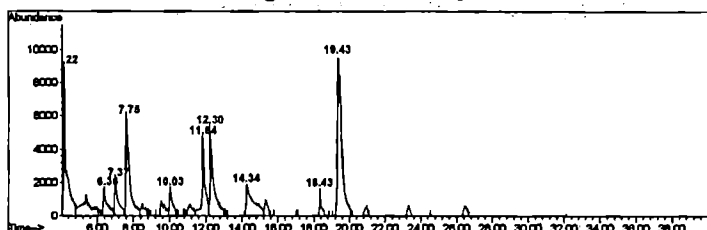
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
117.00 amu			
5.394	248566	0.728	4.643
6.378	496895	1.455	9.282
7.030	562390	1.646	10.505
7.268	1461642	4.279	27.303
7.409	609185	1.783	11.379
7.629	413428	1.210	7.723
10.052	1074922	3.147	20.079
10.196	1831708	5.362	34.216
11.872	3690371	10.803	68.935
11.965	3638531	10.651	67.966
12.306	5353437	15.671	100.000
14.359	1169436	3.423	21.845
14.903	2709684	7.932	50.616
18.415	1635148	4.787	30.544
19.458	4731065	13.849	88.374
21.741	4535025	13.275	84.712

Chromatogram GLC – frakcja V a

Ryc. 20. Analiza GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej

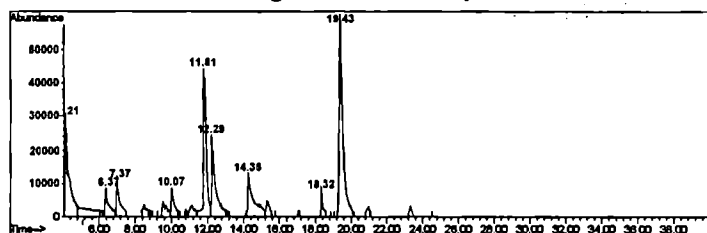


Chromatogram GLC – frakcja K IV a



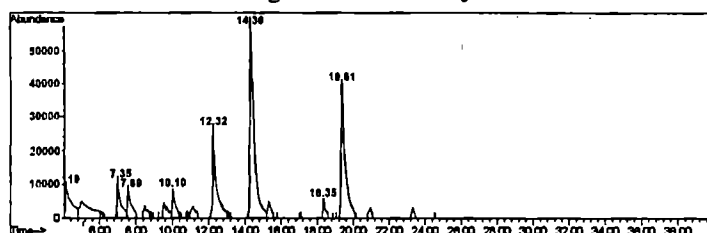
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
4.221	1472550	26.043	100.000
6.357	114726	2.029	7.791
7.374	285262	5.045	19.372
7.754	849102	15.017	57.662
10.031	224755	3.975	15.263
11.836	509002	9.002	34.566
12.301	680892	12.042	46.239
14.337	115242	2.038	7.826
18.430	98896	1.749	6.716
19.431	1296934	22.937	88.074

Chromatogram GLC – frakcja K V a



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
4.210	3131670	14.392	34.892
6.368	211638	1.009	2.358
7.374	837487	3.993	9.331
10.065	424892	2.026	4.734
11.814	3993660	19.042	44.496
12.293	2106687	10.045	23.472
14.351	842514	4.017	9.387
18.319	429738	2.049	4.788
19.425	8975323	42.795	100.000

