

Adsorbenskultur – ein Weg zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion in pflanzlichen Suspensionskulturen

Adsorbent Culture – Method for the Enhanced Production of Secondary Substances in Plant Suspension Cultures

Bernd Knoop und Rolf Beiderbeck

Botanisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 360, D-6900 Heidelberg

Z. Naturforsch. **38c**, 484–486 (1983);
received February 10, 1983

Matricaria, Suspension Culture, Coniferyl Aldehyde, Accumulation, Adsorbent

A crown-gall suspension of *Matricaria chamomilla* L. was cultivated in the presence of an adsorbent (activated charcoal, AC). The culture produces besides other secondary products coniferyl aldehyde which is excreted by the cells and distributed between cells, medium, and the AC according to equilibrium distributions with more than 95% of the substance adsorbed to the AC. This deprivation of coniferyl aldehyde from the medium enables the cells to increase the production of this substance up to 60-fold.

The system *Matricaria*/coniferyl aldehyde serves as a model for the improvement of the production of secondary products by means of plant cell suspensions.

Einleitung

Viele Pflanzenarten produzieren und akkumulieren Stoffwechselprodukte, die als Arznei- und Parfümgrundstoffe von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung sind [1]. Versuche, diese Substanzen aus Zell-Suspensionskulturen der entsprechenden Pflanzen zu gewinnen, sind – mit wenigen Ausnahmen – fehlgeschlagen; die große Mehrheit der Kulturen synthetisiert Sekundärstoffe gar nicht oder nur in sehr geringer Menge [2]. Eine Reihe von Gründen ist ausführlich diskutiert worden [3]. Eine weitere, kaum untersuchte Ursache für die Begrenzung von Sekundärstoffproduktionen *in vitro* könnte darin bestehen, daß bereits geringe Konzentrationen von Sekundärstoffen in der Umgebung der Zellen deren weitere Produktion unterbinden. Ständiger Entzug dieser Substanzen durch Zugabe eines „Akkumulationsortes“ zur Kultur könnte solche Hemmungen aufheben. Für lipophile Substanzen konnte diese Überlegung bereits bestätigt werden [4, 5]. Hier soll nun gezeigt werden, daß durch Zugabe eines geeigneten Adsorbens zum Kulturmedium die Akkumulation weiterer, auch nicht lipophiler Substanzen gefördert werden kann.

Sonderdruckanforderungen an Dr. B. Knoop.
0341-0382/83/0500-0484 \$ 01.30/0

Material und Methoden

Zellkultur

Eine Crown-Gall-Suspensionskultur von Kamille (*Matricaria chamomilla* L.) wurde in MS-Medium [6] ohne Phytohormone, aber mit erhöhter Thiaminkonzentration (0,5 mg/l) kultiviert. Kulturbedingungen: 25 °C; Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden, 600 Lux in der Lichtphase; Schüttelfrequenz 100 U/min; wöchentliche Passage von 3 ml Kultur zu 20 ml frischem Medium in 200-ml-Flaschen.

Adsorbenskultur

Zur Etablierung von Adsorbenskulturen wurde solchen Ansätzen als Adsorbens für Sekundärstoffe 0,2–1 g Aktivkohle (AC, granuliert, 2,5 mm Ø, Merck, Darmstadt) zugesetzt. Während der Schüttelkultur bewegt sich das AC-Granulat ständig durch die Zellsuspension.

Gewinnung von Sekundärstoffen liefernden Fraktionen

Zellsuspension und AC-Granulat wurden nach 1 Woche Kultur durch Abdekantieren und Waschen mit dest. Wasser voneinander getrennt und auf Sekundärstoffgehalt untersucht:

- aus der AC-Fraktion wurden die Sekundärstoffe direkt eluiert (s. u.);
- aus der Zellsuspension wurde das Medium durch Abnutschen von den Zellen befreit, mit AC-Granulat (0,2 g/23 ml Medium) versetzt und für 8 bis 16 Stunden unter Kulturbedingungen geschüttelt. Anschließend wurde die AC aus dem Medium herausgefiltert und ebenfalls eluiert (s. u.). Da die Bindung von affinen Sekundärstoffen an AC sehr schnell erfolgt [9], gilt dieser Wert als Maß für den Sekundärstoffgehalt im Medium.

Elution von Sekundärstoffen aus AC und Einengen

Aus 0,2 oder 1 g AC wurde nach Zermörsern mit einem Gemisch aus Ethanol/1 N KOH (4 + 1) ein gelbes Eluat ausgewaschen. Die Elution wurde so lange fortgeführt, bis kein Farbstoff mehr freigesetzt wurde. Die dazu benötigte Lösungsmittelmenge und deren Extinktion ($\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$) dienen zur relativen Mengenbestimmung (s. Tab.).

Das gesamte Eluat wurde mit 1 N HCl angesäuert und das Ethanol bei 75 °C abrotiert. Der saure, wäßrige Rückstand wurde zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten Ethylacetatpha-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

sen zur Trockne eingengt. Der braunrote Rückstand wurde in Methanol/1 N HCl (30 + 1) gelöst.

