

# **Untersuchungen zur Gewinnung von Isoflavonoiden aus Zellkulturen von Soja (*Glycine max*)**

Vorgelegt von  
Diplom-Ingenieur  
Alper Güven  
aus Istanbul

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften -  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Tressl  
Berichter: Prof. Dr. D. Knorr  
Berichter: Prof. Dr. H. Kunzek

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 07.01.2004

BERLIN 2004  
D 83

*Diese Arbeit wird allen netten Menschen  
dieser Welt gewidmet*

## **Alper Güven: Untersuchungen zur Gewinnung von Isoflavonoiden aus Zellkulturen von Soja (*Glycine max*)**

### **Abstract**

Nachdem epidemiologische Studien aufzeigen konnten, daß verschiedene Lebensmittel antikanzerogene Wirkung entfalten können, hat man sich in der letzten Zeit immer mehr der Untersuchung der primären und sekundären Inhaltsstoffe von Pflanzen zugewandt. Insbesondere die Isoflavonoide mit ihren antioxidativen Eigenschaften stehen dabei im Mittelpunkt des Interesses. Pflanzenzellkulturen als Produzenten von Biomasse und Naturstoffen spielen eine wichtige Rolle in der zukünftigen biotechnologischen Produktion dieser Sekundärmetabolite.

In Batchversuchen und anschließend im Airlift-Bioreaktor wurde die Bildung der Aglykone Genistein und Daidzein und der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide Genistin und Daidzin durch *Glycine max* untersucht. Zwar war die Pflanzenzellkultur in der Lage die genannten Isoflavonoide in den Batchversuchen zu bilden, allerdings konnte in den durchgeführten Untersuchungen keine eindeutige Zuordnung des Wachstums der Zellkulturen mit der erfolgten Biosynthese der Isoflavonoide in den einzelnen Wachstumsphasen gezeigt werden.

Elicitoren und Precursoren wurden in der Kultivierung von Zellkulturen im Batchversuch gezielt eingesetzt, um die Bildung von Sekundärmetaboliten zu induzieren bzw. zu verstärken. Als elicitierende Substanzen fanden Chitin, Methyljasmonat und Salicylsäure Verwendung. Als Precursoren wurden PAL (Phenylalaninlyase) und Naringenin dem Nährmedium zugesetzt und deren Induktion hinsichtlich der Isoflavonoidbiosynthese analysiert. Dabei zeigte sich als beste induzierende Substanz Methyljasmonat in einer Konzentration von 100 mg/L. Durch die Applikation von Methyljasmonat konnte die Isoflavonoidbildung um bis zu dem 7-fachen gesteigert werden. Als physikalisch induzierende Streßfaktoren wurde auch der Einfluß von Hochdruck, Kälteschock und Hochspannung auf die Isoflavonoidbiosynthese der *Glycine max* Zellkulturen untersucht. Hierbei zeigte insbesondere die Anwendung von Hochspannungsimpulsen (HSI) in einer Größenordnung von 1600 Volt einen positiven Einfluss auf die aglykone Isoflavonoidbiosynthese. HSI erwies sich als stärkster physikalischer Elicitor und wurde deshalb in der Versuchsdurchführung der Scale-up Untersuchungen aufgenommen.

Die Isoflavonoidkonzentration blieb im konventionell aufgebauten Airlift-Bioreaktor im Vergleich zu den Batchversuchen im 200 mL Kolben gering. Mit dem Einbau von Fritten in den Begaserring und einer O<sub>2</sub>-Regulierung auf einen 80 %-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck im Medium wurden verbesserte Vitalitätswerte der Pflanzenzellkulturen und eine höhere Biomasse während der Wachstumsphase erreicht. Hochspannungsimpulse zeigten im Bioreaktor sowohl auf das Wachstum der Zellkulturen als auch auf die Bildung der Isoflavonoide keinen positiven Effekt. Der Zusatz von Methyljasmonat bewirkte eine Verlängerung des Isoflavonoidnachweises, insbesondere bei Daidzin. Es war eine Konzentrationserhöhung um bis das 3-fache erkennbar. Insgesamt konnte aber keine signifikante Produktionserhöhung der Isoflavonoide im Bioreaktor festgestellt werden. Dies wird maßgeblich auf die im Bioreaktor vorhandenen Scherkräfte zurückzuführen sein, die weitgehend auf die mechanische Agitation der Zellsuspension beruhen. Dieser hydrodynamische Streß beeinflusste sehr stark die physiologischen Prozesse der Zelle wie Metabolismus, Zellwachstum und Zellvitalität.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>8</b>
2.1	Die Sojabohnenpflanze und ihre wirtschaftliche Bedeutung .....	8
2.2	Isoflavonoide und ihre ernährungsphysiologische Bedeutung.....	10
2.3	Stoffwechsel der Isoflavonoide beim Menschen .....	13
2.4	Biosynthese der Isoflavonoide .....	15
2.5	Pflanzenzellkulturen.....	18
2.6	Einflußfaktoren auf die Isoflavonoidbiosynthese: Elicitoren und Precursoren .....	19
2.7	Beeinflussung der Isoflavonoidbiosynthese durch Hochdruck und Hochspannung .....	21
	2.7.1 Hydrostatischer Hochdruck.....	21
	2.7.2 Hochspannungsimpulse (HSI).....	22
2.8	Kultivierung von Pflanzenzellen im Bioreaktor .....	23
2.9	Die HPLC-Analytik zur Bestimmung der Isoflavonoide.....	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1	Sojabohnen-Zellkultur ( <i>Glycine max</i> ).....	27
3.2	Isoflavonoidgehalt in handelsüblichen Soja-Produkten .....	28
3.3	Chemikalien .....	29
3.4	Geräte .....	29
3.5	Hydrostatischer Hochdruck .....	30
	3.5.1 Aufbau der Hochdruckanlage .....	30
	3.5.2 Probenaufbreitung zur Versuchsdurchführung .....	31
3.6	Kälteschock.....	31
3.7	Hochspannungsimpulsbehandlung bei den Batchversuchen .....	31
3.8	Airlift-Bioreaktor .....	32
	3.8.1 HSI-Anwendung im Airlift-Bioreaktor .....	34
	3.8.2 Kopplung von Hochspannungsimpulsen mit Methyljasmonat .....	35
3.9	Analyseverfahren .....	35
	3.9.1 Bestimmung des Frischgewichtes .....	35

---

3.9.2	Bestimmung des Trockengewichtes.....	36
3.9.3	pH-Messung .....	36
3.9.4	Leitfähigkeit.....	36
3.9.5	Vitalitätstest (TTC Test).....	37
3.9.6	Die Ermittlung des Permeabilisierungsgrades.....	37
3.10	Extraktion der Isoflavonoide und deren HPLC-Analyse.....	37
3.10.1	Die Herstellung und Haltung der Isoflavonoidstandarts .....	38
3.10.2	Probenvorbereitung .....	38
3.10.3	Extraktion .....	38
3.10.4	Wiederfindungsrate.....	39
3.10.5	Bestimmungsgrenze .....	39
3.10.6	Bestimmung der Isoflavonoide .....	40
3.10.7	Eichkurve der Isoflavonoidstandarts.....	41
3.10.8	Die quantitative Auswertung der Isoflavonoide.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Wachstumscharakterisierung von <i>Glycine max</i> in Batchkulturen.....	45
4.1.1	Erstellung von Wachstumskurven der Pflanzenzellkultur im Batchversuch .....	45
4.1.2	Leitfähigkeitsverlauf und pH-Wert.....	46
4.1.3	Vitalitätstest .....	47
4.2	Konzentrationsbestimmung der Isoflavonoide aus den Zellkulturen mit Hilfe der HPLC-Analytik.....	49
4.2.1	Modifizierung und Optimierung der Isoflavonoidextraktion mit Hilfe unterschiedlicher Lösungsmittel .....	49
4.2.1.1	Extraktion von Genistein und Daidzein .....	49
4.2.1.2	Extraktion von Genistin und Daidzin .....	50
4.2.2	Nachweis von Isoflavonoiden in handelsüblichen Soja-Produkten .....	52
4.2.3	Isoflavonoidproduktion der Zellkulturen während der Wachstumsphase im Batchverfahren.....	55
4.2.3.1	Genistein- und Daidzeinkonzentration .....	55
4.2.3.2	Genistin- und Daidzinkonzentration.....	56
4.3	Einflußfaktoren auf die Isoflavonoidbiosynthese.....	58
4.3.1	Chitin, PAL und Naringenin .....	59
4.3.2	Methyljasmonat und Salicylsäure .....	61

4.4	Beeinflussung der Isoflavonoidbiosynthese durch Hochdruck, Kälteschock und Hochspannung.....	65
4.4.1	Hydrostatische Hochdruckbehandlung .....	65
4.4.2	Hydrostatischer Hochdruck und Kälteschock .....	68
4.4.3	Hochspannungsimpulsbehandlung (HSI) .....	70
4.5	Darstellung geeigneter Einflußfaktoren auf die Bildung von Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor (Scale-up Versuche).....	75
4.5.1	Allgemeine Untersuchungen zur Bildung der Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor .....	75
4.5.2	Der Einfluß der Volumeneffekte auf die Produktion der Isoflavonoide .....	78
4.5.3	Wachstumscharakterisierung von <i>Glycine max</i> im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten .....	84
4.5.3.1	Erstellung von Wachstumskurven der Soja-Zellkultur im Airlift-Bioreaktor .....	85
4.5.3.2	pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf .....	85
4.5.3.3	Vitalitätstest .....	86
4.5.3.4	Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten .....	88
4.5.4	Optimierung des partialen O <sub>2</sub> -Partialdruckes während der Fermentation im Airlift-Bioreaktor.....	90
4.5.4.1	Wachstumscharakterisierung der Soja-Zellkultur <i>Glycine max</i> im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( +/- 5 ) O <sub>2</sub> -Sättigung .....	93
4.5.4.2	pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf .....	94
4.5.4.3	Vitalitätstest .....	95
4.5.4.4	Konzentrationsbestimmung der Isoflavonoide.....	97
4.6	Hochspannungsimpulsbehandlung (HSI) im Airlift-Bioreaktor.....	99
4.6.1	Wachstumschrakterisierung von <i>Glycine max</i> nach Einsatz von HSI.....	99
4.6.2	pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf .....	100
4.6.3	Vitalitätstest.....	101
4.6.4	Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach HSI-Behandlung im Airlift-Bioreaktor .....	102
4.7	Anwendung von Methyljasmonat im Airlift-Bioreaktor .....	105
4.7.1	Wachstumschrakterisierung von <i>Glycine max</i> nach Methyljasmonatapplikation .....	106

---

4.7.2	pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf.....	106
4.7.3	Vitalitätstest.....	107
4.7.4	Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach Methyljasmonatzusatz .....	108
4.8	Kopplung von Hochspannungsimpulsen mit Methyljasmonat .....	111
4.8.1	Wachstumschrakterisierung von <i>Glycine max</i> nach Einsatz von HSI und Methyljasmonat .....	111
4.8.2	pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf .....	113
4.8.3	Vitalitätstest .....	113
4.8.4	Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach HSI- und Methyljasmonatbehandlung .....	114
4.9	Abschlußdiskussion und Ausblick.....	117
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>125</b>
5.1	Zusammenfassung der Batchversuche .....	125
5.2	Zusammenfassung der Scale-up Versuche .....	126
5.3	Abschließende Bemerkung .....	128
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>147</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	147
7.2	Tabellenverzeichnis .....	150

## Abkürzungsverzeichnis

DMPO	5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid
E	Extinktion (optische Dichte)
FG	Frischgewicht
h	Stunde
ha	Hektar
HCl	Salzsäure
HPLC	High pressure (performance) liquid chromatography
HSI	Hochspannungsimpuls
IK	Isoflavonoidkonzentration
J	Joule
L	Liter
M	Molare Masse in g/mol
nq	nicht quantifizierbar
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
m	Milli
m	Meter
MW	Mittelwert
ng	Nanogram
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAL	Phenylalanin-Lyase
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
S	Siemens
Tab	Tabelle
TG	Trockengewicht
TTC	2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
μ	mikro

## 1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die Lebensmittelindustrie ist beständig auf der Suche nach innovativen und gesundheitsfördernden Lebensmitteln. Dabei spielen Pflanzenzellkulturen als Produzenten von Biomasse und Naturstoffen eine wichtige Rolle in der zukünftigen biotechnologischen Produktion der Sekundärmetabolite (Lindl und Bauer, 2002).

Nachdem epidemiologische Studien aufzeigten, daß Früchte und Gemüse antikanzerogene Wirkung entfalten können, hat man sich in der letzter Zeit immer mehr der Untersuchung der primären und sekundären Inhaltsstoffe von Pflanzen zugewandt. Pflanzliche Nahrung enthalten viele Vitamine, Mineralstoffe und biologisch aktive Substanzen, die entweder krebsbildenden Wirkungsmechanismen vorbeugen oder das Risiko einer Entwicklung und Wuchern von Tumoren zu vermeiden vermögen (Barnes, 1998). Daher kam der Gedanke, Lebensmittel gezielt mit spezifischen Stoffen anzureichern, um bestimmte Effekte zu erreichen. Diese Nahrungsmittel wurden allgemein unter dem Begriff „Functional Foods“ in der Lebensmittelindustrie bekannt. Insbesondere die Isoflavonoide mit ihren antioxidativen Eigenschaften stehen dabei im Mittelpunkt des Interesses. Die ausreichende und kostengünstige Bereitstellung dieser Sekundärmetabolite ist für ihre weitere Verarbeitung zu neuen zukunftssträchtigen Lebensmitteln für die Lebensmittelindustrie essentiell. Dadurch wird beispielsweise die Industrie in die Lage versetzt, den Konsumenten mit einer umfassenden Möglichkeit zu versehen, Nutzen aus der nutritiven Vorteilen des Sojaproteins und der Sojabohne-Isoflavonoide zu ziehen.

Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen ist die biotechnologische Gewinnung der Isoflavonoide mit Hilfe von Bioreaktoren. In dieser Arbeit wird zunächst untersucht, welche Faktoren in der Lage sind, die Produktion der Isoflavonoide während der Kultivierung zu steigern. In einem 2. Schritt soll verifiziert werden, ob der in der Pflanzenkulturtechnik eingesetzte Airlift-Bioreaktor für die Fermentation der Sekundärmetabolite geeignet ist. Diesem Ziel kann sich nur durch Bearbeitung verschiedener experimenteller Einzelfragestellungen genähert werden. Dahingehend werden folgende Punkte in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Das Wachstum und die Vitalität von *Glycine max* werden im Batchverfahren charakterisiert, um Hinweise zu erhalten, ob die Produktion der Isoflavonoide

mit dem Wachstum der Pflanzenzellen in den verschiedenen Phasen korreliert. Die Ausgewogenheit zwischen gebildeten Sekundärmetaboliten und der notwendigen Zelldichte zur möglichen ökonomischen Produktion im Bioreaktor muß gewahrt werden.

2. Ein Extraktionsverfahren für die HPLC-Methodik soll etabliert werden, um zu gewährleisten, daß die Isoflavonoide bestmöglich aus den Soja-Zellkulturen chromatographisch differenziert und ihre Konzentrationen bestimmt werden können. Neben den aglykonen Isoflavonoiden Genistein und Daidzein werden in dieser Arbeit zusätzlich die  $\beta$ -glykosidische Verbindungen Genistin und Daidzin extrahiert und in der HPLC analysiert. Dies ermöglicht eine exakte Darstellung der Bildung dieser Isoflavonoide in den Zellkulturen.
3. Elicitoren und Precursoren sind in der Lage, als Streßfaktoren die Enzymaktivität in Pflanzenzellen zu induzieren und somit auch die Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu erhöhen. Ein breites Spektrum verschiedener biotischer Elicitoren (Chitin, PAL, Naringenin, Methyljasmonat, Salicylsäure) und abiotischer Faktoren (hydrostatische Hochdruckbehandlung, Kälteschock, Hochspannungsimpuls) werden zur Beeinflussung der Isoflavonoidbiosynthese herangezogen.
4. Die Erkenntnisse, die im Laufe der experimentellen Untersuchungen an den Zellen im Batchverfahren gewonnen werden, sollen anschließend im Scale-up-Maßstab auf den Airlift-Bioreaktor übertragen werden. Im Rahmen der Versuche über die Volumeneffekte sollen Aussagen über Ausbildung von Scherkräften in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen getroffen werden.
5. Die Produktion der Isoflavonoide soll unter Variierung der Sauerstoffblasengröße optimiert werden. Zusätzlich findet eine Regulierung des zugesetzten  $O_2$ -Partialdruckes während der Fermentation bei gleichzeitiger Kontrolle der Vitalität und Leitfähigkeit statt.
6. Die sich bei der Biosynthese der Isoflavonoide in den Batchversuchen als effizient erwiesenen Elicitoren sollen im Airlift-Bioreaktor ihre positive Wirkung auf die Produktion der Isoflavonoide aufzeigen.

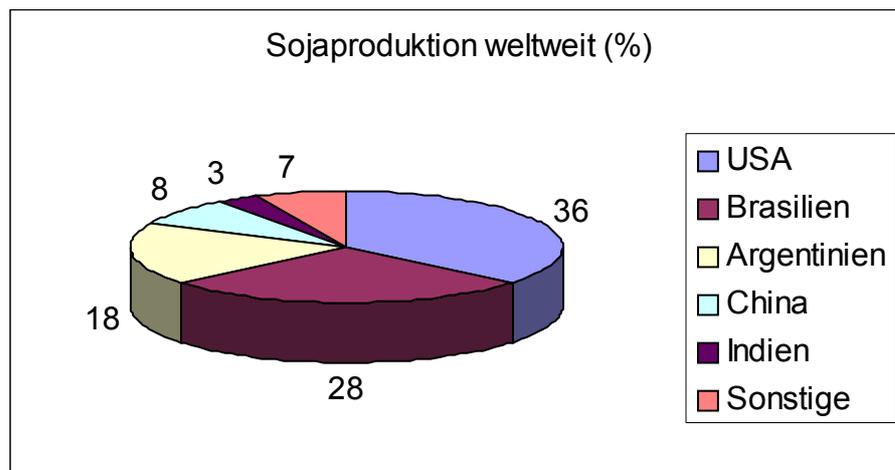
## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Die Sojabohnenpflanze und ihre wirtschaftliche Bedeutung

Die Sojabohne zählt zu einer der bedeutendsten Kulturpflanzen der Erde mit enormer wirtschaftlicher Bedeutung. Schon 2800 v. Chr. wurde sie in China kultiviert. Im 17. Jahrhundert kam sie über Indonesien nach Polynesien; die Verbreitung erfolgte danach über die Molukken nach Vorderindien, Ceylon, Palästina und Nordafrika. Erst 1829 wurde sie in die Vereinigten Staaten von Amerika eingeführt, wo sie später ihre stärkste Anbauausdehnung erfuhr. Seit Mitte des 18. Jahrhunderts wird sie in den botanischen Gärten in Europa kultiviert. Die ersten landwirtschaftlichen Anbauversuche in Frankreich, Österreich-Ungarn, Oberitalien, vor allem in Istrien und Südtirol, in der Ukraine und in Deutschland wurden 1840 durchgeführt. Aufgrund der oftmals kühleren, regnerischen Sommern in Deutschland blieben die Erträge unzureichend und ließen keinen großflächigen Anbau zu.

In der Welt allerdings dehnte sich der Sojabohnenanbau von Nordamerika ausgehend stetig aus. Nach Europa erhöhten sich die Importe infolge des starken Wachstums der Bevölkerung laufend, wurden 1924 erst 137.000 t importiert waren es 1933 schon 1.183.000 t Sojabohnen. Nach dem Zweiten Weltkrieg breitete sich der Sojaanbau in Nord- und Südamerika rasch aus. Heute kommt mehr als 75 % der Weltsojaproduktion aus dieser Region. Die klassischen Anbauländer China, Japan und Korea produzieren vorwiegend für den eigenen Bedarf.

Soja ist die weltweit bedeutendste Ölpflanze. Sie liegt vor Ölpalmen und Raps an der Spitze aller angebauten Ölsaaten. Mehr als die Hälfte des weltweit produzierten Pflanzenöls stammt aus der Sojabohne. Seit den 70er Jahren steigt in den Industrienationen die Nachfrage nach Soja sowohl für Lebensmittel als auch für Viehfutter. Die Folge – der Sojamarkt boomt. Besonders für die industrielle Landwirtschaft der USA ist die öl- und eiweißreiche Bohne lukrativ. Neben Mais zählt Soja dort heute zu den bedeutendsten Agrarerzeugnissen. 1995 ernteten die amerikanischen Landwirte gut die Hälfte der weltweit 135 Millionen Tonnen. Seit Mitte der achtziger Jahre haben auch Argentinien und Brasilien erkannt, daß mit Soja viel Geld zu verdienen ist und sind zu scharfen Konkurrenten der Amerikaner geworden (Abb. 1).



**Abb. 1:** Soja-produzierende Länder weltweit

In der Welt wurden in 2003 201 Mio. Tonnen Sojabohnen geerntet. 36 % der Ernte entfielen allein auf die USA, gefolgt von Brasilien (28 %), Argentinien (18 %) und China (8 %). Indien produzierte 2003 5,8 Mio. t. Damit entfielen 90 % der Welternte auf vier Länder (USA, Brasilien, Argentinien und China). Aus klimatischen Gründen spielt der Sojaanbau in Mitteleuropa kaum eine Rolle. Im Jahr 2000 konnten in der EU 1,3 Mio. t Soja geerntet werden, knapp 1 % der Weltproduktion. Die wichtigsten Soja-Anbauländer in der EU sind Italien (2002: 452.000 t), Frankreich (2002: 207.000 t) und Österreich (2002: 31.000 t). Auch in einigen südosteuropäischen Ländern wie Rumänien, Bulgarien, Ukraine und in der Türkei wird Soja angebaut.

Soja ist ein billiger, effektiver Eiweiß- und Öllieferant. Keine Pflanze ist so reich an Proteinen wie Soja. Der überwiegende Teil der Sojaerzeugung in den exportierenden Ländern wird als Tierfutter verwendet. Soja ist zudem Rohstoff für verschiedenste Lebensmittelzutaten und -zusatzstoffe. Es wird geschätzt, daß 20-30 000 Lebensmittelprodukte in irgendeiner Form Sojakomponenten beinhalten. Sojabohnen enthalten 30-50 % Eiweiße, 25 % Kohlehydrate, 15-20 % Öl, dazu Vitamine (vor allem aus der B-Gruppe) und Mineralstoffe. Das Sojaeiweiß besitzt eine für die menschliche Ernährung nahezu ideale Zusammensetzung. Allerdings ist Soja roh ungenießbar, da es natürliche Giftstoffe enthält (z. B. Trypsininhibitoren). Soja ist die Kulturpflanze mit der weltweit größten Anbau Fläche mit gentechnisch veränderten Sorten.

Das Konsumenteninteresse an den gesundheitlichen Vorteilen der Sojapflanze wächst weltweit ununterbrochen. Dies ist maßgeblich auf die Erlaubnis der U.S. Food and Drug Administration (FDA) und Joint Health Claims Initiative (JCHI) in Großbritannien zurückzuführen, die es den Herstellern zugestehen, die gesundheitlichen Vorteile der

Sojaproteine zur Senkung der koronaren Herzkrankheiten (KHK) allgemein zu verbreiten (FDA, 1999). Dies basierte auf den zwingenden Beweis des cholesterinsenkennden Effektes der Sojaproteine (Anderson, 1995). Viele klinische und ernährungsphysiologische Studien zeigten den positiven Effekt der Sojaproteine auf (Setchell, 1999). Untersuchungen, die schon vor zwei Dekaden durchgeführt wurden, führten zur These, daß das geringere Auftreten von hormonbeeinflussten Krankheiten mit den Essgewohnheiten in Ländern, in denen Sojaprodukte maßgeblich verzehrt werden, in Zusammenhang stehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden funktionelle Lebensmittel entwickelt, die konsequenterweise einen hohen Anteil an Isoflavonoide enthielten. Diese Lebensmittel zielen insbesondere auf die Gesundheit der Frauen ab (Setchell *et al.*, 2001), da die gesundheitsfördernde Wirkung von Soja primär den Frauen zugeschrieben wird, welches in dem nächsten Kapitel noch näher erläutert wird. Die sojaenthaltene Nahrungsmittel sollten daher so viele Isoflavonoide wie möglich beinhalten; dabei wurde aber die pharmakologisch untersuchte physiologische Verwertbarkeit der Isoflavonoide vernachlässigt (Setchell *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 2000; King und Bursill 1998; Setchell *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 1998). So wurde beispielsweise beworben, daß Sojalebensmittel und Getränke mehr als 100 mg Isoflavonoide pro eingenommener Portion enthalten sollten, was allerdings einer wissenschaftlichen Begründung entbehrte (Setchell und Cole, 2003).

## 2.2 Isoflavonoide und ihre ernährungsphysiologische Bedeutung

Isoflavonoide gehören zur Gruppe der Phenylpropanoide. Sie liegen in der Pflanze meist als Glukosekonjugate, die auch Genistin und Daidzin genannt werden, vor. Demgegenüber überwiegen in traditionell fermentierten Sojaprodukten, wie Tempeh oder Miso die aglykonen Isoflavonoide Genistein und Daidzein, da der Glukoserest durch die zur Fermentation eingesetzten Mikroorganismen enzymatisch abgespalten wird (Wang und Murphy, 1994a). In der Sojabohne sind Isoflavonoide unterschiedlich verteilt. In der Samenschale liegen sie in einer 5- bis 6-fach höheren Konzentration vor als im Kotyledon (Heldt, 1996; Kulling und Watzl, 2003).

Wie bereits erwähnt, können als die wichtigsten Inhaltsstoffe der Sojabohnen die Isoflavonoide Genistein, Daidzein, Genistin und Daidzin genannt werden, denen verschiedene wünschenswerte pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben werden. Sie besitzen eine sowohl antikanzerogene als auch krebsvorbeugende

Wirkung und üben einen phytoöstrogenen Einfluß aus (Barnes, 1998). Die antikanzerogene Wirkung könnte aufgrund einer Inhibierung der Tyrosinkinase (Akiyama *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1998) und/oder der Inhibierung der DNA-Topoisomerase II basieren (Marcovits *et al.*, 1989). Zusätzlich interagieren die Isoflavonoide mit dem Multi-Drug-Resistance-Protein (MRP) und mit dem Phosphoglykoprotein (pGP) (Versantvoort *et al.*, 1994; Castro und Altenberg, 1997).

Epidemiologische Daten zeigen auf, daß die Isoflavonoide das Auftreten von Brustkrebs und anderen Krebsarten zu reduzieren vermögen (Adlercreutz, 1995). Neuere Ergebnisse der Krebsforschung belegen, daß speziell Genistein einen positiven Einfluß in der Prophylaxe bestimmter Krebserkrankungen ausübt. Man geht davon aus, daß schwache Östrogene, wie zum Beispiel Isoflavone, in der Lage sind, sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen auszuüben, indem sie beispielsweise Östrogenrezeptoren blockieren. Die hemmende Wirkung von Genistein auf östrogeninduzierte Tumore der Brust könnte beispielsweise darauf zurückzuführen sein. Tab. 1 gibt einen Überblick über verschiedene bioaktive Substanzen und deren Wirkung auf den menschlichen Organismus.

	Carotinoide	Phytosterine	Saponine	Glucosinolate	Flavonoide	Phytoöstrogene
antikanzerogen	X	X	X	X	X	X
antimikrobiell			X	X	X	X
antiinflammatorisch					X	X
immunmodulierend	X		X		X	X
antiatherogen	X		X	X	X	X
antithrombotisch					X	X

**Tab. 1:** Wirkung verschiedener bioaktiver Substanzen mit potentiell krankheitsvorbeugenden Mechanismen.

Umfangreiche epidemiologische Daten, die in asiatischen Ländern gesammelt wurden, zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr sojahaltiger Lebensmittel und einem geringeren Risiko, bestimmte Krebsarten zu entwickeln. Diese Beziehung konnte vor allem für folgende Organe belegt werden: Brust (Shu *et al.*, 2001) und Prostata (Kolonel *et al.*, 2000; Hebert *et al.*, 1998). Veterinärstudien stützten diese

Beobachtungen. Bei Ergänzung der Tiernahrung durch Sojaproteinisolat konnten experimentell induzierte Tumore gehemmt werden (Hakkak *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1999). Bei Tieren, die mit Krebszellen inokuliert wurden, wurde eine Verzögerung der Metastasenbildung beobachtet (Yan *et al.*, 2000).

Allerdings gaben auch einige Studien Anlaß, sich vorsichtiger über die positive Wirkung der Isoflavonoide zu äußern. In verschiedenen Tierexperimenten bewirkte die Verfütterung von Genistein bzw. eines Sojaproteinisolates bei Mäusen mit implantierten menschlichen östrogenabhängigen Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) ein beschleunigtes Wachstum dieser Tumorzellen. In-vitro-Untersuchungen mit MCF-7-Zellen untermauern diese Befunde. Hier stimulierten Isoflavone in niedrigen Konzentrationen, wie sie in Humanplasma nach Verzehr von Sojaprodukten gemessen wurden, die Proliferation der Tumorzellen, während erst hohe Konzentrationen die gewünschte Wachstumshemmung bewirkten. Auch in klinischen Studien übte die Aufnahme von Isoflavonen einen östrogenen Stimulus auf das Brustdrüsengewebe prä- und postmenopausaler Frauen aus, der als unerwünscht eingestuft wird. Obwohl eine Übertragung von in vitro und tierexperimentellen Befunden auf den Menschen schwierig ist, ist es nicht auszuschließen, daß die Aufnahme von Phytoöstrogenen in hoher Dosierung für Frauen mit Brustkrebs, einer präkanzerogenen Veränderungen in der Brust oder einer genetischen Prädisposition kontrainduziert sein könnte (Newbold *et al.*, 2001).

Sowohl die Behandlung kardiovaskuläre Krankheiten als auch die von Osteoporose profitieren von den positiven Wirkungen der Isoflavonoide, obwohl der genaue Mechanismus dieser Wirkung noch unbekannt ist (Knight und Eden, 1996). Allerdings werden einige der Mechanismen der phytoöstrogenen Wirkungen der Isoflavonoide und ihre Fähigkeit als Agonist an die Alpha- und Beta-Östrogenrezeptoren zu binden zugeschrieben (Kuiper *et al.*, 1997). Zusätzlich wird die antioxidative Eigenschaft der Isoflavonoide diesbezüglich von größerer Bedeutung sein (Peterson, 1995). Sie besteht im Einzelnen aus den folgenden Wirkungen:

- Hemmung der Aktivierung von Prokanzerogenen zu Kanzerogenen, z. B. Aflotoxin B<sub>1</sub> (Leberkrebs) oder die Nitrosaminbildung im Magen infolge antioxidativer Wirkung (Magen und Dickdarmkrebs)
- Abfangen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

- Komplexierung von Metallionen (Hemmung der Fenton-Reaktion)
- Schutz der DNA gegenüber oxidativer Schädigung oder Veränderung
- Verstärken der möglicherweise antioxidativen Kapazität von Vitamin C und Selen

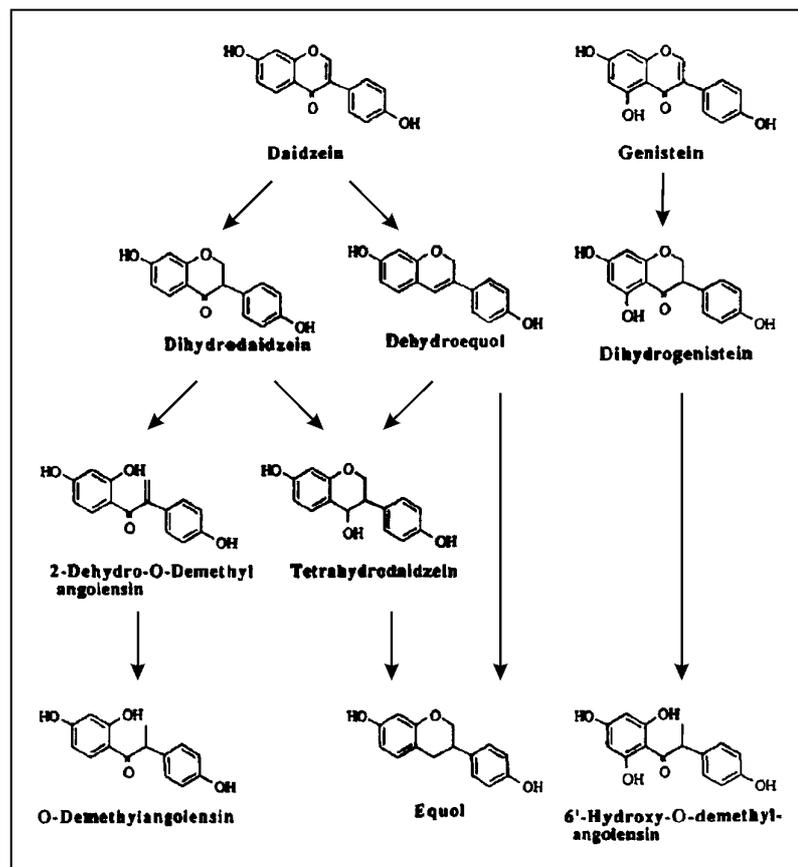
Wie bereits erwähnt, werden Isoflavone häufig in der Literatur als Phytoöstrogene bezeichnet, da sie eine ähnliche Struktur und Eigenschaft wie das weibliche Sexualhormon Östrogen haben. Phytoöstrogene wirken im Körper ähnlich wie das weibliche Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol. Durch Interaktion mit den Östrogenrezeptoren können sie die physiologische Wirkung dieses endogenen Steroidhormons nachahmen oder blockieren. So können die Phytoöstrogene an Östrogenrezeptoren binden und in einigen Geweben östrogene Auswirkungen verursachen. Sie sind jedoch außerordentlich schwach, und besitzen nur 1/1000 bis 1/10000 von der Wirksamkeit des Östrogens (Messina, 1999 a).

### 2.3 Stoffwechsel der Isoflavonoide beim Menschen

Die maximale Plasmakonzentration von Genistein und Daidzein beim Menschen nach Verzehr von nicht fermentierten Sojaprodukten wird nach 6 bis 8 Stunden erreicht. Es wurden für Genistein Halbwertszeiten zwischen 6 und 8 Stunden und für Daidzein zwischen 5 und 6 Stunden in verschiedenen Studien ermittelt. 24 Stunden nach einmaliger Aufnahme von Soja sind die Plasmaspiegel in aller Regel wieder auf den Ausgangswert abgesunken. Noch nicht geklärt ist, inwieweit sich Isoflavonglykoside und Isoflavonaglykone in ihrer Bioverfügbarkeit unterscheiden. Werden Isoflavone als Aglykone aufgenommen, erfolgt wahrscheinlich im Dünndarm aufgrund ihrer Lipophilie eine Resorption durch passive Diffusion. Bei Aufnahme in Glykosidform werden mehrere Resorptionswege diskutiert, deren Bedeutung im Einzelnen noch unklar ist. Lange Zeit wurde angenommen, daß Glukoside erst im Dickdarm durch bakterielle Glukosidasen gespalten werden und anschließend resorbiert werden können. Heute ist bekannt, daß eine Abspaltung des Zuckerrestes auch durch dünndarmeigene

cytosolische Glukosidasen erfolgen kann. Diskutiert wird auch ein aktiver Transport über spezifische Glukosetransporter, wie dies z. B. für das Flavonol gezeigt wurde.

Nicht resorbierte Isoflavone gelangen in den Dickdarm und können durch die Darmflora reaktiv metabolisiert werden. Dabei wird Daidzein zuerst zu Dihydrodaidzein reduziert, welches entweder durch Spaltung des C-Ringes zu O-Demethylangolensin oder unter Erhalt des C-Ringes zu dem Isoflavan Equol verstoffwechselt werden kann (Abb. 2). Die Bildung von Equol ist starken interindividuellen Unterschieden unterworfen und vor allem von der Zusammensetzung der Darmflora abhängig. Etwa ein Drittel der Menschen sind in der Lage, Equol aus Daidzein zu bilden. Analog zu Daidzein wird Genistein im ersten Schritt zu Dihydrogenistein reduziert und kann weiter zu 6'-Hydroxy-O-Demethylangolensin metabolisiert werden (Joannou *et al.*, 1995). Im Unterschied zu Daidzein wird der analoge Equol-Metabolit 5-Hydroxyequol aber nicht gebildet). Stattdessen kann ein Abbau des O-Demethylangolensinderivates zu p-Ethylphenol erfolgen.

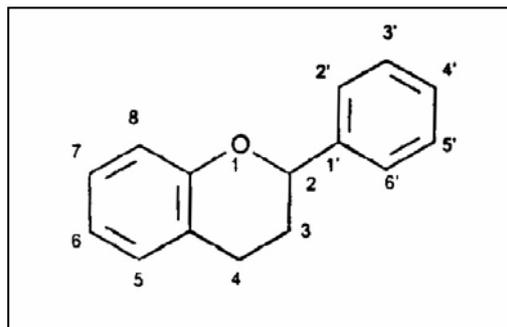


**Abb. 2:** Metabolisierung von Genistein und Daidzein beim Menschen nach Joannou *et al.*, 1995

Isoflavone sowie ihre reduktiven Metabolite, die aus dem Darm resorbiert werden, gelangen über die Pfortader in die Leber. Sie unterliegen dort Phase-II-Konjugationsreaktionen und werden überwiegend zu den Monoglukuroniden umgesetzt. Als Phase-II-Konjugate treten sie in die systemische Zirkulation ein oder werden sowohl renal als auch biliär ausgeschieden. Gelangen sie mit der Galle in den Darm, können die Konjugate durch Enzyme der Darmflora gespalten und die Aglykone erneut resorbiert werden. Damit unterliegen die Isoflavone ähnlich den körpereigenen Steroidhormonen einem enterohepatischen Kreislauf. Der überwiegende Teil der Isoflavone wird über die Niere ausgeschieden.

## 2.4 Biosynthese der Isoflavonoide

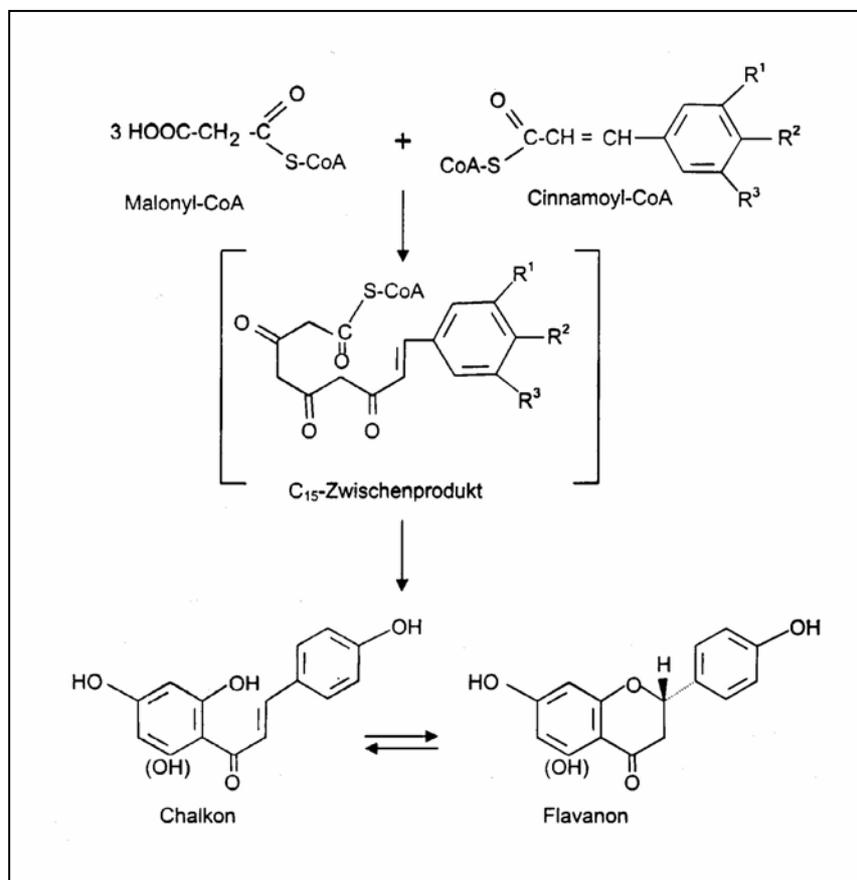
Die Flavonoide zählen zu einer der größten Gruppen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und kommen in Pflanzenreich ubiquitär vor. Die Isoflavonoide stellen eine Untergruppe der Flavonoide dar. Chemisch sind die Isoflavonoide und Flavonoide als Phenylchromanderivate zu bezeichnen (Teuscher, 1990). Das charakteristische Merkmal der Isoflavonoidstruktur ist das verzweigte  $C_6-C_3-C_6$ -Grundskelett (Forkmann und Heller, 1999). Die nach einer Schätzung über 2000 verschiedenen Derivate sind über vielfältige Substitutionen an den beiden aromatischen Ringen und über den Oxidationsgrad der C-Atome 2, 3 und 4 des Chromangerüsts zu erklären (Abb. 3).



**Abb. 3:** Flavangrundgerüst (2-Phenylchroman)

Die Biosynthese der Phenylchromanderivate geht von drei Acetat-Einheiten (Malonyl-CoA) und einer Phenylpropan-Einheit (Cinnamol-CoA) aus, die zu einem  $C_{15}$ -Zwischenprodukt kondensieren, welches schließlich zu einem primär gebildeten Chalkon reagiert (Abb. 4). Dieses Chalkon zyklisiert entweder enzymatisch zu Flavanonen oder aber es geht spontan in solche über. Durch vielfältige Oxidationen,

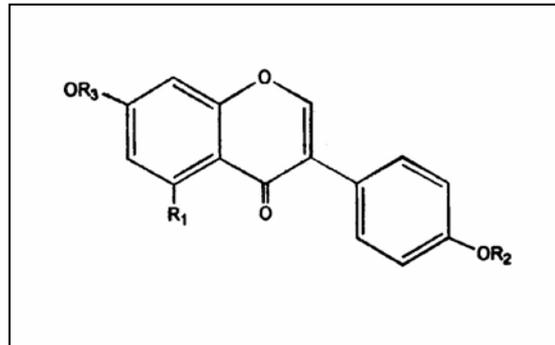
Reduktionen oder auch Dehydrierungen entstehen die einzelnen Untergruppen. Zu dieser Gruppe von Naturstoffen zählen die Flavone und Flavonole. Die Isoflavone unterscheiden sich als 3-Phenylchromonderivate von den in der Pflanzenwelt weit verbreiteten Flavonen nur durch die Position der Verknüpfung von Chromon- und Phenylring (Kulling und Watzl, 2003). Die biologischen Bedeutungen der Flavonoide für die Pflanze sind noch nicht abschließend geklärt. Als sicher anzusehen sind ein Schutz vor Insektenbefall bzw. Bakterien-, Virus- oder Pilzinfektionen, eine Anlockung von Bestäubern durch die charakteristischen Farben und Fluoreszenzen und eine Kontrolle von Wachstumsvorgängen sowohl positiv wie auch negativ.



**Abb. 4:** Biosynthese der Phenylchromanderivate; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> stellen unterschiedliche organische Reste dar (nach Teuscher, 1990).

Von großem Interesse in Hinblick auf eine mögliche östrogene Wirkung ist die Untergruppe der Isoflavonoide, die man im Gegensatz zu den weit verbreiteten Flavonoiden nur in einigen wenigen Pflanzenarten findet (Abb. 5). Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Fabaceae (die Schmetterlingsblütengewächse), die zu Ordnung der Leguminosen zu zählen sind und gemeinhin als Hülsenfrüchte bezeichnet werden.

Bekannt sind bis zum heutigen Zeitpunkt ca. 100 natürlich vorkommende Isoflavonoid-derivate, die häufig in Form von Glykosiden vorliegen und bevorzugt an D-Glukose oder L-Rhamnose gebunden sind (Hunnius, 1998).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Substanz
H	H	H	Daidzein
H	H	Glukose	Daidzin
H	H	6-O-Acetylglukose	6-O-Acetyldaidzin
H	H	6-O-Malonylglukose	6-O-Malonyldaidzin
H	CH <sub>3</sub>	H	Formononetin
OH	H	H	Genistein
OH	H	Glukose	Genistin
OH	H	6-O-Acetylglukose	6-O-Acetylgenistin
OH	H	6-O-Malonylglukose	6-O-Malonylgenistin
OH	CH <sub>3</sub>	H	Biochanin A

**Abb. 5:** Molekulare Struktur von Isoflavonoiden nach Liggins *et al.*, 1998

Chemisch betrachtet handelt es sich bei dieser Untergruppe um 3-Phenylchromane, die sich aus den Flavonoiden ableiten und aus ihnen durch Wanderung des Arylrestes von der Position 2 des Chromanringes in die Position 3 hervorgehen. So entsteht Genistein z. B. aus dem Flavanon Naringenin über die besagte Wanderung des Ringes. Diese Reaktion wird durch das Cytochrom-P-450 Enzym Isoflavon-Synthase katalysiert (Dixon und Ferreira, 2002).

## 2.5 Pflanzenzellkulturen

Seitdem es gelungen ist, Pflanzenzellen in Suspension zu kultivieren, wurde versucht, die Stoffwechsellleistungen der Pflanzenzelle nutzbringend einzusetzen. Die fortschreitenden Erfahrungen auf diesem Gebiet haben inzwischen dazu geführt, daß pflanzliche Zellkulturen in der Forschung vielseitig verwendet werden können. Zum Beispiel werden sie zur Produktion bekannter Naturstoffe eingesetzt. Außerdem können aus Zellkulturen neue pharmakologisch aktive Substanzen isoliert werden. Ein weiteres Einsatzgebiet der Zellkulturen ist die biochemische und genetische Erforschung und Verwendung der Enzyme, die die Sekundärstoffbiosynthese verantworten.

Pflanzenzellkulturen sind in der Lage, eine breite Auswahl wertvolle Phytochemikalien und speziell von Sekundärmetaboliten zu synthetisieren. Es sind mehr als 30 000 chemische Verbindungen, die durch Pflanzen produziert werden. Dies bedeutet ein 4 mal höhere Fähigkeit der Synthese als bei Mikroorganismen beobachtet wurde (Zhong, 2001). Unabhängig von der geographischen Lage, dem Klima, der Saison und anderen Faktoren, von denen die Pflanzenproduktion abhängig ist, verbessert die in vitro-Produktion unter kontrollierten Bedingungen die Zuverlässigkeit der Produktversorgung des Lebensmittelmarktes (Stafford *et al.*, 1986; Parr, 1989; Hay *et al.*, 1988). Ebenso ist es möglich, natürliche pflanzliche Verbindungen, Antikörper und andere komplexe, tierische Proteine in Pflanzenzellsystemen zu exprimieren und zu kultivieren (Franken *et al.*, 1997). Pflanzenzellkulturen bieten eine einzigartige Kombination an physikalischen und biologischen Eigenschaften, die auf eine Kultivierung im größeren Scale-up Maßstab ausgerichtet sein muß, um ihr großes Produktionspotenzial auszunutzen (Doran, 1999).

In verschiedenen Bereichen fordert die Kultivierung der Pflanzenzellen das etablierte Bioreaktordesign und das herkömmliche Kultivierungsverfahren besonders heraus. Pflanzenzellkulturen haben eine komplexere Rheologie und sind schwieriger homogen zu mischen als Bakterien- oder Hefekulturen. Allerdings haben sie geringere Ansprüche an die Sauerstoffversorgung und Kühlbedingungen. Ebenso sind Pflanzenzellkulturen viskos bei hohen Zelldichten und verbinden sich zu Zellaggregaten in verschiedener Größe. Allerdings setzt die Sensibilität der Pflanzenzellen die Ausprägung der Scherkräfte, die durch die Turbulenzen im Kultivierungsgefäß entstehen, enge Grenzen. Diese Scherkräfte werden maßgeblich durch die Luftblasendispersion im Bioreaktor gebildet.

Während der Kultivierung der Pflanzenzellkulturen verursacht möglicherweise die Begasung die Bildung von Schaumblasen im Kultivierungsgefäß. Die Zellvitalität bleibt aber durch die Schaumbildung unbeeinflusst (Wongsamuth und Doran 1994). Über die letzten 10 bis 15 Jahren wurden viele verschiedene Bioreaktordesigns getestet, um die Anforderungen der Pflanzenzellkulturen an eine Scale-up Kultivierung zu erfüllen. Um die Produktion der Sekundärmetabolite zu erhöhen, wäre die Kultivierung in hohen Zelldichten gerade für intrazelluläre Produkte wünschenswert (Tanaka, 1987). Allerdings kommt es dabei zu Problemen wie eine inhomogene Mischung des Kultivierungsmediums oder eine unzureichende Versorgung mit Sauerstoff (Kim *et al.*, 1991).

## **2.6 Einflußfaktoren auf die Isoflavonoidbiosynthese: Elicitoren und Precursoren**

Elicitoren induzieren und erhöhen die Enzymaktivitäten in Pflanzen als Antwort auf Stress. Die Elicitoren wurden bisher erfolgreich eingesetzt, um die Kultivierungsdauer von Pflanzenzellkulturen zu verkürzen und somit in relativ kurzer Zeit die Produktkonzentration zu erhöhen. Desweiteren können Elicitoren zu komplett neuen Verbindungen und somit zu ganz neuen Prozessen führen, die sich in der Lebensmittelbiotechnologie erfolgreich etablieren könnten (Payne *et al.*, 1991). Viele verschiedene Elicitoren wurden bisher identifiziert, die den Zellmetabolismus beeinflussen oder die Produktion von Sekundärmetaboliten steigern können (Eilert, 1987; Funk und Brodelius, 1990; Kohle *et al.*, 1985; Cline und Coscia, 1988; Payne *et al.*, 1991). Elicitoren werden unterteilt in biotisch (biologische) und abiotisch (chemische und physikalische). Biologische Elicitoren sind z. B. Zellwandbestandteile aus Pilzen und Bakterien, deren ausgeschiedene Produkte wie Enzyme und andere Metabolite, pflanzliche Oligosaccharide, die bei der Verletzung oder Infektion aus der pflanzlichen Zellwand herausgelöst werden, oder Viren (Akiyama *et al.*, 1995; Hahlbrock und Scheel, 1989; Bernards und Lewis, 1992).

Als chemische Elicitoren wirken Schwermetalle, Inhibitoren der Proteinsynthese wie Actinomycin D oder Cycloheximid, Atmungshemmer, wie 2,4- Dinitrophenol, Pestizide und Detergentien. Physikalische Faktoren umfassen Kälteschock, UV-Bestrahlung, Behandlung mit hydrostatischen Drücken und hohen elektrischen Impulsen.

