

1. Einleitung

Phototrophe Organismen, wie z.B. Pflanzen und Cyanobakterien, bilden eine Vielzahl von biotechnologischen Wert- und pharmazeutischen Wirkstoffen. Bei den Pflanzen sind dies u.a. Nahrungsergänzungsmittel (wie z.B. essentielle Öle, Rosmarinsäure), natürliche Farbstoffe, Biopestizide und Phytotherapeutika, zu denen auch Phenolderivate und Terpensäuren aus der Gruppe der Triterpene gehören (Gibbs 1974, Banthorpe et al. 1989, Luis et al. 1992, Ulubelen&Topcu 1992). Aus Gründen der Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Oberbegriff „Triterpene“ auch für alle davon abgeleiteten Derivate verwendet. Im Jahr 2008 betrug das Handelsvolumen von Wirkstoffen aus Pflanzen etwa 2 Milliarden US-Dollar (Bäcker et al. 2015). An dieser Gesamtsumme haben die Terpene den größten Anteil und verzeichnen darüber hinaus den höchsten jährlichen Zuwachs (Bäcker et al. 2015). Die Herstellung erfolgt dabei meistens durch Isolation der Terpene aus verschiedenen Teilen unterschiedlicher Pflanzen (Janicsák et al. 2003, Janicsák et al. 2006). Dies birgt das Problem eines stark schwankenden saisonalen und artspezifischen Gehaltes der Zielsubstanzen sowie der Sensitivität gegenüber verschiedener Anbaubedingungen (Schädlinge, Krankheiten, klimatische und geografische Einflüsse usw.) (Mulabagal&Tsay 2004). Als Alternative dazu hat sich die *in vitro* Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen entwickelt, welche eine ganzjährige Produktion ohne Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren ermöglicht. So lassen sich sowohl gleichbleibende Qualität als auch Quantität der Produkte realisieren.

Auf der Seite der Cyanobakterien zählen zu den Wertstoffen z.B. Lebensmittelfarbstoffe, wie Carotinoide und Chlorophylle, Nahrungsergänzungsmittel und Biokraftstoffe (Benedetti et al. 2010, Malcata 2011, Milledge 2011). Des Weiteren können Cyanobakterien große Mengen an extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) produzieren, die z.T. von wirtschaftlichem Interesse sind und manchmal sogar 50% bis 90% des gesamten Kohlenstoffgehalts der Cyanobakterien ausmachen (Nielsen&Jahn 1999). Den größten Anteil der EPS stellen Polysaccharide dar, wovon insbesondere die sulfatierten Polysaccharide eine pharmakologische Wirksamkeit zeigen und daher für die medizinische Forschung von Bedeutung sind (Namikoshi&Rinehart 1996). Ferner wurden antivirale Substanzen, Immunsuppressiva und Substanzen mit fungizider Wirkung nachgewiesen (Falch 1996, Pulz&Gross 2004, Muller-Feuga et al. 2007). Weitere wertvolle Substanzen, wie Stoffwechselmetabolite mit antioxidativen Wirkungen und Glyco- und Phospholipide, die in der Kosmetikindustrie Verwendung finden, können ebenfalls aus Cyanobakterien gewonnen werden (Muller-Feuga et al. 2007). Die wirtschaftliche Bedeutung von Produkten aus Mikroalgen (zu denen in diesem



Fall auch Cyanobakterien gezählt werden) betrug im Jahr 2004 schon über 5 Milliarden US-Dollar (Pulz&Gross 2004).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es nun, im Rahmen der durch die DFG geförderten Projekte UL 170/8-1 und UL 170/7-1 jeweils die Bildung der Wertsbstanzen zu untersuchen und zu optimieren.

2. Fermentation von *Salvia officinalis* zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen

Dieses Kapitel der Dissertation befasst sich mit der Kultivierung von *Salvia officinalis* zur Produktion der pflanzlichen Triterpene Oleanolsäure und Ursolsäure. Beide bieten ein hohes pharmazeutisches Potential und sind daher als biotechnologische Wertstoffe interessant.

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Im Rahmen des von der DFG geförderten Projektes „Gewinnung von pharmakologisch relevanten Triterpenen aus pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel von Oleanol- und Ursolsäure“ (UL 170/8-1) soll untersucht werden, inwieweit über pflanzliche Zellkulturen die genannten Triterpene, sowohl in ausreichender Quantität als auch Qualität, hergestellt werden können. Darüber hinaus soll eine mögliche Modifikation der Triterpene mittels Biotransformation und isolierter Enzyme genauer betrachtet werden. Ziel des Projektes ist die Etablierung eines Gesamtprozesses, in dem die Schritte der Kultivierung, Produktbildung, Aufarbeitung und Biotransformation in einer Anlage zusammen stattfinden.