Charakterisierung des Sekundärstoffgehaltes in AC-Eluaten

Aus AC-Fractionen gewonnene Sekundärstoffe wurden mit unterschiedlichen Methoden näher charakterisiert:

- Im Roheluat durch spektralphotometrische Bestimmung des Absorptionsspektrums gegen Elutionsmittel;
- DC-Chromatographie des eingengten Eluats an Kieselgel G (Merck).
Laufmittel 1: Benzol/Ethylacetat/Essigsäure 85 + 15 + 1;
Laufmittel 2: Chloroform/Methanol/Essigsäure 60 + 10 + 1 [7]. Anschließend Sprühen mit 1 N KOH.
- 300-MHz-Protonenresonanzspektrometrie einer angereicherten und mehrfach durch DC gereinigten Fraktion des Eluats im Lösungsmittel $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$.

Ergebnisse

Wachstum der Suspensionskultur in Gegenwart des Adsorbens AC

Die Crown-Gall-Suspensionskultur besteht aus kleinen Aggregaten und einzelnen Zellen und wächst mit einer Generationszeit von 1,5 bis 2 Tagen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase. In 1 Woche hat sie das 6- bis 10fache ihres Ausgangsgewichtes erreicht.

Dieses Wachstumsverhalten wird durch den Zusatz von 0,2 g AC zu 23 ml Kultur wenig beeinträchtigt. Steigert man jedoch die AC-Menge, so werden mit zunehmendem Kohlezusatz immer geringere Frischgewichte pro Woche erreicht, bis bei 2 g AC pro 23 ml Kultur überhaupt kein Wachstum mehr festzustellen ist (Tab.).

Nachweis und Mengenbestimmung von Sekundärstoffen in AC-Fractionen

Nach unserer Hypothese sollten von den Kamille-Zellen produzierte Sekundärstoffe im Laufe der Kultur an das AC-Granulat adsorbiert werden. Es wurde daher versucht, mit verschiedenen Lösungsmitteln Substanzen aus der für eine Woche mit den Zellen kultivierten AC zu eluieren. Als geeignetes Lösungsmittel erwies sich ein Gemisch aus Ethanol/

Tabelle. Einfluß von AC auf das Wachstum der Crown-Gall-Suspensionskultur und die Produktion gelbgefärbter Substanzen durch diese Kultur. Wachstum: Angegeben sind Mittelwerte aus 4–6 Experimenten mit je 5 Parallelansätzen. Ausgangsgewichte pro Flasche 0,2–0,36 g Gewebe. Gelbgefärbte Substanzen: Angegeben in relativen Einheiten. In Klammern Standardabweichungen.

Zusatz	Frischgew. g/Flasche	Gelbgefärbte Substanzen aus	Menge gelbgefärbter Substanzen $E_{412} \times \text{ml Eluat}$ g Frischgew.
–	1,99	verbrauchtem Medium	6,2 (2,8)
0,2 g AC	1,60	AC verbrauchtem Medium	104,8 (26,4) 4,3 (3,3)
1,0 g AC	0,77	AC verbrauchtem Medium	354,9 (93,3) 0,3 (0,5)

1 N KOH (4 + 1), das große Mengen gelbgefärbter Substanzen freisetzt. Ein damit gewonnenes Eluat zeigt bei basischem pH ein Hauptabsorptionsmaximum bei 412 nm.

Die farbgebende(n) Substanz(en) findet(n) sich nur in sehr geringer Menge im Medium von kohlefrei kultivierten Zellen oder in AC, die für 1 Woche mit toten Zellen unter Kulturbedingungen inkubiert wird. Sie fehlen völlig in reiner AC und in AC, die für 1 Woche mit reinem Nährmedium (ohne Zellen) inkubiert wird.

Lebende Zellen der Kamille-Suspensionskultur geben demnach Substanz(en) in beträchtlicher Menge an das Medium und von dort in die AC ab.

Die Menge von einer Zellsuspension an ihre Umgebung (Medium, Medium + Aktivkohle) abgegebenen Substanz(en) hängt wesentlich von den Kulturbedingungen ab (Tab.). In Abwesenheit von Aktivkohle produzieren die Zellen nur wenig Substanz; Zusatz von 0,2 g AC zu 23 ml Kultur steigert die Produktion auf das 20fache, Zusatz von 1 g AC auf das 60fache, bezogen auf das Frischgewicht der Zellen.

Der größte Teil (ca. 95%) der von einer Adsorbenskultur produzierten Sekundärstoffmenge liegt an die AC adsorbiert vor. Mit steigender Menge AC läßt sich dieser Anteil erhöhen (Tab.). Interessanterweise ist der Gehalt an Substanz(en), die bei 412 nm absorbiert(en), im Medium von kohlefrei kultivierten Zellen und in der Mediumfraktion nach Kultur mit 0,2 g AC nahezu identisch.

