



Einleitung

Moringa oleifera Lam. (1785), auch als „Tree of Life“ bekannt und zu den Moringaceae gehörend, ist eine Pflanze mit vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten. *M. oleifera* als bekannteste und am weitesten verbreitete von insgesamt 13 Arten (Antwi-Boasiako & Enniful, 2011) erlangte in den vergangenen Jahren in Form von Tees, Kosmetika und Nahrungsergänzungsmitteln weltweit immer mehr Bekanntheit. Die unterschiedlichen Pflanzenorgane von *M. oleifera* werden hierbei auf ganz verschiedene Art genutzt. So wird mikrobiell kontaminiertes Grundwasser in armen Regionen (u. a. Ägypten und Sudan) mit Hilfe von Pulver aus den Samen von *M. oleifera* kostengünstig auf Trinkwasserqualität gereinigt. *M. oleifera* dient hier als Coagulant (Foidl et al., 2001; Mangale Sapana et al., 2012). Auch besitzt das Öl der Samen, bekannt als „Ben Oil“, Eigenschaften volatile Stoffe zu binden und sehr stabil sowie langlebig zu sein (Foidl et al., 2001; Ramachandran et al., 1980). Daher wird es in der Kosmetik- und Parfümindustrie sowie als Schmiermittel in der Feinmechanik eingesetzt (Foidl et al., 2001; Ramachandran et al., 1980). Blattpulver von *M. oleifera* wird u. a. als Viehfutter verwendet (Kholif et al., 2015; Sultana et al., 2015), während die Rinde zur Herstellung von Seilen, Matten, Papier (Ramachandran et al., 1980) und Gerbstoffen (Mehta et al., 2011) dient. Aus den Blättern kann ein Extrakt generiert werden, welches u. a. Hormone des Cytokinintyps enthält, und daher wachstumsfördernd wirken können. Dieses kann höhere Erträge, mehr und größere Früchte, eine erhöhte Resistenz gegenüber Krankheiten und Krankheitserreger, höhere Keimungsraten und vieles mehr bei verschiedenen Pflanzenarten zur Folge haben (Foidl et al., 2001; Iqbal et al., 2015; Yasmeen et al., 2012). Besonders verbreitet ist jedoch die Verwendung von frischen Blättern von *M. oleifera* sowie Blattpulvern als Nahrungsmittel bzw. Nahrungsergänzungsmittel oder „Functional Food“ (Anwar et al., 2007). Die Blätter von *M. oleifera* stellen eine wichtige Proteinquelle dar. Weiterhin sind sehr hohe Gehalte an Kalium, Calcium, Eisen und vielen Vitaminen wie u. a. Provitamin A (β -Carotin), C oder Vitamin E (α -Tocopherol) beschrieben (Foidl et al., 2001; Ramachandran et al., 1980; Yang et al. 2006). Da *M. oleifera* als trockenresistent gilt und seine Blätter erst spät in der Trockenzeit abwirft, dienen diese Blätter in einigen tropischen Ländern als einzige Quelle von Proteinen und Nährstoffen in der Trockenzeit. Aus diesem Grunde findet man den ursprünglich aus den Subhimalaya-

Gebieten von Nordindien, Pakistan, Bangladesch und Afghanistan stammenden Baum heute weitverbreitet in tropischen und subtropischen Gebieten, besonders in Ost- und Südafrika, sowie in Asien (Fahey, 2005; Fuglie & Sreeja, 2001). Hier wird *M. oleifera*, dessen Blätter mehrmals jährlich geerntet werden können, in Plantagen angebaut (u. a. Fuglie & Sreeja, 2001; Palada & Chang, 2003). Das frisch geerntete Pflanzenmaterial wird dann auf regionalen Märkten verkauft. Besonders in den afrikanischen Tropen spielt *M. oleifera* zur Bekämpfung von Hunger und insbesondere Mangelernährung eine entscheidende Rolle (Thurber & Fahey, 2009). So werden Blätter von *M. oleifera* schwangeren bzw. stillenden Frauen sowie Kindern in Form von Pulvern verabreicht. Darüber hinaus werden sie frisch verzehrt. Bei mangelernährten Kindern konnte der Ernährungs- und Gesundheitszustand hierdurch deutlich verbessert werden (signifikante Gewichtszunahme: Srikanth et al., 2014; bessere Gesundheit: Price, 2007). Weiterhin zeigten die Säuglinge direkt nach der Geburt ein höheres Gewicht und die Mütter produzierten mehr Milch zum Stillen der Kinder (Fuglie, 2001; Price, 2007).