Ein Großteil dieser Aufgaben wurde bereits in einer vorherigen Dissertation am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern untersucht (Ludwig 2014), wobei für die Kultivierung stets eine heterotrophe Prozessstrategie verwendet wurde. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass durch die Verwendung von Licht die Ausbeute an Sekundärmetaboliten ggfs. weiter gesteigert werden kann (Fett-Neto et al. 1995, Wang et al. 2012). Auch Elicitoren wurden bereits erfolgreich für diesen Zweck eingesetzt (Mulabagal&Tsay 2004).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit zwei bereits genetisch veränderten Stämmen von *Salvia officinalis* zu untersuchen, ob die Synthese der pflanzlichen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure durch eine photo-mixotrophe Kultivierung weiter verbessert werden kann. Daher wird die Bildung der Triterpene zunächst in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtstärken in unterschiedlichen Kultivierungssystemen untersucht und die jeweilige Produktivität bestimmt. Eine besondere Herausforderung ist hierbei die notwendige Bestimmung der Biomasse, welche aufgrund der Bildung von Zellagglomeraten erschwert ist (Andersen 2005). Die erhaltenen Ergebnisse sollen anschließend in Relation zu den Daten der heterotrophen Kultivierungen aus der Dissertation von (Ludwig 2014) gesetzt werden, um einen direkten Vergleich zu erhalten. Zusätzlich soll getestet werden, welchen Einfluss Pektinase als Elicitor auf die Synthese und die Produktivität der Triterpene hat. Dazu sollen verschiedene Konzentrationen von Pektinase,



jeweils unter gleichen Kultivierungsbedingungen, bei einer Fermentation mit und ohne Licht, untersucht werden.

Insgesamt ist somit das Ziel, durch die Verwendung von Licht und eines Elicitors, die Bildung und Produktivität der Oleanol- und Ursolsäuresynthese bei der Kultivierung von *Salvia officinalis* zu verbessern, um den eingangs dargestellten Gesamtprozess zu optimieren.

2.2 Stand der Technik zur Kultivierung von *Salvia officinalis*

Zu der Gattung *Salvia* gehören mehr als 700 verschiedene Arten, die eine ungewöhnlich große Menge an Sekundärmetaboliten aufweisen. Zu diesen gehören essentielle Öle, Triterpene und Phenol-Derivate (Gibbs 1974, Banthorpe et al. 1989, Luis et al. 1992, Ulubelen&Topcu 1992). Von besonderem Interesse sind dabei die Triterpene und von diesen die Positionsisomere Oleanol- und Ursolsäure. Diese Verbindungen verfügen über eine große biologische Wirksamkeit, wodurch sie in letzter Zeit häufig Gegenstand von Forschung waren. Zu den nachgewiesenen pharmazeutisch nutzbaren Eigenschaften zählen u.a. Entzündungshemmung und antitumorale Wirksamkeit.

Der Gehalt von Triterpenen in Pflanzen ist saisonal- und speziesabhängig, so dass die Konzentration von z.B. Oleanol- und Ursolsäure je nach Standort der Pflanze, Zeitpunkt der Ernte und Abstand der Pflanzen zwischen 0,54 und 4% bezogen auf die Trockenmasse schwankt (Untersuchung des DLR-Rheinpfalz). Diese Faktoren unterstützen die Bestrebungen zur reproduzierbaren Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Labor. Bereits veröffentlichte Arbeiten variieren allerdings deutlich hinsichtlich der Kultivierungsstrategie in Bezug auf die Triterpengewinnung mit *Salvia* sp.. Diese reichen von mixotrophen Zellsuspensionskulturen zur Herstellung von Rosmarinsäure (Hippolyte et al. 1992), über Kalluskulturen (sowohl mixotroph als auch heterotroph) zur Herstellung von Lithospermsäure und Rosmarinsäure (Morimoto et al. 1994, Kintzios et al. 1999), bis zur heterotrophen Kultivierung von sowohl Kallus- als auch Zellsuspensionskulturen (Karam et al. 2003). Die isolierten Gehalte an Triterpenen, vor allem von Rosmarinsäure, reichen dabei von 1,4 - 5,1 % bezogen auf die Trockenmasse. Die Herstellung von Oleanol- und Ursolsäure mit *Salvia* sp. ist bislang deutlich weniger beschrieben. Eine Ausnahme bilden hier die Arbeiten von Bolta und Kollegen, die eine Ursolsäurekonzentration von 400 µg pro g Trockenmasse publizierten (Bolta et al. 2003), sowie die von Haas und Kollegen mit einem Gehalt von maximal 4,08 mg pro g Trockenmasse Oleanolsäure und 2,54 mg pro g Trockenmasse Ursolsäure (Haas et al. 2014). Beide Triterpene werden laut aktuell vorliegender Literatur i.d.R. aus anderen, ganzen Pflanzen oder Suspensionskulturen isoliert (Janicsák et al. 2003, Janicsák et al. 2006). Hierzu gehören

Kalluskulturen von *Ternstroemia gymnanthera* (Ikuta et al. 2003), sowie Suspensionskulturen von *Hyssopus officinalis* und *Calendula officinalis* zur Gewinnung von Oleanol- und Ursolsäure (Skrzypek&Wysokinska 2003, Szakiel et al. 2003). Oleanolsäure alleine kann aus den Wurzeln von *Calendula officinalis*- (Ruszkowski et al. 2006) und Suspensionskulturen von *Olea europaea* gewonnen werden (Saimaru et al. 2007), während Ursolsäure aus Blättern von *Catharanthus roseus* isoliert werden kann (Yu et al. 2013).

2.3 Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen zum Verständnis der durchgeführten Arbeiten im Rahmen der Fermentation von *Salvia officinalis* zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen beschrieben. Dabei wird zunächst auf die zur Produktion verwendete Pflanzengattung eingegangen und anschließend auf die Grundlagen des phototropen Stoffwechsels, sowie den Einfluss der Lichtstärke. Danach werden die wichtigsten Grundlagen zur Kultivierung von Pflanzenzellen dargestellt, sowie die konkret in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsstrategien. Abgeschlossen werden die theoretischen Grundlagen mit der Vorstellung der produzierten Triterpene.

