



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Biotische und abiotische Elizitierung von „hairy roots“- Kulturen der Meisterwurz (*Peucedanum ostruthium* L. Koch)

Verfasserin

Judith Strauhs

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp und Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die Bereitstellung dieses interessanten Themas aussprechen. Überdies bedanke ich mich für die kompetente Betreuung sowie für die Motivation und unsere kollegialen Gespräche.

Ebenfalls ein Dankeschön möchte ich Dr. Sylvia Vogl und Dr. Martin Zehl aussprechen, die mir bei den Messungen der Proben mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dankbar bin ich auch Mag. Florian Gössnitzer für die kompetente Einschulung und Hilfestellung, sowie für das stets freundliche Arbeitsklima. Überdies bedanke ich mich für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen zu meinem Thema.

Meinen Eltern danke ich sehr für die Ermöglichung des Studiums und für die Unterstützung in dieser Zeit.

Meinem Lebensgefährten Stefan danke ich für seine Geduld, Motivation und vor allem sein unerschütterlich fröhliches Wesen, das mich motivierte und immer nach vorne blicken ließ.

Überdies haben auch meine Freunde und Studienkollegen ein Dankeschön verdient, da ich immer auf ihre Hilfe und Unterstützung zählen konnte und mir diese Zeit durch sie unvergesslich bleiben wird.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Pflanzenmaterial	5
2.2. Nährmedien und Kulturbedingungen	5
2.3. Elizitierung mit abiotischem Elizitor und Medienvergleich	6
2.4. Elizitierung mit biotischem Elizitor	6
2.5. Probenextraktion und Auswertung	8
2.6. Hochdruckflüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor und Massenspektrometrie – HPLC-DAD und HPLC-MS	9
2.7. Dünnschichtchromatographie	11
3. Ergebnisse	13
3.1. Einfluss der Saccharosekonzentration im Nährmedium	13
3.1.1. Veränderungen der Biomasse	13
3.1.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum	15
3.1.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse der abiotischen Elizitierung mit Saccharose	21
3.2. Einfluss der Elizitierung mit Hefeextrakt	22
3.2.1. Einfluss auf die Biomasse	23
3.2.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum	31
3.2.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse der biotischen Elizitierung mit Hefeextrakt	56
3.3. Einfluss der Ionenstärke im Nährmedium	58
3.3.1. Einfluss auf die Biomasse	58
3.3.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum	60
3.3.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse des Medienvergleiches	65
3.4. HPLC-MS der Cumarine	65
3.5. Dünnschichtchromatographie von Cnidilin und Phellopterin	69
4. Diskussion	71
5. Zusammenfassung	81
6. Summary	83
7. Literaturverzeichnis	85
Lebenslauf	93

Abkürzungen

B5	Medium nach Gamborg und Mitarbeiter (Gamborg et al. 1968)
Cn	Cnidilin
ESI	Elektronensprayionisation
FG	Frischgewicht
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)
HPLC-DAD	Hochdruckflüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor
HPLC-MS	Hochdruckflüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
HPTLC	High performance thin layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
MS	Medium nach Murashige und Skoog (Murashige und Skoog 1962)
½ MS	Medium nach Murashige und Skoog (Murashige und Skoog 1962) mit halber Konzentration an Makroelementen
Ph	Phellopterin
TG	Trockengewicht

1. Einleitung und Problemstellung

Peucedanum ostruthium (L.) Koch (Koch 1824), die Meisterwurz, gehört zur Familie der Apiaceae und ist eine Gebirgspflanze, die in vielen Regionen Österreichs vorkommt und volksmedizinisch angewendet wird. Zubereitet wird d zumeist die Wurzel als Droge, zum Beispiel als Tee oder als ethanolischer Extrakt und kommt bei gastrointestinalen und kardiovaskulären Erkrankungen zum Einsatz. Zu den vielen volksmedizinischen Indikationen zählen weiters Erkrankungen der Haut und der Atemwege (Gerlach 2007).

Peucedanum ostruthium beinhaltet als interessante Inhaltsstoffe einfache Cumarine und lineare Furanocumarine. Dabei konnten Ostruthin und Osthol als die einfachen Cumarine und Oxypeucedanin, Oxypeucedanin-Hydrat, Ostruthol, Imperatorin, Isoimperatorin und Oxypeucedanin-Ethanolat als die Furanocumarine in den Wurzelextrakten von *Peucedanum ostruthium* nachgewiesen werden. Zusätzlich kommt auch das Chromon Peucenin vor (Vogl et al. 2011). Außer Oxypeucedanin-Ethanolat wurden diese Cumarine auch von Hadacek et al. (1994) nachgewiesen.

Unter den Cumarinen ist Ostruthin von großer Bedeutung, da man hier eine antimycobakterielle Wirkung (Schinkovitz et al. 2003) sowie eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen, die eine bedeutende Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen einnehmen (Joa et al. 2011), nachweisen konnte.

Überdies wurde eine inhibierende Wirkung der Cumarine Ostruthol, Ostruthin, Imperatorin und Oxypeucedanin-Hydrat sowie des Chromons Peucenin auf die Aktivität der Acetylcholinesterase beschrieben. Diese Eigenschaft soll zur Anreicherung von Acetylcholin bei der Behandlung von Alzheimer genutzt werden (Urbain et al. 2005).

Dem Furanocumarin Imperatorin konnte an Mäusen eine antikonvulsive Wirkung zugeschrieben werden, wobei die Wirkung möglicherweise auf die Substitution am C-8 des Psoralenrings zurückzuführen ist, eine Annahme, die jedoch durch weitere Studien bestätigt werden muss (Luszczki et al. 2010). In der Arbeit von Garcia-Argaez et al. (2000) konnte auch eine anti-inflammatorische Wirkung von niedrig dosiertem Imperatorin bei Mäusen

beobachtet werden. Jedoch zeigte sich auch, dass hoch dosiertes Imperatorin eine gegensätzliche pro-inflammatorische Wirkung entwickelte.

Weiters ist die antiphlogistische und antipyretische Wirkung des Extrakts aus den Wurzeln von *Peucedanum ostruthium* zu erwähnen (Hiermann und Schantl 1998).

Neben diesen positiven Wirkungen weisen Furanocumarine und Cumarine auch phototoxische, hepatotoxische, carzinogene und mutagene Effekte auf (McKenna 2004; da Silva et al. 2009; Abraham et al. 2010).

Neben den Cumarinen enthält *Peucedanum ostruthium* auch weitere Inhaltsstoffe wie zum Beispiel ätherisches Öl (Cisowskia et al. 2001). Auf diese Inhaltsstoffe wird in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen.

Die Cumarine und Furanocumarine sind vorwiegend in den Wurzeln enthalten, zur Extraktion dieser Inhaltsstoffe muss daher die ganze Pflanze geerntet werden. Im Sinne einer nachhaltigen Gewinnung dieser wertvollen Naturstoffe können biotechnologische Methoden eine Alternative darstellen. Neben Zellsuspensionskulturen bietet sich der Einsatz von Wurzelkulturen, insbesondere von „hairy roots“, an. „Hairy roots“-Kulturen werden durch eine Infektion der Stammpflanze mit dem gram-negativen Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* etabliert, das die „hairy-root disease“ auslöst. Dabei wird Genmaterial des Bakteriums ins Genom der Pflanze aufgenommen und daraufhin kommt es zum Wachstum von proliferierenden Wurzeln, den sogenannten „hairy roots“ (Guillon et al. 2006; Veena und Taylor 2007).

„Hairy roots“-Kulturen zeigen viele Vorteile wie schnelles Wachstum und somit eine kurze Verdopplungszeit (Veena und Taylor 2007), sie wachsen auch auf bzw. in hormonfreiem Nährmedium und weisen genetische und biochemische Stabilität auf (Shanks und Morgan 1999). „Hairy roots“ bilden oft dieselben Verbindungen wie normale Wurzeln der Mutterpflanze, manchmal auch in höherem Ausmaß, und es können auch neuartige Sekundärstoffe synthetisiert werden (Flores et al. 1999; Li et al. 2000; Veena und Taylor 2007).

Die Sekundärstoffbildung kann durch Elizitierung gesteigert werden und „hairy roots“ sind auch für die Gewinnung von rekombinanten Proteinen, die Gewinnung von ins Nährmedium sezernierten Biomolekülen und die Weiterentwicklung von Kulturmethoden von Bedeutung (Guillon et al. 2006).

Die Elizitierung ist eine wichtige Methode, um den Metabolismus von Sekundärstoffen zu beeinflussen. Bei diesem Verfahren werden natürliche Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen Pathogene, Insekten und anderer Stress ausgenutzt. Nach Zusatz von sogenannten Elizitoren soll es zur gesteigerten Synthese und Akkumulation von sekundären Metaboliten kommen, wenn diese von der Pflanze im Rahmen von Abwehrfunktionen genutzt werden (Zhao et al. 2005; Vasconsuelo und Boland 2007).

Biotische Elizitoren haben einen biologischen Ursprung, den man in einem Pathogen oder der Pflanze selber finden kann. Beispiele stellen hierbei Hefeextrakt, Proteine, Glykoproteine und pflanzliche Hormone dar. Abiotische Elizitoren haben im Gegensatz dazu keinen biologischen Ursprung und werden in die zwei Gruppen der chemischen und der physikalischen Elizitoren unterteilt. Schwermetallsalze wie AgNO_3 und CdCl_2 werden den chemischen Elizitoren zugeordnet, während thermischer oder osmotischer Stress, UV-Bestrahlung und Verwundung zu den physikalischen Elizitoren zählen (Angelova et al. 2006; Vasconsuelo und Boland 2007).

Zielsetzung dieser Arbeit sollte die Erhöhung der Bildung der sekundären Inhaltsstoffe von *Peucedanum ostruthium* in „hairy roots“-Kulturen sein, vor allem in Bezug auf die Cumarine. Außerdem sollte auch die Veränderung in der Biomasse untersucht werden.

Zu diesem Zweck sollte einerseits der Einfluss von Variationen der Saccharosekonzentration im Medium auf den sekundären Metabolismus untersucht werden, vor allem weil Saccharose eine Kohlenstoffquelle (Giri und Narusu 2000) für die Kulturen darstellt und außerdem für den osmotischen Druck relevant ist (Yu et al. 1996) und somit einen abiotischen Elizitor darstellt (Gutierrez et al. 1995; Vasconsuelo und Boland 2007).

Andererseits sollte den „hairy roots“-Kulturen der biotische Elizitor Hefeextrakt zugesetzt werden, um eine Steigerung der sekundären Inhaltsstoffe und der Biomasse zu erreichen.

Im Bezug auf die Mediumzusammensetzung sollte der Einfluss verschiedener Ionenstärken auf das Wachstum und das Inhaltsstoffspektrum der „hairy roots“-Kulturen ermittelt werden. Zu diesem Zweck sollten drei unterschiedliche Nährmedien getestet werden, die sich durch die Ionenstärke unterscheiden.

Im Hinblick auf die sekundären Inhaltsstoffe sollte das Wurzelmaterial nach der Kultivierung mittels HPLC-DAD und HPLC-MS analysiert werden, um die Auswirkungen der verschiedenen Versuchsbedingungen festzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

In der vorangegangenen Diplomarbeit von Gössnitzer (2012) waren Pflanzenteile der Stammpflanze *Peucedanum ostruthium* angeritzt und mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm TR105 infiziert worden. Die entstandenen „hairy roots“ waren mit dem Antibiotikum Cefatoxim – Na (Claforan®) behandelt worden, um das *Agrobacterium* zu entfernen. Anschließend wurden die „hairy roots“ in verschiedenen Medien kultiviert.

Die damals erzeugte Klonlinie T22, die in dieser Arbeit verwendet wurde, war aus der 22. Infektion mit dem *Agrobacterium*-Stamm TR105 entstanden.

2.2. Nährmedien und Kulturbedingungen

In der Vermehrungsphase der „hairy roots“-Kulturen und auch bei den Versuchen zur Medienoptimierung mit Saccharose und der Elizitierung wurde das Medium B5 (Gamborg et al. 1968) verwendet.

Überdies kamen das Medium MS (Murashige und Skoog 1962) und das Medium ½ MS (halbe Konzentration an Makroelementen) zum Einsatz.

Die Herstellung der Medien erfolgte mit Stammlösungen der Makro- und Mikroelemente und der Vitamine. Zu Beginn wurde ein Drittel des Endvolumens an destilliertem Wasser vorgelegt. Nach Zugabe der Stammlösungen in den für das entsprechende Endvolumen errechneten Mengen, wurden die festen Bestandteile Myo-Inosit und Saccharose zugefügt und zum Schluss mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Vor dem Autoklavieren stellten wir den pH-Wert des Mediums mit 1n HCl bzw. 1n KOH auf $\text{pH } 5,7 \pm 0,1$ ein. Nach dem Abfüllen von 50ml Medium pro 250ml-Weithals-Erlenmeyerkolben wurden die Kolben mit Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen und durch Autoklavieren bei 121°C und 1 Bar für 20 Minuten sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei 5°C im Kühlraum.

Kulturbedingungen

Die Kultivierung der T22-Klonlinie erfolgte in 250ml-Weithals-Erlenmeyerkolben in 50 ml Medium. Die Kolben wurden mit einem Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen. Die Inkubation der „hairy roots“-Kulturen erfolgte bei 25 ± 1 °C im Dunkeln und bei 85 UpM am Rotationsschüttler. Subkultivierungen wurden alle drei Wochen vorgenommen.

2.3. Elizitierung mit abiotischem Elizitor und Medienvergleich

Für die Untersuchung des Einflusses der Saccharosekonzentration wurden jeweils drei Kulturen mit B5-Medium der fünf unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen von 1% bis 5% eingesetzt. Dabei stellte 3% die Kontrollkonzentration dar, da dies der Standardkultivierung entsprach. Die drei Kolben je Saccharosekonzentration wurden jeweils mit 0,8 g Inokulum beimpft und 21 Tage inkubiert (Xu et al. 2009).

Für die Untersuchung des Einflusses der Ionenstärke wurden je 2 Kolben mit MS-Medium und $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 0,8 g Inokulum beimpft und 21 Tage kultiviert. Bei diesem Versuch fungierten „hairy roots“, die im B5-Medium mit 3% Saccharose kultiviert wurden, als Kontrollkulturen.

2.4. Elizitierung mit biotischem Elizitor

Als Elizitor wurde aufgereinigter Hefeextrakt (Sigma Aldrich) verwendet, der den „hairy roots“-Kulturen in sieben verschiedenen Konzentrationen (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 g/l; (Rhee et al. 2010) für 48 Stunden, 96 Stunden und 144 Stunden (Putalun et al. 2007) zugesetzt wurde. Den Kontrollkulturen (= 0 g/l) wurde anstatt des Hefeextraktes destilliertes Wasser zugesetzt.

Zu Beginn des Versuches wurden drei Kolben pro Elizitorkonzentration und Zeitspanne mit einem Inokulum von 0,8 g beimpft. Am 21. Tag der Kultivierung wurden pro Konzentration drei Kulturen mit der entsprechenden Menge Hefeextrakt elizitiert und je nach Versuchsreihe für zwei, vier oder sechs Tage unter den üblichen Kulturbedingungen kultiviert und dann geerntet.

Aufreinigung des Hefeextraktes

Der Hefeextrakt wurde wie von Hahn und Albersheim (1978) beschrieben aufgereinigt. Dazu wurde der Hefeextrakt in ein Becherglas eingewogen und in der fünffachen Menge destillierten Wassers gelöst. Anschließend wurde soviel 96 proz. Ethanol zugegeben, dass die Konzentration des Ethanols 80% betrug. Die resultierende Suspension wurde für vier Tage bei 5°C gelagert. Dann wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand gewogen und wiederum in der fünffachen Menge destillierten Wassers gelöst. Die Ausfällung mit 96 proz. Ethanol wurde wiederholt und die Suspension für vier weitere Tage bei 5°C gelagert. Abschließend wurde der Überstand wieder abdekantiert und der gewogene Rückstand in der vierfachen Menge destillierten Wassers gelöst (Hahn und Albersheim 1978).

Diese Fraktion stellte den verwendeten aufgereinigten Hefeextrakt für die Elizitierung dar und hatte bei einer Ausgangsmenge von 50 g Hefeextrakt einen Gehalt von 31,9 g aufgereinigten Hefeextrakt in 127,6 ml destilliertem Wasser. Dieser wurde bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren gelagert.

Stammlösungen

Um eine volumenmäßig gleiche Zugabe des Elizitors zu den einzelnen Kulturen zu ermöglichen, wurden durch Verdünnung mit destilliertem Wasser Stammlösungen des aufgereinigten Hefeextraktes mit den gewünschten Konzentrationen hergestellt.

Elizitieren der Kulturen

Vor der Durchführung der Elizitierung wurden die verschiedenen Stammlösungen des Hefeextraktes sowie destilliertes Wasser als Kontrolle in Schottflaschen bei 121°C und 1 Bar für 20 Minuten (Yan et al. 2006) autoklaviert.

Nach Abkühlen der Lösungen wurden jeweils 2 ml der verschiedenen vorbereiteten Stammlösungen oder 2 ml des destillierten Wassers in jeweils 3 Kolben pro Konzentration überführt.

2.5. Probenextraktion und Auswertung

Ernte der Kulturen

Nach der Kultivierung in den verschiedenen Versuchen wurden die „hairy roots“ aus den Kolben entnommen und mit Filterpapier trockengetupft. Danach wurden sie in Petrischalen überführt und das Frischgewicht bestimmt. Darauf erfolgten die Trocknung für zwei Tage bei Raumtemperatur sowie Bestimmung des Trockengewichts (Abbildung 1).

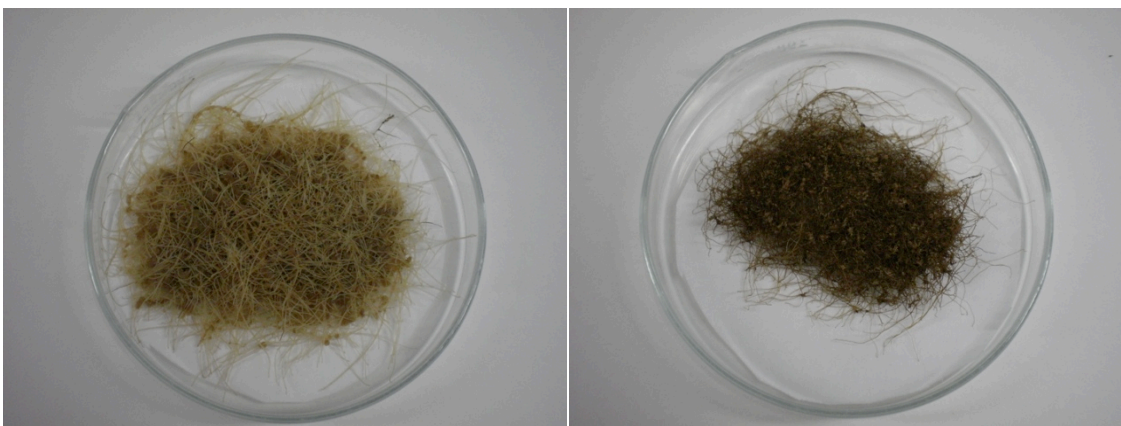


Abbildung 1: „Hairy roots“-Kulturen nach der Ernte (links) und nach der Trocknung (rechts).

Zur Lagerung wurden die in einer Reibschale pulverisierten „hairy roots“ in Pergamentsäckchen überführt und im Exsiccator aufbewahrt.

Aufarbeitung der Proben für die HPLC

Für die Extraktion wurden 0,1 g pulverisierte Probe (jeweils zwei getrennte Einwaagen pro Versuch) eingewogen, mit 4 ml Dichlormethan versetzt und in einem 40°C warmen Wasserbad an einen Rückflusskühler 15 Minuten lang extrahiert. Nach dem Abkühlen filtrierten wir die Probenlösung und entfernten das Dichlormethan am Rotavapor. Danach wurde der Kolben mit dem Extrakt im Exsiccator gelagert und am nächsten Tag das Extraktgewicht bestimmt (Vogl et al. 2011).

Die Vorbereitung der zu analysierenden Proben für die Messungen mittels HPLC verlief nach der Methode von Vogl et al. (2011). Dabei wurden die Extrakte in 0,5 ml Methanol für Flüssigchromatographie mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst und in einem Eppendorfgefäß 10 Minuten bei 13000

UpM zentrifugiert, um Feststoffpartikel abzutrennen. Danach konnten jeweils 400 µl der Proben in HPLC-Vials pipettiert und im HPLC-Gerät positioniert werden. Jeder Extrakt wurde zweimal vermessen.

2.6. Hochdruckflüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor und Massenspektrometrie – HPLC-DAD und HPLC-MS

HPLC-DAD-Messung

Die Quantifizierung der Cumarine wurde mit Hilfe eines HPLC-Gerätes der Fa. Shimazu durchgeführt. Die Bestandteile dieses Geräts waren ein CBM-20A Systemkontroller, ein DGU-20A5 Membranentgaser, eine LC-20AD Lösungsmittelfördereinheit, ein SIL-20AC HAT Autosampler, ein CTO-20AC Säulenofen und ein SPD-M20A Photodiodenarray - Detektor (Vogl et al. 2011). Die verwendete Trennsäule war eine 150 mm x 2.1 mm i.d., 3 µm, Acclaim 120 C18 Umkehrphasesäule mit einer 10 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm, Acclaim 120 C18 Vorsäule der Fa. Dionex. Die Analysen erfolgten bei einer Temperatur von 38°C und einer Flussrate von 0,5 ml/min (Vogl et al. 2011).

Als mobile Phase A diente Wasser mit 0,01% Essigsäure und als Phase B Acetonitril mit 0,01% Essigsäure. Die Gradientenelution wurde wie folgt durchgeführt: 25-37% Acetonitril in sechs Minuten, 37-45% Acetonitril in acht Minuten, 45-65% Acetonitril in zehn Minuten, 65-95% Acetonitril in einer Minute und isokratisch 95% Acetonitril für fünf Minuten. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Proben 10 µl (Vogl et al. 2011).

Ebenfalls vermessen wurden Standards von den Cumarinen Phellopterin (Herboreal Ltd. Edinburgh) und Cnidilin (Herboreal Ltd. Edinburgh).

Auswertung der HPLC-Chromatogramme

Bearbeitet wurden die Daten mit Hilfe des Programms LCsolution Version 1.2 von Shimazu. Anhand dieses Programms konnten die Chromatogramme bei

310 nm ausgewertet werden und die bekannten Cumarine anhand der Retentionszeit und der UV-Spektren identifiziert werden

Die HPLC-Messungen ergaben für die vermessenen Proben Werte unter der Quantifizierungsgrenze dieser Methode (Vogl et al. 2011) und konnte daher nicht mit akzeptabler Präzision wie herkömmlich quantifiziert werden (Shrivastava und Gupta 2011).