(Dörnenburg und Knorr, 1996b). Eine erhöhte UV-Strahlung induziert beispielsweise die Bildung von Isoflavonoiden in verschiedenen Pflanzenarten (Beggs *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1993; Lois, 1994). Diese UV-absorbierenden Verbindungen ermöglichen es den Pflanzenzellen, sich vor UV-B-Schädigungen und nachfolgendem Zelltod zu schützen, indem sie die DNA vor Dimerisierung und Strangbruch bewahren (Dixon und Palva, 1995). Für einige Pflanzenspezies wurden spezifische, hochaffine Elicitor-Bindungsstellen nachgewiesen und charakterisiert (Nürnberg, 1999). Dagegen beruht die Wirkungsweise unspezifischer Signalstoffe möglicherweise auf der Induktion von transmembranen Ionenflüssen, die durch porenbildende Aktivität initiiert werden (Lee *et al.*, 2001).

Ein besonders interessanter biologischer Elicitor ist Methyljasmonat. Jasmonate sind Phytohormone, die auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze Einfluss nehmen. Die Hauptkomponente der Jasmonate ist der Jasmonsäure-Methylester. Er ist ein Signalstoff, welcher als Antwort auf verschiedene Arten von Stress ausgeschieden wird und dann in erhöhtem Maße zu finden ist. Schon ab einer Konzentration von  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  M entfalten Jasmonate ihre Wirkung. Dabei können sie bestimmte Prozesse hemmen, fördern oder induzieren. Sie wirken auf die Genexpression auf verschiedenen Ebenen ein. Dazu gehören Genaktivierung und Transkription, posttranskriptionale RNA-Modifizierung, Transkriptionsstabilität, Translation, posttranslationale Proteinmodifizierung und sogar herabgesetzte Synthese anderer Proteine. Enzyme, wie z. B. die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase oder die Chalconsynthase gehören zu den Jasmonat-induzierten Abwehrproteinen (JIP's), die neu synthetisiert werden. Dabei ist die Dosis ein wichtiger Parameter, da die Bildung der Sekundärmetabolite mit diesem Parameter korreliert (Rijhwani und Shanks, 1998).

Eine weitere Möglichkeit die Produktion der Sekundärmetabolite anzuregen, ist die Applikation verschiedener Precursoren in das Nährmedium. Die Precursoren können spezifische Zwischenprodukte innerhalb der Stoffwechselwege darstellen, die zu einer erhöhten Bildung der Metabolite führen können. Bei der erfolgreichen Anwendung der Precursoren muß sowohl deren potentielle Toxizität als auch der Zeitpunkt der Precursorapplikation berücksichtigt werden (Payne *et al.*, 1991).

## 2.7 Beeinflussung der Isoflavonoidbiosynthese durch Hochdruck und Hochspannung

### 2.7.1 Hydrostatischer Hochdruck

In der Lebensmittelindustrie wurden Anfang des 20. Jahrhunderts Untersuchungen hinsichtlich der Wirksamkeit von hohem Druck bis zu 1000 MPa auf die Haltbarkeit und Veränderung von Lebensmitteln durchgeführt. Hinzu kamen sukzessive Kenntnisse zur Inaktivierung oder Schädigung von Enzymen durch Hochdruckbehandlung (Butz *et al.*, 1996; Cheftel, 1992) oder die positive Wirkung von Hochdruck auf die Konservierung von Lebensmitteln (Knorr, 1999, Basak *et al.*, 2002).

Das Potenzial der Hochdruckbehandlung zur Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts demonstriert (Hite, 1899). Allerdings wurde es zunächst nicht als attraktive Technologie zur Lebensmittelkonservierung angesehen. Erst in den frühen 80-iger Jahren fand eine Rückbesinnung auf dieses Verfahren statt. Eine wichtige Voraussetzung dafür war die Initiative des japanischen Agrarministeriums. Schon 1991 kamen verschiedene hochdruckbehandelte Produkte auf den japanischen Markt (Hayashi, 1987; Lucore *et al.*, 2000; Smelt, 1998).

Hydrostatischer Hochdruck beeinflusst nicht die kovalenten Bindungen der Moleküle; somit bleiben Vitamine, Pigmente und Geschmackstoffe, sowie ihre Vorläufer von diesem Verfahren unbeeinflusst (Stute *et al.*, 1996). Dies bedeutet einen signifikanten Vorteil gegenüber thermischen Verfahren, die beispielsweise bei der Konservierung von Fruchtsäften eingesetzt werden (Basak *et al.*, 2002)

Darüberhinaus inaktiviert Hochdruck vegetative Bakterien (Meyer *et al.*, 2000; Ohshima und Koizumi, 1993; Smelt, 1998), Hefen und Schimmelpilze effizient (Ritz *et al.*, 1998; Prestamo *et al.*, 1999; Zook *et al.*, 1999; Parish, 1998). Allerdings erwiesen sich Bakteriensporen als sehr resistent gegenüber der Anwendung von Hochdruck. Sie können Drücke von über 1000 MPa überleben (Balasubramanian *et al.*, 2003). Nur eine Kombination von moderaten Temperaturen und Druck kann die Sporen inaktivieren (Cheftel, 1995; Rovere, 1995; Reddy *et al.*, 1999).

Studien über hydrostatischen Hochdruck zeigten deren vielfältigen Einfluß auf die Funktion und Aktivität der Zelle und ihren intrazellulären Systemen. Beispielsweise

wurde die Beeinflussung der Chromosomen und Mikrofilamente der Zelle und den mRNA-Spiegel durch Hochdruck beobachtet (Masson, 1999; Wilson *et al.*, 2001; Eisenthal *et al.*, 1999). Auch die Plasmamembran und andere intrazelluläre Membransysteme sowie die 3-dimensionale Struktur der Proteinmoleküle werden durch hohe Drücke in ihre Funktionalität reversibel oder irreversibel beeinflusst (Riahi und Ramaswamy, 2003; Nguyen *et al.*, 2002; Goodner *et al.*, 1998). Diese verschiedenen Einflüsse des Hochdruckverfahrens sind in der Lage, bei den Zellen Streß auszulösen und somit die potentielle Bildung von Sekundärmetaboliten als Streßantwort der Zelle zu induzieren.

### **2.7.2 Hochspannungsimpulse (HSI)**

Die Hochspannung ist, wie die Anwendung von Hochdruck, auch eine Methode der kalten Pasteurisierung. Diese wurde entwickelt, um Mikroorganismen abzutöten und die Qualität der Lebensmittel ohne Anwendung von Hitze zu erhalten (Castro *et al.*, 1993; Sale und Hamilton, 1967; Zimmermann, 1986; Jeyamkondan *et al.*, 1999). Grundlegende Voraussetzung für die Anwendung der Hochspannung in der Lebensmittelindustrie ist, daß es zu keinen signifikanten sensorischen Unterschieden zwischen den behandelten und nicht behandelten Nahrungsmitteln kommt. Untersuchungen an verschiedenen Fruchtsäften zeigten, daß HSI für die Behandlung dieser Lebensmittel besser als thermische Verfahren geeignet erscheint (Jia *et al.*, 1996). Lebensmittelkonservierung durch wiederholte Hochspannungsimpulse (einige  $\mu$ s) induzieren keine signifikante Überhitzung oder sensorische Änderungen der Lebensmittel (Barsotti und Cheftel, 1999). Darüberhinaus können elektrische Hochspannungsimpulse zur Vorbehandlung mit dem Ziel der Verbesserung des Trocknungsprozesses von Lebensmitteln genutzt werden (Clas, 1994).

Der Hochspannungsimpuls wurde außerdem in den Gebieten der Gen- und Biotechnologie angewendet (Brodellius *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1992). Durch die Einwirkung der Hochspannungsimpulsen auf die zellulären Strukturen können hierbei die Membrane der Zellen permeabilisiert und Fremdmaterial wie z. B. DNA in die Zelle eingebracht werden. Ein ähnliches Prinzip wird für die Inaktivierung von Mikroorganismen angewendet. Durch den angelegten Hochspannungsimpuls, kommt es dabei zu einer irreversiblen Schädigung der Zellmembran durch Elektroporation (Barsotti und Cheftel, 1999). Dabei sind die Dauer und die Intensität der Hochspannungsbehandlung von entscheidender Bedeutung. Die Stärke des

elektrischen Feldes zur Induzierung des jeweiligen kritischen Membranpotential ist in erster Linie vom elektrischen Widerstand des umgebenden Mediums abhängig (Kekez *et al.*, 1996). Die Permeabilisierung der Membran kann auch zur Freisetzung von Sekundärmetaboliten aus pflanzlichen Zellkulturen unter Aufrechterhaltung der Zellstruktur genutzt werden (Brodellius *et al.*, 1988). Die Vorteile dieser Permeabilisierung liegen in der schonenden Behandlung der Zellkulturen ohne chemische Extraktionsmittel bei Raumtemperaturen und der kurzen Behandlungsdauer.

## 2.8 Kultivierung von Pflanzenzellen im Bioreaktor

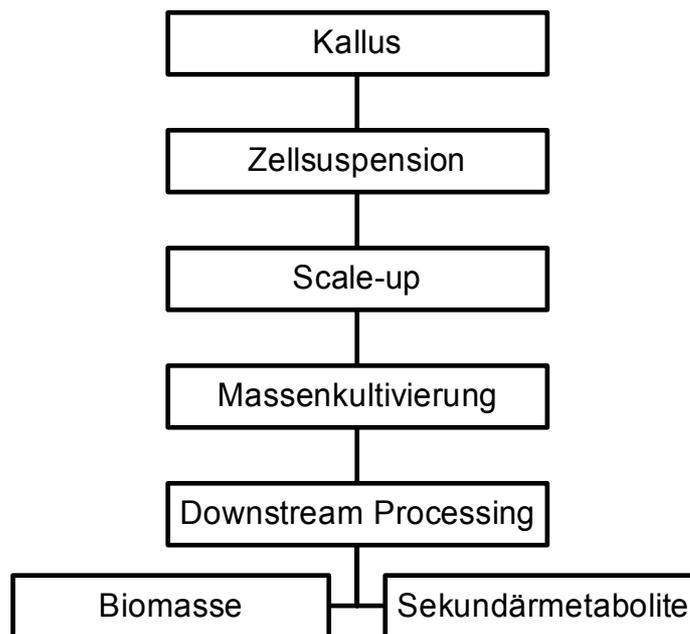
Den Bioreaktoren wird eine große Zukunft in der Gewinnung von biologisch wichtigen Substanzen vorhergesagt (Chang, 2003). Dabei ist das Hauptziel der Untersuchungen, eine kosteneffiziente Produktion der gewünschten Verbindungen zu erreichen. Vor jeder Scale-up-Untersuchung stehen Vorversuche im Batchverfahren. Hierbei erfolgt die Kultivierung der Pflanzenzellen im Labormaßstab in erster Linie in Schüttelkolben. Die dabei erzielten Ergebnisse sind von erheblicher Relevanz für die Untersuchungen im Scale-up-Maßstab.

Pflanzenzellen erfuhren schon Ende der 50er Jahren ihre Kultivierung im Großmaßstab im 10 L Glasballon, die auf einfache Weise belüftet wurden (Heß, 1992). Ein Jahr darauf wurde schon eine Kultivierung in einem Tank mit bis zu über 100 L Inhalt etabliert. Seitdem nahm die Entwicklung der Kultivierungsvorrichtungen, die dem Pflanzenmaterial und der Zielsetzung jeweils optimal entsprechen, eine rasante Aufwärtsbewegung. Die beiden Hauptprobleme bei der Massenkultivierung pflanzlicher Zellen, ausreichende Belüftung und gute Durchmischung, erfordern je nach Gegebenheiten des Pflanzenmaterials und den speziellen Zielsetzungen entsprechende apparative Anpassungen. Pflanzliche Zellen in Suspension sind beispielsweise, wie bereits erwähnt, gegenüber Scherkräften wesentlich empfindlicher als Bakterien. Infolgedessen mußten Bioreaktoren mit speziellen Rührsystemen eingesetzt werden. Für die kontinuierliche Kultur werden meistens Apparaturen nach dem Funktionsprinzip des Chemostaten eingesetzt.

Der Airlift-Bioreaktor hat sich im Pilotmaßstab für die Kultivierung von Pflanzenzellkulturen durchgesetzt, da er sich durch einen einfachen Aufbau und eine relativ

geringe Scherbelastung der Zellen auszeichnet. Mit diesem Reaktortyp wurden gutes Zellwachstum und gute Produktausbeuten bei unterschiedlichen Kulturen erzielt (Smart und Fowler, 1984; Zenk *et al.*, 1977). Die Luft wird am Boden des Reaktors über eine Fritte eingeblasen; die aufsteigenden Blasen durchmischen die Suspension, versorgen die Zellen mit Sauerstoff und befördern die Suspension in einem Kanal nach oben (Merchuk, 1990; Panda *et al.*, 1989). An der Oberfläche des Fluides entweicht das Gas und wird so von der Suspension getrennt. Das entgaste Fluid sinkt in einem zweiten Kanal wieder nach unten und tritt dort erneut in den Kreislauf ein. In der so gebildeten Schleife ist die Gestaltung der unteren Verbindung zwischen diesen beiden Kanälen entscheidend für die Gasaufnahme-fähigkeit des Fluids und die Suspensionsgeschwindigkeit (Merchuk, 1990). Durch die räumliche Trennung der beiden Kanäle wird vermieden, daß das Gas zu schnell durch die Suspension nach oben steigt. Ein Teil des Gases entweicht so oben aus dem Fluid und das Fluid mit dem restlichen gelösten Gas strömt nach unten, wo durch die unterschiedlichen Dichten der Fluide ein Druckunterschied entsteht. Die Zirkulation im Reaktor wird so gewährleistet, ohne daß Orte geballter Energiedissipation entstehen, wie es zum Beispiel im Rührreaktor der Fall ist (Merchuk, 1990).

Wie bereits erwähnt, setzt die Sensibilität der Pflanzenzellen gegenüber den Scherkräften, die durch die Turbulenzen im Kultivierungsgefäß entstehen, enge Grenzen. Obwohl Airlift-Bioreaktoren aufgrund ihrer geringeren Scherkräfte anfänglich bei der Kultivierung von Pflanzenzellen favorisiert wurden, zeigten experimentelle und theoretische Studien, daß das homogene Mischen in diesem Kultivierungsgefäßen bei hohen Zelldichten zwischen 20-30 kg/m<sup>3</sup> nicht geeignet erscheint (Fowler, 1988; Scragg *et al.*, 1988a; Tanaka 1981; Ulbrich *et al.*, 1985; Doran, 1993). Aufgrund der größeren Kraft, die durch die mechanische Agitation auf das Kultivierungsmedium angewendet wird, scheinen die Stirred-Tank Bioreaktoren besser für viskose Flüssigkeiten geeignet zu sein. Sie wurden oft bei der Pflanzenzellkultivierung erfolgreich eingesetzt (Curtin, 1983; Hashimoto *et al.*, 1982; Rittershaus *et al.*, 1990). Es ist allerdings zu beachten, daß sich dies von Organismus zu Organismus unterscheidet. So kann eine Kultivierung im Stirred-Tank Bioreaktor eine größere Zelllysis gegenüber den Airlift-Bioreaktor bewirken, welches sich in einem Rückgang der Produktsynthese um 50 % manifestiert (Aghighi, 1988)



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Produktion von Sekundärmetaboliten mit Hilfe der *in vitro*-Kulturen

Kalluskulturen werden oft zur Gewinnung der Zellsuspensionskulturen eingesetzt (Abb. 6), da die Produktion der sekundären Pflanzenstoffe im Kallus stabiler ist. Darüberhinaus sind Kalluskulturen aufgrund der längeren Kultivierungsperioden besser geeignet als eine Bestandskultur (Stock). Zellsuspensionskulturen bieten eine hervorragende Quelle zur Enzymreinigung und zu Untersuchungen der molekularen Regulation von Bio-synthesewegen. Die Möglichkeit zur Produktakkumulation bei diesen Kulturen besitzt enormes Potential für die Umsetzung im Scale-up Maßstab. Nach erfolgreich abgeschlossenen Scale-up Versuchen werden die Sekundärmetabolite über die biotechnologische Massenkultivierung und dem Down-Stream-Processing in größerem Maßstab gewonnen.

## 2.9 Die HPLC-Analytik zur Bestimmung der Isoflavonoide

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) ist eine der vielseitigsten Instrumente zur Analyse komplexer Gemische. Sie ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, wobei die extrahierten Stoffgemische unter Druckanwendung quantitativ und qualitativ analysiert werden. Die Extraktion und HPLC-Analyse der Isoflavonoide von Sojazellen wird oftmals aufgrund verschiedener Wechselwirkungen als schwierige

Herausforderung beschrieben (Griffith und Collison, 2001). Vor 1991 wurden meistens Alkohole, insbesondere Methanol dazu verwendet. Danach fand Acetonitril als Lösungsmittel immer größere Verbreitung. Zum Teil wurden unterschiedliche Lösungsmittel mit HCl zur Erzielung einer Hydrolyse verwendet (Nakamura *et al.*, 2000). Aufgrund der Vielzahl der verwendbaren Extraktions- und Laufmittel kann die Ausbeute bzw. die Gewinnungsrate der Isoflavonoide aus Soja-Zellkulturen je nach der eingesetzten Extraktionstechnik variieren (Setchell *et al.*, 2003).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Sojabohnen-Zellkultur (*Glycine max*)

Als Zellkultur fanden Pflanzenzellen von *Glycine max* für die verschiedenen Untersuchungen Verwendung. Die Suspensionskultur von *Glycine max* stammte von der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin (BBA) und war aus einer Kalluskultur der Sojabohnenwurzel angelegt worden.

Alle Darstellungen der Versuchsergebnisse bis Kapitel 4.4 beschreiben die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Experimente und die dazugehörigen Fehlerindikatoren (Spannweite) mit der Anzahl der Einzelbeobachtungen ( $n=4$ ). Die Bioreaktorversuche wurden mit  $n=2$  durchgeführt mit jeweils Doppelbestimmungen.

Die Suspensionskultur wurde im Dunkeln bei  $27\pm 1^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler bei 109 rpm gehalten und alle 7 Tage überimpft. Dazu wurden 10 mL der Kultur in 60 mL autoklaviertes B<sub>5</sub> Medium (Gamborg *et al.*, 1968) unter der Sterilbank überführt. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 2 dargestellt, die Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 erfolgte mit 1N KOH. Die beimpften 200 mL Erlenmeyerkolben wurden anschließend sorgfältig mit Aluminiumpapier verschlossen.

Die Stammhaltung der Sojazellkultur erfolgte im 200 mL Erlenmeyerkolben mit 60 mL B<sub>5</sub> Medium.

Zusammensetzung B <sub>5</sub> Nährmediums	Bestandteile	Menge (g/L)	Konzentration (mL/L)
Makroelemente	KNO <sub>3</sub>	25	10
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,5	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,3	
Mikroelemente	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10	100
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2	
	NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,25	
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,25	
	KJ	0,45	
Vitamine	Nikotinsäure	0,1	100
	Pyridoxin-HCl	0,1	
	Thiamin-HCl	1	
	myo-Inositol	10	
Fe-EDTA	-	36,7	1
Hormone	(2,4 Dichlorphenoxy)-essigsäure	0,4	2,5
Saccharose		20	

**Tab. 2:** Zusammensetzung des B<sub>5</sub> Mediums

### 3.2 Isoflavonoidgehalt in handelsüblichen Soja-Produkten

Folgende handelsübliche Soja-Produkte wurden nach dem Extraktionsverfahren (siehe Kapitel 3.10.3) aufbereitet und in der HPLC-Anlage analysiert:

Soja-Keimling	Bean Sprouts, Lunja
Soja-Mehl	Spielberger KG, demeter, 250 g
gesalzene Sojapaste	Yeo`s Salted Soybeans, 450 g Glas
gelbe Sojapaste	Soybean Paste Yan Wal Yun Co & Ltd, 300 mL Flasche
Tofu	Mori-nu Tofu Soybean Curd 12,3 OZ (349 g) Morinaga Nutritional Foods, Inc.
Soja-Trunk	Yeo`s Soja Bean Drink Net, 250 mL
Soja-Sauce	Pearl River Bridge, 150 mL, Artikel Nr: 5704

### 3.3 Chemikalien

Vitalität (TTC-Test)

2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid, Ethanol, Natriumdihydrogenphosphat, (Merck, Darmstadt, Deutschland)

HPLC Standards (Roth, Karlsruhe, Deutschland):

Daidzein (7,4'-Zweihydroxyisoflavon; Molekulär Gewicht: 254)

Genistein (5,7,4'-Dreihydroxyisoflavon; Molekulär Gewicht: 270)

Daidzin (7-O-Glykosyl-4'-Hydroxyisoflavon; Molekulär Gewicht: 416)

Genistin (7-O-Glykosyl-4',5'-Zweihydroxyisoflavon; Molekulär Gewicht: 432)

Proben Methanol (CH<sub>4</sub>O) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Acetonitril (C<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>) (Fisher Chemicals, Loughborough, UK)

Tetrabutylhydrochinon (Flucka, Neu-Ulm, Deutschland),

HCl (Merck, Darmstadt)

Elicitoren:

Jasmonsäuremethylester 95 %, Chitin (β 1,4-N-Acetyl-D-Glucosaminoglykan - durch Ultraschallbehandlung solubulisiert), PAL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Deutschland), Naringenin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Salicylsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland),

Medium

Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Flucka (Neu-Ulm, Deutschland)

### 3.4 Geräte

Abzug Variolab Mobilien W 90, Waldner Laboreinrichtungen GmbH+Co Deutschland

Gefriertrockner Edwards International, UK

Glasgefäße Schott, Deutschland

HPLC	Gynkotheek, München, Deutschland
• Flaschen (2 mL)	2-7064, Supelco, USA
• Probenaufgabe	58059210, Gynkotheek, München, Deutschland
• Pumpe	P 580 HPG, Gynkotheek, München, Deutschland
• Säule	RP C 18, Merck, Darmstadt, Deutschland
• Software	Chromeleon, Deutschland
• UV Detektor	Deuteriumlampe L613-08, Hamamatsu, Japan
Inkubator	Weise Kälte- Technik, Deutschland
Konduktometer	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Uvikon 922, Kontron instruments, Italien
Rotationsverdampfer	Rotavapor RI, Buchi, Deutschland
Schüttler	Certomat U, B.Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Lamin air, Deutschland
Sterilfilter	FP 30/0,2; Schleicher und Schuell, Deutschland
Trockenschrank	Typ UL 40, Memmert, Deutschland
Ultra turrax	T25, Janke und Kunkel, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 100, Bandelin, Deutschland
Waagen	Analysewaage R 102, Sartorius, Deutschland H 120-D2, Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Typ 3047, Küttermann KG, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Deutschland
Hochdrucksanlage	National Forge Europe (St. Niklaas, Belgien)
Hochspannungsanlage	PurePulse Technologies, Inc. (Model 01882 Juice Extraction Enhancement System)
Airlift-Bioreaktor	Eigenentwicklung TU Berlin

### 3.5 Hydrostatischer Hochdruck

#### 3.5.1 Aufbau der Hochdruckanlage

Im Rahmen der Batchversuche wurde der Hochdruck im Druckbehälter durch eine pneumatische Hochdruckpumpe erzeugt. Der Druckbehälter der Hochdruckanlage von National Forge besaß ein Volumen von 0,59 L mit einem inneren Durchmesser von 55 mm und einer Innenlänge von 300 mm. Die Arbeitsdrücke waren stufenlos wählbar bis 600 MPa. Das Druckübertragungsmedium bestand zu 97 % aus Wasser

mit einem 3 %-igen Anteil eines Spezialpressöls der Firma National Forge. Diese Anlage war mit einer Druckhaltesteuerung versehen, die bei temperaturbedingtem Druckabfall automatisch nachpumpte. Der Temperaturbereich von -5 °C bis 100 °C war stufenlos einstellbar und wurde während des gesamten Hochdruckprozesses angezeigt. Die Druckhaltezeit war frei wählbar. Die Temperatur erhöhte sich durch den Druckaufbau je nach Druckhöhe um max. 11 K, fiel aber sofort nach Erreichen des maximalen Druckes wieder ab, sobald die Pumpe zum Stillstand kam. Der Druckabbau erfolgte bei dieser Anlage durch das manuelle Öffnen des Entlastungsventils.

### **3.5.2 Probenaufbreitung zur Versuchsdurchführung**

Die Zellkulturen im 200 mL Schüttelkolben wurden 7 Tage lang im Dunkeln bei 27°C auf einem Schüttler bei 109 rpm kultiviert und anschließend geerntet. Die so gewonnene Zellbiomasse wurde im Polyethylenbeutel 60 bis 70 g proportioniert und unterschiedlichen Hochdruckbereichen (25, 50, 75 und 100 MPa) bei 25 °C 5 Minuten lang ausgesetzt. Danach wurden sie zur HPLC-Analytik gefriergetrocknet und bei -28°C aufbewahrt.

### **3.6 Kälteschock**

Die 7 Tage alten Zellkulturen wurden nach der Hochdruckbehandlung geerntet und 1 Stunde lang einer Temperatur von 8°C ausgesetzt.

### **3.7 Hochspannungsimpulsbehandlung bei den Batchversuchen**

Die Hochspannungsimpulse wurden mit Hilfe der HSI-Behandlungsanlage von PurePulse Technologies, Inc. (Model 01882 Juice Extraction Enhancement System) den Zellkulturen appliziert. Die zu untersuchenden Kulturen verschiedenen Alters wurden mit Kochsalzlösung auf eine einheitliche Leitfähigkeit des Mediums eingestellt. Anschließend wurden 30 g der Zellen aus den Kolben filtriert und in eine Meßkammer, die mit 20 mL Kultivierungsmedium B<sub>5</sub> gefüllt war, überführt. Die Elektroden wurden in einem Abstand von 8 cm an der Meßkammer adjustiert und die jeweilige Spannung 3 mal in einem Intervall von 10 s an die Meßkammer angelegt.

Nach der HSI-Behandlung wurden die Zellen filtriert und 10 g in eine Meßküvette mit seitlichem Loch zur Bestimmung der Permeabilisierung überführt. Luftblasen waren dabei zu vermeiden bzw. zu beseitigen, da diese Funkenüberschläge verursachen können. Beim Verschließen der Küvette mit der zweiten Elektrode drang überschüssige Flüssigkeit aus dem Küvettenloch heraus. Die Küvette wurde abgetrocknet und in die Halterung gespannt. Daraufhin erfolgte die Messung der Permeabilisierung der behandelten Zellen über ein computergesteuertes Programm. Dazu wurde zunächst ein Nullwert für die intakten Zellen eingestellt, wogegen die mit unterschiedlich hohen Spannungen behandelten Proben gemessen wurden.

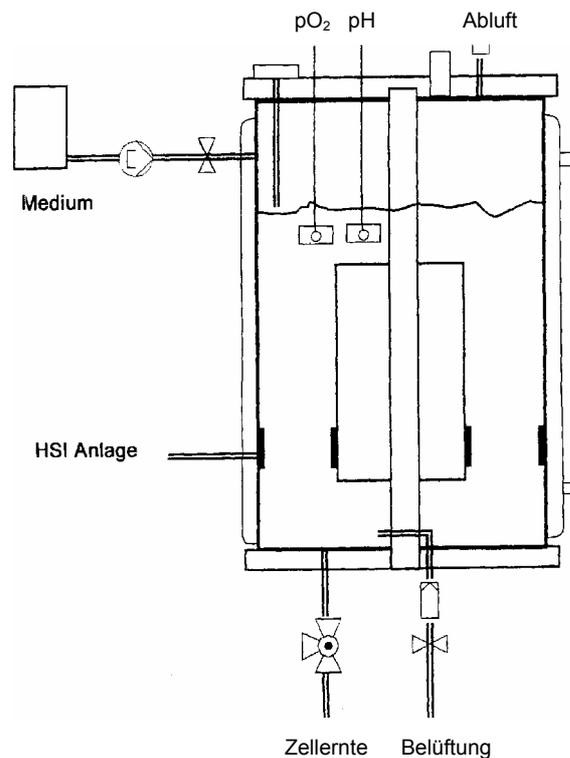
### 3.8 Airlift-Bioreaktor

Abbildung 7 zeigt schematisch den verwendeten Fermenter. Es handelte sich um einen Airlift-Bioreaktor mit integrierter Hochspannungsimpulseinheit. Der Fermenter aus Glas wurde im Institut für Lebensmitteltechnologie an der TU Berlin entwickelt und hatte ein Fassungsvermögen von 3 L.

Er bestand aus folgenden Hauptteilen:

- Innere Säule
- Mittlere Säule
- Äußere Säule mit Temperiermantel
  - 2 Anschlüsse zur Temperierung
  - 3 Öffnungen zur Ernte bzw. Befüllung bzw. Elektrodenanschluss
- Belüftungsring
- Deckel mit 7 Öffnungen
  - 2 x PG 12 für Elektroden
  - 3 x Anschlüsse Bioengineering kompatibel
  - 1 x Anschluss für Überdruckventil
  - 1 x Öffnung für innere Säule
- Boden mit 5 Öffnungen
  - 1 x Belüftungsanschluss
  - 2 x Anschlüsse Bioengineering kompatibel
  - 1 x Anschluss für Dreiwege Ventil (Ernte)
  - 1 x Öffnung für innere Säule

- Elektroden
  - pH-Einstabmeßkette In Pro 3030/3100 der Mettler Toledo GmbH, Steinbach, Germany
  - pO<sub>2</sub>-Sonde Stratos 2401 Oxy der Firma Knick, Berlin, Germany
- Fritten der Firma Merck (je 2 mit Durchmesser 15 mm und 12 mm)



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des konventionell aufgebauten Bioreaktors

Die nicht benötigten Bioengineering-Öffnungen wurden mit Stopfen geschlossen. Der Fermenter wurde mit 2,3 L B<sub>5</sub> Medium beschickt und zusammen mit dem Vorratsbehälter für 20 min. bei 120°C autoklaviert. Zum Animpfen wurden 8 Kolben mit 7 Tage alten Sojazzellkulturen verwendet, die unter sterilen Bedingungen in den Reaktor überführt wurden. Damit ergab sich ein Arbeitsvolumen von 2,7 L, welches durch Medienzugabe nach Probenahme konstant gehalten wurde. Die Temperierung des Bioreaktors erfolgte durch den Mantel mit Hilfe eines Wasserbades. Die Belüftung wurde je nach Versuch manuell reguliert und anhand der Sauerstoffelektrode verfolgt. Vor Eintritt der Luft in den Fermenter passierte sie einen Mikrofilter. Dispergiert wurde sie durch einen Belüftungsring bzw. durch Fritten am Boden des Reaktors. Die Probenahme von 2x100 mL erfolgte unter sterilen

Bedingungen. Es wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Bei Anwendung der HSI wurden Proben vor der Behandlung 1 h, 6 h und 24 h danach gezogen.

Der Aufbau des Bioreaktors wurde im Laufe der Untersuchungen modifiziert. Zur Optimierung des Sauerstoffgehaltes und der Luftblasengröße wurden sogenannte Fritten im Bioreaktor eingesetzt. Hierbei wurde die Funktionalität des Begaserrings außer Kraft gesetzt und stattdessen 4 Fritten in den Begaserring integriert.

### **3.8.1 HSI-Anwendung im Airlift-Bioreaktor**

Die verwendete HSI-Anlage wurde an der TU Berlin im Fachbereich Lebensmittelbiotechnologie- und Prozesstechnik entwickelt. Gerätetechnische Daten sind in Angersbach *et al.*, (2000) aufgeführt. Die Sojabohnenzellkulturen wurden mit einer Ladespannung von 1,6 kV bei einer Frequenz von 5 Hz bepulst. Die Behandlungszeit betrug 36 s, was einer Pulszahl von 3 pro Zelle entsprach. Der Energieeintrag betrug 5 J/kg, die Feldstärke 1,6 kV \* cm. Die Zellen wurden am 2., 4., 6. und 8. Wachstumstag bepulst. Außerdem wurden die einzelnen Versuchstage separat angesetzt (2d; 4d; 6d; 8d). Dies verringerte das Risiko einer Kontamination. In einem vorherigen Versuch war eine solche Kontamination durch den Wechsel des Medienvorratsbehälters aufgetreten.



**Abb. 8:** Darstellung des Airlift-Bioreaktors (im Vordergrund) während der Kultivierung mit angeschlossener HSI-Einheit

### 3.8.2 Kopplung von Hochspannungsimpulsen mit Methyljasmonat

Zur Induzierung der Isoflavonoidbiosynthese wurde HSI mit einer Methyljasmonatapplikation gekoppelt. Hierzu wurden 100 mg/L Methyljasmonat in etwas Medium pipettiert und anschließend vor Animpfen durch einen Sterilfilter in den Fermenter gegeben. Es wurde bis zum 7. Tag kultiviert, da der Isoflavonoidnachweis im Fermenter innerhalb der ersten Wachstumsstages möglich war. Die Behandlung der Zellen mit Hochspannungsimpulsen erfolgte am 2. und 4. Tag.

## 3.9 Analyseverfahren

### 3.9.1 Bestimmung des Frischgewichtes

100 mL entnommener Probe wurden in ein Vakuumfiltriergerät mit Filterpapier (Schleicher und Schuell 589) überführt und unter Vakuum für 3 min abgenutscht. Das Filtrat wurde für die Bestimmung der Leitfähigkeit und des pH-Wertes aufgehoben.

Der Zellrückstand wurde eingewogen und das erhaltene Frischgewicht in g/L angegeben.

### 3.9.2 Bestimmung des Trockengewichtes

1 g frisch abfiltriertes Probenmaterial wurden in Aluminiumtiegel eingewogen und bei 105°C für 24 h bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet. Nach einer Abkühlung von 1 h im Exikator wurden die Proben ausgewogen und das Trockengewicht in g/L angegeben.

$$TG = FG \times TS$$

TG Trockengewicht in g/L

FG Frischgewicht in g/L

$$TS = mTG / mFG$$

TS Trockensubstanz; Verhältnis aus Trockengewicht zu Frischgewicht

mTG Masse Trockengewicht in g

mFG Masse Frischgewicht in g

### 3.9.3 pH - Messung

Der pH-Wert wurde im Filtrat, das bei der Bestimmung des Frischgewichtes anfiel, mit einem pH-Meter bei Raumtemperatur gemessen.

### 3.9.4 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit gab einen Hinweis auf den Gehalt der anorganischen Ionen im Nährmedium, vor allem über vorhandenes Nitrat und Ammonium.

Die Messung erfolgte im o. g. Filtrat mit einem Konduktometer bei Raumtemperatur und wurde in  $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  angegeben.

### 3.9.5 Vitalitätstest (TTC Test)

Intakte Zellen reduzierten 2,3,5 -Triphenyl-tetrazolium-chlorid (TTC) zu Formazan, dessen Absorption bei 485 nm gemessen werden konnte (Towill und Mazur 1974). Dabei war die Farbintensität ein direktes Maß für die Reduktaseaktivität in den Mitochondrien der Zellen. Je 0,1 g frische Zellen wurden in Zentrifugengläser eingewogen. Der Blindwert wurde mit 1 mL 0,066 M Na-Phosphat- Pufferlösung und die Messwerte mit 1 mL TTC-Pufferlösung überschichtet. Es folgte eine Inkubation von 24h bei 22°C im Dunkeln. Anschließend wurde die Reaktion mit 5 mL 96 %-igem Ethanol abgestoppt und die Proben bis zu ihrer Vermessung eingefroren.

Zur Extraktion des roten Farbstoffes wurden die Proben 15 min im 60°C heißen Wasserbad erhitzt, 15 s auf dem Whirlmix geschüttelt und anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei einer Wellenlänge von 485 nm im Spektralphotometer gegen den Blindwert vermessen.

Die Extinktion bezogen auf das Trockengewicht wurde als Vitalitätsfaktor benutzt. Die Angabe erfolgte in Extinktion/g TG.

### 3.9.6 Die Ermittlung des Permeabilisierungsgrades

Zur Bestimmung des Permeabilisierungsgrades von nicht behandelten oder HSI behandelten Zellkulturen wurde die frequenzabhängige Leitfähigkeit gemessen. Ein Breitband-Impedanzmessgerät von der Firma EMM aus Berlin fand ihre Anwendung. Der Anteil an aufgeschlossenen Zellen wurde nach Angersbach *et al.*, (1997) ermittelt.

## 3.10 Extraktion der Isoflavonoide und deren HPLC-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Extraktionsverfahren für die HPLC-Methodik etabliert, um zu gewährleisten, daß die Isoflavonoide bestmöglich aus den Soja-Zellkulturen chromatographisch differenziert und ihre Konzentrationen bestimmt werden. In den letzten Jahren wurde am häufigsten Genistein und Daidzein durch HPLC analysiert (Song *et al.*, 1998). Neben diesen aglykonen Isoflavonoiden interessierten in dieser Arbeit zusätzlich die  $\beta$ -glykosidische Verbindungen Genistin und Daidzin. Es sollte sowohl auf die präzise Trennung der Isoflavonoide während

der Extraktion als auch auf eine möglichst einfache und schnelle labortechnische Umsetzbarkeit der chromatographischen Methode Wert gelegt werden. Die Matrix-Wechselwirkungen zu anderen Verbindungen waren minimal zu halten.

Für die Trennung und Bestimmung der Isoflavonoide aus den Sojaprodukten mittels HPLC existieren zahlreiche Beispiele. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methodik nach Murphy *et al.*, (1997) mit Hilfe der HPLC-Technologie angewendet und in den im Kapitel 3.10.3 beschriebenen Schritten modifiziert. Das Hauptziel dieser Untersuchungen war es, die bestmögliche Extraktion in verschiedenen Verfahren zur optimalen chromatographischen Trennung der Isoflavonoide bei Soja-Zellkulturen zu ermitteln.

### **3.10.1 Die Herstellung und Haltung der Isoflavonoidstandarts**

Das Antioxidanz TBHQ und 10 mg des jeweiligen Isoflavonoid-Standards (Genistin, Genistein, Daidzin, Daidzein) wurden in 10 mL Ethanol gelöst und für 10 min in einem Ultraschallbad behandelt. Diese Lösungen wurden auf Eppendorf Hütchen verteilt und bis zu ihrer Verwendung für die nächste HPLC-Analyse bei  $-28^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.10.2 Probenvorbereitung**

Alle untersuchten Proben wurden für mindestens 1 h bei  $-28^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend 2-3 Tage gefriergetrocknet. Die Lagerung bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte unter luftdicht abgeschlossenen Bedingungen bei  $-28^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10.3 Extraktion**

Bei der Extraktion der Isoflavonoide wurden unterschiedliche Extraktionsmittel eingesetzt:

Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) + HCl

Acetonitril ( $\text{C}_2\text{NH}_3$ ) + HCl

Methanol

Acetonitril

Methanol + HCl

Methanol

Die Zellkulturen wurden entsprechend der erforderlichen Kultivierungszeit geerntet und 2-3 Tage lang gefriergetrocknet. Danach wurde 20 µL TBHQ als Antioxidant zu 0,4 g Sojazellkultur hinzugefügt. Der Homogenisator Ultra Turax (20.500 rpm) schloss bei einer Anwendung von 3 x 30 s nach Zugabe von 20 mL Acetonitril plus 2 mL 0,1 N HCl die Zellen auf. Zur Bestimmung des effektivsten Extraktionsmittels wurden die oben genannten Lösungsmittel verwendet. Danach wurden die Zellen bei Zimmertemperatur 2h lang geschüttelt (175 rpm) und anschließend bei 4000 rpm und einer 8°C Kühlung 15 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte eine Resuspendierung des Pellets mit ca 5 mL Acetonitril und eine nochmalige 15-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 8°C Kühlung.

Der Überstand, der in einen Spitzkolben überführt worden war, wurde bei 30°C am Rotationsverdämpfer eingengt und das erhaltene Sediment in 1 mL in 100 % Methanol aufgelöst. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4000 rpm und einer Kühlung bei 8°C. 1 mL des Überstands wurde in eine HPLC Flasche überführt und für die Analytik im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Für die HPLC-Analyse wurde 20 µL der erhaltenen Suspension in die RP C-18-Säule des HPLC-Gerätes injiziert.

#### **3.10.4 Wiederfindungsrate**

Zellkulturproben wurden mit den Isoflavonoidstandards (10 µL des jeweiligen Isoflavonoids) behandelt und dem beschriebenen Extraktionsverfahren unterworfen. Diese Proben und parallele Proben ohne Zusatz der Standards wurden in der HPLC untersucht und ergaben eine Wiederfindungsrate der Isoflavonoide zwischen 85 und 92 %. Die Wiederfindungsrate ergab sich aus der Differenz des Isoflavonoidgehalts der Proben ohne und mit Zusatz der Isoflavonoidstandards.

#### **3.10.5 Bestimmungsgrenze**

Die Berechnung der Bestimmungsgrenze erfolgte auf Basis des Signal/Rauschverhältnisses bei den Proben. Die Schwankungen der Bestimmungsgrenzen beruhen auf die Empfindlichkeit des massenselektiven UV-Detektors, der großen Schwankungen unterliegt (Stadler, 2003). Bei einem Injektionsvolumen von 20 µL in die HPLC entspricht dies einer Bestimmungsgrenze für Isoflavonoide:

Isoflavonoide	Bestimmungsgrenze
Genistein	100 ng/g TG
Daidzein	170 ng/g TG
Genistin	3,2 µg/g TG
Daidzin	1,1 µg/g TG

**Tab. 3:** Bestimmungsgrenzen der untersuchten Isoflavonoide

### 3.10.6 Bestimmung der Isoflavonoide

Ziel der qualitativen Analyse in der HPLC ist es, Substanzen zu identifizieren. Die Isoflavonoide wurden durch Reversed Phase HPLC mit UV-Detektion quantifiziert. Dabei wurde anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums die Metabolite qualitativ und quantitativ bestimmt.

Die Trennung der Isoflavonoide wurde mit Hilfe der Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP- HPLC) auf einer C 18 Säule (250 x 4,5 mm) mit einem Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Tabelle 4 gibt die Zusammensetzung der mobilen Phase aus Lösungsmittel A (Wasser + 1 mL Essigsäure/L) und B (Acetonitril + 1 mL Essigsäure/L) für einen Zyklus wieder. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL, die Fließgeschwindigkeit 1 mL/min. Die eluierten Isoflavonoide wurden bei 262 nm detektiert. Die Isoflavonoidkonzentrationen wurden mit Hilfe der Chromeleon Software aus der Eichkurve berechnet (Chromeleon, 2000).

Zeit (min)	Lösungsmittel (%)	
	A	B
0	83	17
7	75	25
15	75	25
20	50	50
25	10	90
30	10	90
35	83	17
45	83	17

**Tab. 4:** Listung der Gradienten zur Trennung der Isoflavonoide

### 3.10.7 Eichkurve der Isoflavonoidstandards

Die vorbereiteten Standards wurden aufgetaut und zum Entfernen von Gasblasen für 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend gewortext.

Von jedem der 4 Standards wurde die beschriebene Menge in HPLC-Fläschchen pipettiert, mit 10  $\mu\text{L}$  TBHQ versetzt und mit Methanol auf 1 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Tab. 5 gibt einen Überblick über die Isoflavonoidstandartkonzentrationen. Abb. 9 stellt die Eichkurven der Isoflavonoide dar, Abb. 10 gibt die UV-Spektren der einzelnen Isoflavonoide wieder.

Menge Isoflavonoidstandart ( $\mu\text{L}$ )	Menge TBHQ ( $\mu\text{L}$ )	Menge Methanol ( $\mu\text{L}$ )	Endkonzentration Isoflavonoidstandart ( $\mu\text{g/mL}$ )
5	10	970	5
10	10	950	10
15	10	930	15
20	10	910	20
25	10	890	25
30	10	870	30

**Tab. 5:** Konzentrationen der Isoflavonoid-Standards für die HPLC-Eichkurve.

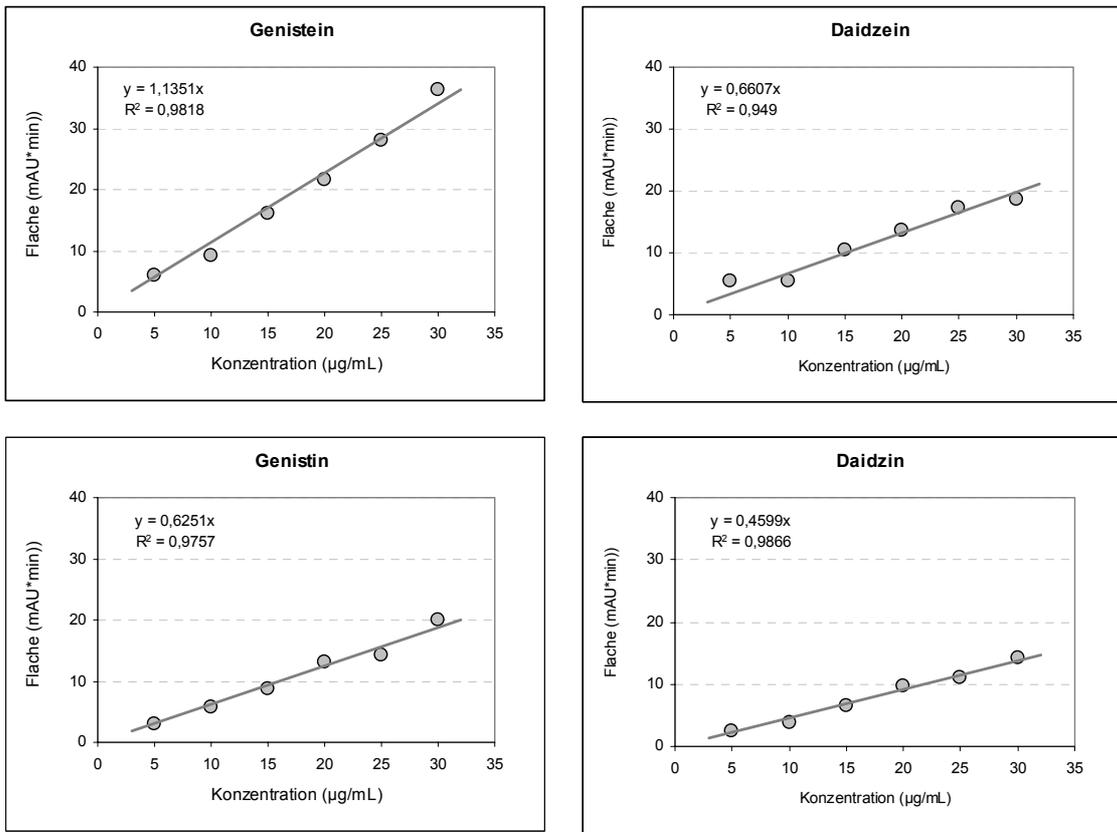
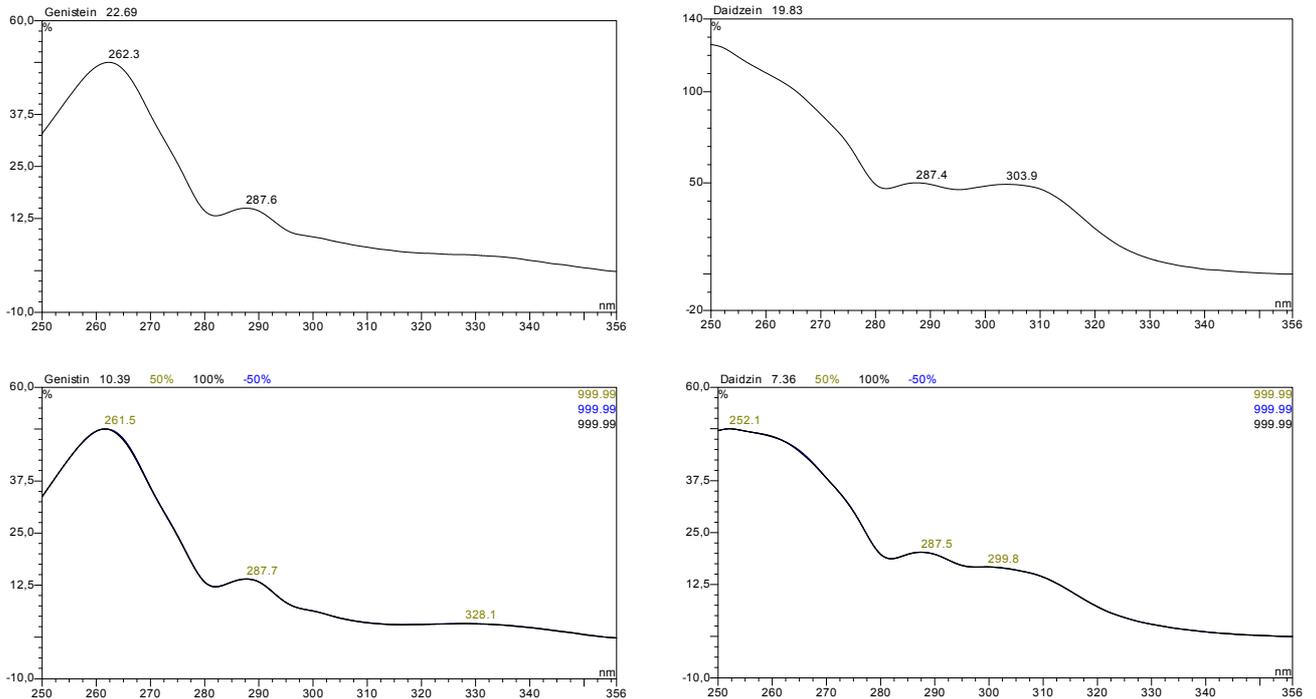


Abb. 9: Kalibrationskurven der 4 Isoflavonoide

## UV Spektren für Isoflavonoide:



**Abb. 10:** Darstellung der verschiedenen UV-Spektren der untersuchten Isoflavonoide durch den Dioden-Array-Detektor

### 3.10.8 Die quantitative Auswertung der Isoflavonoide

Die Identifizierung der Isoflavonoidpeaks erfolgte, wie bereits erwähnt, durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit den Isoflavonoid-Standards. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der Chromeleon Software aus der Eichkurve in  $\mu\text{g/g}$  TG mit folgender Formel berechnet:

$$X = (y - c) / b / \text{TG}$$

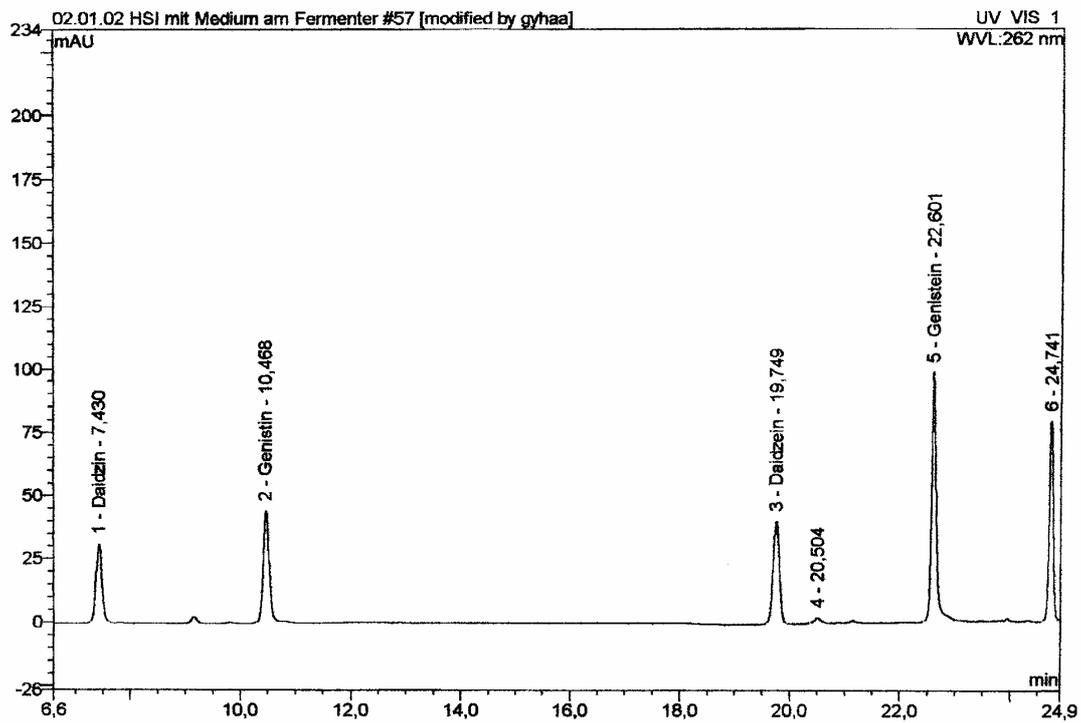
X: Konzentration in Probe ( $\mu\text{g/g}$  TG)

y: Fläche

b: Steigung

c: Abschnitt der Y-Achse= Intercept

TG: Trockengewicht



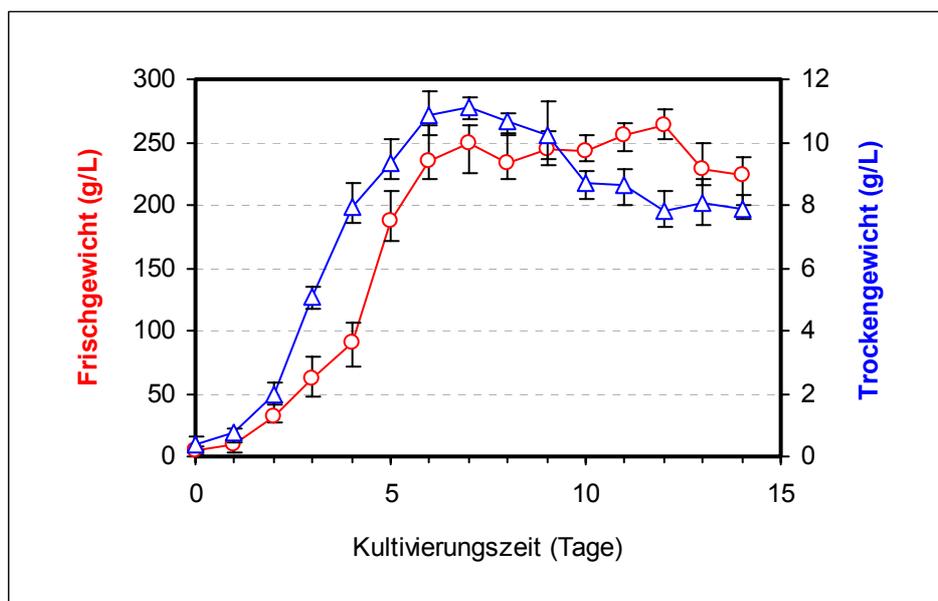
**Abb. 11:** Chromatographische Analyse der 4 untersuchten Isoflavonoide mit Hilfe der HPLC

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Wachstumscharakterisierung von *Glycine max* in Batchkulturen

#### 4.1.1 Erstellung von Wachstumskurven der Pflanzenzellkultur im Batchversuch

In diesem Kapitel der Arbeit wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem physiologischen Zustand der Zelle und ihrer Fähigkeit, Isoflavonoide zu synthetisieren, besteht. Die Effekte des physiologischen Zustands der Soja-Pflanzenzellkulturen auf die Synthese der Sekundärmetabolite wurden über die Untersuchung der Faktoren Zellmasse, pH-Wert, Leitfähigkeit, und Vitalität näher bestimmt, um somit Rückschlüsse auf eine optimale Kultivierung der Soja-Zellkulturen mit einer maximalen Isoflavonoidgewinnung im Scale-up Versuch zu ermöglichen.