Identifizierung eines Sekundärstoffes aus der AC

Das aus der AC gewonnene Eluat wurde nach Einengen dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei zeigten sich nach Verwendung des Laufmittels 1 mehr als 20 deutlich im UV (366 nm) fluoreszierende oder löschende Banden. Eine dieser Banden mit einem R_F -Wert von 0,35 im Laufmittel 1 zeigte eine schwach gelbe Eigenfärbung und färbte sich nach Sprühen der Chromatogramme mit 1 N KOH intensiv gelb-orange. Von allen an die AC adsorbierten Substanzen wurde allein diese Bande weiter untersucht.

Reinigung durch DC und Anreicherung ließen die Gewinnung präziser Absorptionsspektren bei saurem und basischem pH zu. Sie waren in allen Einzelheiten mit dem Absorptionsspektrum des Coniferylaldehyds [8] identisch. Eine Analyse der gereinigten Substanz mit Hilfe der 300-MHz-Protonenresonanzspektrometrie bestätigte die Struktur des Coniferylaldehyds.

In zwei Experimenten gaben insgesamt 22 g Gewebe in 420 ml Kulturmedium in einer Woche 13,5 mg dieser Substanz an das Adsorbens AC ab.

Diskussion

Lebende Zellen einer Crown-Gall-Suspensionskultur von *Matricaria chamomilla* produzieren *in vitro* u. a. Coniferylaldehyd und setzen ihn ins umgebende Medium frei, bis für diese Substanz zwischen Zellen und Medium eine Gleichgewichtsverteilung erreicht ist. Diese Gleichgewichtsverteilung stellt sich bereits bei geringen Konzentrationen des Coniferylaldehyds im Medium ein (Rel. Einheiten: 6). Setzt man einer solchen Zellkultur AC in Konzentrationen zu, die das Zellwachstum nur wenig beeinflussen, dann wird eine weitere Gleichgewichtsverteilung für den Coniferylaldehyd angestrebt, nämlich zwischen Medium und AC. Die AC adsorbiert aus dem Medium Coniferylaldehyd bis zur Gleichgewichtsbeladung [9]. Damit existieren unter solchen Bedingungen der Adsorbenskultur 2

Gleichgewichtsverteilungen für den Coniferylaldehyd:



Die von der AC aus dem Medium adsorbierte Menge Coniferylaldehyd wird von den Zellen ins Medium hinein ergänzt, und damit wird in der Bilanz die Produktion bis auf das 60fache gesteigert (rel. Einheiten: 350). Das Ausmaß dieser Steigerung ist abhängig von der Menge AC im Kulturmedium. Der größte Teil des in einer solchen Adsorbenskultur außerhalb der Zellen vorhandenen Coniferylaldehyds, nämlich mehr als 95%, wird am Adsorbens AC, das als Akkumulationsort dient, gespeichert und kann von dort zurückgewonnen werden. Die Gleichgewichte liegen offenbar weit auf der rechten Seite des aufgezeichneten Schemas und werden um so weiter nach rechts verschoben, je mehr AC vorhanden ist (vgl. Konzentration in den verbrauchten Medien bei Verwendung von 0,2 bzw. 1 g AC, Tab.). Damit ist ein praktikabler Weg zur Gewinnung von Sekundärstoffen aus Zellkulturen aufgezeigt: Produktionssteigerung und Anreicherung der gesuchten Substanz aus dem Medium heraus an ein Adsorbens. Für eine allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode sprechen folgende Gesichtspunkte: Neben dem Coniferylaldehyd finden sich in den entwickelten DCs viele weitere Substanzen; Einsatz des Verfahrens bei einer Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* L. liefert ebenfalls gesteigerte Mengen mehrerer Substanzen in der AC-Fraktion. Mögliche Verbesserungen der Methode lassen sich mühelos aufzeigen: Verwendung weiterer Elutionsmittel für AC; Variation des AC-Typs und der AC-Granulierung; Verwendung weiterer Adsorbentien, die u. U. mit größerer Spezifität an die zu gewinnenden Sekundärstoffe angepaßt sind.

Dank

Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Weinges, Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg für die Aufnahme und Interpretation des 300-MHz-Protonen-Resonanzspektrums und Frau R. Hohl für wertvolle technische Hilfe.

- [1] R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser-Verlag, Basel, 1962–1973.
- [2] B. E. Ellis, IAPTC Newsletter **38**, 13 (1982).
- [3] E. Teuscher, Pharmazie **28**, 6 (1973).
- [4] R. Beiderbeck, Z. Pflanzenphysiol. **108**, 27 (1982).
- [5] W. Bisson, R. Beiderbeck u. J. Reichling, Planta Med. (im Druck).

- [6] T. Murashige u. F. Skoog, Physiol. Plant **15**, 473 (1962).
- [7] E. Stahl, Dünnschichtchromatographie. 2. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg 1967.
- [8] G. Aulin-Erdtman, Svensk Papperstidning **56**, 91 (1953).
- [9] J. S. Mattson, H. B. Mark, Activated Carbon, Marcel Dekker, Inc., New York 1971.