Daher wurden alle Peakflächen bis zu einer Retentionszeit von 27,2 Minuten zusammengerechnet und als 100% angenommen. Von dieser errechneten Gesampeakfläche wurde der prozentuelle Anteile interessanter Peaks errechnet.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ergebnissen wurden mit Statistica (StatSoft, Inc., Version 6) mittels ANOVA (analysis of variance) bei $p=0,05$ berechnet und in den Diagrammen und Tabellen durch unterschiedliche Kleinbuchstaben dargestellt.

HPLC-MS

Bei der HPLC-Messung zeigte sich, dass ein Peak bei der Retentionszeit von 19,4 Minuten anhand der UV-Spektren nicht eindeutig als Cnidilin oder Phellopterin identifiziert werden konnte. Daher wurde zu diesem Zweck eine Untersuchung mit der HPLC-MS gegen die Referenzlösungen von Cnidilin und Phellopterin vorgenommen. Es wurde eine Probe gewählt, die nach der HPLC-Quantifizierung einen Inhaltsstoffgehalt im mittleren Bereich enthielt.

Die Proben wurden mit einem UltiMate 3000 RSLC-Serien System (Dionex) gemessen, wobei dieses an ein HCT 3D Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometer gekoppelt war. Das Massenspektrometer war hierbei mit einer orthogonalen ESI-Quelle ausgestattet (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Wie zuvor beschrieben wurde eine HPLC-Trennung durchgeführt und der Eluentenfluss in einem Verhältnis von 1:8 vor der ESI-Ionenquelle aufgespalten. Diese arbeitete mit folgenden Parametern: Kapillarspannung -4.0 kV; Zerstäuber 26 psi (N₂); Trockengasfluss 9 l/min (N₂); Trockentemperatur 350°C.

Das Massenspektrometer arbeitete in einem automatisierten datenabhängigen Bezugsmodus (DDA), wobei jeder MS-Scan (m/z 100 – 700) gefolgt wurde von einem MS²-Scan (m/z 40 – 700, Fragmentierungsamplitude 0.7 V) der zwei intensivsten Vorläuferionen. Ebenso folgte ein MS³-Scan (m/z 40 -700,

Fragmentierungamplitude 1.0 V) der intensivsten Fragmentierungsionen im MS²-Scan. Als Kollisionsgas diente Helium und das Isolationsfenster war auf 4 m/z festgesetzt (Vogl et al. 2011).

Die HPLC wurde nach der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt. Gemessen wurden zwei Standardmischungen: (1) Cnidilin und Imperatorin und (2) Phellopterin und Isoimperatorin. Alle Standards stammten von Herboreal Ltd. (Edinburgh, England). Von der Probe wurden hier 5 µl eingespritzt.

2.7. Dünnschichtchromatographie

Zur weiteren Unterscheidung von Cnidilin und Phellopterin wurde mit den Referenzlösungen eine Dünnschichtchromatographie nach Waldbauer (2011) durchgeführt, um eine Möglichkeit zur Trennung zu finden.

Die beiden Referenzlösungen von Phellopterin (0,5 mg/ml MeOH) und Cnidilin (0,4 mg/ml MeOH) wurden zu je 2 µl, 5 µl und 10 µl alleine und als Mischung bandförmig (10 mm) aufgetragen. Verwendet wurde eine HPTLC-Fertigplatte (Kieselgel 60) ohne Fluoreszenzindikator. Als Fließmittel dienten eine Mischung von Toluol *R*, Ethylacetat *R* und Essigsäure (75:25:3, V/V/V), die Laufstrecke betrug 8 cm. Die Trocknung erfolgte fünf Minuten an der Luft und anschließend wurde unter ultraviolettem Licht (366 nm, Eigenfluoreszenz) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der Saccharosekonzentration im Nährmedium

Die Konzentration der Saccharose im Nährmedium kann sowohl das Wachstum als auch die Sekundärstoffbildung in vitro beeinflussen (Giri und Narusu 2000). Unsere diesbezüglichen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.1.1. Veränderungen der Biomasse

Nach drei Wochen Kultivierung zeigten sich bei den verschiedenen Saccharosekonzentrationen im B5-Medium unterschiedliche Einflüsse auf das Wachstum und den Zustand der „hairy roots“.

Bei der Bestimmung der Frischgewichte (FG) der verschieden behandelten Kulturen anhand von drei Ansätzen konnte beobachtet werden, dass in der Versuchsreihe mit 1% Saccharose das gemittelte Gewicht mit 3,90 g am geringsten war. Überdies zeigten sich bei dieser Konzentration Veränderungen bei der Färbung der „hairy roots“, die hier dunkler waren als bei der Kontrollkonzentration von 3% Saccharose.

Die Kulturen mit 2% Saccharose wiesen ein höheres Gewicht von 6,18 g und ebenfalls eine leichte dunkle Verfärbung der „hairy roots“ auf.

Bei der Kontrollkonzentration von 3% Saccharose zeigte sich eine weitere Zunahme des Frischgewichtes im Vergleich zu 1% und 2% Saccharose. Verfärbung konnte hier keine mehr beobachtet werden, jedoch nahm die Kallusbildung zu.

Das höchste Frischgewicht wurde bei 4% Saccharose mit 6,76 g beobachtet, das aber nur geringfügig höher lag als bei 5% Saccharose mit 6,24 g. Bei beiden Konzentrationen trat keine Verfärbung der „hairy roots“ auf, die Kallusbildung war jedoch im Vergleich zu Kulturen mit 1% und 2% Saccharose beträchtlich.

In Bezug auf das mittlere Trockengewicht (TG) konnte ein stetiger Anstieg des Gewichts über die unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt werden. So ergab sich das niedrigste Trockengewicht bei 1% Saccharose und das höchste bei 5% Saccharose

Es zeigte sich, dass das Trockengewicht bei 1% Saccharose signifikant niedriger war als bei den übrigen Saccharosekonzentrationen. Die Trockengewichte bei den verschiedenen Saccharosekonzentrationen unterschieden sich alle signifikant voneinander.

Zur Veranschaulichung der Unterschiede in Frischgewicht und Trockengewicht sind in der Tabelle 1 die mittleren Frischgewichte und Trockengewichte dargestellt.

Das Verhältnis Frischgewicht (FG)/Trockengewicht (TG), welches den Wassergehalt der Zellen ausdrückt (Chen und Chen 2000), wurde ebenso ermittelt und zeigte starke Unterschiede bei den verschiedenen Saccharosekonzentrationen. So zeigte sich zum Beispiel bei 1% Saccharose, dass das Frischgewicht dem 14,4fachen des Trockengewichtes entsprach. Dieses Verhältnis war bei 5% Saccharose deutlich niedriger, denn hier stellte das Frischgewicht nur mehr das 7,3fache des Trockengewichtes dar. Bei der Analyse der gemessenen Frisch- und Trockengewichte konnte festgestellt werden, dass mit steigender Saccharosekonzentration dieses Verhältnis stetig sinkt und bei den Ansätzen mit der höchsten Saccharosekonzentration am niedrigsten war.

Tabelle 1: Einfluss der Saccharosekonzentration im Nährmedium auf Frisch (FG)- und Trockengewicht (TG), Verfärbung und Kallusbildung der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Saccharose (%)	FG (g)	TG (g)	FG/TG	Verfärbung	Kallus- bildung
1	3,90 ± 0,48 ^a	0,27 ± 0,03 ^a	14,4	+	-/+
2	6,18 ± 0,07 ^b	0,52 ± 0,01 ^b	11,9	-/+	-/+
3	6,48 ± 0,22 ^b	0,70 ± 0,03 ^c	9,3	-	+
4	6,76 ± 0,29 ^b	0,77 ± 0,03 ^d	8,8	-	++
5	6,24 ± 0,34 ^b	0,85 ± 0,01 ^e	7,3	-	++

Diagramm 1 (S. 15) zeigt den Einfluss der Saccharosekonzentration auf die prozentuelle Zuwachsrate der „hairy roots“. Bei einer durchschnittlichen Zuwachsrate von 477% zeigte die Kultur bei 1% Saccharose die niedrigste Wuchsrate, womit sie über 300% weniger Zuwachs hatte als die Kontrolle bei 3% Saccharose (792% Zuwachs).

Mit 762% bei 2% Saccharose war der Biomassezuwachs fast so hoch wie in den Kontrollkulturen mit 3% Saccharose. Die höchste Zuwachsrate konnte mit 826% bei 4% Saccharose erreicht werden, was einer Verachtfachung des Gewichts entsprach. Der leichte Abfall bei 5% Saccharose, der sich schon beim Frischgewicht zeigte, ist auch in der prozentuellen Zuwachsrate mit einem Wert von 762% ersichtlich.

Die Zuwächse der Biomasse bei den Saccharosekonzentrationen von 2% bis 5% unterschieden sich nicht signifikant voneinander, jedoch bestand zwischen diesen vier Konzentrationen und 1% Saccharose ein deutlich signifikanter Unterschied in der Wuchsrate.

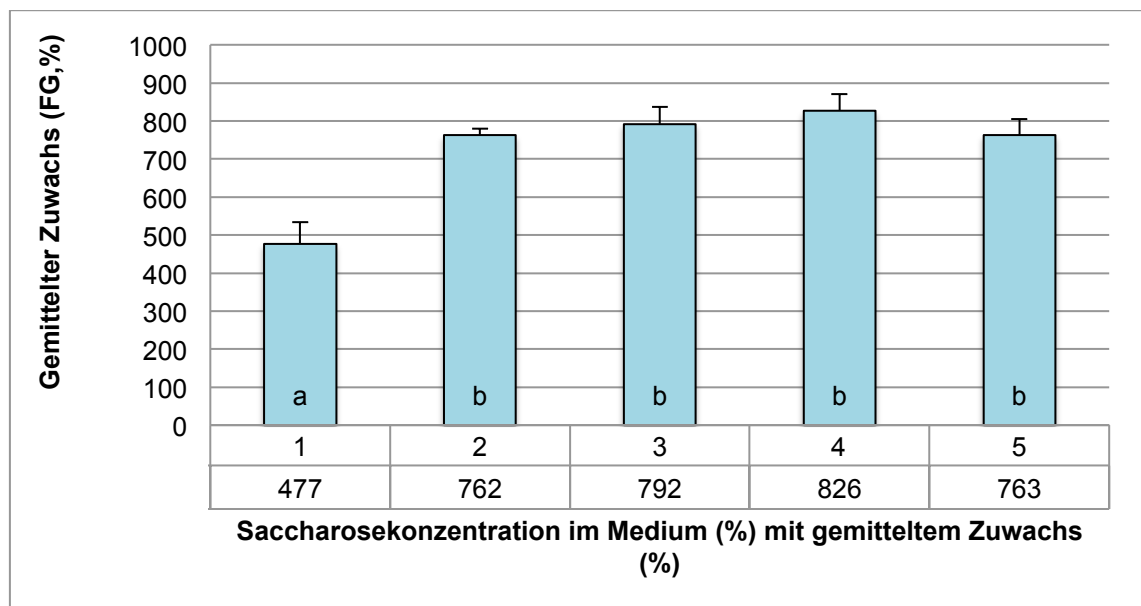


Diagramm 1: Einfluss der Saccharosekonzentration im Nährmedium auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

3.1.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum

Bei der Analyse der Inhaltsstoffe wurde besonderes Augenmerk auf die Cumarine gelegt. Hier konnten jedoch nicht alle in der HPLC erhaltenen Peaks Substanzen zugeordnet werden. Da die nicht identifizierten Inhaltsstoffe teilweise einen großen Anteil an der Gesamtpeakfläche hatten, wurden auch diese hier bewertet. Abbildung 2 (S.16) zeigt das HPLC-Chromatogramm der Wurzeln aus der Kontrollkultur mit 3% Saccharose.

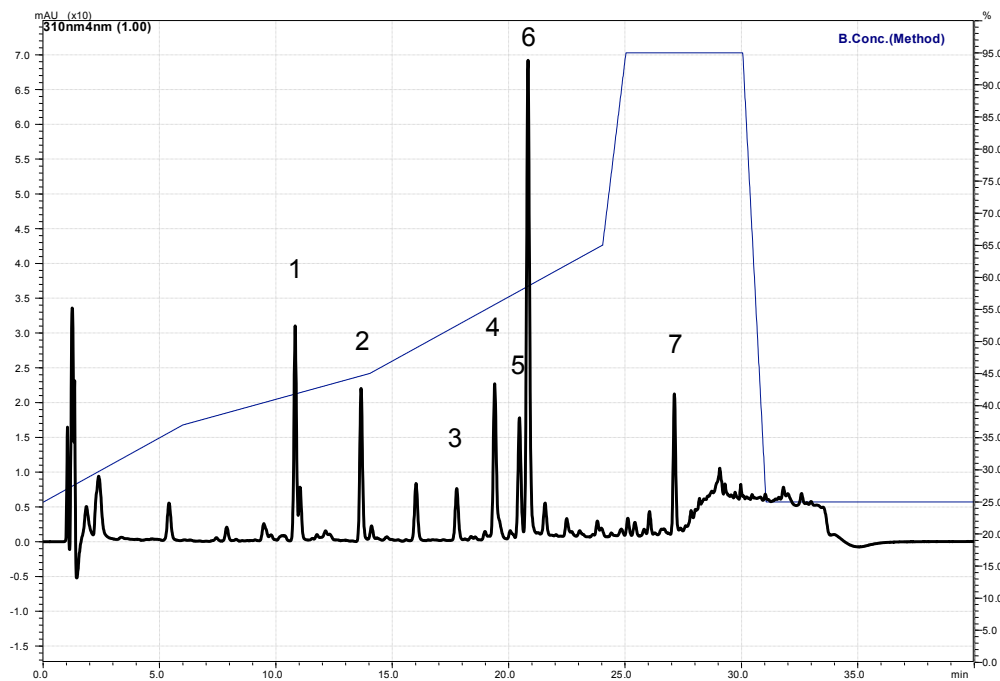


Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm der Inhaltsstoffe von „hairy roots“ aus der Kontrollkultur mit 3% Saccharose. (1) Inhaltsstoff A, (2) Inhaltsstoff B, (3) Imperatorin, (4) Cnidilin / Phellopterin, (5) Inhaltsstoff C, (6) Isoimperatorin, (7) Inhaltsstoff D

Die Auswertung der HPLC-Messungen zeigte, dass die unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen keinen Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum hatten. Vielmehr kam es zu einer Veränderung der Inhaltsstoffmenge, also der quantitativen Zusammensetzung der untersuchten Ansätze.

Identifizierte Inhaltsstoffe

Imperatorin und Isoimperatorin

Die Cumarine Imperatorin und Isoimperatorin konnten anhand ihrer UV-Spektren bei 310 nm und der Retentionszeiten nach der HPLC-DAD-Analyse eindeutig identifiziert werden (Vogl et al. 2011). Imperatorin erschien in der HPLC bei einer Retentionszeit von 17,8 Minuten, und Isoimperatorin wurde bei einer Retentionszeit von 20,9 Minuten erfasst.

Wie sich zeigte, hatte vor allem eine Saccharosekonzentration von 5% mit einem gemessenen Wert von 5,43% einen fördernden Effekt auf die Bildung von Imperatorin in den „hairy roots“ (Diagramm 2, S. 17). Den geringsten Effekt

auf die Imperatorinproduktion hatte 2% Saccharose mit einem Anteil von 1,44% an der Gesamtpeakfläche. Die Saccharosebehandlungen mit 1%, 2% und 4% führten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 3% Saccharose zu keinem signifikanten Unterschied im Gehalt an Imperatorin. Eine signifikante Differenz trat nur zwischen der oben genannten höchsten Imperatorinproduktion bei 5% Saccharose und den übrigen getesteten Saccharosekonzentrationen auf. Zusammenfassend zeigte die Analyse der Ergebnisse, dass nur die Kultivierung bei 5% Saccharose zu einem nennenswerten Unterschied im Imperatorinanteil im Vergleich zu den anderen Konzentrationen führte. Zwischen den vier niedrigeren Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

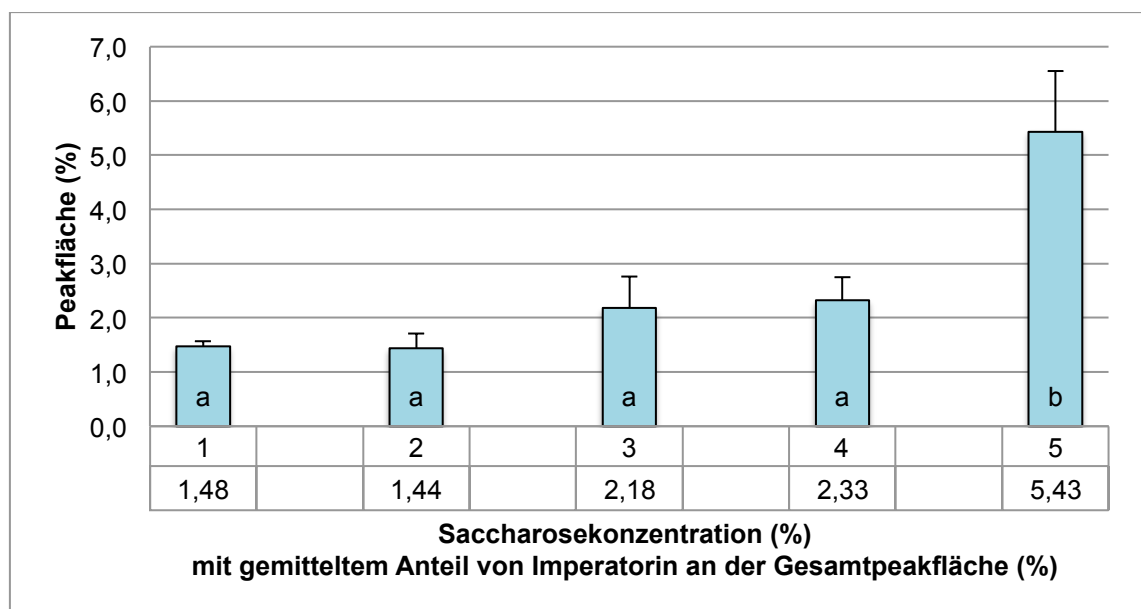


Diagramm 2: Einfluss der verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf die Produktion von Imperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Auswertung der HPLC-Ergebnisse ergab für Isoimperatorin keine signifikanten Unterschiede bei den unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen. Dieser Umstand kann jedoch auch auf die großen Standardabweichungen zurückgeführt werden (Diagramm 3, S. 18). Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass der größte durchschnittliche Anteil an Isoimperatorin mit 24,7% bei 5% Saccharose und der niedrigste durchschnittliche Anteil mit 17,8% bei der Kontrollkonzentration von 3% Saccharose zu beobachten war.

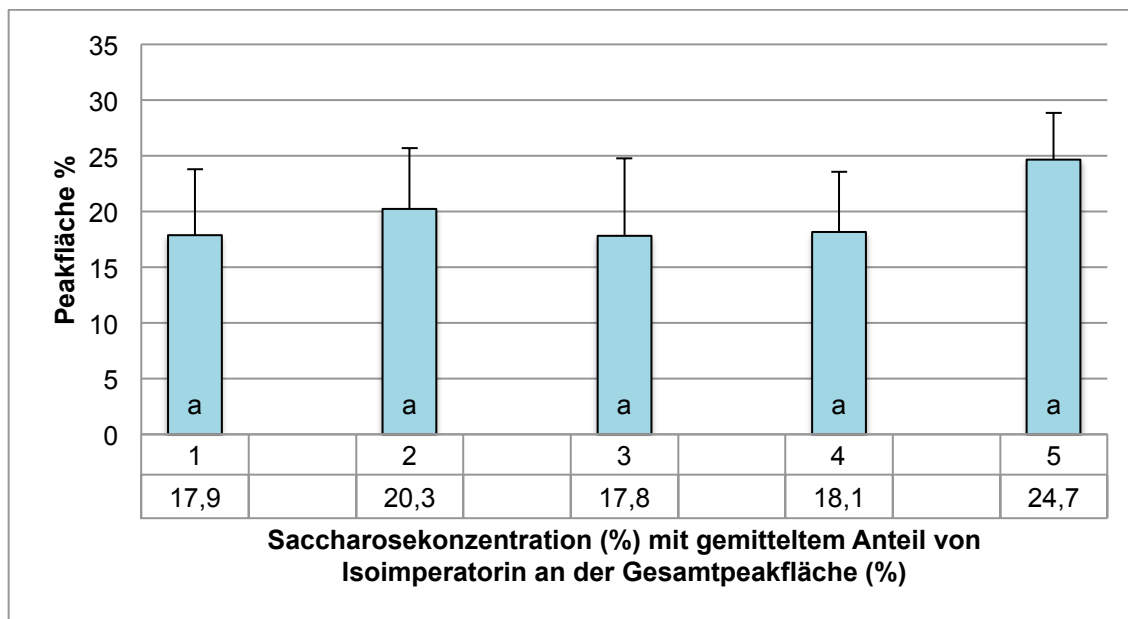


Diagramm 3: Einfluss der verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Cnidilin bzw. Phellopterin

Bei einer Retentionszeit von etwa 19,4 Minuten konnte in der HPLC-Messung ein Peak erfasst werden, dessen UV-Spektrum und Retentionszeit dem von Cnidilin bzw. Phellopterin entsprach. Anhand des UV-Spektrums und der Retentionszeit konnte keine eindeutige Identifizierung erfolgen, da durch die Strukturähnlichkeit dieser beiden Cumarine, die zueinander isomer sind, auch die UV-Spektren und Retentionszeiten sehr ähnlich sind.

Bei diesem nicht eindeutig identifizierten Peak traten zwischen den verschiedenen Saccharosekonzentrationen signifikante Unterschiede auf, die in zwei Gruppen eingeteilt werden konnten (Diagramm 4, S. 19): So wiesen die prozentuellen Anteile der Peakflächen dieses Inhaltsstoffes an der Gesamtpeakfläche bei den Saccharosebehandlungen bei 2%, 3%, 4% und 5% keine signifikanten Unterschiede zueinander auf und konnten somit der Gruppe A zugeordnet werden. Die Gesamtpeakflächenanteile bei den Saccharosekonzentrationen 1%, 2% und 5% unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant (Gruppe B). Die Ergebnisse der Konzentrationen 2% und 5% Saccharose wurden demzufolge beiden Gruppen zugeteilt. Eindeutige signifikante Unterschiede zeigten sich nur zwischen den Ergebnissen von 1% Saccharose zu 3% bzw. 4% Saccharose.