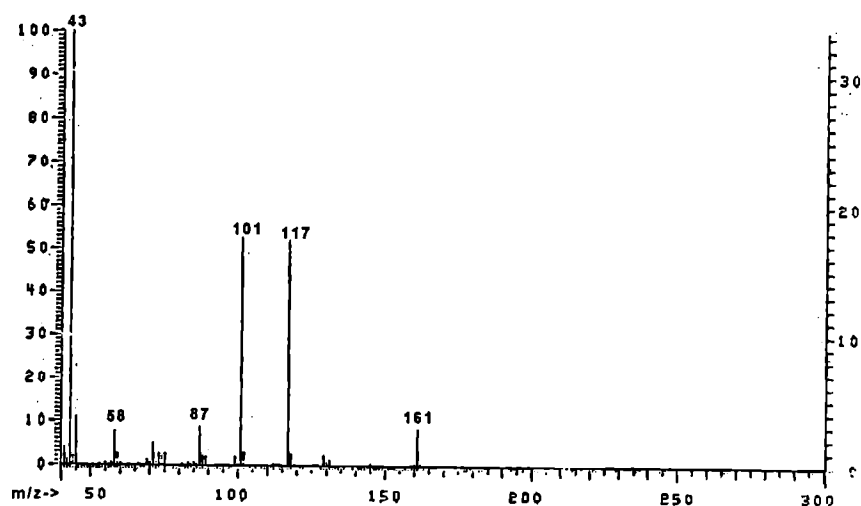
Chromatogram GLC – frakcja K VI a



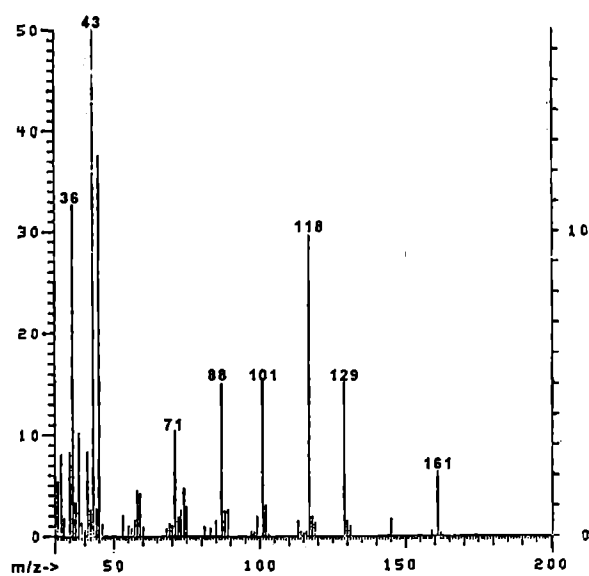
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
4.193	601369	2.895	6.578
7.352	837510	4.032	9.161
7.694	202498	0.975	2.215
10.103	625230	3.010	6.839
12.315	2701864	13.007	29.554
14.364	9142125	44.011	100.000
18.350	1003074	4.829	10.972
19.611	5611436	27.014	61.380

Ryc. 21. Przykładowe widma masowe częściowo zmetylowanych octanów alditoli

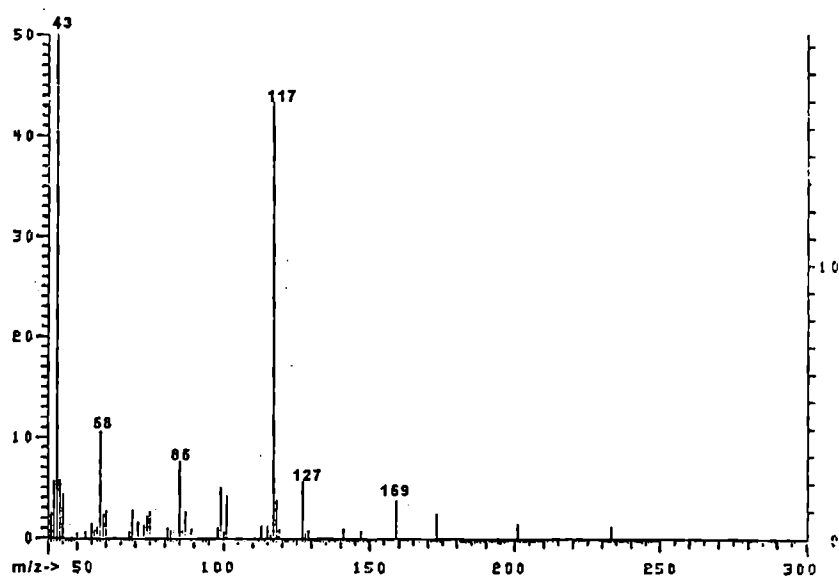
1,5-di-O-acetylo-2,3,4-tri-O-metyloarabitol



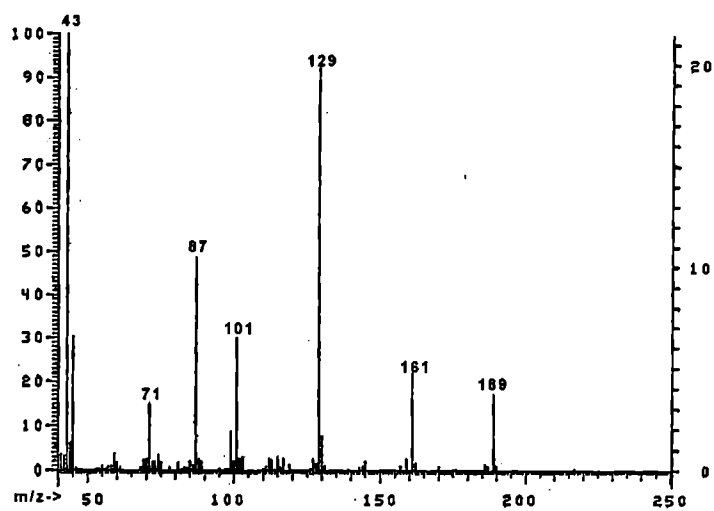
1,4-di-O-acetylo-2,3,5-tri-O-metyloarabitol



