

Received: 2013.02.04
Accepted: 2013.08.25
Published: 2013.12.30

Roślinne i mikrobiologiczne źródła przeciwutleniaczy*

Plant and microbial sources of antioxidants

Izabela Agnieszka Stolarzewicz¹, Jakub Ciekot², Agata Urszula Fabiszewska¹,
Ewa Białecka-Florjańczyk¹

¹Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

W ostatnich latach systematycznie wzrasta zainteresowanie substancjami o właściwościach przeciwutleniających, które obniżają lub zapobiegają szkodliwemu wpływowi wolnych rodników na żywe tkanki, hamując m.in. proces starzenia oraz rozwój niektórych chorób. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu nowych metod pozyskiwania przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego oraz tendencji badawczych w kierunku zwiększania ich ogólnej jakości i opłacalności produkcji na skalę przemysłową. Wśród omawianych zagadnień znalazły się metody z wykorzystaniem narzędzi inżynierii genetycznej roślin i mikroorganizmów. W pracy przedstawiono również krótką charakterystykę antyoksydantów oraz naturalne źródła ich występowania.

Ze względu na to, że szlaki biosyntezy flawonoidów i izoflawonoidów są prawdopodobnie najlepiej poznanymi szlakami biosyntezy naturalnych produktów roślinnych, przegląd osiągnięć ostatnich lat w zakresie inżynierii metabolicznej omówiono na przykładzie związków flawonowych. Przedstawione modyfikacje szlaków biosyntezy flawonoidów dotyczyły zmian w poziomie ekspresji genów strukturalnych lub regulacyjnych, wyciszania genów konkurencyjnych lub też modyfikacji właściwości katalitycznych enzymów za pomocą technik inżynierii białek. W pracy przedstawiono także dokonania inżynierii mikroorganizmów w zastosowaniu procesów fermentacyjnych jako źródła specyficznych związków flawonowych, poprzez konstrukcję szlaku biosyntezy fenylpropanoidów w komórkach drobnoustrojów, takich jak bakterie *E. coli* czy drożdże piekarskie *S. cerevisiae*. Oba podejścia mogą znaleźć zastosowanie w produkcji flawonoidów atrakcyjnych pod względem aplikacyjnym.

Słowa kluczowe: przeciwutleniacze • flawonoidy • inżynieria genetyczna

Summary

In recent years there has been growing interest in substances with antioxidative properties, which reduce or prevent harmful effects of free radicals on living tissues, and inhibit aging processes and the development of certain diseases. The objective of this paper is to review new methods of obtaining antioxidants of plant origin and new trends in research aiming to improve their quality and profitability on an industrial scale. Among the issues discussed, there are the methods that use techniques of plant and microbial genetic engineering. A brief description of antioxidants and natural sources of their occurrence is also presented in this paper.

In view of the fact that the biosynthesis of flavonoids and isoflavonoids is probably the best-known

*Praca wykonana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N209 107639.

	metabolic pathway of natural plant products, the review of achievements of recent years in the field of metabolic engineering was shown with the example of flavonoids. The modifications of flavonoid biosynthetic pathways were related to changes in the expression level of structural or regulatory genes, silencing of competitive genes or modifying catalytic properties of enzymes using techniques of protein engineering. The paper also presents the achievements of microorganism engineering in the field of application of fermentation processes as a source of specific flavonoid compounds, which was possible by designing the phenylpropanoid biosynthetic pathway in cells of microorganisms such as the bacterium <i>E. coli</i> or <i>S. cerevisiae</i> , baker's yeast. Both approaches can be used in the production of flavonoids attractive in terms of application.
Key words:	antioxidants • flavonoids • genetic engineering
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1083019
Word count:	4623
Tables:	3
Figures:	7
References:	85

Adres autorki: mgr inż. Agata Fabiszewska, Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; e-mail: agata.fabiszewska@zhp.net.pl

WSTĘP

Tlen jest niezbędny do życia wszystkim tlenowym organizmom żywym, ale od kilku dziesięcioleci wiadomo także, że gdy jego stężenie w organizmie jest zbyt wysokie, może stać się toksyczny dla komórek żywych. Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym jest stosunkowo nieaktywna chemicznie, ale może być źródłem reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak: tlen singletowy (1O_2), anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy (OH), nadtlenek wodoru (H_2O_2) itp. [47].

Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz reaktywne formy azotu (RFA) spełniają ważne funkcje fizjologiczne w warunkach homeostazy. Uwalniane w niskich stężeniach pełnią rolę regulatorów i mediatorów wielu reakcji w komórce, np.: regulują odpowiedź komórkową na szkodliwe czynniki zewnętrzne, biorą udział w prawidłowym funkcjonowaniu szlaków sygnałowych, indukują działanie czynników mitogennych [72], a także regulują procesy starzenia i apoptozy oraz biorą udział w prawidłowej odpowiedzi immunologicznej [14]. Wymienione funkcje zależą jednak w dużej mierze od prawidłowego stosunku między samymi RFT i RFA, a złożonymi systemami antyoksydacyjnymi. W chwili zachwiania tej równowagi wzrasta poziom czynników utleniających w komórkach, co prowadzi do tzw. stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny wywołany jest przez tleno- i azotopochodne rodniki (reaktywne cząsteczki chemiczne zawierające niesparowane elektrony) powstające w wyniku metabolizmu komórki, głównie podczas oddychania komórkowego zachodzącego w mitochondriach. Stan ten może prowadzić do uszkodzeń organelli komórkowych [54], uszkodzenia cząsteczek DNA oraz zaburzeń w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych [36].

Rodniki mogą być generowane zarówno poprzez czynniki egzogenne, w tym na przykład: promieniowanie jonizujące, ksenobiotyki, toksyny zawarte w powietrzu oraz czynniki endogenne: oddychanie komórkowe, „wybuchy tlenowe” fagocytów podczas procesu zapalnego i inne [6]. Szczególną uwagę badaczy skupia grupa reaktywnych form tlenu, których nadmierne wytwarzanie ma największy udział w powstawaniu stresu oksydacyjnego i związanych z nim stanów chorobowych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroby nowotworowe, miażdżycę tętnic [47], a także zawał mięśnia sercowego oraz choroby neurodegeneracyjne [36]. Wspomniane wyżej reaktywne formy tlenu, czyli anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru oraz rodnik hydroksylowy powstają w procesie redukcji tlenu cząsteczkowego w mitochondriach [6].

W odpowiedzi na wzrastające zagrożenie komórek organizmów żywych ze strony rodników został wykształcony antyoksydacyjny mechanizm obronny, który dzieli się zasadniczo na dwa systemy: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Mechanizm enzymatyczny opiera się na enzymach antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa i katalaza, natomiast na system nieenzymatyczny składają się niskocząsteczkowe przeciwutleniacze: kwas askorbinowy, α -tokoferol, glutation, karotenoidy, flawonoidy i inne [73].

Rośliny i zwierzęta utrzymują w swoich komórkach środowisko redukujące za pomocą przeciwutleniaczy, które neutralizują rodniki, przekształcając je w mniej aktywne pochodne, opóźniając lub zatrzymując całkowicie proces utleniania. Przeciwutleniacze pełnią rolę

inhibitorów procesu utleniania, stąd bierze się ich znacząca rola w walce o przywrócenie i utrzymanie homeostazy organizmu [47]. Nauki o żywności definiują antyoksydant jako substancję, której obecność w niskich stężeniach, w porównaniu do substratu podatnego na utlenianie, znacząco obniża lub zapobiega szkodliwemu wpływowi wolnych rodników na ludzkie tkanki [29].

KLASYFIKACJA PRZECIWUTLENIACZY I CHARAKTERYSTYKA ICH DZIAŁANIA

Termin „przeciwutleniacz” może odnosić się do każdej cząsteczki zdolnej do związania rodnika, zanim dojdzie do uszkodzenia komórki [58]. Możemy wyróżnić przeciwutleniacze enzymatyczne (endogenne) i nieenzymatyczne (egzogenne). Główną rolę w obronie organizmu przed rodnikami, a przez to w utrzymaniu homeostazy, pełnią przeciwutleniacze pochodzenia endogenne [67].

Niezależnie od poprzedniego podziału związki o właściwościach przeciwutleniających można sklasyfikować „alfabetycznie” w dziewięciu kategoriach (tab. 1) w zależności od ich struktury, występowania, rozpuszczalności (w wodzie i tłuszczach) oraz kinetyki reakcji, w których biorą udział [17].

Przeciwutleniacze enzymatyczne

Główną rolę w zwalczaniu wolnych rodników w organizmie pełnią przeciwutleniacze endogenne, najczęściej enzymy. Jednym z najwydajniejszych przeciwutleniaczy enzymatycznych jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1), która katalizuje reakcję rozkładu anionorodników ponadtlenkowych do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru. Występuje ona w kilku izoformach, które różnią się od siebie m.in. budową centrum aktywnego czy obecnością różnych kofaktorów [41].

Kolejnym enzymem jest katalaza (EC 1.11.1.6) występująca w peroksysomach komórek roślin, zwierząt oraz bakterii tlenowych i odpowiadająca za rozkład nadtlenu wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody. Reakcje z jej udziałem charakteryzują się dużą szybkością – jedna cząsteczka katalazy może przekształcić nawet 6 milionów cząsteczek nadtlenu wodoru w ciągu minuty [40].

Następnym ważnym elementem systemu chroniącego komórkę przed atakiem wolnych rodników są reakcje związane z metabolizmem glutationu (GSH), w których uczestniczy peroksydaza glutationowa (GPx), występująca w dwóch izoformach: selenozależnej (EC 1.11.1.19, dye decolorizing peroxidase) i selenoniezależnej (EC 2.5.1.18, glutathione transferase). W obecności glutationu enzym ten katalizuje przeniesienie dwóch elektronów na cząsteczkę nadtlenu wodoru, w wyniku czego dochodzi do rozkładu nadtlenu do cząsteczki wody oraz do utlenienia cząsteczek glutationu (GSH) [40].