2.3.1 *Salvia officinalis*

Salvia officinalis (deutsch: „Echter Salbei“) ist eine wärmeliebende Pflanze, die zu den Halbsträuchern zählt. Ursprünglich stammt Salbei aus mediterranen Regionen und ist vorwiegend in Mitteleuropa beheimatet. Seit der Antike findet Salbei Anwendung in der Lebensmittel- und Kosmetik- sowie der Arzneimittelindustrie. Erstmals wird *Salvia officinalis* von Plinius im 1. Jahrhundert n.Chr. als Heilpflanze beschrieben (Secundus&Denso 1765). Aufgrund der enthaltenen ätherischen Öle wird Salbei vielfach als Gewürz- oder Heilpflanze verwendet. Von besonderer Bedeutung ist die medizinische Verwendung im Bereich der Entzündungsbehandlung. In diesem Zusammenhang sind traditionell vor allem ätherische Öle sowie Gerb- und Bitterstoffe wie Thujon, 1,8-Cineol und Linalool von Interesse, die aber je nach Herkunft der Pflanze in ihrem Gehalt variieren. Ebenfalls relevant in vielfältigen medizinischen Anwendungsbereichen sind Ursol- sowie Oleanolsäure, die u.a. antibakterielle (Tsai&Yin 2008) und antikanzerogene (Bishayee et al. 2011) Eigenschaften besitzen. Sie zählen wie die zuvor genannten Stoffe zu den Sekundärmetaboliten von *Salvia officinalis*. Um pharmazeutische Richtlinien zu erfüllen, muss die Produktion der Triterpene reproduzierbar sein. Bei der Isolation aus ganzen Pflanzen (*in vivo*) kommt es jedoch zu Schwankungen in der Qualität und Quantität der Produkte (Muffler et al. 2011). Weiterhin nachteilig sind geno- und phänotypische Variabilität, sowie eine Kontamination durch toxische Inhaltsstoffe (Canter et



al. 2005). Bei einer monoseptischen Kultivierung in einem Bioreaktor (*in vitro*) wachsen die Zellen unabhängig von Umwelteinflüssen wie Krankheiten, Schädlingen, Klimaveränderungen und Bodenbeschaffenheit des jeweiligen Anbaugebietes (Heß 1992, Rao&Ravishankar 2002, Vanisree et al. 2004). Somit können die bereits beschriebenen Nachteile weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ausbeute der gewünschten Metaboliten in *in vitro* Kulturen fällt jedoch meistens geringer aus als in *in vivo* Kulturen (Collin 2001). Durch genetische Optimierung wird versucht, diesen Nachteil auszugleichen (Muffler et al. 2011). Der Anbau genetisch modifizierter Pflanzen benötigt lange und teure Genehmigungsverfahren, bevor sie angebaut werden dürfen. Die Kultivierung im Reaktor hingegen bringt weniger bürokratischen und finanziellen Aufwand mit sich. Somit bietet die Kultivierung von Pflanzenzellen in Bioreaktoren eine interessante Möglichkeit zur Produktion von biologisch aktiven Metaboliten.

2.3.2 Photosynthese

Phototrophe Organismen wie z.B. Pflanzen, Algen und Cyanobakterien sind in der Lage, Licht als Energiequelle zu nutzen. Die Photosynthese beschreibt den Stoffwechselprozess, bei dem Licht absorbiert und die daraus gewonnene Energie zur Produktion von ATP und Glucose verwendet wird. Der Gesamtprozess der Photosynthese kann vereinfacht in der unten aufgeführten Reaktionsgleichung zusammengefasst werden (Purves et al. 2011).



Photosynthetisch aktive Organismen nehmen zur Bildung von Kohlenhydraten Kohlendioxid, Wasser und Lichtenergie auf. Als Nebenprodukte fallen Sauerstoff und Wasser an. Der genaue Ablauf der photosynthetischen Reaktionen sowie die daran beteiligten Proteine variieren z.T. stark zwischen den einzelnen Organismen. Grundsätzlich lässt sich der Vorgang der Photosynthese aber in zwei Teilreaktionen untergliedern, die Licht- und die Dunkelreaktion, die bei allen Arten gleich sind. In der Lichtreaktion werden Adenosintriphosphat (ATP) und reduzierte Elektronencarrier (NADPH-H⁺) gebildet. In der Dunkelreaktion werden über den Calvin-Zyklus unter Verbrauch von ATP, NADPH-H⁺ und CO₂ Zucker gebildet (Purves et al. 2011).

2.3.2.1 Lichtreaktion

In Algen, höheren Pflanzen und Cyanobakterien ist der Photosyntheseapparat in der Thylakoidmembran lokalisiert. Dieser besteht aus dem Photosystem I (PS I) und dem Photosystem II (PS II) (Abbildung 1). Photosysteme besitzen einen Antennenkomplex (light harvesting complex, LHC), bestehend aus verschiedenen photosynthetisch aktiven Molekülen,

die unterschiedliche Wellenlängen absorbieren und die Energie an das Reaktionszentrum weiterleiten, und ein Reaktionszentrum.