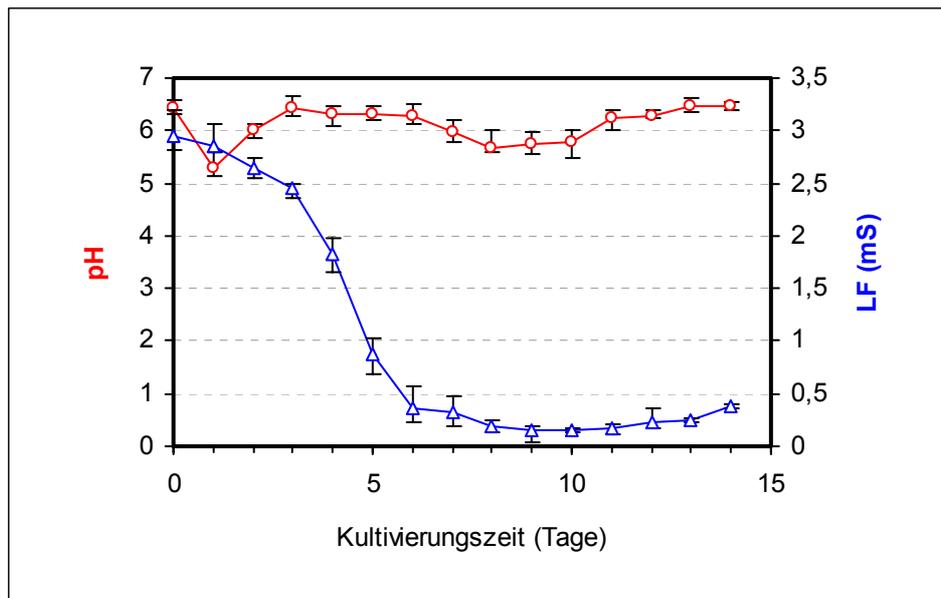
**Abb. 12:** Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkulturen im Schüttelkolben (200 mL) bei 27°C im Dunkeln und bei 109 rpm

Die Zellen gingen bereits nach 2 Tagen in die logarithmische Phase des Wachstums über. Möglicherweise war die hohe Konzentration von 20 % v/v (Volumen zu Volumen), mit der die Kulturmedien im Kolben angeimpft wurden, für das schnelle Wachstum mitverantwortlich. Eine ausgeprägte lag-Phase war somit nicht erkennbar, es kann höchstens von einer lag-Phase von 1-2 Tagen gesprochen werden.

Das höchste Wachstum in der logarithmischen Phase wurde nach 7 Tagen erreicht. Danach ging die Zellkultur in die stationäre Phase über. Die gebildete Zellmasse blieb bis zum Ende der Messung am 14. Tag relativ konstant mit 250 g/L ( $\pm 10$  g/L). Der leichte Rückgang der Zellmasse in der stationären Phase wird wahrscheinlich auf eine geringfügige Zelllyse durch Nahrungs- und O<sub>2</sub>-Mangel (niedriger O<sub>2</sub>-Partialdruck) zurückzuführen sein. Der Verlauf der Wachstumskurven, gemessen sowohl in Trockengewicht als auch in Frischgewicht der Zellkulturen, zeigte große Parallelen, wobei allerdings das Trockenzellgewicht das Maximum in der logarithmischen Phase wesentlich früher erreichte. Nach 8 Tagen überstieg das Frischgewicht relativ das Trockengewicht im Wachstumsverlauf, welches sich aufgrund eines höheren H<sub>2</sub>O-Einstroms in den Zellen durch einen gestiegenen osmotischen Druck zurückführen läßt, begründet durch die hohe Synthese von Proteinen und anderen osmotisch wirksamen Molekülen.

#### **4.1.2 Leitfähigkeitsverlauf und pH-Wert**

Die Leitfähigkeit ist eine einfache Meßgröße zur Bestimmung der Konzentration salzartiger Substrate und gibt einen Anhaltspunkt für die Leistungsfähigkeit der zellulären Ionenaufnahme. Der pH-Wert des Mediums hat einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum und im Allgemeinen auch auf die metabolische Aktivität der Zellkulturen. Um gute Kultivierungsbedingungen für das Wachstum und die Produktion zu erreichen, muß ein optimaler pH-Wert aufrechterhalten werden. Bei der Kultivierung von Pflanzenzellen liegt im Allgemeinen der pH zwischen 4 und 7,5, wobei jedoch sich der anfängliche pH-Wert für viele Zellkulturen meistens zwischen pH 5,5 - 5,9 bewegt (Ziv, 2000). Zusätzlich kann über den pH-Wert eine Aussage getroffen werden, ob die Kultur mit fremden Mikroorganismen kontaminiert ist.



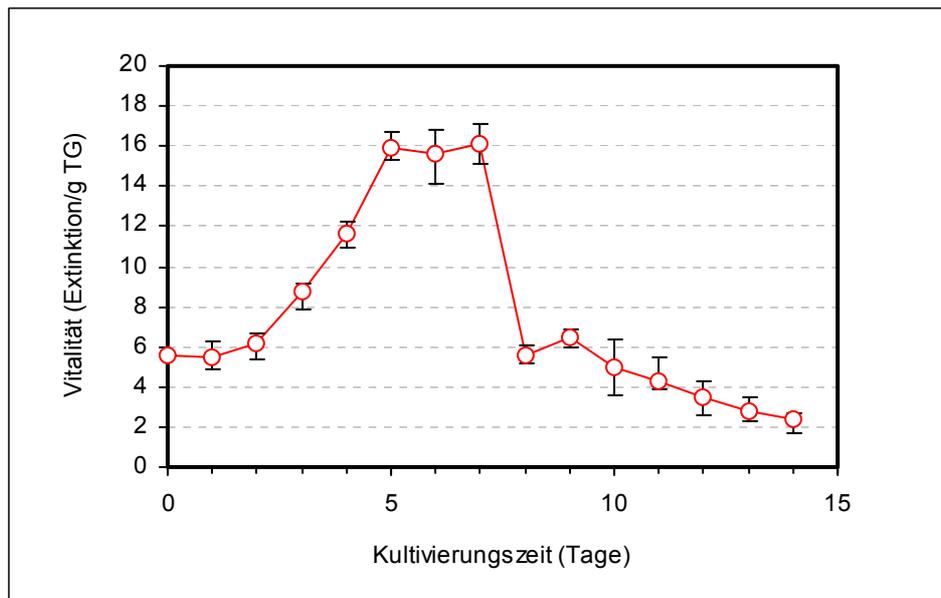
**Abb. 13:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Schüttelkolben (200 mL)

Analog zum Wachstum der Zellkultur (Abb.12) war ein starker Rückgang der Leitfähigkeit des Mediums bis zum 6.-7. Kultivierungstag von 2,95 mS auf 0,32 mS zu beobachten. Danach änderte sich die Leitfähigkeit in der stationären Phase bis zum 14. Tag nur noch geringfügig. Die Leitfähigkeit des Mediums beruht auf die Dissoziation von Salzen, hauptsächlich Natrium, Chlorid, Nitrat- und Ammoniumionen. Daher ist der Rückgang der Leitfähigkeit in der logarithmischen Wachstumsphase auf die schnelle und kontinuierliche Aufnahme der Salzionen in die Zellen zurückzuführen, während die Leitfähigkeit aufgrund einer schwächeren physiologischen Leistungsfähigkeit der Zellen und der geringeren Salzkonzentration im Medium in der stationären Phase gering blieb.

Der pH-Wert schwankte stark um den Ausgangswert von 6, der auf eine ungerichtete Aufnahme von Nitrat- und Ammoniumionen schließen lässt.

#### 4.1.3 Vitalitätstest

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des TTC-Tests bestimmt. Hierbei wurde die Reduktaseaktivität in den Mitochondrien der Zellen gemessen und gab somit einen wichtigen Hinweis zur Leistungsfähigkeit der Zelle.



**Abb. 14:** Vitalität der Soja-Zellkulturen während der Wachstumsphase im Schüttelkolben (200 mL)

Nach einer kurzen Anlaufphase im frischen Medium stieg die Vitalität der Zellkultur stark in der exponentiellen Phase an. Die Vitalität erreichte am Tag 5 ihren Höhepunkt und bildete bis zum Tag 7 ein Plateau aus. Danach ging sie um mehr als 60 % zurück. Ab dem 9. Tag verloren die Zellen langsam und kontinuierlich ihre Vitalität, welches wiederum auf den Substratmangel im Medium zurückzuführen ist.

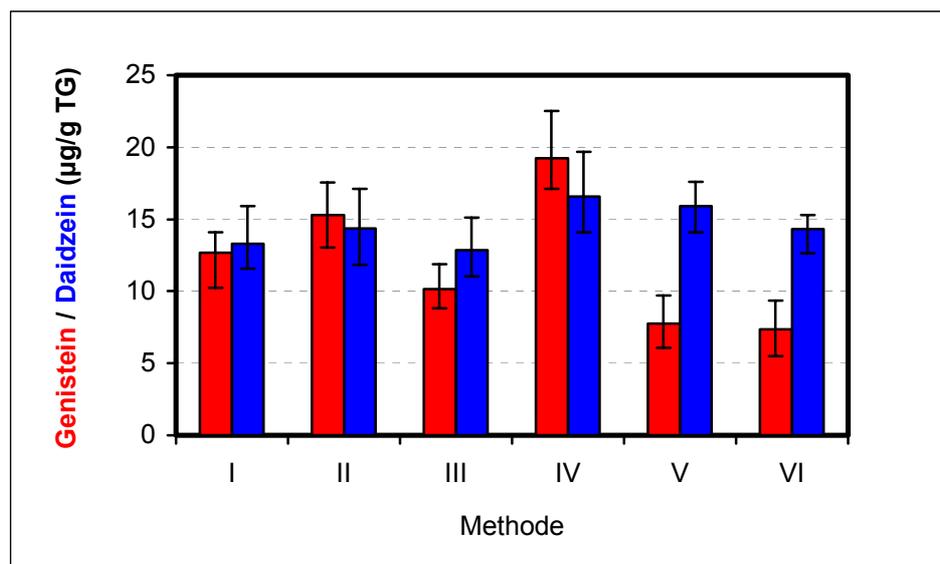
Die erzielten Ergebnisse der Wachstumscharakteristik werden mit den HPLC-Untersuchungen in Beziehung gesetzt und am Ende des folgenden Kapitels dargestellt.

## 4.2 Konzentrationsbestimmung der Isoflavonoide aus den Zellkulturen mit Hilfe der HPLC-Analytik

### 4.2.1 Modifizierung und Optimierung der Isoflavonoidextraktion mit Hilfe unterschiedlicher Lösungsmittel

#### 4.2.1.1 Extraktion von Genistein und Daidzein

Für die HPLC-Analytik müssen die Proben zuvor in einem geeigneten Lösungsmittel solubilisiert werden, um eine günstige Verdünnung für die Analyse zu erreichen (Meyer, 1999). Es wurden hierbei verschiedene Lösungsmittel zur Bestimmung des optimalen Extraktionsverfahrens von Isoflavonoiden bei Pflanzenzellkulturen verwendet. Alle HPLC-Untersuchungen der Isoflavonoide wurden an gefriergetrockneten Soja-Zellpräparaten durchgeführt.



**Abb. 15:** Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln an gefriergetrockneten Soja-Zellkulturen:

I - mit Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) + HCl

II - mit Acetonitril ( $\text{C}_2\text{NH}_3$ ) + HCl

III - mit Methanol

IV - mit Acetonitril

V - mit Methanol + HCl + kurze Trocknung im Vakuum

VI - mit Methanol + kurze Trocknung im Vakuum

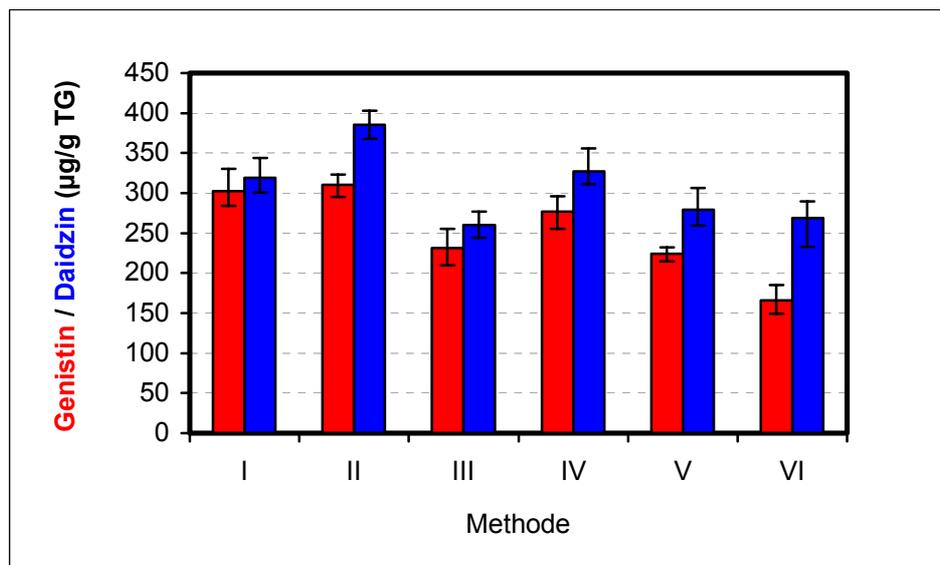
Acetonitril ohne HCl-Zusatz erzielte die höchsten Analysewerte bei der Messung von Genistein (Abb. 15). Insgesamt konnte durchschnittlich 19,75 µg Genistein/g TG Zellmasse bestimmt werden. Dieser Wert lag um bis zu 140 % über den Ergebnissen, die mit der Methode 6 (Extraktion mit Methanol+Trocknung im Vakuum) erzielt wurden. Die nächst effizientere Methode (Acetonitril+HCl) lag noch ca. 30 % unter diesen Höchstwerten.

Die Daidzein-Analysen mit den dargestellten, unterschiedlichen Methoden zeigten geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Extraktionsmitteln. Wiederum erwies sich Acetonitril ohne HCl-Zusatz als beste Extraktionsmethodik. Mit einem Mittelwert von 16,61 µg Genistein/g TG Zellmasse lag es um mehr als 15 % über der nächst besseren Extraktionsmethode (Extraktion mit Methanol und HCl), aber noch fast 40 % über den schlechtesten Werten (Extraktion mit Methanol).

Die Untersuchungen ergaben, daß die Methode IV (Extraktion mit Acetonitril) die höchste Detektion der Genistein- und Daidzeinkonzentration gewährleistete.

#### **4.2.1.2 Extraktion von Genistin und Daidzin**

Genistein und Daidzein als aglykone Form dieser Isoflavonoide konnten in der Soja-Zellkultur zufriedenstellend differenziert werden. Zusätzlich sollten die  $\beta$ -glykosidischen Verbindungen der Isoflavonoide Genistin und Daidzin, über die HPLC-Analytik aufgetrennt und bestimmt werden.



**Abb. 16:** Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln an gefriergetrockneten Soja-Zellkulturen:

I - mit Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) + HCl

II - mit Acetonitril ( $\text{C}_2\text{NH}_3$ ) + HCl

III - mit Methanol; IV - mit Acetonitril

V - mit Methanol + HCl + kurze Trocknung im Vakuum

VI - mit Methanol + kurze Trocknung im Vakuum

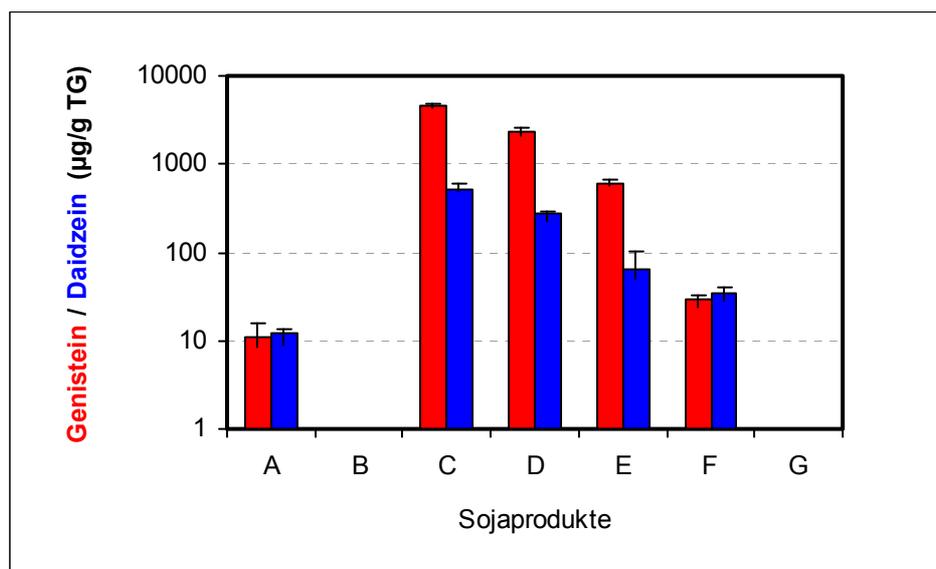
Die Extraktion mit Acetonitril plus HCl (Methode II) ergab mit  $302 \mu\text{g}$  Genistin/g TG Zellmasse die höchsten Meßwerte nach der HPLC-Analyse (Abb. 16). Bei der Konzentrationsbestimmung von Genistin konnte zwischen den Methoden I und II nur ein sehr kleiner Unterschied festgestellt werden. Genistin wird aus den Zellen mit Methanol beinahe genauso gut extrahiert wie mit Acetonitril. Eine Verwendung der Methode II erreichte eine fast 90 % höhere Genistinkonzentration als mit Methode VI erzielt wurde, die eine kurze Trocknung während der Extraktion vorsah. Auch bei der Extraktion und Analyse von Daidzin war die Extraktion mit Acetonitril plus HCl (Methode II) das eindeutig zu bevorzugende Extraktionsverfahren. Untersuchungen mit Methanol plus HCl und Methanol nach Trocknung zeigten dagegen eine bis zu 30 % geringere Fähigkeit zur Extraktionsausbeute als Methode II.

Aufgrund der Extraktions- und Analyseergebnisse, insbesondere bei den  $\beta$ -glykosidischen Formen, wird Acetonitril plus HCl als Extraktionsmittel für die folgenden HPLC-Untersuchungen verwendet.

#### 4.2.2 Nachweis von Isoflavonoiden in handelsüblichen Soja-Produkten

Die Anwendbarkeit der ausgewählten Extraktionsmittel wurde bei verschiedenen handelsüblichen Sojaprodukten zur Bestimmung des Isoflavonidgehalts mit Hilfe der HPLC-Analytik überprüft.

Die Sojaprodukte sind reich an Isoflavonoiden, die zu den sekundären Metaboliten innerhalb der Pflanzenstoffgruppe gehören und zugleich zu den Phytoöstrogenen zählen (Boland *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2002). Sie liegen oft in Glykosiden gebunden vor (Richter, 1988; Kulling und Watzl, 2003). Unbehandelte Sojabohnen und nicht fermentierte Sojanahrungsmittel beinhalten zum größten Teil Isoflavonoide in der Glykosid-Form Genistin und Daidzin (Wang und Murphy, 1994b). Dagegen enthalten fermentierte Sojaprodukte meistens die aglykone Form Genistein und Daidzein ohne glykosidische Bindung. Die handelsüblichen Sojaprodukte wurden aufbereitet und mit Acetonitril plus HCl extrahiert und zur HPLC-Analyse herangezogen.

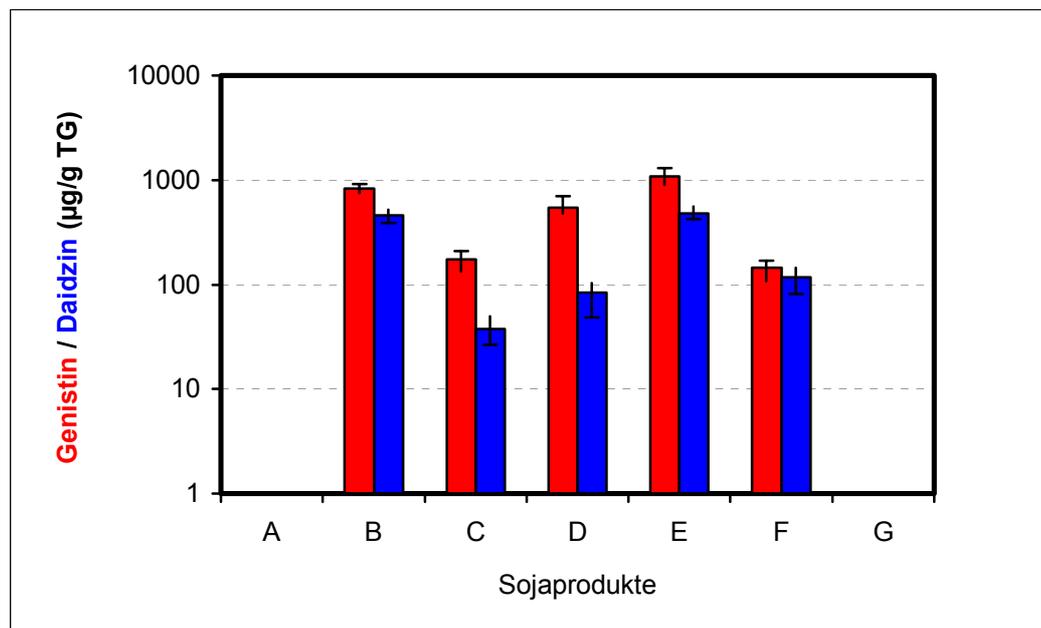


**Abb. 17a:** Nachweis der Genistein- und Daidzeinkonzentrationen bei unterschiedlichen Sojaprodukten durch HPLC-Analyse:

- A - Soja-Keimling
- B - Soja-Mehl
- C - gesalzene Sojapaste
- D - gelbe Sojapaste
- E - Tofu
- F - Soja-Trunk
- G - Soja-Sauce

Zur Spezifizierung der Sojaprodukte siehe Material und Methoden Kapitel 3.2. Die Werte, die in der Graphik nicht dargestellt wurden, konnten nicht quantifiziert werden.

Die höchste Konzentration an Genistein (4505  $\mu\text{g/g TG}$ ) und Daidzein (524  $\mu\text{g/g TG}$ ) wurde in der gesalzenen und fermentierten Sojabohnenpaste nachgewiesen. Gelbe fermentierte Sojabohnenpaste enthielt ca. 50 % weniger Genistein und Daidzein. Diese hohen Konzentrationen bei den untersuchten Sojaprodukten C und D sind auf die Fermentation durch die Abspaltung des Zuckermoleküls mit Hilfe von fungalen-enzymatischen Mikroorganismen zurückzuführen (Wang und Murphy, 1996; Choi *et al.*, 2000). Bei Soja-Mehl und Soja-Sauce konnte kein Genistein und Daidzein gemessen werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte beim Soja-Mehl der hohe Ausmahlungsgrad des Mehls sein, da diese beiden Isoflavonoide fast ausschließlich in den äußeren Hüllen der Sojabohnen enthalten sind. Die Genistein- und Daidzeinkonzentration war im Soja-Keimling sehr gering (11 bzw. 12  $\mu\text{g/g TG}$ ). In der Natur vorkommende Sojabohnen enthalten sehr geringe Konzentrationen an Genistein und Daidzein (Wang und Murphy 1994a). Dies könnte für die niedrigen Konzentrationen der aglykonen Isoflavonoiden in den nichtfermentierten Produkten Soja-Keimling, Soja-Mehl und Soja-Sauce verantwortlich sein (Messina, 1999).



**Abb. 17b:** Nachweis der Genistin- und Daidzinkonzentrationen bei unterschiedlichen Sojaprodukten durch HPLC-Analyse:

- A - Soja-Keimling
- B - Soja-Mehl
- C - gesalzene Sojapaste
- D - gelbe Sojapaste
- E - Tofu
- F - Soja-Trunk
- G - Soja-Sauce

Die höchste Konzentration von Genistin (1083 µg/g TG) und Daidzin (478 µg/g TG) wurde bei dem Sojaprodukt Tofu gemessen (Abb. 17b). Die Produkte Soja-Mehl, gesalzene Sojapaste, gelbe Sojapaste und Soja-Trunk zeigten ähnliche Genistin- und Daidzinwerte wie sie aus der Literatur bekannt sind (Elridge, 1982; Fukutake *et al.*, 1996; Franke *et al.*, 1994; Franke *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 2000). Bei den Produkten Soja-Keimling und Soja-Sauce wurden kein Genistin und Daidzin nachgewiesen. Möglicherweise wurden die  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide, die normalerweise in den Bohnen vorhanden sind, bei den Soja-Keimlingen während der Keimung abgespalten oder umgewandelt. Zur Gewinnung der Soja-Sauce werden verschiedene Verarbeitungsverfahren angewendet. Aufgrund der durchgeführten Dampf- und Röstverarbeitung kann es zu einem Abbau von hochmolekularen Proteinen und Stärke kommen (Kinoshita *et al.*, 1997). Dies könnte auch für den Abbau der Isoflavonoide

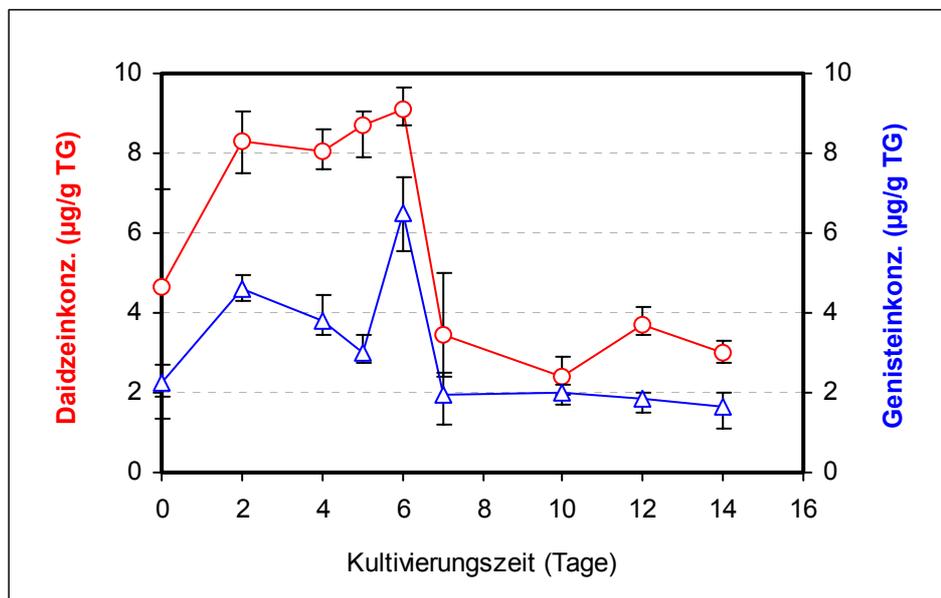
ursächlich sein, da sie nicht mehr in den untersuchten Proben der Soja-Sauce bestimmt werden konnten.

#### 4.2.3 Isoflavonoidproduktion der Zellkulturen während der Wachstumsphase im Batchverfahren

Die Produktion der Sekundärmetabolite ist vom Wachstum der Pflanze nicht unabhängig, da sie aus den Primärmetaboliten synthetisiert werden (Hegglin *et al.*, 1990). Diese Darstellung sollte im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen überprüft werden. Das Vorkommen der Isoflavonoide wurde während der einzelnen Phasen des Wachstums der Zellkulturen im 200 mL Schüttelkolben verfolgt. Hierbei wurde 60 mL Wachstumsmedium in der Batchkultur mit 10 mL 7 Tage kultivierter Sojazellsuspension angeimpft.

##### 4.2.3.1 Genistein- und Daidzeinkonzentration

In Abb. 18 wird die Synthese der aglykonen Isoflavonoide in den Soja-Zellkulturen während der zweiwöchigen Wachstumsphase dargestellt.



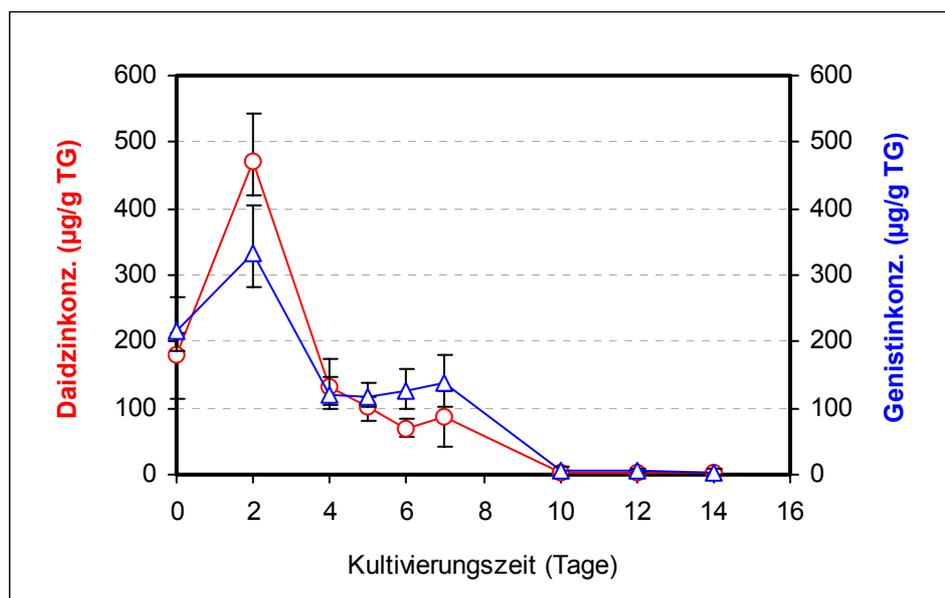
**Abb. 18:** Daidzein- und Genisteinkonzentration im Schüttelkolben (200 mL) während der Wachstumsphase der Pflanzenzellkultur

Der Genisteingehalt in den Zellen stieg in den ersten beiden Tagen während der lag-Phase auf 4,61  $\mu\text{g/g}$  TG deutlich an, nahm allerdings danach bis zum 5. Tag um ca. 50 % ab. Der 6. Tag des Wachstums brachte einen deutlichen Genisteinpeak, der aber nur ein Einzelereignis darstellte. Nach dem 7. Tag blieben die Isoflavonoide unter der Konzentration der logarithmischen Phase und behielten diese Konzentration mit geringfügigen Schwankungen bis zum 14. Tag hindurch bei.

Im Vergleich zum Ausgangswert verdoppelte sich der Gehalt an Daidzein nach 2 Tagen annähernd auf 8,3  $\mu\text{g/g}$  TG und bildete bei dieser Konzentration ein Plateau, das bis zum 6. Tag zu beobachten war. Danach sank die Konzentration an Daidzein um mehr als 55 % und schwankte bis zum 14. Tag um diesen Wert.

#### 4.2.3.2 Genistin- und Daidzinkonzentration

Die Biosynthese von Genistin und Daidzin wurde in den Experimenten in der Wachstumsphase über 14 Tage verfolgt.



**Abb. 19:** Daidzin- und Genistinkonzentration im Schüttelkolben (200 mL) während der Wachstumsphase der Pflanzenzellkultur

Die Daidzinwerte zeigten die höchsten Konzentrationen, die in dieser Versuchsreihe gemessen wurden. Die Daidzinkonzentration stieg nach 2 Tagen auf 470  $\mu\text{g/g}$  TG an. Ab dem 2. Fermentationstag sank der Gehalt an Daidzin sehr stark um über 70 % auf 125  $\mu\text{g/g}$  TG. Nach einem weiteren, allerdings geringfügigeren Rückgang, der bis zum

7. Tag anhielt, stieg die Daidzinkonzentration wieder leicht an und sank anschließend ab dem 10. Tag auf unter 20 µg/g TG ab. Die Konzentration von Genistin stieg um über 56 % innerhalb der ersten beiden Tage auf 333,1 µg/g TG. Nach einem raschen Rückgang des Genistingehalts auf 120,1 µg/g TG konnte ab dem 10. Tag sowohl Genistin als auch Daidzin praktisch nicht mehr nachgewiesen werden. Es finden sich im Allgemeinen höhere Konzentrationen an β-glykosidischen Isoflavonoiden als ihre aglykonen Formen in den Sojaprodukten (Fukutake *et al.*, 1996). Diese Verteilung der verschiedenen Isoflavonoidformen konnte auch für die *Glycine max* Zellkulturen festgestellt werden.

Die dargestellten Daidzein- und Genisteinkonzentrationen wiesen auf eine diffuse Relation zum Wachstumsverlauf der Zellkulturen hin. Die Biosynthese der Isoflavonoide war nicht eindeutig den einzelnen Wachstumsphasen der Zellen zuzuordnen. Yeoman *et al.*, 1982, verneinte in seinen Untersuchungen eine physiologische Kompatibilität zwischen Wachstumsverhalten der Pflanzenzellkulturen und der Produktion von Sekundärmetaboliten. Dies könnte mit dem Wachstumshormon zusammenhängen, das die Produktion der Isoflavonoide unterdrückt. Ein stagnierendes Wachstum der Zelle in der stationären Phase war assoziiert mit einer nur geringfügigen Konzentration von Daidzin. Dies ist möglicherweise auch auf die Synthese von Sekundärmetaboliten zurückzuführen, da diese, produziert durch die Pflanzenzellkulturen, hydrophobisch und toxisch auf das Zellwachstum wirken (Choi *et al.*, 2001).

Allerdings legten verschiedene Untersuchungen dar, daß die Biosynthese von Sekundärmetaboliten in Zellen, Phasen langsamen Wachstums erfordert. Viele Faktoren, die das Zellwachstum verlangsamen, fördern die Produktion von Sekundärmetaboliten (Mantell und Smith, 1983; Guardiola *et al.*, 1994). Die Untersuchungen an den aglykonen- und insbesondere an den β-glykosidischen Isoflavonoiden konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Vielmehr nahmen die genannten Isoflavonoide am Ende der logarithmischen Phase/Anfang der stationären Phase um über 60 % im Vergleich zur Mitte der log-Phase ab. Es scheint daher, daß bei den hier durchgeführten Untersuchungen bei *Glycine max* zwischen Phasen langsamen Wachstums und gleichzeitig erhöhter Isoflavonoidbiosynthese kein direkter Zusammenhang besteht. Interessanterweise konnte ein starker Anstieg der β-glykosidischen Isoflavonoidkonzentration am mutmaßlichen Übergang zwischen lag- und log-Phase des Wachstumsverlauf gemessen werden. Diese Beobachtung entzieht

sich allerdings einer möglichen eindeutigen Interpretation, da die interessierenden metabolischen Vorgänge, die während der lag-Phase/Anfang der log-Phase auftreten, nicht gut genug erklärbar sind, um einen Zusammenhang zwischen dem gemessenen starken Anstieg der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide und dem Wachstumsverhalten der Zellkultur herzustellen (Payne *et al.*, 1991).

Im Kapitel 4.9 werden zusammenfassend weitere Erklärungen zu möglichen Ursachen des Isoflavonoidkonzentrationsrückgangs diskutiert.

### 4.3 Einflußfaktoren auf die Isoflavonoidbiosynthese

Ein wichtiger Ansatz zu Erhöhung oder Induktion von Enzymaktivitäten in Pflanzen oder Pflanzenzellkulturen ist die Verwendung von Elicitoren und Precursoren. In Zellkulturen werden sie gezielt eingesetzt, um die Bildung von Sekundärmetaboliten zu induzieren bzw. zu verstärken und somit das Potential zur Verbesserung der Produktion vieler wirtschaftlich wichtiger Pflanzenmetabolite zu erschliessen (Walker *et al.*, 2003; Dixon und Bolwell, 1986; Ruiz *et al.*, 1998).

Schwerpunkt der Untersuchungen im 200 mL Schüttelkolben war die Applikation verschiedener chemischer Elicitoren in das Wachstumsmedium. Die Pflanzenzellkulturen wurden nach Animpfung 7 Tage lang bei 27°C, 109 rpm, kultiviert, anschliessend geerntet, gefriergetrocknet und nach Extraktion der Isoflavonoide in der HPLC analysiert.

Es wurden folgende Elicitoren eingesetzt:

Chitin

PAL (Phenyl Alanin Ammonium Lyase)

Naringenin

Methyljasmonat

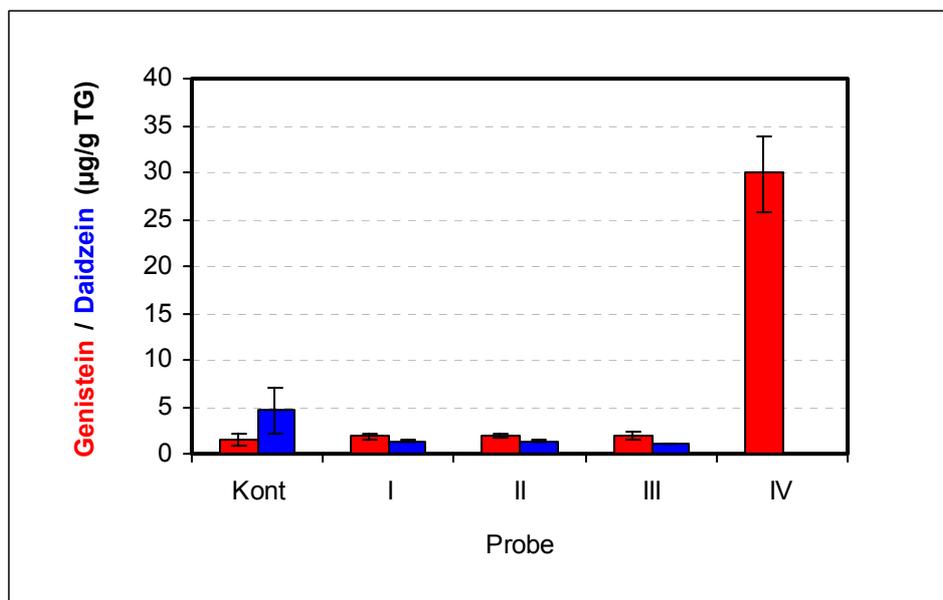
Salicylsäure

In den Batchversuchen wurde der effektivste Elicitor zur Gewinnung der Isoflavonoide in der Pflanzenzellkultur *Glycine max* bestimmt und fand anschließend in den Scale-up Versuchen im Airlift-Bioreaktor Verwendung.

Die hier eingesetzten Elicitorkonzentrationen wurden in verschiedenen Dosen appliziert, um einen möglichst signifikanten Einfluß auf die Isoflavonoidbiosynthese darstellen zu können. Ein weitere Differenzierung der Elicitorkonzentration zur Eingrenzung der Elicitorwirkung und zur Bestimmung der in Kapitel 4.3.1 erwähnten Grenzkonzentration wäre in weiterführenden Arbeiten sinnvoll.

#### 4.3.1 Chitin, PAL und Naringenin

Die Applikation von Chitin, PAL und Naringenin wurde in einem 200 mL Schüttelkolben vorgenommen und zusammen mit dem Animpfvolumen von *Glycine max* 7 Tage kultiviert.



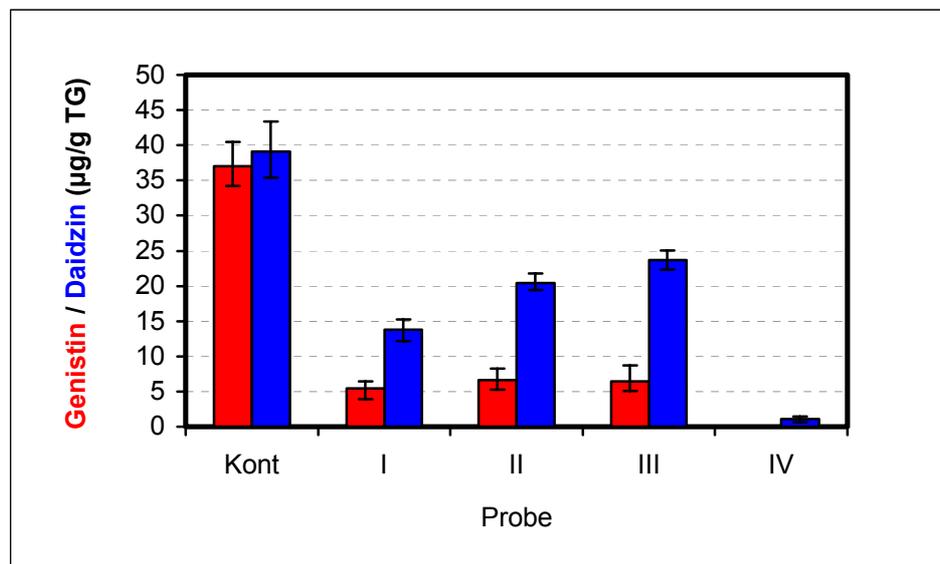
**Abb. 20:** Genistein- und Daidzeinkonzentrationen nach Applikation folgender Elicitoren:

- I - Chitin (50 mg/L)
- II - Chitin (100 mg/L)
- III - PAL (200 mg/L)
- IV - Naringenin (200 mg/L)

Die Messung mit Naringenin ergab für Genistein eine sehr starke Steigerung um beinahe das 10-fache dieses Isoflavonoids gegenüber der Kontrolle. Die Elicitoren Chitin, PAL, bewirkten dagegen nur eine geringfügige Änderung des Isoflavonoidgehaltes im Vergleich zur Kontrolle. Naringenin ist ein Isoflavon und

Isomer von Genistein und gilt als dessen Vorläuferverbindung im Isoflavonoid-Biosyntheseweg. Es wird durch das Enzym Isoflavonsynthase in Genistein umgewandelt (Parr *et al.*, 2000). Anscheinend wurde Naringenin von der Zelle extrem gut aufgenommen und in die Genisteinsynthese eingeschleust. Eine positive Wirkung von Naringenin auf Daidzein erfolgte nicht, da Naringenin keine direkte Bedeutung für dessen Biosynthese besitzt.

Die Wirkung der Elicitoren auf die Daidzeinbildung war insgesamt negativ. Die Applikation der Elicitoren ließ die Daidzeinkonzentrationen in den Zellen um bis zu 80 % sinken bzw. nach Naringeninapplikation konnte überhaupt kein Daidzein mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 21:** Genistin- und Daidzinkonzentrationen nach Applikation folgender Elicitoren:

- I - Chitin (50 mg/L)
- II - Chitin (100 mg/L)
- III - PAL (200 mg/L)
- IV - Naringenin (200 mg/L)

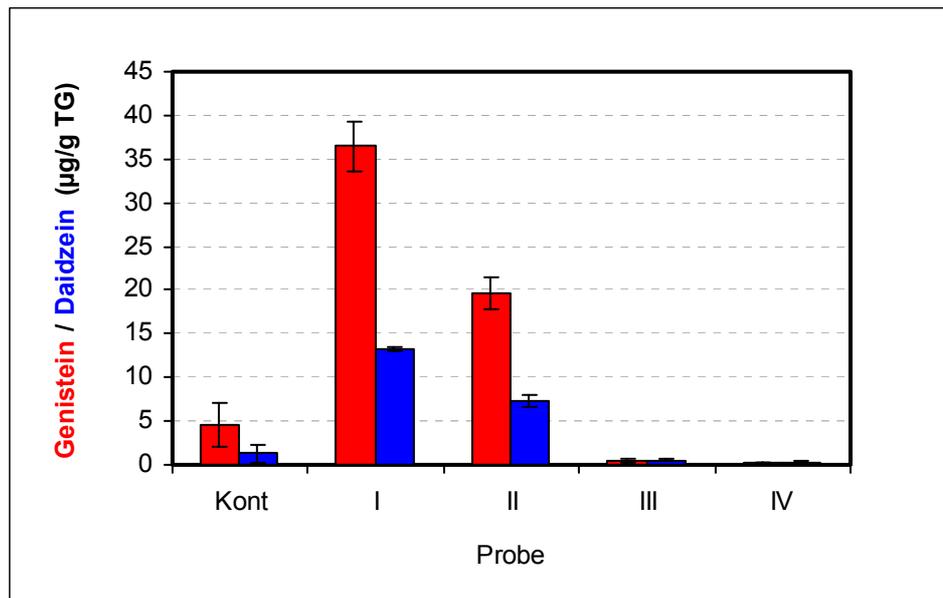
Die Applikation der eingesetzten Elicitoren wirkte auf die Synthese der glykosidisch gebundenen Isoflavonoide Daidzin und Genistin stark hemmend. Beim Einsatz von Naringenin blieb die Synthese von Genistin und Daidzin vollkommen aus. Die relativ schwache Hemmung der Genistinsynthese durch PAL betrug ca. 40 %.

Untersuchungen an Chitin als elicitierende Substanz zeigten dessen deutlich positive Wirkung auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Dörnenburg und Knorr, 1994). Chitin ist bekannt für seine Fähigkeiten aufgrund reaktiver funktioneller Gruppen, Bindungen mit vielen anderen Molekülen einzugehen. Beispielsweise kann es kovalent an Proteine gebunden werden (Tharanathan und Kittur, 2003). Synowiecki und Al-Khateeb, 2003, beschrieben die bakteriostatische und fungistatische Wirkung von Chitin. Die molekularen und physiologischen Eigenschaften scheinen die elicitierende Wirkung von Chitin zu begründen. Die Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten allerdings eine Elicitorwirkung von Chitin nicht bestätigen. Beaumont *et al.*, 1989, beschrieben, daß oberhalb einer Elicitorgrenzkonzentration neben Sekundärmetaboliten auch lebenswichtige Proteine der Zelle freigesetzt würden und dies somit zu einem gesamten Vitalitätsverlust der Zelle führen konnte. Anscheinend wurde die Grenzkonzentration auch bei den Versuchen mit *Glycine max* überschritten und führte somit zu einer stark rückläufigen Biosynthese der Isoflavonoide.