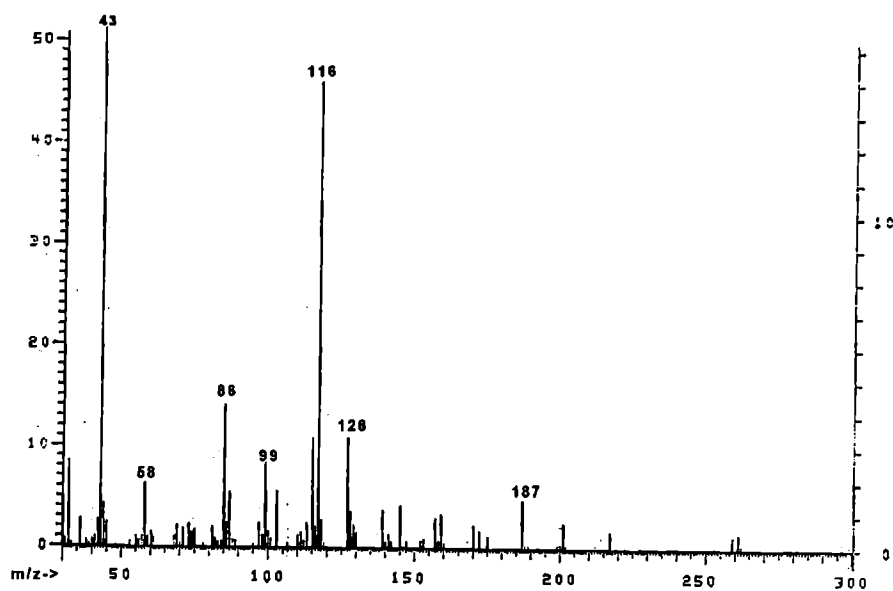
1,3,5-tri-O-acetylo-2,4-di-O-metyloarabitol



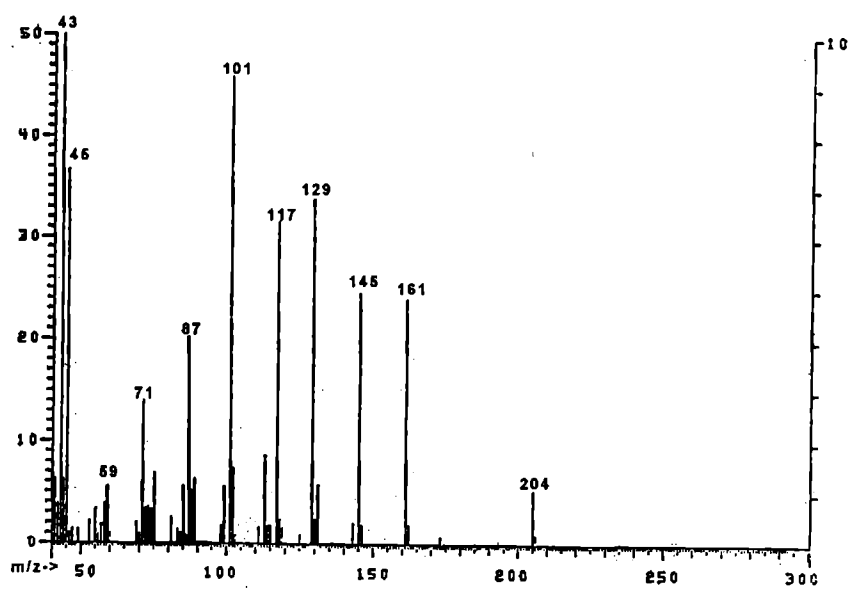
1,2,4-tri-O-acetylo-3,6-di-O-metyloarabitol



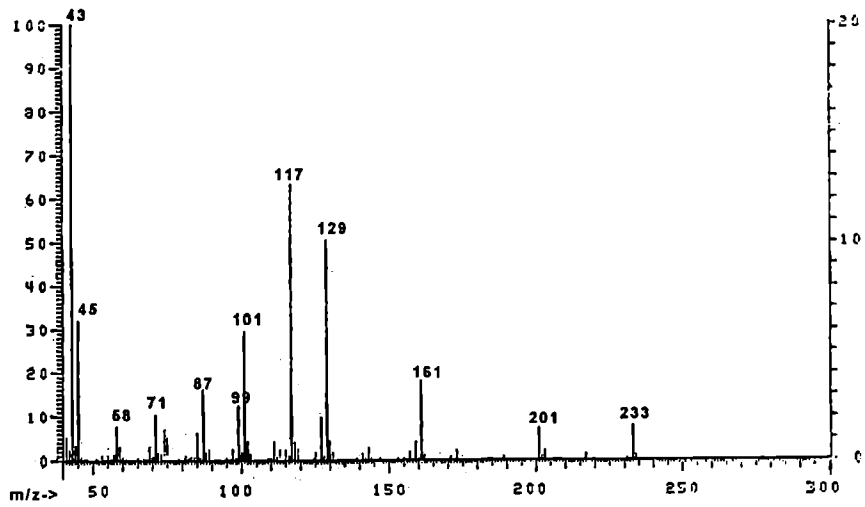
1,3,4,5-tetra-O-acetylo-2-O-metyloarabitol