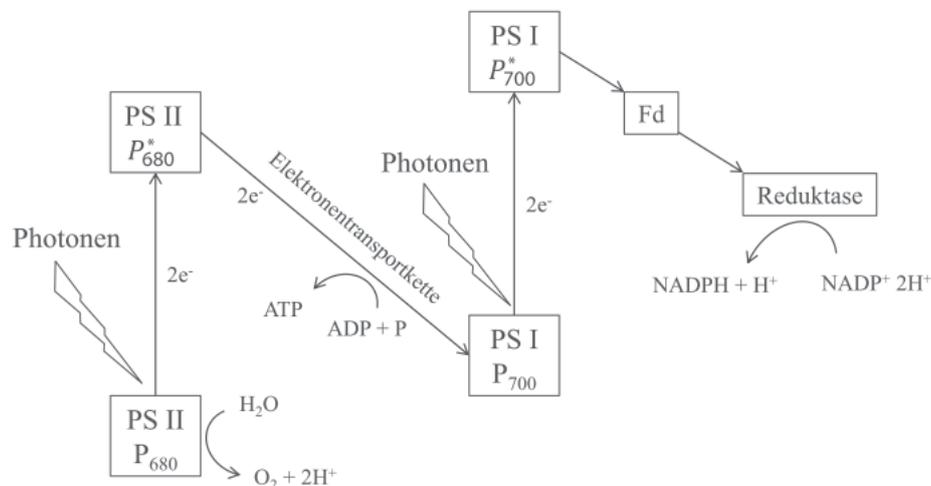


Abbildung 1: Die Lichtreaktion. Dargestellt ist der nichtzyklische Elektronentransport modifiziert nach (Purves et al. 2011).

Die Photosysteme sind funktionell hintereinander geschaltet. PS I besitzt ein Chlorophyll-a-Paar (P_{700}) und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 700 nm. Das PS II benötigt energiereichere Photonen zur Anregung des Chlorophyll-a-Paares (P_{680}), da es bei einer Wellenlänge von 680 nm angeregt wird. Die Lichtenergie wird hier zur Oxidation von Wassermolekülen genutzt, wodurch Elektronen freigesetzt werden, die anschließend eine Elektronentransportkette durchlaufen. Über diese wird ein Protonengradient aufgebaut und ATP durch das Enzym ATP-Synthase synthetisiert.

Bei der Lichtreaktion der Photosynthese werden die Photonen von den Pigmenten des LHC absorbiert und die Energie auf das Reaktionszentrum des Photosystems II übertragen. Die angeregten Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gebracht und von einem primären Elektronenakzeptor abgefangen. Mittels eines wasserspaltenden Enzymkomplexes, welcher 2 Wassermolekülen 4 Elektronen entzieht, werden die Elektronen des zuvor oxidierten Chlorophyllmoleküls nacheinander wieder ersetzt. Die Elektronen werden vom PS II über die Elektronentransportkette, bestehend aus Plastoquinonen, dem Cytochrom f/b6- Komplex und Plastocyanin, auf das PS I übertragen. Der primäre Elektronenakzeptor des PS I gibt die angeregten Elektronen an das Ferredoxin (Fd) weiter, bis sie schließlich von einer Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase auf NADP⁺ übertragen werden, wodurch NADP⁺ zu NADPH+H⁺ reduziert wird (Huner et al. 1998, Lawlor 2001, Campbell et al. 2006). Das angeregte P_{700}^* kehrt durch die Aufnahme von Elektronen aus der Elektronentransportkette in den Grundzustand zurück und kann erneut angeregt werden (Abbildung 1)(Richter 1998, Purves et al. 2011).



Zum Schutz einer überschüssigen Anregung des PS II und der optimalen Ausnutzung des aktinischen Lichtes haben sich verschiedene Mechanismen, wie die situationsabhängige Energieübertragung auf vornehmlich PS II oder PS I (State transition) und die Dissipation überschüssig absorbiertes Energie in Form von Hitze und Fluoreszenz entwickelt (Huner et al. 1998). State transitions sind schnelle physiologische Adaptationsmechanismen, die die Verteilung der absorbierten Lichtenergie zwischen PS I und PS II regulieren. Lichtbedingungen, die zu einer überschüssigen Anregung des PS II führen, induzieren einen Übergang zu State 2, in welchem mehr absorbierte Energie auf das PS I übertragen wird. Ist das PS I überangeregt, findet ein Übergang zu State I statt (Mullineaux&Emlyn-Jones 2005). Zusätzlich bieten Antennenkomplexe Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten, indem sie durch Umwandlung der Lichtenergie in Wärme die überschüssige Energie an die Umgebung abgeben und die Photoinhibition (licht-induzierter Stress) verhindern.

2.3.2.2 Dunkelreaktion

Der Calvin-Zyklus besteht aus zwei Teilschritten. Im ersten Schritt wird die Fixierung von CO_2 durch das Enzym Ribulosebiphosphatcarboxylase/oxygenase (RuBisCO) katalysiert.