Phenylalaninlyase (PAL) ist ein Schlüsselenzym des Phenylpropanoidsyntheseweges und katalysiert 3 wichtige initiale Schritte zur Bildung von Sekundärmetaboliten (Chaman *et al.*, 2003; Bate *et al.*, 1994; Glassgen *et al.*, 1998). PAL scheint im Cytoplasma der Zelle frei vorhanden zu sein, obwohl einige Studien darauf hinweisen, daß es lose mit Membranen assoziiert sein könnte (Dixon *et al.*, 1995). Appliziertes PAL bewirkte in den durchgeführten Untersuchungen keinen Anstieg der Isoflavonoidbildung. Eventuell wird PAL während eines möglichen Aufnahmeprozesses in die Zelle durch Peroxidasen abgebaut oder chemisch verändert und steht somit der Biosynthese der Isoflavonoide nicht mehr zu Verfügung. Fraglich ist allerdings auch, ob appliziertes PAL aufgrund seiner tetrameren Struktur und Masse (Molekulargewicht zwischen 240.000 und 330.000 Dalton (Min-Soo *et al.*, 1998)) überhaupt von der Zelle aufgenommen wird.

#### **4.3.2 Methyljasmonat und Salicylsäure**

Methyljasmonat und Salicylsäure, als mögliche Elicitoren, wurden in verschiedenen Konzentrationen dem Medium der Pflanzenzellkultur hinzugesetzt.

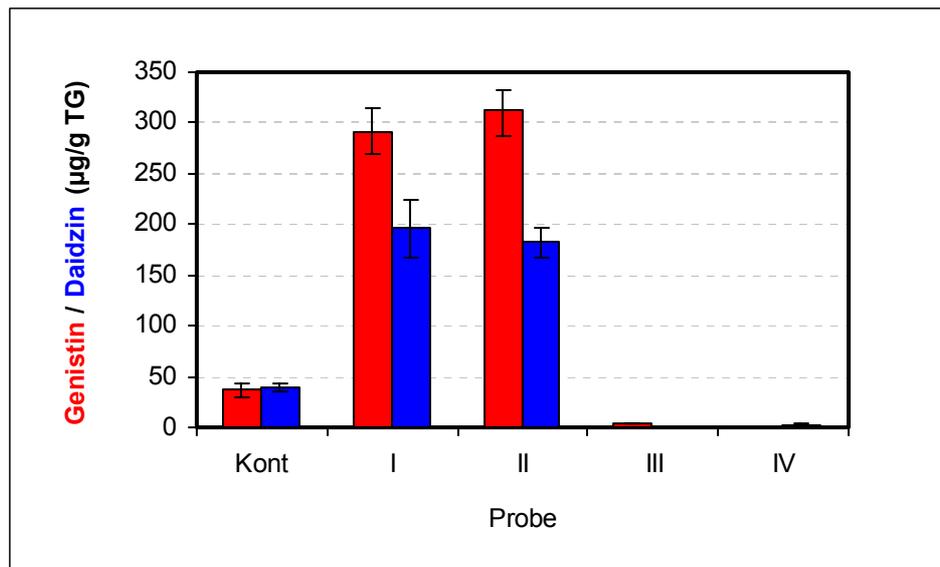


**Abb. 22:** Genistein- und Daidzeinbiosynthese bei Applikation folgender Elicitoren:

- I - Methyljasmonat (100 mg/L)
- II - Methyljasmonat (200 mg/L)
- III - Salicylsäure (50 mg/L)
- IV - Salicylsäure (100 mg/L)

Der Einsatz von Methyljasmonat führte zu einem deutlichen Anstieg der Biosynthese von Genistein. Als besonders effektiv erwies sich die Methyljasmonatkonzentration von 100 mg/L, die einen Anstieg von Genistein um über das 5-fache bewirkte. Eine Erhöhung der Methyljasmonatkonzentration auf 200 mg/L zeigte jedoch keinen zusätzlichen positiven Effekt auf die Genesteinsynthese. Anscheinend wurde es bei 100 mg/L in einer optimalen Dosis appliziert. Die Daidzeinkonzentration erhöhte sich nach 100 mg/L Methyljasmonatzugabe um mehr als das 7-fache. Dagegen bewirkte der Einsatz der doppelten Methyljasmonatkonzentration (200 mg/L) nur eine ca. 4-fache Erhöhung der Daidzeinkonzentration.

Salicylsäure zeigte keine induzierende, vielmehr eine eindeutig hemmende Wirkung auf die Biosynthese von Genistein und Daidzein. Beispielsweise hemmte Salicylsäure in einer Konzentration von 50 mg/L die Synthese von Genistein um mehr als 70 % gegenüber der Kontrolle.



**Abb. 23:** Wirkung der ausgewählten Elicitoren auf die Biosynthese von Genistin und Daidzin:

- I - Methyljasmonat (100 mg/L)
- II - Methyljasmonat (200 mg/L)
- III - Salicylsäure (50 mg/L)
- IV - Salicylsäure (100 mg/L)

Die Salicylsäureanwendung hatte keinerlei positiven Effekt auf die Synthese von Genistin und Daidzin. Die Bildung dieser Sekundärmetaboliten in der Zellkultur wurde völlig gehemmt. Die Salicylsäure ist ein wichtiger Teil des pflanzlichen Immunsystems, das bei Verletzungen der Pflanze ausgeschüttet wird und die Produktion von Schutzmechanismen der Pflanzenzelle wie beispielsweise die Bildung von Sekundärmetaboliten auslöst (Fletcher, 2000). Zudem wird vermutet, daß Salicylsäure an der Akkumulierung von  $H_2O_2$  beteiligt ist, in dem es die Katalaseaktivität inhibiert und einzelne Gene, die dem Schutz der Pflanzenzelle dienen, induziert oder aktiviert (Shirasu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Gaffney *et al.*, 1993). Verschiedene Untersuchungen an Pflanzenzellen wie z. B. über die Wurzelzellen von *Lupinus luteus* zeigten eine starke Steigerung der Isoflavonidsynthese durch Salicylsäure (Kneer *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse konnten bei den Untersuchungen an *Glycine max* nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich war die applizierte Salicylsäurekonzentration nicht adäquat, um eine Steigerung der Isoflavonidsynthese zu bewirken.

Die Genistinkonzentration wurde durch die Zugabe von Methyljasmonat (100 mg/L) um das ca. 6-7 fache erhöht. Eine Verdopplung der Konzentration von Methyljasmonat

zeigte nicht den erwarteten Effekt einer zusätzlichen Steigerung der Genistinsynthese. Vielmehr stieg die Genistinsynthese nur geringfügig gegenüber einer Methyljasmonatapplikation von 100 mg/L an. Die Untersuchungen mit Methyljasmonat (200 mg/L) zeigten eine sehr starke Steigerung der Daidzinkonzentration um das fast 5-fache gegenüber der Kontrolle. Eine um die Hälfte reduzierte Methyljasmonatapplikation blieb mit einer 4-5-fachen Erhöhung der Daidzinkonzentration nur geringfügig hinter der erreichten Steigerung bei einer 200 mg/L Applikation zurück.

Methyljasmonat hat sich in verschiedenen Untersuchungen als effektiver Elicitor der Biosynthese von Sekundärmetaboliten bei Pflanzenzellkulturen erwiesen (Fang *et al.*, 1999; Curtin *et al.*, 2003). Dabei kann es sowohl als einzelner Elicitor positiv auf die Synthese wirken als auch synergetisch mit anderen Elicitoren (Zhang *et al.*, 2002). Zudem ist Methyljasmonat bekannt als wichtiger Regulator der pflanzlichen Verteidigungsmechanismen (Gundlach *et al.*, 1992) und spielt eine Schlüsselrolle in der Signalübertragungskaskade des Elicitierungsprozesses (Kneer *et al.*, 1999). In den Versuchen zeigte eine Methyljasmonatkonzentration vom 100 mg/L insgesamt die beste elicitierende Wirkung auf die Bildung der Isoflavonoide, während eine Verdopplung der Konzentration eher negativ wirkte. Untersuchungen von Creelmann und Mullet, (1995) stellten dar, daß geringe Konzentrationen von Methyljasmonat, das auf die Genexpression der Zellen auf verschiedenen Ebenen eingreift (Schneid, 2002), kaum oder nur geringfügig auf Pflanzenzellen wirkten; erst ab einem bestimmten Level trat eine Streßantwort ein. Zu hohe Konzentrationen induzierten hypersensitive Reaktionen, die zum Zelltod führen können. Anscheinend war die Konzentration von 200 mg/L in den durchgeführten Experimenten geringfügig zu hoch dosiert. Die Dosis eingesetzter Elicitoren ist somit ein wichtiger Parameter, mit dem die Bildung von Sekundärmetaboliten korreliert (Rijhwani und Shanks, 1998).

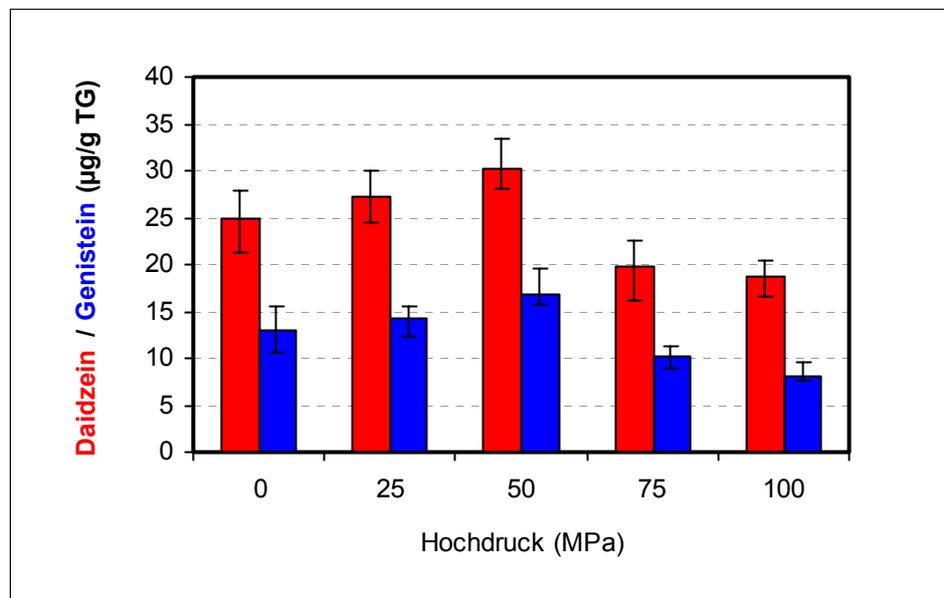
Aufgrund der sehr positiven Auswirkungen von Methyljasmonat (100 mg/L) auf die Biosynthese der Isoflavonoide und der in der Literatur bekannten synergetischen Wirkung von Methyljasmonat mit anderen Elicitoren (Zhang *et al.*, 2002) wurde es für weitere Untersuchungen zur Steigerung der Metabolitsynthese im Airlift-Bioreaktor herangezogen. Die übrigen untersuchten Elicitoren sind nicht in der Lage, eine geeignete Streßantwort der *Glycine max* Zellkultur zu bewirken. Somit wurden sie nicht in den Scale-up Versuchen berücksichtigt. Naringenin zeigte eine ungerichtete, nicht eindeutig interpretierbare Wirkung auf die Zellkulturen und wurde daher ebenfalls von den Bioreaktorversuchen ausgeschlossen.

#### 4.4 Beeinflussung der Isoflavonoidbiosynthese durch Hochdruck, Kälteschock und Hochspannung

Die Anwendung einer Hochdruck- oder Hochspannungsbehandlung, die zur Induktion einer Streßreaktion führt, ist ein interessanter Ansatzpunkt zur Beeinflussung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten und soll hier näher untersucht werden.

##### 4.4.1 Hydrostatische Hochdruckbehandlung

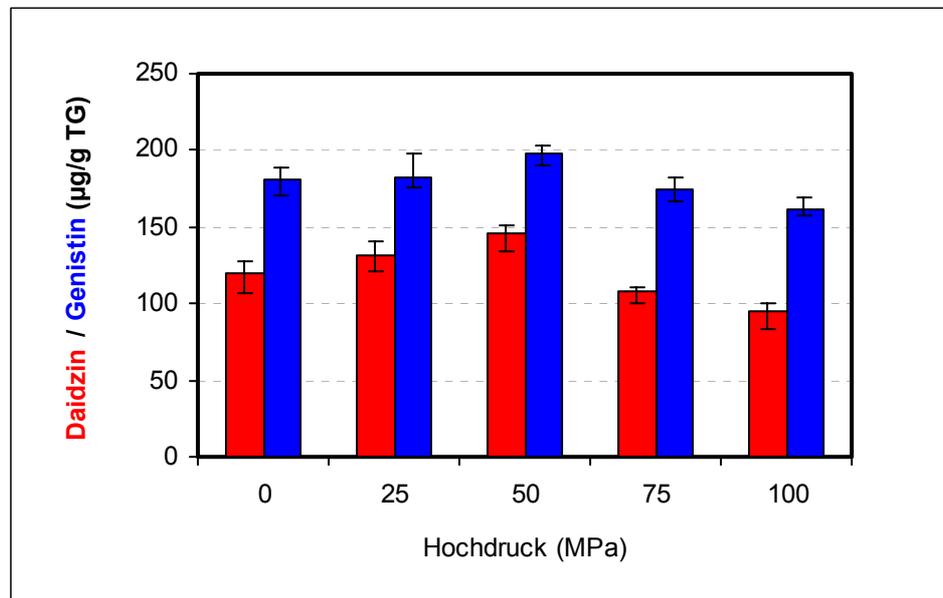
Während der 7-tägigen Inkubation im 200 mL Schüttelkolben wurden die Zellkulturen von *Glycine max* 4 unterschiedlichen Hochdruckbereichen ausgesetzt.



**Abb. 24:** Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Daidzein- und Genisteinkonzentration in den Zellkulturen

Ein Hochdruck von 50 MPa zeigte einen positiven Einfluß auf die Biosynthese von Genistein. Es war ein Anstieg der Genisteinsynthese um ca. 30 % zu beobachten. Eine weitere Erhöhung des Druckbereiches auf 75 MPa und anschließend auf 100 MPa bewirkte allerdings einen Rückgang der Genisteinkonzentration um ca. 25-40 %. Die Daidzeinkonzentration erhöhte sich nach einer Hochdruckbehandlung von 50 MPa um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Der geringere Druckbereich von 25 MPa zeigte ebenfalls einen positiven Einfluß, der aber nicht so ausgeprägt war wie bei 50 MPa. Eine Erhöhung des Hochdruckbereiches auf 75 MPa und 100 MPa hemmte die

Daidzeinbildung in der Pflanzenzellkultur zunehmend. So konnte bei 100 MPa ein ca. 20 %-iger Verlust an Daidzein gegenüber der Kontrollkonzentration beobachtet werden.



**Abb. 25:** Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Daidzin- und Genistinkonzentration in den Zellkulturen

Die Genistinkonzentration wurde im Vergleich zur Kontrolle durch die Hochdruckbehandlung bei 50 MPa um ca. 10 % erhöht. Ein Hochdruck von 25 MPa zeigte nur eine geringe, wenn auch positive Wirkung auf die Genistinbiosynthese. Eine weitere Erhöhung des Druckbereiches auf 75 MPa und 100 MPa bewirkte einen Rückgang der Genistinkonzentration. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Hochdruckbehandlung auch bei der Daidzinsynthese. Die Anwendung der Hochdruckbereiche 75 MPa und 100 MPa hatten einen negativen Einfluß auf die Daidzinsynthese. Es wurde hierbei ein fast 20 %-iger Konzentrationsverlust an Daidzein gemessen. Eine Hochdruckbehandlung von 75 MPa und 100 MPa zeigte daher sowohl auf die Genistin- als auch auf die Daidzinsynthese einen hemmenden Einfluß, während 50 MPa die Sekundärmetabolitbiosynthese positiv beeinflusste.

Hochdruck greift auf vielfältige Weise in die Physiologie der Zelle ein. Er kann auf die Stabilität von Nukleinsäuren wirken und somit Einfluß auf die Unterdrückung der Expression verschiedener Gene nehmen (Wilson *et al.*, 2001). Enzyme können je nach Druckbereich aktiviert oder inaktiviert werden, im Extremfall ist es möglich, daß

eine Denaturierung des Enzyms stattfindet. Die Stabilität von Proteinen wird bestimmt durch die Bildung ihrer dreidimensionalen Struktur, die durch verschiedene elektrostatische Wechselwirkungen und kovalente Bindungen geprägt wird. Hochdruck ist in der Lage, diese räumliche Struktur zu beeinflussen, indem es auf die elektrostatischen Wechselwirkungen wirkt, aber die kovalenten Bindungen unberührt läßt (Knorr, 1996). So ist z. B. eine Veränderung der Tertiärstruktur von Proteinen durch Denaturierung oberhalb von 200 MPa denkbar (Cheftel, 1992). Als mögliche Folge kann die Enzymaktivität verstärkt werden, die Substratspezifität kann sich ändern und schließlich könnte auch das Enzym inaktiviert werden (Seyderhelm *et al.*, 1996). Verbindungen mit geringem Molekulargewicht wie z. B. Vitamine, Pigmente und deren Vorläufern bleiben allerdings vom Hochdruckeinfluß unberührt (Stute *et al.*, 1996). Die Ergebnisse zeigten, daß 50 MPa die Isoflavonidsynthese positiv beeinflussten, was auf eine Aktivierung der entscheidenden Enzyme des Phenylpropanoidweges wie z. B. PAL zurückzuführen sein könnte. Allerdings hemmte eine Erhöhung des Drucks auf 75 MPa und 100 MPa die Enzymaktivität, das auf einen zunehmenden negativen Einfluß auf die Proteininstabilität bzw. Membranintegrität schließen läßt. Da Hochdruck auch auf die Proteinbiosynthese an den Ribosomen wirkt, kann eine Beeinflussung auf dieser Ebene nicht ausgeschlossen werden.

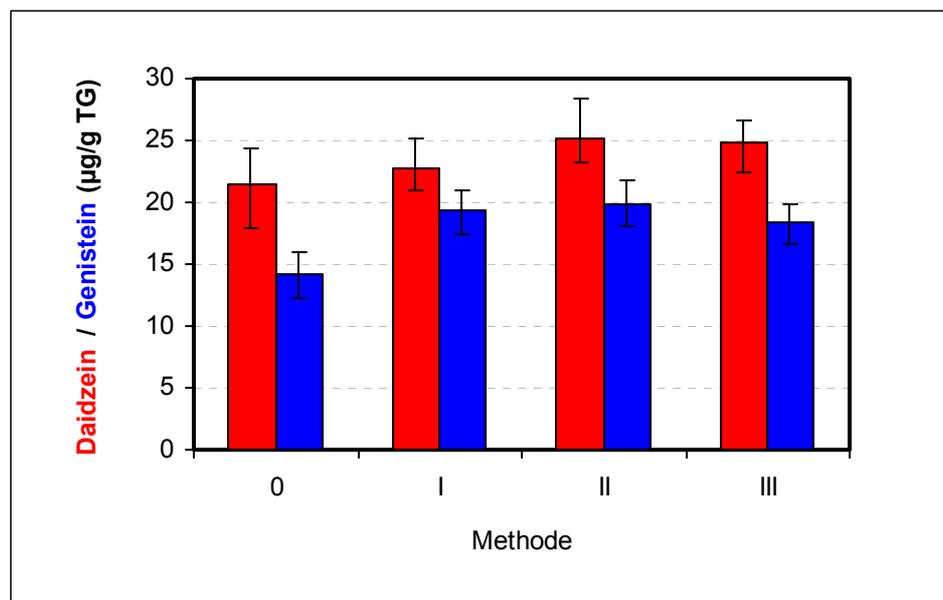
Hoher Druck wirkt auf die funktionelle und strukturelle Integrität der Membran ein (Messens *et al.*, 1997; Angersbach *et al.*, 2002). Die Cytoplasmamembran als osmotische Schranke der Zelle mit entscheidender Stoffwechselfunktion wird ab einem bestimmten Hochdruck permeabilisiert; Ionenflüsse werden verändert und die Produktion aktiver Sauerstoffspezies angeregt. Das führt dazu, daß es innerhalb des Lipidbilayers zu Lipidperoxidationen kommt (Stallaert, 1995). Dies wiederum beeinträchtigt die Aktivität membranständiger Proteine, insbesondere der ATPase, dessen Funktion auch durch die umgebenen Lipide, dem sogenannten Lipidanulus, beeinflusst wird. Durch die genannten Einwirkungen wird die Funktion und Struktur der Zellmembran beeinträchtigt; das Zellinnere verbleibt vor extrazellulären Molekülen ungeschützt. Es ist wahrscheinlich, daß es bei den Untersuchungen nach Anlegen eines Hochdrucks ab 75 MPa zu einer Permeabilisierung der Zellmembran kam.

Die Wirkungsweise von Hochdruck ist sehr vielfältig, daher kann ein einzelner Wirkungsort in dieser Versuchsreihe nicht lokalisiert werden. Die Applikation von Hochdruck auf die Isoflavonoidbiosynthese der Pflanzenzellkulturen zeigten nicht

eindeutig interpretierbare Ergebnisse und fanden somit keine Anwendung auf die Zellkulturen im Bioreaktor.

#### 4.4.2 Hydrostatischer Hochdruck und Kälteschock

Hydrostatischer Hochdruck sowie die Temperatur beeinflussen den Phasenübergang von Wasser und somit auch die Funktionalität und Integrität von Makromolekülen und Molekülsystemen. Eine Kombination von Kälteschock und hydrostatischem Hochdruck wurde als streßauslösender Faktor zur Behandlung der Soja-Zellkulturen angewendet und die anschließende Freisetzung von Isoflavonoiden aus der Soja-Zellkultur untersucht.

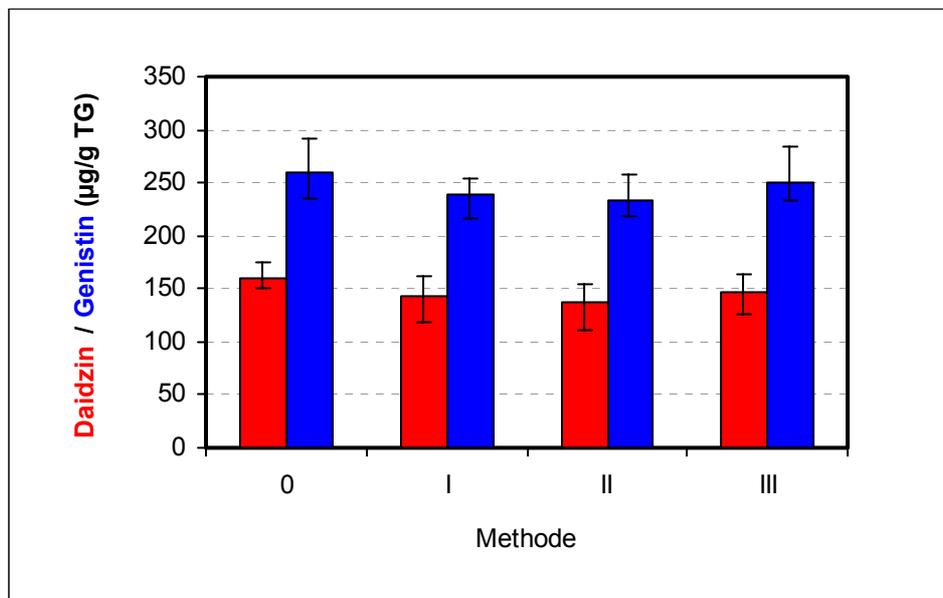


**Abb. 26:** Einfluß von hydrostatischem Hochdruck und Kälteschock auf die Genistein- und Daidzeinkonzentration bei Methode:

- 0 - Kontrolle (7 Tage Kultivierung im 200 mL Schüttelkolben)
- I - 50 MPa (25°C, 5 min) + 2h bei 25°C inkubiert
- II - 50 MPa (25°C, 5 min) + 1h bei 8°C + 2h bei 25°C inkubiert
- III - 1h bei 8°C + 2h bei 25°C inkubiert

Die Genisteinkonzentration wurde sowohl durch hydrostatischen Hochdruck als auch durch Kälteschock um 35 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 26). Die Konzentrationsunterschiede von Genistein zwischen den Methoden I, II und III blieben allerdings sehr gering. Eine Kombination von Hochdruckbehandlung und Kälteschock

brachten jedoch keine weitere Steigerung der Genisteinbiosynthese. Ein Kälteschock bei 8°C löste eine mäßige Zunahme der Daidzeinkonzentration von etwa 20 % aus. Bei der Anwendung der Streßfaktorenkombination Hochdruck und Kältebehandlung blieb der Daidzeingehalt in gleicher Größenordnung wie bei der alleinigen Anwendung von Kälteschock.



**Abb. 27:** Einfluß von hydrostatischem Hochdruck und Kälteschock auf die Genistin- und Daidzinkonzentration bei Methode:

- 0 - Kontrolle (7 Tage Kultivierung im 200 mL Schüttelkolben)
- I - 50 MPa (25°C, 5 min) + 2h bei 25°C inkubiert
- II - 50 MPa (25°C, 5 min) + 1h bei 8°C + 2h bei 25°C inkubiert
- III - 1h bei 8°C + 2h bei 25°C inkubiert

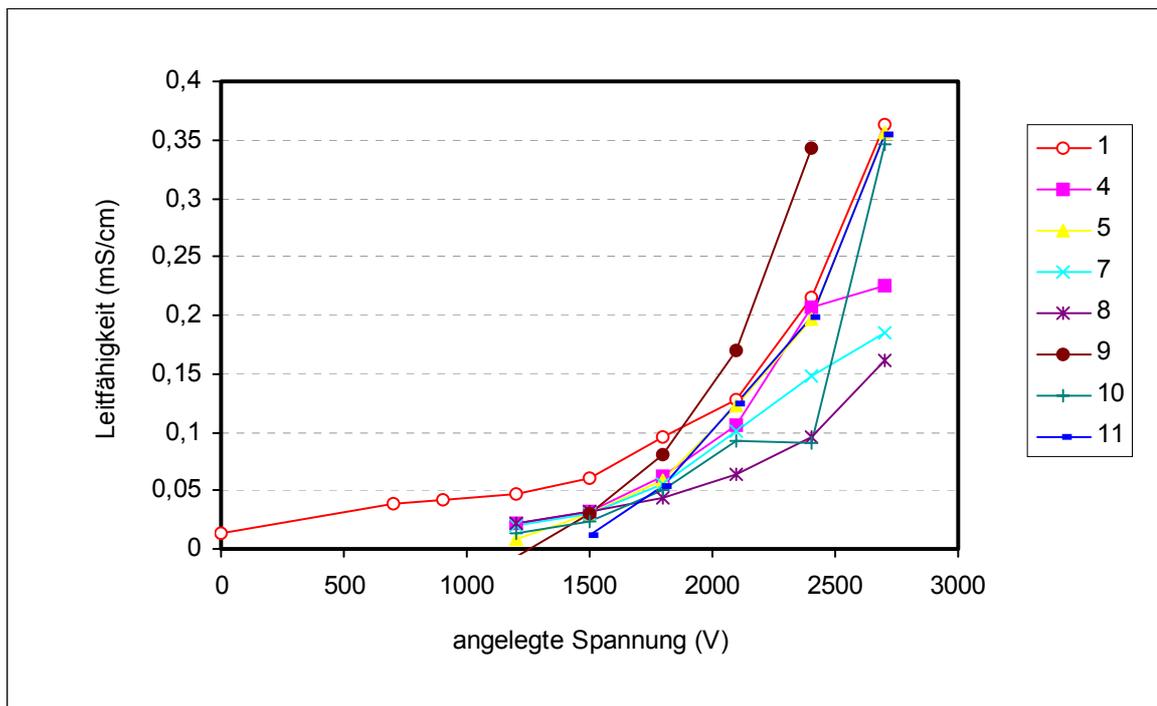
Kälte ist in der Lage, Streß in der Pflanzenzelle auszulösen und eine höhere Konzentration an Isoflavonoiden in Zellen zu induzieren (Kirakosyan *et al.*, 2003). Dies konnte auch bei den Experimenten mit den aglykonen Isoflavonoiden bestätigt werden. Allerdings zeigte eine Kopplung des hydrostatischen Hochdruckes bei 50 MPa mit einer 1-stündigen Inkubation entweder bei Zimmertemperatur (25°C) oder bei einer Kühlung auf 8°C (mit oder ohne 50 MPa) keinen positiven Effekt auf die Genistinbildung. Es konnte sogar ein Rückgang der Genistinkonzentration um bis zu 10 % beobachtet werden. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich nach der Anwendung der verschiedenen Methoden auf die Daidzinbiosynthese. Alle Kombinationen von

Hochdruck und Kälteschock oder Kälteschock alleine bewirkten einen Rückgang der Daidzinkonzentration, bis zu einem Ausmaß von ca. 15 %.

Aufgrund der uneinheitlichen Effekte von hydrostatischem Hochdruck und Kälteschock auf die Bildung der Isoflavonoide fanden diese experimentellen Bedingungen für die Bioreaktorversuche keine weitere Verwendung. Hierbei gaben die HPLC-Ergebnisse der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide, die in einer 10-fach höheren Konzentration in der Zellkultur als die aglykonen Formen vorlagen, den Ausschlag.

#### **4.4.3 Hochspannungsimpulsbehandlung (HSI)**

Zellkulturen verschiedenen Alters wurden steigenden Voltzahlen ausgesetzt, um zu bestimmen, bei welcher Spannung die Sojazellen angeregt und nicht irreversibel geschädigt werden. Dabei stellt die Leitfähigkeit ein Maß für die Schädigung der Zellmembranen dar. Aus dem Verhältnis der Leitfähigkeit intakter und gestörter Zellmembranen gibt der Membranpermeabilisierungsgrad, der sich zwischen den Werten 0 (0 % für intakte Zellen) und 1 (100 % für fast vollständig aufgeschlossene Zellen) bewegt, Aufschluß über die Schädigung der Membranen.

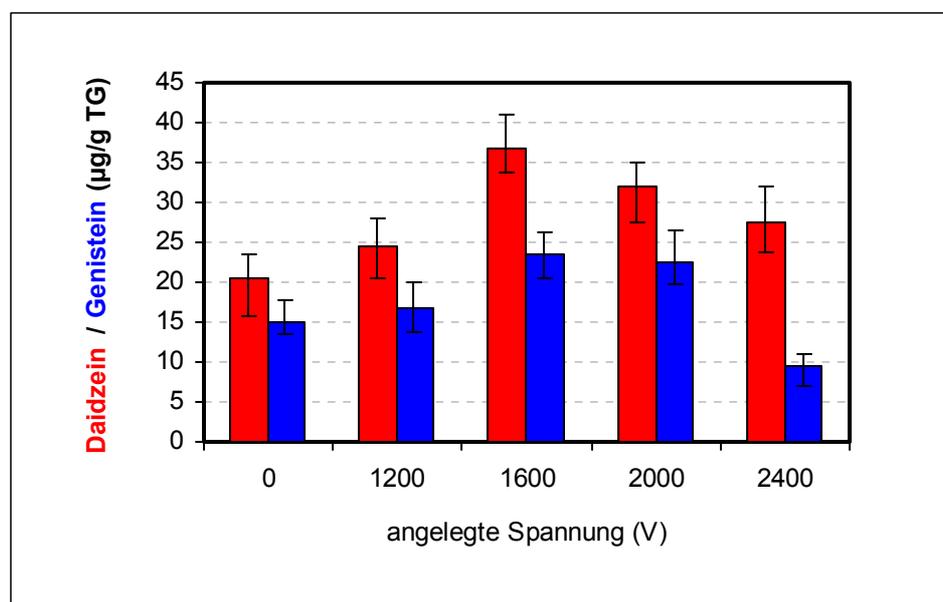


**Abb. 28:** Membranpermeabilität (dargestellt als Leitfähigkeit) bei verschiedenen Spannungen in Abhängigkeit vom Alter der Soja-Zellkulturen. Es wurden 7 Tage alte Kulturen zur Animpfung verwendet und nach den entsprechenden Tagen (siehe Legende) dem HSI-Impuls ausgesetzt

Spannungen unter 1000 Volt übten generell keine permeabilisierende Wirkung auf die Membranen der Pflanzenzellen aus. (siehe Versuchsreihe 1 in Abb. 28). Daher wurden alle mit Spannungen von 1200 Volt aufwärts behandelt. Ab ca. 1500 Volt setzte die Permeabilisierung der Zellmembranen unabhängig vom Alter der Kulturen ein. Ab einer Spannung von 1800 Volt erhöhte sich die Membrandurchlässigkeit exponentiell, die maximalen Leitfähigkeitswerte lagen dabei z. B. bei einer ein Tag alten Kultur nach Applikation von 2500 Volt bei 0,37 mS/cm, was eine Steigerung um etwas das 7-fache gegenüber dem Ausgangsimpuls von 1200 Volt Kontrolle darstellte. Dies läßt auf eine starke, zum Teil irreversible Zellschädigung schließen. Daher wäre dieser Bereich für eine Anwendung in den Bioreaktorversuchen nicht optimal. Allein die 7 Tage alte Kultur zeigte eher einen linearen Zusammenhang zwischen Membranschädigung und angelegter Hochspannung. Erkennbar war außerdem eine Abhängigkeit des Permeabilisierungsgrades vom Alter der Zellkultur. Zellen der lag- (Hochspannungsimpuls nach 1 Tag Kultivierung) und der stationären Phase (Hochspannungsimpuls nach 9 Tagen Kultivierung) waren leichter permeabilisierbar als Zellen der exponentiellen Wachstumsphase. Dies könnte daran liegen, daß sich

die Zellen der Adaptationsphase den neuen Umweltbedingungen durch Anpassung in der Membranbeschaffenheit einfügen und bei den alten Zellen bereits die Lyse einsetzt.

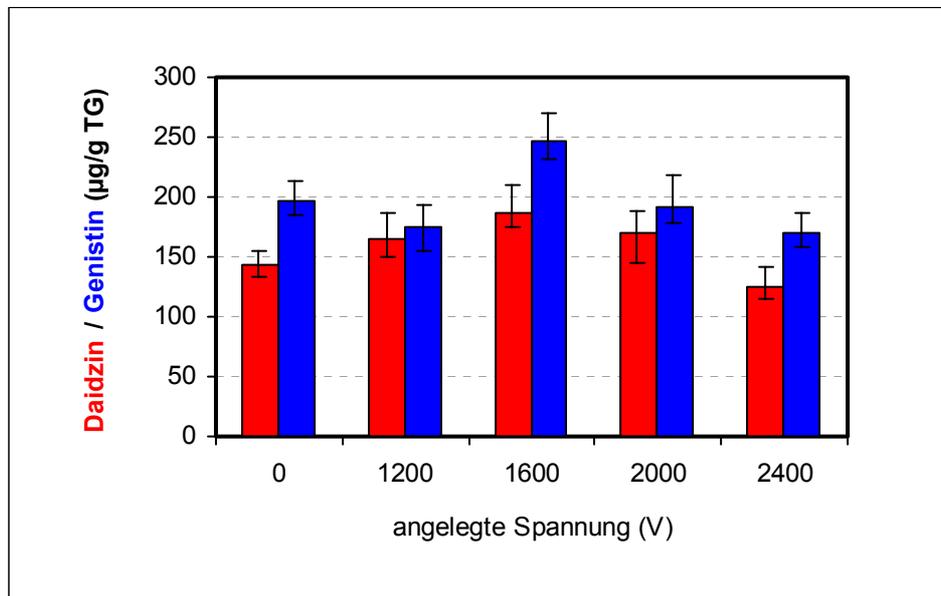
Eine voraussetzende Bedingung, um Zellen kommerziell zur kontinuierlichen Akkumulation von Sekundärmetaboliten mit Hilfe von Hochspannungsimpulsen anzuregen ist, daß die Zellen nicht in ihrer Vitalität und ihrem biosynthetischen Potential geschädigt werden. Sie müssen sich nach Abschluß der Behandlung vollständig regenerieren können.



**Abb. 29:** Einfluß von Hochspannungsimpulsen auf die Genistein- und Daidzeinkonzentration bei 7 Tage alten Kulturen

Der Genisteingehalt stieg durch das Anlegen eines Hochspannungsimpulses von 1600 Volt und 2000 Volt um mehr als 50 % im Vergleich zur Kontrolle an. Eine weitere Erhöhung der Hochspannung führte allerdings zu einem Rückgang der Isoflavonoidkonzentration um ca. 30 % gegenüber der Probe, die mit 1600 Volt bepulst wurde. Die Daidzeinkonzentration konnte durch das Anlegen eines Hochspannungsimpulses von 1600 Volt um mehr als 75 % erhöht werden und zeigte somit die höchste Synthesesteigerung, die durch eine bestimmte angelegte Hochspannung erreicht werden konnte. Die Steigerung der Spannungsimpulse von 1600 Volt auf zunächst 2000 Volt und anschließend auf 2400 Volt zeigte ebenfalls

eine positive Wirkung auf die Daidzeinbiosynthese gegenüber der Kontrolle, war aber in der Ausprägung nicht so stark wie bei 1600 Volt.



**Abb. 30:** Einfluß von Hochspannungsimpulsen auf die Genistin- und Daidzinkonzentration bei 7 Tage alten Kulturen.

Die Genistinkonzentration stieg durch die Hochspannungsbehandlung von 1600 Volt um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle an. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf 2000 Volt zeigte keinen positiven Effekt auf die Bildung von Genistin, sondern bewirkte einen leichten Rückgang. Der Spannungsbereich von 2400 Volt steigerte die Hemmung der Genistinbildung um weitere fast 10 %. Die Daidzinkonzentration wurde durch die Hochspannungsbehandlung von 1600 Volt um 30 % erhöht. Die Hochspannungsbereiche 1200 Volt und 2000 Volt bewirkten keinen größeren Unterschied auf die Bildung von Daidzin. Eine weitere Spannungserhöhung auf 2400 Volt zeigte dagegen einen Rückgang der Daidzinkonzentration um ca. 10 %.

Zellmembranen können durch Applikation von Hochspannungsimpulsen (HSI) permeabilisiert werden, welches auf die Dipoleigenschaft der Lipidmoleküle und die selektive Permeabilität der Membran für Ionen zurückzuführen ist (Tsong, 1991). Eine reversible Membranpermeabilisierung ruft in Pflanzenzellkulturen Streßreaktionen hervor, die zur einer verstärkten Produktion von Sekundärmetaboliten führt (Heinz *et al.*, 2000). Neben der Wirkung von HSI auf die Integrität der Zellmembran, wird ihr vielfältiger Einfluß auch auf die Aktivität und Struktur von Proteinen und Enzymen

beschrieben (Knorr, 1999). Dabei zeigten Untersuchungen differenzierte Ergebnisse. Ho *et al.*, (1997) berichtete über eine partielle Inaktivierung bestimmter Enzyme wie die Glukoseoxidase oder Peroxidasen; als Beispiel für eine vollständige Inaktivierung eines Enzymes sei die Pektinmethylesterase genannt (Min *et al.*, 2003). Dagegen zeigten Lysozym und Pepsin eine gesteigerte Aktivität bei verschiedenen angelegten Spannungen. Es bleibt jedoch unklar, ob der Grad der Inaktivierung abhängig ist von der Struktur der Proteine, deren Anzahl der aktiven Zentren, der Konzentration der behandelten Enzyme, lokaler Wärmeeffekte oder einer Kombination dieser Faktoren (Barbosa-Canovas, 1999).

Es scheint, daß die angelegte Spannung, die Impulsdauer und die Anzahl der Impulse entscheidenden Einfluß auf die Inaktivierung der Enzymtätigkeit ausüben. Die Untersuchungen zeigten, daß eine angelegte Spannung von 1600 Volt positiv auf die Bildung der Isoflavonoide wirkte. Dies kann auf die Streßantwort der Zelle nach reversibler Zellmembranpermeabilisierung zurückzuführen sein. Unter anderem könnten auch Proteinkanäle, die in der Zellmembran lokalisiert sind und durch die angelegte Spannung sich öffnen, eine Rolle spielen (Jeyamkondam *et al.*, 1999). Eine Schädigung der Proteinkanäle durch eine elektrische Modifikation der funktionellen Gruppen wie die Hydroxyl-, Carboxyl-, Sulfhydryl- oder Aminogruppen kann bei der Auslösung der Streßantwort der Zelle mitursächlich sein. Wie am Anfang des Kapitels erwähnt, besteht zudem die Möglichkeit, daß die Spannung von 1600 Volt einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität entscheidender Enzyme des Phenylpropanoidweges wie z. B. PAL, Chalkonisomerase ausübt und somit positiv auf die Isoflavonoidsynthese wirkt.

Allerdings gilt immer noch, daß das größte Problem bei der Gewinnung und Produktion von Sekundärmetaboliten im Augenblick die unzureichende Kenntnis der Biosynthesewege und der cytologischen und genetischen Hintergründe dieser Metaboliten darstellt (Buitelaar und Tramper, 1991; Reichling, 1985).

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Hochspannungsimpulse auf die Isoflavonoidsynthese im Batchverfahren (Schüttelkolben) bei einer angelegten Hochspannung von 1600 Volt wurde dieser Spannungsbereich für die Untersuchungen im Bioreaktor zur Steigerung der Sekundärmetabolitbiosynthese verwendet.

#### **4.5 Darstellung geeigneter Einflußfaktoren auf die Bildung von Isoflavonoiden im Airlift-Bioreaktor (Scale-up Versuche)**

Bioreaktoren werden in der Zukunft bei den biologischen Produktionsmethoden eine wichtige Rolle spielen (Chang, 2003). Der Durchbruch zu einer industriellen Nutzung von Pflanzenzellkulturen blieb allerdings aufgrund einer fehlenden wirtschaftlichen Durchführbarkeit bisher weitgehend aus (Sahai, 1994; Goldstein, 1999). Hierbei stellt eine große Herausforderung die verfahrenstechnische Umsetzung der Batchversuche im Scale-up Maßstab dar (Kieran *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1995); dabei besteht ein Hauptproblem in dem Verlust der Produktivität der Zellkulturen im Scale-up Design (Ritterhaus *et al.*, 1990).

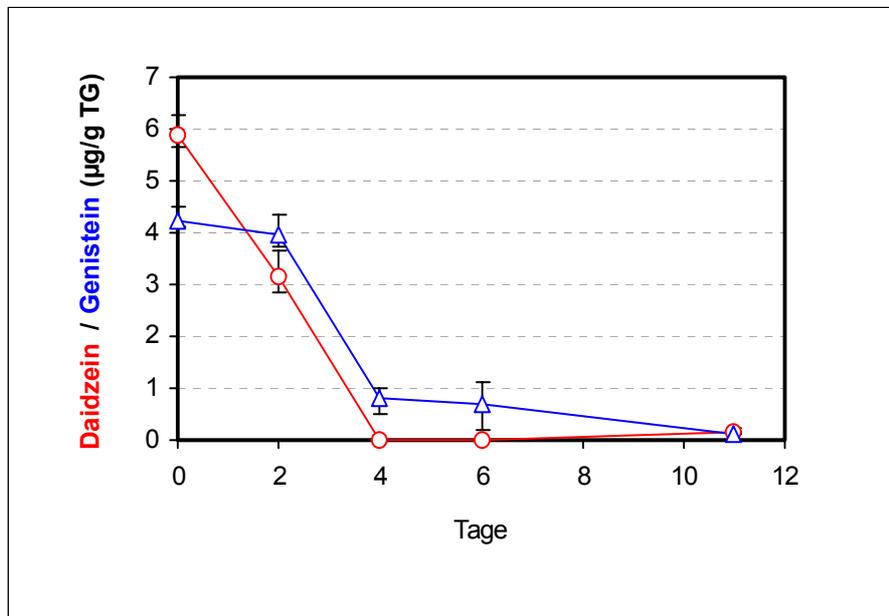
Der Airlift-Bioreaktor scheint aufgrund seiner speziellen technischen Ausstattung besonders für die Fermentierung von Pflanzenzellkulturen geeignet zu sein (Aghighi, 1988; Merchuk, 1990). Curtis (1999) nahm an, daß die größten Schwierigkeiten, die bei der Kultivierung von Pflanzenzellen in Bioreaktoren auftreten, von einem Mangel an Verständnis über die spezifischen Anforderungen der Zellkulturen herrühren. Dabei ist insbesondere auch die instabile Produktion der Sekundärmetabolite durch die Pflanzenzellkulturen zu nennen.

In diesem Kapitel sollen daher verschiedene Faktoren, die die Isoflavonoidbiosynthese der Zellkulturen im Bioreaktor beeinflussen können, näher untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse, die bei den Untersuchungen in den Batchkulturen zur Bildung von Sekundärmetaboliten bei *Glycine max* erzielt wurden, können als vielversprechende Faktoren zur Steigerung der Isoflavonoidbiosynthese der O<sub>2</sub>-Partialdruck, der Elicitor Methyljasmonat und der Hochspannungsimpuls angesehen werden. Sie wurden daher im Airlift-Bioreaktor zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

##### **4.5.1 Allgemeine Untersuchungen zur Bildung der Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor**

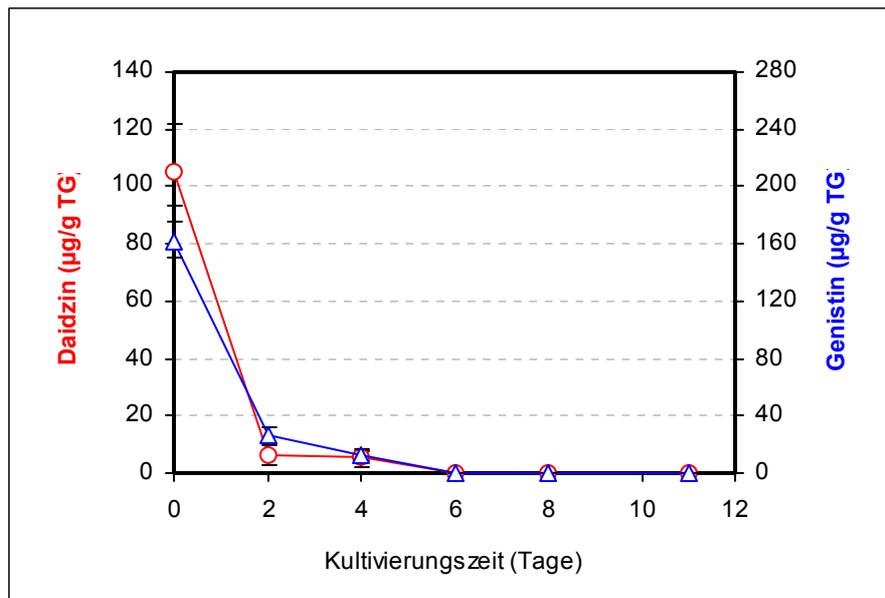
Es wurde zunächst die Isoflavonoidbiosynthese im Airlift-Bioreaktor beim konventionellen Versuchsaufbau (siehe Material und Methoden) untersucht. Die Versuchsplanung sollte in den darauf anschließenden Experimenten, entsprechend

den erhaltenen Ergebnissen zur Bildung der Isoflavonoide, variiert und jeweils optimiert werden.



**Abb. 31:** Daidzein- und Genisteinkonzentration im Airlift-Bioreaktor beim konventionellen Versuchsaufbau (ohne Einbau von Fritten)

Es kam zu keiner Biosynthese von Genistein und Daidzein beim konventionellen Versuchsaufbau im Airlift-Bioreaktor (Abb. 31). Ausgangskonzentrationen der beiden Isoflavonoide, die unmittelbar nach der Animpfung mit den jeweiligen Vorkulturen gemessen wurden, nahmen innerhalb von 4 Tagen stark ab. In der Kulturprobe des 4. Inkubationstages war Genistein in einer Konzentration von  $< 1 \mu\text{g/g TG}$  und Daidzein nur in Spuren nachweisbar.



**Abb. 32:** Daidzin- und Genistinkonzentration im Airlift-Bioreaktor beim konventionellen Versuchsaufbau (ohne Einbau von Fritten)

Noch deutlicher als bei den aglykonen Isoflavonoiden konnte ein Rückgang der Konzentrationen der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide beobachtet werden. Während der ersten 2 Tage im Airlift-Bioreaktor ging der Genistingehalt um mehr als 80 % zurück. Ab dem 6. Tag konnte kein Genistin mehr im Airlift-Bioreaktor gemessen werden. Einen ähnlichen Verlauf wie bei Genistin zeigte die Messung der Daidzinkonzentration. Bereits nach 2 Tagen war ein über 90 %-iger Daidzinverlust erkennbar. Danach waren sie nur noch im einstelligen  $\mu\text{g/g TG}$  Bereich nachweisbar. Die  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide erfuhren insgesamt einen stärkeren und über die Zeitachse längeren Rückgang ihrer Konzentration als die aglykonen Isoflavonoide.

Die geringe Biosyntheserate ist deutlich bei den hier untersuchten Isoflavonoiden im Airlift-Bioreaktor erkennbar. Verschiedene, generelle Schwierigkeiten treten bei der Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Airlift-Bioreaktor auf. Dabei sind die während der Kultivierung auftretenden Scherkräfte wahrscheinlich ein zentraler Grund für die geringe Isoflavonoidkonzentration im Airlift-Bioreaktor, die bis zu einem 90 %-igen Verlust (Daidzin) innerhalb der ersten 2 Tage der Kultivierung führten. Im Airlift-Bioreaktor sind Zellkulturen Ziel von hydrodynamischen Kräften, die von einer Belüftung über den Begaserring mit gleichzeitiger Blasenbildung herrühren. Die daraus resultierenden Effekte der Scherkräfte auf die biologischen Zellen wurden in verschiedenen Studien untersucht (Leckie *et al.*, 1991; Dunlop *et al.*, 1994; Ho *et al.*,

1995; Hooker *et al.*, 1989; Kieran *et al.*, 1995; MacLoughlin *et al.*, 1998; Meijer *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1998). Dabei sind Pflanzenzellen wahrscheinlich nicht so empfindlich gegen hydrodynamische Kräfte wie tierische Zellkulturen, aber im Allgemeinen sind sie wesentlich sensitiver als Mikroorganismen. Als Grund dafür kann das große Volumen der Pflanzenzelle und die rigide Zellwand angeführt werden. Kultivierte Pflanzenzellen besitzen eine Größe von 20-40  $\mu\text{m}$  Durchmesser und 100-200  $\mu\text{m}$  in der Länge (Wilson, 1980). Sie beinhalten Vakuolen, die bis 95 % ihres Zellvolumens ausfüllen. Sie haben die Tendenz sich in größeren Zellaggregaten, die bis zu einigen mm im Durchmesser betragen können, aneinander zu lagern (Doran, 1999; Singh *et al.*, 1994). Die Zellmorphologie und die Zellaggregatgröße sind sehr abhängig von den hydrodynamischen Scherkräften in der umgebenden Flüssigkeit. Daher wurden die Pflanzenzellen als sehr empfindlich gegenüber Scherkräften betrachtet. Zusätzlich haben die Pflanzenzellen in Suspensionskulturen die Tendenz, sich an die Wände der Kulturgefäße anzulagern oder sich im oberen Bereich des Bioreaktors zu akkumulieren. Bei hohen Zelldichten kann das Biomassevolumen 50 bis zu 90 % des Kultivierungsvolumens ausmachen, welches auf den hohen Wassergehalt der Pflanzenzellen zurückzuführen ist. Alle diese Charakteristika tragen zur hohen Komplexität der Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Bioreaktor bei.