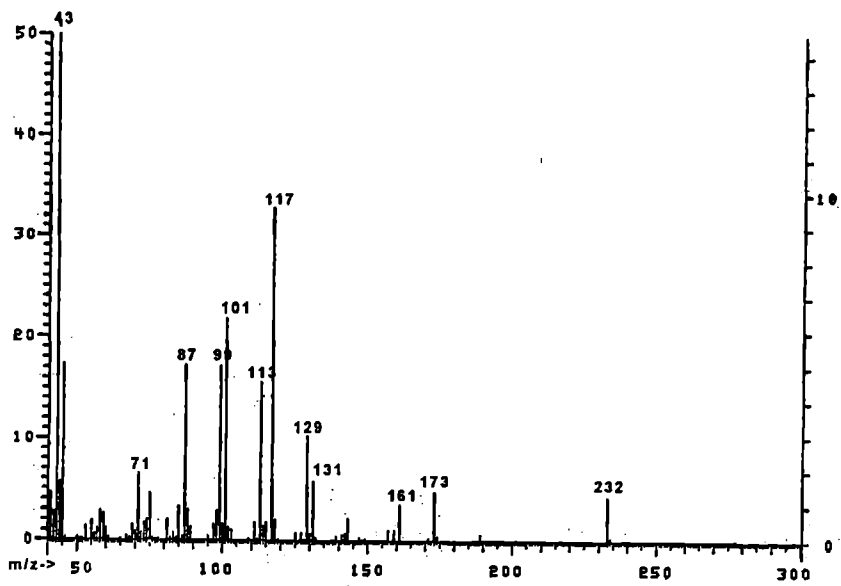
1,5-di-O-acetylo-2,3,4,6-tetra-O-metylogalakcitol



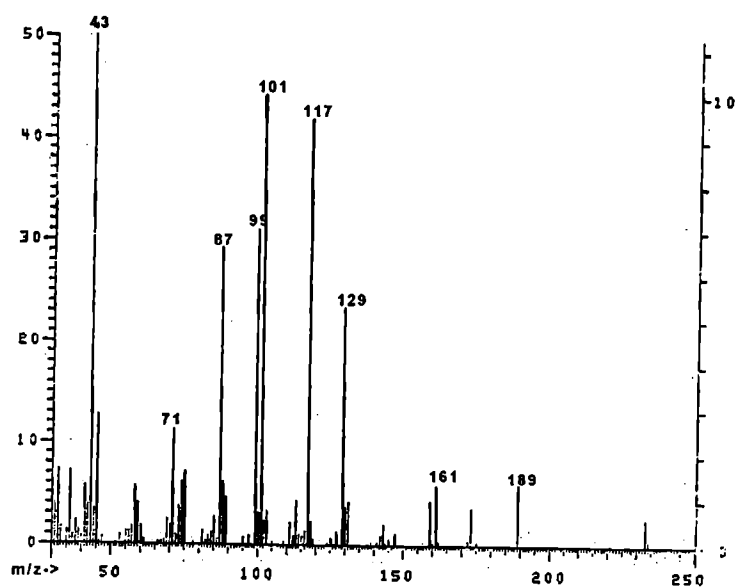
1,3,5-tri-O-acetylo-2,4,6-tri-O-metylogalakitol