Der höchste Anteil der Peakfläche von Isoimperatorin an der Gesamtpeakfläche konnte mit 6,9% bei der Saccharosekonzentration von 1% erzielt werden, der niedrigste Anteil mit 5,1% bei der Kontrollkonzentration von 3%.

Um eine eindeutige Unterscheidung zwischen Cnidilin und Phellopterin zu ermöglichen, wurde sowohl eine HPLC-MS-Messung als auch eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.4 (S. 65) und Kapitel 3.5 (S. 69) vorgestellt.

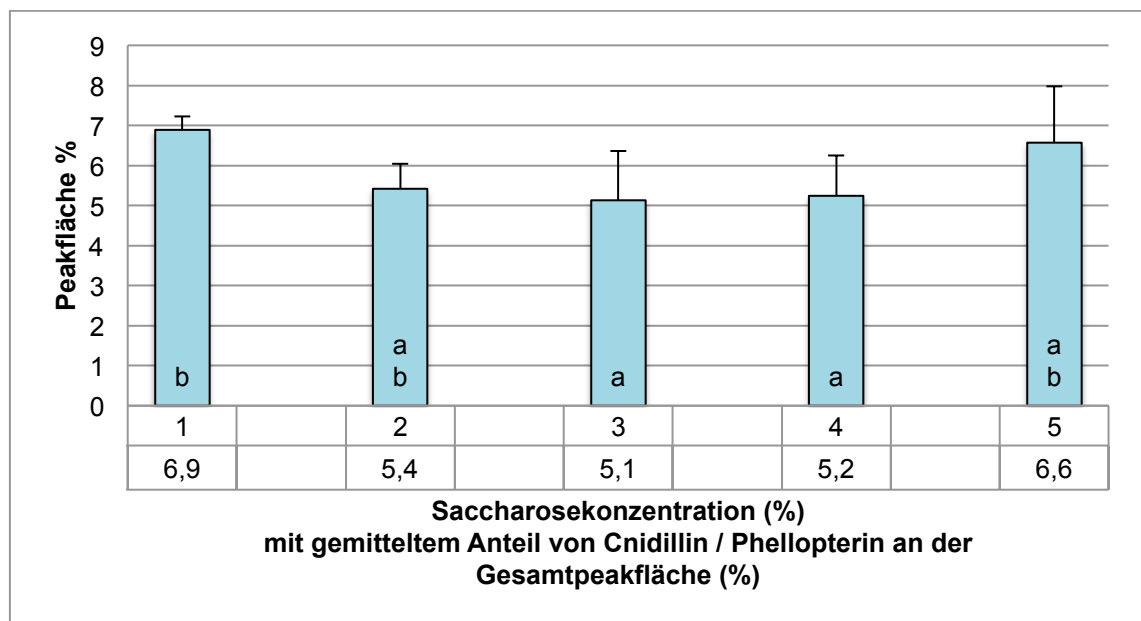


Diagramm 4: Einfluss der verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf die Produktion von Cnidilin / Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Nicht identifizierte Cumarine

Anhand der HPLC-Messung konnten noch weitere Inhaltsstoffe erfasst werden, deren Peakflächen ebenfalls einen gewissen Anteil an der Gesamtpeakfläche aufwiesen und aufgrund ihrer UV-Spektren der Substanzklasse der Cumarine zugeordnet werden konnten. Jedoch konnten diese Inhaltsstoffe weder anhand der UV-Spektren, noch anhand der HPLC-MS identifiziert werden. Aufgrund des beträchtlichen Anteils an der Gesamtpeakfläche sollten sie jedoch nicht unerwähnt bleiben. Diagramm 5 (S. 21) veranschaulicht den prozentuellen Anteil der vier unbekannten Inhaltsstoffe, die von Interesse sind.

In Bezug auf den Inhaltsstoff A, der bei einer Retentionszeit von etwa 10,8 Minuten in der HPLC-Messung erfasst wurde, konnte festgestellt werden, dass sich im Vergleich zur Kontrolle mit 3% Saccharose nur der Ansatz mit 5% Saccharose signifikant unterschied. Der prozentuelle Anteil der Peakfläche dieses Inhaltsstoffes an der Gesamtpeakfläche war bei 3% Saccharose mit 5,21% am höchsten und bei 5% Saccharose mit 3,38% am niedrigsten. Die Ergebnisse bei 5% Saccharose unterschieden sich von denen bei 2% und 3% Saccharose signifikant, zu allen anderen Saccharosekonzentrationen konnte keine deutliche Differenz festgestellt werden.

Der Inhaltsstoff B erschien im Chromatogramm bei einer Retentionszeit von ca. 13,6 Minuten. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede bei den prozentuellen Anteilen der Peakflächen an der Gesamtpeakfläche festgestellt werden, jedoch resultierten große Standardabweichungen. Der höchste Anteil zeigte sich bei 5% Saccharose mit 5,03% und der niedrigste bei 2% Saccharose mit 2,98%.

Bei der Retentionszeit von 20,5 Minuten wurde der Inhaltsstoff C gemessen, hier kam es zu einem signifikanten Unterschied im prozentuellen Anteil an der Gesamtpeakfläche zwischen der Konzentration 5% Saccharose und den anderen Konzentrationen. Die Anteile an der Gesamtpeakfläche bewegten sich zwischen dem niedrigsten Wert von 2,91% bei 2% Saccharose und dem höchsten mit 10,30% bei 5% Saccharose. 5% Saccharose hatte gegenüber der Kontrollkonzentration von 3% und dem dortigen Resultat von 3,43% einen signifikanten Anstieg der Bildung von Inhaltsstoff C zur Folge.

Beim vierten Inhaltsstoff D, der bei der Retentionszeit von 27,2 Minuten in der HPLC-Messung erschien, waren zwei signifikant unterschiedliche Gruppen ersichtlich. Zur Gruppe a gehören 3%, 4% und 5% Saccharose, zur Gruppe b 1% und 2% Saccharose. Die Messung ergab bei 1% Saccharose mit 7,71% den höchsten und bei 5% Saccharose mit 2,58% den niedrigsten Anteil an der Gesamtpeakfläche.

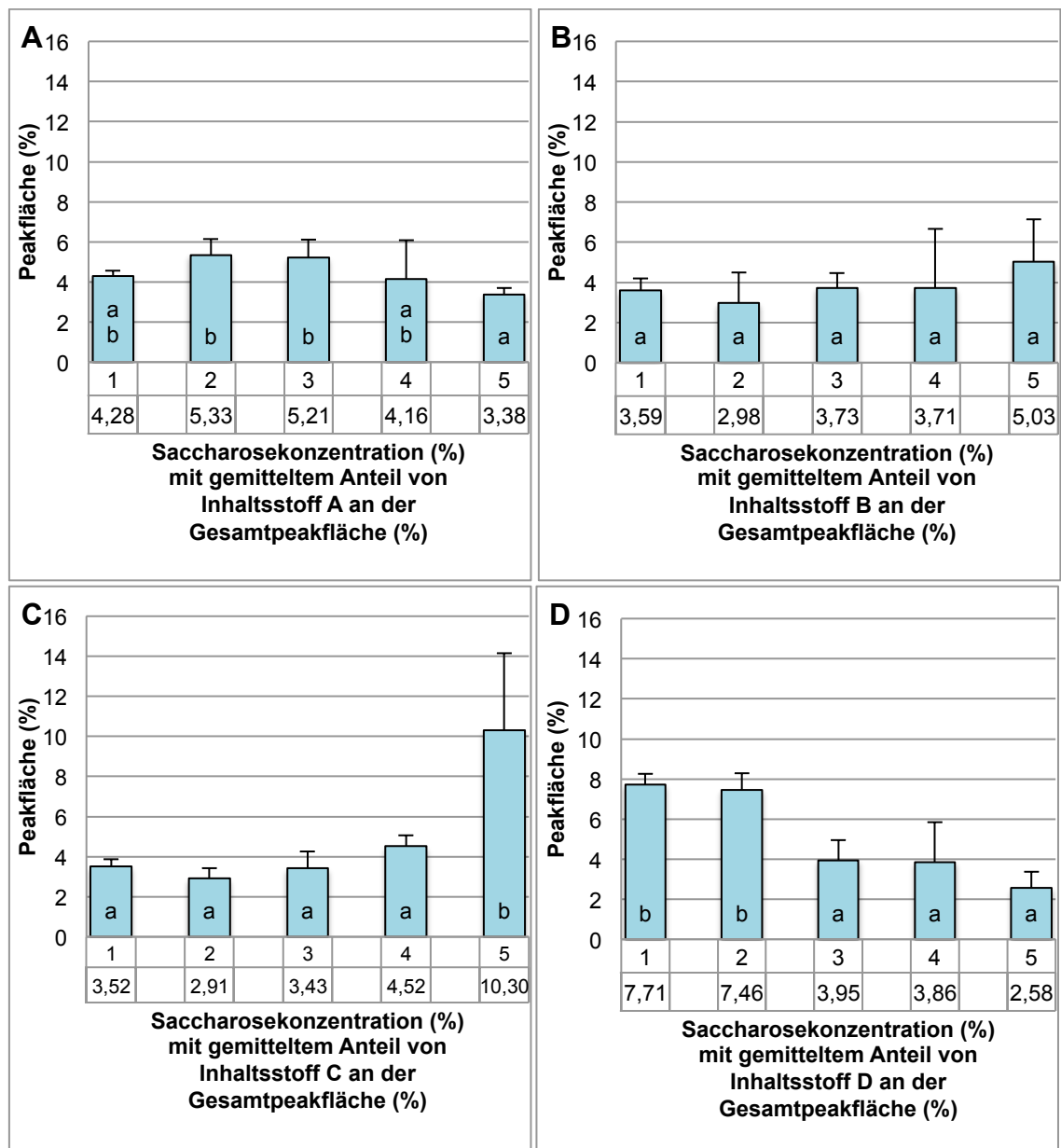


Diagramm 5: Einfluss der verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf die Produktion der vier unbekannten Inhaltsstoffe A bis D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

3.1.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse der abiotischen Elizitierung mit Saccharose

Die verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium beeinflussten die Biomasse mit steigender Konzentration positiv. Bei 1% Saccharose zeigte sich das niedrigste Trockengewicht, es steigerte sich mit zunehmender Saccharosekonzentration sukzessive, und bei 5% Saccharose wurde schlussendlich das höchste Trockengewicht erreicht. Die größte prozentuelle Zuwachsrate konnte bei 4% Saccharose erzielt werden, wobei hier nur zum niedrigsten Zuwachs bei 1% Saccharose ein signifikanter Unterschied bestand.

Im Hinblick auf die Inhaltsstoffe konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Saccharosekonzentrationen die Inhaltsstoffe in unterschiedlicher Weise beeinflussten.

Bei der Analyse von Imperatorin und Isoimperatorin zeigte sich, dass eine Saccharosekonzentration von 5% im Nährmedium die besten Ergebnisse lieferte. Ebenfalls von der höchsten Saccharosekonzentration positiv beeinflusst wurden die Inhaltsstoffe B und C. Im Gegensatz dazu bewirkten Konzentrationen von 1% Saccharose bei Cnidilin / Phellopterin und Inhaltsstoff D sowie 2% Saccharose beim Inhaltsstoff A den größten Anstieg der Peakflächenanteile an der Gesamtpeakfläche im Vergleich zur Kontrollkonzentration von 3% Saccharose. Die Werte der Kontrollkonzentration wurden somit durch die Kultivierung mit niedrigeren (1% und 2%) oder höheren (5%) Saccharosekonzentrationen teilweise signifikant überschritten. Die Kultivierung der „hairy roots“ bei bestimmten Saccharosekonzentrationen im Nährmedium konnte zur Steigerung der Produktion der verschiedenen Inhaltsstoffe beitragen.

3.2. Einfluss der Elizitierung mit Hefeextrakt

Die Elizitierung mit dem biotischen Elizitor Hefeextrakt kann ebenso wie die Saccharosekonzentration im Nährmedium Einfluss auf das Wachstum und die Sekundärstoffbildung nehmen (Chen et al. 2001; Zhao et al. 2005).

Einerseits werden die Ergebnisse dieser Elizitierung innerhalb der einzelnen Elizitoreinwirkzeiten (z.B. 0 g/l bis 10 g/l bei 48h) besprochen, andererseits werden die Ergebnisse bei den verschiedenen Elizitorreinwirkzeiten einander gegenübergestellt, um die Auswirkungen auf Biomasse und Inhaltsstoffe sowie diesbezügliche signifikante Unterschiede über alle durchgeführten Messungen hinweg herauszuarbeiten. Überdies ist eine Analyse der Ergebnisse innerhalb einer Hefeextraktkonzentration bei verschiedenen Einwirkzeiten des Elizitors (z.B. 0,1 g/l bei 48, 96 und 144 Stunden) möglich.

3.2.1. Einfluss auf die Biomasse

Die „hairy roots“-Kulturen wurden 21 Tage unter den Standardbedingungen kultiviert und dann mit dem aufgereinigten Hefeextrakt in sechs verschiedenen Konzentrationen eliziert sowie zur Kontrolle mit destilliertem Wasser versetzt. Die Bestimmung der Biomasse erfolgte anhand von drei Ansätzen pro Hefeextraktkonzentration und Elizitoreinwirkzeit.

Elizitierung über 48 Stunden

Bei einer Elizitoreinwirkzeit von 48 Stunden hatte die Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l den geringsten wachstumsfördernden Einfluss auf das Frischgewicht (6,02 g FG). Das höchste Frischgewicht konnte bei einer Konzentration von 0,5 g/l Hefeextrakt mit 7,55 g nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede ergaben sich hier zwischen der Hefeextraktkonzentration 0,1 g/l und den Konzentrationen 0,5 g/l bzw. 5 g/l Hefeextrakt (Tabelle 2, S. 24).

Das höchste Trockengewicht konnte bei den Hefeextraktkonzentrationen 0,5 g/l und 1 g/l Hefeextrakt, das niedrigste bei 0,1 g/l Hefeextrakt erzielt werden. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen der Konzentration 0,1 g/l und den Konzentrationen 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l und 5 g/l,. Keine signifikanten Unterschiede traten zwischen der Kontrolle bzw. 10 g/l und den restlichen Konzentrationen auf. Überdies zeigte die Kontrolle beim Frischgewicht und beim Trockengewicht eine relativ große Standardabweichung, also stark variierende Werte, im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen (Tabelle 2, S. 24).

Die Verhältnisse von Frischgewicht zu Trockengewicht befanden sich bei allen Hefeextraktkonzentrationen in einem engen Bereich zwischen 9,0 und 9,7. Die optischen Auswertung ergab eine stärker werdende dunkle Verfärbung und vermehrte Kallusbildung und zwar je höher die Elizitorkonzentration war (Tabelle 2, S.24).

Tabelle 2: Einfluss der Elizitorkonzentration über 48 Stunden auf Frisch (FG)- und Trockengewicht (TG), Verfärbung und Kallusbildung der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Hefe-konz. (g/l)	FG (g)	TG (g)	FG/TG	Verfärbung	Kallusbildung
0 g/l	6,74 ± 1,37 ^{ab}	0,72 ± 0,12 ^{ab}	9,4	-	-/+
0,1 g/l	6,02 ± 0,54 ^a	0,65 ± 0,06 ^a	9,3	-	-/+
0,5 g/l	7,55 ± 0,13 ^b	0,79 ± 0,01 ^b	9,6	-/+	+
1 g/l	7,19 ± 0,31 ^{ab}	0,79 ± 0,02 ^b	9,1	+	+
2 g/l	7,05 ± 0,35 ^{ab}	0,78 ± 0,02 ^b	9,0	+	++
5 g/l	7,44 ± 0,77 ^b	0,77 ± 0,05 ^b	9,7	++	++
10 g/l	6,69 ± 0,87 ^{ab}	0,74 ± 0,07 ^{ab}	9,0	++	++

Die Hefeextraktkonzentration von 0,5 g/l erbrachte die höchste prozentuelle Zuwachsrates mit 938%. Wie schon beim Frisch- und Trockengewicht zu beobachten war, erzielte eine Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l auch bei der Wachstumsrate den geringsten Wert mit 743%, also ca. 4/5 des höchsten Wertes. Signifikante Unterschiede traten nur zwischen der Hefeextraktkonzentration 0,1 g/l und den Konzentrationen von 0,5 g/l bzw. 5 g/l auf (Diagramm 7).

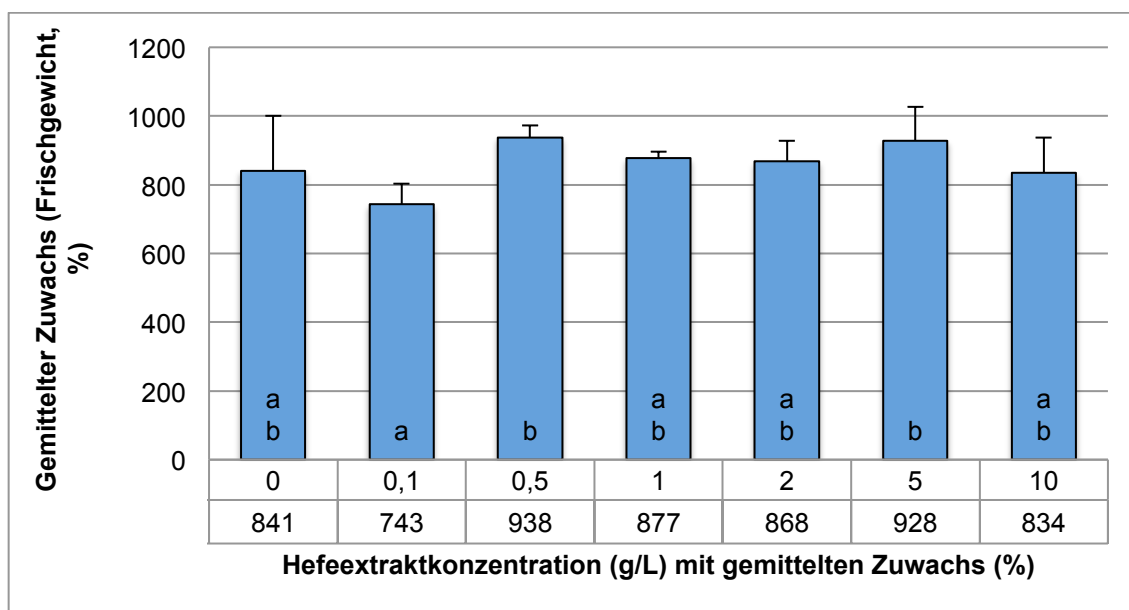


Diagramm 7: Einfluss der Elizitorkonzentration über 48 Stunden auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Elizitierung über 96 Stunden

Die Elizitierung mit Hefeextrakt und nachfolgender Einwirkzeit von 96 Stunden zeigte folgende Ergebnisse, die auch in Tabelle 3 dargestellt sind:

Das Frischgewicht erreichte den höchsten Wert (7,36 g) bei den Hefeextraktkonzentrationen von 2 g/l und 5 g/l, das niedrigste hingegen wurde mit 6,56 g bei der Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l gemessen, signifikante Unterschiede traten nicht auf.

Das höchste Trockengewicht war 0,79 g bei einer Elizitorkonzentration von 2 g/l und das niedrigste mit 0,64 g bei 0,1 g/l Hefeextrakt. Signifikant unterschiedlich erwiesen sich die Gewichte zwischen den Hefekonzentrationen 0,1 g/l und den Konzentrationen 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l bzw. 10 g/l, zwischen den Trockengewichten der Kontrollkulturen und den der elizitierten Kulturen trat kein signifikanter Unterschied auf.

Die Verhältnisse von Frischgewicht zu Trockengewicht zeigten mit den Faktoren zwischen 9,3 und 10,5 vergleichbare Ergebnisse. Bei den höheren Hefekonzentrationen wurden, wie bereits bei der Elizitierung über 48 Stunden, eine dunkle Verfärbung und vermehrte Kallusbildung beobachtet.

Tabelle 3: Einfluss der Elizitorkonzentration über 96 Stunden auf Frisch (FG)- und Trockengewicht (TG), Verfärbung und Kallusbildung der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Hefe-konz. g/l	FG (g)	TG (g)	FG/TG	Verfärbung	Kallus-bildung
0 g/l	6,82 ± 0,12 ^a	0,72 ± 0,02 ^{abc}	9,5	-	-/+
0,1 g/l	6,56 ± 0,11 ^a	0,64 ± 0,04 ^a	10,3	-	-/+
0,5 g/l	7,21 ± 0,35 ^a	0,69 ± 0,06 ^{ab}	10,5	-/+	+
1 g/l	7,12 ± 0,15 ^a	0,76 ± 0,08 ^{bc}	9,4	+	+
2 g/l	7,36 ± 0,90 ^a	0,79 ± 0,02 ^c	9,3	+	++
5 g/l	7,36 ± 0,89 ^a	0,76 ± 0,02 ^{bc}	9,7	++	++
10 g/l	7,11 ± 1,32 ^a	0,74 ± 0,06 ^{bc}	9,6	++	++

Die ermittelten prozentuellen Zuwachsraten der Frischgewichte, graphisch dargestellt in Diagramm 8 (S. 26), zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen. Der niedrigste

Zuwachs zeigte sich bei 0,1 g/l Hefeextrakt mit 812% und der höchste mit 918% bei 5 g/l.

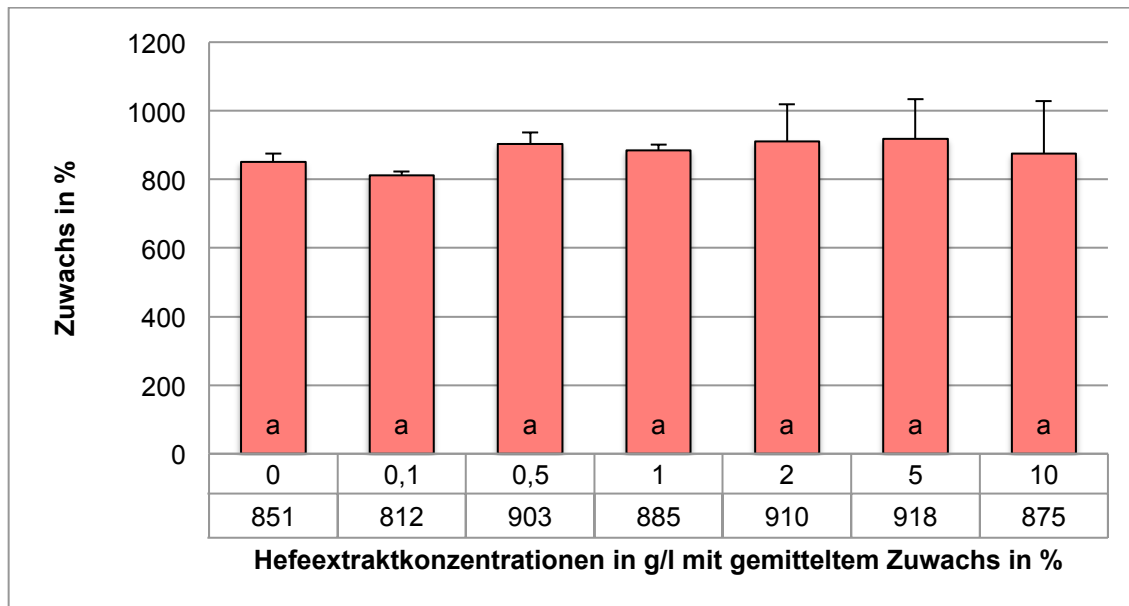


Diagramm 8: Einfluss der Elizitorkonzentration über 96 Stunden auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Elizitierung über 144 Stunden

Tabelle 4 (S. 27) bietet einen Überblick der Ergebnisse von Frisch- und Trockengewichten der Elizitierung mit Hefeextrakt über 144 Stunden.