Neben den genannten Verwendungsmöglichkeiten ist weiterhin eine vielseitige Einsetzbarkeit von *M. oleifera* als pflanzliches Arzneimittel hervorzuheben. Südafrikanische Stämme nutzen Extrakte, Sude, Breie, Öle, Salben und Pulver aus *M. oleifera*, um Entzündungen, Infektionskrankheiten, Fieber, Schwellungen, Kopfschmerzen, abdominale Tumore, Herz-Kreislauf-Beschwerden, Magen-Darm- und Nervenerkrankungen zu behandeln (reviewed in Mahmood et al., 2010; Sreelatha et al., 2011). Auf Basis dieses Stammeswissens und der mündlichen Überlieferungen von Wirksamkeiten begann eine Vielzahl an Autoren diese in wissenschaftlichen Studien zu analysieren (Anwar et al., 2007; reviewed in Fahey, 2005). U. a. konnten antibiotische, antimikrobielle (Cáceres et al., 1991; Eilert et al., 1981; Nikkon et al. 2003), antiinflammatorische (Cáceres et al., 1992; Ezeamuzie et al., 2008), antioxidative (Atawodi et al., 2010; Chumark et al., 2008; Kumar et al., 2012; Verma et al., 2009) und antikarzinogene (Bharali et al., 2003; Budda et al., 2011; Costa-Lotufo et al., 2005; Khalafalla et al., 2010; Parvathy & Umamakeskwari, 2007) Effekte von *M. oleifera*, meist in Gesamtextrakten der unterschiedlichen Pflanzenorgane, nachgewiesen werden. Diese Wirksamkeiten werden, wie auch schon bei anderen Pflanzenfamilien (z. B. Labiatae oder Zingiberaceae), auf die in der Pflanze vorkommenden sekundären Inhaltsstoffe zurückgeführt (reviewed in Craig, 1999). Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

in *M. oleifera* sind Flavonoiden, Saponine, Phenolsäuren, Carotinoide und Glucosinolate (Förster et al., 2015a; Sharma & Paliwal, 2014; Shidduraju & Becker, 2003; Yang et al., 2006). Nur vereinzelt untersuchten Wissenschaftler in *in vitro*- und *in vivo*-Studien die genannten Effekte von einzelnen chemischen Verbindungen bzw. Inhaltsstoffgruppen von *M. oleifera* (Guevara et al., 1999; Murakami et al., 1998; Sharma & Paliwal, 2014). Die medizinische Wirksamkeit, im Besonderen das antioxidative und/oder antikarzinogene Potential, wird zum großen Teil auf die in allen Pflanzenteilen von *M. oleifera* enthaltenen Glucosinolate bzw. deren Hydrolyseprodukte zurückgeführt (Bennett et al., 2003). Eine Vielzahl an epidemiologischen Studien korrelierte eine erhöhte Aufnahme an Kohlgemüse mit einer protektiven Wirkung gegen Krebs. So erklärten Kirsh et al. (2007), dass das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken mit der erhöhten Aufnahme von Kohlgemüse, speziell Brokkoli und Blumenkohl, reduziert werden kann. Verhoeven et al. (1996) verglichen die Ergebnisse von sieben Kohortenstudien und 87 Fall-Kontroll-Studien und stellten inverse Zusammenhänge zwischen dem Konsum von verschiedenen *Brassica*-Gemüsen und dem Krebsrisiko heraus. 67 % der Fall-Kontroll-Studien zeigten, dass sich ein erhöhter *Brassica*-Verzehr krebsreduzierend auswirkte (70, 56 und 67 % für Kohl, Brokkoli und Blumenkohl). Alle diese Studien führen die protektiven Effekte auf die in *Brassica* enthaltenen Glucosinolate, bzw. deren bioaktive Hydrolyseprodukte, zurück. So wurden dem Isothiocyanat von Glucoraphanin, Sulforaphan, welches in hohen Konzentrationen in Brokkoli nachzuweisen ist, chemoprotektive Effekte zugeschrieben (Review von Clarke et al., 2008). Die von Clarke et al. (2008) zitierten Studien untersuchten die Regulierung von Phase I- und Phase II-Enzymen und stellten fest, dass Sulforaphan die Krebs-Initiationsphase durch die Hemmung von Phase I-Enzymen und Stimulierung von Phase II-Enzymen blockieren kann. Auch Benzyl-Isothiocyanat bewirkte ein unterdrücktes Wachstum von Brustkrebszelllinien durch Zellzyklus-Arrest sowie Apoptoseinduktion (Xiao et al., 2006). *M. oleifera* besitzt im Vergleich zu anderen Pflanzen, welche Glucosinolate enthalten, sehr hohe Konzentrationen an diesen (Bennett et al., 2003; Förster et al. 2015a; Yang et al. 2006). Weiterhin ist ein zusätzlicher Zucker, die Rhamnose, am Benzolring des aromatischen Glucosinolates gebunden, welcher dem Molekül eine im Pflanzenreich sehr seltene Struktur verleiht.