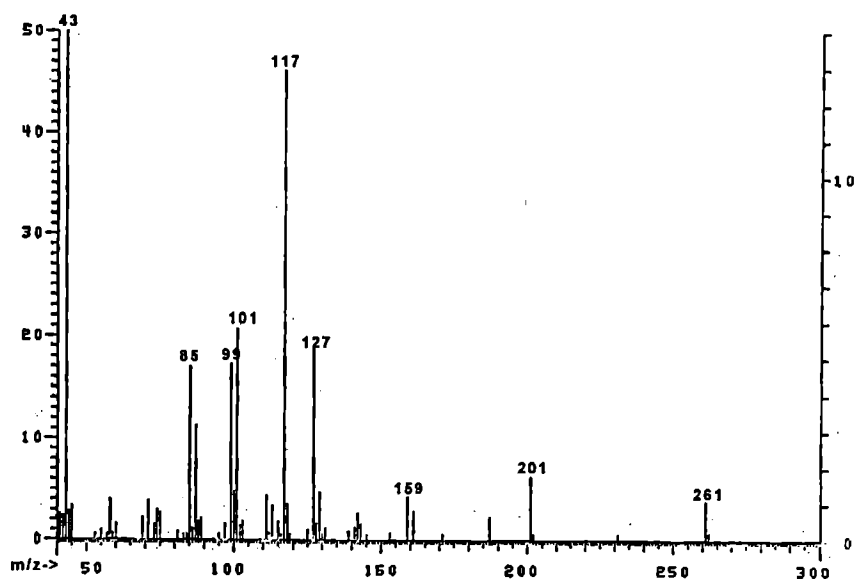
1,4,5-tri-O-acetylo-2,3,6-tri-O-metylogalakitol



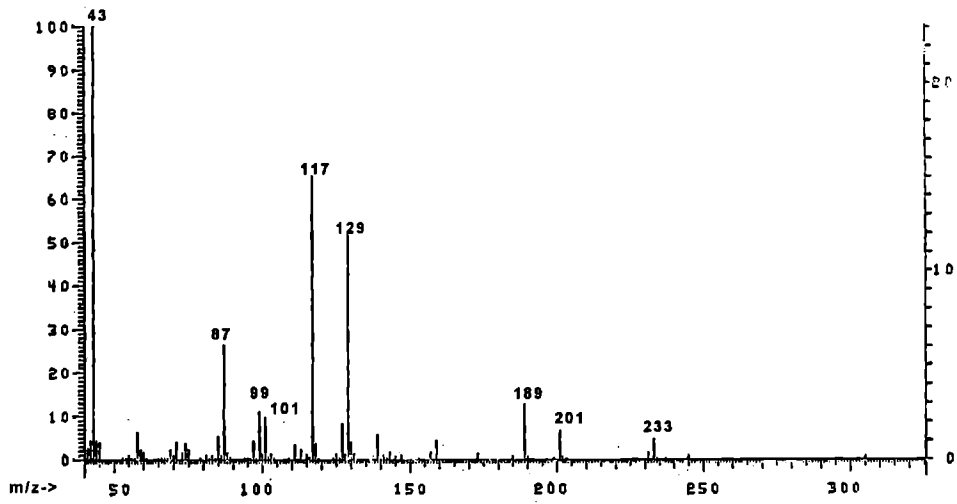
1,5,6-tri-O-acetylo-2,3,4-tri-O-metylogalakcitol



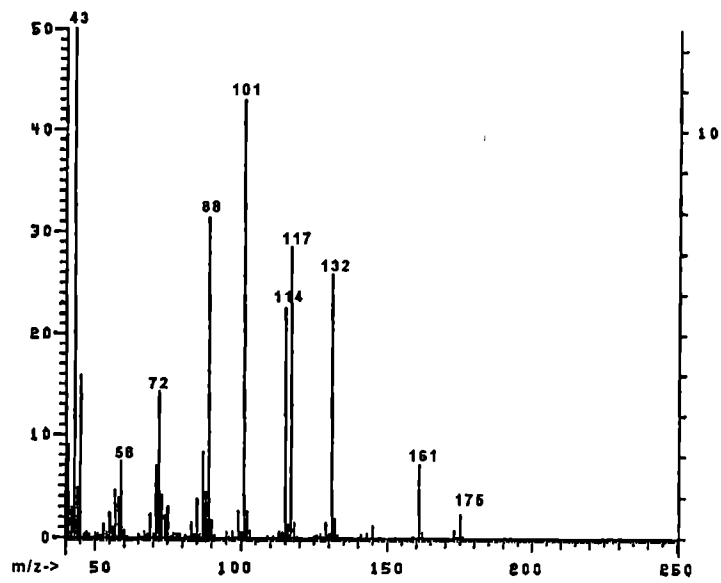
1,4,5,6-tetra-O-acetylo-2,3-di-O-metylogalakcitol