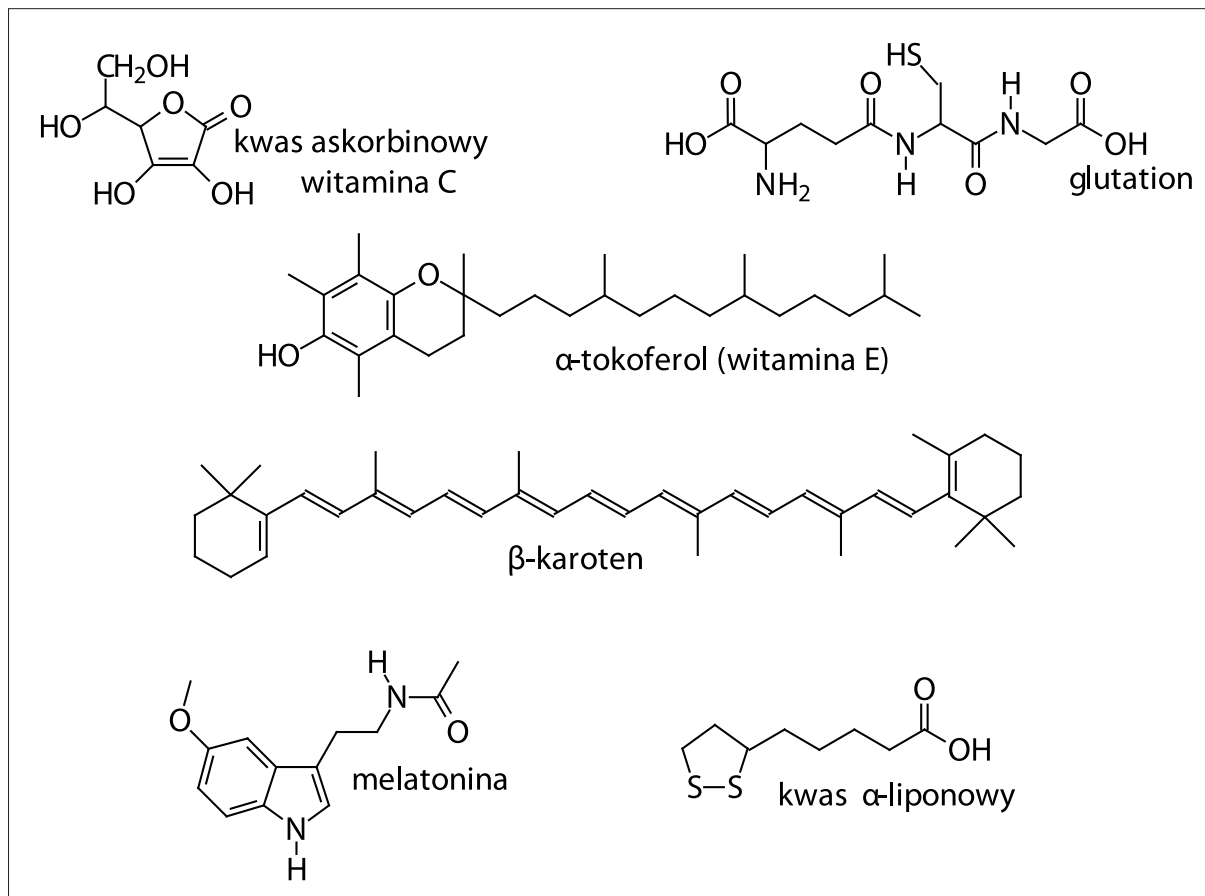
Zarówno katalaza jak i peroksydaza są enzymami wykorzystującymi jako substrat nadtlenek wodoru, jednak to peroksydaza glutationowa jest dominującym czynnikiem w enzymatycznej ochronie przeciwrodnikowej [9].

Przeciwutleniacze nieenzymatyczne

Działanie przeciwutleniaczy enzymatycznych wspomaga grupa małocząsteczkowych związków nieenzymatycznych, głównie metabolitów wtórnych (drugorzędowych), wykazujących właściwości przeciwutleniające. Do tej grupy należą m.in. witamina C, witamina E, glutation, kwas α -liponowy, melatonina, karotenoidy oraz flawonoidy. Część przeciwutleniaczy, które szczególnie łatwo ulegają utlenieniu, może wchodzić w reakcję z innymi antyoksydantami, przywracając ich pierwotne właściwości np. witamina C wzmacnia działanie witaminy E, tworząc tzw. „sieć przeciwutleniaczy” [60,67].

Tabela 1. Klasyfikacja alfabetyczna przeciwutleniaczy [17]

Nazwa alfabetycznie Przeciwutleniacz	Grupy przeciwutleniaczy	Przykłady
C	karotenoidy	β -karoten, likopen, luteina, zeaksantyna
E	enzymy	dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa
G	glutation	glutation
H	hormony	melatonina, estrogen
L	związki chemiczne związane z tłuszczami	Ubichinon 10, acetylocysteina, kwas liponowy
M	metale	cynk, selen, miedź
P	związki fenolowe	kwercetyna, katechiny
S	saponiny, steroidy	kortyzon, estradiol, estriol
V	witaminy	α -tokoferol, kwas askorbinowy



Ryc. 1. Przeciwutleniacze nieenzymatyczne

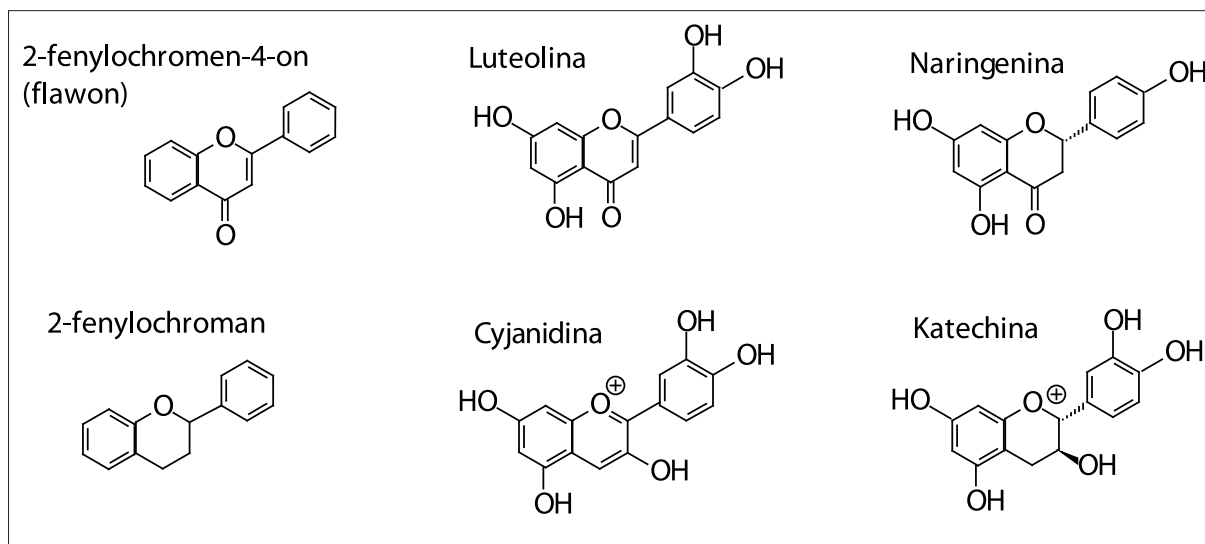
Witamina C (kwask askorbinowy, ryc. 1) jest rozpuszczalnym w wodzie przeciwutleniaczem o dużej efektywności działania. W walce z rodnikami współdziała z witaminą E i karotenoidami [58], biorąc udział w regeneracji α -tokoferolu, redukując jego utlenioną postać znajdującą się w błonach komórkowych oraz lipoproteinach [38]. Ponadto podnosi stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu, który chroni grupy tiolowe białek przed utlenianiem [52]. Dzięki szybkiemu transferowi elektronów witamina C zmiata RFT (reaktywne formy tlenu), zapobiegając utlenianiu lipidów [32].

Witamina E występuje w ośmiu izoformach, z których najbardziej aktywną, spotykaną u ludzi, jest związany z błoną komórkową α -tokoferol (ryc. 1) [25]. Głównym zadaniem witaminy E jest ochrona komórki przed utlenianiem lipidów [56]. Mechanizm tej reakcji polega na przenoszeniu atomu wodoru z cząsteczki α -tokoferolu na cząsteczkę tłuszczu. Powstaje wówczas postać utleniona α -tokoferolu, która może zostać zredukowana przez kwask askorbinowy [38].

Najważniejszym i powszechnie występującym w komórkach nieenzymatycznym przeciwutleniaczem jest glutation (GSH, ryc. 1). Jest to tripeptyd zbudowany z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, występujący w cy-

tosolu, jądrze komórkowym i mitochondriach [48]. Ze względu na budowę zalicza się go do przeciwutleniaczy tiolowych, które swoje antyoksydacyjne właściwości zawdzięczają obecności grupy -SH w cząsteczce [34]. Glutation jest kofaktorem enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków, ponadto uczestniczy w transporcie aminokwasów przez błony, zmiata rodniki wodorotlenowe oraz redukuje witaminy C i E do ich aktywnych form [48]. Utleniona cząsteczka glutationu (GSSG) jest akumulowana w komórkach, stąd stosunek postaci zredukowanej glutationu (GSH) do utlenionej (GSSG) jest dobrym wyznacznikiem stresu oksydacyjnego [14].

Kolejnym przeciwutleniaczem tiolowym jest kwask α -liponowy (LA, ryc. 1). Ze względu na rozpuszczalność w wodzie oraz w tłuszczach kwask ten występuje w błonach oraz cytosolu komórek prokariotycznych i eukariotycznych. Kwask α -liponowy łatwo wchłania się z pożywieniem i jest szybko przekształcany w postać zredukowaną – kwask dihydroliponowy (DHLA) [68]. Obie postaci są silnymi przeciwutleniaczami, które zmiatają rodniki, chelatują jony metali, redukują inne przeciwutleniacze, a także przywracają białkom funkcjonalność, utraconą na skutek stresu oksydacyjnego [45,51].



