Charakterisierung pflanzlicher *in vitro* Kulturen am Beispiel Sonnenblume

This is the postprint version from Research Article – BIOSpektrum, 20, Katja Geipel, Thomas Bley, Juliane Steingroewer, Charakterisierung pflanzlicher *in vitro* Kulturen am Beispiel Sonnenblume, 450-452, 2014, which has been published in final form at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12268-014-0460-z>. (c) 2014 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Personal use of this material is permitted. Permission from publisher must be obtained for all other users. The final publication is available at link.springer.com.

Katja Geipel, Thomas Bley, Juliane Steingroewer

Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden, Dresden

Abstract

In advance of industrial applications of *in vitro* plant cell or tissue cultures e.g., as bioactive ingredients for pharmaceuticals, an intense characterization concerning growth and productivity has to be performed. Innovative respiration measurement techniques in shake flask scale were applied to investigate and compare heterotrophic, photomixotrophic and *hairy root* cultures of sunflower. Furthermore, the qualification of RAMOS for screening of plant *in vitro* cultures is discussed.

Wirkstoffgewinnung mittels chemischer Synthese führt oft zu Stereoisomeren, welche aufwendig getrennt werden müssen und manche Moleküle sind nur sehr kostenintensiv oder gar nicht darstellbar. Landwirtschaftliche Gewinnung bedeutet Nachteile wie Schadstoffeinsatz und großer Flächenbedarf. Der Einsatz von pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen überwindet die genannten Hürden [1, 2]: mit Methoden der Pflanzenbiotechnologie ist es möglich, pflanzliche Inhaltsstoffe in ihrer natürlichen, bioaktiven Form das ganze Jahr über unabhängig von biotischen/abiotischen Umweltfaktoren bei gleichbleibender Qualität und Quantität zu produzieren [3, 4].

Suspensionskulturen und *hairy roots* gelten momentan als die *in vitro*-Kulturtypen mit dem größten biotechnologischen Potential. Erstere sind in Flüssigmedium kultivierte Kalluszellen. Bei Kallus handelt es sich um undifferenzierte Pflanzenzellen, welche tumorartig wachsen und durch Zugabe von Pflanzenhormonen an der Differenzierung gehindert werden. *Hairy roots* entstehen durch Infektion eines Pflanzenteils mit dem Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes*. Die so erhaltene Haarwurzelkultur kann ohne Hormonzusatz vermehrt werden,

ihre Morphologie erfordert aber häufig eine Anpassung bestehender Kultivierungsgefäße [2, 5].

Modellsystem Sonnenblume

Vor einer ertragreichen industriellen Anwendung pflanzlicher *in vitro*-Kulturen stehen grundlegende Untersuchungen zur Charakterisierung ihres biotechnologischen Potentials. Drei Kulturtypen des Modellsystems Einjährige Sonnenblume (*Helianthus annuus*) werden vorgestellt, in Bezug auf ihr Respirationsverhalten bei Kultivierung im Schüttelkolben charakterisiert und verglichen.

H. annuus gehört zur Familie der Korbblütler und ist bekannt für einen hohen Anteil an α -Tocopherol [6]. Diese aktivste Form des Vitamins E wirkt anti-oxidativ, verhindert Lipidperoxidation [6] und findet daher z. B. zur Konservierung von Cremes aber auch zur Erhöhung des Vitamingehalts von Lebensmitteln Anwendung.

Für die vorgestellten Versuche kamen heterotrophe und photomixotrophe Suspensionskulturen sowie Gewebekulturen (*hairy roots*) (**Abb. 1**) zum Einsatz. Alle Kulturen wurden aus Blättern von *H. annuus* induziert. Die heterotrophe Kultur wurde in Linsmaier-Skoog-Medium unter Zugabe von 0,2 mg/L des Pflanzenhormons 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 30g/L Saccharose im Dunkeln kultiviert [7]. Zur Vermehrung der photomixotropen Kultur im Licht (125 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, LED) wurde Murashige-Skoog-Medium (MS) mit je 0,5 mg/L der Pflanzenhormone 1-Naphthyllessigsäure und 6-Benzylaminopurin sowie 15 g/L Saccharose eingesetzt [8]. *Hairy roots* wurden in MS mit 30 g/L Saccharose im Dunkeln kultiviert. Alle Experimente erfolgten bei 26°C und 110 U/min.

Kultivierung im Schüttelkolben mit Überwachung: RAMOS®

Das *Respiration Activity MOnitoring System*® bietet die Möglichkeit zur nicht-invasiven *online*-Wachstumsüberwachung von Zellkulturen in geschüttelten Kultivierungssystemen [9]. Das System erlaubt über die Messung von Gesamt- und Sauerstoffpartialdruck im speziell gestalteten Kopf des Schüttelkolbens die Berechnung von Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidtransfer (OT, CT) bzw. daraus resultierender -raten (OTR, CTR) sowie vom Respirationsquotienten RQ. Die Autoren nutzen das RAMOS um grundlegende Fragestellungen bzgl. Charakterisierung und Etablierung innovativer pflanzlicher Zell-/Gewebekulturen zu untersuchen – fokussiert auf Gewebekulturen und Kulturen mit phototropem Stoffwechsel.