Das Frischgewicht war bei einer Konzentration von 5 g/l Hefeextrakt am höchsten (7,94 g) und bei 10 g/l mit 6,30 g am niedrigsten. Letzteres unterschied sich signifikant von allen anderen ermittelten Gewichten, weitere signifikante Unterschiede wurden nicht ermittelt..

Bei Vergleich der Trockengewichte zeigten sich die höchsten Werte bei der Kontrollkultur sowie bei 2 g/l Hefeextrakt. Das niedrigste Trockengewicht konnte genau bei der Konzentration, die beim Frischgewicht den höchsten Wert erreichte, nämlich bei 5 g/l Hefeextrakt nachgewiesen werden. Der Umstand, dass die „hairy roots“-Kulturen mit dem höchsten Frischgewicht das niedrigste Trockengewicht aufwiesen, deutet auf einen hohen Flüssigkeitsgehalt bei gleichzeitig geringer Zellmasse hin. Die Erklärung für das niedrige Trockengewicht ist somit der Flüssigkeitsverlust durch die Trocknung der „hairy roots“.

Das Verhältnis zwischen Frisch- und Trockengewicht bewegte sich zwischen dem niedrigsten Faktor 9,0 bei 10 g/l Hefeextrakt und 11,5 bei 5 g/l Hefeextrakt, womit sich der Trocknungsverlust beim Vergleich dieser Kulturen um den Faktor 2,5 unterschied.

Die optische Auswertung der „hairy roots“-Kulturen ergab auch bei der Hefebehandlung über 144 Stunden eine mit steigender Hefekonzentration stärker werdende dunkle Verfärbung der „hairy roots“ sowie vermehrte Kallusbildung.

Tabelle 4: Einfluss der Elizitorkonzentration über 144 Stunden auf Frisch (FG)- und Trockengewicht (TG), Verfärbung und Kallusbildung der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Hefe-konz. g/l	FG (g)	TG (g)	FG/TG	Verfärbung	Kallus-bildung
0 g/l	7,51 ± 0,33 ^b	0,75 ± 0,02 ^b	10,0	-	-/+
0,1 g/l	7,36 ± 0,31 ^b	0,74 ± 0,03 ^b	10,0	-	+
0,5 g/l	7,75 ± 0,03 ^b	0,74 ± 0,02 ^{ab}	10,5	-/+	+
1 g/l	7,18 ± 0,86 ^b	0,73 ± 0,02 ^{ab}	9,8	+	++
2 g/l	7,73 ± 0,31 ^b	0,75 ± 0,02 ^b	10,3	+	++
5 g/l	7,94 ± 0,40 ^b	0,69 ± 0,03 ^a	11,5	++	++
10 g/l	6,30 ± 0,34 ^a	0,70 ± 0,03 ^a	9,0	++	++

Bei der Elizitoreinwirkzeit von 144 Stunden bestand zwischen den Konzentrationen von 0 g/l bis 5 g/l Hefeextrakt kein signifikanter Unterschied in der prozentuellen Zuwachsrate (Diagramm 9, S. 28). Der niedrigste Zuwachs mit 764% bei 10 g/l Hefeextrakt zeigte zu allen anderen elizitierten Kulturen sowie zur Kontrolle einen signifikanten Unterschied. Die höchste Zuwachsrate mit 991% konnte bei einer Hefeextraktkonzentration von 5 g/l festgestellt werden und unterschied sich nur vom Zuwachs bei 10 g/l signifikant.

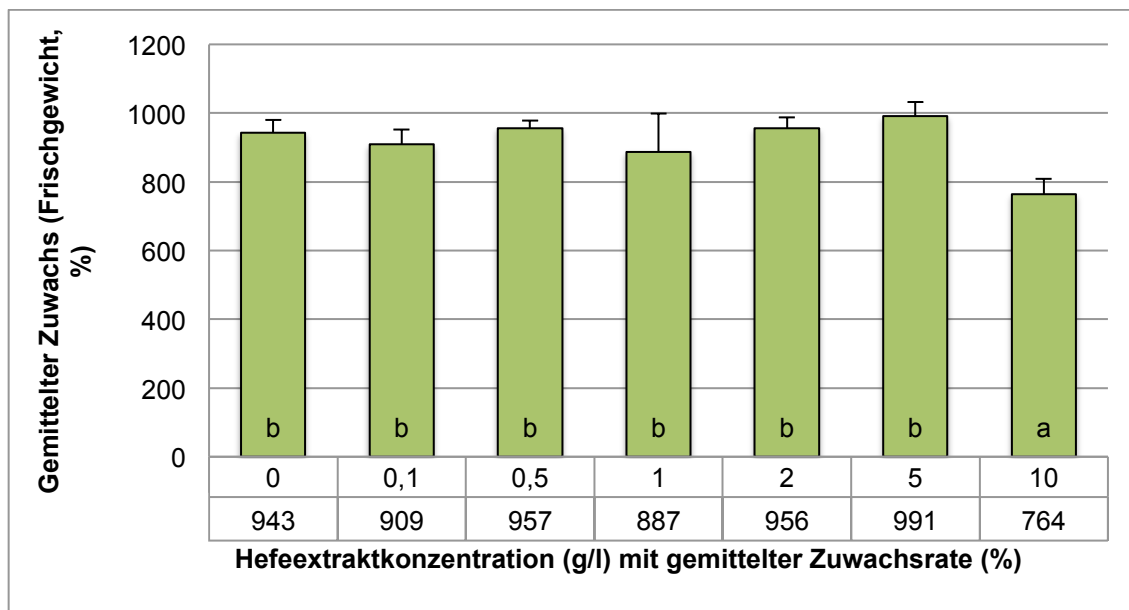


Diagramm 9: Einfluss der Elizitorkonzentration über 144 Stunden auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Vergleich der Elizitierungszeiträume

Die Analyse der Ergebnisse zeigte beim Vergleich der verschiedenen Elizitierungszeiträume folgende Resultate:

Im Bezug auf das Frischgewicht (Diagramm 10, S. 29) wurde der höchste Wert (7,94 g) bei einer Konzentration von 5 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden gemessen und unterschied sich vom Frischgewicht bei 0,1 g/l über 48 und 96 Stunden sowie bei 10 g/l über 144 Stunden signifikant. Mit 6,02 g zeigte sich der niedrigste Mittelwert der Frischgewichte bei einer Konzentration von 0,1 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden. Signifikante Unterschiede zum niedrigsten Wert traten bei den Ergebnissen bei 0,5 g/l und 5 g/l über 48 Stunden, bei 2 g/l und 5g/l über 96 Stunden sowie bei 0 g/l, 0,1 g/l, 0,5 g/l, 2 g/l und 5 g/l über 144 Stunden auf. Innerhalb der Hefeextraktkonzentrationen, aber bei verschiedenen Elizitoreinwirkzeiten unterschied sich das Frischgewicht bei der Elizitierung über 144 Stunden und der Hefekonzentration von 0,1 g/l signifikant von dem bei 48 Stunden. Alle anderen Konzentrationen wiesen keinen signifikanten Unterschied in den Ergebnissen zwischen den verschiedenen Elizitierungszeiträumen auf.

Insgesamt führte die Elizitierung bei den verschiedenen Ansätzen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem positiven Einfluss auf das Frischgewicht.

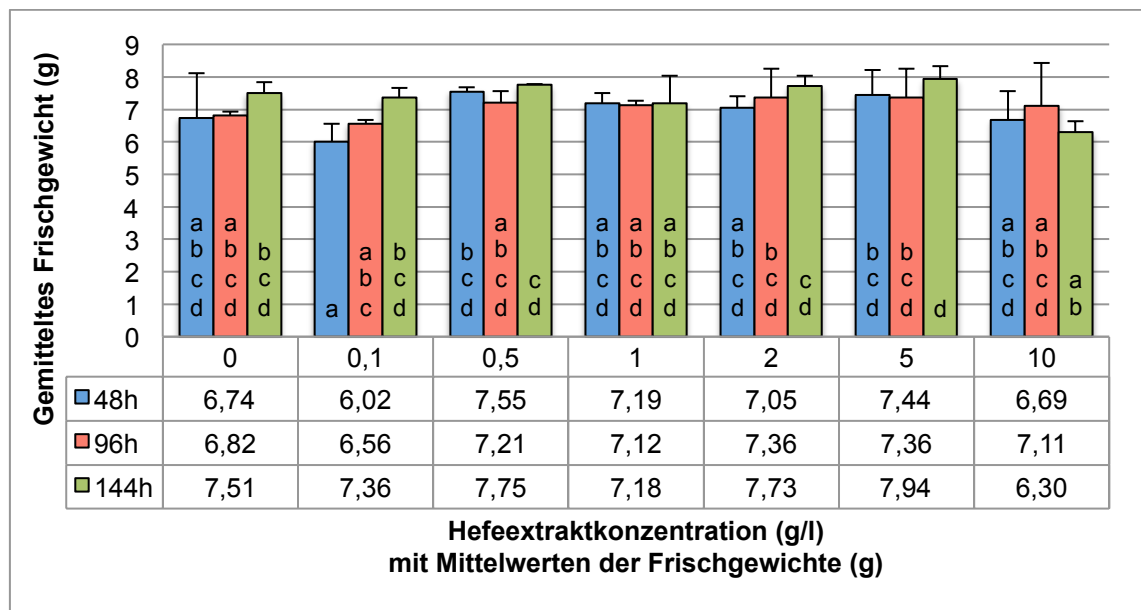


Diagramm 10: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf das Frischgewicht der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die höchsten Trockengewichte (Diagramm 11, S. 30) zeigte sich bei 0,5 g/l und 1 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden und bei 2g/l über 96 Stunden mit einem Mittelwert von 0,79 g und wies signifikante Unterschiede zu den Trockengewichten bei 0,1 g/l über 48 Stunden, bei 0,1 g/l und 0,5 g/l über 96 Stunden und bei 5 g/l über 144 Stunden auf. Der niedrigste Wert wurde bei 0,1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden festgestellt und unterschied sich signifikant von den Werten von 0,5 g/l bis 10 g/l über 48 Stunden, von 1 g/l bis 10 g/l über 96 Stunden und von 0 g/l bis 2 g/l über 144 Stunden.

Im Folgenden werden die signifikanten Unterschiede zwischen den Elizitierungszeiträumen bei derselben Hefeextraktkonzentration dargestellt: Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich in der Kontrollgruppe. Bei der Konzentration von 0,1 g/l Hefeextrakt unterschied sich das Ergebnis des Trockengewichtes bei der Elizitierung über 144 Stunden signifikant von den Ergebnissen über 48 und 96 Stunden, welche deutlich niedriger waren. Ebenfalls signifikant unterschieden sich bei der Konzentration von 0,5 g/l die Ergebnisse der Elizitierung über 48 Stunden von der über 96 Stunden, wobei das Trockengewicht bei 48 Stunden höher war. Bei den anderen Konzentrationen von 1 g/l bis 10 g/l gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Resultaten der Trockengewichte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Elizitierung über die kürzeren Zeiträume von 48 und 96 Stunden zwar keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle

aufwiesen, jedoch die Resultate im Vergleich zu der Elizitoreinwirkzeit von 144 Stunden, vor allem bei höheren Konzentrationen des Hefeextraktes, besser waren.

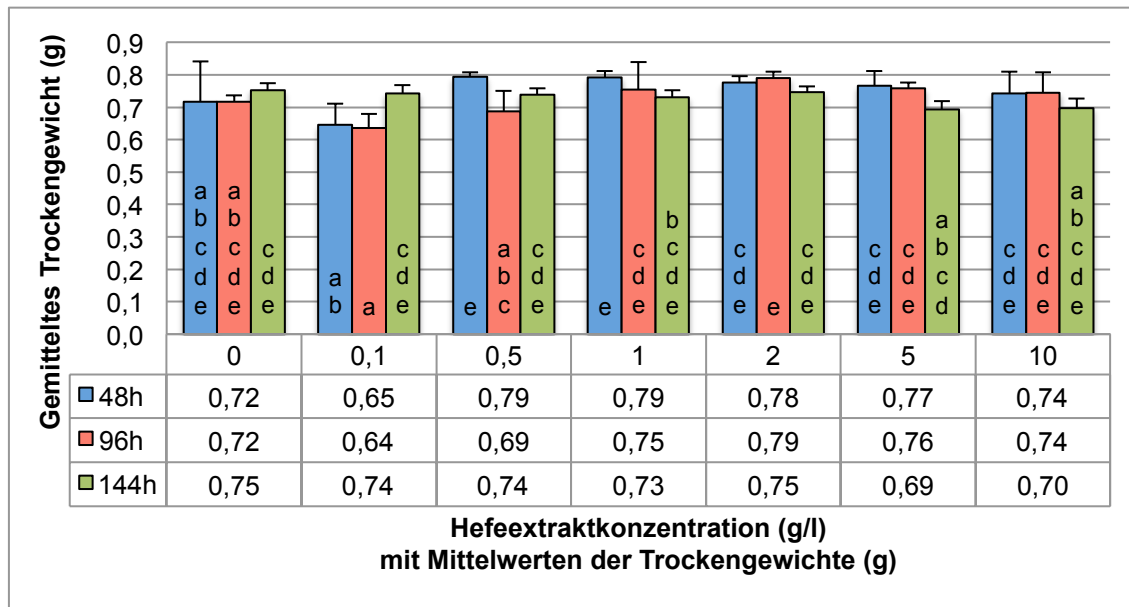


Diagramm 11: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf das Trockengewicht der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Der Vergleich des Zuwachses des Frischgewichts bei unterschiedlichen Elizitierungszeiträumen und Elizitorkonzentrationen (Diagramm 12, S. 31) ergab den höchsten Durchschnittswert mit 991% bei 5 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen bei 0,1 g/l über 48 und 96 Stunden und 10 g/l über 144 Stunden. Der niedrigste Wert mit 743% ergab sich bei 0,1 g/l über 48 Stunden und unterschied sich somit signifikant von den Resultaten bei der Kontrollkonzentration über 144 Stunden, bei 0,1 g/l über 144 Stunden, bei 0,5 g/l bei allen Elizitierungszeiträumen, bei 2 g/l über 96 und 144 Stunden und von allen Zeiträumen bei 5 g/l. Innerhalb der Konzentrationen konnte nur bei 0,1 g/l über 144 Stunden ein signifikanten höherer Zuwachs als bei 48 Stunden erzielt werden. Insgesamt konnte jedoch ein positiver Einfluss der Elizitierung auf den Zuwachs der Frischgewichte festgestellt werden.

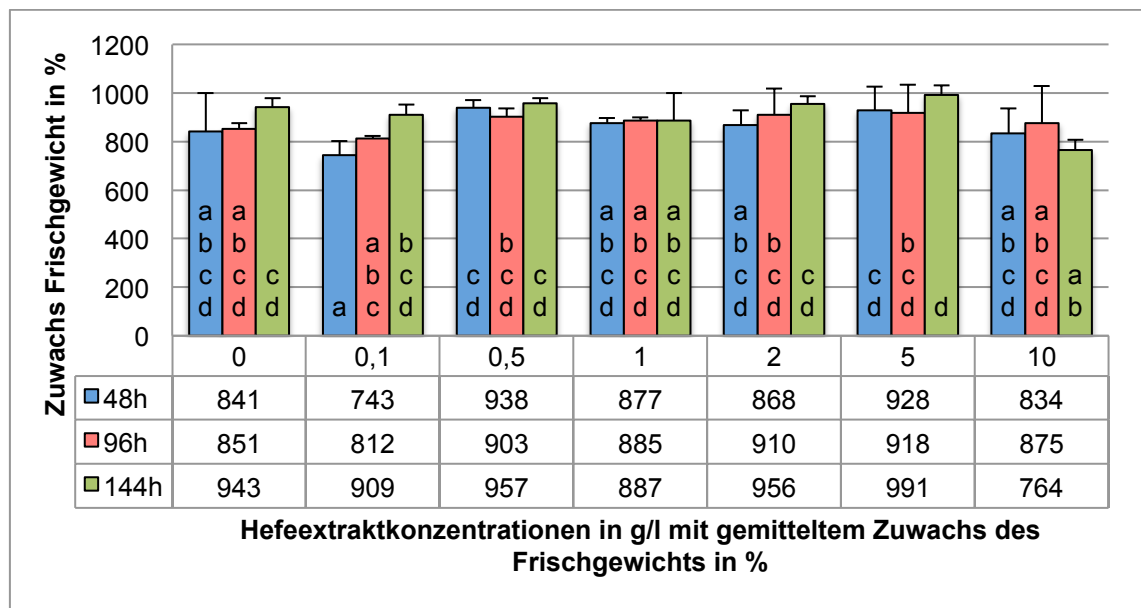


Diagramm 12: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf den Zuwachs des Frischgewichts der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

3.2.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum

Die Analyse der Inhaltsstoffe wurde bei den Ansätzen mit Elizitierung durch Hefeextrakt sowie der Kontrolle wie in Kapitel 3.2.1. durchgeführt. Es erfolgten zwei HPLC-Messungen von je zwei Ansätzen pro Hefeextraktkonzentration und Elizitoreinwirkzeit. Ausgenommen waren die Konzentration 0,1 g/l über 96 Stunden mit zwei Messungen bei dem einem Ansatz und nur einer Messung beim anderen Ansatz, sowie die Konzentration 0,5 g/l über 96 Stunden mit jeweils einer Messung pro Ansatz. Hier traten ebenso, wie bereits bei der abiotischen Elizitierung mit Saccharose, nicht identifizierbare HPLC-Peaks auf, die aufgrund ihres Anteils an der Gesamtpeakfläche bei der Analyse mitberücksichtigt wurden. Bei der qualitativen Beurteilung der HPLC-Messungen und der dabei erhaltenen UV-Spektren ergab sich durch die verschiedenen Elizitorkonzentrationen und –einwirkzeiten keine geänderte Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der „hairy roots“. Das Chromatogramm der Kontrolle ohne Elizitierung in Abbildung 3 (S. 32) spiegelt somit das Inhaltsstoffspektrum aller Ansätze wider.

Durch die biotische Elizitierung mit Hefeextrakt wurde also nur die quantitative Zusammensetzung der Inhaltsstoffe beeinflusst.

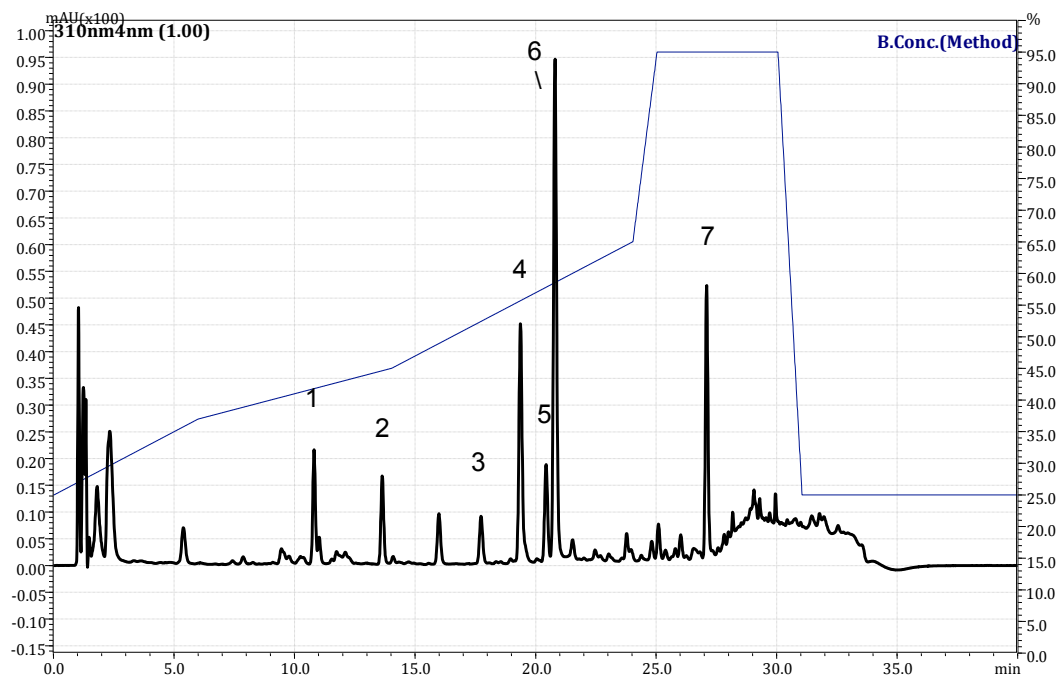


Abbildung 3: HPLC-Chromatogramm von „hairy roots“ aus der Kontrollkultur ohne den Elizitor Hefeextrakt: (1) Inhaltsstoff A, (2) Inhaltsstoff B, (3) Imperatorin, (4) Cnidilin / Phellopterin, (5) Inhaltsstoff C, (6) Isoimperatorin, (7) Inhaltsstoff D

Identifizierte Inhaltsstoffe

Wie bei den Ansätzen mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen konnten durch HPLC-DAD die Cumarine Imperatorin und Isoimperatorin identifiziert werden. Bei den vorgenommenen Messungen waren die Retentionszeiten etwas verschoben, wodurch Imperatorin bei einer Retentionszeit von 17,8 bis 17,9 und Isoimperatorin bei 20,9 bis 21,1 Minuten erfasst wurden.

Imperatorin

Die Behandlung der „hairy roots“-Kulturen mit unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen zeigte bei einer Elizitierungsdauer über 48 Stunden keine signifikanten Auswirkungen auf die Produktion von Imperatorin (Diagramm 13, S 33). Der höchste prozentuelle Peakflächenanteil von Imperatorin mit 2,09% an der Gesamtpeakfläche wurde bei der Kontrollgruppe (0 g/l Hefeextrakt) gemessen, wobei die Hefeextraktkonzentration von 10 g/l nur einen geringfügig niedrigeren Anteil mit 2,04% erzielte. Mit einem Peakflächenanteil von 1,66% zeigte die Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l die

niedrigste Ausbeute an Imperatorin. Ein Ergebnis, das sich jedoch, wie erwähnt, nicht signifikant von den anderen Behandlungen unterscheidet.