Ryc. 2. Flawonoidy – ogólna struktura i przykłady

Następnym antyutleniaczem nieenzymatycznym, o szerokim zakresie działania w organizmie jest neurohormon melatonina (ryc. 1), której wytwarzaniem kieruje szyszynka. Jedną z najważniejszych funkcji tego neurohormonu jest ochrona organizmu przed uszkodzeniami DNA, błon komórkowych i białek [57]. Melatonina w odróżnieniu od pozostałych przeciwutleniaczy nie ulega regeneracji [39], stąd bywa nazywana przeciwutleniaczem „samobójcą” lub przeciwutleniaczem końcowym [70].

Dużą grupę antyoksydantów stanowią karotenoidy, mogące przeciwdziałać lub hamować rozwój niektórych nowotworów, miażdżycy czy chorób degeneracyjnych mięśni [17]. Funkcja przeciwutleniająca tej grupy związków wynika z obecności w ich strukturze sprzężonego układu wiązań podwójnych (β -karoten, ryc. 1). Taka budowa sprzyja delokalizacji niesparowanych elektronów w łańcuchu [49], dzięki czemu karotenoidy są zdolne do „wyłapywania” tlenu singletowego oraz do reagowania z rodnikami nadtlenkowymi, wodorotlenowymi i ponadtlenkowymi. Ponadto wykazują działanie przeciwproliferacyjne [17].

Ostatnią opisywaną grupę przeciwutleniaczy stanowią flawonoidy, których podstawowy szkielet opiera się na strukturze 2- lub 3-fenylchromen-4-onu albo 2-fenylchromanu (ryc. 2) [4]. Zależnie od modyfikacji strukturalnych w tej grupie związków rozróżniamy flawony (luteolina), flawanony (hesperetina), izoflawony (genisteina), flawonole (kwercytyna), flawanole, (katechina) i antocyjanidyny (delfinidyna) [4], przy czym te dwie ostatnie grupy flawonoidów zawierają szkielet bez grupy ketonowej w pozycji 4.

W organizmach roślinnych flawonoidy odpowiadają za pigmentację kwiatów, owoców i łodyg [4], działają przeciwbakteryjnie oraz chronią przed insektami, a wystę-

pują najczęściej w postaci glikozydów. Pierwszym etapem metabolizmu tych związków, jest deglikozylacja, po której mogą nastąpić hydroksylacja, metylowanie, sulfonowanie lub glukuronowanie [58]. Właściwości przeciwutleniające flawonoidów opierają się na ich zdolności do przerywania łańcuchowych reakcji rodnikowych [59] oraz chelatowaniu jonów metali [63], a wynikają z obecności kilku grup fenolowych w cząsteczce. Związki te uchodzą za idealne „zmiatacze” rodników nadtlenkowych oraz inhibitory peroksydacji lipidów [55].

ROŚLINNE ŹRÓDŁA ZWIĄZKÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWUTLENIAJĄCYCH

Naturalne źródła antyoksydantów

Dieta obfitująca w produkty pochodzenia roślinnego odgrywa ważną rolę w profilaktyce wielu chorób, takich jak cukrzyca, miażdżycę tętnic, choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona. Prozdrowotne właściwości żywności wynikają m.in. z dużej zawartości związków przeciwutleniających, m.in. polifenoli, witaminy C, E, A, karotenoidów, kwasów organicznych oraz seleniu [69]. Jednym z głównych źródeł substancji o silnych właściwościach antyoksydacyjnych są owoce, wśród których na szczególną uwagę zasługują owoce jagodowe obfitujące w antocyjany i taniny (tab. 2).

Największą zawartością antyoksydantów spośród owocowych produktów przetworzonych odznaczają się wina. Obecne w nich naturalne przeciwutleniacze, głównie flawonoidy, wpływają hamująco na utlenianie tłuszczów (również tych obecnych w LDL) oraz są inhibitorami enzymów oksydacyjnych. Badania aktywności przeciwutleniającej związków zawartych w winach wykazały, że jest ona najwyższa w winach czerwonych, mniejsza w winach różowych i najniższa w winach białych (odpowiednio 6-krotnie i 17-krotnie w stosunku do win czerwonych) [73].

Tabela 2. Zawartość przeciwutleniaczy oraz aktywność antyoksydacyjna owoców jagodowych [35]

Gatunek	Fenole ogółem [mg/g s/m]	Antocyjany [mg/g s/m]	Zdolność zmiatania rodnika DPPH [$\mu\text{mol Troloksu/g}$]
Borówka wysoka	26,4	6,3	128,4
Borówka czernica	55,1	26,3	287,9
Borówka brusznica	35,4	6,1	196,9
Żurawina	20,1	3,1	92,9
Porzeczka czarna	40,9	15,3	200,3
Porzeczka czerwona	13,0	2,3	71,3
Malina	39,0	4,4	208,0
Jeżyna	42,5	10,0	238,5
Truskawka	22,5	2,4	121,6

Tabela 3. Aktywność przeciwutleniaczy zawartych w wybranych gatunkach warzyw [7]

Gatunek	ORAC* ROO- [$\mu\text{mol Troloksu/g s.m.}$]	ORACOH- [$\mu\text{mol Troloksu/g s.m.}$]	ORACCu [$\times 10^3 \text{ j./g s.m.}$]
Czosnek	19,4	1,1	2,7
Jarmuż	17,7	6,2	0,2
Szpinak	12,6	2,8	1,6
Brukselka	9,8	5,4	0,6
Brokuł	8,9	2,4	1,6
Burak	8,4	3,1	0,2
Papryka czerwona	7,1	0,6	0,4
Cebula	4,5	0,5	0,6
Kukurydza	4,0	2,2	1,0
Bakłażan	3,9	1,1	0,1
Kalafior	3,8	1,1	0,2
Ziemniak	3,1	1,0	0,5
Kapusta	3,0	1,5	0,3
Groch zielony	2,0	1,7	0,2
Marchew	2,1	0,8	0,5
Dynia żółta	1,5	1,1	0,2
Seler	0,6	0,3	0,2

*pojemność antyoksydacyjna (oxygen radical absorbance capacity)

Warzywa również stanowią bogate źródło związków przeciwutleniających, jednak ich zawartość jest znacznie mniejsza niż w wspomnianych wcześniej owocach (tab. 2). Największą zdolnością neutralizacji rodników nadtlenkowych odznaczają się substancje zawarte w czosnku,

natomiast jarmuż i brukselka najlepiej redukują rodniki hydroksylowe (tab. 3) [28].

W grupie warzyw istotną rolę jako źródło przeciwutleniaczy spełnia pomidor ze względu na zawarty w nim

likopen. Wykazuje silne działanie antyoksydacyjne wynikające z obecności w cząsteczce sprzężonego układu jedenastu wiązań podwójnych. Również przetwory pomidorowe są dobrym źródłem tego barwnika, ponieważ procesy technologiczne nie zmniejszają jego zawartości w tych produktach [27].

Kolejnym roślinnym źródłem charakteryzującym się dużą zawartością przeciwutleniaczy są nasiona roślin strączkowych, zwłaszcza soi, której nasiona wykazują duże zróżnicowanie jakościowe i ilościowe izoflawonów [69], są to m.in. glikozydy flawonoli, katechiny, antocyjanidyny, izoflawonoidy oraz kwasy fenolowe, których największa koncentracja występuje w okrywach nasiennych tej rośliny [71].

Produkty zbożowe charakteryzują się na ogół mniejszą zawartością przeciwutleniaczy aniżeli owoce czy warzywa. Antyoksydanty powszechnie występujące w tej grupie produktów to: kwasy fenolowe, lignany, witamina E, pierwiastki śladowe pełniące funkcje kofaktorów przeciwutleniaczy enzymatycznych (Se, Cu, Zn oraz Mn), glutation, a także melatonina [85].

Istotnym źródłem tokoferoli są nasiona roślin oleistych. Tokoferole znajdują się w różnych stężeniach we wszystkich tłuszczach pochodzenia roślinnego. W tej grupie produktów największą zawartością tokoferoli odznacza się olej z zarodków pszennych oraz bardziej popularne oleje - sojowy i kukurydziany [46].

Szczególnie dużą zawartością substancji o właściwościach przeciwutleniających charakteryzuje się herbata ze względu na obecność związków fenolowych, których zawartość w liściach może sięgać 35% suchej masy. Są to w głównej mierze katechiny, teaflawiny oraz tearubiginy [75]. Rodzaj i ilość antyoksydantów zawartych w herbacie zależy od jej typu, w zielonej herbacie głównymi antyutleniaczami są katechiny, natomiast w czarnej herbacie i herbacie oolong dominują teaflawiny i tearubiginy, które powstają w procesie fermentacji liści. Aktywność katechin wyizolowanych z zielonej herbaty dorównuje aktywności syntetycznych przeciwutleniaczy, np. butyloowany hydroksyanizol (BHA) czy butyloowany hydroksytoluen (BHT) [81]. Związki antyutleniające obecne są również w ziołach i przyprawach [66].

Zastosowanie inżynierii genetycznej i metabolicznej roślin w syntezie flawonoidów

Modyfikacje genetyczne szlaków biosyntezy wtórnych metabolitów roślinnych znajdują się w centrum zainteresowań biotechnologów roślin. Wynika to z tego, że synteza chemiczna niektórych metabolitów, w związku ze stopniem ich złożoności, jest nie tylko trudna, ale również kosztowna i mało wydajna. Metody inżynierii genetycznej i metabolicznej wychodzą naprzeciw potrzebom zwiększania zawartości różnych metabolitów, w tym flawonoidów, poprzez zmiany poziomu ekspresji genów endogennych lub egzogennych w gatunkach roślin użytkowych [20].