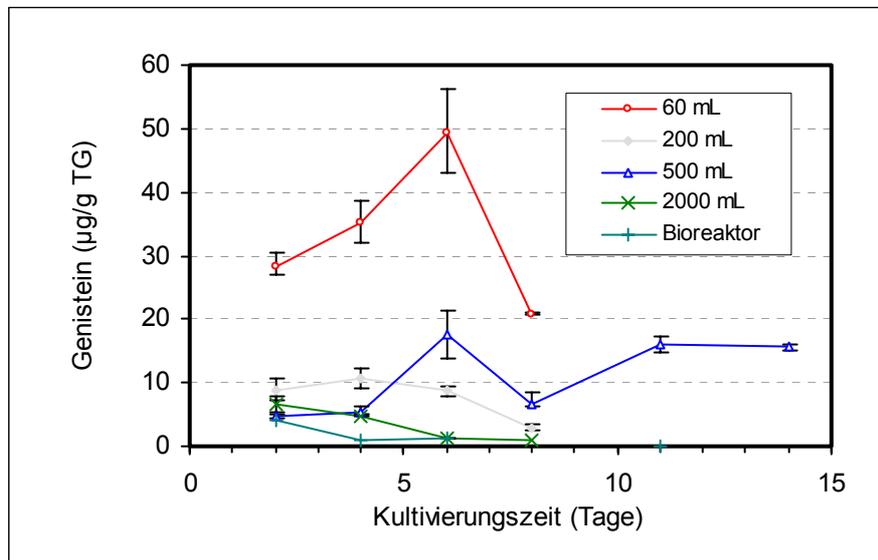
Darüberhinaus gibt es noch einen weiteren wichtigen Grund, der zur schwierigen Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Airlift-Bioreaktor entscheidend beiträgt. Da die Pflanzenzellen strikte Aerobier sind, muß ihre Versorgung mit gelöstem Sauerstoff sowie ein ausreichender Gasaustausch zwischen dem Medium und den Zellen gewährleistet sein (Schermyly und Blaß, 1990). Die Bedeutung des Sauerstoffs wird im Kapitel 4.5.4 behandelt und soll hier nicht weiter ausgeführt werden.

Zunächst sollte in den weiteren Experimenten im Kapitel 4.5.2 untersucht werden, in welcher Größenordnung die Scherkräfte Einfluß auf die Biosynthese der Isoflavonoiden ausüben. Die Untersuchungen über die Sauerstoffversorgung der Zellen im Airlift-Bioreaktor schließen sich daran an.

#### **4.5.2 Der Einfluß der Volumeneffekte auf die Produktion der Isoflavonoide**

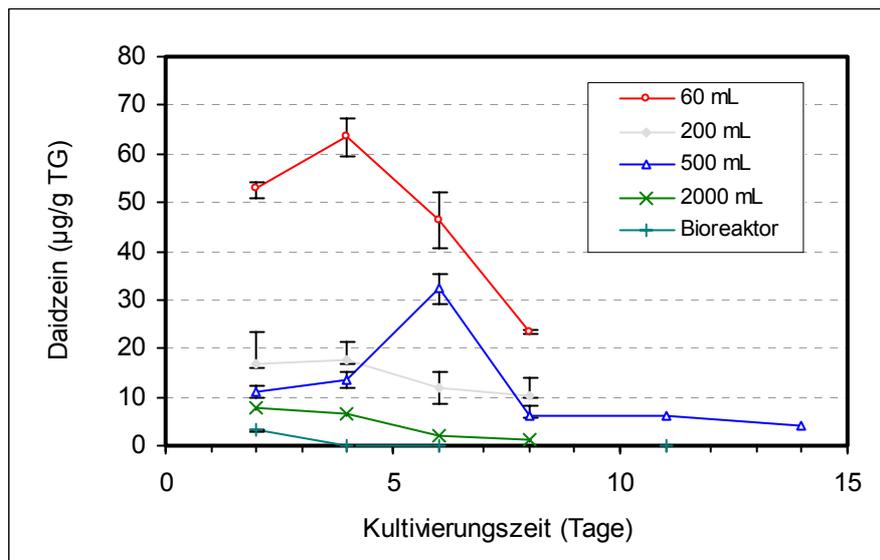
Die geringe Biosynthese der verschiedenen Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor war vermutlich auf die vorhandenen Scherkräfte durch die Belüftung über das Begasungssystem des Bioreaktors und auf das spezielle Design des Bioreaktorgefäßes zurückzu-

führen. Es sollte daher überprüft werden, inwieweit die Kräfte in unterschiedlichen Gefäßvolumen auftreten und die dortige Biosynthese von Isoflavonoiden beeinträchtigen.



**Abb. 33a:** Volumeneffekte auf die Bildung von Genistein

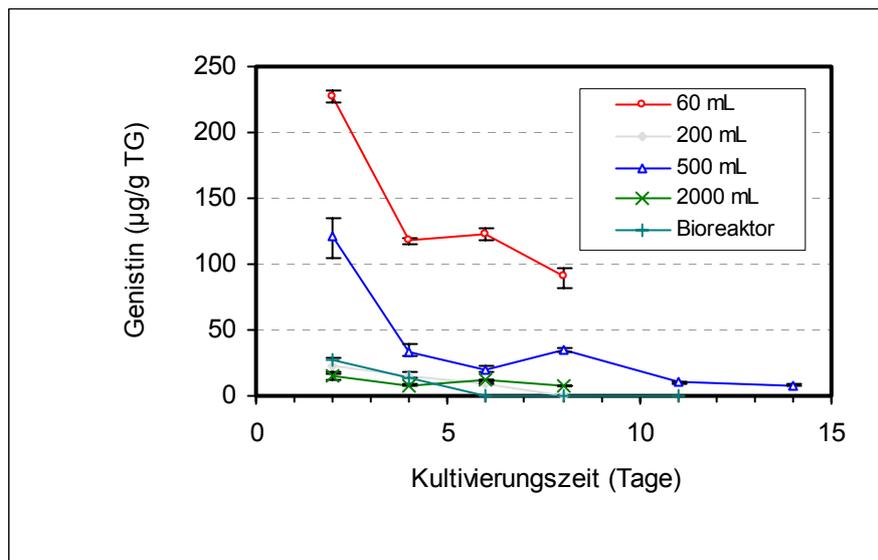
Die maximale Produktion von Genistein fand im kleinsten Kulturkolben von 60 mL Volumen statt (Abb. 33a). Die Genisteinkonzentration, die bereits am 2. Versuchstag bei 28,1 µg/g TG lag, stieg bis zum 6. Inkubationstag um ca. 75 % auf 49,3 µg/g TG an. Ab dem 6. Tag erfuhr sie jedoch einen starken Rückgang um mehr als 50 %. Die Kultivierung der Zellen im 500 mL Kolben ließ eine mäßige Biosynthese von Genistein zu, wobei die Genisteinkonzentration am 6. Tag auf 17,62 µg/g TG anstieg. Dieser Wert blieb, nach einer mäßigen Abnahme am 8. Versuchstag, ab dem 11. Tag bis zum Versuchsende unverändert. Im Kulturkolben von 200 mL Volumen wurde eine relativ geringe Bildung von Genistein festgestellt. Während der 8-tägigen Kultivierungszeit bewegte sich die Genisteinkonzentration um 10 µg/g TG. Die Genesteinbiosynthese blieb im großvolumigsten Kulturkolben von 2000 mL und im Airlift-Bioreaktor vollkommen aus. Kein Genistein konnte nach 4 bzw. 8 Inkubationstagen in den Kulturproben nachgewiesen werden. Die Kultivierung der Zellkulturen im großvolumigsten Gefäß (Bioreaktor) dieser Versuchsreihe zeigte somit die geringste Genesteinkonzentration. Dies wies auf die in diesem Volumen besonders starke Ausprägung der Scherkräfte hin.



**Abb. 33b:** Volumeneffekte auf die Bildung von Daidzein

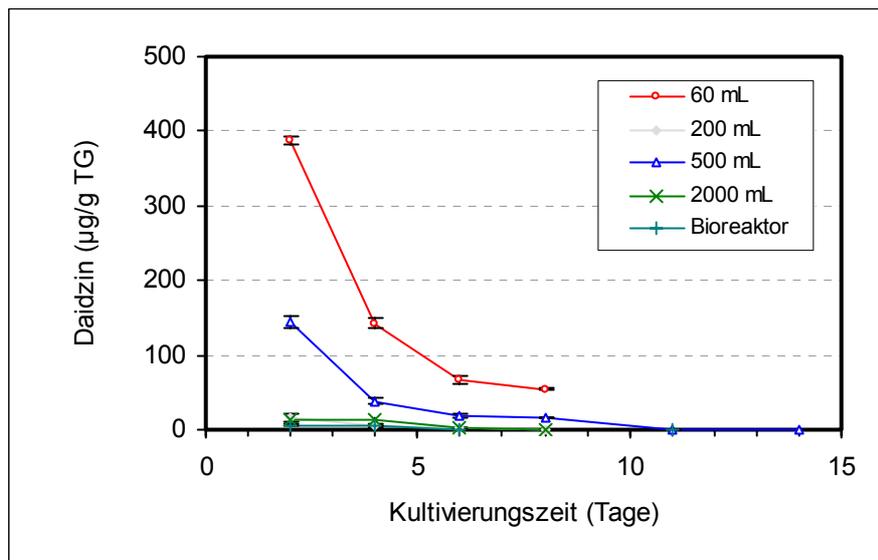
Die Kultivierung der Zellen im 60 mL Kolben zeigte ebenfalls die höchsten Daidzeinkonzentrationen in der Versuchsreihe. Nach 4 Tagen stieg die Daidzeinkonzentration um ca. 20 % im Vergleich zum 2. Tag an, nahm allerdings danach bis zum 8. Tag sehr stark um ca. 70 % auf 23,28 µg/g TG ab. Die Messungen in 200 mL Kolben ergaben ab dem 4. Tag rückläufige Daidzeinkonzentrationen, die bis zum 8. Tag auf 60 % des Ausgangswertes zurückgingen. Bei den Messungen des 500 mL Kolbens stieg die Daidzeinkonzentration nach 6 Tagen rasch um 180 % auf 32,5 µg/g TG an, danach sank allerdings die Konzentration wieder annähernd auf den Ausgangswert ab. Die Messungen in 2000 mL Kolben nahmen kontinuierlich von 7,70 µg/g TG bis auf 1,15 µg/g TG an dem 8. Tag ab.

Die geringsten Daidzeinergebnisse zeigten wiederum die Versuche im Airlift-Bioreaktor, hierbei war die Konzentration ab dem 4. Tag nur in Spuren nachweisbar. Die höchsten Konzentrationen an Daidzein während des gesamten Versuchsverlaufs konnten erneut im 60 mL Kolben festgestellt werden, der das geringste Volumen für die Kultivierung der Soja-Zellkulturen bot.



**Abb. 33c:** Volumeneffekte auf die Bildung von Genistin

Die Resultate der Untersuchungen an den  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoiden ähnelten vom Verlauf der Kurven stark den Ergebnissen, die bei den aglykonen Isoflavonoiden erzielt wurden. So zeigte wiederum die Zellsuspension des kleinsten Kulturkolbens von 60 mL Volumen die höchsten Isoflavonoidkonzentrationen (Abb. 33c, 33d). Die größte Genistinkonzentration, die am 2. Inkubationstag ermittelt wurde, ging bis zum 8. Inkubationstag um ca. 60 % auf 92  $\mu\text{g/g TG}$  zurück (Abb. 33c). Die Proben aus dem Kulturgefäß von 500 mL Volumen wiesen ebenfalls eine starke Abnahme der Genistinkonzentration am 4. Inkubationstag auf. In den Kulturgefäßen von 200 und 2000 mL Volumen sowie im Airlift-Bioreaktor kam es nicht zu einer nennenswerter Synthese von Genistein, die bereits am 2. Inkubationstag unter 30  $\mu\text{g/g TG}$  lag und mit zunehmender Inkubationsdauer bis zur Nachweisgrenze abnahm. Deutlich erkennbar war wiederum der Effekt, daß im Allgemeinen eine geringere Konzentration an Isoflavonoiden in höhervolumigen Kultivierungsgefäßen festgestellt werden konnte. Die Isoflavonoidkonzentration war erneut im Airlift-Bioreaktor am schwächsten ausgeprägt.



**Abb. 33d:** Volumeneffekte auf die Bildung von Daidzin

Ähnlich wie bei Genistin ging die Biosynthese von Daidzin in den 60 und 500 mL Kulturgefäßen unmittelbar nach dem 2. Inkubationstag stark zurück. In den Kulturkolben mit einem Volumen von 200 und 2000 mL sowie im Airlift-Bioreaktor kam Daidzin am 2. Inkubationstag nur in sehr geringer Konzentration vor. Nach 6-tägiger Inkubation konnte Daidzin nur noch in Spuren nachgewiesen werden.

Die dargestellten Ergebnissen zeigten auf, daß die stärkste Biosynthese der untersuchten Isoflavonoide während der Kultivierung in den kleinsten Kulturgefäßen von 60 mL Volumen erfolgte. In den Kulturkolben von 500 mL Volumen konnte eine mäßige Konzentration von Isoflavonoiden erzielt werden. Das Ausbleiben der Biosynthese von den Isoflavonoiden in einem großvolumigen Gefäß von 2000 mL sowie im Airlift-Bioreaktor weist wiederum auf die in diesen Volumen besonders starke Ausprägung der Scherkräfte hin.

Die Beeinträchtigung der Biosynthese verschiedener Stoffwechselprodukte von Pflanzenzellkulturen durch die mangelhafte Regulierung der Scherkräfte in einem Bioreaktor wurde häufig beschrieben (Kieran *et al.*, 2000; Zhong, 2002; Nienow, 1998; Prokop und Bajpai, 1992; Thomas, 1990). Scherkräfte wirken auf die Oberfläche eines Körpers in der Richtung parallel zur Oberfläche. Allgemein können sie über die folgende Formel definiert werden (Payne *et al.*, 1991; Dunlop *et al.*, 1994):

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

$\tau$  = Schubspannung (Scherkraft)

$\eta$  = Viskosität (dynamisch)

$\dot{\gamma}$  = Scherrate

Die Formel gilt für die Berechnung der Schubspannung bei NEWTONsche Fluide. Allerdings kann bei den Suspensionskulturen im Airlift-Bioreaktor von einem Nicht-NEWTONschen Fließverhalten gesprochen werden. Hierbei werden zusätzliche Effekte der Wechselwirkungen der Phasen und Teilchen untereinander wirksam, die sich aus dem zunehmendem Zellwachstum und Aggregationszustand der Zellen ergeben. Dabei können zur Berechnung der Schubspannung die Gleichungen nach BINGHAM, CASSON und HERSCHEL-BULKLEY herangezogen werden (Weipert *et al.*, 1993). Die letztere Gleichung soll hier dargestellt werden:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n + \tau_0$$

$\tau$  = Schubspannung (Scherkraft)

$K$  = Konsistenzfaktor

$\dot{\gamma}$  = Scherrate

$n$  = Fließexponent

$\tau_0$  = Fließgrenze

Durch die Gleichung können die Struktur-, Orientierungs- und Deformationseffekte, die in der Pflanzensuspension im Bioreaktor auftreten, erfaßt werden.

Wie dargestellt zeigten die Ergebnisse im Bioreaktor die niedrigsten Isoflavonoidkonzentrationen von allen untersuchten Kultivierungsgefäßen. Im Unterschied zu den Versuchen im Schüttelkolben wurde der Airlift-Bioreaktor über ein Begaserring belüftet. Dies hatte zur Folge, daß aufsteigende Blasen in ihrer Wirbelschlepe und insbesondere bei ihrer Eruption an der Flüssigkeitsoberfläche hohe lokale Scherkräfte

erzeugten, welche die Zellen einem Streß aussetzten, sie beschädigten oder gar zerrissen (Garcia-Briones *et al.*, 1994). Beschädigte Zellen sind nicht nur teilungsunfähig, sie setzen zusätzlich Zellinhaltsstoffe wie Lipasen und Proteasen frei. Dadurch werden die noch gesunden Zellen am Wachstum und ihren Biosyntheseleistungen gehemmt. Außerdem hindern die durch die Belüftung entstandenen Scherkräfte die Ausbildung von Zellaggregaten, welche für die Bildung von Sekundärmetaboliten eine wichtige Rolle spielen (Payne *et al.*, 1991). Zudem können Zellen durch Stöße von Zellaggregaten gegeneinander oder gegen feste oder bewegliche Reaktorteile sowie durch Wechselwirkung zwischen Zellen und turbulenten Strömungen geschädigt werden (Cherry und Papoutsakis, 1986). Es soll daher nur soviel Energie in das System eingebracht werden wie notwendig ist, um die Konzentration des limitierenden Nährstoffs, üblicherweise Sauerstoff, im ganzen Bioreaktor auf einem genügenden Niveau zu halten. Insbesondere sind hohe Turbulenz und Relativgeschwindigkeit der Zellen zu Reaktorteilen, eventuell auch eine direkte Begasung, zu vermeiden (Hegglin *et al.*, 1990).

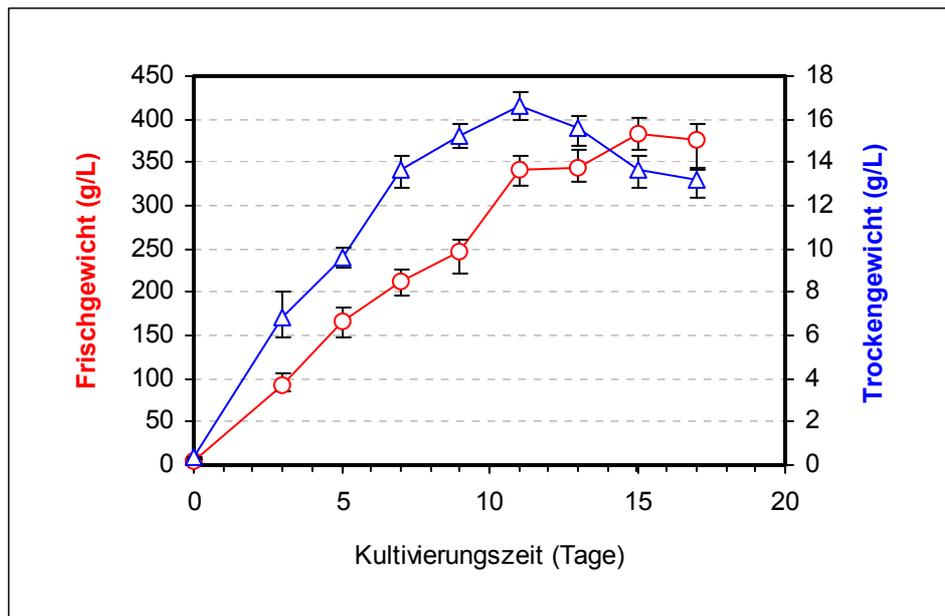
Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die Versuchsplanung in den folgenden Untersuchungen geändert und zur Verringerung der Scherkräfte die Luftblasengröße variiert. Dies sollte mit dem Einbau von Fritten in den Versuchsaufbau des Airlift-Bioreaktors erreicht werden. Durch die feineren Blasen konnte zusätzlich bei geringerem Belüftungseintrag der gleiche Stoffübergang gewährleistet werden (Potas, 2002).

#### **4.5.3 Wachstumscharakterisierung von *Glycine max* im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten**

Die in den Experimenten erzielten Zelldichten variierten zwischen 200 und 350 kg/m<sup>3</sup> und waren somit gut für eine kommerzielle Nutzung geeignet. Die Ausbildung von Scherkräften sollte durch eine Verringerung der Sauerstoffblasengröße mit Hilfe des Einbaus von Fritten entgegengewirkt werden.

##### **4.5.3.1 Erstellung von Wachstumskurven der Soja-Zellkultur im Airlift-Bioreaktor**

Das Wachstumsverhalten von *Glycine max* wurde nach Einbau von Fritten über 17 Tage im Bioreaktor verfolgt und durch die Bestimmung von Frischgewicht und Trockengewicht dargestellt.



**Abb. 34:** Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkultur im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten

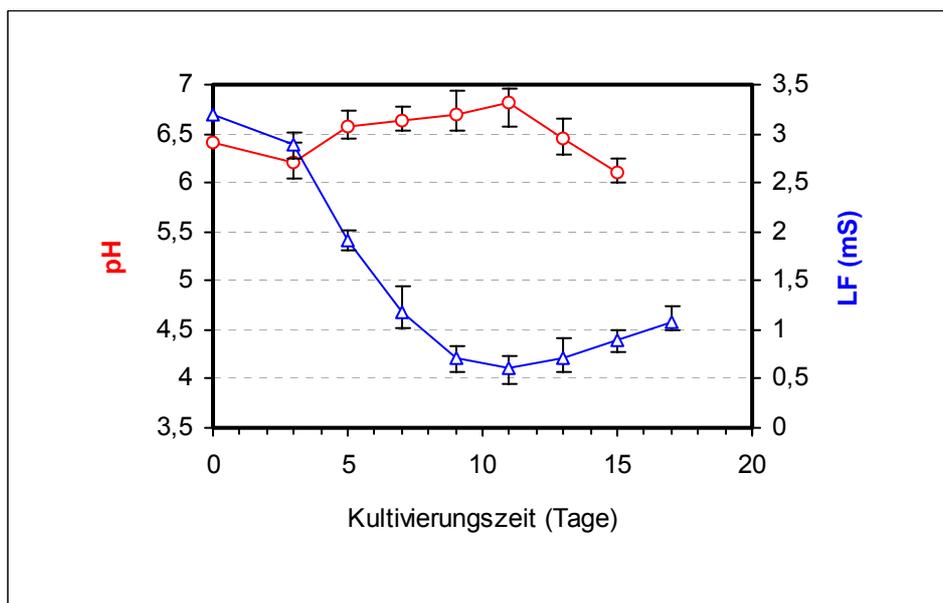
Die Zellen erreichten das höchste Wachstum nach 11 Tagen mit einem Trockengewicht von 16,65 g/L. In der stationären Phase ging nach 11 Tagen das Trockengewicht leicht zurück. Dieser leichte Rückgang der Zellmasse wird wahrscheinlich auf eine geringfügige Zellysis durch Nahrungs- und O<sub>2</sub>-Mangel (niedriger O<sub>2</sub>-Partialdruck) zurückzuführen sein. Die Kultur erreichte ihr maximales Frischgewicht nach ca. 2 Wochen Fermentationsdauer. Die Zellkulturen von *Glycine max* wuchsen im Airlift-Bioreaktor langsamer als im 200 mL Kolben (Abb.12). Der Verlauf der Wachstumskurven im Bioreaktor, gemessen in Trockengewicht als auch in Frischgewicht, erreichte das Maximum in der logarithmischen Phase wesentlich später als in den Wachstumskurven von *Glycine max* bei den Batchversuchen dargestellt. Im Vergleich zu den Untersuchungen des Wachstums der Soja-Zellkultur im Bioreaktor ohne Einbau von Fritten zeigte sich hier ein fast sofortiges Eintreten der Zellen in die logarithmische Phase und ein schnellerer Übergang in die stationäre Phase (nach 11 Tagen, gemessen in TG).

In früheren Untersuchungen wurde bei den Wachstumsversuchen der Zellen ohne Einbau von Fritten eine lag-Phase von 8 Tagen gemessen. Die Zellen erreichten das Maximum ihres Wachstums am 20. Tag (Taza-Azaba, 2001). Daraus ist ersichtlich, daß der Einbau von Fritten den O<sub>2</sub>-Partialdruck im Medium und anscheinend die Scherkräfte reduzierte. Dies führte zu einer höheren Zellbiomasse. Somit konnte

sowohl im Vergleich zu den Batchversuchen als auch im Vergleich zu dem Bioreaktor ohne Einbau von Fritten ein verbessertes Wachstum durch eine Verfeinerung der Blasengröße aufgrund des Einbaus von Fritten erreicht werden.

#### 4.5.3.2 pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf

Die Leitfähigkeit als Indikator für die Leistungsfähigkeit der zellulären Ionenaufnahme und der pH-Wert wurden parallel zu dem Wachstumsversuchen im Bioreaktor verfolgt.



**Abb. 35:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach dem Einbau von Fritten

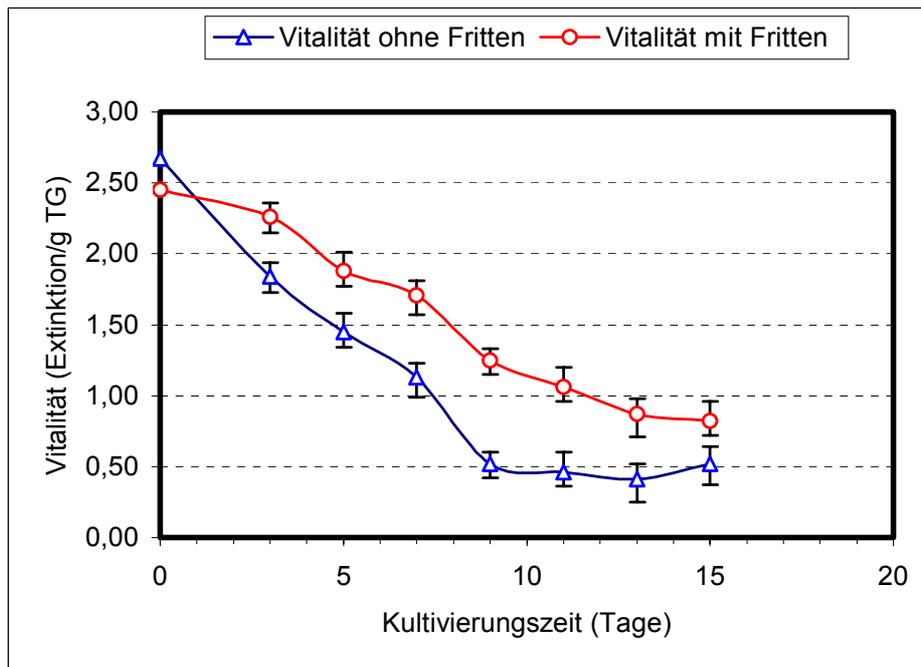
Die Leitfähigkeit des Mediums im Airlift-Bioreaktor ging nach 11 Tagen auf 0,62 mS zurück. Das war der Zeitpunkt, an dem das Wachstum seinen maximalen Wert am Ende der logarithmischen Phase erreichte (Abb. 34). Der pH-Wert stieg langsam zu Mitte der logarithmischen Wachstumsphase auf pH 6,81 an und sank danach auf 6 ab.

Die Versorgung der Pflanzenzellen im Bioreaktor mit Stickstoff wurde durch eine Kombination von Ammonium und Nitratsalzen sichergestellt (McDonald und Jackman, 1989). Das Wachstum in diesen Medien kann eine Änderung des pHs im Medium bewirken, da das verwendete Medium nicht sehr stark gepuffert wurde. Somit stieg der pH-Wert während der logarithmischen Phase leicht an, da die Pflanzenzellen die Salze während ihres Wachstums akkumulierten. Parallel dazu konnte ein Rückgang der

Leitfähigkeit des Mediums festgestellt werden, das sich wiederum auf die Ionenaufnahme durch die Zellen zurückführen läßt.

#### 4.5.3.3 Vitalitätstest

Die Vitalität gibt einen Hinweis auf die Leistungsfähigkeit der Zellen und wurde parallel zum Zellwachstum gemessen.



**Abb. 36:** Vitalitätsvergleich der Sojazzellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor ohne Einbau von Fritten - und nach Einbau von Fritten

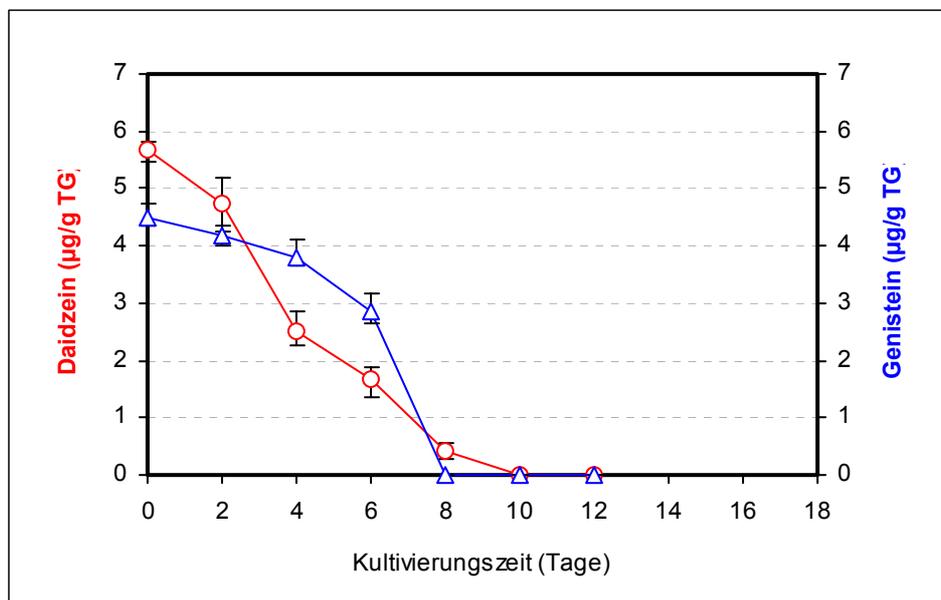
Die Vitalität der Zellkultur in dem konventionell aufgebauten Bioreaktor (ohne Einsatz von Fritten) ging über den Versuchszeitraum stärker zurück als im Versuch nach Einbau der Fritten festzustellen war. Nach 9 Tagen konnte ein über 80 %-iger Verlust der Vitalität nachgewiesen werden. Zwar verlor die Zellkultur nach Einbau von Fritten auch ihre Vitalität, allerdings nicht in demselben Ausmaß. Es wurde ein über 60 %-iger Verlust der Vitalität festgestellt. Interessant dabei war die Tatsache, daß die Vitalität der Zellkultur in jeder Wachstumsphase bei dem Versuchsaufbau mit Fritten der Vitalität bei dem Versuch ohne Einbau von Fritten überlegen war. Die mitochondriale Aktivität, dargestellt durch die gemessene Vitalität (Enikeev *et al.*, 1995), wurde demnach aufgrund des Einbaus von Fritten und somit durch die Optimierung der Blasengröße verbessert. Insgesamt mußte allerdings festgestellt werden, daß während der gesamten Kultivierung wiederum die Vitalität der Zellkultur abnahm. Im Schüttelkolben zeigten dagegen die Kulturen während der logarithmischen Phase

einen starken Anstieg der Vitalität (Abb. 14). Dies wird vermutlich auf die im Vergleich zum Bioreaktor wesentlich schwächeren Scherkräfte im Schüttelkolben aufgrund des beschriebenen Volumeneffektes zurückzuführen sein. Lebenswichtige Proteine und Stoffe des primären Stoffwechsels könnten aufgrund hoher Scherkräfte freigesetzt worden sein, was zum Vitalitätsverlust führte.

#### 4.5.3.4 Isoflavonoidbiosynthese der Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten

Die Regulierung der Blasengröße durch den Einbau von Fritten auf dem Begaserring des Bioreaktors sollte sich positiv auf die Isoflavonoidbiosynthese auswirken. Es war durch eine visuelle Beobachtung eine deutliche Reduzierung der Blasengröße aufgrund des Einbaus von Fritten erkennbar. Die Überprüfung der Blasengröße fand in definierten Abständen während der Kultivierung der Zellkulturen im Bioreaktor statt.

Die Konzentrationen der verschiedenen Isoflavonoide wurden über eine Kultivierungszeit von 12 Tagen verfolgt.

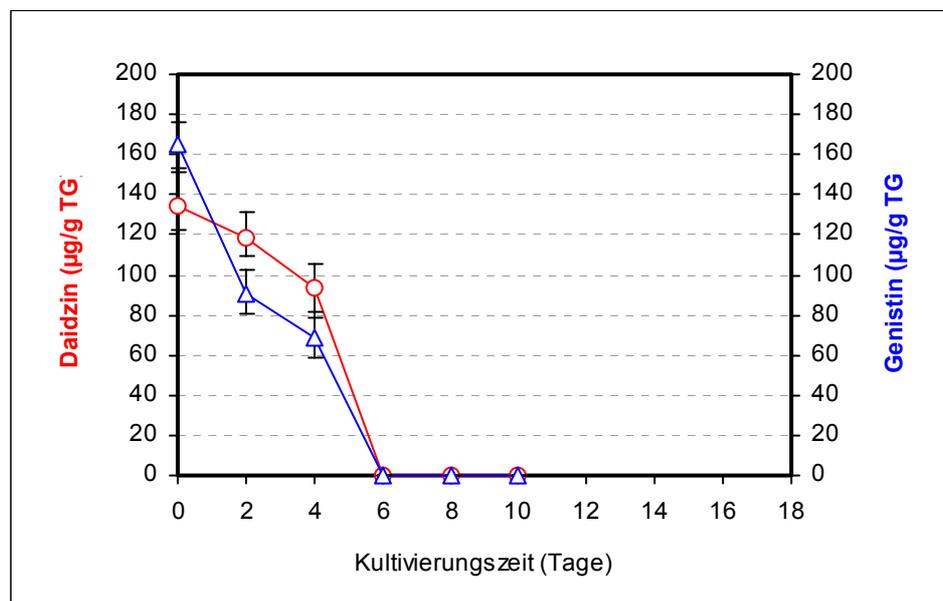


**Abb. 37:** Daidzein- und Genisteinkonzentration im Airlift-Bioreaktor während der Wachstumsphase nach Einbau von Fritten (ohne manuelle Belüftungsregulierung (siehe Abb. 39)

Die Genisteinkonzentration sank kontinuierlich während der gesamten Kultivierungszeit ab. Nach einer Fermentationszeit von ca. 1 Woche konnte fast kein Genistein

mehr festgestellt werden. Ein noch stärkerer Rückgang zeigte die Daidzeinkonzentration. Bis zum 10. Tag sank der Daidzeingehalt gegen 0  $\mu\text{g/g}$  TG ab. Auch danach konnte fast kein Daidzein im Airlift-Bioreaktor mehr nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den erhaltenen Isoflavonoidkonzentrationen bei dem Versuch vor Einbau der Fritten zeigte sich eine geringfügige Zunahme der aglykonen Isoflavonoide. Dies lässt sich auf die verbesserte Vitalität der Pflanzenzellkultur aufgrund des Einbaus von Fritten zurückführen.



**Abb. 38:** Daidzin- und Genistinkonzentration im Airlift-Bioreaktor während der Wachstumsphase nach Einbau der Fritten (ohne manuelle Belüftungsregulierung (siehe Abb. 39))

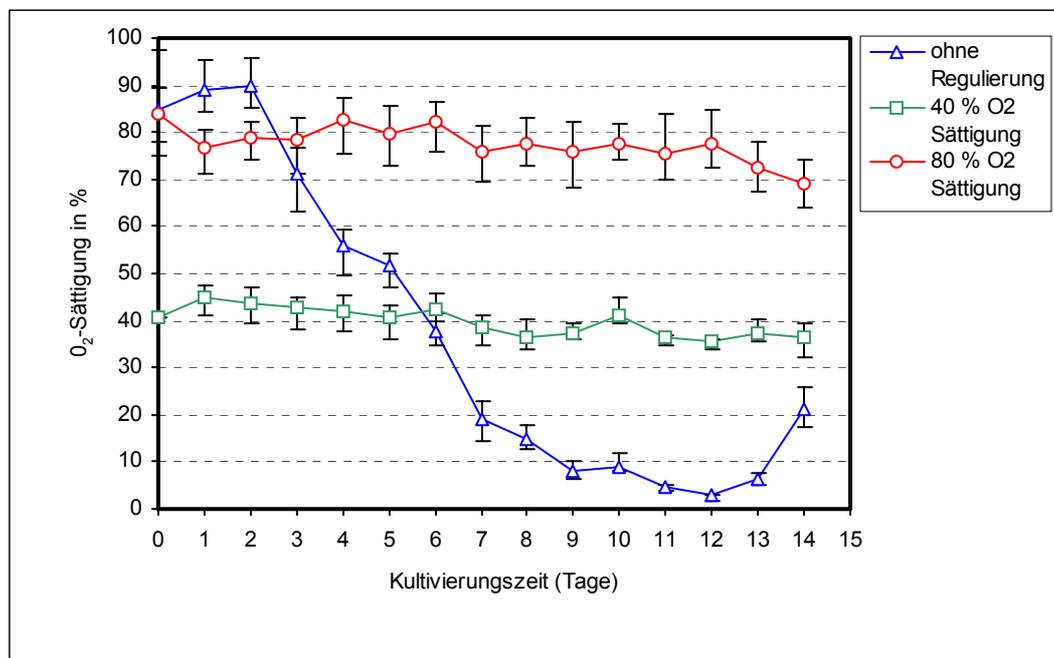
Sowohl die Genistin- als auch die Daidzinkonzentration sanken sehr stark nach Animpfung im Airlift-Bioreaktor ab. Dabei war der Rückgang an Genistin noch etwas stärker als bei Daidzin ausgeprägt. Am 6. Fermentationstag konnten keine der beiden  $\beta$ -glykosidischen Formen der Isoflavonoide mehr nachgewiesen werden. Ein Anstieg der Konzentrationen war in der anschließenden Kultivierungszeit nicht festzustellen.

Entgegengesetzt zu den Bioreaktorversuchen ohne Einbau von Fritten ging die Genistinkonzentration im Airlift-Bioreaktor langsamer zurück. Ab dem 6. Tag konnte kein Genistin mehr festgestellt werden. Auffallend ist, daß die Zellkultur nach 2 Tagen Fermentationszeit im Airlift-Bioreaktor über ein Drittel mehr Genistin enthält als in den

Versuchen im Bioreaktor ohne Einbau von Fritten. Die Daidzinkonzentration ging in einem ähnlichen Ausmaß wie bei Genistin zurück. Am 6. Tag konnte Daidzin nur noch in Spuren gemessen werden. Im Vergleich zu den Versuchen ohne Einbau von Fritten konnte hier eine erhöhte Konzentration an Genistin und Daidzin nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte daher festgestellt werden, daß der Rückgang der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoiden durch den Einbau von Fritten verlangsamt werden konnte (siehe auch Abb. 60). Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Reduzierung der Scherkräfte aufgrund einer Verfeinerung der Blasengröße im Begasungssystem des Airlift-Bioreaktors. Im Kapitel 4.9 werden zusammenfassend weitere Erklärungen zu möglichen Ursachen des Isoflavonoidkonzentrationsrückgangs diskutiert.

#### 4.5.4 Optimierung des partialen $O_2$ -Partialdruckes während der Fermentation im Airlift-Bioreaktor

Eine optimale Sauerstoffversorgung der ausgebildeten Zellaggregate im Bioreaktor ist einer der zentralen Parameter zur Sicherstellung einer erhöhten Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Daher wurde die  $O_2$ -Konzentration im Medium des Bioreaktors auf unterschiedliche  $O_2$ -Partialdrücke reguliert.



**Abb. 39:** Prozentuale  $O_2$ -Konzentration des Kulturmediums im Airlift-Bioreaktor ohne Regulierung der Belüftung (bei 0,4 bar Anfangsregulierung), bei einer manuellen Regulierung der Belüftung (zw. 0,25 und 0,3 bar) auf 40 %  $\pm$  5 % Sauerstoffsättigung und bei einer manuellen Regulierung (zw. 0,5 und 0,6 bar) auf 80 %  $\pm$  5 % Sauerstoffsättigung

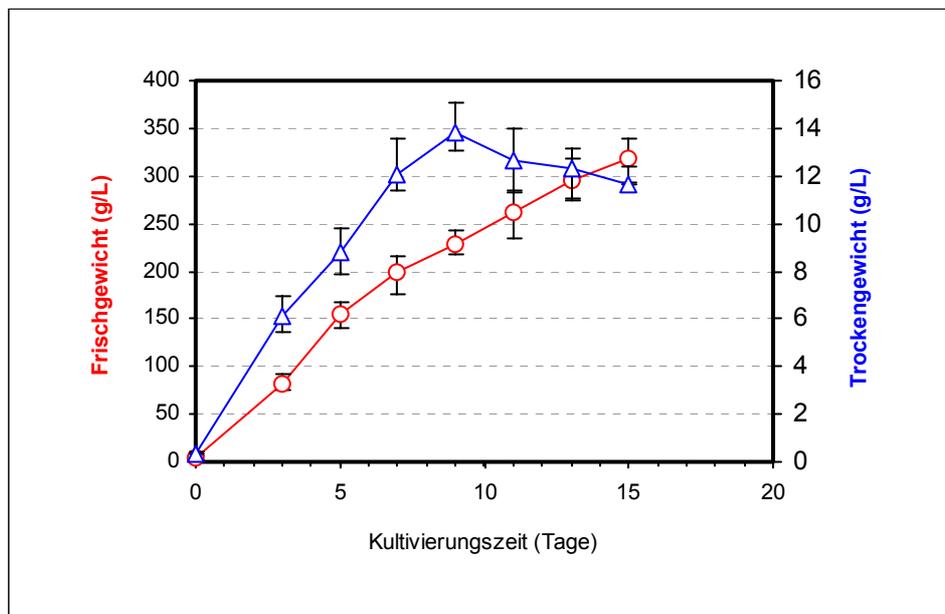
Bei dem zunächst durchgeführten Versuch ohne Belüftungsregulierung bei alleinigem Einbau von Fritten änderte sich die gelöste O<sub>2</sub>-Konzentration in den ersten 2 Tagen kaum. Ab dem 2. Fermentationstag wurde einen Rückgang der gelösten O<sub>2</sub>-Konzentration im Airlift-Bioreaktor festgestellt, der sich fast bis zur 0 % O<sub>2</sub>-Konzentration am 12. Tag fortsetzte. Dies ist auf den erhöhten Sauerstoffverbrauch durch die wachsende Zellkulturen zurückzuführen. Die gelöste Sauerstoffkonzentration wurde 2 Wochen bei 40 % (+/- 5) Sauerstoffsättigung durch manuelle Belüftungsregulierung konstant gehalten. Sie fluktuierte nur geringfügig um 40 % Sauerstoffsättigung. Es wurde allerdings beobachtet, daß durch die geringere Bewegung im Bioreaktor keine homogene Mischung der Zellkulturen gewährleistet werden konnte. Die Zellen setzten sich im Bioreaktor am Gefäßboden ab. Es kam somit aufgrund der hohen Zelldichte zu einer Bildung von Totzonen im Airlift-Bioreaktor, die zu einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff und anderen essentiellen Nährstoffen im Medium führten. Zusätzlich bestand ein Problem in dem Anhaften der Zellen auf den Gefäßoberflächen, die nicht vom Medium erreicht werden und somit keine Nährstoffe erhalten können. Gerade diese Zelladhäsion an Oberflächen kann bei der Kultivierung von Pflanzenzellen beobachtet werden, in den Gasblasen Verwendung finden (Payne *et al.*, 1991).

Eine erhöhte manuelle Sauerstoffregulierung hielt eine 80 %-ige Sauerstoffsättigung über den gesamten Versuchszeitraum aufrecht. Durch die zellbewegende Belüftung wurde zusätzlich eine starke Durchmischung der Zellkulturen im Bioreaktor gewährleistet und Totzonen konnten vermieden werden. Dies hatte zur Folge, daß eine Zellabsetzung am Gefäß nicht beobachtet wurde. Die kritische Gelöstsauerstoffkonzentration liegt zwar allgemein für Pflanzenzellen bei 20 % Sättigung, welches aber für verschiedene Spezies variieren kann (Doran, 1993). Eine Sauerstoffsättigung in diesem Ausmaß würde aber die hier erwähnte Problematik der heterogene Zelldurchmischung mitverursachen. Die Zellen konnten in den durchgeführten Versuchen bei einer 80 %-igen O<sub>2</sub>-Sättigung während der gesamten Kultivierungszeit zufriedenstellend mit Sauerstoff versorgt werden. Daher wurde in den folgenden Experimenten zur Optimierung der Isoflavonoidbiosynthese eine Sauerstoffregulierung auf 80 % O<sub>2</sub> durchgeführt.

Sauerstoff ist der terminale Elektronenakzeptor in der oxidativen Phosphorylierung und spielt eine kritische Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen. In vielen Pflanzenzellen gibt es Parallelen zwischen Sauerstoffmangel und einem reduzierten Level an ATP (Saglio *et al.*, 1983), welches für den Stoffwechsel von Bedeutung ist. Allerdings ist O<sub>2</sub> auch als Substrat von Oxygenasen an verschiedenen Biosynthesewegen von Sekundärmetaboliten beteiligt (Butt und Lamb 1981). Shirsat und Nair (1981) beschrieben schon sehr früh die geringere Aktivität von PAL bei einem reduzierten Sauerstofflevel bei *Potato tuber*. Dies könnte auf eine Akkumulation der Zimtsäure, ein durch PAL katalysiertes Folgeprodukt von Phenylalanin innerhalb des Phenylpropanoidweges (Dörnenburg und Knorr, 1996), bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen zurückzuführen sein. Somit ist eine gute Sauerstoffversorgung zur Sicherstellung der hohen metabolischen Aktivität der Zellen von großer Wichtigkeit und stellt gleichzeitig eine Herausforderung an der Umsetzung im Scale-up Maßstab, gerade im Hinblick auf die Löslichkeit des Sauerstoffs im Medium, dar. Dies sollte hier mit dem Einbau von Fritten begegnet werden. Daher wurde der Einfluß eines unterschiedlichen O<sub>2</sub>-Partialdruckes auf die Zellen und insbesondere ihre Isoflavonoidbiosynthese in den weiteren Versuchen untersucht.

#### 4.5.4.1 Wachstumscharakterisierung der Sojazellkultur *Glycine max* im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm 5$ ) O<sub>2</sub>-Sättigung

Das Wachstumsverhalten der Pflanzenzellkulturen wurde bei 80 %-iger O<sub>2</sub>-Sättigung bestimmt, um den Einfluß einer optimierten O<sub>2</sub>-Versorgung mit Hilfe von Fritten auf die Physiologie der Zellen zu untersuchen.



**Abb. 40:** Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkultur im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm 5$ ) O<sub>2</sub>-Sättigung mit Hilfe von Fritten.

Das Trockengewicht stieg gleichmäßig bis zum 9. Tag an und erreichte dort seinen maximalen Punkt mit 13,80 g/L. Ab dem 9. Tag konnte ein leichter Rückgang des Trockengewichtes festgestellt werden. Die Sojazellkulturen wuchsen im Airlift-Bioreaktor bei 80 %-iger O<sub>2</sub>-Regulierung im Vergleich zu dem Wachstumsverlauf ohne O<sub>2</sub>-Regulierung (nur mit Fritteneinbau) schneller und erreichten eher die stationäre Phase (Abb. 34). Mit Hilfe der O<sub>2</sub>-Regulierung zeigten die Zellen ihr maximales Wachstum nach 9 Tagen; dagegen wurde das höchste Wachstum ohne O<sub>2</sub>-Regulierung erst nach 11 Tagen erreicht. Die bessere Sauerstoffversorgung aufgrund der O<sub>2</sub>-Regulierung scheint daher das Wachstum der Pflanzenzellkultur zu begünstigen.

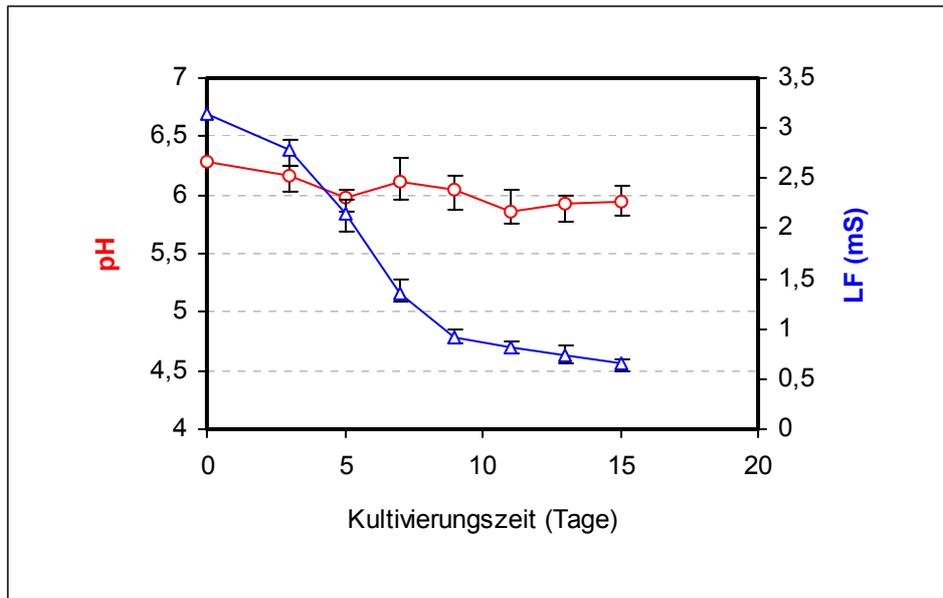
Die Belüftung zur Erreichung einer 80 %-igen O<sub>2</sub>-Sättigung im Bioreaktor hatte zusätzlich den positiven Effekt, daß eine wesentlich bessere Durchmischung des Mediums erreicht werden konnte. Dies war insbesondere positiv zu beurteilen, da mit hohen Zelldichten gearbeitet wurde (zwischen 200-350 kg/m<sup>3</sup>). Bei geringen Zelldichten bietet der Airlift-Fermenter aufgrund des geringen Sauerstoffbedarfs von

Pflanzenzellen, wie bereits oben erwähnt (die kritische Gelöstsauerstoffkonzentration liegt zwischen  $1,3-1,6 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m}^3$ , was einer Sättigung von ca. 20 % entspricht), eine ausreichende Mischung und einen zufriedenstellenden Massentransfer bei vergleichsweise geringen Scherkräften. Bei höheren Zelldichten, die wegen der geringen Produktionsraten der Sekundärmetabolite für eine kommerzielle Nutzung nötig wären (ca.  $100 \text{ kg/m}^3$ ), ist dies nicht mehr gegeben. Es kommt zur Bildung von Totzonen durch eine behinderte Flüssigkeitszirkulation. Die Mischzeiten verlängern sich, so daß es zur Ausbildung von Sauerstoffgradienten kommt (Buchholz, 1998).