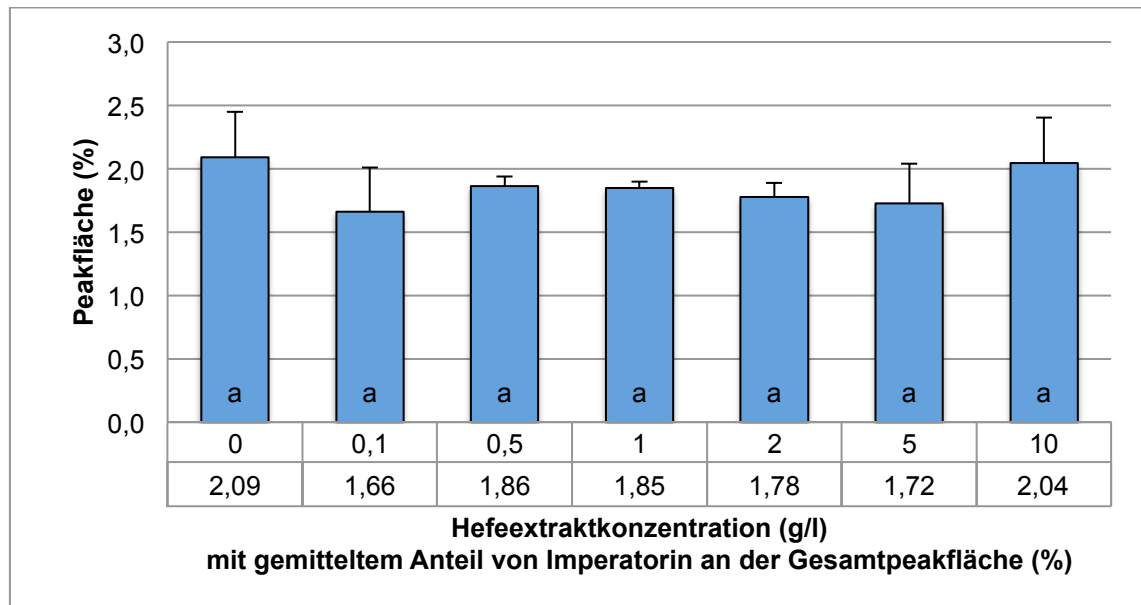


Diagramm 13: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 48 Stunden auf die Produktion von Imperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Im Gegensatz zur Elizitierungsdauer von 48 Stunden konnte bei 96 Stunden eine deutliche Differenz der Ausbeuten von Imperatorin bei den verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen festgestellt werden (Diagramm 14, S. 34). Der höchste Peakflächenanteil von Imperatorin wurde mit einem Wert von 2,39% an der Gesamtpeakfläche bei 5 g/l gemessen und betrug somit das Doppelte des niedrigsten Wertes (1,13%) bei 0,5 g/l Hefeextrakt.

Zwischen den Hefeextraktkonzentrationen von 0,1 g/l, 0,5 g/l, 10 g/l und der Kontrollkonzentration mit 0 g/l zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Ebenso wurde zwischen den Konzentrationen 0,1 g/l, 2 g/l und 10 g/l sowie zwischen den Konzentrationen 1 g/l, 2 g/l und 5 g/l keine signifikante Differenz festgestellt. Im Vergleich zur Kontrollkonzentration und zu 0,5 g/l Hefeextrakt konnten bei den Hefeextraktkonzentrationen von 1 g/l, 2 g/l und 5 g/l signifikant höhere prozentuelle Anteile an der Gesamtpeakfläche nachgewiesen werden. Der deutliche Unterschied zwischen der Kontrollkonzentration (1,23 %) und der Hefeextraktkonzentration von 5 g/l (2,39 %) zeigte daher einen positiven Einfluss der Elizitierung auf die Imperatorinproduktion.

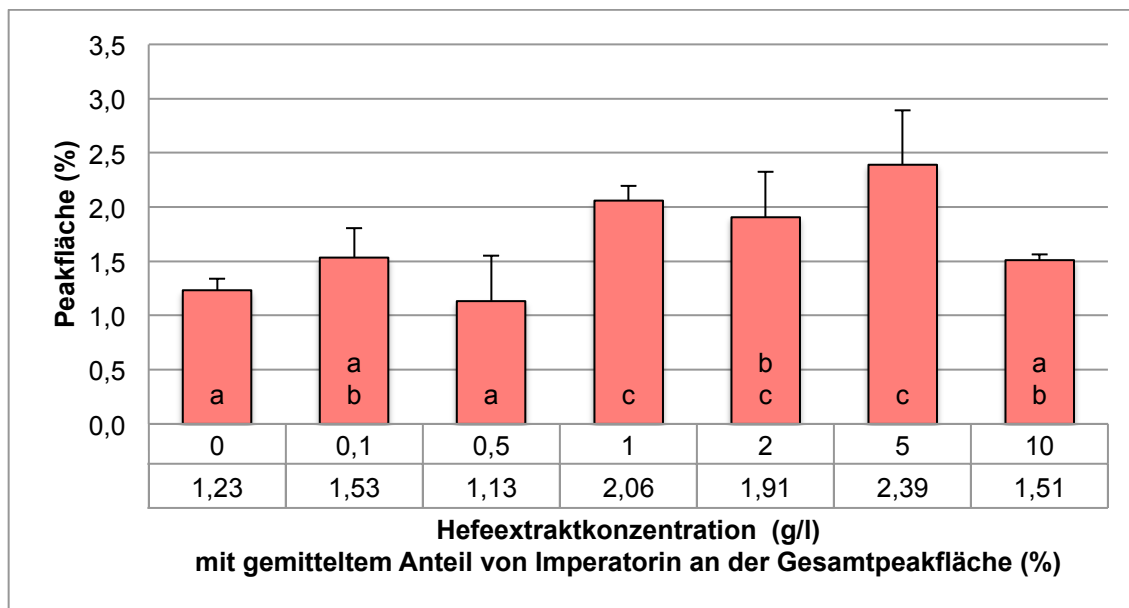


Diagramm 14: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 96 Stunden auf die Produktion von Imperatorin in hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Durch die HPLC-Messungen der Ansätze über die Elizitierungszeit von 144 Stunden konnte ein hemmender Einfluss der Elizitierung auf die Produktion von Imperatorin (Diagramm 15, S. 35) nachgewiesen werden. Bei der Kontrollkonzentration von 0 g/l Hefeextrakt wurde mit 2,00% der höchste prozentuelle Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche gemessen und danach eine sinkende Bildung von Imperatorin festgestellt. Keinen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen der Kontrollkonzentration gab es bei 0,1 g/l und 0,5 g/l Hefeextrakt, aber die Werte aller anderen Konzentrationen zeigten einen deutlichen Unterschied, in dem Ausmaß, dass sich eine schlechtere Bildung an Imperatorin zeigte. Ebenfalls signifikant unterschieden sich die Ergebnisse bei 0,1 g/l bzw. 0,5 g/l von denen bei 5 g/l bzw. 10 g/l. Weiters ergab sich zwischen den Werten bei 0,1 g/l und 2 g/l ein deutlicher Unterschied. Der niedrigste prozentuelle Anteil an der Gesamtpeakfläche wurde mit einem Wert von 1,22% bei der Elizitierung mit 5 g/l Hefeextrakt festgestellt und war somit im Vergleich zur Kontrolle und den Elizitorkonzentrationen von 0,1 g/l und 5 g/l signifikant niedriger.

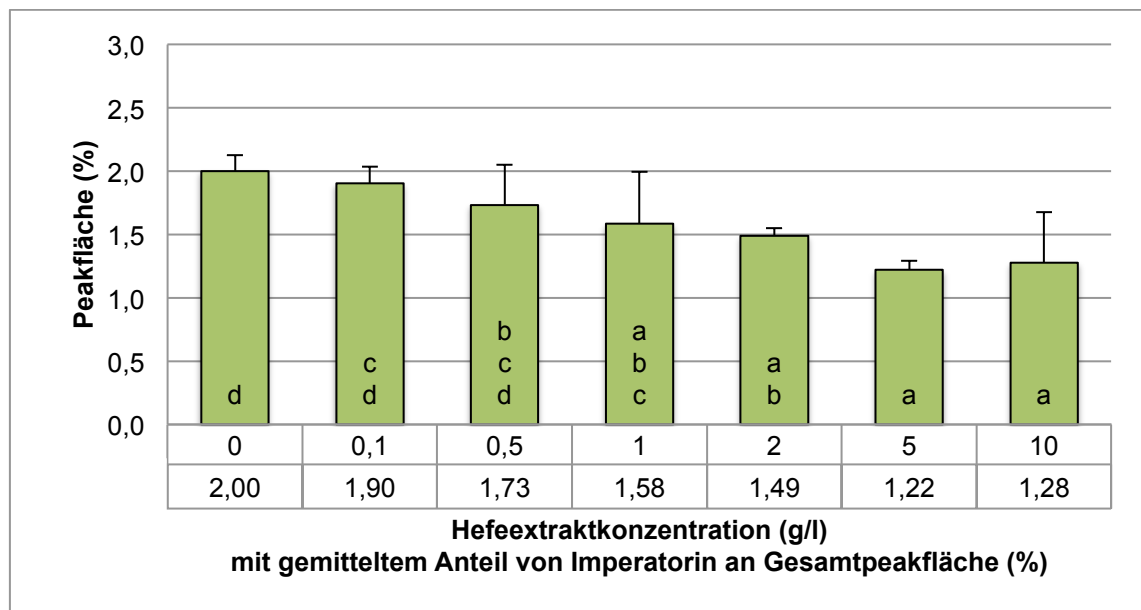


Diagramm 15: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 144 Stunden auf die Produktion von Imperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Der Vergleich der prozentuellen Peakflächenanteile von Imperatorin an der Gesamtpeakfläche über alle Elizitorkonzentrationen und Elizitierungszeiträumen (Diagramm 16, S. 36) hinweg zeigte, dass eine Hefeextraktkonzentration von 5 g/l über 96 Stunden den besten Einfluss auf die Bildung des Cumarins hatte. Diese Konzentration zeigte nur zu den Kontrollkonzentrationen bei 48 und 144 Stunden, sowie bei 1 g/l über 96 Stunden und bei 10 g/l über 48 Stunden keinen signifikanten Unterschied in der Bildung von Imperatorin, zu allen anderen Konzentrationen bestand dieser jedoch. Auch beim niedrigsten Wert von 1,13% bei 0,5 g/l über 96 Stunden bestand zum Großteil der anderen Konzentrationen eine signifikante Differenz in den Ergebnissen. Innerhalb der einzelnen Hefeextraktkonzentrationen, aber bei den verschiedenen Elizitoreinwirkzeiten konnten signifikante Unterschiede im Imperatoringehalt bei der Kontrollkonzentration bzw. 0,5 g/l Hefeextrakt zwischen 96 Stunden und den anderen Zeiträumen, zwischen allen Zeiträumen bei 5 g/l und bei 10 g/l zwischen 48 Stunden und den anderen Zeiträumen festgestellt werden.

Einen positiven Einfluss der Elizitierung mit Hefeextrakt hatte die Behandlung über 96 Stunden. Bei den anderen Elizitierungszeiträumen zeigte sich kein Vorteil der Behandlung mit dem Hefeextrakt gegenüber der Kontrollgruppe ohne Hefeextrakt. Bei der allgemeinen Betrachtung konnte festgestellt werden, dass besonders die Elizitierung über 144 Stunden im Vergleich zu den anderen

Elizitierungszeiträumen den schlechtesten Einfluss auf die Imperatorinproduktion hatte.

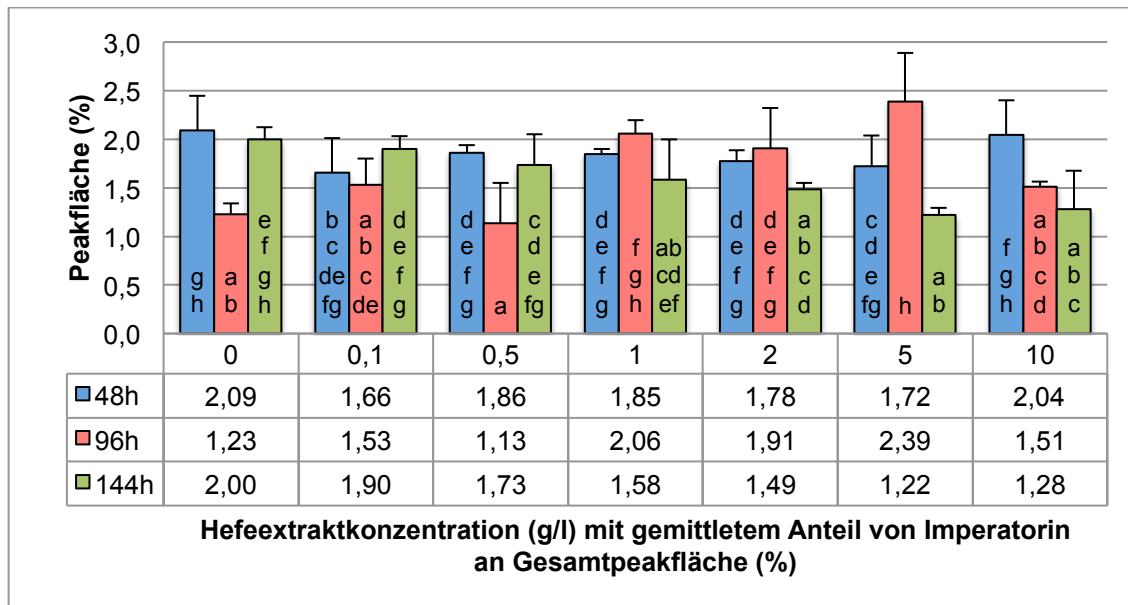


Diagramm 16: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf die Produktion von Imperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Isoimperatorin

Der größte Peakflächenanteil von Isoimperatorin an der Gesamtpeakfläche konnte bei einer Elizitierungsdauer von 48 Stunden (Diagramm 17, S. 37) bei der Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l festgestellt werden. Der dortige Anteil war 19,67% und damit nur geringfügig höher als der Peakflächenanteil bei der Kontrollkonzentration von 0 g/l (19,44%), jedoch signifikante Unterschiede zu den Ergebnissen bei 0,5 g/l, 2 g/l und 5 g/l Hefeextrakt aufwies. Bei 2 g/l Hefeextraktkonzentration wurde der geringste Anteil an der Gesamtpeakfläche mit 11,00% gemessen, wobei der gemittelte Anteil bei 5 g/l Hefeextrakt mit einem Wert von 11,06% nur unerheblich höher lag. Die Werte bei 0,5 g/l, 2 g/l und 5 g/l Hefeextrakt waren deutlich niedriger als bei der Kontrollkonzentration von 0 g/l Hefeextrakt und die Wirkung der Elizitierung auf die Produktion von Isoimperatorin kann hiermit als negativ bzw. hemmend angesehen werden.

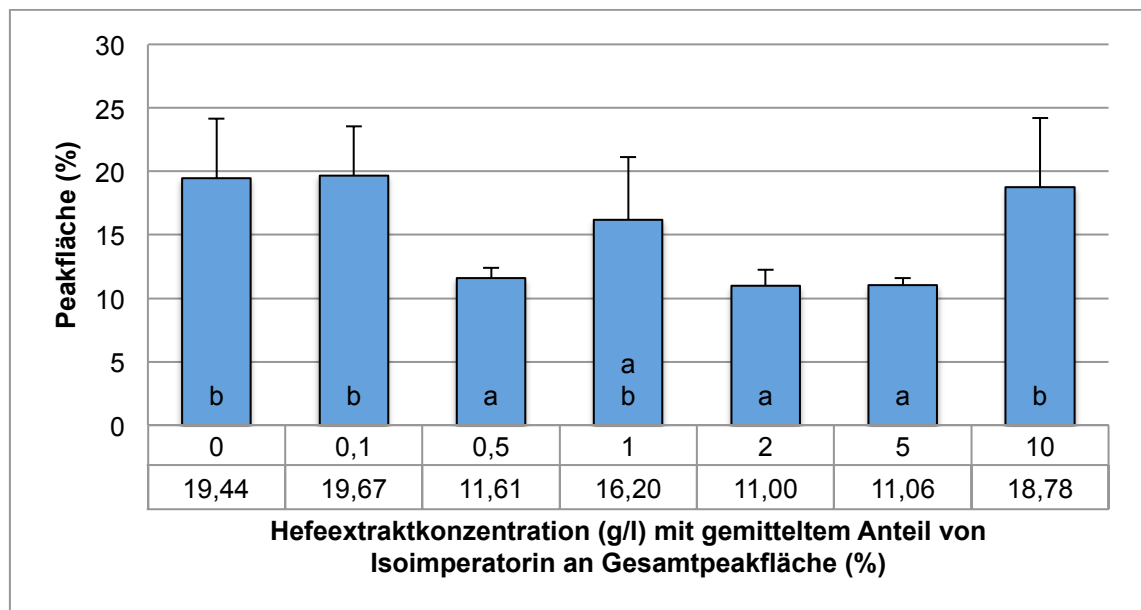


Diagramm 17: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 48 Stunden auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die HPLC-Messungen der Ansätze über 96 Stunden Elizitierungszeit (Diagramm 18, S. 38) ergaben den höchsten prozentuellen Peakflächenanteil (21,44%) von Isoimperatorin bei einer Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l, wobei sich nur gegenüber dem Wert bei 1 g/l Hefeextrakt kein signifikanter Unterschied zeigte. Der niedrigste Wert der Isoimperatorinbildung konnte bei 2 g/l Hefeextrakt mit 11,77% nachgewiesen werden, der sich allerdings signifikant von den höheren Ergebnissen bei 0,1 g/l und 1 g/l Hefeextrakt unterschied.

Die Elizitierung mit Hefeextrakt über 96 Stunden führte im Gesamten zu einer leichten Steigerung der Produktion von Isoimperatorin, nur bei der Elizitierung mit 2 g/l trat ein geringeres Ergebnis als in der Kontrolle, die einen Wert von 12,62% hatte, auf.

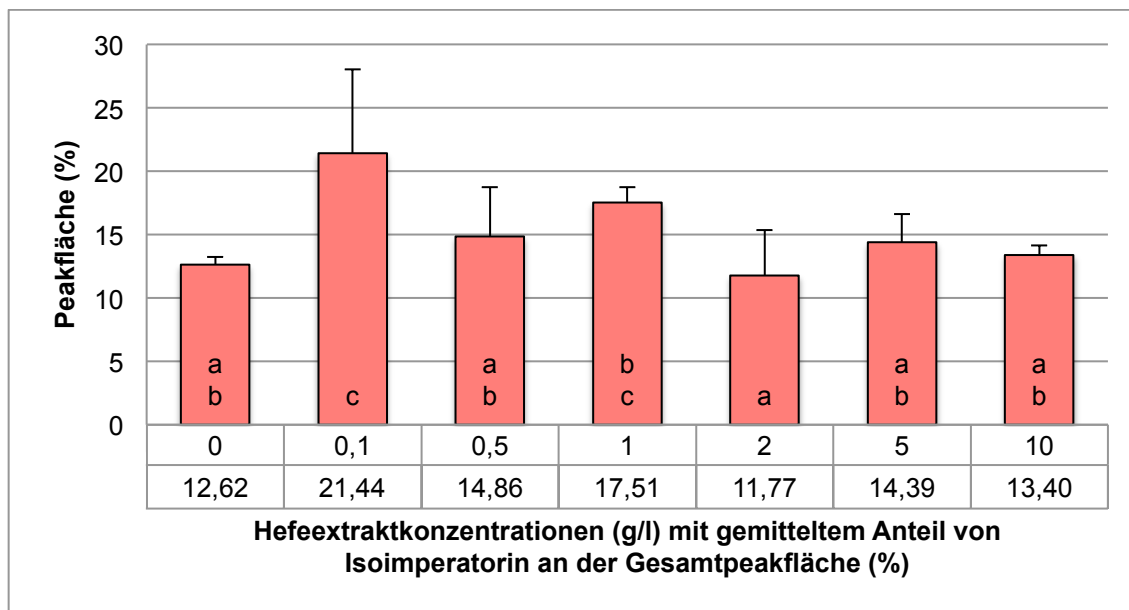


Diagramm 18: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 96 Stunden auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Elizitierung mit Hefeextrakt über den Zeitraum von 144 Stunden (Diagramm 19, S. 39) zeigte bei den Messungen der verschiedenen Ansätze teilweise hohe Standardabweichungen, die dazu führten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden konnte. Dennoch sei erwähnt, dass sich zwischen dem höchsten Durchschnittswert mit 16,99% bei 1 g/l Hefeextrakt und dem niedrigsten mit 9,48% in der Kontrolle eine deutliche Differenz ergab. Darüber hinaus wurden bei den elizitierten Kulturen stets höhere Mittelwerte der Peakflächenanteile von Isoimperatorin gemessen, als bei der Kontrolle ohne Elizitor. Eine zuverlässige Aussage über den Nutzen der Elizitierung mit Hefeextrakt über eine Dauer von 144 Stunden im Bezug auf die Produktion des Cumarins Isoimperatorin lässt sich anhand dieser Ergebnisse jedoch nicht machen.