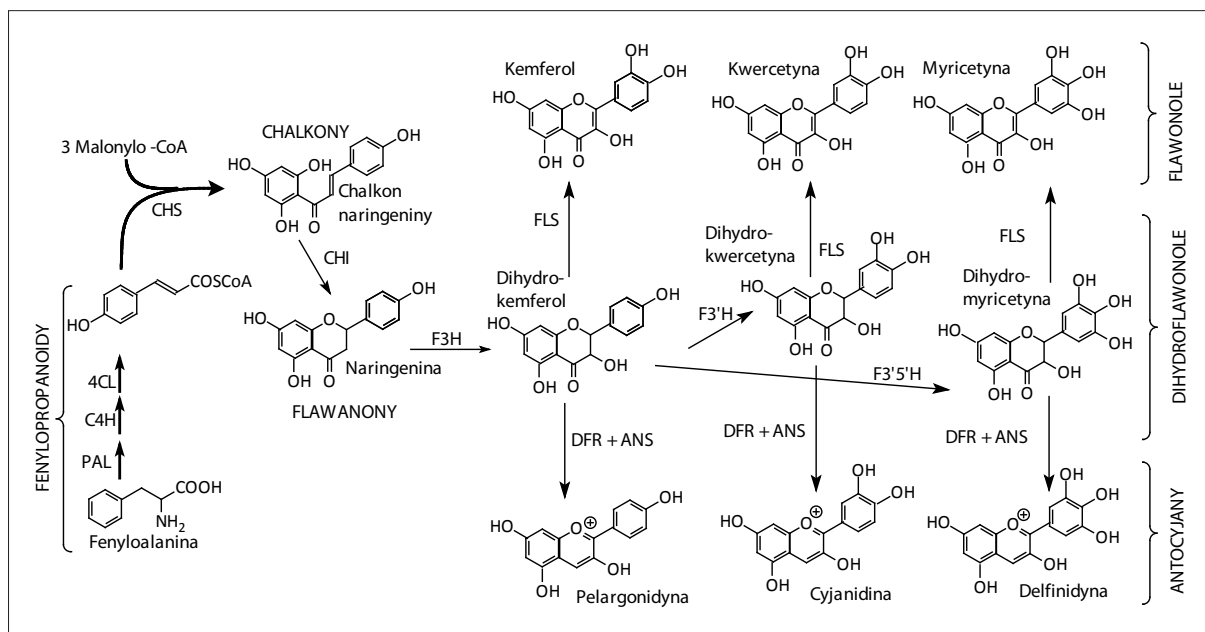
Szczególne zainteresowanie flawonoidami wynika z ich szerokiego działania prozdrowotnego. Sukcesywnie przybywa dowodów naukowych potwierdzających ich działanie przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe i przeciwzapalne. Niestety spożywane rośliny uprawne często nie zawierają flawonoidów lub zawierają tylko niewielkie ich ilości [18], stąd istnieje potrzeba sięgania po narzędzia inżynierii genetycznej w celu podwyższenia zawartości w komórkach roślinnych.

Szlaki biosyntezy flawonoidów i izoflawonoidów są prawdopodobnie najlepiej poznаныmi szlakami biosyntezy naturalnych produktów roślinnych, m.in. dlatego związki flawonowe są przedmiotem licznych badań w zakresie inżynierii metabolicznej. Modyfikacje szlaków biosyntezy flawonoidów mogą dotyczyć zmian w poziomie ekspresji genów strukturalnych lub regulacyjnych, wyciszania genów konkurencyjnych lub też modyfikacji właściwości katalitycznych enzymów za pomocą techniki inżynierii białek [13]. Inżynieria metaboliczna roślin uprawnych i modelowych skupia się w głównej mierze na zwiększaniu zawartości flawonoidów w surowcach roślinnych, natomiast inżynieria mikroorganizmów rzuca nowe światło na procesy fermentacyjne jako źródło specyficznych związków flawonowych wytwarzanych w kontrolowanych warunkach poprzez konstrukcję szlaku biosyntezy fenylopropanoidów w komórkach drobnoustrojów. Oba podejścia mogą znaleźć zastosowanie w produkcji atrakcyjnych pod względem medycznym flawonoidów [78].

Rozwój inżynierii metabolicznej flawonoidów i innych związków chemicznych opiera się na kilku rozwiązaniach [13,16,77]. Po pierwsze, aby zwiększyć zawartość interesujących metabolitów w organizmie gospodarza należy doprowadzić do nadekspresji enzymów limitujących ich wytwarzanie lub doprowadzić do ekspresji w organizmie gospodarza enzymów nieulegających inhibicji. Większość przemysłowo wykorzystywanych mikroorganizmów nie zawiera endogennego szlaku biosyntezy flawonoidów, dlatego niezbędne jest wprowadzenie roślinnych genów kodujących konkretne enzymy [13,16].

Drugi kierunek modyfikacji ma na celu pokonanie barier regulatorowych przez modyfikacje w aparacie transkrypcyjnym i translacyjnym. W przypadku roślin udało się zmodyfikować kilka szlaków metabolicznych dzięki identyfikacji swoistych czynników transkrypcyjnych i ich nadekspresji. Rozpoznawanie czynników transkrypcyjnych nadal jest problemem badawczym, którego rozwiązanie jest niezbędne do zwiększenia ekspresji transgenów [16].

Kierunek przemian w danym szlaku metabolicznym może być przewidywany i wybierany dzięki analizom transkryptomycznym i metabolicznym całego genomu bądź jego konkretnej części. W ostatnim czasie takie analizy okazały się potężnym narzędziem w identyfikacji nieznanymi wcześniej konkurujących szlaków. W efekcie



Ryc. 3. Szlak biosyntezy flawonoidów [3]. ANS, syntaza antocyjanowa; CHI, izomeraza chalkonowa; CHS, syntaza chalkonowa; DFR, reduktaza dihydroflawonolowa; F3H, flawanon-3-hydroksylaza (EC 1.14.11.9); F3'H, flawanon-3'-hydroksylaza (EC 1.14.13.21); F3'5'H, flawanon-3'5'-hydroksylaza (EC 1.14.13.88); FLS, syntaza flawonolowa (EC 1.14.11.23); PAL, liaza fenylalaninowa; 4CL, ligaza 4-kumaroil-CoA (EC 6.2.1.12); C4H, 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego (EC 1.14.13.11)

nadekspresja wybranych genów bądź inhibicja konkurencyjnych szlaków prowadzi do zwiększonej produkcji pożądaných produktów [16,18,26].

Ostatnim rozwiązaniem stosowanym przez inżynierię metaboliczną jest kontrola mechanizmów transportu i magazynowania produktów zarówno u roślin jak i mikroorganizmów [78]. Ważną rolę w tym podejściu pełnią swoiste transportery drugorzędowych metabolitów, które oprócz przenoszenia produktów syntezy między organelami oraz między środowiskiem wewnątrzkomórkowym a zewnątrzkomórkowym, pozwalają na magazynowanie produktów w dużych stężeniach bez jednoczesnego efektu toksycznego, a także odpowiadają za zachowanie kierunku biosyntezy, odprowadzając produkty reakcji z miejsca ich powstawania [84].

Szlak biosyntezy flawonoidów

Flawonoidy są produktami dobrze poznanego szlaku syntezy związków fenylpropanowych (ryc. 3). Sklonowano wiele ze strukturalnych genów tego szlaku oraz część genów regulatorowych z kilku roślin modelowych, takich jak kukurydza, wyżlin większy, tytoń, petunia czy rzodkiewnik pospolity [26], a ich ekspresji dokonano w zmodyfikowanych genetycznie roślinach modelowych i mikroorganizmach [13,17]. Dzisiejsze standardowe narzędzia biologii molekularnej wystarczają, by modyfikować genetycznie kilka ważnych roślin uprawnych, tj. kukurydzę, ziemniaka, buraka cukrowego i pszenicę [65].

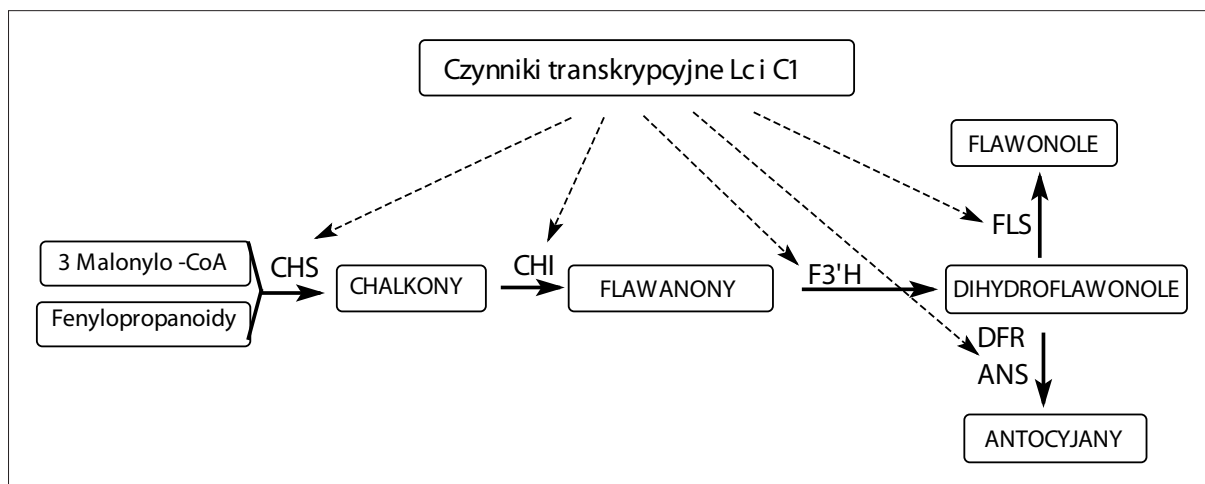
Pierwsze trzy etapy szlaku fenylpropanowego są katalizowane przez amoniakolizację fenylalaninową (PAL, EC 4.3.1.24), 4-hydroksylazę kwasu cynamonowego (C4H) i ligazę 4-kumaroil-CoA (4CL, EC 6.2.1.12). PAL odpowiada za deaminację fenylalaniny do kwasu cynamonowego, C4H katalizuje utlenianie kwasu cynamonowego do kwasu 4-kumarowego, który jest konwertowany przez 4CL do 4-kumaroil-CoA. Następnym etapem jest kondensacja czterech cząsteczek 4-kumaroil-CoA z trzema cząsteczkami malonylo-CoA, co umożliwia otrzymanie chalkonu naringeniny. Reakcja ta jest katalizowana przez syntazę chalkonową (CHS, EC 2.3.1.74). Zamknięcie pierścienia katalizowane izomerazą chalkonową (CHI, EC 5.5.1.6) skutkuje syntezą naringeniny, która jest prekursorem dużej liczby flawonoidów [78].