Bei der Kultivierung der pflanzlichen Zellkulturen sind gewohnte verfahrenstechnische Reaktorprobleme der Hydrodynamik, des Mischens und des Massentransports (insbesondere Sauerstofftransport) gekoppelt mit der Scherempfindlichkeit und Aggregatbildung, sowie der Bildung Nicht-Newtonscher Fluide bei relativ geringer Zelldichte. Zusätzlich wird die Fermentation durch wenig vorhandenes Wissen über die erforderlichen Bedingungen zur Synthese der Sekundärmetaboliten erschwert (Doran, 1993). Es ist allerdings noch zu untersuchen, inwieweit die durch die  $\text{O}_2$ -Belüftung resultierenden erhöhten Scherkräfte auf die Biosynthese der Isoflavonoide der Pflanzenzellkultur wirken.

#### **4.5.4.2 pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf**

Es wurden die beiden Parameter pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf während der Kultivierung der Pflanzenzellen gemessen, um weitere Anhaltspunkte zur Wirkung der Einstellung auf 80 %  $\text{O}_2$ -Sättigung im Medium auf die Zellen zu erhalten.

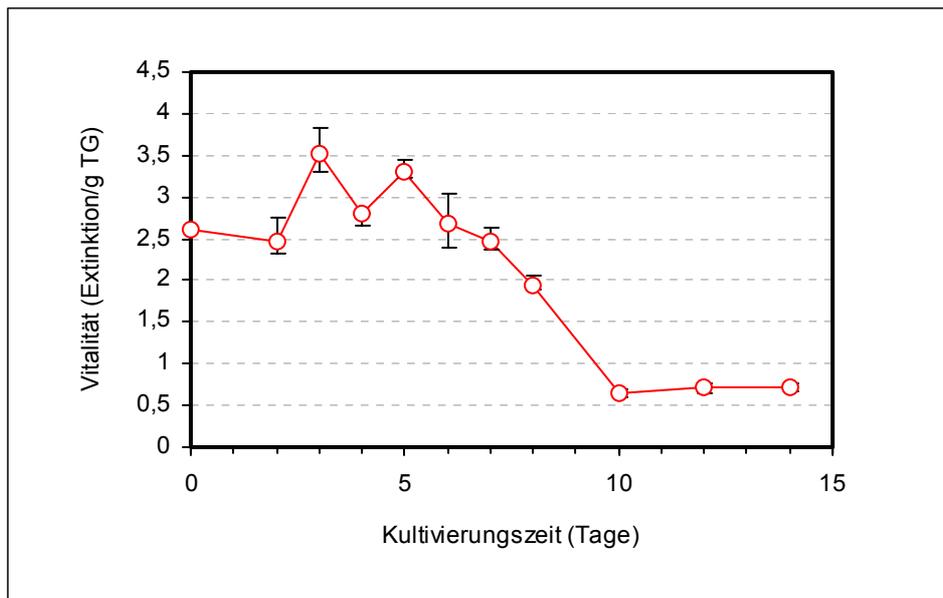


**Abb. 41:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm 5$ )  $O_2$ -Sättigung

Der pH-Wert änderte sich während der Fermentation der Soja-Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor kaum und schwankte um den Wert 6,0. Die Leitfähigkeit sank in den ersten 3 Tagen auf 2,78 mS. Ab dem 3. Versuchstag bis zum 9. Tag ging sie stark auf 0,92 mS zurück. Danach wurde nur noch ein leichter Rückgang der Leitfähigkeit auf 0,5 mS gemessen. Dieser Rückgang der Leitfähigkeit zeigte keine größere Änderung zur Messung der Leitfähigkeit ohne Belüftungsregulierung (Abb. 35) und resultierte aus der Aufnahme von Salzionen aus dem Medium durch die Zellen.

#### 4.5.4.3 Vitalitätstest

Die Vitalität als Indikator für mitochondriale Aktivität der Zellen wurde über 14 Tage im Medium nach Einstellen des  $O_2$ -Partialdruckes auf 80 % bestimmt.

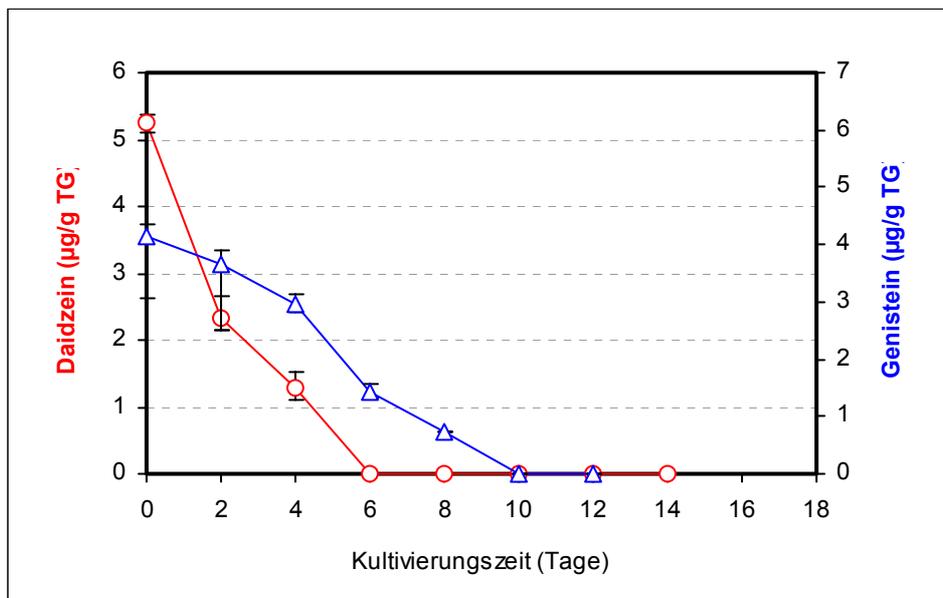


**Abb. 42:** Vitalität der Sojazzellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm$  5)  $O_2$ -Sättigung

Die Vitalität der Sojazzellkultur erhöhte sich in der 1. Kultivierungswoche zwischen 20 und 30 %. Danach verloren die Zellen schnell ihre Vitalität, die allerdings ab dem 10. Kultivierungstag relativ konstant bei 0,6 Extinktion/g TG blieb. Im Vergleich zu den Versuchen im Bioreaktor mit Einbau von Fritten ohne Belüftungsregulierung auf 80 % Sauerstoffsättigung zeigte sich hier ein deutlicher Anstieg der Vitalität der Zellen in der 1. Untersuchungswoche um bis zu 70 %. Der Vergleich zu den Untersuchungen an Zellen ohne Belüftung und ohne Einbau von Fritten bestätigte diese Messungen, hier konnte sogar eine Verdopplung der Vitalität innerhalb der ersten 7 Kultivierungstage festgestellt werden (Abb. 36). Die erhöhte Sauerstoffzufuhr auf 80 %  $O_2$ -Partialdruck bewirkte somit einen starken Anstieg der respiratorischen Leistungsfähigkeit der Zellen, welches wahrscheinlich auf eine bessere Bereitstellung von Sauerstoff für die Elektronentransportkette in den Mitochondrien zurückzuführen ist. Dennoch darf nicht übersehen werden, daß die Vitalität ab dem 5. Tag kontinuierlich zurückging. Scherkräfte verstärkten hierbei die Verlangsamung der physiologischen Aktivität der Zellen bei dem Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase. Im Kapitel 4.9 werden zusammenfassend weitere Erklärungen zu möglichen Ursachen des Vitalitätsrückgangs diskutiert.

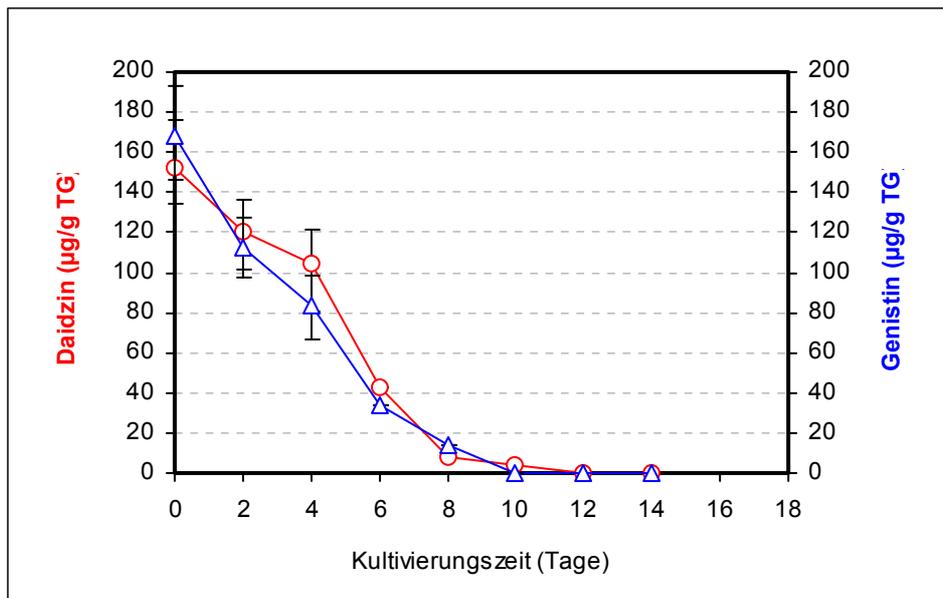
#### 4.5.4.4 Konzentrationsbestimmung der Isoflavonoide

Aufgrund der Ergebnisse des Wachstumsverlaufs und der Vitalität der Zellen schien eine Anregung der Isoflavonoidbiosynthese durch eine Belüftungsregulierung mit Hilfe von Fritten möglich. Dies sollte in Untersuchungen mit Hilfe der HPLC-Technik überprüft werden.



**Abb. 43:** Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der manuellen Regulierung der Belüftung auf 80 % ( $\pm$  5)  $O_2$ -Sättigung mit Hilfe von Fritten

Auch bei der Regulierung des partiellen  $O_2$ -Druck auf 80 % ging die Ausgangskonzentrationen von Daidzein und Genistein nach 2 Tagen zurück. Im Vergleich zu Daidzein war die Abnahme der Genistein langsamer. Nach 10 Tagen konnte kein Daidzein bzw. Genistein mehr nachgewiesen werden. Verglichen mit den Isoflavonoiduntersuchungen ohne Einbau von Fritten und ohne Belüftungsregulierung (Abb. 31 und 37) war keine erhöhte Isoflavonoidbiosynthese während der Kultivierung erkennbar. Sowohl die Bildung der Isoflavonoide als auch die Nachweisdauer im Bioreaktor zeigte keine signifikante Überlegenheit des Einbaus von Fritten und der Belüftungsregulierung.



**Abb. 44:** Genistin- und Daidzinkonzentration nach der manuellen Regulierung der Belüftung bei 80 % ( $\pm$  5)  $O_2$ -Sättigung

Der Verlust der Ausgangskonzentration von Daidzin und Genistin konnte auch durch eine  $O_2$ -Regulierung nicht verhindert werden. Die Zellkultur baute beide Isoflavonoide innerhalb von 8 Tagen fast vollständig ab. Am 12. Inkubationstag konnten sie nicht mehr nachgewiesen werden. Es war jedoch hier auffällig, daß noch beide  $\beta$ -glykosidische Isoflavonoide nach 10 Tagen in geringen Konzentrationen nachweisbar waren. Im Vergleich dazu ergaben die Versuche mit alleinigem Einbau von Fritten zu diesem Zeitpunkt keine messbaren Konzentrationen beider Isoflavonoide (Abb. 38). Der Rückgang der Daidzinkonzentration zeigte Parallelen zu dem Verlauf der Genistinkonzentrationskurve. So konnten im Bioreaktor bis zum 10. Tag noch beide  $\beta$ -glykosidische Isoflavonoide nachgewiesen werden. Dies war eine Ausweitung der Nachweisbarkeit dieser Isoflavonoide um 4 Tage gegenüber den Bioreaktorversuchen, die nach alleinigem Einbau von Fritten durchgeführt wurden (Abb. 38).

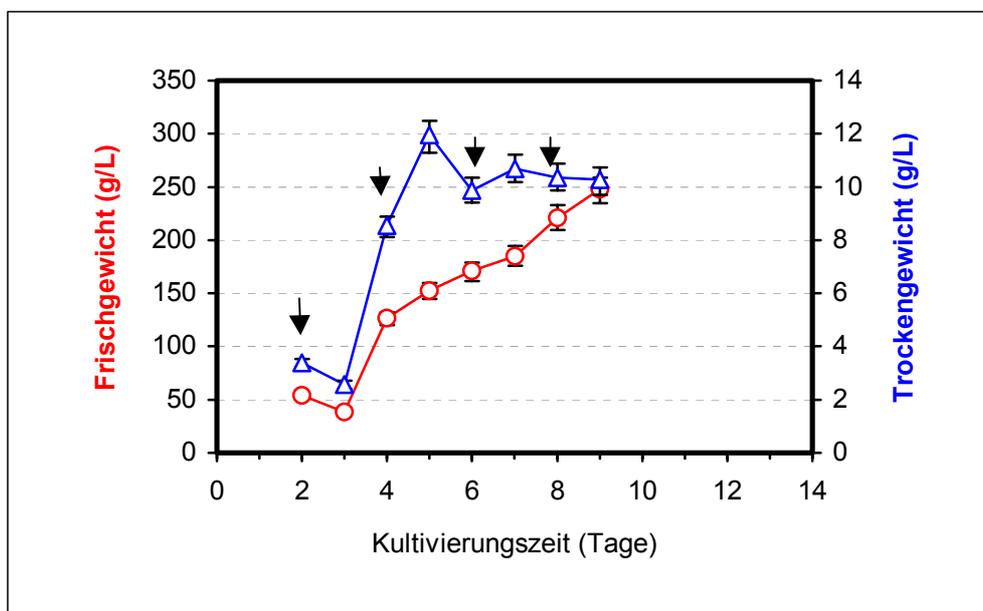
Die Regulierung auf einen 80 %-igen  $O_2$ -Partialdruck im Medium des Bioreaktors zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Isoflavonoidbiosynthese. Es konnte allerdings sowohl eine Erhöhung der Genistin- und Daidzinkonzentration gemessen als auch die Nachweisbarkeit der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide um 4 Tage beobachtet werden (siehe Abb. 60). In den folgenden Versuchen sollte Hochspannung und der Elicitor Methyljasmonat die Isoflavonoidbiosynthese anregen, deren positive Effekte auf die Isoflavonoidbildung bereits im Kapitel 4.3 und 4.4 dargestellt wurde.

## 4.6 Hochspannungsimpulsbehandlung (HSI) im Airlift-Bioreaktor

Zunächst sollte der Einfluß von HSI auf das Wachstum und die Isoflavonoid-biosyntheseleistung der Pflanzenzellen von *Glycine max* untersucht werden. Die Induktion der Sekundärmetabolitsynthese in pflanzlichen Zellen kann in einem Airlift-Bioreaktor durchgeführt werden, in dem koaxial angeordnete Elektroden integriert sind. Es ist möglich in jeder Wachstumsphase der Zellkulturen die erforderliche Impulsenergie zuzuführen (Heinz *et al.*, 2000). Dadurch wurden die Zellen einem Streß ausgesetzt mit der Erwartung, daß durch eine geeignete Zellantwort die Biosynthese der Sekundärmetabolite angeregt wird.

### 4.6.1 Wachstumscharakterisierung von *Glycine max* nach Einsatz von HSI

Die Zellkulturen wurden im Bioreaktor über 9 Tage an verschiedenen Zeitpunkten einer Hochspannung von 1600 Volt über jeweils 12 s ausgesetzt und ihr Wachstumsverhalten beobachtet. Diese Spannung erwies sich als optimal, um eine elicitierende Wirkung zu erzielen, wie bereits im Kapitel 4.3 bei den Batchversuchen dargestellt. Das Medium wurde mit Hilfe von Fritten auf 80 % O<sub>2</sub>-Partialdruck eingestellt und während des Versuchs konstant gehalten.



**Abb. 45:** Wachstum von *Glycine max* Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung mit 1600 Volt am 2., 4., 6., und 8. Tag (Pfeilmarkierung)

Das Trockengewicht sank nach 2 Tagen leicht ab, stieg dann aber bis zum 5. Tag sehr stark an. Es wurde an diesem Tag 11,96 g/L Trockengewicht gemessen, was eine Steigerung des Trockengewichts um über 400 % im Vergleich zum 3. Tag bedeutete. Dies war die größte Steigerung in einem Zeitraum von nur 2 Tagen, die bisher bei allen Wachstumsuntersuchungen gemessen wurde. Nach dem 6. Meßtag ging das TG leicht auf 10 g/L zurück und änderte sich nur noch geringfügig bis zum 9. Versuchstag. Ein Vergleich zu den Bioreaktorversuchen mit Einbau von Fritten - allerdings ohne HSI-Anwendung - legte dar, daß hier die Zellen ihr Trockengewichtmaximum 6 Tage früher erreichten (Abb. 34). Der Vergleich zeigte außerdem, daß bei diesem Versuch nach dem 1. HSI-Impuls am 2. Tag das Wachstum der Pflanzenzellen nach kurzer Adaptionsphase durch die angelegte Hochspannung wesentlich gesteigert werden konnte.

#### 4.6.2 pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf

Der HSI-Einfluß auf pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf wurde während der Kultivierung der Pflanzenzellen im Bioreaktor über 9 Tage untersucht.



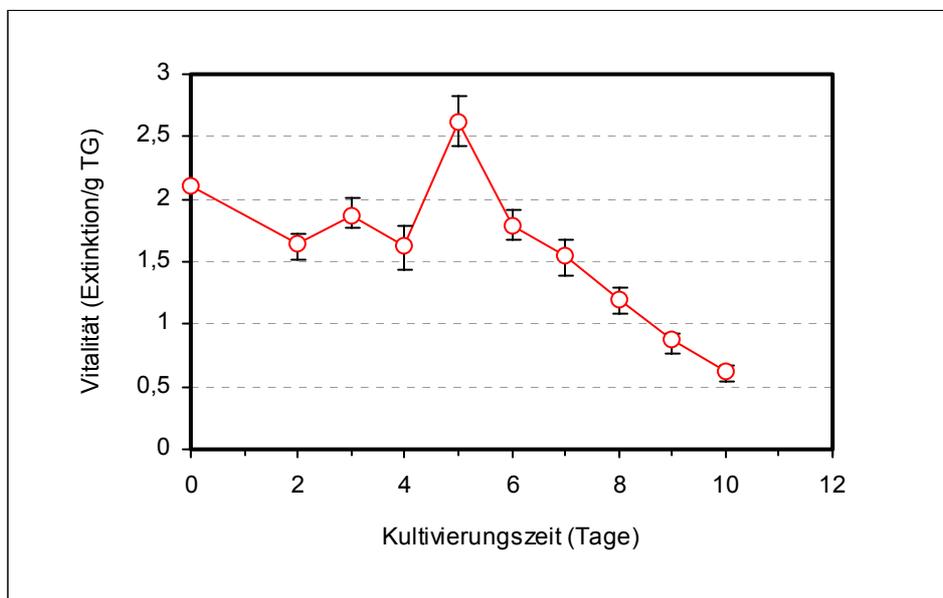
**Abb. 46:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung am 2., 4., 6., und 8. Tag

Die pH-Werte zeigten einen ähnlichen Verlauf wie bei dem Versuch im Bioreaktor mit Einbau von Fritten ohne HSI (Abb. 35). Der pH-Wert schwankte um 6, nach 5 Tagen

wurde eine geringfügige Erhöhung des pHs festgestellt. Ein Einfluß von HSI auf den pH-Wert war nicht erkennbar. Die Leitfähigkeit ging nach 9 Tagen von ca. 3 mS auf 1 mS zurück, wie bereits in dem Versuch im Bioreaktor mit Einbau von Fritten ohne HSI festzustellen war. Die Plateaus im Leitfähigkeitskurvenverlauf kamen durch die Probenentnahme an den Tagen der HSI-Behandlung zustande.

#### 4.6.3 Vitalitätstest

Der Einfluß der HSI-Behandlung auf die Vitalität der Pflanzenzellkultur im Airlift-Bioreaktor wurde über 10 Tagen während des Wachstums untersucht.



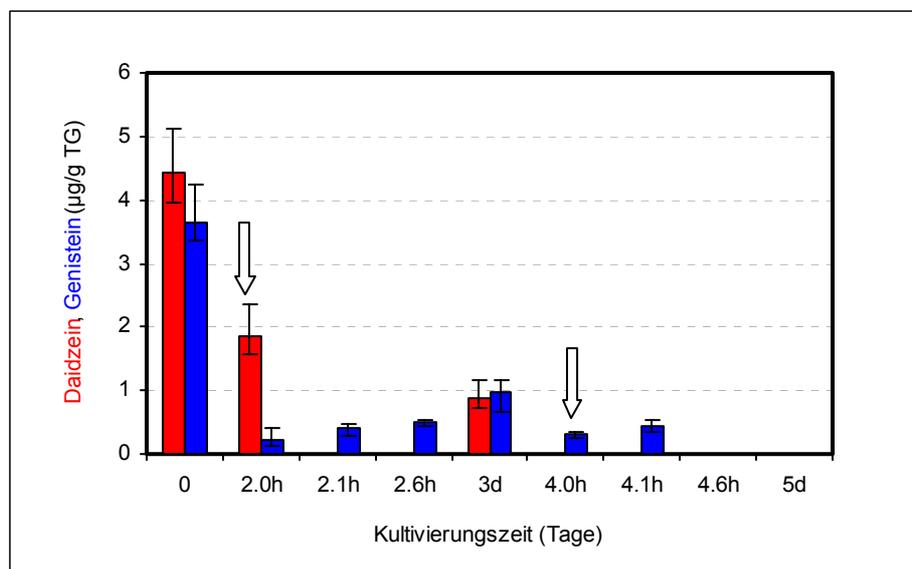
**Abb. 47:** Vitalität der Sojazzellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung

Die Kultur verlor ca. ein Viertel ihrer Vitalität innerhalb der ersten beiden Tage. Nach der 1. HSI-Behandlung am 2. Tag erhöhte sich die Vitalität der Zellkultur von 1,65 Extinktion/g TG auf 1,87 Extinktion/g TG. Ein wesentlich stärkerer Anstieg der Vitalität wurde nach der 2. HSI-Behandlung beobachtet. Hierbei erhöhte sich die Vitalität am 5. Tag um ca. 60 % und sank anschließend am 10. Tag auf ein Viertel der anfänglichen Zellkulturvitalität. Die hier durchgeführten Untersuchungen mit HSI ergaben im Vergleich zu den Versuchen im Bioreaktor ohne HSI und mit Einbau von Fritten (Abb. 36) eine höhere Vitalität. So sank die Vitalität dort kontinuierlich während des

Versuchszeitraumes ab, während sie hier nach der 1. und 2. HSI-Behandlung signifikant bis zu 30 % anstieg.

#### 4.6.4 Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach HSI-Behandlung im Airlift-Bioreaktor

Die Bildung der Isoflavonoide könnte durch die höheren Vitalitätswerte im Airlift-Bioreaktor positiv beeinflusst werden. Der Einfluß der HSI-Behandlungen auf die Isoflavonoidkonzentrationen sollte daher am 2. und 4. Tag während der Kultivierung im Bioreaktor bei 80 %-igem O<sub>2</sub>-Partialdruck untersucht werden.

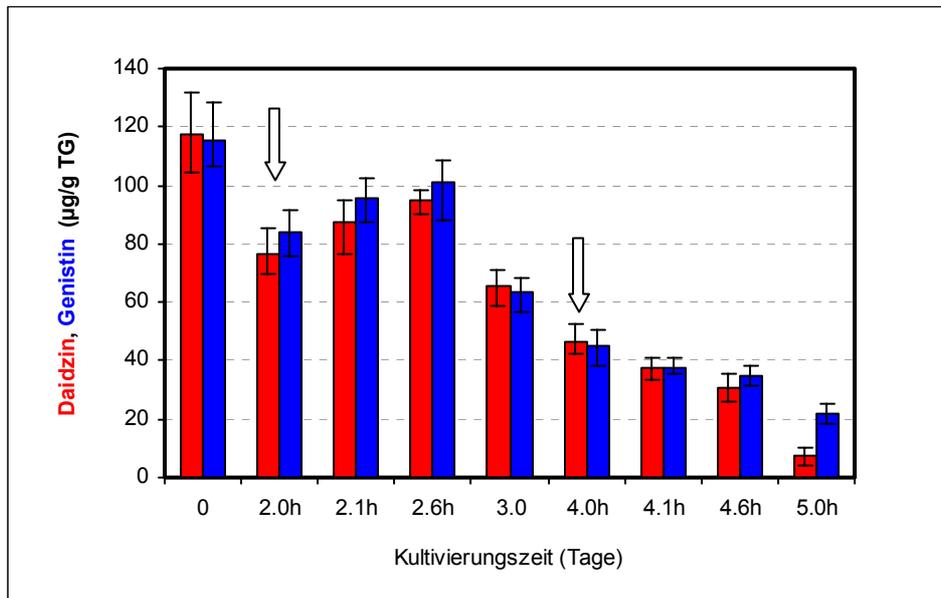


**Abb. 48:** Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor bei Einstellung eines 80 %-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck. Ein Hochspannungsimpuls wurde an dem 2. und dem 4. Tag (2.0h und 4.0h) appliziert (Pfeilmarkierung). Die Untersuchungen fanden nach dem folgenden Zeitplan statt (d= Tag, h: Stunde, danach gilt: 2.1h= nach 2 Tage und einer Stunde):

- 2.0: Kontrolle vor der 1. HSI-Behandlung
- 2.1h: 1 Stunde weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 2.6h: 6 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 3d: 24 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 4.0: 4 Tage Kultivierung, Kontrolle vor der 2. HSI-Behandlung
- 4.1h: 1 Stunde weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 4.6h: 6 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 5d: 24 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor

Die Zellkultur verlor ca. 50 % ihrer Daidzeinkonzentration innerhalb der ersten beiden Tage. Nach dem 1. Hochspannungsimpuls konnte sowohl nach 1 Stunde als auch nach 6 Stunden kein Daidzein mehr in der Zellkultur nachgewiesen werden. An dem 3. Versuchstag vor der 2. HSI-Behandlung wurde Daidzein nur noch in Spuren gemessen. Danach konnte wiederum kein Daidzein mehr festgestellt werden. Die HSI-Behandlung zeigte insgesamt keinen positiven Effekt auf die Daidzeinbildung. Der Einfluß der HSI-Behandlung auf die Genisteinbildung im Airlift-Bioreaktor war ähnlich negativ wie bei Daidzein. Die Genisteinkonzentration sank innerhalb von 2 Tagen von 3,65 µg/g TG auf 0,22 µg/g TG. Die Messungen nach einer und 6 Stunden nach der 1. HSI-Behandlung zeigten eine leichte Erhöhung der Genisteinkonzentration. Nach der 2. HSI-Behandlung am 4. Tag war allerdings nach 6 Stunden Genistein nur noch in Spuren nachzuweisen.

Im Vergleich zu den Bioreaktorversuchen ohne HSI (Abb. 43) zeigte sich hier ein deutlicher Rückgang der aglykonen Isoflavonoide. Bei allen Meßpunkten wurde in diesem Versuch eine geringere Isoflavonoidkonzentration nachgewiesen. Der Einsatz von HSI bewirkte keinen positiven Effekt auf die Bildung der aglykonen Isoflavonoide.



**Abb. 49:** Genistin- und Daidzinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor bei Einstellung eines 80 %-igen  $O_2$ -Partialdruck. Ein Hochspannungsimpuls wurde an dem 2. und dem 4. Tag (2.0h und 4.0h) appliziert (Pfeilmarkierung). Die Untersuchungen fanden nach dem oben genannten Zeitplan statt.

Zunächst ging der Genestingehalt am 2. Tag von 116  $\mu\text{g/g TG}$  auf 84,3  $\mu\text{g/g TG}$  zurück. Allerdings konnte nachfolgend die 1. HSI-Behandlung die Genistinkonzentration eine Stunde nach der Behandlung um mehr als 10 % erhöhen (2.1h). Eine weitere Erhöhung um insgesamt 20 % gegenüber 2.0h wurde 6 Stunden nach der 1. HSI-Behandlung erreicht. Danach gingen die Genistinkonzentrationen deutlich zurück. Bei 3.0h und 6 Stunden nach der 2. HSI-Behandlung wurde noch ein Viertel des Genistins gemessen. Die 2. HSI-Behandlung zeigte keinen positiven Effekt auf die Genistinbildung. Allerdings bewirkte die 1. HSI-Applikation eine leichte Steigerung der Biosynthese von Genistin. Die Daidzinkonzentration ging innerhalb von 2 Tagen um ca. 35 % zurück. Allerdings konnte nach der Anwendung des 1. Hochspannungsimpulses der Daidzingehalt leicht erhöht werden. Ein deutlicher Anstieg um ca. 33 % wurde 6 Stunden nach der 1. HSI-Behandlung festgestellt. Die 2. Applikation der Hochspannung bewirkte keinen positiven Effekt auf die Daidzinbildung.

Im Vergleich zu den Bioreaktorversuchen ohne HSI (Abb. 44) bewirkte der Hochspannungsimpuls insgesamt einen Rückgang der sekundären Isoflavonoide, der

allerdings nicht so ausgeprägt war, wie bei den Versuchen mit den primären Isoflavonoiden erkennbar. Zudem konnte sowohl bei Daidzin als auch bei Genistin eine deutliche, wenn auch vorübergehende, Induktion der Biosynthese nach dem 1. Hochspannungsimpuls festgestellt werden.

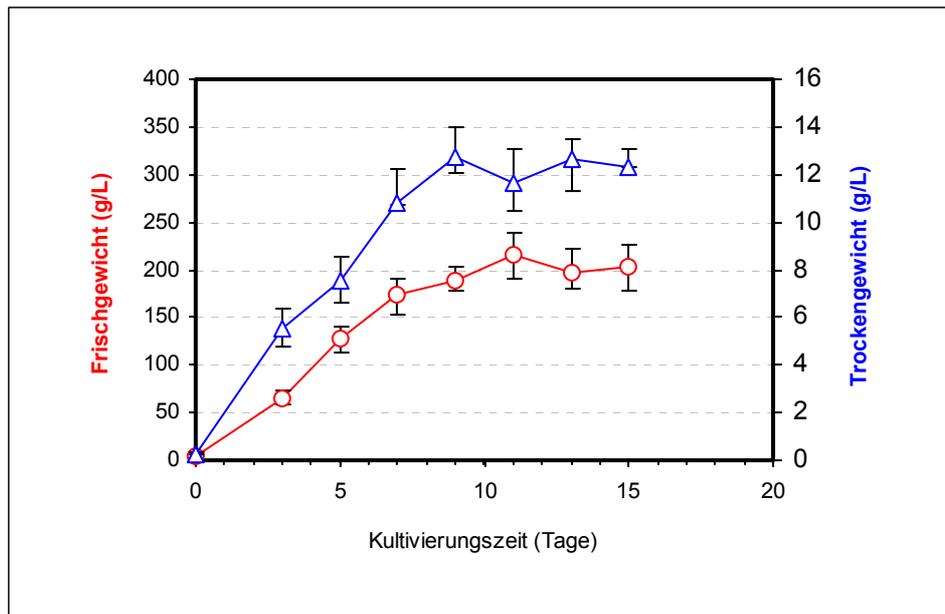
Die negative Wirkung der Scherkräfte auf die Sekundärmetabolitbildung war auch in diesem Versuch deutlich erkennbar. Dieser Effekt wurde nur vorübergehend durch den 1. Hochspannungsimpuls entgegengewirkt. Anscheinend konnten kurzfristig Proteine und Enzyme der Zellen durch HSI stabilisiert oder sogar ihre Aktivität gesteigert werden, zumal der positive Einfluß von HSI auf die Funktionalität der Proteine bekannt ist (Barbosa-Canovas, 1999). Bei längerer Kultivierungsdauer der Zellen machte sich der negative Einfluß der Scherkräfte auf die physiologische Leistungsfähigkeit der Zellen bemerkbar. Bei zunehmender Zelldichte bewirkten die Scherkräfte Änderungen der Aggregatgröße und beeinflussten somit negativ die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Madhusudhan *et al.*, 1996; Hanagata *et al.*, 1993). Scherkräfte, die die Zellaggregate auseinanderreißen, beeinträchtigen die Funktion der Zellen äußerst stark (Lindsey und Yeoman, 1983). Bekannterweise sind Hochspannungsimpulse in der Lage, die Zellmembran zu permeabilisieren (Tsong, 1991). Ein durch die Scherkräfte hervorgerufener sogenannter „oxidativer burst“ (siehe Kapitel 4.9) kann synergistisch mit HSI auf die Zellmembran wirken und somit die Funktionalität der Membran und damit die Physiologie der Zelle so weit schädigen, daß eine Biosynthese von Sekundärmetaboliten nicht mehr möglich ist. Untersuchungen konnten zeigen, daß durch mechanische Agitation oxidativer burst hervorgerufen werden kann (Barz, 2000, Cazale, 1998).

#### **4.7 Anwendung von Methyljasmonat im Airlift-Bioreaktor**

Methyljasmonat war in den Batchversuchen in der Lage die Bildung von Isoflavonoiden zu steigern. Dies galt sowohl bei den Aglykonen als auch bei den  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoiden. Daher fand der Elicitor Methyljasmonat für die Scale-up Versuche Anwendung und wurde in einer Konzentration von 100 mg/L dem Medium der Zellkultur hinzugesetzt.

#### 4.7.1 Wachstumschrakterisierung von *Glycine max* nach Methyljasmonat-applikation

Das Wachstumsverhalten der Pflanzenzellkulturen wurde bei 80 %-iger O<sub>2</sub>-Sättigung und nach Applikation von Methyljasmonat während einer 15 tägigen Kultivierung verfolgt.

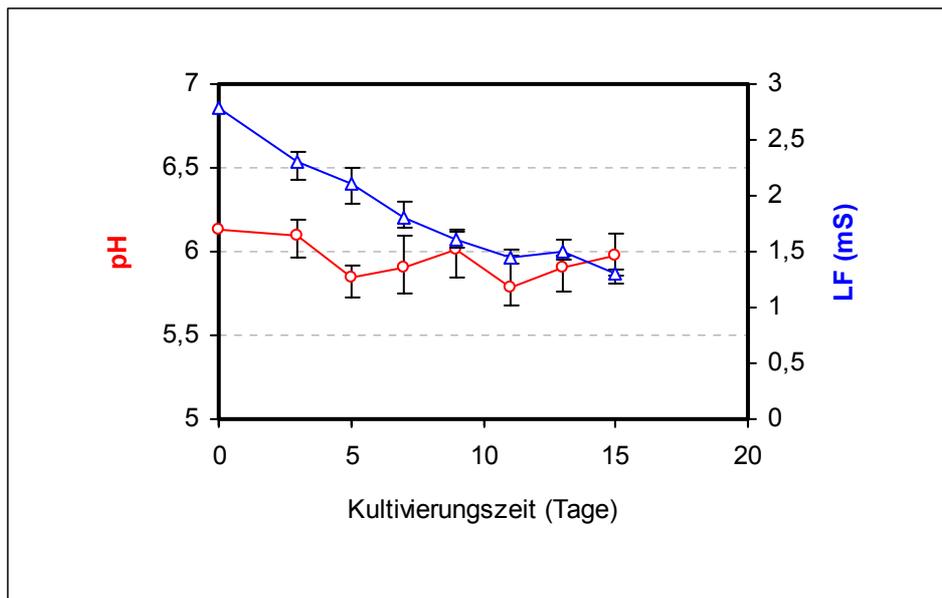


**Abb. 50:** Wachstum von *Glycine max* Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach der Applikation von Methyljasmonat in einer Konzentration von 100 mg/L

Die Zellen erreichten das höchste Wachstum nach 9 Tagen mit einem Trockengewicht von 12,8 g/L. Danach blieb das Wachstum in der stationären Phase bis zum Ende der Kultivierung auf diesem Niveau. Im Vergleich zu dem Wachstum der Pflanzenzellkulturen ohne Zugabe von Methyljasmonat (Abb. 40) zeigte sich hier ein nur leicht geringeres Wachstum der Zellen. Insgesamt konnte allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

#### 4.7.2 pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf

Die Leitfähigkeit als Indikator für die Leistungsfähigkeit der zellulären Ionenaufnahme und der pH-Wert wurden parallel zu dem Wachstumsversuchen im Bioreaktor nach dem Zusatz von Methyljasmonat beobachtet.

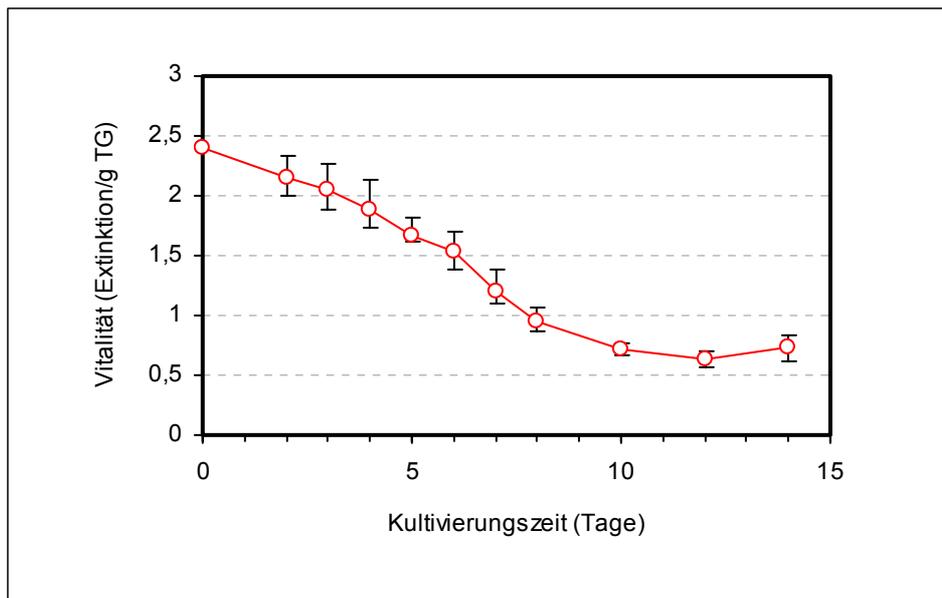


**Abb. 51:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach Zusatz von Methyljasmonat in einer Konzentration von 100 mg/L.

Der pH-Wert änderte sich nur wenig und schwankte um den Wert 6. Die Leitfähigkeit sank langsam bis auf 1,35 mS. Dieser Rückgang war im Vergleich zu den Bioreaktorversuchen mit 80 % iger Sauerstoffregulierung wesentlich geringer (Abb. 41) und resultierte wahrscheinlich auf eine verminderte Aufnahme von Salzionen aus dem Medium durch die Zellen.

#### 4.7.3 Vitalitätstest

Methyljasmonat wurde in einer Konzentration von 100 mg/L dem Medium der Pflanzenzellkultur hinzugesetzt und anschließend die Vitalität über 14 Tage im Medium verfolgt.



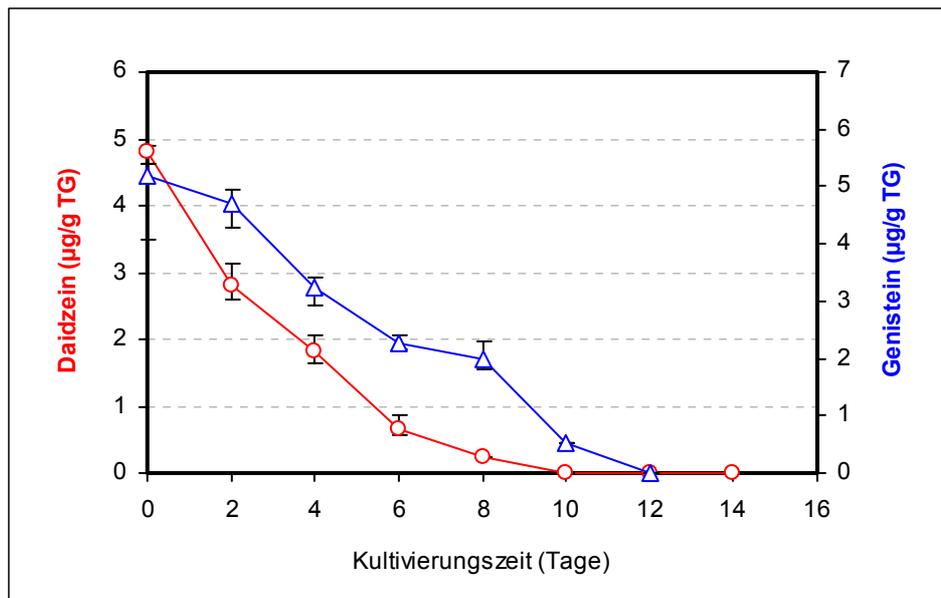
**Abb. 52:** Vitalität der Soja-Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach Methyljasmonatapplikation

Die Vitalität der Soja-Zellkultur ging kontinuierlich bis zum 12. Tag der Kultivierung zurück und erreichte dort seinen niedrigsten Punkt mit 0,64 Extinktion/g TG.

Im Vergleich zu den Versuchen im Bioreaktor mit Belüftungsregulierung auf 80 % Sauerstoffsättigung ohne Methyljasmonatapplikation zeigte sich hier kein deutlicher Anstieg der Vitalität der Zellen in den ersten 7 Tagen der Kultivierung. Der Rückgang der Vitalität war hier schwach ausgeprägt, begann allerdings nach dem 1. Kultivierungstag. Insgesamt wurde bei beiden Versuchen die gleiche niedrige Vitalität, wenn auch an unterschiedlichen Tagen, erreicht. Die Anwendung von Methyljasmonat wirkte nicht positiv auf die Vitalität der Zellen.

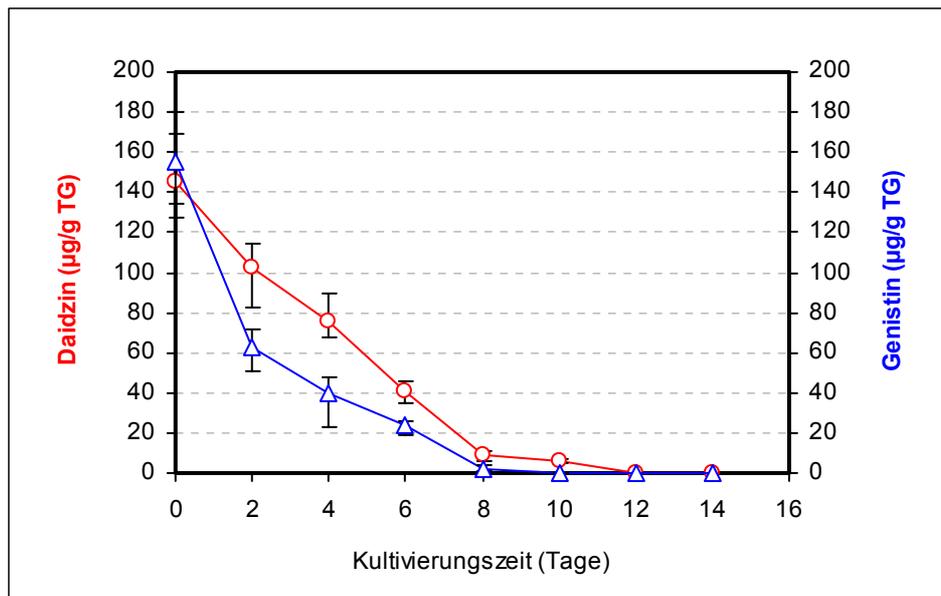
#### 4.7.4 Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach Methyljasmonatzusatz

Methyljasmonat wurde in einer Konzentration von 100 mg/L dem Medium hinzugesetzt und die Bildung der Isoflavonoide anschließend während der Wachstumsphase verfolgt.



**Abb. 53:** Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der Methyljasmonatapplikation (100 mg/L) im Airlift-Bioreaktor.

Die Genisteinkonzentration sank kontinuierlich während der gesamten Kultivierungszeit ab. Nach einer Fermentationszeit von 10 Tagen konnte kein Genistein mehr festgestellt werden. Die Daidzeinkonzentration zeigte einen noch stärkeren Rückgang. Bis zum 5. Tag sank der Daidzeingehalt unter  $< 1 \mu\text{g/g TG}$  ab. Nach 8-10 Tagen konnten keine Isoflavonoide mehr im Airlift-Bioreaktor nachgewiesen werden. Die Zugabe von Methyljasmonat bewirkte im Vergleich zu den erhaltenen Isoflavonoidkonzentrationen bei dem Versuch mit 80 %-iger Sauerstoffsättigung (Abb. 43) nur geringfügig positiv. Von einer signifikanten Steigerung der Isoflavonoidbildung durch Methyljasmonat kann nicht gesprochen werden.



**Abb. 54:** Genistin- und Daidzinkonzentration nach dem Methyljasmonatzusatz (100 mg/L) im Airlift-Bioreaktor

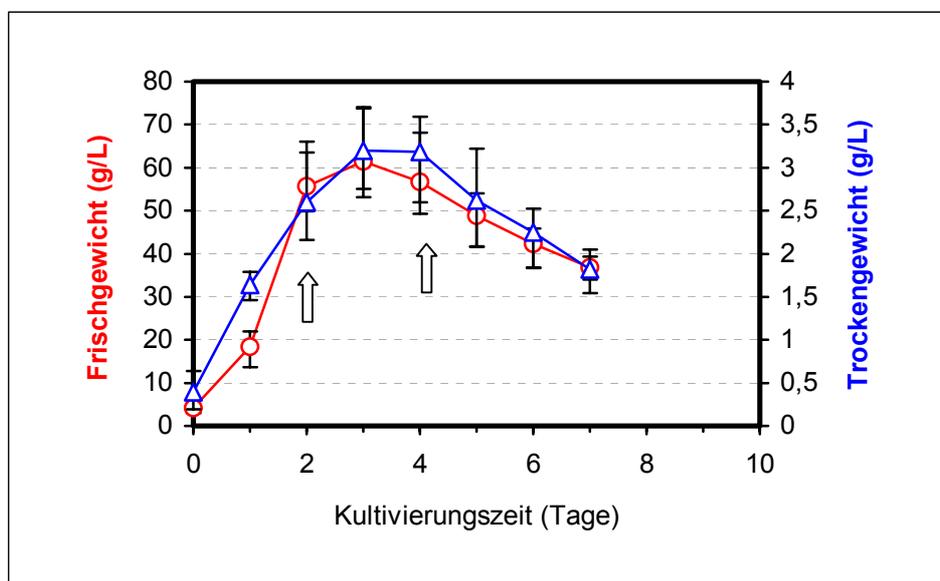
Der Einsatz von Methyljasmonat führte nicht zu dem erwarteten deutlichen Anstieg der Genistin- und Daidzinkonzentration. Es konnte sowohl bei Daidzin als auch bei Genistin ein Rückgang der Konzentration über die ganze Kultivierungszeit festgestellt werden. Nach 8-12 Tagen wurden die Isoflavonoide nur noch in Spuren nachgewiesen. Die Induktion der Isoflavonoidbiosynthese in einem Ausmaß wie bei den Batchversuchen (Abb. 23) beschrieben, konnte hier bei weitem nicht erreicht werden. Im Vergleich zu den Versuchen ohne Einbau von Fritten konnte hier eine erhöhte Konzentration an Genistin und Daidzin nachgewiesen werden, auch von einer Ausweitung der Isoflavonoidkonzentration kann gesprochen werden. Die Abbau der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoiden konnte durch die Applikation von Methyljasmonat verlangsamt werden (siehe auch Abb. 60). Die im Bioreaktor vorhandenen Scherkräfte können als wichtige Ursache dieser Ergebnisse benannt werden. Unterschiedliche Faktoren wie Belüftung,  $O_2$ -Partialdruck, Design, Querschnitt des Kultivierungsgefäßes werden mitverantwortlich sein, weshalb Methyljasmonat eine unterschiedliche Wirkung im Batchversuch und im Bioreaktor entfaltet.

## 4.8 Kopplung von Hochspannungsimpulsen mit Methyljasmonat

Die Untersuchungen an den Elicitoren Methyljasmonat und Hochspannungsimpuls im Kapitel 4.3 und 4.4 zeigten deren positiven Einfluß auf die Biosynthese der Isoflavonoide in den Batchuntersuchungen. Diese Ergebnisse sollen nun im Scale-up-Maßstab im Airlift-Bioreaktor nachvollzogen werden. Dazu wurde Methyljasmonat am Tag 0 der Kultivierung dem Medium in einer Konzentration von 100 mg/L hinzugesetzt. Die Hochspannungsimpulse (1600 V) wurden am 2. und 4. Kultivierungstag am Bioreaktor angelegt. Die Untersuchungen erstreckten sich sowohl auf die Wachstumsuntersuchungen von *Glycine max* Pflanzenzellkulturen als auch auf die Bildung der Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor.

### 4.8.1 Wachstumscharakterisierung von *Glycine max* nach Einsatz von HSI und Methyljasmonat

Das Wachstum von *Glycine max* Zellkulturen wurde über 7 Tage im Bioreaktor verfolgt und der Einfluß der Kopplung von Methyljasmonat und Hochspannungsimpuls untersucht.