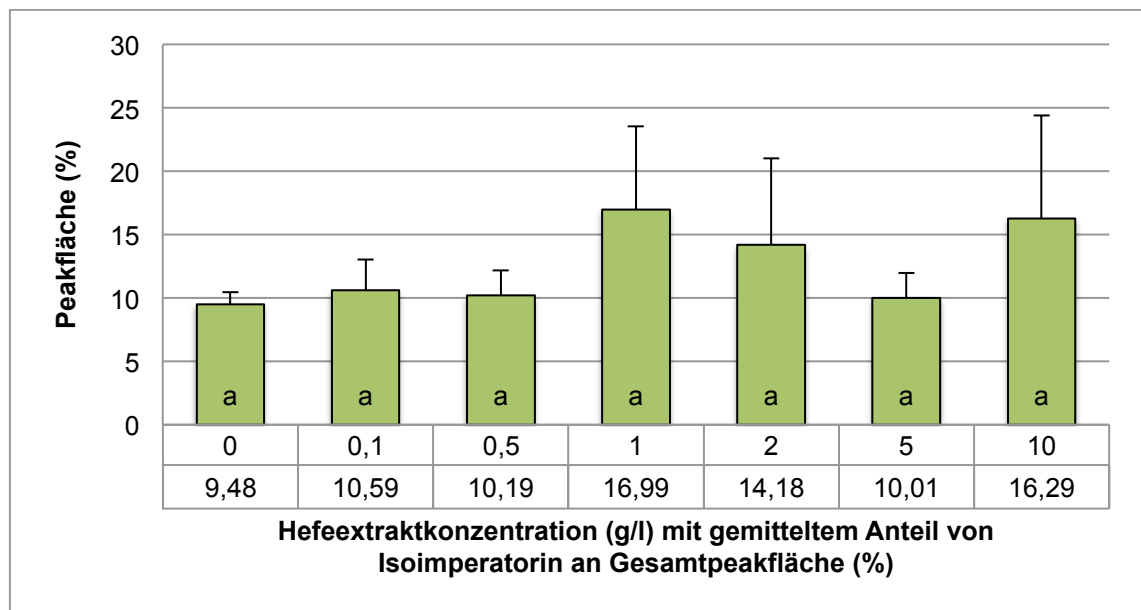


Diagramm 19: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 144 Stunden auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Elizitierung mit Hefeextrakt über die verschiedenen Zeiträume hatte auf die Bildung von Isoimperatorin verschiedenen Auswirkungen, wie aus Diagramm 20 (S. 40) ersichtlich ist. So zeigte sich bei der Elizitierung über 48 Stunden nur bei einer Konzentration von 0,1 g/l Hefeextrakt ein sehr geringer, nicht signifikanter Vorteil der Elizitierung mit dem Hefeextrakt. Bei der Elizitierung über 96 Stunden ergab sich zwar nur bei 0,1 g/l Hefeextrakt eine signifikante Steigerung der Isoimperatorinbildung, aber bei anderen Konzentrationen über 96 Stunden und der Elizitierung über 144 Stunden kam es ebenfalls zu Erhöhungen gegenüber der Kontrolle, die jedoch nicht als signifikant beurteilt werden können. Der höchste Gehalt an Isoimperatorin über alle Konzentrationen und Zeiträume hinweg wurde bei 0,1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden mit 21,44% gemessen und der niedrigste mit 9,48% bei der Kontrollgruppe über 144 Stunden. Signifikante Unterschiede zum höchsten Wert ergaben sich bei den Resultaten bei den meisten anderen Konzentrationen und Zeiträumen. Es unterschieden sich nur die Ergebnisse bei den Konzentrationen 0,5 g/l und 1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden sowie die Werte bei den Konzentrationen 0 g/l, 0,1 g/l, 1 g/l und 10 g/l über 48 Stunden und 1 g/l und 10 g/l über 144 Stunden nicht vom höchsten Wert. Im Hinblick auf den niedrigsten Wert zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Es ergaben sich nur wenige signifikante Unterschiede zu den Ergebnissen der anderen Ansätze, und zwar zu denen bei 0 g/l über 48 Stunden, bei 0,1 g/l über 48 und 96

Stunden, bei 1 g/l über 96 und 144 Stunden sowie bei 10 g/l über 48 Stunden. Innerhalb der Konzentrationen gab es signifikante Unterschiede bei der Kontrolle zwischen 48 Stunden und 144 Stunden bzw. bei 0,1 g/l Hefeextrakt zwischen 144 Stunden und den anderen Zeiträumen. Im Allgemeinen zeigte die Elizitierung mit Hefeextrakt auf die Isoimperatorinproduktion in den „hairy roots“ teilweise stark schwankende Ergebnisse, auch bezogen auf die zwei gemessenen Ansätze pro Elizitorkonzentration und Elizitierungszeitraum, was aus den großen Standardabweichungen ablesbar ist.

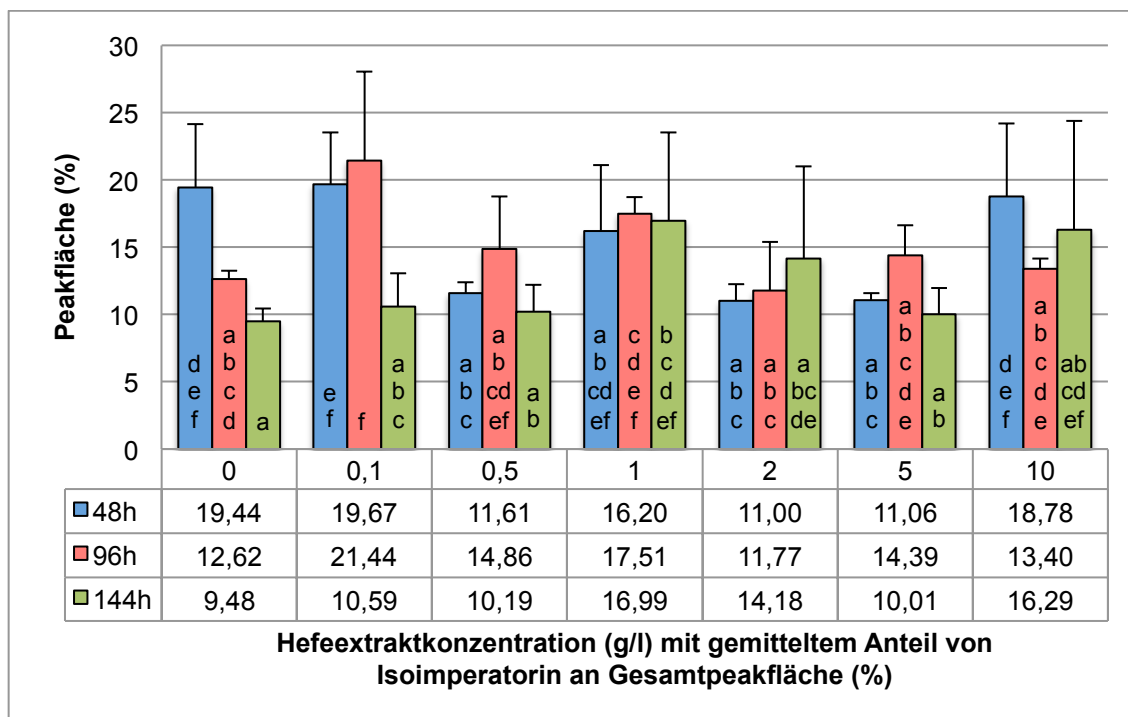


Diagramm 20: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Cnidilin bzw. Phellopterin

Bei der Analyse der Ansätze zeigte sich, wie schon bei den Versuchen mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen, ein Peak bei einer Retentionszeit von etwa 19,4 Minuten. Beim Vergleich der untersuchten Ansätze mit den Standards von Cnidilin bzw. Phellopterin konnte eine Übereinstimmung der UV-Spektren und der Retentionszeiten festgestellt werden. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen beiden Cumarinen konnte allerdings nicht getroffen werden.

Durch das Elizitieren mit Hefeextrakt über 48 Stunden (Diagramm 21) konnte keine gesteigerte Produktion von Cnidilin bzw. Phellopterin erzielt werden, sondern diese Behandlung führte im Vergleich zur Kontrollkonzentration, die den höchsten Peakflächenanteil (7,21%) von Cnidilin bzw. Phellopterin erbrachte, sogar zu einer signifikanten Verminderung der Cumarinproduktion. Der niedrigste Wert mit 3,71% wurde bei einer Hefeextraktkonzentration von 2 g/l festgestellt, und zeigte gegenüber 0 g/l, 0,1 g/l und 10 g/l einen signifikanten Unterschied.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Elizitierung mit allen Hefeextraktkonzentrationen einen negativen Einfluss auf die Cumarinproduktion hatte, wobei die Konzentrationen von 2 g/l und 5 g/l Hefeextrakt hervorzuheben sind. Hier kam es zu einer Halbierung der prozentuellen Peakflächenanteile von Cnidilin bzw. Phellopterin im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Die niedrigste und die höchste Hefeextraktkonzentration hatten wiederum einen besseren Einfluss auf die Cumarinproduktion, konnten jedoch ebenfalls nicht an die Ergebnisse der Kontrollgruppe herankommen.

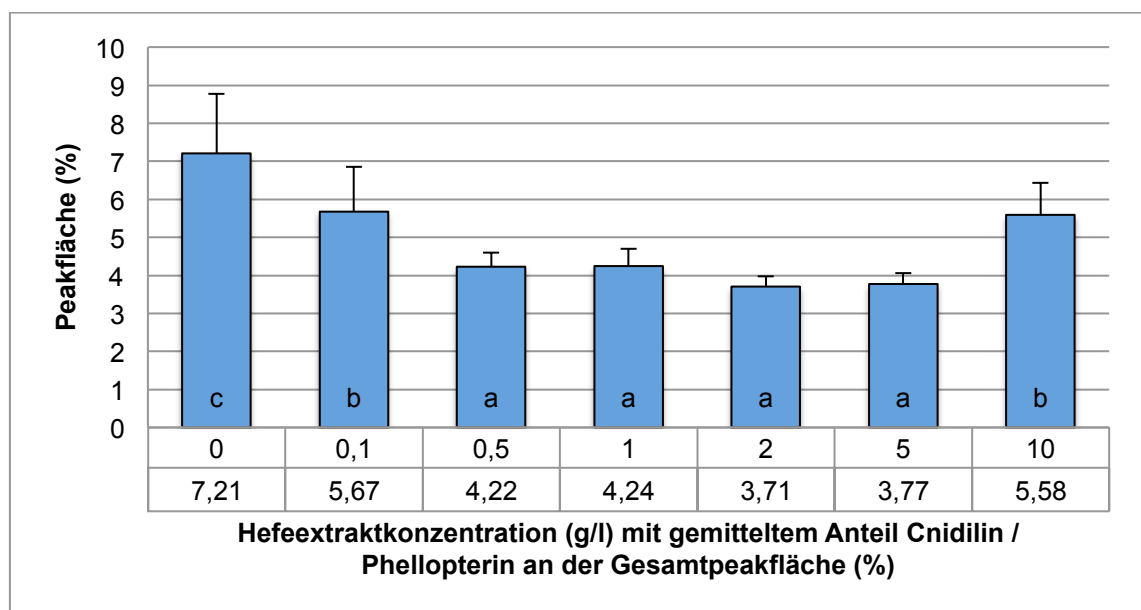


Diagramm 21: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 48 Stunden auf die Produktion von Cnidilin bzw. Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die 96-Stunden-Elizitierung mit Hefeextrakt (Diagramm 22, S. 42) zeigte einen positiven Einfluss bei 0,1 g/l Hefeextrakt mit einem deutlich höheren Wert von 6,48% gegenüber der Kontrolle mit 3,37%, womit sich die Ausbeute von Cnidilin bzw. Phellopterin fast verdoppelt hat. Ansonsten konnte nur noch die

Elizitierung mit 1 g/l Hefeextrakt zu einer Peakfläche führen, die sich etwas mehr, jedoch nicht signifikant, von der Kontrolle unterschied. Der niedrigste Wert mit 3,00% bei 2 g/l Hefeextrakt wies nur zu diesen eben erwähnten höheren Ergebnissen bei 0,1 g/l und 1 g/l Hefeextrakt einen signifikanten Unterschied auf.

Eine deutliche Steigerung der Cumarinproduktion konnte somit nur durch eine niedrige Hefeextraktkonzentration erzielt werden.

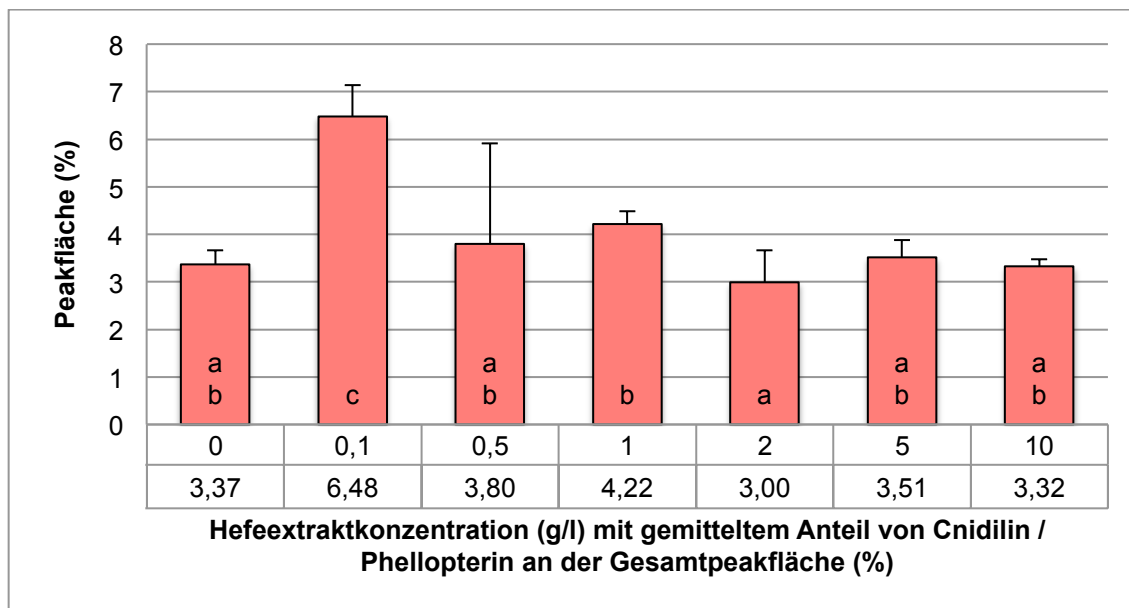


Diagramm 22: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 96 Stunden auf die Produktion von Cnidilin bzw. Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Durch die Elizitierung der „hairy-roots“-Kulturen mit Hefeextrakt über 144 Stunden bildete sich bei den Konzentrationen 0,1 g/l bis 2 g/l Hefeextrakt etwas mehr Cnidilin bzw. Phellopterin als in der Kontrolle (Diagramm 23, S. 43). Der höchste prozentuelle Anteil an der Gesamtpeakfläche mit 3,72% ergab sich bei 1 g/l Hefeextrakt und war damit um 0,73% höher als in der Kontrollgruppe (2,99%). Der niedrigste Wert mit 2,55% Anteil an der Gesamtpeakfläche wurde bei 10 g/l nachgewiesen. Dieser war damit, ebenso wie das Ergebnis bei 5 g/l, signifikant niedriger als der Wert bei 1 g/l.

Bei der Analyse zeigte sich somit ein leichter positiver Einfluss der Elizitierung mit Hefeextrakt bei den niedrigeren Konzentrationen und eine Verminderung der Cumarinproduktion bei den höheren.

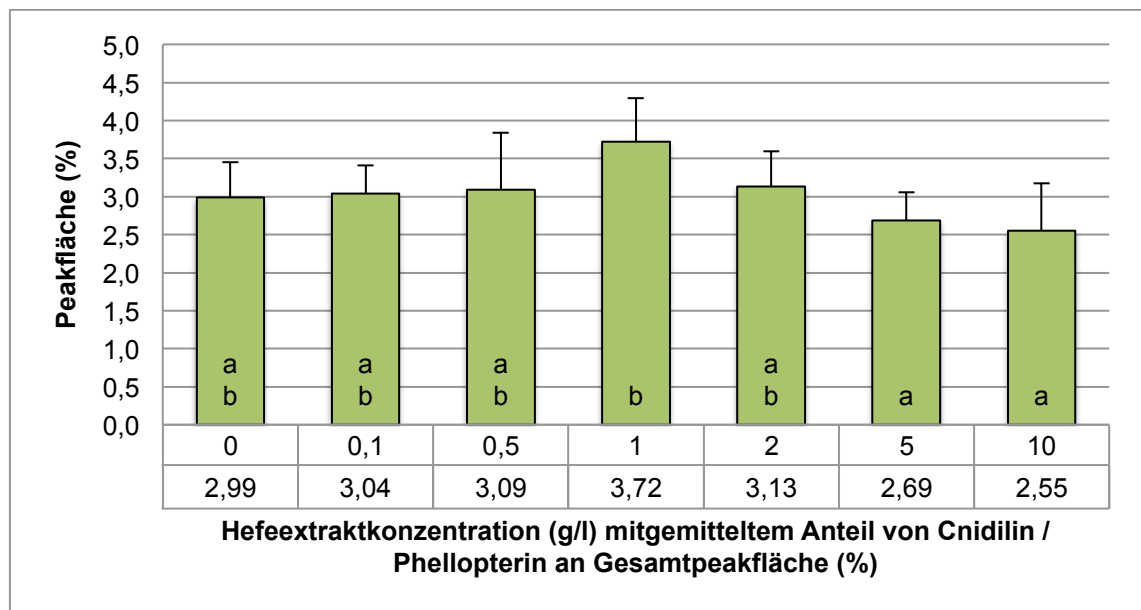


Diagramm 23: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 144 Stunden auf die Produktion von Cnidilin bzw. Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Elizitoreinwirkzeiten (Diagramm 24, S. 44) konnte festgestellt werden, dass die Kontrollgruppe über 48 Stunden mit einem Wert von 7,21%, der gleichzeitig der höchste Anteil aller Ergebnisse ist, nur zum Wert bei 0,1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden keinen Unterschied zeigte. Alle anderen Konzentrationen wiesen deutlich signifikante Unterschiede in ihren Ergebnissen auf, d.h. weniger Cnidilin bzw. Phellopterin wurde gebildet. Der geringste Peakflächenanteil von Cnidilin bzw. Phellopterin wurde bei diesem Vergleich bei 10 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden mit einem Wert von 2,55% gemessen. Innerhalb der Konzentrationen von 0,5 g/l bis 5 g/l Hefeextrakt konnte zwischen den verschiedenen Einwirkzeiten des Elizitors kein signifikanter Unterschied in der Bildung von Cnidilin bzw. Phellopterin festgestellt werden. In der Kontrollgruppe unterschied sich das Ergebnis bei 48 Stunden durch einen höheren Wert deutlich von den anderen Zeiträumen. Ebenso konnte die 48-Stunden Elizitierung bei einer Elizitorkonzentration von 10 g/l Hefeextrakt einen signifikant besseren Wert als die anderen Elizitoreinwirkzeiten erzielen. Schlussendlich wurden noch signifikante Unterschiede innerhalb der Konzentration von 0,1 g/l Hefeextrakt beobachtet, wobei die Elizitierung über 144 Stunden schlechtere Ergebnisse erbrachte als die anderen Zeiträume.

Die Elizitierung über 48 Stunden führte insgesamt zu den besten Ergebnissen im Hinblick auf die prozentuellen Anteile an der Gesamtpeakfläche, konnte

jedoch die Bildung des Cumarins gegenüber der Kontrolle nicht steigern. Im Gegensatz zur Elizitorenwirkzeit von 48 Stunden wurden bei 96 und 144 Stunden geringere Anteile gemessen, allerdings war hier die Cumarinproduktion gegenüber der jeweiligen Kontrolle bei einzelnen Hefeextraktkonzentrationen höher, sodass der Zweck der Elizitierung bei diesen Versuchsreihen erfüllt wurde.

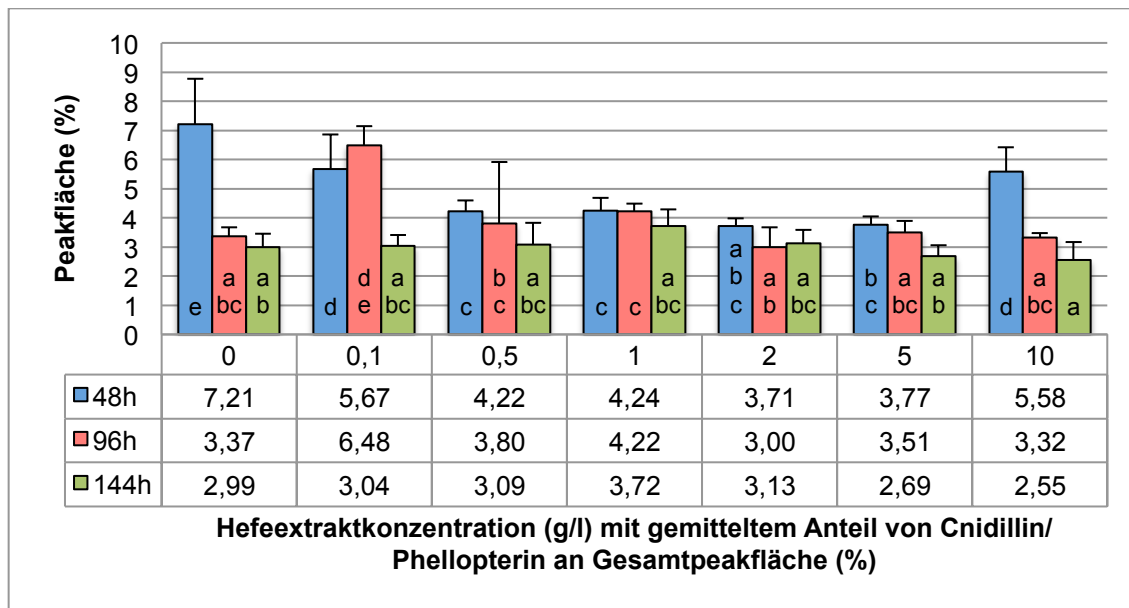


Diagramm 24: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitorenwirkzeiten auf die Produktion von Cnidillin bzw. Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Nicht identifizierte Cumarine

Die Analyse der dominierenden Peakflächen zeigte die vier nicht identifizierten Inhaltsstoffe, die bereits bei den Ansätzen mit unterschiedlicher Saccharosekonzentration aufgetreten waren (siehe S. 19). Die Peakflächenanteile dieser an der Gesamtpeakfläche werden im Folgenden genauer erläutert.

Die Ergebnisse zu den Inhaltsstoffe A und B sind im Diagramm 25 (S. 45) sowie zu den Inhaltsstoffen C und D im Diagramm 26 (S. 46) mit gleicher Skalierung graphisch dargestellt. Inhaltsstoff A erschien nach der Elizitierung über 48 Stunden bei einer Retentionszeit von etwa 10,9 Minuten. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte einen durchwegs positiven Einfluss der Elizitierung auf die Bildung dieses Inhaltsstoffes. Der höchste Wert mit 11,13% bei 5 g/l

Hefeextrakt ergab über das Doppelte des niedrigsten Wertes mit 4,39% bei der Kontrollkonzentration mit 0 g/l Hefeextrakt und zeigte, außer zu einer Hefeextraktkonzentration von 0,5 g/l, eine deutliche Differenz zu den restlichen Elizitorkonzentrationen. Ein signifikanter Unterschied zum niedrigsten Wert bei der Kontrolle konnte bei den Ergebnissen bei 0,5 g/l, 1 g/l und 5 g/l Hefeextrakt festgestellt werden.