We współczesnych badaniach można wyróżnić cztery sposoby modyfikacji szlaku biosyntezy flawonoidów:

- z udziałem genów regulatorowych,
- modyfikacje genów strukturalnych,
- blokowanie specyficznych etapów szlaku za pomocą RNAi (interferencyjnego RNA o dwuniciowej strukturze),
- wytwarzanie flawonoidów przez wprowadzanie nowych ścieżek szlaku.

Modyfikacje ekspresji genów regulatorowych

O ostatecznej zawartości drugorzędowych metabolitów w komórkach roślinnych decyduje poziom transkrypcji właściwych genów strukturalnych. Swoiste czynniki transkrypcyjne, które reagują z regionem promotora



Ryc. 4. Wpływ genów regulatorowych *Lc* i *C1* pomidora na szlak biosyntezy flawonoidów [3]. Pogrubione strzałki reprezentują natywny szlak biosyntezy flawonoidów w skórce pomidora. Po ekspresji czynników transkrypcyjnych *Lc* (*leaf color*) i *C1* (*colorless*) zaobserwowano zwiększoną biosyntezę flawonoidów w miąższu

rowym danego genu, zmieniają poziom jego ekspresji, a zatem odgrywają istotną rolę w biosyntezie metabolitów [59]. Czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję wybranych genów szlaku fenylopropanowego zidentyfikowano u wielu roślin [26]. Kontrola genów regulatorowych tego szlaku wydaje się bardzo zależna od rodzaju tkanki, sygnałów wewnętrznych (np. hormonalnych) i sygnałów zewnętrznych (np. promieniowania ultrafioletowego) [76]. Za regulację genów strukturalnych szlaku biosyntezy flawonoidów odpowiadają w znacznym stopniu czynniki transkrypcyjne z rodziny C1 lub rodziny R. Mogą one kontrolować nawet kilka genów strukturalnych szlaku flawonoidowego [24,37].

Do najlepiej scharakteryzowanych genów regulatorowych należą gen *C1* (*colorless*) z kukurydzy i gen *Lc* (*leaf color*) należący do rodziny genów kodujących czynniki transkrypcyjne typu R. Nadekspresja obu genów w kulturach komórkowych kukurydzy spowodowała indukcję całego szlaku biosyntezy flawonoidów [23]. Geny poddawano ektopowej ekspresji u takich roślin jak np. tytoń, rzodkiewnik pospolity [44], petunia [5] i pomidor [22]. Nadekspresja genów *Lc* i *C1* kukurydzy u pomidora, który wytwarza i akumuluje jedynie niewielkie ilości kemferolu i kwercetyny, skutkowałą zwiększonym wytwarzaniem kemferolu zarówno w skórce, jak i w miąższu (nawet o 60%) [18]. Ekspresja genów *Lc* i *C1* u ziemniaka również doprowadziła do zwiększonej akumulacji kemferolu w jego bulwach [18]. Wprowadzenie do tytoniu i ryżu genu *Lc* zaowocowało zwiększoną akumulacją antocyjanów [21,44]. W przypadku tytoniu i rzodkiewnika pospolitego ekspresja jedynie genu *R* skutkowałą zwiększeniem zawartości antocyjanów w tkankach pierwotnie go wytwarzających, natomiast ekspresja genu *C1* nie miała żadnego wpływu na cechy fenotypowe roślin transgeniczných. Co ciekawe w przypadku ekspresji obu wspomnianych genów zaobserwowano u rzodkiewnika pospolitego akumulację antocyjanów w tkankach, w których one nie występują [44]. U transgenicznego

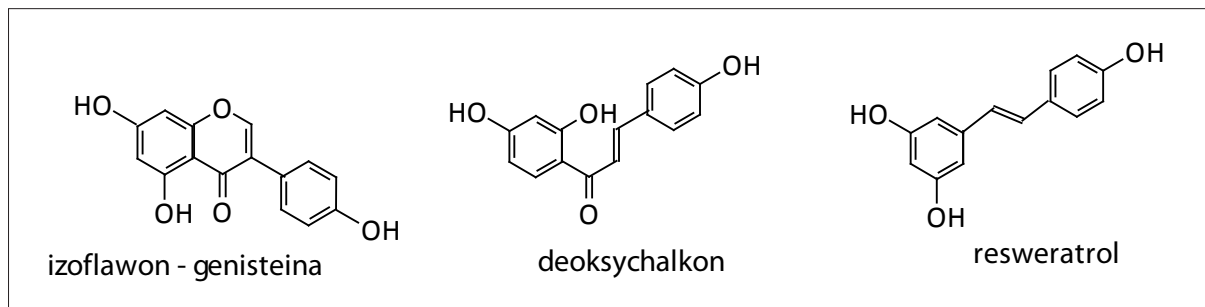
pomidora nadekspresja genów *Lc* i *C1* zaowocowała niemal 20-krotnie wyższą zawartością flawonoli w owocu w porównaniu do owoców odmiany dzikiej. Ektopowa ekspresja genów *Lc* i *C1* może prowadzić nie tylko do zwiększonego wytwarzania antocyjanów, ale także innych klas flawonoidów (ryc. 4) [3].

Ekspresja cDNA genu *Lc* w petunii, znajdującego się pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora, skutkowałą nadmiernym wytwarzaniem antocyjanów głównie w liściach. Obecność tego genu zwiększyła wydajność szlaku biosyntezy flawonoidów w tej roślinie na skutek nadekspresji genów strukturalnych opisywanego szlaku [5,12].

Powyższe przykłady pokazują, że kontrola akumulacji produktów szlaków metabolicznych u roślin na poziomie molekularnym może odbywać się na etapie transkrypcji, a podejście to daje obiecujące rezultaty u kilku różnych gatunków organizmów roślinnych [74].

Modyfikacje związane z genami strukturalnymi

Badania związane z nadekspresją i wyciszeniem genów głównych enzymów związanych ze szlakiem biosyntezy flawonoidów roślin wykazały, że są to skuteczne metody zwiększania zawartości flawonoidów w materiale roślinnym [16]. W przypadku pomidora głównym związkiem flawonowym jest chalcon naringeniny, produkt reakcji katalizowanej przez syntazę chalconową (CHS), gromadzący się w skórce w czasie dojrzewania w odpowiedzi na wzrost ekspresji genu kodującego CHS. W skórce pomidora oprócz chalconu naringeniny gromadzona jest również rutyna. Izomeraza chalconowa (CHI) bierze udział w transformacji chalconu naringeniny do naringeniny, a reakcja ta stanowi etap ograniczający syntezę rutyny u pomidora. Ektopowa ekspresja genu kodującego CHI z petunii skutkowałą zniesieniem tej blokady prowadząc do 70-krotnego wzrostu zawartości flawonoidów w skórce owocu pomidora [50].



Ryc. 5. Przykłady utleniaczy z grupy izoflawonów, deoksychalkonów i stilbenów

W literaturze znane są także inne przykłady modyfikacji ekspresji genów strukturalnych szlaku syntezy flawonoidów. W celu zwiększenia stężenia flawonoidów w miąższu owocu pomidora, do jego komórek wprowadzono konstrukt składający się z czterech genów petunii. Jednoczesna ekspresja genów kodujących enzymy CHS (syntazę chalkonową EC 2.3.1.74), CHI (izomerazę chalkonową, EC 5.5.1.6), F3H (flawanon-3-hydroksylazę, EC 1.14.11.9) i FLS (syntazę flawonolową, EC 1.14.11.23) przyczyniła się do zwiększenia akumulacji flawonoli zarówno w skórce, jak i miąższu pomidora [11].

Z kolei ekspresja u rzodkiewnika pospolitego genu kodującego amoniakoliazę tyrozynową (TAL), enzymu który u niektórych roślin i bakterii katalizuje reakcję przemiany tyrozyny bezpośrednio do kwasu 4-kumarowego [77], doprowadziła do zwiększonej akumulacji antocyjanów oraz flawonoidów, a także innych fenylopropanoidów w tkankach [53].

Ważną klasą flawonoidów są izoflawony, które mogą działać jak fitoestrogeny. Izoflawony (ryc. 5) wzbudziły zainteresowanie środowisk medycznych w związku z ich potencjalnym wykorzystaniem w leczeniu i zapobieganiu chorobom endokrynologicznym [64]. Występowanie tej grupy metabolitów ogranicza się głównie do roślin strączkowych, u których pierwszym etapem ich biosyntezy jest reakcja katalizowana przez syntazę izoflawonową (IFS, EC 1.14.13.136). Sklonowanie genu kodującego IFS umożliwiło wytwarzanie izoflawonów przez rośliny uprawne, u których związki te naturalnie nie występują [18].