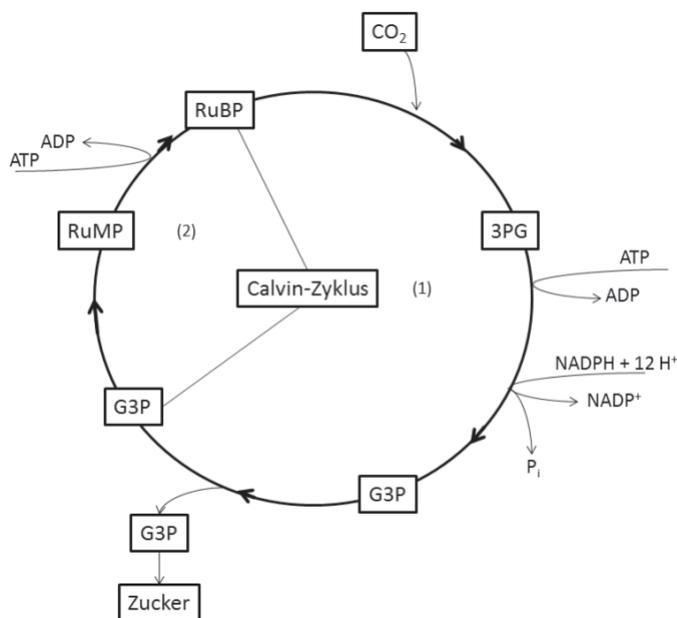


Abbildung 2: Der Calvin-Zyklus. Dargestellt ist der vereinfachte Ablauf der Dunkelreaktion. 1 = Kohlenstofffixierung durch RuBP, Reduktion und Zuckersynthese; 2 = Regenerierung von RuBP modifiziert nach (Purves et al. 2011).

Als Reaktionsprodukt entsteht 3-Phosphoglycerat (3PG). 3PG wird weiter zu einem Kohlenhydrat reduziert (Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P)). In der zweiten Phase wird ein Großteil des G3P's regeneriert, also in RuMP (Ribulosemonophosphat) und anschließend unter

Verbrauch von ATP zu RuBP umgewandelt (Abbildung 2). Dementsprechend wird gleichzeitig ein Kohlenstoffatom fixiert und der CO₂-Akzeptor regeneriert (Richter 1998).

2.3.2.3 Lichtstärke

Der Einfluss der Lichtstärke, während einer Kultivierung, auf die Photosyntheserate von phototrophen Organismen ist in Abbildung 3 dargestellt. Mit zunehmender Lichtstärke steigt die Photosyntheserate von phototrophen Organismen zunächst linear an und erreicht anschließend eine Sättigung. Die Lichtstärke, die zur Sättigung führt, ist organismusspezifisch, genauso wie der Lichtkompensationspunkt. Dieser beschreibt den Zeitpunkt, bei dem die Respiration und die Photosynthese im Gleichgewicht stehen (Richter 1998).

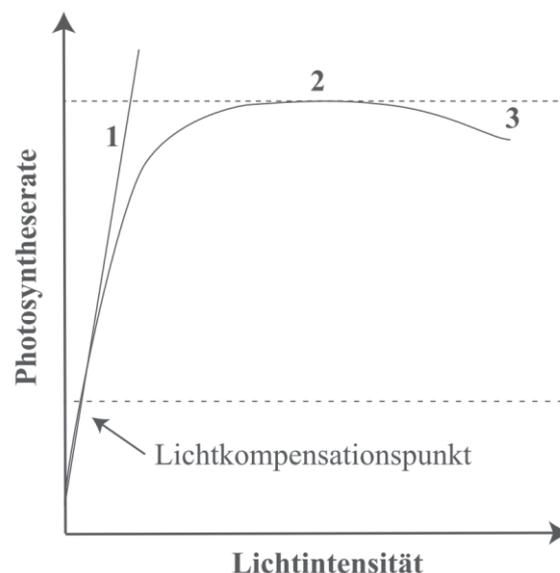


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Photosynthese- bzw. Sauerstoffbildungsrate in Abhängigkeit der Bestrahlung. 1 = Lichtlimitierung (max. Quantenausbeute); 2 = Lichtsättigung (max. Photosyntheserate); 3 = Photoinhibierung modifiziert nach (Walter 1999).

Da die Lichtabsorption linear mit der Lichtstärke steigt, entsteht im Sättigungsbereich ein Überschuss an Lichtenergie. Somit kommt es bei zu hoher Lichteinstrahlung zu einer Abnahme der Photosyntheseleistung bzw. zu einer Verschlechterung der Quantenausbeute (Schopfer&Brennicke 2010). Steigt die Lichtstärke weiter an, kommt es darüber hinaus zu einer Schädigung der Zelle, so dass es zu einer Abnahme der Wachstumsrate und schließlich zu einem Absterben der Kultur kommt.

2.3.3 Kultivierung von Pflanzenzellen

Höhere Pflanzen sind wichtige Quellen für eine große Menge bioaktiver Stoffe, wie pharmazeutische Wirkstoffe, Pestizide, Geschmacks- und Duftstoffe. Traditionell wurden diese Substanzen aus ganzen Pflanzen extrahiert, was den Anbau dieser Pflanzen in einem Großmaßstab voraussetzt (z.B. die Produktion von Alkaloiden aus *Catharanthus roseus*).



Darüber hinaus können viele Produkte aus Pflanzen auch chemisch synthetisiert werden, was u.U. eine zuverlässigere und kosteneffektivere Alternative darstellt. Die Nutzung einer Pflanzenzellkultur ist daher z.B. dann attraktiv, wenn die ursprüngliche Pflanze schwer zu kultivieren ist, lange Kultivierungsperioden und, eine geringe Produktausbeute hat, oder die chemische Synthese noch nicht durchführbar bzw. technisch problematisch ist. Es ist daher wichtig, geeignete Methoden zu entwickeln, die konstant hohe Ausbeuten des gewünschten Produktes liefern (Berlin&Sasse 1985).