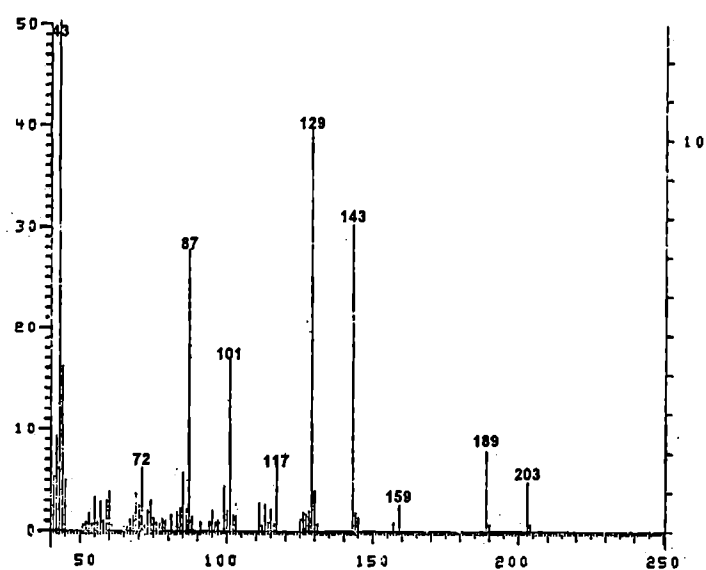
1,3,5,6-tetra-O-acetylo-2,4-di-O-metylogalakcitol



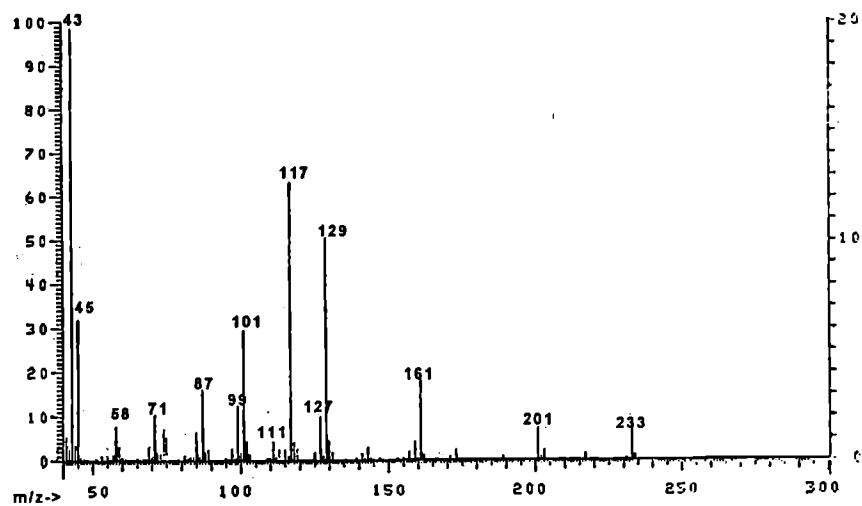
1,5-di-O-acetylo-6-dezoksy-2,3,4-tri-O-metyloheksitol



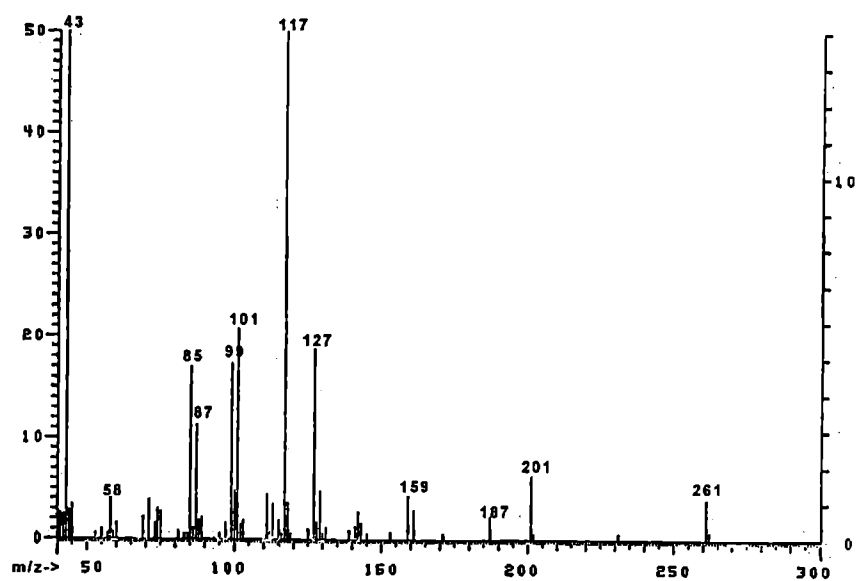
1,2,4,5-tetra-O-acetylo-6-dezoksy-3-O-metyloheksitol