Ein wichtiges Ziel vieler Forscher ist es, der Heilung bzw. Bekämpfung von Krebs näher zu kommen und die dahinter stehenden biologische Prozesse besser verstehen zu lernen. Dazu bedarf es der Aufklärung von Mechanismen und Abläufen der Krebsentstehung sowie der Identifizierung krebsfördernder und –hemmender Einflüsse. Sicherlich ist es möglich mit der Hilfe von Chemo- und Strahlentherapie als auch mit immer besser werdenden chirurgischen Techniken sowie mit einer zielgerichteten Therapie (z. B. mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern) verschiedene Tumorarten mit hohen Erfolgsraten zu bekämpfen. Jedoch gilt Krebs noch immer als häufigste Todesursache auf der Welt (8,2 Millionen krebsbedingte Sterbefälle 2012; Stewart & Wild, 2014). Weltweit wurden 2012 14 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert, 3,2 Millionen davon allein in Europa (Torre et al., 2015). Im Jahre 2012 wurde bei 477.950 Deutschen Krebs diagnostiziert, 2016 werden schätzungsweise eine halbe Million Menschen in Deutschland neu an Krebs erkranken (RKI & GEKID, 2015). Auch wenn synthetische Arzneimittel als wirksamer gelten, stoßen Phytopharmaka auf eine immer größere Akzeptanz in unserer Gesellschaft. So betrug der Anteil der Phytopharmaka im Jahr 2014 21 % am Umsatz mit rezeptfreien Arzneimitteln im Apothekenmarkt (BAH, 2015). Wie am Beispiel von Acetylsalicylsäure gelten sie häufig als verträglicher, da die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in eine organische Umgebung eingebettet sind und maßvoll dosiert werden. Weiterhin sind in einem pflanzlichen Arzneimittel meist mehrere Wirkstoffe vereint. Noch heute sind Pflanzen, welche in traditioneller sowie Stammesmedizin aufgrund verschiedener potentiell heilender Effekte genutzt wurden und werden, daher Forschungsgegenstand. So weist auch *M. oleifera* ein hohes bioaktives Potential auf, von dem man noch nicht genau klären konnte, auf welche Inhaltsstoffe dieses zurückgeführt werden kann. Die vorliegende Dissertation soll daher einen Beitrag dazu leisten das antioxidative und antikarzinogene Potential der Glucosinolate von *M. oleifera* besser einschätzen zu können. Bedingt durch die aufeinander aufbauenden Fragestellungen ergab sich folgende Struktur der Arbeit:

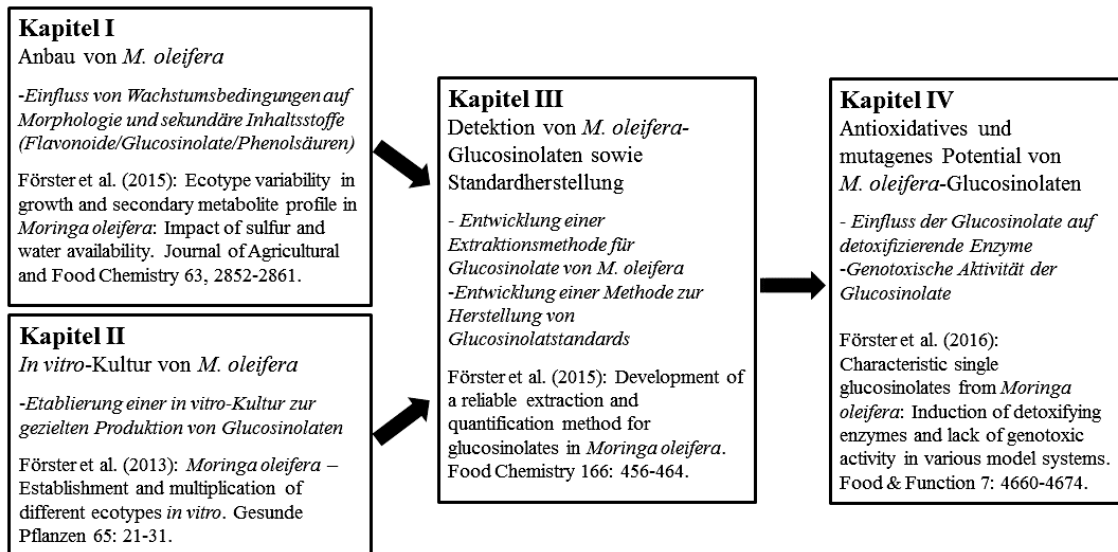


Abb. 1: Aufbau der vorliegenden Dissertation

Mit Hilfe eines gezielten Anbaus sollte im Gewächshaus (Kapitel I) sowie durch *in vitro*-Kultur (Kapitel II) Blattmaterial von *M. oleifera* produziert werden, welches ausreichende Mengen an Glucosinolaten beinhaltet. Die Blätter dienen als Grundlage für die Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens dieser sekundären Inhaltsstoffe (Kapitel III). Stabile Glucosinolatstandards (Gesamtextrakt sowie Einzelsubstanzen) wurden hergestellt (Kapitel III), um im Folgenden potentielle medizinische Wirksamkeiten dieser aus *M. oleifera* isolierten Substanzen zu untersuchen (Kapitel IV).





Kapitel I - Anbau von *M. oleifera*

M. oleifera weist im Vergleich zu anderen Arten der Gattung *Moringa* enorm hohe Glucosinolatgehalte auf (Bellostas et al., 2010). Neben Diversitäten im Inhaltsstoffprofil konnten auch Unterschiede im Wuchsverhalten oder in der Blattmasseproduktion festgestellt werden (Doerr et al., 2009; Palada & Chang, 2003; eigene Beobachtungen). Diese waren nicht nur interspezifisch (zwischen verschiedenen Arten) sondern auch intraspezifisch (innerhalb einer Art) nachzuweisen. Im Intensivanbau von *M. oleifera* wurden stark wachsende Ökotypen verwendet, das Inhaltsstoffspektrum spielte bis zum heutigen Zeitpunkt eine untergeordnete/keine Rolle (Palada & Chang, 2003). Variabilitäten können zum einen genetisch begründet sein (Ökotypen) und/oder aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in den Herkunftsstandorten zustande kommen (Herkünfte).

Neben der genetischen Konstitution können auch Anbaubedingungen das Wachstum sowie die Inhaltsstoffgehalte von Pflanzen, so auch *M. oleifera*, beeinflussen. Eine Vielzahl an Studien an Brassicaceen (glucosinolathaltige Pflanzen) bewies den Einfluss von Düngung auf den Glucosinolatgehalt unterschiedlichster Pflanzenorgane. Aromatische Glucosinolate, wie sie in den Blättern von *M. oleifera* vorzufinden sind, befinden sich jedoch besonders in der Wurzel oder in den Samen von Pflanzen (Bennett et al., 2004; Dam et al., 2009). Düngungsstudien über die Beeinflussung von aromatischen Glucosinolaten in Blättern sind daher rar bzw. fokussieren meist auf die aliphatischen sowie indolischen Vertreter dieser sekundären Inhaltsstoffe. Bloem et al. (2007) zeigten jedoch, dass eine erhöhte Schwefeldüngung den Glucotropaeolingehalt in den Blättern der Kapuzinerkresse um das 1,4 – 2,1-fache erhöhte. Eine erhöhte Stickstoffdüngung beeinflusste den Glucotropaeolingehalt nicht. Untersuchungen von Kopsell et al. (2007) an Wasserkresse stellten die Stickstoff- sowie Schwefeldüngung als beeinflussende Parameter für den Gehalt an aromatischen Glucosinolaten heraus. Die Autoren detektierten in Wasserkresse Glucosinalbin und Gluconasturtiin als aromatische Glucosinolate. Auch Trockenstress kann sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in unterschiedlichem Maße beeinflussen. So konnten Zhang et al. (2008) zeigen, dass die Konzentration von aromatischen Glucosinolaten in der Wurzel von *Brassica rapa* ssp. *rapifera* L. (Rübe) abhängig von der Anbauzeit durch eine unterschiedliche

Wasserversorgung variieren konnte. Auch wurde der Glucosinolatgehalt des Rapssamens durch Trockenstress zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungszeiten positiv oder negativ beeinflusst (Bouchereau et al., 1996). Bloem et al. (2014) veröffentlichten eine Studie, in der sie zeigten, dass Trockenstress die Glucotropaeolinkonzentration in Kapuzinerkresse erhöhte, die Biomasse sank jedoch gleichzeitig ab.

Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Herkünfte von *M. oleifera* phänotypische Unterschiede zeigten, der Baum generell als trockenresistent gilt (Anbau in Tropen und Subtropen) und enorm hohe Gehalte an Glucosinolaten (schwefelhaltigen Verbindungen) sowie hohe Gehalte an Flavonoiden (UV-Pigmente) aufweist, sollten folgende Sachverhalte untersucht werden:

- *Unterscheiden sich die Ökotypen/Herkünfte morphologisch phänotypisch (Biomasse, Höhe)/oder chemisch phänotypisch (Gehalt und Spektrum an sekundären Inhaltsstoffen) bei gleichen Wachstumsbedingungen?*
- *Können wir von der Existenz verschiedener M. oleifera-Ökotypen ausgehen oder handelt es sich um unterschiedliche Herkünfte?*
- *Ist ein Trade off zwischen Wachstum und Inhaltsstoffproduktion zu beobachten?*
- *Kann man einen „Top“-Ökotypen identifizieren, welcher eine hohe Biomasse und hohe Gehalte an Sekundärmetaboliten vereint?*
- *Wie wirken sich Trockenheit und Schwefeldüngung auf das Pflanzenwachstum sowie die sekundären Inhaltsstoffe (Glucosinolate und Flavonoide) von M. oleifera aus? Wie reagieren die verschiedenen Ökotypen?*
- *Kann man Rückschlüsse auf optimale Anbaubedingungen für M. oleifera ziehen?*

Die in diesem Kapitel dargestellten Fragestellungen werden in folgender Publikation behandelt:



Förster, N.; Ulrichs, C.; Schreiner, M.; Arndt, N.; Schmidt, R. & Mewis, I. (2015): Ecotype variability in growth and secondary metabolite profile in *Moringa oleifera*: Impact of sulfur and water availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 2852-2861.



Abstract

Moringa oleifera is widely cultivated in plantations in the tropics and subtropics. Previous cultivation studies with *M. oleifera* focused primarily only on leaf yield. In the present study the contents of potentially health-promoting secondary metabolites, (glucosinolates, phenolic acids, and flavonoids) were also investigated. Six different ecotypes were grown under similar environmental conditions to identify phenotypic differences that can be traced back to the genotype. The ecotypes TOT4880 (origin USA) and TOT7267 (origin India) were identified as having the best growth performance and highest secondary metabolite production, making them an ideal health-promoting food crop. Furthermore, optimal cultivation conditions - exemplarily on sulfur fertilization and water availability - for achieving high leaf and secondary metabolite yields were investigated for *M. oleifera*. In general, plant biomass and height decreased under water deficiency compared to normal cultivation conditions, while the glucosinolate content increased. The effects depended to a great extent on the ecotype.

Introduction

Moringa oleifera Lam., the main representative of the order *Moringa* and originally native to the sub-Himalayan region, is commonly grown on plantations in Asia and Africa (Fuglie et al., 2001). All plant parts of *M. oleifera* are edible and contain a multitude of nutrients such as high levels of essential amino acids, iron, calcium, and carotenoids (Ferreira et al., 2008). *M. oleifera* can be cultivated in different ways, but more often the tree is cultivated intensively in plantations to harvest large quantities of leaf material (Fuglie et al., 2001; Gamatie, 2001; Olivier; Palada, 1995; Palada & Chang, 2003; Radovich). Especially in Asia and Africa this tree is cultivated commercially (Bellostas et al., 2010; Fahey, 2005; Gamatie, 2001; Radovich; Saha et al., 2012). Bellostas et al. (2010) reported that *Moringa* leaves rank first among the most widely consumed leafy vegetables in Niger. *M. oleifera* leaves provide a good basis for satisfying the population's nutritional needs. Additionally, *M. oleifera* is known to be drought resistant and is therefore an important source of food during the dry season, especially in the African tropics (Thurber & Fahey, 2009).