Respiratorische Charakterisierung pflanzlicher *in vitro*-Kulturen

In **Abb. 2** sind OT, OTR, RQ sowie *growth ratio* ($\frac{x_{\max}}{x_0}$) für die untersuchten *H. annuus*-Kulturtypen (**Abb. 1**) dargestellt. Aus dem OTR-Verlauf lässt sich schlussfolgern, dass die heterotrophe Kultur am schnellsten wächst, gefolgt von der Gewebe- und der photomixotrophen Kultur. Die Längen der lag-Phasen variieren stark: während sich die *hairy roots* noch adaptieren (Inokulum: sehr geringe x_0 von Plattenkultur), ist die heterotrophe Suspension (Inokulum: flüssige Vorkultur mit ca. 20-facher x_0) bereits am Ende ihrer Wachstumsphase ($t \approx 4,5$ d). Eine Einteilung in Wachstumsphasen ist bei der photomixotrophen Kultur unmöglich. Zur verstärkten Anregung der Photosyntheseaktivität wurde bei dieser Zellkultur die Saccharosekonzentration halbiert. Es muss von einem Stoffwechsel mit sich überlagerndem heterotrophem und phototrophem Anteil ausgegangen werden. Bekannt ist, dass α -Tocopherol ausschließlich von photosynthetisch-aktiven Organismen in Abhängigkeit der Lichtintensität synthetisiert wird [8, 10]. Durch Lichteinstrahlung bilden sich in den Zellen Chloroplasten, welche Photosynthese ermöglichen. Die photomixotrophe Kultur ist somit in der Lage, sowohl Zucker als auch Licht als Energiequelle zu nutzen [11]. Gründe für das sehr langsame Wachstum dieser Licht-induzierten Kultur gilt es zukünftig weiter zu erforschen, sowohl im Hinblick auf Anteile an respirativem bzw. phototrophem Metabolismus als auch im Zusammenhang mit der Produktausbeute.

Die Respirationsdaten zeigen, dass die maximale Sauerstofftransferrate ($OTR_{\max}$) bei allen Kulturtypen stark differiert. Die höchste $OTR_{\max}$ zeigt die Gewebe-, gefolgt von der heterotrophen Kultur. Die photomixotrophe Kultur zeigt nur eine sehr geringe $OTR_{\max}$. Die spezifische, auf die Biotrockenmassekonzentration (BTM) bezogene maximale Sauerstofftransferrate ($otr_{\max} = \frac{OTR_{\max}}{x}$) weist dagegen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Kulturtypen auf (**Tab. 1**). Sie liegt für alle Kulturen in einem kleinen Bereich von $0,16 < otr_{\max} < 0,22$ mmol/(g·h) ($otr_{\max, photomixotroph} < otr_{\max, heterotroph} < otr_{\max, Hairy\ roots}$). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im Untersuchungszeitraum bei allen drei Kulturtypen pro Biomasse ca. die gleiche Menge Sauerstoff aufgenommen wird. Für die photomixotrophe Kultur bedeutet das vermutlich, dass vorerst hauptsächlich der heterotrophe Anteil des Metabolismus aktiv ist: in erster Linie wird Zucker respirativ umgesetzt.

Aussagekräftigere Charakterisierungen bieten biotechnologische Kenngrößen wie z.B. die Wachstumsrate μ , welche sowohl auf Grundlage der BTM- (*offline*) als auch der Respirationsdaten (*online*) vergleichend berechnet wurde (**Tab. 1**). Die Werte beider

Berechnungsmethoden zeigen ähnliche Ergebnisse (z.B. $\mu=0,48$ bzw. $0,53$ /d für *hairy roots*) und liegen für alle drei Kulturtypen im Bereich von $0,09$ - $0,53$ /d ($\mu_{\text{photomixotroph}} < \mu_{\text{heterotroph}} < \mu_{\text{Hairy roots}}$). Aufgrund der höheren Datendichte (alle 1-3 h) ist die Berechnung auf Basis der Respiationsdaten exakter. Biomassedaten liegen nur im Abstand von Tagen vor. Auffällig ist der enorme Wachstumsschub der *hairy roots* von nur $0,06$ g/L zu Beginn der Kultivierung auf über 15 g/L nach 14 Tagen. Somit ergibt sich hier eine sehr hohe maximale *growth ratio* von über 250 bzw. eine für pflanzliche *in vitro*-Kulturen hohe Wachstumsrate von ca. $0,5$ /d.