1,3,5-tri-O-acetylo-2,4,6-tri-O-metyloglucitol



1,4,5,6-tetra-O-acetylo-2,3-di-O-metyloglucitol



8. Wykaz rycin, tabel i skrótów użytych w tekście

Spis rycin

Ryc. 1. Występowanie miodownika melisowatego w Europie – bez uwzględnienia podgatunków (Meusel, 1978)	10
Ryc. 2. Rozmieszczenie stanowisk <i>Melittis melissophyllum</i> L. na terenie Polski - według danych na rok 1998 (Zajac, Zajac, manuskrypt).....	10
Ryc. 3. Rozmieszczenie <i>Melittis melissophyllum</i> L. na terenie dawnego woj. krakowskiego (Zajac, Zajac, 1998) • stanowiska aktualne × stanowiska historyczne	11
Ryc. 4. Struktury tworzone przez polisacharydy (wg.: Aspinall, 1970)	23
Ryc. 5. Porównanie wartości średnich wskaźnika W_p dla wariantów pożywek H, K-P	60
Ryc. 6. Profil wymywania z kolumny DEAE Sephacel polisacharydów wyizolowanych z ziela	70
Ryc. 7. Profil wymywania z kolumny DEAE Sephacel polisacharydów wyizolowanych z tkanki kalusowej.....	70
Ryc. 8. Chromatografia kolumnowa GPC frakcji I, II, III, IV, V (polisacharydy wyizolowane z ziela).....	73
Ryc. 9. Chromatografia kolumnowa GPC frakcji K I, K II, K III, K IV, K V, K VI, K VII (polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej).....	75
Ryc. 10. Wyznaczenie krzywej wzorcowej dla standardowych dekstranów	78
Ryc. 11. Kwasy uronowe – krzywa wzorcowa (dla frakcji polisacharydowych wyizolowanych z ziela).....	81
Ryc. 12. Kwasy uronowe – krzywa wzorcowa (dla frakcji polisacharydowych wyizolowanych z tkanki kalusowej)	81
Ryc. 13. Otrzymywanie częściowo zmetylowanych octanów alditoli (wg. Jansson et al., 1976; zmodyfikowane)	88
Ryc. 14. Krzywa wzorcowa – oznaczanie zawartości cukrów.....	94
Ryc. 15. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy pochodnych wzorcowych cukrów prostych (dla frakcji wyizolowanych z ziela)	114
Ryc. 16. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z ziela	121
Ryc. 17. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy pochodnych cukrów prostych (dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej): galaktozy, glukozy, mannozy. Pozostałe wzorce analogiczne, jak dla frakcji z ziela.	126
Ryc. 18. Analiza GLC octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej.....	129
Ryc. 19. Analiza GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z ziela.....	133
Ryc. 20. Analiza GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli – chromatogramy dla frakcji wyizolowanych z tkanki kalusowej	137
Ryc. 21. Przykładowe widma masowe częściowo zmetylowanych octanów alditoli	139