Blokowanie specyficznych etapów szlaków metabolicznych za pomocą RNAi

Przykładem wykorzystania techniki wyciszania genów za pomocą RNAi (interferencyjnego RNA o dwuniciowej strukturze) może być zmniejszenie zawartości ligniny na rzecz flawonoidów rzodkiewnika pospolitego. Ligniny są głównymi składnikami ścian komórkowych ważnymi dla przemysłu biopaliwowego. Wyciszenie u rzodkiewnika pospolitego genu kodującego glikozylotransferazę hydroksycynamonową (HCT, EC 2.4.1.177, enzymu szlaku syntezy ligniny), za pomocą powtarzalnych sekwencji nukleotydowych genu *HCT*, powodowało zahamowanie syntezy ligniny i zwiększenie wydajności szlaku syntezy

flawonoidów przez wzrost aktywności syntazy chalkonowej (CHS), enzymu konkurującego z HCT o wspólny substrat [1].

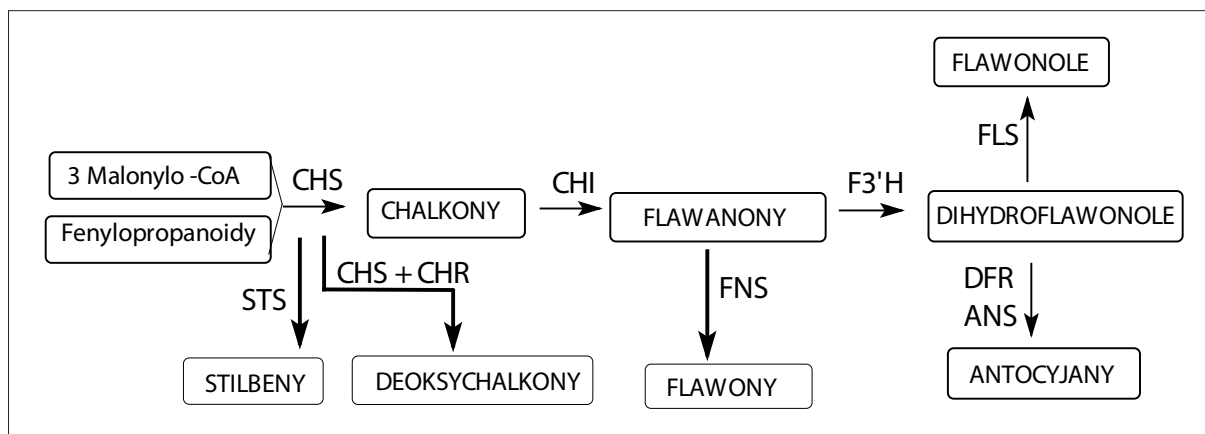
Wykorzystując zjawisko interferencji RNA można również zmieniać stężenie flawonoidów przez blokowanie specyficznych etapów szlaku ich syntezy. Za pomocą konstruktów RNAi genu kodującego syntazę flawonolową (FLS, EC 1.14.11.23), wprowadzonego do wegetatywnych tkanek pomidora, osiągnięto wysokie stężenie antocyjanów w tkankach, obniżając tym samym zawartość flawonoli [4].

Wprowadzenie nowych ścieżek w szlakach biosyntezy flawonoidów w komórkach roślinnych

Głównym źródłem przeciwutleniaczy z grupy flawonoidów jest seler i pietruszka. Podjęte próby wytwarzania flawonów w komórkach pomidora opierały się na wprowadzeniu do jego tkanek genu kodującego syntazę flawonową (FNS, EC 1.14.11.22) z gerbery. Metoda ta jednak okazała się efektywna jedynie przy równoczesnym zwiększeniu wydajności endogennego szlaku biosyntezy flawonoidów [62], co zaowocowało dużą akumulacją flawonów, głównie luteoliny i 7-glikozydu luteoliny (odpowiednio do 340 mg/kg i do 150 mg/kg świeżej masy). Oprócz zwiększonej zawartości flawonów w komórkach skórki transgenicznego pomidora odnotowano również 16-krotny wzrost flawonoli (kwercetyny do 67 mg/kg świeżej masy oraz rutyny do 900 mg/kg świeżej masy) w porównaniu z odmianą dziką [4].

Innym przykładem omawianego podejścia inżynierii metabolicznej jest wytwarzanie deoksychalkonów (ryc. 5), występujących głównie u roślin motylkowych, gdzie za ich wytwarzanie odpowiadają dwa enzymy: reduktaza chalkonowa (CHR, EC 2.3.1.170) i syntaza chalkonowa (CHS) [11]. Nadekspresja obu genów kodujących wspomniane enzymy w pomidorze zaowocowała akumulacją tych flawonoidów (do 265 mg/kg świeżej masy) [62]. Podobny poziom akumulacji deoksychalkonów został opisany dla transgenicznego petunii [11].

Stilbeny są grupą związków rzadko spotykanych w królestwie roślin, ale niezwykle ciekawych z punktu widzenia ich prozdrowotnych właściwości. Dokonano kilku



Ryc. 6. Szlak syntezy flawonoidów u pomidora z uwzględnieniem nowych gałęzi wprowadzonych metodami inżynierii genetycznej (zmodyfikowano na podstawie [4]) (wprowadzone odgałęzienia szlaku oznaczono pogrubionymi strzałkami); CHS - syntaza chalkonowa (CHS, EC 2.3.1.74); STS – syntaza stilbenowa (EC 2.3.1.95); CHR - reduktaza chalkonowa (EC 2.3.1.170), CHI - izomeraza chalkonowa (EC 5.5.1.6); FNS - syntaza flawonowa (EC 1.14.11.22); F3'H - flawanon-3'-hydroksylaza (EC 1.14.13.21); FLS - syntaza flawonolowa (EC 1.14.11.23); DFR - reduktaza dihydroflawonolowa (EC 1.1.1.219); ANS - syntaza antocyjanowa

prób syntezy tych związków w powszechnie występujących roślinach jadalnych, takich jak pomidor. Wprowadzenie do pomidora cDNA syntazy stilbenowej (EC 2.3.1.95) skutkowało akumulacją stilbenów w owocach (głównie resweratrolu, ryc. 5) [62]. Interesujące jest to, że w transgenicznym pomidorze stężenie stilbenów było znacznie większe niż w różnego rodzaju czerwonych winach, uważanych obecnie za najbogatsze źródło resweratrolu [8].

Poszerzenie wiedzy w zakresie kontroli szlaku biosyntezy flawonoidów otwiera nowe możliwości zwiększania ilości związków flawonowych o właściwościach antyutleniających w roślinach jadalnych. Przedstawione przykłady roślin transgenicznych potwierdzają możliwość efektywnej produkcji przeciwutleniaczy, syntezowanych w niewielkich stężeniach lub naturalnie nieprodukowanych. Dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwa była akumulacja stilbenów, deoksychalkonów i flawonów na poziomie porównywalnym lub wyższym niż w źródłach naturalnych [4].

GENETYCZNIE MODYFIKOWANE MIKROORGANIZMY JAKO ŹRÓDŁO PRZECIWUTLENIACZY

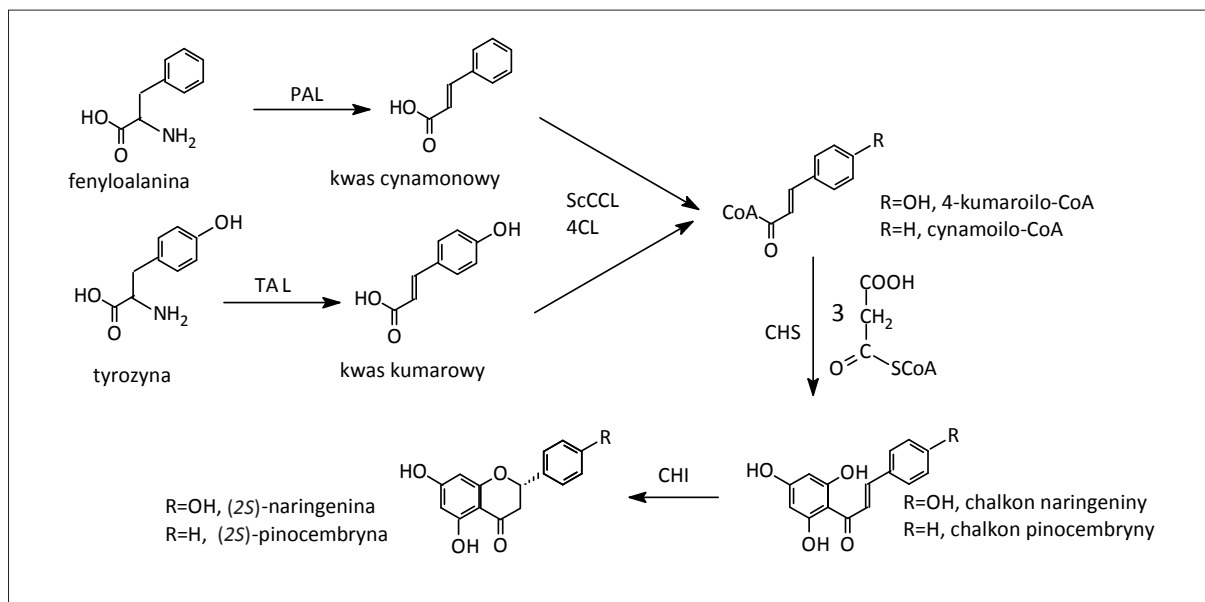
Biosynteza związków chemicznych i biomateriałów za pomocą rekombinowanych mikroorganizmów stała się ciekawą alternatywą dla metod ekstrakcyjnych oraz metod syntezy chemicznej. Niekwestionowaną zaletą hodowli mikroorganizmów jest możliwość przeniesienia skali z poziomu laboratoryjnego do rozmiarów biofermentorów przemysłowych. Fermentacja mikrobiologiczna na dużą skalę rozwiązuje problemy związane z ekstrakcją metabolitów ze źródeł roślinnych. Rekombinowane mikroorganizmy są zazwyczaj pozbawione konkurujących szlaków metabolicznych, dzięki czemu mogą wytwarzać swoiste produkty, np. konkretny enancjomer danego związku, co z kolei skraca proces jego oczyszczania.