2.3.3.1 Produktion von Sekundärmetaboliten

Pflanzenzellsuspensionskulturen bieten die Möglichkeit, ggfs. auch seltene Pflanzen pharmazeutisch zu nutzen. Darüber hinaus wurde bereits untersucht, Pflanzenzellkulturen als Alternative zu traditioneller Landwirtschaft und für die industrielle Produktion von sekundären Stoffwechselprodukten zu nutzen (DiCosmo&Misawa 1995). Zu diesem Zweck wurde die Technologie der Pflanzenzellkultur bereits seit Ende der 60er Jahre kontinuierlich weiter erforscht. Seitdem wurden verschiedene Kultivierungsstrategien untersucht, mit dem Ziel, die Produktion der sekundären Stoffwechselprodukte zu optimieren. Der Vorteil der Pflanzenzellsuspensionskultur liegt darin, dass bioaktive Stoffe in einer kontrollierten Umgebung, unabhängig von klimatischen Einflüssen und verschiedenen Bodenbedingungen produziert werden können. Darüber hinaus gibt es keine negativen Einflüsse von Mikroorganismen; einzelne besonders produktive Stämme können gezielt selektiert werden, und es kann durch Automatisierung des Prozesses Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung genommen werden. Somit lassen sich die Kosten zur Herstellung reduzieren und die Produktion gleichzeitig optimieren. Ziel ist es, dabei einen Prozess zu entwickeln, der die Herstellung von sekundären Stoffwechselmetaboliten mit einer Pflanzenzellkultur günstiger macht als die Extraktion der entsprechenden Stoffe direkt aus ganzen Pflanzen bzw. als die chemische Synthese der Stoffe.

2.3.3.2 Kultivierungsbedingungen

Bei den Kultivierungsbedingungen spielen eine Vielzahl von chemischen und physikalischen Faktoren eine Rolle für die Optimierung. Dazu gehört die Zusammensetzung des Nährmediums, Phytohormone, der pH-Wert, die Temperatur, die Begasung, der Leistungseintrag und die Beleuchtung (Fett-Neto et al. 1995, Goleniowski&Trippi 1999, Wang et al. 1999, Lee&Shuler 2000). Einige Produkte werden in größeren Konzentrationen in Zellkulturen gebildet als in ganzen Pflanzen, was hauptsächlich an der Optimierung der Kultivierungsbedingungen liegt. Eine Veränderung der physikalischen Parameter sowie der

Nährstoffgehalt in dem verwendeten Kulturmedium haben dabei den größten Einfluss. Dies wurde bereits anhand von vielen Beispielen bestätigt, wie bei der Produktion von Ginsenosiden (Furuya et al. 1984, Furuya 1988, Choi et al. 1994, Franklin&Dixon 1994), Rosmarinsäure (Ulbrich et al. 1985), Shikonin (Takahashi&Fujita 1991), Ubichinon 10 (Fontanel&Tabata 1987) und Berberin (Matsubara et al. 1989). Auf diese Faktoren wird hier nicht weiter eingegangen, da ihre Untersuchung in Bezug auf Pflanzenzellen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Ihr Einfluss auf das Wachstum ist allerdings in Kapitel 3.3.3 detailliert in Bezug auf Cyanobakterien dargestellt, wovon viele Punkte auch für Pflanzenzellen gültig sind.

2.3.3.3 Auswahl von Stämmen

Pflanzenzellkulturen repräsentieren heterogene Populationen, bei denen physiologische Charakteristika z.T. sehr unterschiedlich sind. Die Optimierung einer Produktion durch Screening und Selektion spezieller Kulturen wurde bereits von Berlin und Kollegen beschrieben (Berlin&Sasse 1985). So konnte zum Beispiel die Ausbeute von Anthocyan aus *Euphorbia milli* um das 7fache nach 24 Selektionsschritten im Vergleich zu dem Ausgangsstamm erhöht werden (Yamamoto et al. 1982). Ähnliches wurde für die Synthese von Berberin aus *Coptis japonica* berichtet, wo nach 27 Generationen die 6fache Wachstumsgeschwindigkeit und eine stabile Produktion auf hohem Level erreicht wurde (Yamada&Sato 1981).

2.3.3.4 Precursor-Zugabe

Durch die gezielte Zugabe eines Precursors in das Kulturmedium kann die Ausbeute eines bestimmten Produktes u.U. gesteigert werden. Diese Möglichkeit ist vor allem dann in Betracht zu ziehen, wenn der benötigte Precursor günstig verfügbar ist. Die zugrundeliegende Idee ist, dass jede Komponente, die selbst ein Stoffwechselintermediat ist, oder am Anfang eines bestimmten Stoffwechselweges steht, die Produktbildung fördern kann. Eine entsprechende Steigerung der Synthese von sekundären Stoffwechselmetaboliten wurde bereits erfolgreich an vielen Beispielen demonstriert (Moreno et al. 1993, Whitmer et al. 1998, Silvestrini et al. 2002). Durch die Zugabe von Aminosäuren wurde z.B. die Produktion von Tropan- und Indolalkaloiden, sowie die von Rosmarinsäure aus *Salvia officinalis* durch Zugabe von Phenylalanin (Ellis&Towers 1970) gesteigert. Weitere Beispiele sind die gesteigerte Bildung von Taxol aus *Taxus chinensis* ebenfalls durch Phenylalanin (Fett-Neto et al. 1993, Fett-Neto et al. 1994), eine Erhöhung der Vanillinkonzentration in *Vanilla planifolia* durch Ferulasäurezugabe (Romagnoli&Knorr 1988), sowie eine Steigerung der flüchtigen



Monoterpene durch Zugabe von Leucin bei der Pflanzenzellkultur von *Perilla fruticosa* (Mulder-Krieger et al. 1988).