Spis tabel

Tab. 1. Cechy morfologiczne <i>Melittis melissophyllum</i> L. - różnice między podgatunkami (Tutin et al., 1972)	9
Tab. 2. Przykłady nowych związków znalezionych w kulturach <i>in vitro</i> , które nie są wytwarzane w tkankach odpowiednich gatunków roślin gruntowych (wg.: Berlin, 1988)	20
Tab. 3. Wybrane przykłady metabolitów wtórnych wytwarzanych w kulturach tkankowych w ilościach równych lub większych niż w roślinie gruntowej (wg.: Endress, 1994 – zmodyfikowane).....	20
Tab. 4. Podstawowe klasy polisacharydów występujące w roślinach wyższych, glonach i grzybach (wg.: Harborne, 1973).....	25
Tab. 5. Polisacharydy wyizolowane z grzybów o aktywności immunostymulującej i przeciwnowotworowej – przykłady (wg.: Kohlmünzer, 1988; Franz, 1989).....	28
Tab. 6. Budowa i właściwości biologiczne polisacharydów wyizolowanych z glonów i porostów – przykłady. ..	30
Tab. 7. Przykłady polisacharydów wyizolowanych z roślin wyższych: budowa, aktywność biologiczna.	38
Tab. 8. Biosynteza polisacharydów w kulturach <i>in vitro</i> roślin wyższych – przykłady.	44
Tab. 9. Modyfikacje pożywki podstawowej MS stosowane w kulturze <i>in vitro</i> <i>Melittis melissophyllum</i> L.	51
Tab. 10. Czas wzrostu tkanki kalusowej.....	52
Tab. 11. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l i Kin – 0,1 mg/l (wariant H) dla serii I–V	52
Tab. 12. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej BAP – 1 mg/l, NAA – 0,5 mg/l i GA ₃ – 0,25 mg/l (wariant P) dla serii I–V	53
Tab. 13. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l i Kin – 0,5 mg/l (wariant K) dla serii I–V	54
Tab. 14. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin – 0,5 mg/l, m-in. – 0,5 g/l i kaz. – 0,5 g/l (wariant L) dla serii I–V	55
Tab. 15. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin. – 0,5 mg/l i m-in. – 0,5 g/l (wariant M) dla serii I–V	56
Tab. 16. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 1 mg/l, Kin. – 0,5 mg/l i kaz. – 0,5 g/l (wariant N) dla serii I–V	57
Tab. 17. Wartości wskaźników przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D – 0,5 mg/l, BAP – 1 mg/l (wariant O) dla serii I–V	58
Tab. 18. Porównanie przyrostu tkanki kalusowej (W_p) na pożywkach H, K–P. (Opis pożywek zob. Tab. 9)	59
Tab. 19. Analiza wariancji wskaźnika przyrostu tkanki kalusowej dla pożywek H, K–P	59
Tab. 20. Łączenie frakcji wyeluowanych z kolumny DEAE-Sephacel	71
Tab. 21. Frakcje uzyskane po rozdziale surowych polisacharydów na kolumnie DEAE Sephacel.....	71
Tab. 22. Łączenie frakcji wyeluowanych z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z ziela.....	72
Tab. 23. Łączenie frakcji polisacharydów wyeluowanych z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z tkanki kalusowej.....	72
Tab. 24. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – wzorcowe dekstrany	78
Tab. 25. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z ziela	79
Tab. 26. Frakcje wyeluowane z kolumny Sephacryl S-300 – polisacharydy z tkanki kalusowej	79
Tab. 27. Wartości absorpcji dla różnych stężeń roztworu wzorcowego kwasu galakturonowego	80
Tab. 28. Zawartość kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych - polisacharydy wyizolowane z ziela	82
Tab. 29. Zawartość kwasów uronowych we frakcjach kwaśnych - polisacharydy wyizolowane z tkanki kalusowej.....	82
Tab. 30. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z ziela – stosunki molowe cukrów prostych i kwasów uronowych (mol %).....	84
Tab. 31. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z tkanki kalusowej – stosunki molowe cukrów prostych i kwasów uronowych (mol %).....	84
Tab. 32. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z tkanki kalusowej – stosunki molowe cukrów prostych i kwasu galakturonowego (mol %) – z uwzględnieniem typów wiązań (na podstawie analizy GLC-MS)	90
Tab. 33. Frakcje polisacharydowe wyizolowane z ziela – stosunki molowe cukrów prostych i kwasu galakturonowego (mol %) – z uwzględnieniem typów wiązań (na podstawie analizy GLC-MS)	91
Tab. 34. Wartości absorpcji dla różnych stężeń roztworu wzorcowego	95
Tab. 35. Zawartość cukrów we frakcjach polisacharydowych wyizolowanych z ziela	95
Tab. 36. Zawartość cukrów we frakcjach polisacharydowych wyizolowanych z tkanki kalusowej	95
Tab. 37. Zestawienie czasów retencji dla analizy GLC częściowo zmetylowanych octanów alditoli.....	132

Spis skrótów

ARA	pochodna arabinozy (analiza GLC octanów alditoli)
BAP	6-benzyloaminopuryna
2,4-D	kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
Dim syl-K	karboanion metylosulfinylowy połączony z kationem potasowym. Występuje w mieszaninie metylującej (zob. rozdz. 3.2.7.2.2)
GA ₃	kwas giberelinowy
GAL	pochodna galaktozy (analiza GLC octanów alditoli)
GLU	pochodna glukozy (analiza GLC octanów alditoli)
IAA	kwas indoliloctowy
kaz.	kazeina
Kin	kinetyna
KSY	pochodna ksylozy (analiza GLC octanów alditoli)
MAN	pochodna mannozy (analiza GLC octanów alditoli)
m-in.	mezoinozytol
M_p	masa początkowa [g]; masa pasażowanego kalusa (masa inokulum)
M_k	masa końcowa [g]; masa kalusa po określonym okresie wzrostu (4–5 tygodni)
MS	pożywka podstawowa wg Murashige i Skoog’a (Murashige, Skoog, 1962)
NAA	kwas α -naftalenoctowy
RAM	pochodna ramnozy (analiza GLC octanów alditoli)
σ_{W_p}	odchylenie standardowe wielkości W_p
t	statystyka t -Studenta
$t_{1-\alpha, f-1}$	wartość krytyczna statystyki t -Studenta przy poziomie istotności α i liczbie stopni swobody f
—	warianty pożywki MS – skład opisany w tabeli Tab.9
W_p	wskaźnik przyrostu tkanki kalusowej
$\overline{W_p}$	średni wskaźnik przyrostu tkanki kalusowej
$\overline{W}_{p(I-V)}$	średni wskaźnik przyrostu tkanki kalusowej dla serii I–V