Herausforderungen und Ideen zur Respiationskontrolle pflanzlicher *in vitro* Kulturen

RAMOS stellt ein innovatives und hilfreiches Tool zur Ermittlung von Standardparametern für die Wachstumscharakterisierung sowohl pflanzlicher Zell- als auch Gewebekulturen dar. Besonders aufgrund der geringen Datendichte im Bereich der Biomasseanalytik (*offline*) sind hier die Vorteile des Systems zu sehen. Die bisherigen Untersuchungen der Autoren leisten einen Beitrag zur Aufklärung der Respiration verschiedener pflanzlicher Zellkulturen. Zukünftige Untersuchungen sollen weiterführende Erkenntnisse zum photo(mixo)tropen Stoffwechsel pflanzlicher Zellkulturen liefern sowie das Verständnis vom Zusammenspiel von Respiration und Produktbildung u.a. in Gewebekulturen erweitern.

Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung danken wir dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand). Wir bedanken uns zudem ganz herzlich bei der Firma HiTec Zang, Herzogenrath für die gute Zusammenarbeit!

Literatur

1. Marchev A, Haas C, Schulz S, et al. (2014) Sage *in vitro* cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. *Biotechnology Letters* 36:211–221. doi: 10.1007/s10529-013-1350-z
2. Steingroewer J, Ludwig-Müller J, Bley T (2013) Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen — neue Produktionssysteme für die Biotechnologie. *BIOSpektrum* 19(6):683–686. doi: 10.1007/s12268-013-0369-y
3. Georgiev M, Pavlov A, Bley T (2007) *Hairy root* type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:1175–1185. doi: 10.1007/s00253-007-0856-5

4. Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59:39–52
5. Geipel K, Lenk F, Bley T, et al. (2012) Die Sonnenblume im Bioreaktor — Herstellung von α -Tocopherol mittels pflanzlicher Zell- und Gewebekulturen. *Lebensmitteltechnik* 44:55–56
6. Traber MG, Sies H (1996) Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Review of Nutrition* 16:321–347. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.001541
7. Geipel K, Socher ML, Haas C, et al. (2013) Growth kinetics of a *Helianthus annuus* and a *Salvia fruticosa* suspension cell line: Shake flask cultivations with online monitoring system. *Engineering in Life Sciences* 13:593–602. doi: 10.1002/elsc.201200148
8. Geipel K, Song X, Socher ML, et al. (2014) Induction of a photomixotrophic plant cell culture of *Helianthus annuus* and optimization of culture conditions for improved α -tocopherol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:2029–2040. doi: 10.1007/s00253-013-5431-7
9. Anderlei T, Büchs J (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal* 7:157–162. doi: 10.1016/S1369-703X(00)00116-9
10. Fachechi C, Nisi R, Gala R, et al. (2007) Tocopherol biosynthesis is enhanced in photomixotrophic sunflower cell cultures. *Plant Cell Reports* 26:525–530.
11. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) *Brock Biology of microorganisms*, Tenth Edition. Prentice Hall [u.a.], Upper Saddle River, NJ

Korrespondenzadresse

Katja Geipel
Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik
Technische Universität Dresden
Bergstraße 120
01069 Dresden
Tel: 0351-4633-9042
katja.geipel@tu-dresden.de
www.tu-dresden.de/mw/ilb

Abb. 1: Verwendete *H. annuus*-Kulturtypen auf festem Medium

Abb. 2: Biomasse (A) und Respiration (B, C, D) untersuchter *H. annuus*-Kulturen. **A**, Growth ratio [-] (je n=1). **B**, Heterotroph (n=3). **C**, Photomixotroph (n=4). **D**, Hairy roots (n=5). OT: Sauerstofftransfer in mmol/L, OTR: Sauerstofftransferrate in mmol/(L·h), RQ: Respirationsquotient

Tab. 1: Wachstumskenngößen untersuchter *H. annuus*-Kulturen, Maxima sind hervorgehoben

Kenngröße	Heterotrophe Suspension	Photomixotrophe Suspension	<i>Hairy roots</i>
Startbiomassekonzentration x_0 in $\frac{g}{L}$	1,28	1,21	0,06
Max. Biomassekonzentration x_{max} in $\frac{g}{L}$ (d)	14,49 (12)	7,55 (15)	15,45 (14)
Maximum <i>growth ratio</i>	11,32	6,24	257,50
Max. O ₂ -Transferrate OTR_{max} in $\frac{mmol}{L \cdot h}$ (d)	2,00 (8)	0,64 (12)	2,30 (12)
Max. spezifische O ₂ -Transferrate otr_{max} in $\frac{mmol}{g \cdot h}$	0,17	0,16	0,22
Wachstumsrate μ in $\frac{1}{d}$ $\rightarrow$ Berechnung aus BTM/ <i>offline</i> (d)	0,26 (0-9)	0,12 (0-15)	0,48 (0-11)
Wachstumsrate μ in $\frac{1}{d}$ $\rightarrow$ Berechnung aus OTR/ <i>online</i> (d)	0,31 (0-4)	0,09 (6,5-10,5)	0,53 (1-14)

* Gleichung siehe [7]