Kolejnymi zaletami takiej hodowli jest szybki wzrost inokulum bakteryjnego lub drożdżowego pozwalający na znaczne skrócenie czasu wytwarzania flawonoidów w stosunku do organizmów roślinnych oraz to, że wzrost drobnoustrojów może być ściśle kontrolowany i odbywać się w pożywkach zawierających tanie, odnawialne źródła węgla [10].

Powszechnie stosowanymi organizmami modelowymi w produkcji flawonoidów są *Escherichia coli* oraz drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae*. Synteza flawonoidów przez komórki mikroorganizmów zazwyczaj wymaga wprowadzenia do komórek gospodarza wielogenowego konstruktów, a wytwarzanie tych metabolitów jest limitowane dostępem do prekursorów i kofaktorów dla enzymów szlaku w organizmie gospodarza [16].

Escherichia coli jako narzędzie do produkcji flawonoidów

Komórki *Escherichia coli* są często wykorzystywane jako „fabryki komórkowe” do syntezy wielu ważnych produktów roślinnych, w tym także flawonoidów [19,42,61]. Barię w wytwarzaniu związków flawonowych w komórkach bakteryjnych są trudności w ekspresji C4H (4-hydroksylazy kwasu cynamonowego) wynikające z braku odpowiedniej reduktazy związanej z cytochromem P450 bakterii. Wykazano, że ektopowa ekspresja genu kodującego 4CL (ligazę 4-kumarylo-Co A) z bakterii *Streptomyces coelicolor* (ScCCL) umożliwia efektywną syntezę białka enzymatycznego 4CL, które bierze udział w transformacji kwasu cynamonowego bezpośrednio do cynamoil-CoA [33]. Bazując na tym doniesieniu stworzono konstrukt składający się z genów kodujących: 4CL (ze *S. coelicolor*), PAL (o aktywności TAL z drożdży), CHS (z lukrecji) i CHI (z opornika łąkowego), uzyskując roślinne flawonoidy: pinocembryny w ilości 751 µg/dm³ i naringeniny w ilości równej 452,6 µg/dm³ (ryc. 7) [16,30,33].



Ryc. 7. Szlak heterologicznej biosyntezy flawonoidów w komórkach *E. coli* [15]; ScCCl ligaza 4-kumaroilo/cynamoilo-Co A przyłącza cząsteczkę CoA do kwasu 4-kumarrowego lub kwasu cynamonowego z taką samą wydajnością; PAL, amoniakoliza fenyloalaninowa; TAL, amoniakoliza tyrozynowa; CHS, syntaza chalkonowa; CHI, izomeraza chalkonowa

Zwiększenie wydajności syntezy różnych flawonoidów w komórkach *E. coli* w ostatnich latach było możliwe dzięki podniesieniu wewnątrzkomórkowej puli kofaktorów niezbędnych w szlaku ich biosyntezy. Przykładem takiego rozwiązania może być synteza antocyjanów m.in. przez eliminację szlaku syntezy cukrów złożonych w szlaku biosyntezy UDP-glukozy, biorącej udział w wytwarzaniu antocyjanów [43,83]. Podobnie udało się zwiększyć wytwarzanie flawanonów (do 710 mg/dm³) przez podniesienie stężenia wewnątrzkomórkowego malonylo-CoA, indukując m.in. nadekspresję genu karboksylazy acetylo-CoA (ACC) [42].

Santos i wsp. zaproponowali metodę mikrobiologicznego wytwarzania naringeniny z wykorzystaniem glukozy w podłożu hodowlanym, bez dodatku aminokwasów jako prekursorów syntezy flawonoidy [61]. Konstruktor złożony z czterech genów kodujących kolejno CHS, TAL, 4CL i CHI wprowadzono do dwóch linii *E. coli*, które następnie zmodyfikowano genetycznie w kierunku zwiększonego wytwarzania L-tyrozyny. Komórki te były zdolne do syntezy 29 mg/dm³ naringeniny z glukozy, a przy dodatkowym zahamowaniu aktywności enzymów syntetyzujących kwasy tłuszczowe - nawet do 84 mg/dm³ tego flawonoidu. Natomiast w wyniku koekspresji genu TAL z *Rhodobacter sphaeroides*, 4CL i CHS w *E. coli* uzyskano naringeniny 20,8 mg/dm³ [79].

Jednym z pierwszych doniesień dotyczących wytwarzania związków flawonowych jako substancji mogących znaleźć zastosowanie w medycynie była praca opisująca linie *E. coli* zmodyfikowane w kierunku wytwarzania resweratrolu przez ekspresję roślinnych genów kodujących 4CL i STS [33,43]. Ponadto bakterie *E. coli* okazały się także

zdolne do wytwarzania resweratrolu w podłożu z dodatkiem kwasu *p*-kumarrowego lub kwasu kawowego. Synteza resweratrolu przez tak zmodyfikowane komórki osiągnęła poziom powyżej 100 mg/dm³ płynu pochodowlanego [80].

Metody otrzymywania flawonoidów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmy eukariotyczne są bardziej odpowiednimi od bakterii gospodarzami do ekspresji genów roślinnego szlaku biosyntezy flawonoidów, gdyż m.in. zawierają kompartmenty podobne do tych występujących u roślin, dzięki czemu mogą potranslacyjnie modyfikować białka [2,78].

Wprowadzenie do komórek drożdży genów kodujących PAL (o aktywności TAL, z *Rhodospodium torioides*), 4CL (z rzodkiewnika) i CHS (z dziurawca) wraz z promotorem GAL10 (promotor genu epimerazy UDP-galaktozy, jednego z genów odpowiedzialnych za wykorzystanie galaktozy przez komórki *S. cerevisiae*) zaowocowało syntezą około 7 mg/dm³ naringeniny i 0,8 mg/dm³ pinocembriny, w pozycywie z dodatkiem odpowiednio tyrozyny i fenyloalaniny [31]. Z kolei sklonowanie genów C4H (z rzodkiewnika), 4CL (z pietruszki), CHS i CHI (z petunii) z podobnym promotorem GAL1 (promotor genu galaktokinazy) skutkowało około 4-krotnym wzrostem wytwarzania naringeniny (28,3 mg/dm³) i ponad 20-krotnym pinocembriny (16,3 mg/dm³) [82] w porównaniu z przytoczonymi wyżej wynikami Jiang i wsp. [31].

Ważnym czynnikiem wpływającym na wytwarzanie flawonoidów jest rodzaj zastosowanej pożywki w hodowli transgenicznych drożdży. Komórki drożdży zawierające

ektopowe enzymy C4H, 4CL i CHS wytwarzają małą ilość naringeniny (0,2 mg/dm³), gdy prekursorem ich syntezy jest kwas cynamonowy, natomiast w przypadku, gdy miejsce kwasu cynamonowego zajmie kwas 4-kumaro- wy akumulacja naringeniny w kulturze wzrasta do 28,3 mg/dm³ [82].

Dowiedziano również, że wprowadzenie transportera bakteryjnego araE do komórek drożdży zwiększa akumulację resweratrolu. Komórki drożdży zawierające gen kodujący wspomniany transporter produkowały do 2,5 razy więcej resweratrolu w porównaniu do komórek niemodyfikowanych [78].

PODSUMOWANIE

Prozdrowotny wpływ przeciwutleniaczy na organizmy żywe jest niekwestionowany. W odpowiedzi na wzrastające tempo rozwoju cywilizacyjnego, coraz wyższe wymagania stawiane przez społeczeństwo i związane z tym stres, powoduje wzrost zapotrzebowania na „strażników homeostazy procesów redoks”, czyli szeroko rozumianą grupę przeciwutleniaczy.

Znane są metody zwiększania zawartości antyoksydantów w tkankach roślinnych przez genetyczną modyfikację naturalnie występujących szlaków biochemicznych. Jednym

z najlepiej poznanych szlaków metabolicznych jest szlak syntezy flawonoidów, którego produkty stanowią ważną grupę związków przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu. Wspomniane modyfikacje mogą dotyczyć zarówno genów strukturalnych jak i regulacyjnych szlaku, występujących natywnie, jak i genów ektopowych, a także blokowania specyficznych jego etapów czy wprowadzania nowych ścieżek do szlaku. Alternatywnym rozwiązaniem jest wprowadzanie roślinnych szlaków metabolicznych do komórek mikroorganizmów, np. bakterii *Escherichia coli* czy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Pula funkcjonalnych związków o właściwościach antyoksydacyjnych jest ogromna. Problemem nie jest ich identyfikacja ani ekstrakcja z materiałów roślinnych czy hodowla mikroorganizmów, ale pozyskiwanie w stężeniach umożliwiających efektywne terapie antyrodnikowe oraz zwiększenie ich dostępności i różnorodności w diecie. Celem badaczy powinno być również opracowanie metod otrzymywania bezpiecznych przeciwutleniaczy syntetycznych, niewykazujących działania toksycznego *in vivo*. Rozwój metod produkcji antyutleniaczy na skalę przemysłową i jednoczesne badania nad interakcją między rodnikami, przeciwutleniaczami i żywymi tkankami pozwolą być może, na skuteczne zwalczanie chorób spowodowanych nadmiernym utlenianiem komórkowym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Besseau S., Hoffmann L., Geoffroy P., Lapierre C., Pollet B., Le-grand M.: Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, 2007; 19: 148-162
- [2] Białecka-Florjańczyk E., Kapturowska A.U.: Genetically modified baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in chemical synthesis and bio-transformations, *Chem. Biol.*, Deniz Ekinici (Ed.), ISBN: 978-953-51-0049-2, InTech, DOI: 10.5772/33079. 2012
- <http://www.intechopen.com/books/chemical-biology/genetically-modified-baker-s-yeast-saccharomyces-cerevisiae-in-chemical-synthesis-and-biotransformat>
- [3] Bovy A., de Vos R., Kemper M., Schijlen E., Pertejo M.A., Muir S., Collins G., Robinson S., Verhoeyen M., Hughes S., Santos-Buelga C., van Tunen A.: High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell*, 2002; 14: 2509-2526
- [4] Bovy A., Schijlen E., Hall R.D.: Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics*, 2007; 3: 399-412
- [5] Bradley J.M., Davies K.M., Deroles S.C., Bloor S.J., Lewis D.H.: The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *Plant J.*, 1998; 13: 381-392
- [6] Cadet J.L., Brannock C.: Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry Int.*, 1998; 32: 117-131
- [7] Cao G., Sofic E., Prior R.L.: Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agricultural Food Chem.*, 1996; 44: 3426-3431
- [8] Celotti E., Ferrarini R., Zironi R., Conte L.S.: Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatography*, 1996; 730: 47-52
- [9] Chaudiere J., Ferrari-Iliou R.: Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, 1999; 37: 949-962
- [10] Chemler J.A., Koffas M.A.: Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Op. Biotechnol.*, 2008; 19: 597-605
- [11] Colliver S., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., de Vos C.H., Verhoeyen M.E.: Improving the nutritional content of tomatoes through reprogramming their flavonoid biosynthetic pathway. *Phytochemistry Rev.*, 2002; 1: 113-123
- [12] Davies K.M., Bloor S.J., Spiller G.B., Delores S.C.: Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *Plant J.*, 1998; 13: 259-266
- [13] Dixon R.A., Steele C.L.: Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.*, 1999; 4: 394-400
- [14] Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Rev.*, 2002; 82: 47-95
- [15] Du F., Zhang F., Chen F., Wang A., Wang Q., Yin X., Wang S.: Advances in microbial heterologous production of flavonoids. *Afr. J. Microbiol.*, 2011; 5: 2566-2574
- [16] Du H., Huang Y., Tang Y.: Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010; 86: 1293-1312
- [17] Flora S.J.: Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2009; 2: 191-206
- [18] Forkmann G., Martens S.: Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Op. Biotechnol.*, 2001; 12: 155-160
- [19] Fowler Z.L., Gikandi W.W., Koffas M.A.: Increased malonyl coenzyme a biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network