**Abb. 55:** Wachstum von *Glycine max* Zellkultur mit HSI-Behandlung am 2. und 4. Tag im Airlift-Bioreaktor (Pfeilmarkierung) und vorhergehender Methyljasmonatzugabe (100 mg/L) ins Nährmedium

Das Trockengewicht stieg parallel zu dem Frischgewichtsverlauf in den ersten Tagen sehr stark an und erreichte sein Maximum mit 3 g/L TG am 3. Tag der Kultivierung -

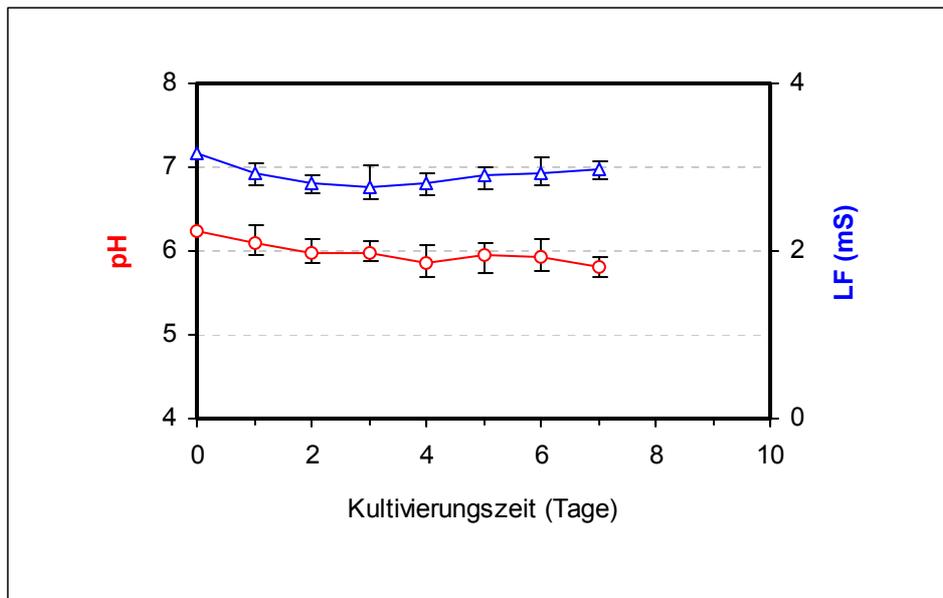
am Übergang der logarithmischen zur stationären Phase. Danach sank das Wachstum auf 2 g/L TG in der stationären Phase ab. Sowohl nach der 1. HSI-Behandlung als auch nach dem 2. Impuls konnte keine Stimulierung des Wachstums festgestellt werden. Im Vergleich zu den Versuchen mit HSI-Behandlung aber ohne Applikation von Methyljasmonat konnte hier kein eindeutiger positiver Einfluß von Methyljasmonat festgestellt werden (Abb. 55). Auch blieb die gebildete Biomasse in diesem Versuch um über 80 % unter dem Trockengewicht, das bei den Versuchen ohne Methyljasmonat mit HSI und ohne Elicitoren, nur nach Einbau von Fritten (Abb. 34), erzielt wurde. Das geringe Wachstum, insbesondere die Absterbephase der Zellen nach dem 4. Kultivierungstag, könnte folgende Ursachen haben:

Pflanzenzellen unterliegen im Bioreaktor wie mehrmals erwähnt hydrodynamischem Streß durch Belüftung. Das Wachstum der Pflanzenzellen und die Biosynthese der Sekundärmetabolite werden oft durch diesen Streß beeinflusst (Leckie *et al.*, 1991; Zhong *et al.*, 1994). Verschiedene Pflanzenzelllinien zeigten signifikante Unterschiede in der hydrodynamischen Sensitivität, die sich mit der Kultivierungszeit ändert (Meiers *et al.*, 1993). Daher muß beim Design des Bioreaktors eine Abschätzung der Zellschädigung durch hydrodynamischen Streß berücksichtigt werden. Allerdings gibt es keine Kriterien für kritischen Streß, der nicht tolerant ist für Pflanzenzellkulturen. Pflanzenzellen können sich während des hydrodynamischen Stresses metabolisch verändern. Dies könnte sich in einem geringeren Wachstum, wie in diesen Versuchen dargestellt, niederschlagen. Es wurde berichtet, daß Wachstum (Dunlop *et al.*, 1994), Zellmembranintegrität (Takeda *et al.*, 1994; Kieran *et al.*, 1995) und respiratorische Aktivität (Huka *et al.*, 1989; Dunlop *et al.*, 1994) in Pflanzenzellen während eines Anstiegs eines hydrodynamischen Stresses zurückgehen. Diese Beobachtungen deuten an, daß die Signale des hydrodynamischen Stresses in den Stoffwechsel der Pflanzenzellkulturen kommuniziert werden. Der Mechanismus der Streßrezeption und der Signaltransduktion muß unter Berücksichtigung der metabolischen Antwort auf die reguläre physiologische Aktivität der Zellkultur in das Design des Bioreaktors als Konstruktionsmerkmale einfließen. Allerdings besteht weiterer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet.

Im Kapitel 4.9 werden zusammenfassend weitere Erklärungen zu möglichen Ursachen des Wachstumsrückgangs der Pflanzenzellkulturen gegeben.

#### 4.8.2 pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf

Der Einfluß von Hochspannungsimpulsen und applizierten Methyljasmonat auf pH-Wert- und Leitfähigkeitsverlauf wurde während der Kultivierung der Pflanzenzellen im Bioreaktor über 7 Tage untersucht.

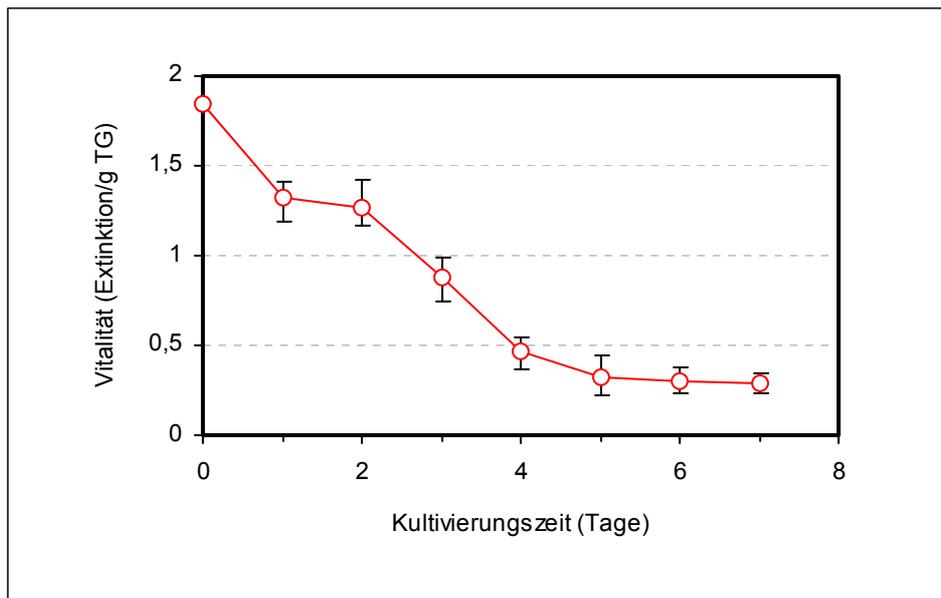


**Abb. 56:** Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase mit HSI- Behandlung am 2. und 4. Tag im Airlift-Bioreaktor und Methyljasmonatzugabe (100 mg/L) ins Nährmedium

Die pH-Werte änderten sich während der Experimente kaum und schwankten um den Wert 6. Die Leitfähigkeit sank nur sehr leicht bis zum 3. Tag. Danach änderte sie sich nur noch geringfügig. Die Kultur nahm nur noch wenige Nährstoffe aus dem Medium auf, dies korrespondierte mit dem beobachteten geringen Wachstum der Zellen im Bioreaktor (Abb. 55). Auch im Vergleich zu den bisher durchgeführten Leitfähigkeitsversuchen zeigte sich hier die geringste gemessene Abnahme der Leitfähigkeit überhaupt.

#### 4.8.3 Vitalitätstest

Die Vitalität als Indikator für mitochondriale Aktivität der Zellen wurde über 7 Tage im Medium nach Methyljasmonatapplikation verfolgt.

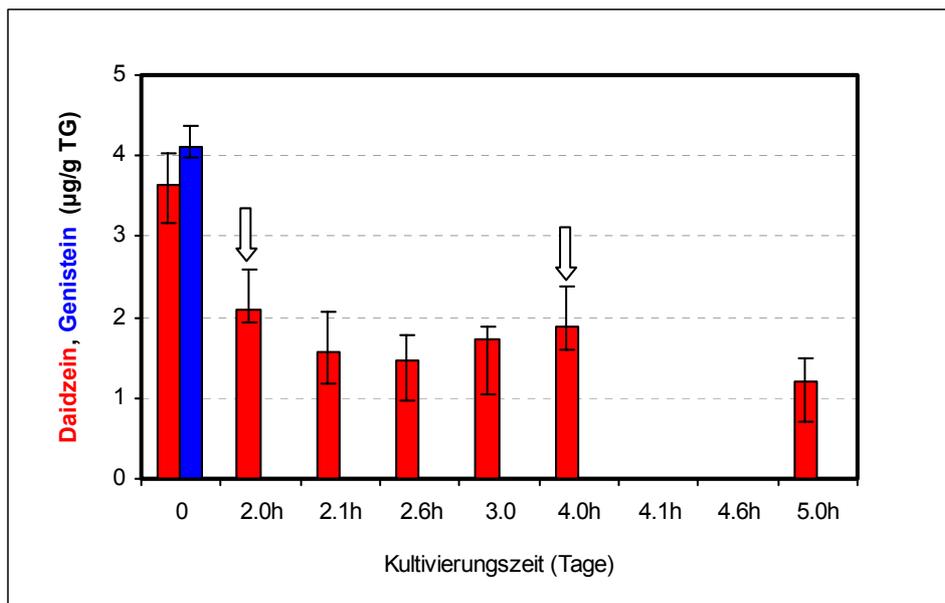


**Abb. 57:** Vitalität der Soja-Zellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach HSI-Behandlung am 2. und 4. Tag und vorhergehender Methyljasmonatzugabe (100 mg/L) in das Nährmedium

Die Vitalität ging während des Versuchszeitraumes stetig zurück. Bis zum 10. Tag verlor die Kultur zwei Drittel ihrer Vitalität. Dies war der niedrigste Wert, der bisher in allen Untersuchungen gemessen wurde. Die geringe Vitalität spiegelt sich in dem geringen Wachstum der Zellen im Bioreaktor wieder (siehe auch Kapitel 4.9). Im Kapitel 4.9 werden zusammenfassend weitere Erklärungen zu möglichen Ursachen des Vitalitätsrückgangs diskutiert.

#### 4.8.4 Isoflavonoidkonzentration der Zellkulturen nach HSI- und Methyljasmonatbehandlung

Die Bildung der Isoflavonoide wurde nach HSI-Behandlungen am 2. und 4. Tag und vorhergehender Methyljasmonatapplikation untersucht.



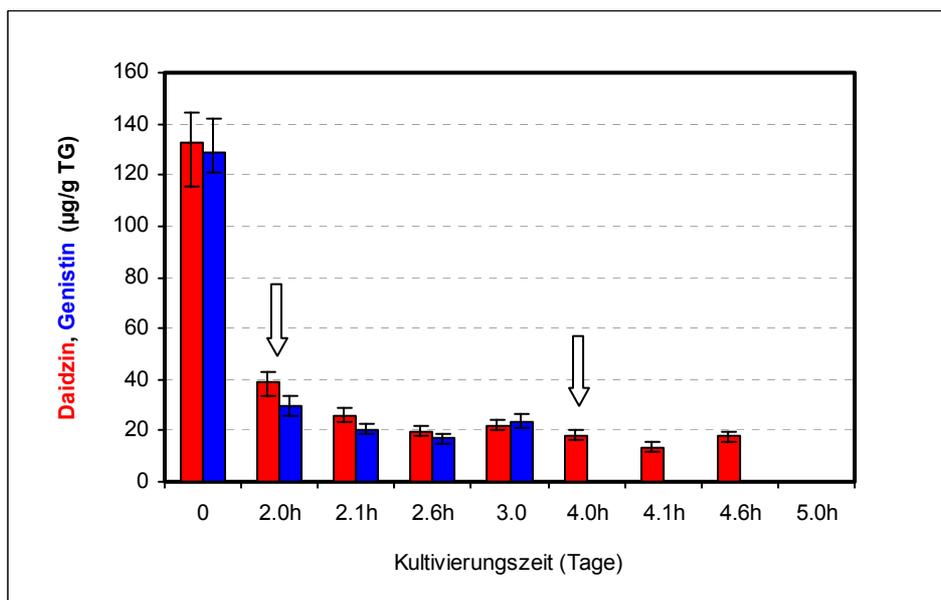
**Abb. 58:** Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor. Zu Anfang der Untersuchungen wurden Methyljasmonat dem Medium hinzugefügt. Ein Hochspannungsimpuls wurde an dem 2. und dem 4. Tag (2.0h und 4.0h) appliziert (Pfeilmarkierung). Die Untersuchungen fanden nach dem folgenden Zeitplan statt (d= Tag, h: Stunde, danach gilt: 2.1= nach 2 Tagen und einer Stunde):

- 0: Zugabe von Methyljasmonat zum Medium (100 mg/L)
- 2.0: Kontrolle vor der 1. HSI-Behandlung
- 2.1h: 1 Stunde weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 2.6h: 6 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 3d: 24 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 4.0: 4 Tage Kultivierung, Kontrolle vor der 2. HSI-Behandlung
- 4.1h: 1 Stunde weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 4.6h: 6 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor
- 5d: 24 Stunden weitere Kultivierung im Bioreaktor

Die Genisteinkonzentration ging nach der Animpfung des Airlift-Bioreaktors auf 0 zurück. Es wurden kein Genistein mehr an dem 2., 4. oder 5. Tag gemessen. Dies waren die niedrigsten Werte aller durchgeführten Untersuchungen bisher. Die Tatsache, daß schon vor der 1. HSI-Applikation kein Genistein mehr im Bioreaktor vorhanden war, weist darauf hin, daß die Applikation von Methyljasmonat dafür mitverantwortlich sein könnte. Methyljasmonat wird für diesen negativen Effekt nicht

allein ursächlich sein, sondern wirkt additiv mit den vorhandenen Scherkräften auf die Zellen ein.

Die Daidzinkonzentration sank nach 2 Tagen von 3,64 auf 2,09  $\mu\text{g/g}$  TG. Nach der 2. Hochspannungsbehandlung ging der Daidzeingehalt auf 0  $\mu\text{g/g}$  TG bevor er sich am 5. Tag auf 1,2  $\mu\text{g/g}$  TG erhöhte. Die Kopplung von HSI und Methyljasmonat im Airlift-Bioreaktor zeigte keinen positiven Effekt auf die Daidzeinsynthese.



**Abb. 59:** Genistin- und Daidzinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor. Ein Hochspannungsimpuls wurde an dem 2. und dem 4. Tag (2.0h und 4.0h) appliziert (Pfeilmarkierung). Zu Anfang der Untersuchungen wurde Methyljasmonat (100 mg/L) dem Medium hinzugefügt. Die Untersuchungen fanden nach dem oben genannten Zeitplan statt.

Die Genistinkonzentration ging sehr stark zurück. Der Genistingehalt in Airlift-Bioreaktor wurde innerhalb von 3 Tagen abgespalten, es konnte ab dem 4. Tag kein Genistin mehr nachgewiesen werden. Auch die Konzentration von Daidzin ging sehr schnell von 132  $\mu\text{g/g}$  TG auf 38,7  $\mu\text{g/g}$  TG zurück. Sowohl nach der 1. HSI-Anwendung als auch nach der 2. HSI-Behandlung konnte keine Erhöhung der Daidzinkonzentration festgestellt werden.

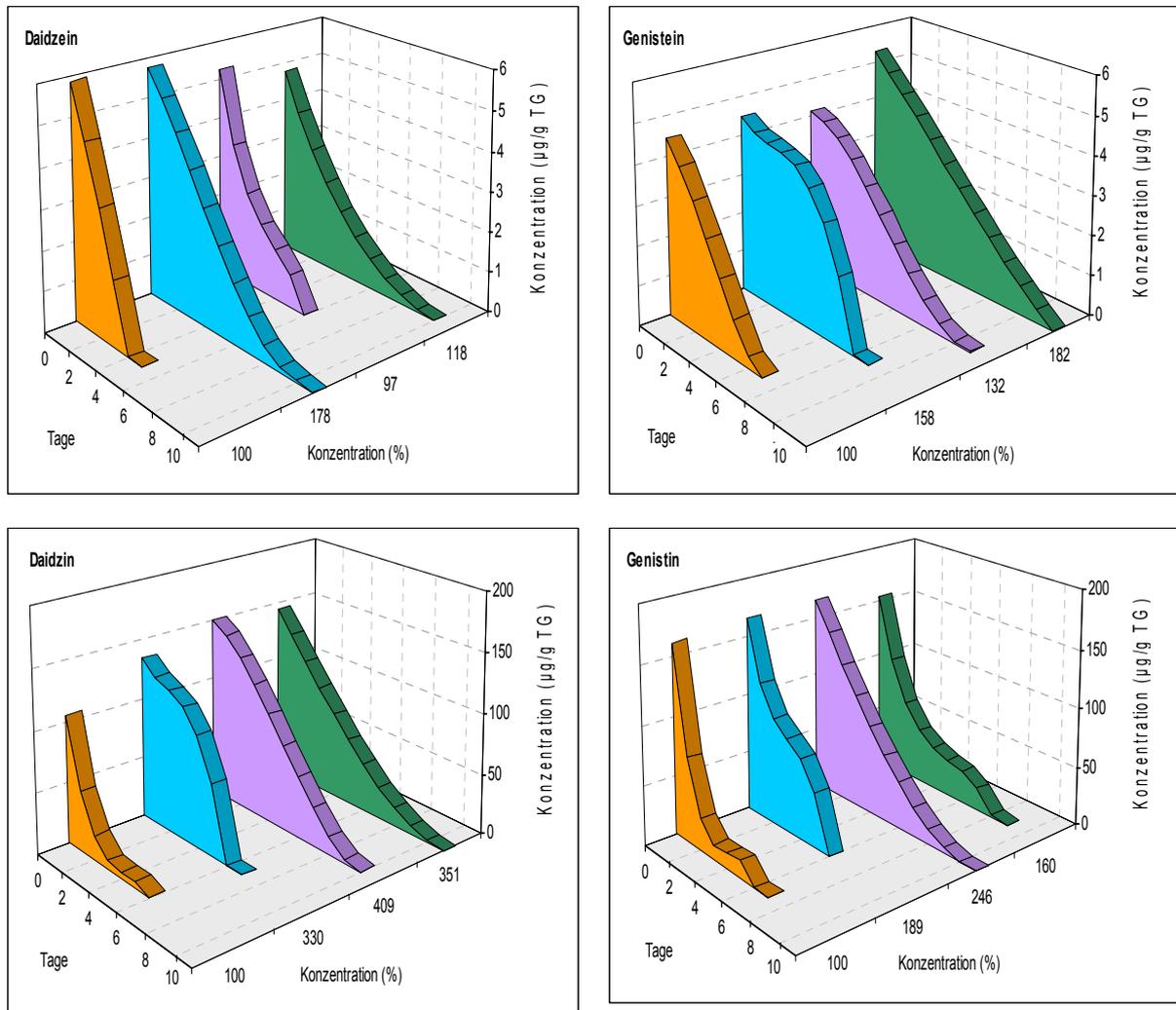
Im Vergleich zu den Untersuchungen mit HSI-Behandlung, allerdings ohne vorhergehende Applikation von Methyljasmonat ins Medium, zeigten sich hier zu jedem

Untersuchungszeitpunkt geringere Konzentrationen von Genistin und Daidzin. Der Einfluß einer Kopplung von HSI-Behandlung mit Methyljasmonat zeigte somit keinen positiven Effekt auf die Biosynthese der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoiden.

Methyljasmonat ist ein wichtiger Elicitor, der auch wesentlich in der Signaltransduktionskaskade eingreift (Weiler, 1997). Es hat die Fähigkeit, effektiv die Biosynthese der sekundären Metabolite zu induzieren (Kneer *et al.*, 1999). Die in einer synergetischen Intention zusammen applizierten Elicatoren Hochspannungsimpuls und Methyljasmonat, die einzeln appliziert in den Batchversuch sehr positiv auf die Biosynthese von den Isoflavonoiden wirkten, zeigten hier eine eindeutig hemmende Wirkung auf die Isoflavonoidbildung. Diese soll in folgenden Kapitel näher erläutert werden.

#### **4.9 Abschlußdiskussion und Ausblick**

Ziel der Versuche im Bioreaktor war es, eine möglichst hohe Konzentration der Aglykonen und  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide zu gewinnen. Die Untersuchungen, die im Bioreaktor an den Pflanzenzellen durchgeführt wurden, zeigten eine Verlängerung des Isoflavonoidnachweises durch die Änderung verschiedener Kultivierungsparameter (Abb. 60). Dies hatte allgemein eine erhöhte Isoflavonoidkonzentration zur Folge. Insbesondere die Daidzinkonzentration konnte durch den Einbau von Fritten in den Begaserring, einer 80 %-igen Sauerstoffsättigung nach Einbau von Fritten und einer 80 %-igen Sauerstoffsättigung und Applikation von Methyljasmonat (100 mg/L) um ca. das 3 bis 4-fache gesteigert werden.



**Abb. 60:** Vergleich der verschiedenen Isoflavonoidkonzentrationen (IK) während der Kultivierung im Airlift-Bioreaktor nach Änderung folgender Versuchsparameter:

**Orange:** IK ohne Parameteränderung

**Blau:** IK nach Einbau von Fritten in den Begaserring

**Violett:** IK bei 80 %-iger Sauerstoffsättigung nach Einbau von Fritten

**Grün:** IK bei 80 %-iger Sauerstoffsättigung und Applikation von Methyljasmonat (100 mg/L)

Die Konzentrationen wurden in relativen Prozentwerten zu dem Ausgangswert (IK ohne Parameteränderung) ausgedrückt, wobei dieser gleich 100 % gesetzt wurde.

Insgesamt konnte aber keine signifikante Produktionserhöhung der Isoflavonoide festgestellt werden. Zudem ging der Rückgang der Isoflavonoidkonzentrationen in den Zellkulturen bei fortschreitender Kultivierungszeit einher mit dem Rückgang der Biomassebildung durch die Pflanzenzellkulturen im Bioreaktor. Die entscheidende Frage lautet daher, welche Faktoren einer relevanten Produktion der Isoflavonoide im Airlift-Bioreaktor entgegenstehen. Ein zentraler Punkt ist hierbei das Auftreten von Scherkräften durch hydrodynamische Agitation.

Pflanzenzellkulturen wurden als vielversprechende Quelle zur Gewinnung von unterschiedlichen Sekundärmetaboliten angesehen (Kutney, 1993). Die Möglichkeit der Scale-up Produktion wurde allerdings limitiert durch die Größe, die rigide Zellwand und die ausgedehnte Vakuole der Pflanzenzellen, die für die Sensitivität der Pflanzenzellkulturen verantwortlich sind (Dicosmo und Misawa, 1995). Die Scherkräfte sind weitgehend auf die mechanische Bewegung der Zellsuspension und durch platzende Gasblasen zurückzuführen (Hooker *et al.*, 1989; Martin, 1980; Scragg *et al.*, 1988b). Toshiyo *et al.*, 1994, zeigten, daß hydrodynamischer Streß die physiologischen Prozesse wie Metabolismus, Zellwachstum und Zellvitalität beeinflussten. Auch mechanische Kräfte wie Druckänderung, Schaumbildung und Zellflotation tragen zur Schädigung der Zellen im Bioreaktor bei (Bronnenmeier und Markl, 1982; Wongsamuth und Doran, 1994).

Sun und Linden, 1999, unterstützten die Beobachtungen, daß unter erhöhtem Scherstreß die Pflanzenzellkulturen zelluläre Funktionen und Vitalität verlieren. Dies ist u.a. abhängig von den jeweiligen Zelllinien und der Subkultivierung (Schragg, 1992). Zellen verschiedener Pflanzen bewiesen ihre Fähigkeit, kleinere Läsionen durch Einlagerung von Polysacchariden in die Zellwand zu reparieren. Diese Fähigkeit scheint bei einer Exposition hohen Scherstress verloren zu gehen. Dunlop *et al.*, 1994, stellten die starke Scherkraftsensitivität von Pflanzenzellen gegenüber Zellwachstum, Zellaggregatzustand und Zeitpunkt der Zelllysis dar. Die Aktivität der Mitochondrien, der Sekundärstoffwechsel und zelluläre Enzyme zeigten starke physiologische Schädigungen. Es gibt keine Berichte, daß sich die zelluläre Physiologie nach einem Aussetzen der Streßbedingungen hätte erholen können. In den Versuchen, die im Airlift-Bioreaktor durchgeführt wurden, konnte ein deutlicher Rückgang der Vitalität (Abb. 36) nachgewiesen werden, aus dem ein reduzierter Sekundärmetabolismus resultierte. Zellen mit geringer Aktivität der Mitochondrien und Enzyme sind nicht in der Lage, Isoflavonoide zu bilden.

Die Untersuchungen der Volumeneffekte (Abb. 33 a bis d) zeigten auf, daß die Scherkräfte der wesentliche Grund für die geringere Produktion der Isoflavonoide darstellen. Ein höheres Kultivierungsvolumen (und damit höhere Scherkräfte (Payne *et al.*, 1991)) bei gleichzeitiger Konstanz der übrigen physiologischen Parameter führte zu einem starken Rückgang der Isoflavonoidkonzentrationen in den Pflanzenzellen.

Das B<sub>5</sub>-Medium diente zunächst in den Batchversuchen zur Kultivierung der Zellen. Dieses Medium zeigte sich in diesen Untersuchungen für die Kultivierung gut geeignet und fand somit auch bei den Versuchen im Airlift-Bioreaktor Verwendung. Die Nährstoffversorgung im Bioreaktor konnte durch das Chemostatenprinzip gewährleistet werden, welches sich auch in der Konstanz der Leitfähigkeit des Mediums im Verlauf der Kultivierung niederschlug (Abb. 56).

Im Airlift-Bioreaktor sind die Zellen, wie erwähnt, Ziel von hydrodynamischen Kräften, die von einer Belüftung über den Begaserring mit gleichzeitiger Blasenbildung herrühren. Volumen, Größe und Struktur der Zellen sind wichtige Bestimmungsgrößen für die Ausprägung der Scherkräfte. Zusätzlich spielt auch der Aggregationsstatus der Pflanzenzellen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Einige Studien zeigten deutlich eine Abhängigkeit zwischen den gebildeten Zellaggregaten und der Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Kinnerly *et al.*, 1980; Hulst *et al.*, 1989; Madhusudhan *et al.*, 1996; Hanagata *et al.*, 1993). Solche Effekte waren verschiedentlich mit zellulärer Organisation und Differenzierung assoziiert. Dabei spielte für Pflanzenzellen oftmals ein Zell-Zell-Kontakt eine essentielle Rolle für den Sekundärmetabolismus. Scherkräfte, die die Zellaggregate auseinanderreißen, beeinflussen diese Größen äußerst stark (Lindsey und Yeoman, 1983). Bei hohen Zelldichten, bei denen das Biomassevolumen 50 bis zu 90 % des Kultivierungsvolumens beträgt, können die Scherkräfte Änderungen der Aggregatgröße bewirken. Dies war in den hier durchgeführten Versuchen der Fall. Ein weiterer Faktor, der zur schwierigen Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Airlift-Bioreaktor entscheidend beiträgt, ist die Optimierung des O<sub>2</sub>-Bedarfes der Zellkultur. Da die Pflanzenzellen strikte Aerobier sind, muß ihre Versorgung mit gelöstem Sauerstoff sowie ein ausreichender Gasaustausch zwischen dem Medium und den Zellen gewährleistet sein (Schermyly und Blaß, 1990).

Da Elicitoren in pflanzlichen Zellen auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Streß- und Abwehrmechanismus auslösen (Kieran *et al.*, 2000; Sutherland, 1991; Mehdy, 1994), kann in den hier durchgeführten Untersuchungen im Bioreaktor (Abb. 58, 59) die Kombination von

Elicitoren, eine zu starke Antwort bzw. Bildung von oxidativen Streß ausgelöst haben, der die Physiologie der Zelle und damit auch die Fähigkeit zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten eingeschränkt hat. Eine der ersten sichtbaren Antworten der Zelle auf Streß ist die Bildung von aktiven Sauerstoffverbindungen wie das Superoxidradikal  $O_2^{\cdot -}$ , das Hydroxylradikal  $OH^{\cdot}$  oder Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  und ist allgemein unter dem Begriff ‚oxidativer burst‘ bekannt und war zunächst als Antwort der Pflanzenzellen gegen einen pathogenen Angriff beschrieben worden (Doke, 1983). Oxidativer burst wurde identifiziert als das initiiierende Signal für eine Serie von metabolischen Verteidigungsmechanismen (Apostol *et al.*, 1989; Doke *et al.*, 1996). Die meisten Studien über oxidativen burst bei Pflanzenzellen in den letzten Jahren stellten die Bildung und die Folgen des oxidativen Stresses in den Mittelpunkt ihrer Untersuchungen (Mehdy *et al.*, 1996; Wojtaszek, 1997; Lamb und Dixon 1997; Low *et al.*, 1996).

Von besonderer Bedeutung sind die Untersuchungen, die zeigen konnten, daß oxidativer burst nicht nur nach einem pathogenen Angriff entsteht, sondern auch bei mechanischer Agitation (Barz, 2000; Legendre *et al.*, 1993; Cazale *et al.*, 1998), Druck (Schreck *et al.*, 1996; Dörnenburg und Knorr, 1998) und osmotischem Streß (Yahraus *et al.*, 1995) zu beobachten ist. Dies ist deshalb von besonderer Relevanz, da diese Untersuchungen wichtige Hinweise auf die Wirkung von Scherkräften, die in Airlift-Bioreaktoren auf die Zellen wirken, geben können (Kieran *et al.*, 2000). Hierbei ist es möglich, daß der durch die Scherkräfte hervorgerufene oxidative Streß eine hypersensitive Antwort der Zellen verursacht, die schließlich zum Zelltod führen kann. Sie können zudem je nach Stärke der Scherkräfte die Zellen deformieren oder zur direkten Zelllysis führen (Honda *et al.*, 2001).

Verschiedene Pflanzenzelllinien zeigten signifikante Unterschiede in der hydrodynamischen Sensitivität, die mit der Kultivierungszeit variiert (Meiers *et al.*, 1993). Daher muß beim Design des Bioreaktors eine Abschätzung der Zellschädigung durch hydrodynamischen Streß berücksichtigt werden. Allerdings gibt es keine Kriterien für kritischen Streß, der für Pflanzenzellkulturen nicht tolerant ist (Takeda *et al.*, 1998). Pflanzenzellen können sich während des hydrodynamischen Stresses metabolisch verändern. Es wurde berichtet, daß Wachstum (Dunlop *et al.*, 1994), Zellmembranintegrität (Takeda *et al.*, 1994; Kieran *et al.*, 1995) und respiratorische Aktivität (Hooker *et al.*, 1989; Dunlop *et al.*, 1994) in Pflanzenzellen zurückgehen, während der hydrodynamische Streß anstieg. Diese Beobachtungen deuten, wie bereits erwähnt,

an, daß die Signale des hydrodynamischen Stresses in den Stoffwechsel der Pflanzenzellkulturen weitergeleitet werden. Der Mechanismus der Streßrezeption und der Signaltransduktion und deren Effekt auf die reguläre metabolische Aktivität muß für das Design des Bioreaktors berücksichtigt werden. Im Allgemeinen wird die Signalperzeption von den Rezeptoren der Zelloberfläche in andere Teile der Zelle kommuniziert. Dieses wird durch intrazelluläre Botenstoffe, sogenannte Second-messenger, vermittelt. So ist  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytoplasma dafür bekannt, daß es als Secondmessenger in der Signaltransduktionskette in vielen Organismen auch in Pflanzenzellen fungiert.  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt in das Cytosol über intrazelluläre Lagerung, wie z. B. Vakuolen, als Antwort auf unterschiedliche Stimuli. Das  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Zielproteinen wie Calmodulin und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen, die wiederum die Aktivität andere Proteine beeinflussen können (Bush, 1993). Untersuchungen an tierischen Zellen konnten weitere Hinweise auf die Rolle des  $\text{Ca}^{2+}$  in Bezug auf vorhandenen Scherstress geben (Motobu *et al.*, 1998). Bei der zellulären Erkennung des Scherstressess könnte die Zellmembran über die Regulierung des  $\text{Ca}^{2+}$  Metabolismus beteiligt sein. Der Mechanismus, der die  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisierung reguliert, wird allgemein über die Phospholipase C geregelt. Die Kaskade der Signaltransduktion umfasst die Aktivierung der Zelloberflächenrezeptoren, die nachfolgend die Phosphoinosid-spezifische Phospholipase C stimuliert. Es folgt anschließend eine Aktivierung der cytosolischen Transskriptionsfaktoren und eine Regulierung der Gentransskription im Zellkern (Papadaki und Eskin, 1997).

Außerdem ist es wahrscheinlich, daß ein Abbau oder eine Verstoffwechslung der Isoflavonoide durch den Einfluß von Scherstreß stattfand. Bei den vorgenommenen HPLC-Untersuchungen konnten Peaks von Substanzen beobachtet werden, die ähnliche Retentionszeiten wie die zu untersuchenden Isoflavonoide besaßen. Diese Peaks konnten zwar durch die gegebenen Standards nicht identifiziert werden, allerdings ist es möglich, daß diese Verbindungen aus Abspaltungen von funktionellen Gruppen der Isoflavonoide hervorgegangen sind.

Alle diese Charakteristika tragen zur hohen Komplexität der Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Bioreaktor bei. Viele wissenschaftliche Arbeiten zeigten, daß die Antwort der Pflanzenzellen auf Streß, wozu auch die Synthese von Isoflavonoiden gehört, ein wesentlich komplexerer Prozeß ist, als zunächst angenommen. Die durch Streß ausgelösten zellulären Mechanismen reichen von einer sofortigen Antwort durch

zelleigene Proteine bis zu langfristigen Effekten auf die Leistungsfähigkeit der Pflanzenzellkulturen (Kieran *et al.*, 2000).

Aus den durchgeführten Versuchen ging hervor, daß die Physiologie der Zelle durch die Scherkräfte deutlich beeinträchtigt wurde. Daher sollten für weitere Untersuchungen folgende Überlegungen in die Versuchsplanung einfließen:

Pflanzenzellkulturen sind bekannterweise unterschiedlich sensitiv gegenüber Scherkräften. *Perilla frutescens* und *Taxus cuspidata* sind gegenüber Scherstress relativ unempfindlich und zeigen zum Teil ein besseres Wachstum (Wanger und Vogelmann, 1977; Sun und Linden, 1999) unter Scherstreßbedingungen. Diese Organismen könnten über eine Gentransfertechnik zu einer Expression von Isoflavonoiden angeregt werden. Diese Technik wird seit Anfang der 70 er Jahre bei der Gewinnung von Sekundärmetaboliten in der Forschung angewendet (Zhong, 2001). Obwohl diese Technik sehr aufwendig ist, bietet sie sich als vielversprechende Möglichkeit zur Gewinnung der Isoflavonoide an.

Akashi *et al.*, 1999, klonierten die Isoflavonsynthase, die im Genistein- und Daidzeinstoffwechselweg eine wichtige Rolle spielt. In Sojabohnen kodieren 2 Gene dieses Enzym. In Expressionsstudien an *Arabidopsis* und anderen Leguminosen wurden die homologen Gene bestimmt (Jung *et al.*, 2000). Diese Studien können möglicherweise genetische Marker identifizieren, die mit Genorten verbunden sind, welche die unterschiedliche Bandbreite der Isoflavonoidproduktion in verschiedenen Sojabohnenspezien begründen. Diese genetischen Informationen könnten dazu genutzt werden, Sojabohnenarten zu entwickeln, die eine hohe und konstante Isoflavonoidkonzentration produzieren (Meksem *et al.*, 2001). Ein solche Eigenschaft, angewendet bei scherkraftunempfindlicheren Soja-Zellkulturen, wäre für eine Kultivierung im Bioreaktor gut geeignet.

Oxidativer Streß, als wichtige Faktor zur Beeinflussung der Zellphysiologie, sollte durch geeignete Meßverfahren quantifiziert werden. Dabei hat sich insbesondere das Elektronenspinresonanzverfahren (ESR) als besonders geeignet herausgestellt. Das Meßprinzip beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie aus einem hochfrequenten elektromagnetischen Feld. Da das Superoxidradikal ein ungepaartes Elektron besitzt, läßt sich das Signal des paramagnetischen Superoxides mit Hilfe der ESR-Methode unter bestimmten Bedingungen direkt nachweisen. Dies erfordert jedoch

Bedingungen, unter denen die  $O_2$ - Radikale stabilisiert sind. Mit der Anwendung von Spintraps, d.h. Verbindungen, die mit Radikalen unter Bildung von mit ESR nachweisbaren Addukten reagieren (beispielsweise DMPO), ist es möglich, bei Raumtemperatur den Nachweis der Existenz von  $O_2$ -Radikalen zu führen (Frejaville *et al.*, 1995; Buettner und Mason, 1990).

Die verschiedenen Arten der Bioreaktoren übertragen in unterschiedlicher Weise und Höhe hydrodynamische Agitation auf die zu kultivierenden Zellen. Da dieser Scherstreß als problematische Größe der Fermentierung identifiziert ist, sollte er mit Hilfe des Coutte Viscometers quantifiziert werden (Sun und Linden, 1999). Als wichtiger Effekt des Scherstressses kann die Störung der Zellaggregatbildung gezählt werden, der zu einer wesentlichen Physiologieänderung der Zelle führt. Daher sollten die Veränderungen der Zellaggregatzustände unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Rheologie der Zellsuspensionen in weiteren Versuchen im Bioreaktor untersucht werden. Dabei könnte der Laserpartikelanalysator Anwendung finden und wichtige Anhaltspunkte zur Belastung der Zellen liefern. Das Design des Bioreaktors muß anschließend an den Erfordernissen einer optimalen Kultivierungstechnik zur Erzielung des minimalen Scherstressses angepaßt werden.

Es gibt viele Gründe anzunehmen, daß signifikante Fortschritte in der Optimierung der Pflanzenzellkulturen in naher Zukunft erreicht werden. Obwohl es zur Zeit zwei wesentliche Schwierigkeiten gibt. Zum einen ist eine weitere Entwicklung der technischen Eigenschaften des Bioreaktors notwendig, zum anderen die Heterogenität und Instabilität der Pflanzenzellkulturen nicht berechenbar. Eine Verbesserung der Zellphysiologie und des Sekundärmetabolismus durch geeignete biochemische Verfahren wird die Produktivität vieler Pflanzenzellkulturen enorm verbessern und sie in einem ökonomisch sinnvollen Stadium der kommerziellen Produktion von wichtigen Metaboliten bringen. Es erfordert eine enge Zusammenarbeit zwischen Biologen, Biotechnologen, Agraringenieuren und Lebensmitteltechnologern, da dieses interdisziplinäre Ziel nur gemeinschaftlich erreicht werden kann.

## 5 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 5.1 Zusammenfassung der Batchversuche

*Glycine max* war in der Lage sowohl Aglykone als auch  $\beta$ -glykosidische Isoflavonoide in den Batchversuchen zu bilden. Allerdings konnte in den durchgeführten Untersuchungen keine eindeutige Zuordnung des Wachstums der Pflanzenzellkulturen mit der erfolgten Biosynthese der Isoflavonoide in den einzelnen Wachstumsphasen vorgenommen werden.

Mit Hilfe der HPLC-Technologie konnten sowohl die aglykonen Isoflavonoide Genistein und Daidzein als auch die  $\beta$ -glykosidischen Formen Genistin und Daidzin aus den Zellkulturen bestimmt werden. Dazu wurden die Kulturen einem Extraktionsverfahren unterworfen, das eine präzise Trennung der Isoflavonoide aus der Zellmatrix und eine einfache und schnelle labortechnische Umsetzbarkeit gewährleistete. Nach Untersuchungen stellte sich als bestes Extraktionsmittel für die Isoflavonoide eine Mischung von Acetonitril und HCl heraus. Eine Überprüfung der nun etablierten Extraktion bei unterschiedlichen handelsüblichen Sojaprodukten bewies ihre Effizienz und fand somit für die folgenden Versuche weitere Verwendung.

Elicitoren und Precursoren wurden in der Kultivierung von Zellkulturen gezielt eingesetzt, um die Bildung von Sekundärmetaboliten zu induzieren bzw. zu verstärken. Als elicitierende Substanzen fanden Chitin, Methyljasmonat und Salicylsäure Verwendung. Als Precursoren wurden PAL (Phenylalaninlyase) und Naringenin dem Nährmedium zugesetzt und deren Induktion hinsichtlich der Isoflavonoidbiosynthese analysiert. Dabei zeigte sich als beste induzierende Substanz Methyljasmonat in einer Konzentration von 100 mg/L. Durch die Applikation von Methyljasmonat konnte die Isoflavonoidbildung um bis zu dem 7-fachen gesteigert werden.

Als physikalisch induzierende Streßfaktoren wurde der Einfluß von Hochdruck, Kälteschock und Hochspannung auf die Isoflavonoidbiosynthese der *Glycine max* Zellkulturen untersucht. Die Ergebnisse bei den unterschiedlich eingesetzten Hochdruckbereichen zeigten, daß 50 MPa die Isoflavonoidbildung zwischen 10-25 % steigerte, jedoch wirkte es mit Kälteschock gekoppelt nicht eindeutig positiv.

Die Möglichkeit zur Beeinflussung biologischer Materialien mit elektrischen Feldern unterschiedlicher Intensität ist für zahlreiche Einsatzgebiete nachgewiesen worden und wurde in Pflanzenzellkulturen zur Induktion der Isoflavonoidbiosynthese bereits untersucht. Es wurde in den durchgeführten Versuchen eine Membranpermeabilisierung der Zellkultur bei 1600 Volt festgestellt. Spannungen unter 1000 Volt übten generell keine permeabilisierende Wirkung auf die Membranen der Pflanzenzellen aus. Die Anwendung von Hochspannungsimpulsen (HSI) wirkte in einer Größenordnung von 1600 Volt insbesondere auf die aglykone Isoflavonoidbiosynthese sehr positiv. Hierbei erhöhte sich die Genistein- und Daidzeinkonzentration zwischen 50-80 % und die Konzentrationen der  $\beta$ -glykosidischen Formen zwischen 20-30 %. Dies ist anscheinend speziell durch die Porenerweiterung in der Membran infolge der angelegten Spannung geschehen. HSI erwies sich als starker physikalischer Elicitor der Isoflavonoidbiosynthese und wurde deshalb in der Versuchsdurchführung der Scale-up Untersuchungen aufgenommen.

## 5.2 Zusammenfassung für Scale-up Versuche

Die Isoflavonoidkonzentration blieb im konventionell aufgebauten Airlift-Bioreaktor ohne Parameteränderung im Vergleich zu den Batchversuchen im 200 mL Kolben gering. Innerhalb der ersten 4 Tage sanken die Konzentrationen der Isoflavonoide um über 90 % ab und konnten danach nur noch in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide wurden bereits nach 6 Tagen nicht mehr in Airlift-Bioreaktor gemessen. In den Batchversuchen konnten dagegen beispielsweise die aglykonen Isoflavonoide bis zu 2 Wochen lang bestimmt werden.

Die Untersuchungen der Volumeneffekte auf die Bildung der Isoflavonoide ergaben allgemein stark rückläufige Ergebnisse der Isoflavonoidkonzentrationen bei zunehmenden Volumen des Kultivierungsgefäßes. Die niedrigsten Konzentrationen der Sekundärmetabolite wurden in den hochvolumigsten Schüttelkolben (2000 mL) und im Airlift-Bioreaktor gefunden. Ein Anstieg im Durchmesser des Kultivierungsgefäßes bedeutet einen gleichsam Anstieg der Scherkräfte. Daher ist es erklärbar, daß im Allgemeinen in den Schüttelkolben mit ansteigenden Volumen durch die größer werdenden Scherkräfte die Isoflavonoidbiosynthese sukzessive beeinträchtigt wurde.

Mit dem Einbau von Fritten in den Begaserring des konventionellen aufgebauten Bioreaktors wurden im Vergleich zu den ohne Fritten Einbau (konventioneller Versuchsaufbau) verbesserte Vitalitätswerte der Pflanzenzellkulturen und eine höhere Biomasse während der Wachstumsphase erreicht. Fritten dienten zur einer Minimierung der im Bioreaktor auftretenden Scherkräfte aufgrund der Verfeinerung der Blasengröße, welches zudem auch eine Steigerung des O<sub>2</sub>-Partialdrucks zur Folge hatte. Der Einbau von Fritten in dem Bioreaktor zeigte für die aglykonen Isoflavonoide einen Anstieg und eine zeitliche Ausdehnung der Biosynthese in den ersten 4-6 Fermentationstagen. Die  $\beta$ -glykosodische Isoflavonoide hielten nach Einbau von Fritten einen höheren Isoflavonoidlevel in den ersten 4 Tagen im Vergleich zu den Versuchen ohne Einbau von Fritten aufrecht. Insbesondere bei Daidzin konnte eine 3-fach höhere Isoflavonoidkonzentration durch die Verwendung der Fritten gemessen werden. Dieser Einbau stellte eine homogene Mischung des Bioreaktorinhalts und eine Vermeidung von Totzonen im Airlift-Bioreaktor sicher.

Die O<sub>2</sub>-Regulierung auf einen 80 %-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck im Medium bewirkte, daß das Maximum des Wachstums von *Glycine max* schneller erreicht wurde als nach alleinigem Einbau von Fritten. Zusätzlich stieg die Vitalität der Zellen um über 40 % an. Es wurde eine Erweiterung des Nachweises der  $\beta$ -glykosodischen Isoflavonoide bis zum 10. Tag beobachtet, so daß eine bis zu 4-fach höhere Konzentration an Isoflavonoiden (Daidzin) nachgewiesen werden konnte (Abb. 60).

Die Zellkulturen wurden im Bioreaktor mit mehreren Hochspannungsimpulsen (HSI) behandelt. Die Anwendung des 2. Hochspannungsimpulses steigerte nach kurzer Adaptionphase das Wachstum der Zellkultur im Bioreaktor um 400 %. Zudem erreichten die Soja-Zellkulturen ihr Trockengewichtsmaximum 6 Tage früher als bei den Kontrollkulturen. Die Vitalität der Zellkultur wurde durch die 2. HSI-Behandlung um bis zu 50 % im Bioreaktor erhöht. Die Erwartungen eines positiven Effektes von HSI auf eine signifikante Steigerung der Isoflavonoidkonzentrationen erfüllten sich allerdings nicht. Sowohl nach der 1. als auch nach der 2. HSI-Behandlung wurden nur noch geringe Konzentrationen der aglykonen Isoflavonoide nachgewiesen. Dagegen konnte eine leichte Induktion der  $\beta$ -glykosidischen Isoflavonoide nach der 1. HSI-Behandlung festgestellt werden. Die 2. HSI-Behandlung bewirkte keine Änderung der Isoflavonoidkonzentrationen im Bioreaktor.

Der Zusatz von Methyljasmonat, der in den Batchversuchen sehr positiv auf die Isoflavonoidbildung (eine Steigerung um bis das 6 fache) gewirkt hatte, zeigte in den Experimenten, die im Bioreaktor durchgeführt wurden, auch eine Steigerung dieses Parameters. Es war eine Verlängerung des Isoflavonoidnachweises insbesondere bei Daidzin und somit eine Konzentrationserhöhung um bis das 3-fache erkennbar (Abb. 60).

Die Kopplung von Hochspannungsimpulsen mit Methyljasmonat im Airlift-Bioreaktor zeigte sowohl auf das Wachstum der Zellkulturen als auch auf die Bildung der Isoflavonoide keinen positiven Effekt. Nach Zugabe von Methyljasmonat in den Bioreaktor und HSI-Behandlung lag die gebildete Biomasse um fast 80 % unter dem Trockengewicht, das bei den Untersuchungen ohne Zusatz der Elicitoren erzielt wurde. Die Bildung der Isoflavonoide konnte sowohl nach der 1. als auch nach der 2. HSI-Behandlung nicht angeregt werden.

### **5.3 Abschließende Bemerkung**

Die Ergebnisse der Batchversuche zeigten deutliche Steigerungsraten der Isoflavonoidkonzentrationen in den Soja-Pflanzenzellen nach Applikation verschiedener Elicitoren. Eine Umsetzung der Ergebnisse im Scale-up-Maßstab erwies sich als schwierig, da auftretende Scherkräfte die Physiologie der Zellen beeinträchtigten. Allerdings könnte eine technische Weiterentwicklung des verwendeten Airlift-Bioreaktors, insbesondere im Bereich der hydrodynamischen Agitation in Nicht-Newtonschen-Fluide unter Berücksichtigung der rheologischen Eigenschaften der Soja-Zellkulturen eine Minimierung des Scherstress bewirken und somit zu einer erfolgreichen Kultivierung der Pflanzenzellen entscheidend beitragen. Es ist zudem voraussehbar, daß die Gentechnologie ihren Beitrag dazu leisten wird, scherkraftunempfindlichere und mit einer höheren Isoflavonoidsyntheseleistung ausgestattete Soja-Pflanzenzellen zu erforschen. Dies wird zu weiteren Fortschritten in der Ernährung der Bevölkerung führen und somit wichtige Impulse für den Kampf gegen die Zivilisationskrankheiten in der Gesellschaft geben.

## 6 Literaturverzeichnis

Adlercreutz, H. 1995. Phytoöstrogens-epidemiology and a possible role in a cancer protection. *Environmental Health Perspectives*. 103: 103-112

Aghighi, D. 1988. Airlift Fermenters offer Advantages in Plant Cell Scale-up Production. *Genetic Engineering News*. 8: 26-27

Akashi, T., Aoki, T., Ayabe, Si. 1999. Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-Hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiology*. 121: 821- 828

Akiyama, K., Kawazu, K., and Kobayashi, A. 1995. Partially N-Deacetylated Chitin Oligomers (Pentamer to Heptamer) are Potential Elicitors for (+)-Pisatin Induction in Pea Epicotyls. *Zeitschrift für Naturforschung* 50 (5-6): 391-397

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 262: 5592-5595

Anderson, J. W., Johnstone, B. M., Cook-Newell, M. E. 1995. Metaanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *Journal of Medicine*. 333: 276 -282

Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. 2002. Evaluation of Process-Induced Dimensional Changes in the Membrane Structure of Biological Cells Using Impedance Measurement. *Biotechnology Progress*. 18: 597-603

Angersbach, A., Knorr, D. 1997. Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse als Vorbehandlung zur Beeinflussung der Trocknungscharakteristika und Rehydratationseigenschaften von Kartoffelwürfeln. *Die Nahrung*. 41 (4): 194-200

Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. 2000. Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 1: 135-149

Apostol, I., Heinstejn, P. F., Low, P. S. 1989. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells. *Plant Physiology*. 90: 109-116

Balasubramanian, S., Balasubramaniam, V. M. 2003. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. *Food Research International*. 36: 661-668

Barbosa-Canovas G. V., Gongora-Nieto M. M, Pothakamury U. R, Swanson BG. 1999. *Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields*. San Diego: Academic Press

Barnes, S. 1998. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 217: 386-392

Barsotti, L., and Cheftel, C., 1999. Food Processing by Pulsed Electric Fields. II. Biological Aspects. *Food Review International*. 15(2): 181-213

Barz, W. 2000. Universität Münster. Persönliche Kommunikation.