2.3.3.5 Elicitoren

Viele Pflanzen bilden sekundäre Stoffwechselprodukte als natürliche Defensivreaktion gegen Pathogene. Elicitoren sind spezifische Stoffe, die die Bildung dieser Stoffwechselprodukte auslösen. Dadurch ist der Einsatz von Elicitoren des pflanzlichen Abwehrmechanismus (Elicitation) eine der effektivsten Strategien, um die Bildung von sekundären Stoffwechselprodukten gezielt zu steigern (Roberts&Shuler 1997). Biotische und abiotische Elicitoren (physikalisch oder chemisch) werden nach ihrem jeweiligen Ursprung (exogen oder endogen) klassifiziert (Radman et al. 2003) und führen in der Regel zu einer Reduktion der Prozesszeit, die gebraucht wird, um das Zielprodukt in einer hohen Konzentration zu bilden (DiCosmo&Tallevi 1985, Eilert 1987, Barz et al. 1988). Eine Übersicht der Elicitoren-Klassifikation ist in Abbildung 4 dargestellt.

Elicitoren					
Physikalisch	Verletzung				
	Abiotisch		Metallische Ionen (Europium, Calcium, Silber, Cadmium)		
Chemisch	Biotisch	Komplexe Zusammensetzung	Hefezellwand, Mycelienzellwand, Pilzsporen		
		Definierte Zusammensetzung	Kohlenhydrate	Poly-saccharide	Alginat
					LBG
					Pectin
					Chitosan
			Oligo-saccharide	Guargummi	
				Mannuronsäure	
				Guluronsäure	
				Mannane	
		Peptide	Galacturonsäure		
Proteine	Glutathion				
Lipide	Cellulase, Elicitin, Oligandrin				
Glykoproteine	Lipopolysaccharide				
Flüchtige Stoffe		C ₆ -C ₁₀			

Abbildung 4: Klassifizierung von Elicitoren nach (IJDDHR 2011).

2.3.3.6 Aggregatbildung

Pflanzenzellen sind signifikant größer und langsamer wachsend als die meisten mikrobiellen Systeme. Einzelne Pflanzenzellen haben typischerweise eine Länge von 10-100 μm und eine sphärische bis zylindrische Form. Eine Aggregatbildung ist häufig zu finden, meistens bedingt durch eine fehlende Spaltung am Ende der Zellteilung und z.T. auch durch Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) während späterer Phasen der Batch-Kultivierung (Taticek et al. 1991). Die Aggregatbildung wurde bereits mehrfach gezielt für eine Selbst-Immobilisierung der Zellen genutzt (Prenosil et al. 1987, Hegglin et al. 1990). Zellaggregate, die aus bis zu 100 Zellen bestehen, können mehrere Millimeter dick sein und neigen zur Sedimentation (Tanaka 1982). Die Ausprägung und Umstände der Zellaggregation variieren stark in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie, dem Alter der Kultur sowie den Kultivierungsparametern (Mavituna&Park 1987, Kieran et al. 1995).

2.3.3.7 Begasung

Die benötigte Begasung zur Deckung des Sauerstoffbedarfes von Pflanzenzellen ist im Vergleich zu anderen Zellkulturen gering. So liegt die spezifische Sauerstoffaufnahme, bezogen auf die Trockenmasse, in der Größenordnung von $10^{-6} \text{ g g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Bond et al. 1988, Dubuis et al. 1995, Ho et al. 1995). Durch hohe Zelldichten und eine hohe Viskosität des Kulturmediums kann die Effizienz des Sauerstofftransfers verringert werden. Trotzdem liegt die kritische Konzentration an gelöstem Sauerstoff bei ca. 15-20 % (Payne et al. 1992) für die Produktion von Stoffwechselprodukten, während die benötigte Konzentration für reines Zellwachstum noch signifikant darunter liegt (Schlatmann et al. 1995). Die meisten Veröffentlichungen, die sich mit der Auswirkung der Begasung auf die Pflanzensuspensionskulturen befassen, fokussieren auf den Parameter k_{LA} , in dem die Effekte von Begasung und Durchmischung vereint sind (Kato et al. 1975, Smart&Fowler 1981, Tanaka 1981, Leckie et al. 1991). Obwohl die Ergebnisse spezifisch für die verwendeten Systeme sind, existiert ein unterer limitierender k_{LA} -Wert, unter dem die Zellkultur inhibiert wird. Eine reduzierte Produktivität bei hohen Begasungsraten ist dagegen auf das Strippen von CO_2 und anderen essentiellen, flüchtigen Stoffen zurückzuführen (Kato et al. 1975, Schlatmann et al. 1994), bzw. auf den damit verbundenen höheren Scherstress (Ballica&Ryu 1993). Darüber hinaus kann die Begasung von Pflanzenzellsuspensionen zur Schaumbildung führen (Zhong et al. 1992), welche vor allem von der Stärke der Begasung und der Konzentration der vorhandenen extrazellulären Proteine abhängt (Wongsamuth&Doran 1994). Der Einsatz von verschiedenen Antischaummitteln kann dagegen in einigen Fällen zu einer reduzierten Produktivität der Kultur führen (Smart&Fowler 1981, Wongsamuth&Doran 1994).