Die Produktion des Inhaltsstoffes B, der bei einer Retentionszeit von etwa 13,6 Minuten auftrat, wurde durch Elizitierung mit höheren Hefeextraktkonzentrationen unterschiedlich beeinflusst. So ergab sich bei 1 g/l Hefeextrakt mit einem Wert von 6,64% zwar der deutlich höchste Gehalt an Inhaltsstoff B, jedoch brachte die Hefeextraktkonzentration von 5 g/l mit 3,52% bereits einen niedrigeren prozentuellen Anteil als die Kontrollgruppe mit 3,76%. Schlussendlich wurde bei der höchsten Konzentration von 10 g/l Hefeextrakt der niedrigste Wert mit 3,02% gemessen. Somit trat zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert ein signifikanter Unterschied auf, sowie auch zwischen dem niedrigsten Wert und dem Ergebnis bei 0,1 g/l Hefeextrakt. Gesamt gesehen führte die Elizitierung mit den niedrigeren Konzentrationen zu einer Verbesserung der Produktion des Inhaltsstoffes B.

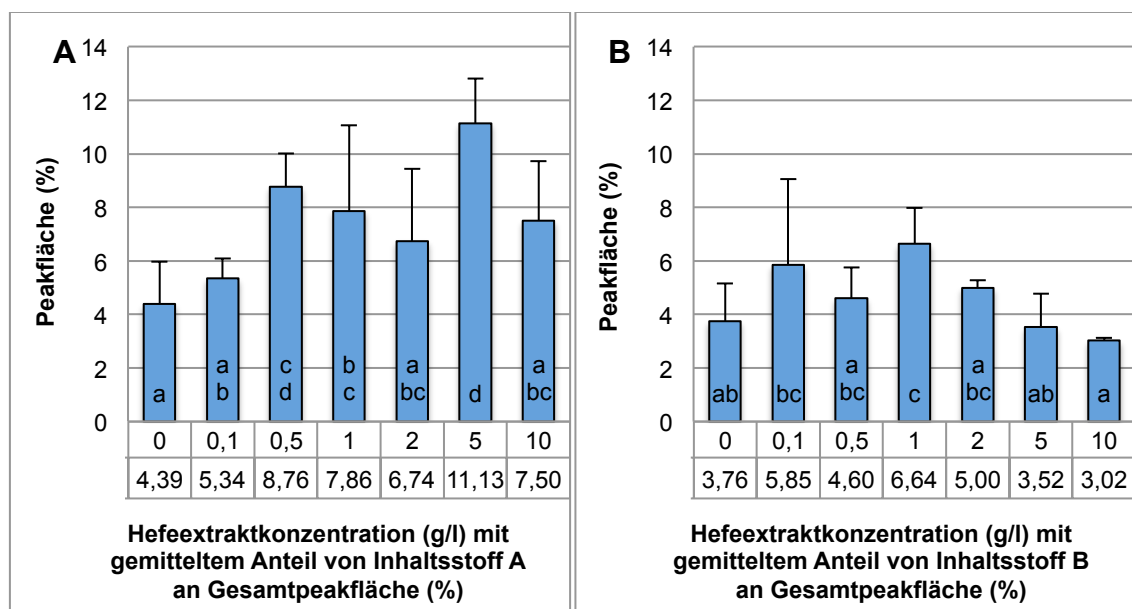


Diagramm 25: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 48 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe A und B in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Bei einer Retentionszeit von etwa 20,5 Minuten erschien der Inhaltsstoff C im HPLC-Chromatogramm (Diagramm 26, S. 46). Durch die Elizitierung konnte mit

4,03% nur bei 0,5 g/l Hefeextrakt ein höherer Wert erzielt werden als in der Kontrollgruppe (3,63%). Der niedrigste prozentuelle Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche wurde mit 2,76% bei 0,1 g/l gemessen, womit sich dieses Ergebnis signifikant von denen der Kontrolle, von 0,5 g/l, von 5 g/l und von 10 g/l Hefeextrakt unterschied. Zu einer signifikanten Differenz ist es auch zwischen dem höchsten Wert bei 0,5 g/l und den Werten bei den Konzentrationen 0,1 g/l, 1 g/l und 2 g/l Hefeextrakt gekommen.

Der Inhaltsstoff D (Diagramm 26, S. 46) eluierte bei etwa 27,3 Minuten und wurde nach der Elizitierung mit Hefeextrakt ab einer Konzentration von 0,5 g/l stark vermindert produziert. Bei der Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l zeigte sich mit 6,98% ein höherer prozentueller Anteil des Inhaltsstoffes D als in der Kontrollgruppe (6,57%). Die genannten Werte waren sich untereinander sehr ähnlich, wiesen jedoch einen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen bei allen anderen Konzentrationen auf. Der niedrigste Wert wurde bei 10 g/l Hefeextrakt mit 2,46% gemessen und ergab somit einen um mehr als die Hälfte niedrigeren Wert als die Kontrollgruppe. Zusammenfassend machten die Ergebnisse des Inhaltsstoffes D deutlich, dass die Elizitierung mit Hefeextrakt nur mit der niedrigsten Konzentration von 0,1 g/l eine positive Auswirkung auf die Produktion des Inhaltsstoffes D hatte.

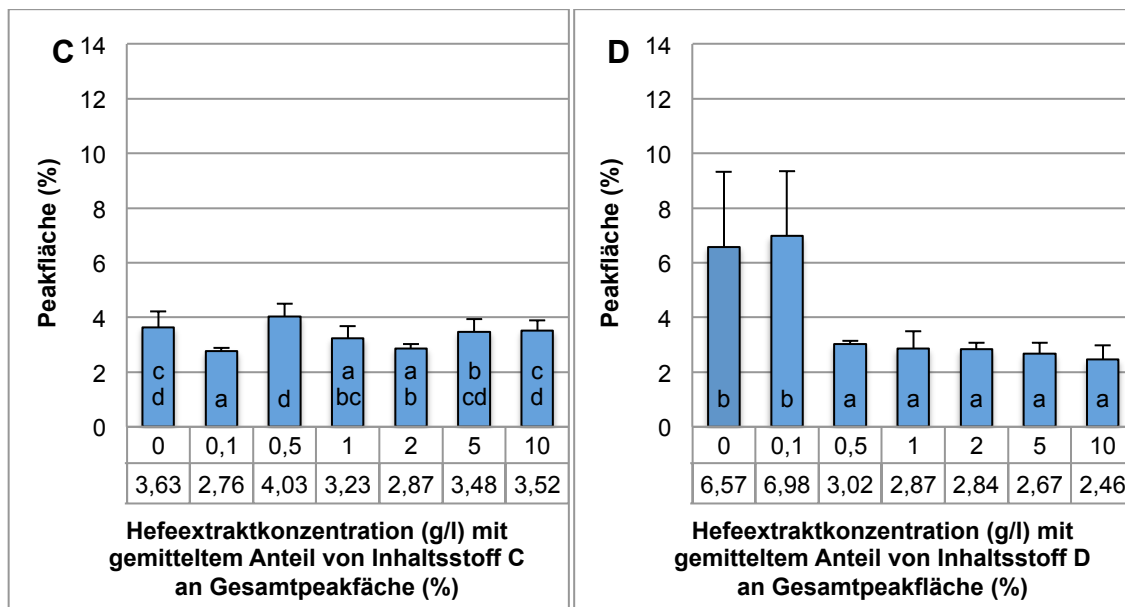


Diagramm 26: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 48 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe C und D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Diagramme 27 (S. 48) und 28 (S. 49) stellen die Ergebnisse zu den Inhaltsstoffen A bis D der Elizitierung mit Hefeextrakt über 96 Stunden dar.

Der Inhaltsstoff A (Diagramm 27, S. 48) erschien bei einer Retentionszeit von etwa 10,9 Minuten und wurde bei der Behandlung mit höheren Hefeextraktkonzentrationen stärker gebildet als in der Kontrollgruppe ohne Hefeextrakt. Bei einer Konzentration von 10 g/l Hefeextrakt trat ein prozentueller Peakflächenanteil von 14,11% auf, welcher deutlich höher lag als bei der Kontrollgruppe mit 8,02% und annähernd dem Dreifachen des niedrigsten Wertes mit 5,62% bei 0,1 g/l Hefeextrakt entsprach. Der höchste Wert zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dem Ergebnis bei 5 g/l Hefeextrakt, zu allen anderen wurde ein deutlicher Unterschied festgestellt. Auch der niedrigste Wert bei 0,1 g/l Hefeextrakt unterschied sich signifikant von den Werten bei 0 g/l, 2 g/l, 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich erst bei einer Hefeextraktkonzentration von 2 g/l ein eindeutiger Vorteil in der Produktion des Inhaltsstoffes A.

Die hohen Konzentrationen, die bei Inhaltsstoff A einen Vorteil brachten, zeigten bei Inhaltsstoff B (Diagramm 27, S. 48), der bei einer Retentionszeit von ungefähr 13,6 Minuten im HPLC-Chromatogramm erschien, einen nachteiligen Effekt auf die Produktion. Daher wurde bei 10 g/l der niedrigste Wert gemessen, der mit 4,16% nur der Hälfte des Wertes der Kontrollgruppe mit 8,87% entsprach. Als besonders vorteilhaft für die Bildung von Inhaltsstoff B erwies sich eine Hefeextraktkonzentration von 1 g/l, bei der sich ein prozentueller Anteil an der Gesamtpeakfläche von 14,27% zeigte. Es konnte festgestellt werden, dass sich die beiden höchsten Werte bei 0,5 g/l und 1 g/l Hefeextrakt, als auch die beiden niedrigsten Werte bei 5 g/l und 10 g/l von allen anderen unterschieden. Allgemein zeigten die Konzentrationen von 0,1 g/l bis 1 g/l erhöhte Anteil an Inhaltsstoff B gegenüber der Kontrollgruppe, bei höheren Konzentrationen kam es wiederum zu einer sinkenden Produktion.

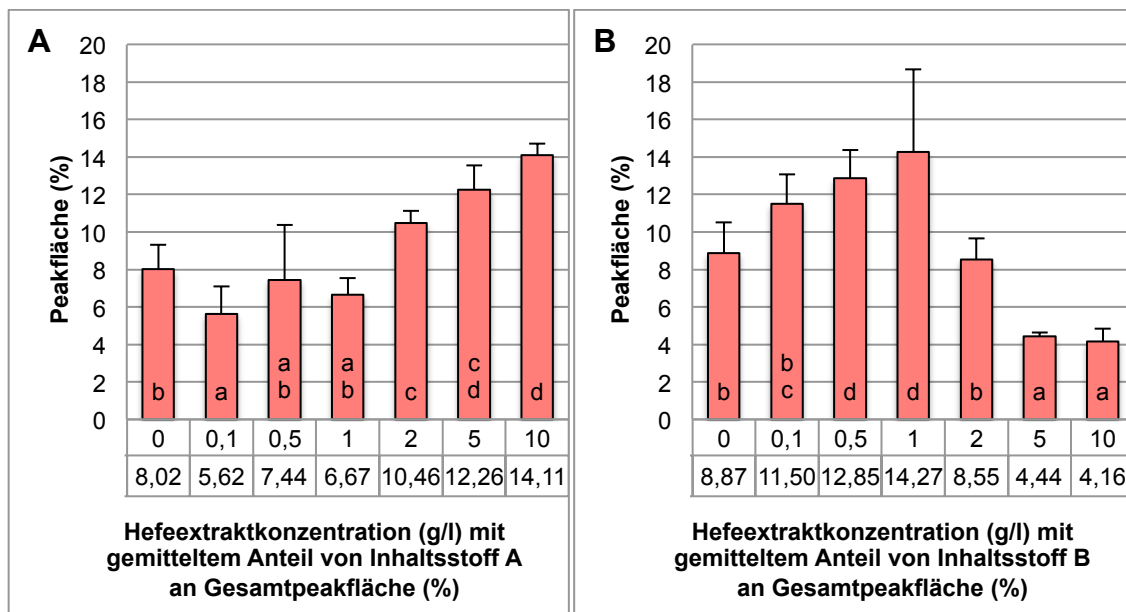


Diagramm 27: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 96 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe A und B in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Analyse des bei der Retentionszeit von etwa 20,5 Minuten auftretenden Inhaltsstoffes C (Diagramm 28, S. 49) zeigte eine niedrigere Produktion als bei Inhaltsstoff A und B. Der höchste Wert bei 5 g/l Hefeextrakt entsprach 4,01% der Gesamtpeakfläche und unterschied sich damit signifikant Unterschied von allen anderen Ansätzen. Die Konzentration von 0,5 g/l Hefeextrakt brachte mit 2,25% Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche den niedrigsten Wert und dieser wich nicht signifikant von der Kontrollgruppe mit 2,50% ab. Durch die Elizitierung mit den Konzentrationen ab 2 g/l Hefeextrakt wurde die Produktion des Inhaltsstoffes C gesteigert, eine Tatsache, die sich auch in den ermittelten signifikanten Unterschieden zeigte.

Wie schon beim Versuch über 48 Stunden wurde der Inhaltsstoff D (Diagramm 28, S. 49) bei einer Retentionszeit von ungefähr 27,3 Minuten gemessen. Die prozentuellen Anteile an der Gesamtpeakfläche des Inhaltsstoffes D bewegten sich eher in niedrigeren Bereichen. Überdies führte die Elizitierung mit steigender Elizitorkonzentration zu sinkender Produktion des Inhaltsstoffes D. Der höchste Anteil wurde daher mit 3,02% bei der Kontrollgruppe, der niedrigste Wert wurde nach stetigem Sinken der Produktion bei steigenden Hefeextraktkonzentrationen mit einem Wert von 1,50% bei 10 g/l Hefeextrakt gemessen. Diese Entwicklung spiegelte sich auch in der Ermittlung der signifikanten Unterschiede wider. So zeigten die Ergebnisse bei den Konzentrationen von 0 g/l, 0,1 g/l und 0,5 g/l Hefeextrakt zueinander keine

signifikanten Differenzen, jedoch zu den Resultaten bei den anderen Hefeextraktkonzentrationen. Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass die Elizitierung mit Hefeextrakt über 96 Stunden einen nachteiligen Effekt auf die Produktion des Inhaltsstoffes D hatte.

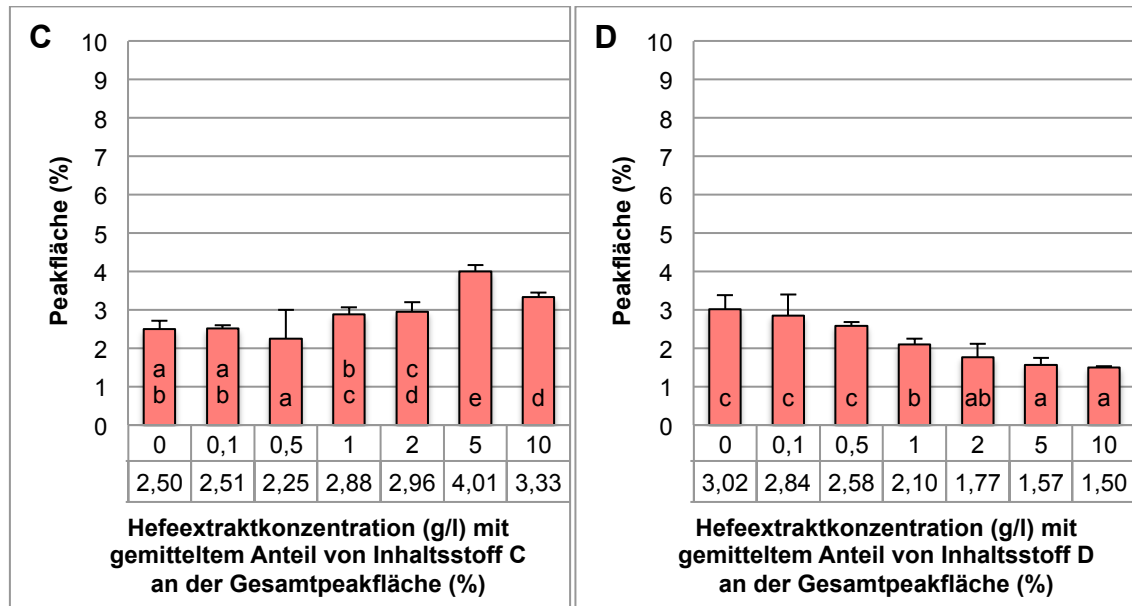


Diagramm 28: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 96 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe C und D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

In Diagramm 29 (S. 50) und Diagramm 30 (S. 51) werden die Ergebnisse der nicht identifizierten Inhaltsstoffe A bis D nach der Elizitierung über 144 Stunden dargestellt.

Die Elizitierung hatte auf den bei einer Retentionszeit von 10,9 Minuten auftretenden Inhaltsstoff A einen überwiegend positiven Einfluss. Bei der Konzentration von 0,1 g/l Hefeextrakt konnte 8,11% Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche erzielt werden, ein Ergebnis, das nahezu 2% über der Kontrollgruppe mit 5,88% lag und damit den höchsten Wert erreichte. Mit 4,48% bei 1 g/l Hefeextrakt und 5,56% bei 10 g/l Hefeextrakt lagen nur die Mittelwerte dieser zwei Elizitierungsversuche unter der Kontrollgruppe ohne Hefeextrakt. Eine signifikante Differenz trat vor allem zwischen dem höchsten Wert bei 0,1 g/l Hefeextrakt und den restlichen Ergebnissen auf. Weiters ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der niedrigsten Produktion des Inhaltsstoffes A bei 1 g/l Hefeextrakt und jener bei den Konzentrationen 0,5 g/l, 2 g/l bzw. 5 g/l Hefeextrakt. Insgesamt gesehen brachte die Elizitierung gegenüber der Kontrolle einen leichten Vorteil.

Inhaltsstoff B trat bei einer Retentionszeit von 13,6 Minuten im HPLC-Chromatogramm auf und es konnte durch die Elizitierung mit Hefeextrakt größtenteils eine Erhöhung der Produktion erreicht werden. So stellte der höchste prozentuale Peakflächenanteil mit 8,38% bei 2 g/l Hefeextrakt eine Verdoppelung des Wertes der Kontrollgruppe mit 3,87% dar. Überdies führte die Elizitierung mit den anderen Konzentrationen, außer mit 10 g/l Hefeextrakt, zu einer vermehrten Produktion. Die Hefeextraktkonzentration von 10 g/l hatte im Gegensatz dazu einen stark verminderten Einfluss auf die Inhaltsstoffproduktion, was sich in dem prozentuellen Peakflächenanteil von 0,31% verdeutlichte. Dieser Umstand war auch in den signifikanten Unterschieden des Ergebnisses bei der Konzentration von 10 g/l Hefeextrakt zu allen anderen ersichtlich. Weitere signifikante Differenzen traten zwischen dem höchsten Wert bei 2 g/l Hefeextrakt und den restlichen Elizitorkonzentrationen sowie zwischen dem Ergebnis der Kontrollgruppe und dem Wert bei der Konzentration von 0,1 g/l auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass nur die Elizitierung mit 10 g/l Hefeextrakt einen stark nachteiligen Effekt auf die Inhaltsstoffproduktion hatte, alle anderen Hefeextraktkonzentrationen jedoch einen leichten oder sogar signifikanten Vorteil für die Produktion des Inhaltsstoffes B brachten.

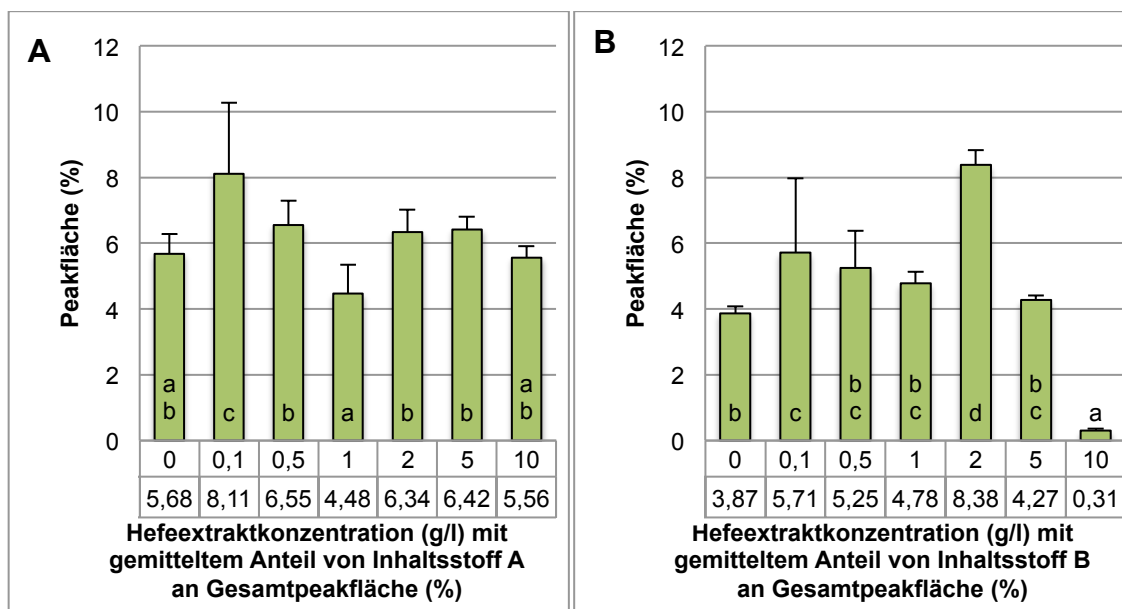


Diagramm 29: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 144 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe A und B in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Bildung des bei einer Retentionszeit von 20,5 Minuten erschienenen Inhaltsstoff C wurde durch die Elizitierung mit Hefeextrakt kaum beeinflusst (Diagramm 30). Der prozentuelle Peakflächenanteil des Inhaltsstoffes C mit 3,96% in der Kontrollgruppe konnte nur durch die Elizitierung mit 0,5 g/l Hefeextrakt mit einem Wert von 4,12% geringfügig übertroffen werden, was jedoch zu keiner signifikanten Differenz führte. Ebenso zeigte der niedrigste Wert bei 2 g/l Hefeextrakt mit 2,91%, wie alle anderen Elizitierungsansätze, keinen signifikanten Unterschied zum Wert der Kontrollgruppe, weshalb die Elizitierung über 144 Stunden im Hinblick auf die Produktion von Inhaltsstoff C als nicht vorteilhaft bezeichnet werden konnte.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Analyse des Inhaltsstoffes D, der bei einer Retentionszeit von etwa 27,3 Minuten bei der HPLC-Messung erschien (Diagramm 30). Hier zeigte sich mit 5,50% Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche bei 1 g/l Hefeextrakt eine Verdoppelung des Inhaltsstoffes gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,47%. Letztere erzielte damit auch den niedrigsten Wert an Inhaltsstoff D in der Versuchsreihe über 144 Stunden. Neben den beiden Spitzenwerten bei 0,1 g/l und 1 g/l Hefeextrakt bewegte sich die Anteile der elizitierten Ansätze zwischen 2,70% und 3,26%. Signifikante Unterschiede traten zwischen den zwei höchsten Werten und den übrigen auf. Insgesamt betrachtet brachte die Elizitierung bei ausgewählten Hefeextraktkonzentrationen deutliche Vorteile.