Basak, S., Ramaswamy., Piette, J. P.G. 2002. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. Innovative Food Science & Emerging Technologies 3: 223-231

Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Natler-Hassar, T., Dörner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Elkind, Y. 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonialyase levels and phenylprpanoid accumulation in transgenic tobacco indentifies a rate determining step in natural product synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7608-7612

Beaumont, M.D., Pandya, und Knorr, D., 1989. Chitosan immobilization and permeabilization of cultured *Apium graveolens*, *Chenopodium rubrum* and *Daucus carota* cells. Food Biotechnology. 3(1): 71-87

Beggs, C. J., Stoltzer, J. A., Wellman, E. 1985. Isoflavonoid formation as an indicator of UV Stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves: The significance of photo-repair in assessing potential damage by increased solar UV-B radiation. Plant Physiology. 79: 630-634

Bernards, M. A., and Lewis, N. G. 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. Phytochemistry. 31: 3409-3412

Brodelius, P., Douglas, R., und Potrykus, I. 1988. Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen. Offenlegungsschrift Patent DE 3733927.3

Bronnenmeier, R., Markl, H. 1982. Hydrodynamic stress capacity of microorganism. Biotechnology and Bioengineering. 24: 5553-578

Buchholz, R., 1998. Biotechnik 1 Bioverfahrenstechnik, Skript zur Vorlesung (SS. 1998) der TU-Berlin, seite: 85

Buettner, G.R. and Mason, R.P. 1990. Spin-trapping methods for detecting superoxide and hydroxyl free radicals *in vitro* and *in vivo*. Methods of Enzymology 186; 127-133;

Buitelaar, R. M., Tramper, J. 1991. Strategies to improve the Production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. Journal of Biotechnology. 23: 111-141

Bush, D. S. 1993. Regulation of Cytosolic Calcium in Plants. Plant Physiology. 103: 7-13

Butt, V. S. and Lamb, C. J. 1981. Oxygenases and the Metabolism of Plant Products. In: The Biochemistry of Plants. Vol: 7 E. E. Conn (ed.), Academic Press, New York, seite: 627- 665

Butz, P., Fister, H., Losch, S., and Tauscher, B. 1996. Response of immobilized *Bacillus subtilis* Alpha Amylase to High Pressure Treatment. Food Biotechnology. 10 (2): 93-103

Boland, G. M., Donnely, M. X. 1998. Isoflavonoids and related compounds. Natural Production Report: 15. 241-260

- Castro, A. J., Barbosa-Canovas, G.V., and Swanson, B. G. 1993. Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Process Preservation*. 19: 47-73
- Castro, A. F., Altenberg, G. A. 1997. Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology*. 53: 89-93
- Cazale, A. C., Rouet-Mayer, M. A., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., Lauriere, C. 1998. Oxidative Burst and Hypoosmotic Stress in Tobacco Cell Suspensions. *Plant Physiology*. 116: 659-669
- Chaman, M. E., Copaja, S. V., Argandona, V. H., 2003. Relationships between Salicylic Acid Content, Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) Activity, and Resistance of Barley to Aphid Infestation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2227-2231
- Chang, D. C., Saunders, J. A., Chassy, B. M., Sowers, A. E. 1992. Overview of electroporation and electrofusion. In: *Guide to electroporation and electrofusion*. Page: 1-6. Eds: Chang, D. C., Saunders, J. A., Chassy, B. M., Sowers, A. E. Academic Press, Inc. San Diego. Calif.
- Chang, D. M., 2003. The snowball effect in Fed-Batch Bioreactions. *Biotechnology Progress*. 19: 1064-1070
- Cheftel, J.-C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents. In: *High Pressure and Biotechnology*, Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. (Hrsg.), Colloque Inserm / John Libbey & Co., London, 224: 195-209
- Cheftel, J.-C. 1995. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*. 1: 75-90
- Cherry, R. S., Papoutsakis, E. T. 1986. Hydrodynamic Effects on Cells in Agitated Tissue Culture Reactors. *Bioprocess Engineering*. 1:29-41
- Choi, Jeong-Woo., Cho, Gyu. Heon., Byun, Sang. Yo., Kim, Dong. Il. 2001. Integrated bioprocessing for plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 72: 69-99
- Choi, Y.S., Lee, B. H., Kim, J. H, Kim, N. S., 2000. Concentration of phytoestrogens in soybeans and soybean products in Korea. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 80: 1709-1712
- Chromeleon. 2000. *Chromatography Data Systems. Benutzerhandbuch. Version: 6.10. Safron.*
- Clas, T. 1994. Einfluß von elektrischen Hochspannungsimpulsen auf das Trocknungs-, Gefrier- und Garverhalten pflanzlicher Lebensmittel am Beispiel von Möhrenscheiben. Diplomarbeit Im Institut für Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität Berlin.
- Cline, S.D., and Coscia, C. J. 1988. Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiology*. 86: 161- 165

Creelmann, R. A., Mullet, J. E. 1995: Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 4114-4119.

Curtis, W.R. 1999. Achieving economic feasibility for moderate-value food and flavor additives: A perspective on productivity and proposal for production technology cost reduction. In: Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients (Fu, T.-J.; Singh, G.; Curtis, W.R., eds.) Kluwer Academic / Plenum Publishing, New York, NY, pp. 225-236

Curtin, M. E. 1983. Harvesting profitable products from plant tissue culture. Bio/Technology. 1: 649-657

Curtin, C., Zhang, W., Franco, C. 2003. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. Biotechnology Letters. 25: 1131-1135

Dicosmo, F., and Misawa, M. 1995. Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production. Biotechnology Advances, Vol.13: 425-453

Dixon, R. A., Bolwell, G. P., 1986 Secondary metabolism in plant cell cultures, Morris P, Scragg A.H. Stafford A, Fowler M N, Editors. Cambridge University Press, Chapter 11 pp 89-102

Dixon, R. A., Palva, N. L., 1995. Stress induced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell. 7: 1085-1097

Dixon, R. A., and Ferreira, D. 2002. Genistein. Phytochemistry. 60 (3): 205-211

Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H. J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence- a review . Gene. 179: 45-51

Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and the hyphal wall components. Physiology Plant Pathology. 23: 345-357

Doran, P. M. 1999. Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspensions in Stirred Reactors. Biotechnology Progress. 15 (3) :319-335

Doran, P. M., 1993. Design of Reactors for Plant Cells and Organs. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. 48: 115-168

Dörnenburg, H. und Knorr, D. 1994. Effectiveness of Plant-Derived and Microbial Polysaccharides as Elicitors for Anthraquinone Synthesis in *Morinda citrifolia* Cultures. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 1048-1052

Dörnenburg, H. und Knorr, D. 1996. Flavor Compounds with Cultured Cells and Tissues of *Vanilla* Speziess. Food Biotechnology. 10 (1): 75-92

Dörnenburg und Knorr, 1996 (b). Einsatz von Chitosan bei der Kultivierung pflanzlicher Zellkulturen. Bioforum. 3: 52-62

- Dörnenburg, H. und Knorr, D., 1998. Monitoring the Impact of High Pressure Processing on the Biosynthesis of the Plant Metabolites using Plant Cell Culture. *Trend Food Science Technology*. 9: 355-361
- Dunlop, E. H., Namdev, P. K., Rosenberg, M. S., 1994. Effect of Fluid Shear Forces on Plant Cell Suspensions. *Chemical Engineering Science*. 49, Nr.14: 2263-2276
- Eilert, U. 1987. Elicitation: methodology and aspects of application. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, F Constabel and IK Vasil eds. New York. Academic Press. Vol: 4, page: 153-196
- Eisenthal, A., Gelfand, A., Misonzhnik, F., Trejo; L., Schwartz, I., Skornick, Y., Lifschitz-Mercer, B. 1999. Exposure of Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to hydrostatic pressure increases their proliferative response to phytohemagglutinin A (PHA) and anti-CD<sub>3</sub> antibody. *Immunological Investigations*. 28: 55-65
- Elridge, A. C., 1982. Determination of Isoflavones in Soybean Flours, Protein Concentrates and Isolates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 30: 353-355
- Enikeev, A. G., Vysotskaya, E. F., Leonova, L. A. and Gamburg, K. Z. 1995. Viability Assay with 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride in Plant Cell Cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*. Vol. 42. No:3: 372-375
- Fang, Y., Smith, MAL., Pepin, M. F. 1999. Effects of exogenous Methyljasmonate in elicited Anthocyanin-producing Cell Cultures of Ohelo (*Vaccinium pahalae*). *In-Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 35: 106-113
- Fang, N., Yu, S. and Badger, T. M. 2002. Characterization of Isoflavones and Their Conjugates in Female Rat Urine Using LC/MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 2700-2707
- FDA. Food and Drug Administration Talk Paper. 1999. Nov. 10. T 98-80
- Fletcher, L., 2000. Power to the Pea Plant. *New Scientist*. July: 27-29
- Forkmann, G., and Heller, W. 1999. Biosynthesis of Flavonoids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry Volume I. Polyketides and other Secondary Metabolites including fatty Acids and their Derivatives*. Eds: Ushio Sankawa. Elsevier Verlag. Page: 713-748
- Fowler, M. W. 1988. Problems in commercial exploitation of plant cell cultures. In *Application of Plant cell and Tissue Culture*; Ciba Foundation Symp. 137; Bock, G, Marsch, J, Eds; Wiley: Chichester, page: 239-253
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., and Narala, K. K., 1994. Quantitation of Phytoestrogens in Legumes by HPLC. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42:1905-1913
- Franke, A. A., Custer, L. J., Wang, W., Yang-Shi, C. 1998. HPLC Analysis of Isoflavonoids and Other Phenolic Agent from Foods and from Human Fluids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Volume: 217 (1) : 263-273

Franken, E., Teuschel, U., Hain R. 1997. Recombinant proteins from transgenic plants Curent Opinion Biotechnology. 8: 411-416

Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Le Moigne, F., Culcasi, M., Pietri, S., Lauricella, R., and Tordo, P. 1995. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. Journal of Med. Chem. 38 (2); 258-265;

Funk, C., and P. Brodelius 1990. Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. Phytochemistry 29 (3): 845-848.

Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 1996. Quantifikation of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food Chemical Toxicology. 34: 457-461

Gaffney, T., Friedrich, L. Vernooij, B., Negretto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. 1993. Requirement of Salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. Science. 261: 754-756

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Experimental Cell Research. 50: 151-158

Garcia-Briones, M. A., Brodkey, R. S., Chalmers, J. J. 1994. Computer Simulations of the Rupture of a Gas Bubble at a Gas/Liquid Interface and its Omplications in Animal Cell Damage. Chemical Engineering Science. 49 (14): 2301-2320

Glassgen, W. E., Rose, A., Madlung, J., Gleitz, J., Seitz, H.U. 1998. Regulation of Enzymes involved in Anthocyanin Biosynthesis in Carrot Cell Cultures in Response to Treatment with Ultraviolet Light and Fungal Elicitors. Planta. 204 (4): 490-498

Griffith, A. P., Collison, M. W. 2001. Improved methods for the Extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 913: 397-413

Goldstein, W. E., 1999. In: Fu T-J, Singh G, Curtis W R (eds) Plant cell culture for the production of food ingredients. Kluwer Academic, NewYork, p: 195

Goodner, J. K., Hraddock, R. B., Parish, M. E. 1998. Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 1997-2000

Guardiola, J., Iborra, L., Canovas, M. 1995. A Model that links Growth and Secondary Metabolite Production in Plant Cell Suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering. 46: 291-297

Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 89: 2389-2393

- Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology. 40: 347-369
- Hakkak, R., Korourian, S., Shelnut, S. R., Lensing, S., Ronis, M. J., Badger, T. M. 2000. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protects against 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9: 113-117
- Hanagata, N. Ito, A., Uehara, H., Asari, F., Takeuchi, T. Karube, I. 1993. Behavior of cell aggregate of *Carthamus tinctorius* L. cultured cells and correlation with red pigment formation. Journal of Biotechnology. 30: 259-269
- Hashimoto, T., Azechi, S., Sugita, S., Suzuki, K. 1982. Large scale production of tobacco cells by continuous cultivation. In Plant Tissue Culture; Fujivara, A., Eds; Japanese Association for Plant Tissue Culture: Tokyo. page: 403-404
- Hay, C. A., Anderson, L. A., Roberts, M. F., Philipson, J. D. 1988. Alkaloid Production by plant cell cultures. In: Biotechnology in Agriculture; Mizrahi, A., Ed: Alan, R. Liss, Inc. Page: 97-140
- Hayashi, R. 1987. Possibility of High Pressure Technology for Cooking, Sterilization, Processing and Storage of Foods. Use of High Pressure in Food. Shokohin to Kaihatsu. 22: 55-61
- Hebert, J. R., Hurley, T. G., Olendzki, B. C., Teas, J., Ma, Y., Hampl, J. S. 1998. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. Journal National Cancer Institute. 90: 1637 -1647.
- Hegglin, M., Prenosil, J. E., Bourne, J. R. 1990. Reaktorsystem zur Massenkultivation von pflanzlichen Zellkulturen bei niedrigem hydrodynamischem Stress. Chimia. 44: 26-32
- Heinz, V., Mönsch, S., und Knorr, D., 2000. Hochleistungspulstechnik in der Lebensmittel- und Biotechnologie: Entkeimungs- und Zellaufschlußverfahren. Vortrag anlässlich der ISP Vortragsveranstaltung: Anwendungen der Hochleistungspulstechnik, Gelsenkirchen. 31.03.2000
- Heldt, H. W. 1996. Die Phenylpropanoide umfassen eine Vielzahl pflanzlicher Sekundärmetabolite und Zellwandbestandteile, in: Pflanzenbiochemie. Spektrum-Akademischer Verlag. 421-426
- Heß, D. 1992. Biotechnologie der Pflanzen. UTB für Wissenschaft. Verlag Eugen Ulmer GmbH&Co. Stuttgart
- Hite, B., 1899. The effect of Pressure in the Preservation of Milk. West Virginia Agriculture Exp. Station, Bulletin. 58: 15-35
- Ho, C. H., Henderson, K.A., Rorrer, G. L., 1995. Cell Damage and Oxygen Mass Transfer during Cultivation of *Nicotiana tabacum* in a Stirred-Tank Bioreactor. Biotechnology Progress. 11(2) :140-145
- Hooker, B. S., Lee, J. M., An, G., 1989. Response of Plant Tissue Culture to High Shear Environment. Enzyme Microbial Technology 11: 484-490

- Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D. 1997. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*.31: 69-84
- Honda, H., Liu, C., Kobayashi, T., 2001. Large Scale Plant Micropropagation. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Vol: 72: 157-182
- Hulst, A. C., and Tramper, J. 1989. Immobilized Plant Cells: A Literature Survey. *Enzyme Microbial Technology*. 11: 546-558
- Hunnius 1998. *Pharmazeutisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag. Berlin New York
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M. 2000. Soy Isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*. 130: 1695-1699
- Jeyamkondan, S., Yayas, D. S. and Holley, R. A. 1999. Pulsed Electric Field Processing of foods: A Review. *Journal of Food Protection*. Vol. 62 (9) : 1088-1096
- Joannou, G. E., Kelly, G. E., Reeder, A. Y., Waring, M. and Nelson, C. 1995. A Urinary Profile Study of Dietary Phytoestrogens. The Identification and Mode of Metabolism of New Isoflavonoids. *Journal of Steroid Biochemie and Moleculae Biology*. Vol: 54, No. 3/4: 167-184
- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M. 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*. 18: 208-212
- Kekez, M. M., Savic, P., Johnson, B. F. 1996. Contribution to the biophysics of the lethal effects of electric fields on microorganism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1278: 79-88
- Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P. B., Warber, S., Bolling, S., Chang, S. C. 2003. Antioxidant capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3973-3976
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D. M., 1997. Plant Cell Suspension Cultures: some Engineering Considerations. *Journal of Biotechnology*. 59: 39-52
- Kieran, P. M., Malone, D. M., MacLoughlin, P. F. 2000. Effect of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*. Vol. 67: 139-177
- Kieran, P. M., O'Donnell, H. J., Malone, D.M., MacLoughlin, P.F. 1995. Fluid Shear Effects on Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnology & Bioengineering*. 45: 415-425
- Kim, D-I., Cho, G. H., Pedersen, H. and Chin, C-K. 1991. A hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions. *Applied Microbiological Biotechnology*. 34: 726-729

- Kim, H., Peterson, T. G., Barnes, S. 1998. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68 :1418S-1425S
- King, R. A. und Bursill, D. B. 1998. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 67: 867-872
- Kinoshita, E., Ozawa, Y., and Aishima, T., 1997. Novel Tartaric Acid Isoflavone Derivates that play key roles in differentiating Japanese Soy Sauces. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45: 10; 3753-3759
- Kinnersley A. M., Dougall D. K . 1980. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell aggregate size. *Planta* 148: 200-204
- Kneer, R., Poulev, A. A., Olesinski, A., and Raskin, Ilya., 1999. Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *Journal of Experimental Botany*. Vol: 50, No. 339: 1553-1559
- Knight, D. C., Eden, J. A. 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstetrics and Gynecology*. 87: 897- 904
- Knobloch, K.H., Hahlbrock, K. 1977. 4-Coumarate Coa Ligase from Cell Suspension cultures of *Petroselinum hortense* *Archive of Biochemistry and Biophysics*. 184: 237-248
- Knorr, D., 1999. Novel Approaches in Food Processing Technology: New Technologies for Preserving Foods and Modifying Function. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 485-491
- Knorr, D. 1996. Advantages, opportunities and challenges of high hydrostatic pressure application to food systems. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Hayashi, R. und Balny, C. (Hrsg.), Elsevier Science B. V., 279-287
- Kohle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W and Kauss, H. 1985. Chitosan-elicited callose synthesis in soy bean cells as a Ca<sup>2+</sup>- dependent process. *Plant Physiology*. 77: 544-551
- Kolonel, L. N., Hankin, J. H., Whittemore, A. S., Wu, A. H., Gallagher, R. P., Wilkens, L. R. 2000. Vegetables fruits legumes and prostate cancer : a multiethnic case control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 9: 795-804
- Kuboi, T., Yamada, Y. 1976. Caffeic Acid-O-Methyltransferase in Suspension of Cell Aggregates of Tobacco. *Phytochemistry*. 15: 397-400
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J. A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138: 863-870
- Kulling, S. E., Watzl, B. 2003. Phytoöstrogene. *Ernährungsumschau*. 6. Juni. 50. Jahrgang: 234-239
- Kutney, J. P. 1993. Plant cell culture combined with chemistry : a powerful route to complex natural products. *Journal of American Chemical Society*. 26: 559-566

- Li, J., Ou-Lee, T-M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L. 1993. Arabidopsis Flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*. 5: 171-179
- Liggins, J., Leslie, J. C., Bluck, W., Coward, A., and Bingham, S. A. 1998. Extraction and Quantification of Daidzein and Genistein in Food. *Analytical Biochemistry*. 264: 1-7
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., 1983. Novel experimental system for studying the production of secondary metabolite by plant tissue cultures, dari mantel, S.H., Smith, H. (Eds.). *Plant Biotechnology*, Cambridge University Press, London, 39-66
- Lindl, T. und Bauer, J. 2002. *Zell und Gewebekultur* (5. Auflage), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lamb, C., Dixon, R. A. 1997. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 48: 251-275
- Leckie, F., Scragg, A. H., Cliffe, K.C. 1991. Effect of Bioreactor Design and Agitator Speed on the Growth and Alkaloid Accumulation by Cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microbial Technologie*. 13 : 296-301
- Lee, J., Klüsener, J., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A. C., Panopoulos, N. J., Nöller, J., Weiler, E. W., Cornelis, G. R., Mansfield, J. W., Nürnberger, T. 2001. HrpZ PspH from the Plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proceeding of the National Academical Science*. 98 (1): 289-294
- Legendre, L., Rueter, S., Heinstein, P.F., Low, P. S. 1993. Characterization of the Oligogalacturonide-Induced Oxidative Burst in Cultured Soybean (*Glycine max*) Cells. *Plant Physiology*. 102: 233-240
- Lois, R. and Buchanan, B. B. 1994. Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanism of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta*. 194: 504-509
- Low, P.S., Merida, J. R. 1996. Review: The oxidative Burst in Plant Defence Function and Signal Transduction. *Physiologia Plantarum* (Denmark). 96 (3) :533-542
- Lucore, L. A., Shellhammer, T. H. and Yousef, A. E. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on Artificially Contaminated Frankfurters by High-Pressure Processing. *Journal of Food Protection*. 63 (5): 662-664
- Madhusudhan, R. Ravishankar, G. A. 1996. Gradient of anthocyanin in cell aggregates of *Daucus carota* in suspension cultures. *Biotechnology Letters*. 18: 1253-1256
- McDonald, K. A. and Jackman, A. P. 1989. Bioreactor Studies of Growth and Nutrient Utilization in Alfaalfa Suspension Cultures. *Plant Cell Reports*. 8. 455-458
- MacLoughlin, P.F., Malone, D. M., Murtagh, J.T., Kieran, P.M., 1998. The Effects of Turbulent Jet Flows on Plant Cell Suspension Cultures. *Biotechnology & Bioengineering*. 58 (6): 595-604

Mantell, S. H., Smith, H. 1983. Cultural Factors that Influence Secondary Metabolite Accumulations in Plant Cell and Tissue Cultures. pp.75-108 In: S. H. Mantell and H. Smith (eds), Plant Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge

Marcovits, J., Linassier, C. Fosse, P., Couprie, L, Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J M., Le Pecq, J B., Larsen, A. 1989. Inhibitory effects of the tyrosin kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. Cancer Research. 49: 5111-5117

Martin, S. M. 1980. Mass culture systems for plant cell suspensions. In: Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals (Staba EJ), Page: 149-166. CRC Press. Boca Raton

Masson, P. 1999. Action of hydrostatic pressure on proteins: emergence of high pressure biotechnology, potential pharmaceutical and medical applications. Annales Pharmaceutiques Francaises. 57: 49-55

Meijer, J. J., van Hoopen, H.J.G. and Luyben, K. C. A. M. 1993. Effect of Hydrodynamic Stress on Cultured Plant Cells: A Literature Survey. Enzyme Microbial Technology. 15: 234-238

Meijer, J.J., van Hoopen, H.J.G., van Gameren, Y.M., Luyben K. A.M., Libbenga, K.R., 1994. Effects of Hydrodynamic Stress on the Growth of Plant Cells in Batch and Continuous Culture. Enzyme Microbial Technology. 16 : 467-477

Meksem, K., Njiti, V. N., Banz, W. J., Iqbal, M. J., Kassem, My. M., Hyten, D. L., Yuang, J., Winters, T. A., and Lightfoot. D. A. 2001. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1:1: 38-44

Merchuk, J. C. 1990. Why use air-liftbioreaktor? 1990. TIBTECH. March. Vol: 8: 66-71

Meyer, R., Cooper, K. L., Knorr, D., and Lelieveld, H. 2000. High-pressure sterilization of Foods. Food Technology. 54 (11) : 67-72

Meyer, V. R. 1999. Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, II. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim

Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defence against pathogens. Plant Physiology. 105:467-472

Mehdy, M.C., Sharma, Y. K., Sathasivan, K., Bays, N. W., 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. Physiologia Plantarum. 98: 365-375

Messina, M. J. 1999(a). Legumes and Soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. American Journal of Clinical Nutrition. Vol: 70, 3: 439-450

Messina, M. J., 1999. Positive Eigenschaften der Soja-Isoflavone. ASA News aus Internet: [www.asa-hamburg.de/04/04a\\_17.html](http://www.asa-hamburg.de/04/04a_17.html) (Stand 14.09.2001)

Messens, W., Van Camp, J. und Huyghebaert, A., 1997. The Use of Modify the Functionality of Food Proteins. Trends Food Science-Technology. 8: 107-112

- Min-Soo, K., Lee, W. K., Kim, H-Y., Kim, C. and Ryu, Y-W. 1998. Effect of Environmental Factors on Flavonol Glycoside Production and Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Cell Suspension Cultures of *Ginkgo biloba*. 8(3): 237-244
- Min, S., Jin, Z.T., Zhang, O.H. 2003. Commercial Scale Pulsed Electric Fields Processing of Tomato Juice. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51: 3338-3344
- Motobu, M., Wang, P-C., and Matsumura, M. 1998. Effect of Shear Stress on Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 85 No. 2: 190-195
- Murphy, P.A., Song, T.T., Buseman, G., Barua, K., 1997. Isoflavones in Soy-Based Infant Formula. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45: 4635-4638
- Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonagai, Y. 2000. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. Journal of Association of Agricultural Chemists Internatinal. May-Jun. 83(3): 635-50
- Newbold, R. R., Banks, E. P., Bullock, B., Jefferson, W. N. 2001. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. Cancer Research. 61: 4325-4328
- Nguyen, B.L., Van Loey, A., Fachin, D., Verlent I., Hendrickx, I. M. 2002. Purification, characterization thermal and high pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas. Biotechnology and Bioengineering. 78 (6): 683-691
- Nienow, A.W., 1998. Hydrodynamics of Stirred Bioreactors in "Fluid Mechanics Problems in Biotechnology", R. Pohorecki, ed., Applied Mechanical Review. 51: 3-32
- Nürnbergger, T. 1999. Signal perception in plant pathogen defense. Cellular and Molecular Life Sciences. 55: 167-182
- Ohshima, T., Ushio, H., and Koizumi, C. 1993. High-pressure processing of fish and fish products. Trends in Food Science and Technology. 4: 370-375
- Panda, A. K., Mishra, S., Bisaria, V. S., Bhojwani, S. S. 1989. Plant cell reactors: a perspective. Enzyme Microbioal Technology. 11: 386-397
- Papadaki, M., and Eskin, S. G. 1997. Effect of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. Biotechnology Progress. 13: 209-221
- Payne, G. F., Payne, N.N., Shuler, M.L. und Asada, M., 1988. In situ absorption for enhanced alkaloid production by *Catharantus roseus*. Biotechnology Letters. 10: 187-192.
- Payne, G. F., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M. L. 1991. Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. Hanser Publisher. Munich, Vienna, New York. Page: 346
- Parr, A. J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. Journal of Biotechnology. 10: 1-26

- Parish, M. E. 1998. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *Journal of Food Safety*. 18: 57-65
- Parr, A J, Bolwell G P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potentials for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985 - 1012.
- Peterson, G. 1995. Evaluation of the biochemical targets genistein in tumor cells. *Journal of Nutrition*. 125: 784-789
- Potas, D. 2002. Kontinuierliche Produktion von Isoflavonoiden aus Sojabohnenzellkulturen im Bioreaktor durch Hochspannungsimpuls induzierte Stressreaktionen. Diplomarbeit. Im Institut für Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität Berlin
- Prestamo, G. Sanz, P. D., Fonberg-Broczek, M., and Arroyo, G. 1999. High pressure response of fruit jams contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 28: 313-316
- Prokop, A., Bajpai, R. K. 1992. The Sensitivity of Biocatalysts to Hydrodynamic Shear Stress. *Advances in Applied Microbiology* 37:165-232
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Fingerhut, G. H., Rhodehamel, E. L., Balasubramaniam, V. M., and Palaniappan, S. 1999. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *Journal of Food Safety*. 19: 277-288
- Reichling, J., 1985. Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis. Teil 1. GIT Fachzeitschrift Labor. 5/85:388-395
- Riahi, E. and Ramaswamy, H. S. 2003. High-Pressure Processing of Apple Juice: Kinetics of Pektin Methylesterase Inactivation. *Biotechnology Progress*. 19: 908-914
- Richter, G. 1988. Stoffwechselphysiologie der Pflanzen Physiologie und Biochemie des Primär-und Sekundärstoffwechsels. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart New York
- Rittershaus, E., Ulrich, J., Westphal, K., 1990. Large-scale Production of plant cell Cultures. Symposium Newsletter. International Association Plant Tissue Culture Newsletter. 61: 2-10
- Ritz, M., Courcoux, C., Semenou, M., and Federighi, M. 1998. High hydrostatic pressure investigation of *Salmonella typhimurium*: effects of pressure, duration pH and temperature studied by analysis of variance. *Veterinary Research*. 29: 547-556
- Rijhwani, S.K.; Shanks, J.V. 1998. Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indolealkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology Progress*. 14: 442-449.
- Rovere, P. 1995. The third dimension of food technology. *Technologie Alimentari. Tetra Pak Report*. 19: 277-288

- Ruiz, J. M., Bretoes, G., Baghour, M., Ragala, L., Belakbir, A., Romero, L. 1998 Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry*. 48: 269-272
- Rupp, H., Zoller, O., Zimmerl, B. 2000. Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein in sojahaltigen Produkten. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. Vol. 91: 199-223
- Saglio, P. H., Raymond, P. and Pradet, A. 1983. Oxygen Transport and Root Respiration of Maize Seedlings. *Plant Physiology*. 72: 1035-1039
- Sahai, O., 1994. In: Gabelman A. (ed) *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*. John Wiley, New York, p 239
- Sale, A. J. H. and Hamilton, W. H. 1967. Effects of high electric Fields on Mikroorganism. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta*. 148: 789-800
- Schermuly, W., Blass, E. 1990. Pflanzliche Zellkulturen aus der Sicht des Ingenieurs. Teil-1:wirtschaftliche, reaktionstechnische und apparative Randbedingungen künstlich angelegter Pflanzenzellkulturen. *BioEngineering* 2/90 6. 43-52
- Schneid, R., 2002. Jasmonsäure. aus Internet: <http://www.rz.uni-frankfurt.de/~rschneid/biologie/Jasmon.htm> (Stand 20.01.2002)
- Schirsat, S. G. and Nair, P. M. 1981. Biochemical Mechanism for the Inhibition of Phenylalanine Ammonia-Lyase Induction in the Absence of Oxygen in *Potato tuber* Tissue. *Phytochemistry*. 20: 2315-2318
- Schreck, S., Dörnenburg, H., Knorr, D., 1996. Evaluation of Hydrogen Peroxide Production in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension Cultures as a Stress Reaction to High Pressure Treatment. *Food Biotechnology*. 10 (2) :163-171
- Schragg, A. H. 1992. Bioreactor for the mass cultivation of plant cells. In: *Comprehensive Biotechnology, Plant Biotechnology* (Moo-Young. M, ed), Vol: 2 page: 45-62, Pergamon Press, Oxford
- Scragg, A. H., Bond, P. H., Fowler, M. W. 1988. Bioreactor performance, mixing and shear in the large scale growth of plant cells. *Proceeding of the 6th European Conference on Mixing, Pavia-Italy*. May 24-26; BHRA, The Fluid Engineering Centre: Cranfield, U.K. Page: 457-464
- Scragg, A. H., El, Allah., and Leckie, F. 1988b. Effects of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microbial Technology*. 10: 361-367
- Scragg, A. H. 1991. *Plant Cell Bioreactors*. In *Plant and Tissue Culture*. Stafford A., Wareen, G. Editors. Open University Press. Buckingham. UK. page: 220-239
- Setchell, K. D. R., Cassidy, A. 1999. Dietary Isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*. 129: 758S-767S

- Setchell, K. D. R., Faughnan, M. S., Avades T., Zimmer-Nechamias, L., Nadina, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P., Cassidy, A. 2003. Comparing the Pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77: 411-419
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechamias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirscher, A. S., Sassidy, A., Heubi, J. 2001. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*. 131. 1S-14S
- Setchell, K. D.R., Cole, S. J. 2003. Variations in Isoflavone Levels in Soy Foods and Soy Protein Isolates and Issues Related to Isoflavone Databases and Food Labeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 4146-4155
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. und Knorr, D., 1996. Pressure induced inactivation of selected food systems. *Journal of Food Science*. 61 (2): 308-310
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A., Lamb, C., 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell*. 9: 261-270
- Shu, X. O., Jin, F., Dai, Q., Wen, W. O., Potter, J. D., Kushi, L.H. 2001. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epid. Biomarkers Prevent*. 10: 483-488
- Singh, G., Curtis, W. R., 1994. In: Shargool PD, Ngo TT (eds) *Biotechnological applications of plant cultures*. CRC. Press, Boca Raton, FL, page: 151
- Smart, N. J. and Fowler, M. W. 1984. Mass cultivation of *Cantharanthus roseus* cells using a nonmechanically agitated bioreactor. *Applied Biochemie and Biotechnology*. 9. 84 :209-214
- Smelt, J., P. P. M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*. 9: 152-158
- Stafford, A., Morris, P., Fowler, M.W. 1986. Plant cell biotechnology: a perspective (review). *Enzyme Microbial Technology*. 8: 578-587
- Stadler, N. 2003. Persönliche Kommunikation. Heart Research Institut. University of Sydney.
- Stallaert, V. M., Ducruet, J.-M., Tavernier, E., and Blein, J.-P., 1995. Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with the elicitor cryptogenin :evaluation by high-temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *Biochemical Biophysical Acta*. 1229: 290-295
- Stute, R., Klingler, R. W., Boguslawski, S., Eshtiaghi, M. N., Knorr, D. 1996. Effects of High Pressure Treatment on Starches. *Starch/Stärke*. 48. Nr.11/12: 399-408
- Song, T., Barua, K., Buseman, G., Murphy, P.A. 1998. Soy Isoflavone Analysis: Quality Control and a new Internal Standard. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68: 1474S-1479S

- Sun, X., and Linden, J. C. 1999. Shear stress effects on plant cell suspension cultures in Arotating Wall Vessel Bioreaktor. *Journal of Industrial Microbiology & Bioengineering*. 22: 44-47
- Sutherland, M. W. 1991. The Generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 39: 79-93
- Synowiecki, J., und Al-Khateeb, N. A. 2003. Production, Properties, and some new Applications of Chitin and Its Derivates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43 (2) : 145-171
- Taza-Asaba, N. 2001. Stress Induced Biosynthesis of Isoflavones in Soy Cell Culture. Diplomarbeit. Im Institut für Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität Berlin.
- Takeda, T., Seki, M., Furusaka, S. 1994. Hydrodynamic Damage of Cultured Cells of *Carthamus tinctorius* in Stirred Tank Reactor. *Journal of Chemical Engineering Japan*. 27: 466-472
- Takeda, T., Kitagawa, T., Takeuchi, Y., Seki, M., Furusaka, S., 1998. Metabolic Responses of Plant Cell Culture on Hydrodynamic Stress. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 76: 267-275
- Tanaka, H. 1981. Technological Problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnology and Bioengineering*. 23: 1203-1218
- Tanaka, H. 1987. Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review. *Process Biochemie*. 22: 106-113
- Teuscher, B. 1990. Pharmazeutische Biologie. Vieweg Verlag. Braunschweig, Wiesbaden
- Tharanathan, R. N., und Kittur, F. S. 2003. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . 43 (1): 61-87
- Thomas, C. R. 1990. In: Winkler M A (ed) *Critical reports in applied chemistry: Chemical Engineering Problems in Biotechnology*, Vol 29. Elsevier Applied Science, London, p 23
- Toshiyo, T. T., Seki, M., and Furusaki, S. 1994. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *Journal of Chemical Engineering Japan*. 27: 466-471
- Towill, L. und Mazur, P. 1974. Studies on the Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium-chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Cultures. *Canadian Journal of Botanic*. 53: 1097-1102
- Tsong, T. Y. 1991. Electroporation of Cell Membrans. *Biophysical Journal*. 60: 297-306
- Ulbrich, B., Wiesner, W., Arens, H. 1985. Large-scale production of rosmarinic acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blumei* Benth. In *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*; Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E., Eds.; Springer-Verlag: Berlin. Page: 293-303

- Versantvoort, C., Broxterman, H., Lankelma, J., Feller, N., Pinedo, H. 1994. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 48: 1129-1136
- Walker, T. S., Bais, H. P., Halligan, K.M., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M. 2003. Metabolic Profiling of Root Exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2548-2554
- Wang, H. J. and Murphy, Patricia A., 1994a. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1666-1673
- Wang, Huei-Ju und Murphy, Patricia A. 1994b. Isoflavone composition in American and Japanese Soybeans in Iowa Effects of variety crop year and location. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1674-1677
- Wang, Huei-Ju and Murphy, Patricia A., 1996. Mass Balance Study of Isoflavones during Soybean Processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 2377-2383
- Wanger, F. and Vogelmann, H. 1977 Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application* (Barz W, E Reinhard and M H Zenk, eds) page: 245-252. Springer-Verlag. Berlin
- Wähälä, K., Salakka, A., Adlercreutz, H. 1998. Synthesis of Novel Mammalian Metabolites of the Isoflavonoid Phytoestrogens Daidzein and Genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 217(1): 293-299
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wähälä, K., Adlercreutz, H. 1998. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *Journal of Nutrition*. 128: 1710-1715
- Weiler, E. W. 1997. Octadecanoid-mediated Signal Transduction in Higher Plants. *Naturwissenschaften*. 84. 340-349
- Weipert, D., Tscheuschner, H.-D., Windhab, E. 1993. *Rheologie der Lebensmittel*. B. Behr's Verlag GmbH & Co. Hamburg
- Wojtaszek, P. 1997. Review Article: Oxidative Burst, an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical Journal*. 322: 681-692
- Wilson, R. G., Trogadis, J. E., Zimmerman, S., Zimmerman, A. M. 2001. Hydrostatic Pressure Induced Changes in the Cytoarchitecture of Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Cell Biology International*. 25. 7: 649-665
- Wilson, G. 1980. Continuous Culture of Plant Cells using the Chemostat Principle. *Advance Biochemical Engineering & Biotechnology*. 16:1-25
- Wongsamuth, R. und Doran, P. M. 1994. Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 481-488

- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I., Shah, D. M. 1997. Activation of Host Defence Mechanism by Elevated Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Transgenic Plants. *Plant Physiology*. 115: 427-435
- Yahraus, T., Chandrs, S., Legendre, L., Low, P.S. 1995. Evidence for a Mechanically Induced Oxidative Burst. *Plant Physiology*. 109: 1259-1266
- Yan, L., Yee, J. A., Lee, D. 2000. Soyprotein isolate and spontaneous metastasis of mammary carcinoma cells in mice. *Proceeding American Association Cancer Research*. 41: 1-6
- Yeoman, M.M., Lindsey, K., Miedzybrodzaka, M.B. und Mc. Lauchlan, W. R., 1982. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. In: Yeoman, M.M. und Truman, D.E.S. (eds.), *Differentiation in Vitro*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 65-82.
- Zenk, M. H., El-Shagi, H., Arens, H., Stockigt, J., Weiler, E. W., Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalinein cell suspension cultures of *Cantharanthus roseus*, in Barz, W., Reinhart, E., Zenk, M.H. *Plant Tissue Culture and its biotechnical Applications*. Springer-Verlag Berlin: seite: 27
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*. 162: 459-468
- Zhong, J. J., Yu, J. T., Yoshida, T. 1995. Recent Advances in Plant Cell Cultures in Bioreactors. *World Journal of Microbial Biotechnology*. 11 (4): 461-467
- Zhong, J. J. 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Vol. 72: 1-24
- Zhou, J. R., Gugger, E. T., Tanaka, T., Guo, Y., Blackburn, G. L., Clinton, S. K. 1999. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplatable human prostata carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *Journal of Nutrition*. 129: 1628-1635
- Zimmermann, U. 1986. Electric breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Review Physical Biochemical Pharmacology*. 105: 196-256
- Ziv, M. 2000. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. *Horticultural Reviews*. 24: 1-29
- Zook, C. D., Parish, M. E., Braddock, R. J., Balaban, M. O. 1999. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. *Journal of Food Science*. 64: 533-535

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Soja-produzierende Länder weltweit
- Abb. 2: Metabolisierung von Genistein und Daidzein beim Menschen nach Joannou et al., 1995
- Abb. 3: Flavangrundgerüst (2-Phenylchroman)
- Abb. 4: Biosynthese der Phenylchromanderivate; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> stellen unterschiedliche organische Reste dar (nach Teuscher, 1990).
- Abb. 5: Molekulare Struktur von Isoflavonoiden nach Liggins *et al.*, 1998
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Produktion von Sekundärmetabolite mit Hilfe der in vitro-Kulturen
- Abb. 7: Schematische Darstellung des konventionell aufgebauten Bioreaktors
- Abb. 8: Darstellung des Airlift-Bioreaktors (im Vordergrund) während der Kultivierung mit angeschlossener HSI-Einheit
- Abb. 9: Kalibrationskurven der 4 Isoflavonoide
- Abb. 10: Darstellung der verschiedenen UV-Spektren der untersuchten Isoflavonoide durch den Dioden-Array-Detektor
- Abb. 11: Chromatographische Analyse der 4 untersuchten Isoflavonoide mit Hilfe der HPLC
- Abb. 12: Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkulturen im Schüttelkolben (200 mL)
- Abb. 13: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Schüttelkolben
- Abb. 14: Vitalität der Soja-Zellkulturen während der Wachstumsphase im Schüttelkolben (200 mL)
- Abb. 15: Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln an gefriergetrockneten Soja-Zellkulturen
- Abb. 16: Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln an gefriergetrockneten Soja-Zellkulturen
- Abb. 17a: Nachweis der Genistein- und Daidzeinkonzentrationen bei unterschiedlichen Sojaprodukten durch HPLC-Analyse
- Abb. 17b: Nachweis der Genistin- und Daidzinkonzentrationen bei unterschiedlichen Sojaprodukten durch HPLC-Analyse
- Abb. 18: Daidzein- und Genisteinkonzentration im Schüttelkolben während der Wachstumsphase der Pflanzenzellkultur
- Abb. 19: Daidzin- und Genistinkonzentration im Schüttelkolben während der Wachstumsphase der Pflanzenzellkultur
- Abb. 20: Genistein- und Daidzeinkonzentrationen nach Applikation folgender Elicitoren
- Abb. 21: Genistin- und Daidzinkonzentrationen nach Applikation folgender Elicitoren
- Abb. 22: Genistein- und Daidzeinbiosynthese bei Applikation folgender Elicitoren
- Abb. 23: Wirkung der ausgewählten Elicitoren auf die Biosynthese von Genistin und Daidzin
- Abb. 24: Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Daidzein- und Genisteinkonzentration in den Zellkulturen
- Abb. 25: Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Daidzin- und Genistinkonzentration in den Zellkulturen
- Abb. 26: Einfluß von hydrostatischem Hochdruck und Kälteschock auf die Genistein- und Daidzeinkonzentration bei Methode
- Abb. 27: Einfluß von hydrostatischem Hochdruck und Kälteschock auf die Genistin- und Daidzinkonzentration bei Methode

- Abb. 28: Membranpermeabilität (dargestellt als Leitfähigkeit) bei verschiedenen Spannungen in Abhängigkeit vom Alter der Soja-Zellkulturen
- Abb. 29: Einfluß von Hochspannungsimpulsen auf die Genistein- und Daidzeinkonzentration bei 7 Tage alten Kulturen
- Abb. 30: Einfluß von Hochspannungsimpulsen auf die Genistin- und Daidzinkonzentration bei 7 Tage alten Kulturen
- Abb. 31: Daidzein- und Genisteinkonzentration im Airlift-Bioreaktor beim konventionellen Versuchsaufbau (ohne Einbau von Fritten)
- Abb. 32: Daidzin- und Genistinkonzentration im Airlift-Bioreaktor beim konventionellen Versuchsaufbau (ohne Einbau von Fritten)
- Abb. 33a: Volumeneffekte auf die Bildung von Genistein
- Abb. 33b: Volumeneffekte auf die Bildung von Daidzein
- Abb. 33c: Volumeneffekte auf die Bildung von Genistin
- Abb. 33d: Volumeneffekte auf die Bildung von Daidzin
- Abb. 34: Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkultur im Airlift-Bioreaktor nach Einbau von Fritten
- Abb. 35: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach dem Einbau von Fritten
- Abb. 36: Vitalitätsvergleich der Sojazellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor ohne Einbau von Fritten - und nach Einbau von Fritten
- Abb. 37: Daidzein- und Genisteinkonzentration im Airlift-Bioreaktor während der Wachstumsphase nach Einbau von Fritten
- Abb. 38: Daidzin- und Genistinkonzentration im Airlift-Bioreaktor während der Wachstumsphase nach Einbau der Fritten
- Abb. 39: Prozentuale O<sub>2</sub>-Konzentration des Kulturmediums im Airlift-Bioreaktor ohne Regulierung der Belüftung (bei 0,4 bar Anfangsregulierung), bei einer manuellen Regulierung der Belüftung (zw. 0,25 und 0,3 bar) auf 40 %  $\pm$  5 % Sauerstoffsättigung und bei einer manuellen Regulierung (zw. 0,5 und 0,6 bar) auf 80 %  $\pm$  5 % Sauerstoffsättigung
- Abb. 40: Wachstum von *Glycine max* Pflanzenzellkultur im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm$  5) O<sub>2</sub>-Sättigung mit Hilfe von Fritten.
- Abb. 41: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm$  5) O<sub>2</sub>-Sättigung
- Abb. 42: Vitalität der Sojazellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor bei 80 % ( $\pm$  5) O<sub>2</sub>-Sättigung
- Abb. 43: Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der manuellen Regulierung der Belüftung auf 80 % ( $\pm$  5) O<sub>2</sub>-Sättigung mit Hilfe von Fritten
- Abb. 44: Genistin- und Daidzinkonzentration nach der manuellen Regulierung der Belüftung bei 80 % ( $\pm$  5) O<sub>2</sub>-Sättigung
- Abb. 45: Wachstum von *Glycine max* Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung mit 1600 Volt am 2., 4., 6., und 8. Tag
- Abb. 46: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung am 2., 4., 6., und 8. Tag
- Abb. 47: Vitalität der Sojazellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach der HSI-Behandlung
- Abb. 48: Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor bei Einstellung eines 80 %-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck
- Abb. 49: Genistin- und Daidzinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor bei Einstellung eines 80 %-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck
- Abb. 50: Wachstum von *Glycine max* Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach der Applikation von Methyljasmonat
- Abb. 51: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach Zusatz von Methyljasmonat

- Abb. 52: Vitalität der Soja-Zellkulturen im Airlift-Bioreaktor nach Methyljasmonatapplikation
- Abb. 53: Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der Methyljasmonatapplikation im Airlift-Bioreaktor.
- Abb. 54: Genistin- und Daidzinkonzentration nach dem Methyljasmonatzusatz im Airlift-Bioreaktor
- Abb. 55: Wachstum von *Glycine max* Zellkultur mit HSI-Behandlung am 2. und 4. Tag im Airlift-Bioreaktor und Methyljasmonatzugabe
- Abb. 56: Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums während der Wachstumsphase mit HSI- Behandlung am 2. und 4. Tag im Airlift-Bioreaktor und Methyljasmonatzugabe
- Abb. 57: Vitalität der Soja-Zellkulturen während der Wachstumsphase im Airlift-Bioreaktor nach HSI-Behandlung am 2. und 4. Tag und Methyljasmonatzugabe
- Abb. 58: Genistein- und Daidzeinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor. Zu Anfang der Untersuchungen wurden Methyljasmonat dem Medium hinzugefügt
- Abb. 59: Genistin- und Daidzinkonzentration nach der HSI-Behandlung im Bioreaktor. Zu Anfang der Untersuchungen wurde Methyljasmonat dem Medium hinzugefügt
- Abb. 60: Vergleich der verschiedenen Isoflavonoidkonzentrationen (IK) während der Kultivierung im Airlift-Bioreaktor nach Änderung folgender Versuchsparameter

## 7.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Wirkung verschiedener bioaktiver Substanzen mit potentiell krankheitsvorbeugenden Mechanismen.
- Tab. 2: Zusammensetzung des B<sub>5</sub> Mediums
- Tab. 3: Bestimmungsgrenzen der untersuchten Isoflavonoide
- Tab. 4: Leistung der Gradienten zur Trennung der Isoflavonoide
- Tab. 5: Konzentrationen der Isoflavonoid-Standards für die HPLC-Eichkurve

## Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meinem Doktorvater und akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. D. Knorr für die Überlassung dieses Themas, für seine motivierende, hilfsbereite auch fordernde Art bei der Durchführung dieser Dissertation herzlich bedanken. Er stand mir wie für das Dissertationsvorhaben in gleicher Weise kritischen Situationen ganz besonders zur Seite. Für seine Unterstützung werde ich ihm immer dankbar sein.

Meinen besonderen Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Kunzek. Seine sehr konstruktive und weiterführende Kritik war sehr wertvoll für mich.

Bei Herrn Vladimir Vacata, Herrn Halim Dizer und Herrn Stephan Aßmann möchte ich mich sehr herzlich für die freundliche Kritik bei dem Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken, die mich sehr motivierend am Ende meiner Kraft unterstützt hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau I. Hemmerich, G. Martens für die technische Unterstützung im Pflanzenzellkulturlabor und das gute Arbeitsklima im Institut bedanken.

Mein Dank gilt auch den Institutsangehörigen, die mir während meiner Doktorarbeit mit freundlicher Hilfe immer zur Seite gestanden haben. Besonders zu nennen sind hierbei Herr Dr. V. Heinz, Herrn Dr. A. Angersbach, Herrn Dipl.-Ing. M. Zenker; Herrn Dr. M. Eshtiagi, Herrn Dr. O. Schlüter, Herrn Dipl.-Ing. S. Boguslawski, Herrn M. Bunzeit und Frau G. Ehrlich.

Weiterhin bedanke ich mich an dieser Stelle sehr bei dem Bildungsministerium der Türkischen Republik, das mich langjährig und geduldig finanziell in Deutschland während meines Studiums und meiner Dissertation unterstützt hat.

## **Lebenslauf**

Name: Güven  
Vorname: Alper  
Geboren: 16.08.1969 in Istanbul  
Nationalität: Türkisch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Pascal Str. 5 (bei Dizer), 10587 Berlin

## **Schulbildung**

1975-1979 Besuch der Grundschule in Alpullu-Kirklareli / Türkei  
1979-1985 Besuch Staatliches Gymnasium in Afyon / Türkei  
1985 Abitur (Lise Diploması)

## **Universitätsausbildung**

1987-1989 Immatrikulation an der Trakya Universität in Edirne, Fachbereich Ernährungswissenschaften und Lebensmitteltechnologie  
1975-1979 Studium Lebensmitteltechnologie an der Universität Ankara  
1991 Abschluß: Dipl. Ing. Agrar  
1991-1993 Magister-Studium an der Universität Ankara, Fachbereich: Lebensmittelmikrobiologie  
1993 Stipendium der Türkischen Republik  
1993-1994 Deutschkurs im Goethe Institut in Mannheim  
1994-1998 Studium Lebensmitteltechnologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
1998 Abschluß: Dipl.-Ing. Lebensmitteltechnologie  
1998-2003 Promotion an der TU-Berlin