2.3.3.8 Scherstress

Die Empfindlichkeit von biologischen Systemen (pro- und eukaryotisch) gegenüber hydrodynamischem Scherstress wurde bereits mehrfach untersucht (Thomas 1990, Märkl et al. 1991, Merchuk 1991, Hua et al. 1993, Joshi et al. 1996). Gerade bei Kulturen mit hoher Zelldichte oder einem Scale-up steigen die Anforderungen an den erforderlichen Massentransfer und damit gleichzeitig auch an das Prozessequipment und die Stärke der Begasung sowie des Leistungseintrages. Die Auswirkungen hängen jeweils von der Dauer und der Intensität ab, die das jeweilige biologische System den individuellen Bedingungen ausgesetzt ist. Diese können zwar positiv sein (größere Ausbeute an Biomasse, erhöhte Produktion von Sekundärmetaboliten), meistens wird aber auf die negativen Seiten fokussiert (Hooker et al. 1989, Zhong et al. 1995). So ist seit längerem bekannt (Vogelmann et al. 1978, Rosenberg 1987, Dunlop&Namdev 1993, Kieran et al. 1995), dass Pflanzenzellen unter „normalen“ Bedingungen in einem Rührkessel robuster sind als gedacht (in Bezug auf irreparable Zellschäden); allerdings Effekte, wie die Verringerung der Produkt- (Hooker et al. 1990) und Biomasseausbeute (Ho et al. 1995), durchaus auftreten können. Welcher Effekt zu erwarten ist, hängt zum einem vom dem Alter der Zellkultur und zum anderen von der konkret verwendeten Zelllinie selbst ab.

2.3.3.9 Verwendete Kultivierungsstrategien

Nachfolgend dargestellt sind die verwendeten submersen und emersen Kultivierungsstrategien zur Fermentation von *Salvia officinalis*. Genaue Angaben zu den Methoden sind dem Anhang A.1 sowie A.2 zu entnehmen.

2.3.3.9.1 Schüttelkolben

Schüttelkolben sind einfache und preiswerte Laborreaktoren. Ein handelsüblicher Schüttelkolben besitzt weder ein spezielles System zur Gasversorgung, noch mess- oder regeltechnische Einrichtungen (Abbildung 43 A). Aus diesem Grund werden experimentelle Versuche meistens in einem temperierbaren Schüttelinkubationsschrank durchgeführt. Variationen bestehen aus der Anzahl von Stromstörern und der Art des Verschlusses (z.B. Wattestopfen, Metallhaube, Schaumstoffstopfen). Schüttelkolben werden vor allem für die Stammentwicklung und für die Mediumoptimierung eingesetzt, da viele Versuche parallel und kostengünstig durchgeführt werden können. Der Leistungseintrag ist abhängig von der Anzahl der Stromstörer, der Füllhöhe, dem Volumen des Kolbens sowie der Schüttelfrequenz und der Schüttelexzentrizität des verwendeten Schüttelinkubators. Um bei einem Scale-up die gleichen Strömungseigenschaften zu erreichen, müsste das Verhältnis der Exzentrizität des Schüttlers

zum Schüttelkolbenradius konstant gehalten werden. Da eine Variation der Exzentrizität bei den meisten Schüttelinkubatoren nicht möglich ist, ist ein geometrisches Scale-up von kleinen auf große Schüttelkolben schwer umsetzbar. Eine Untersuchung von nicht geometrischen Scale-up-Prozessen kann durch die Anpassung des volumetrischen Leistungseintrages in einem gewissen Rahmen realisiert werden (Chmiel 2006, Storhas 2012).

2.3.3.9.2 Wavebag-Reaktoren

Der Wavebag-Bioreaktor gehört zu den sogenannten „disposable“ oder Einweg-Reaktorsystemen. Er setzt sich somit aus zwei verschiedenen Hauptkomponenten zusammen. Zum einen dem sterilen Kultivierungsbeutel (verschieden große Volumina) und zum anderen der Basisstation, die über eine Kippbewegung die Leistung in die Kultursuspension einbringt (Abbildung 5). An dieser Station können darüber hinaus wichtige verfahrenstechnische Parameter wie Begasungsrate, Temperatur sowie Winkel und Frequenz der Kippbewegung eingestellt und geregelt werden. Durch Bewegung des Tablars der Reaktorstation entstehen Wellen, durch die die Fermentationsbrühe durchmischt und deren Oberfläche kontinuierlich erneuert wird. So kann eine blasenfreie Oberflächenbegasung erreicht werden. Der Leistungseintrag wird größer je kleiner das Füllvolumen ist, je größer der eingestellte Kippwinkel und je schneller die Frequenz ist. Erreichbare Leistungseinträge liegen jedoch deutlich unter denen der zuvor beschriebenen Reaktoren. Die Sauerstofftransferate ist auf der anderen Seite vergleichbar oder liegt höher als die von Schüttelkolben und den meisten anderen Reaktoren, die mit Oberflächenbegasung oder blasenfreier Membranbegasung arbeiten (Eibl et al. 2009). Wavebag-Einwegreaktoren sind gut zur Fermentation von scherstressempfindlichen Organismen geeignet, da kaum Scherkräfte auftreten. Durch die blasenfreie Begasung kann üblicherweise auf Antischaummittel verzichtet werden. Vorteile dieses Reaktorsystems liegen bei dem Entfall von Sterilisation und Reinigung sowie der Flexibilität hinsichtlich der Einsatzgebiete (Eibl et al. 2009). Dem gegenüber stehen hohe Anschaffungskosten der benötigten sterilen Fermentationsbeutel (bags).

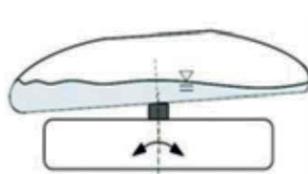


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Wavebagreaktor-Systems