and its application to flavanone production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009; 75: 5831-5839

- [20] Galili G., Höfgen R.: Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metabolic Engineering*, 2002; 4: 3-11
- [21] Gandikota M., de Kochko A., Chen L., Ithal N., Fauquet C., Reddy A.R.: Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin genes and increased blast resistance. *Mol. Breeding*, 2001; 7: 73-83
- [22] Goldsbrough A.P., Tong Y., Yoder J.I.: Lc as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant J.*, 1996; 9: 927-933
- [23] Grotewold E., Chamberlin M., Snook M., Siame B., Butler L., Swenson J., Maddock S., St Clair G., Bowen B.: Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *Plant Cell*, 1998; 10: 721-740
- [24] Grotewold E., Koes R.: How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.*, 1998; 3: 212-217
- [25] Hensley K., Benaksas E. J., Bolli R., Comp P., Grammas P., Homdheydari L., Mou S., Pye Q.N., Stoddard M.F., Wallis G., Williamson K.S., West M., Wechter W.J., Floyd R.A.: New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxylthylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biol. Med.*, 2004; 36: 1-15
- [26] Holton T.A., Cornish E.C.: Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995; 7: 1071-1083
- [27] Horbowicz M., Saniewski M.: Biosynteza, występowanie i właściwości biologiczne likopenu. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2000; 1: 29-46
- [28] Horubała A.: Pojemność przeciwutleniająca i jej zmiany w procesach przetwarzania owoców i warzyw. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 1999; 3: 30-32
- [29] Huang D., Ou B., Prior R.L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agricultural Food Chem.*, 2005; 53: 1841-1856
- [30] Hwang E., Kaneko M., Ohnishi Y., Horinouchi S.: Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 2699-2706
- [31] Jiang H., Wood K.V., Morgan J.A.: Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 2962-2969
- [32] Jones D.P., Kagan V.E., Aust S.D., Reed D.J., Omaye S.T.: Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1995; 26: 1-7
- [33] Kaneko M., Hwang E., Ohnishi Y., Horinouchi S.: Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 2003; 30: 456-461
- [34] Karoui H., Hogg N., Frejaville C., Tordo P., Kalyanaraman B.: Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 1996; 11: 6000-6009
- [35] Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M.: Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agricultural Food Chem.*, 2003; 51: 68-75
- [36] Kerr M.E., Bender C.M., Monti E.J.: An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung: J. Critical Care*, 1996; 25: 200-209
- [37] Koes R.E., Quattrocchio F., Mol J.N.: The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 1994; 16: 123-132
- [38] Kojo S.: Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 1041-1064
- [39] Korkmaz A., Reiter R.J., Topal T., Manchester L.C., Oter S., Tan D.X.: Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol. Med.*, 2009; 15: 43-50
- [40] Krishnamurthy P., Wadhvani A.: Antioxidant enzymes and human health, antioxidant enzyme, El-Missiry M.A. (red.), InTech, DOI: 10.5772/48109, 2012. <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health>
- [41] Landis G.N., Tower J.: Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.*, 2005; 126: 365-379
- [42] Leonard E., Lim K., Saw P., Koffas M.A.: Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 3877-3886
- [43] Leonard E., Yan Y., Fowler Z.L., Li Z., Lim C.G., Lim K.H., Koffas M.A.: Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol. Pharmaceutics*, 2008; 5: 257-265
- [44] Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W.: *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science*, 1992; 258: 1773-1775
- [45] Malińska D., Winiarska K.: Kwas liponowy – charakterystyka i zastosowanie w terapii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 535-543
- [46] Małecka M.: Składniki frakcji nieglicerydowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze. *Tłuszcz Jadalne*, 1995; 30: 123-130
- [47] Mandal S.S., Yadav S. Yadav, Nema R.K.: Antioxidants: a review. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2009; 1: 102-104
- [48] Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C.: Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005; 16: 577-586
- [49] Mortensen A., Skibsted L.H., Truscott T.G.: The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001; 385: 13-19
- [50] Muir S.R., Collins G.J., Robinson S., Hughes S., Bovy A., Ric De Vos C.H., van Tunen A.J., Verhoeven M.E.: Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnol.*, 2001; 19: 470-474
- [51] Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C.: Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.*, 2002; 6: 463-470
- [52] Naziroglu M., Butterworth P.J.: Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can. J. Appl. Physiol.*, 2005; 2: 172-185
- [53] Nishiyama Y., Yun C.S., Matsuda F., Sasaki T., Saito K., Tozawa Y.: Expression of bacterial tyrosine ammonia-lyase creates a novel p-coumaric acid pathway in the biosynthesis of phenylpropanoids in *Arabidopsis*. *Planta*, 2010; 232: 209-218
- [54] Packer L., Cadenas E., Davies K.L.: Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 44: 123-125
- [55] Polovka M., Brezová V., Stasko A.: Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 2003; 106: 39-56
- [56] Pryor W.A.: Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.*, 2000; 28: 141-164
- [57] Rahimi R., Nikfar S., Larjani B., Abdollahi M.: A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed. Pharmacother.*, 2005; 59: 365-373
- [58] Rahman K.: Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, 2007; 2: 219-236
- [59] Ranish J.A., Hahn S.: Transcription: basal factors and activation. *Curr. Op. Genet. Dev.*, 1996; 6: 151-158

- [60] Rice-Evans C.: Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8: 797-807
- [61] Santos C.N., Koffas M., Stephanopoulos G.: Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab. Eng.*, 2011; 13: 392-400
- [62] Schijlen E, Ric de Vos C.H., Jonker H., van den Broeck H., Molthoff J., van Tunen A., Martens S., Bovy A.: Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnol. J.*, 2006; 4: 433-444
- [63] Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C.: MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*, 2002; 23: 861-880
- [64] Setchell K.D., Cassidy A.: Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.*, 1999; 129: 758S-767S
- [65] Sévenier R., van der Meer I.M., Bino R., Koops A.J.: Increased production of nutriment by genetically engineered crops. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2002; 21: 199-204
- [66] Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H.: Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 7749-7759
- [67] Sies H., Stahl W., Sevanian A.: Nutritional, dietary and post-prandial oxidative stress. *J. Nutr.*, 2005; 135: 969-972
- [68] Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M.: Lipic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 1135-1146
- [69] Szajdek A., Borowska J.: Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004; 4: 5-28
- [70] Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R.: Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002; 2: 181-197
- [71] Troszyńska A., Bednarska A., Łatosz A., Kozłowska H.: Polyphe-nolic compounds in the seed coat of legume seeds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997; 6: 37-45
- [72] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 44-84
- [73] Verhagen J.V., Haenen G.R., Bast A.: Nitric oxide radical scavenging by wines. *J. Agricultural Food Chem.*, 1996; 44: 3733-3734
- [74] Verpoorte R., Memelink J.: Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr. Op. Biotechnol.*, 2002; 13: 181-187
- [75] Vinson J.A., Dabbagh Y.A.: Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutr. Res.*, 1998; 18: 1067-1075
- [76] Vom Endt D., Kijne J.W., Memelink J.: Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 2002; 61: 107-114
- [77] Wang Y., Chen S., Yu O.: Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011; 91: 949-956
- [78] Wang Y., Halls C., Zhang J., Matsuno M., Zhang Y., Yu O.: Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metab. Engineer.*, 2011; 13: 455-463
- [79] Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C.: Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem*, 2004; 5: 500-507
- [80] Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C.: Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BCM Biotechnology*, 2006; 6: 22
- [81] Wilska-Jeszka J.: Struktura i właściwości antyoksydacyjne polifenoli. *Materiały II Konferencji Naukowej „Żywność a Zdrowie”, Łódź 1999; 27-36*
- [82] Yan Y., Kohli A., Koffas M.A.: Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 5610-5613
- [83] Yan Y., Li Z., Koffas M.A.: High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengineer.*, 2008; 100: 126-140
- [84] Yazaki K.: Transporters of secondary metabolites. *Curr. Op. Plant Biol.*, 2005; 8: 301-307
- [85] Zieliński H.: Low molecular weight antioxidants in the cereal grains – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2002; 1: 3-9

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.