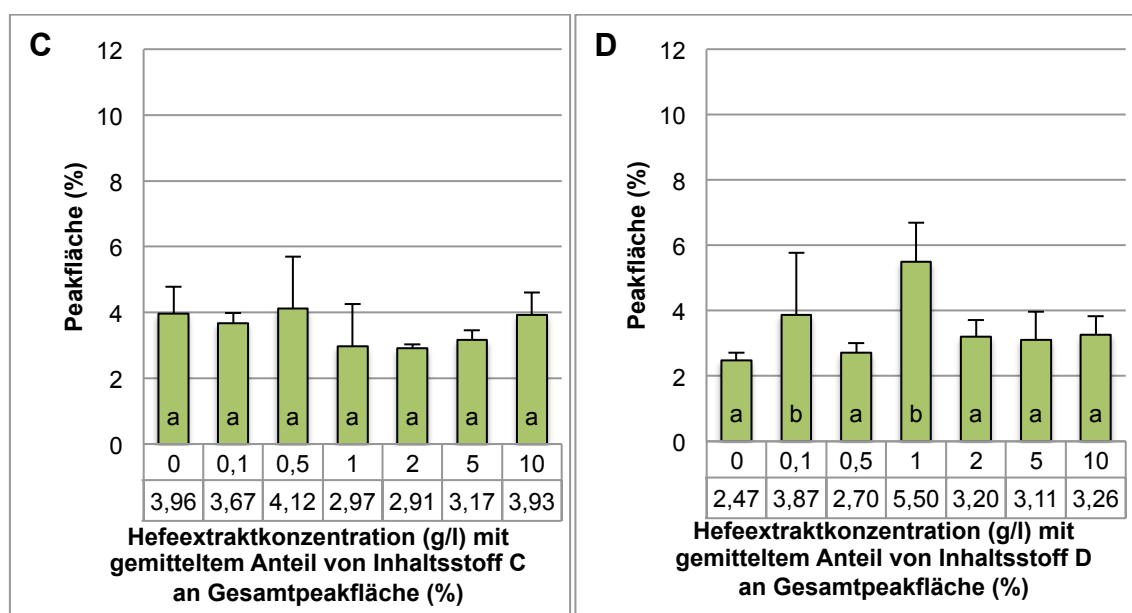


Diagramm 30: Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen über 144 Stunden auf die Produktion der Inhaltsstoffe C und D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Der Vergleich der verschiedenen Elizitierungszeiträume (Diagramm 31, S. 53) zeigte beim Inhaltsstoff A, dass die Elizitierung über 96 Stunden die zwei höchsten Werte unter allen Ansätze erreichte. Somit unterschied sich der höchste prozentuelle Anteil an der Gesamtpeakfläche, der bei 10 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden gemessen wurde, signifikant von den Werten der anderen Konzentrationen und Zeiträumen, außer von dem Ergebnis bei 5 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden. Der niedrigste Wert wurde bei diesem Vergleich aller Ansätze bei 48 Stunden bei der Kontrolle festgestellt, unter den elizitierten Ansätzen erreichte die Hefeextraktkonzentration von 1 g/l über 144 Stunden den geringsten Peakflächenanteil. Überdies brachte die Elizitierung über 144 Stunden bei vier weiteren Konzentrationen (0,5 g/l; 2 g/l; 5 g/l; 10 g/l Hefeextrakt) im Vergleich die niedrigsten Werte. Der niedrigste Wert (4,39%) wies einen signifikanten Unterschied zu zehn anderen Ergebnissen der anderen Zeiträume und Elizitorkonzentrationen auf. Innerhalb der Konzentrationen zeigte sich, dass bei der Kontrolle signifikante Unterschiede zwischen 48 und 96 Stunden berechnet wurden. Überdies waren signifikante Unterschiede im Inhaltsstoffgehalt bei den Konzentrationen 0,1 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt zwischen den Zeiträumen feststellbar.

Schlussendlich ist aus dem Diagramm 31 (S. 53) ersichtlich, dass die Elizitierung über 48 Stunden hinsichtlich der Steigerung der Produktion des Inhaltsstoffes A gegenüber der Kontrolle das beste Ergebnis brachte. Der höchste Gehalt wurde jedoch bei der Elizitierung über 96 Stunden erreicht, daher war diese die sinnvollste zur Gewinnung des Inhaltsstoffes.

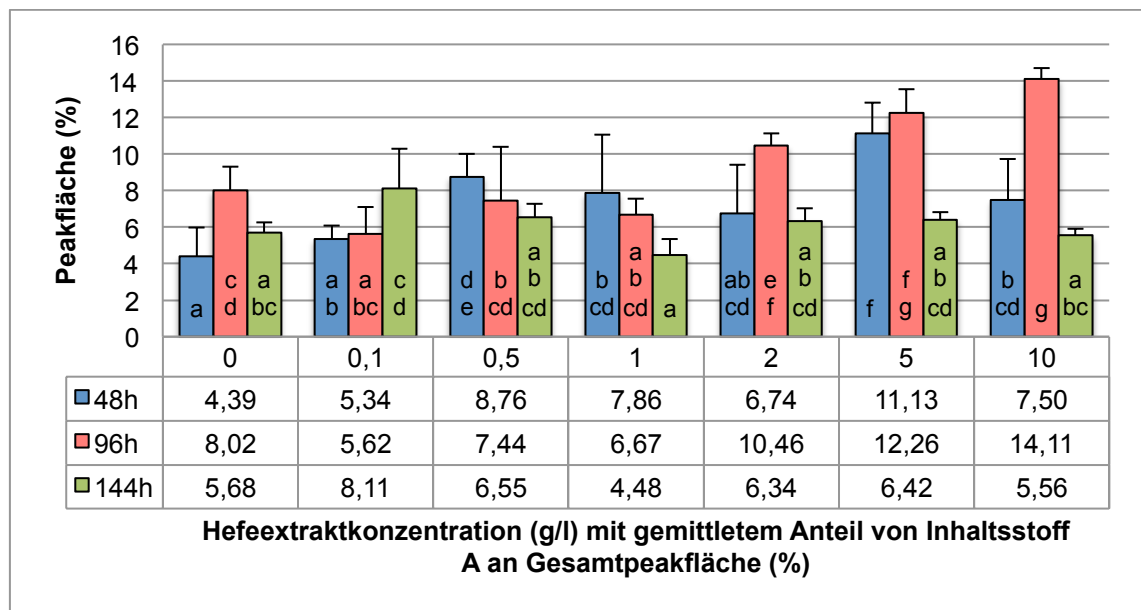


Diagramm 31: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf die Produktion des Inhaltsstoffes A in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Der Inhaltsstoff B konnte wie auch Inhaltsstoff A durch die Elizitierung über 96 Stunden am positivsten beeinflusst werden. Verglichen mit den anderen Elizitierungszeiträumen zeigten sich hier stets die höchsten Werte (Diagramm 32, S. 54). Der höchste prozentuelle Peakflächenanteil an der Gesamtpeakfläche wurde bei 1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden gemessen und war mit 14,27% um das 46-fache höher als der niedrigste Wert (0,31%) bei 10 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden. Außer zum Ergebnis der Hefeextraktkonzentration 0,5 g/l über 96 Stunden unterschied sich der höchste Wert von allen anderen Ergebnissen signifikant. Auch der niedrigste Wert zeigte einen deutlichen Unterschied zu allen anderen Werten. Beim Vergleich der Zeiträume innerhalb der Konzentrationen waren die Resultate bei 0 g/l bis 1 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden signifikant höher als bei den anderen Elizitierungszeiträumen.. Innerhalb von 2 g/l Hefeextrakt unterschied sich das Ergebnis über 48 Stunden und innerhalb von 10 g/l jenes über 144 Stunden von den jeweils beiden anderen Elizitoreinwirkzeiten.

Bei Betrachtung der Ergebnisse konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die niedrigeren Hefeextraktkonzentrationen über 96 Stunden den positivsten Effekt auf die Produktion des Inhaltsstoffes B hatten und diese Elizitierung daher am effizientesten war.

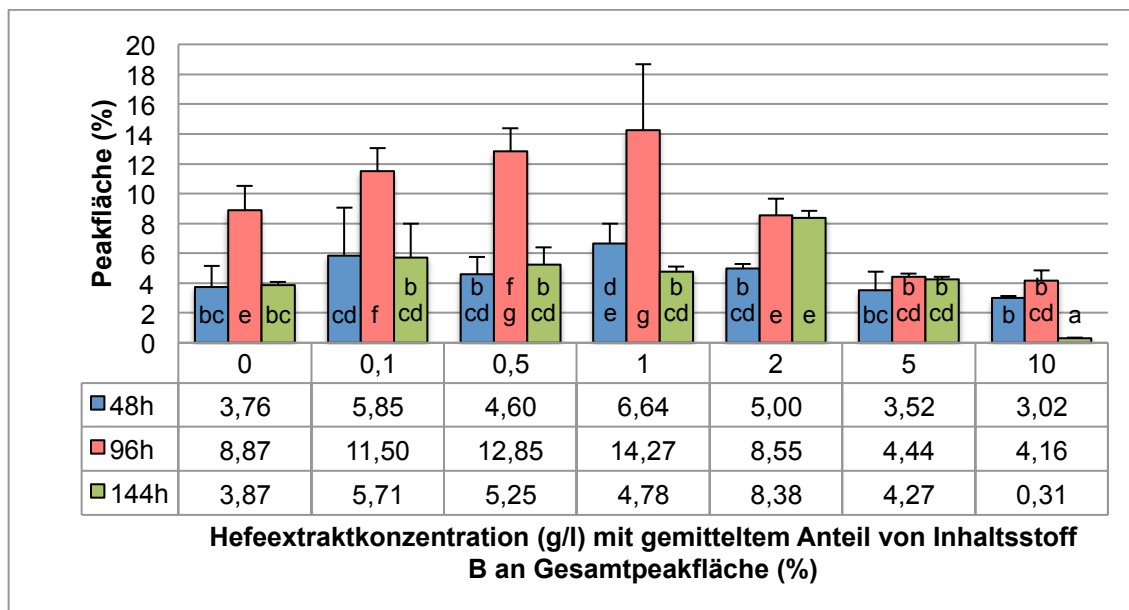


Diagramm 32: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf die Produktion des Inhaltsstoffes B in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Beim Vergleich der verschiedenen Elizitierungszeiträume (Diagramm 33, S. 55) unterschied sich der höchste Wert mit 4,12% Peakflächenanteil bei 0,5 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden nicht so deutlich von den anderen Ergebnissen wie bei den Inhaltsstoffen A und B. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen diesem höchsten Wert und denen bei 0,1 g/l bzw. 2 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden, bei 0 g/l bis 2 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden sowie bei 1 g/l bzw. 2 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden. Der niedrigste prozentuelle Peakflächenanteil mit einem Wert von 2,25% zeigte sich bei 0,5 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden. Dieser unterschied sich zu den Resultaten bei 0 g/l, 0,5 g/l, 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden, bei 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden und bei 0 g/l, 0,1 g/l, 0,5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden signifikant. Innerhalb der Konzentrationen traten bei der Kontrolle sowie bei 0,1 g/l und 0,5 g/l Hefeextrakt signifikante Unterschiede auf.

Im Vergleich mit der Kontrollkonzentration erreichte die Elizitierung mit den höheren Konzentrationen von 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden zwar nicht die höchsten Werte aller Ansätze, aber die Steigerung gegenüber der Kontrolle bei 96 Stunden zeigte sich am deutlichsten. Bei den anderen Elizitierungszeiträumen ergaben sich teilweise die höheren prozentuellen Peakflächenanteile des Inhaltsstoffes C an der Gesamtpeakfläche, aber es erfolgte gegenüber der Kontrolle des jeweiligen Zeitraums der Elizitierung keine Steigerung der Produktion des Inhaltsstoffes.

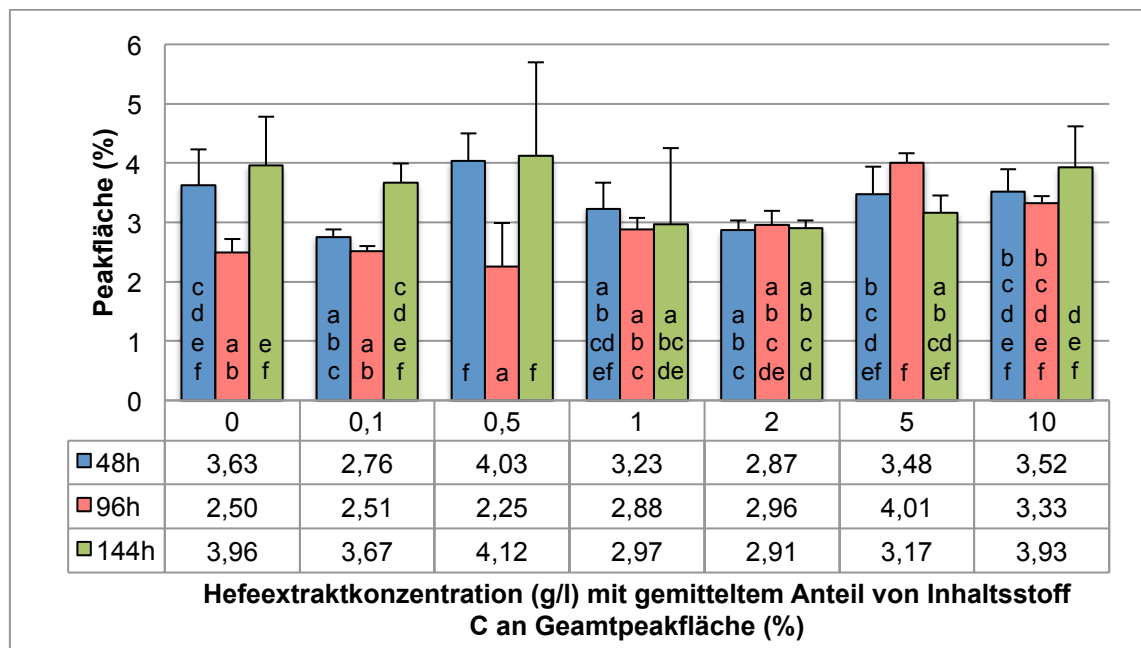


Diagramm 33: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitorenwirkzeiten auf die Produktion des Inhaltsstoffes C in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Die Analyse von Inhaltsstoff D nach der Elizitierung mit dem Hefeextrakt über die verschiedenen Zeiträume zeigte den höchsten Wert bei 0,1 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden (Diagramm 34, S. 56). Mit einem Wert von 6,98% war die Inhaltsstoffproduktion jedoch nur geringfügig höher als bei der Kontrolle über 48 Stunden (6,57%). Signifikante Unterschiede zum höchsten Wert ergaben sich zu den Ergebnissen aller Elizitorkonzentrationen und –zeiträumen, außer zu denen bei der Kontrolle über 48 Stunden und bei 1 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden. Der niedrigste Wert wurde bei 10 g/l Hefeextrakt über 96 Stunden gemessen, signifikante Unterschiede traten hier zu den Ergebnissen der Kontrolle über 48 Stunden, 0,1 g/l Hefeextrakt über 48 und 144 Stunden und 1 g/l Hefeextrakt über 144 Stunden auf. Der direkte Vergleich der Elizitierungszeiträume bei den einzelnen Konzentrationen zeigte signifikante Unterschiede im Inhaltsstoffgehalt bei 0 g/l und 0,1 g/l Hefeextrakt über 48 Stunden sowie bei 1 g/l über 144 Stunden zu den jeweils anderen Zeiträumen. Die Produktion des Inhaltsstoffes D konnte durch die Elizitierung mit Hefeextrakt nur über 144 Stunden gegenüber der Kontrolle zufriedenstellend gesteigert werden. Über 48 Stunden wurde der höchste Wert bei 0,1 g/l Hefeextrakt erreicht, jedoch wirkten sich die anderen Konzentrationen über diesen Zeitraum nachteilig auf die Produktion des Inhaltsstoffes D aus. Am schlechtesten schnitt die Elizitierung über 96 Stunden ab, da sich hier bei den

Elizitierungsansätzen mit Hefeextrakt stets die niedrigsten Werte zeigten und diese mit steigender Konzentration auch immer weiter sanken.

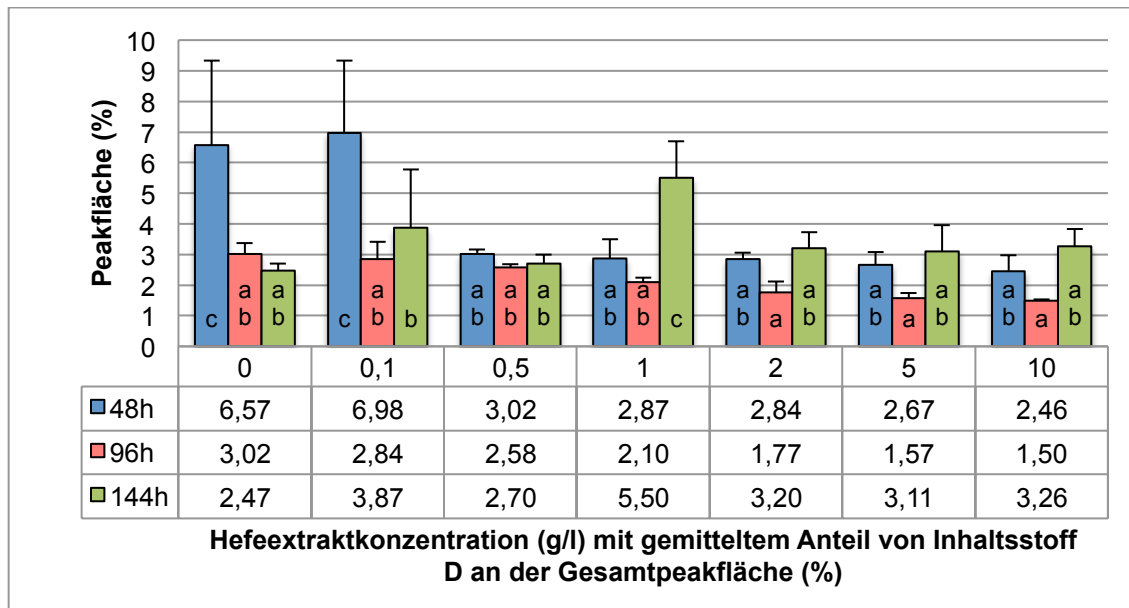


Diagramm 34: Vergleich des Einflusses von verschiedenen Elizitorkonzentrationen und Elizitoreinwirkzeiten auf die Produktion des Inhaltsstoffes D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

3.2.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse der biotischen Elizitierung mit Hefeextrakt

Die Biomasse konnte durch die Elizitierung mit unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen über die verschiedenen Zeiträume überwiegend positiv beeinflusst werden.

Das Trockengewicht wurde durch die Hefeextraktelizitierung über 48 Stunden durch fünf Konzentrationen und über 96 Stunden durch vier Konzentrationen leicht, jedoch nicht signifikant, gegenüber der Kontrolle erhöht. Hingegen ist es bei der Elizitierung über 144 Stunden teilweise zu signifikant niedrigeren Werten im Vergleich zur Kontrolle gekommen.

Durch die Elizitierung mit höheren Hefeextraktkonzentrationen über 48 und 96 Stunden kam es teilweise zu einer leichten Erhöhung des Zuwachses gegenüber der Kontrolle. Gleichzeitig trat bei dem Elizitierungszeitraum von 48 Stunden bei 0,1 g/l Hefeextrakt der niedrigste Wert mit 743% auf.. Bei der Elizitierung über 144 Stunden ergab sich, neben anderen höheren Werten, der höchste Wert unter allen Elizitorkonzentrationen und -zeiträumen mit 991% Zuwachs bei 5 g/l Hefeextrakt. Das Resümee über die Wirkung der Elizitierung

mit Hefeextrakt auf die Zuwachsrates ist, dass insgesamt eine leicht positive Auswirkung nachgewiesen werden konnte, da die Werte der elizitierten Ansätze größtenteils über dem Mittelwert der Kontrolle des jeweiligen Elizitierungszeitraumes lagen.

Wie auch schon bei den Ansätzen mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium konnte auch bei der Elizitierung mit Hefeextrakt kein einheitlicher Einfluss der verschiedenen Elizitorkonzentrationen und –zeiträume auf die Produktion der untersuchten Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Die kürzeste Elizitierung über 48 Stunden erzielte bei Inhaltsstoffen A durchwegs und bei Inhaltsstoff B teilweise positive Wirkungen. Im Gegensatz dazu konnte die 96-Stunden-Elizitierung bei Imperatorin, Isoimperatorin und Inhaltsstoff A überwiegend eine Steigerung der Produktion erzielen und auch Cnidilin bzw. Phellopterin, Inhaltsstoff B und C konnten positiv beeinflusst werden. Die Elizitierung über 144 Stunden führte bei einzelnen Hefeextraktkonzentrationen zu einer signifikant gesteigerten Bildung von Inhaltsstoff A, B und D sowie zu einer leichten Erhöhung von Isoimperatorin und Cnidilin bzw. Phellopterin. Hinsichtlich der verwendeten Konzentrationen des Hefeextraktes ergab sich für die Bildung der Inhaltsstoffe ebenfalls kein einheitliches Bild, da sich manche Inhaltsstoffe von niedrigeren und manche von höheren Konzentrationen besser beeinflussen ließen. Deutlich ließ sich dieser Unterschied zum Beispiel beim Inhaltsstoff B über 96 Stunden erkennen, da hier der Peakflächenanteil bis zu einer Hefeextraktkonzentration von 1 g/l die Werte stetig stiegen um daraufhin bei den höheren Elizitorkonzentrationen wieder zu sinken.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Elizitierung mit ausgewählten Hefeextraktkonzentrationen über bestimmte Zeiträume eine mögliche Methode zur gesteigerten Gewinnung der Inhaltsstoffe aus *Peucedanum ostruthium* war..

3.3. Einfluss der Ionenstärke im Nährmedium

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Versuchen mit den drei verschiedenen Medien $\frac{1}{2}$ MS, MS und B5 erläutert. Die Auswirkung der unterschiedlichen Ionenzusammensetzung der Medien wird anhand der Biomasse und den Inhaltsstoffen präsentiert.

3.3.1. Einfluss auf die Biomasse

Bei der Bestimmung der Biomasse wurden von den Medien MS und $\frac{1}{2}$ MS je zwei Kolben gewogen, beim Medium B5, das 3% Saccharose enthielt, wurden die zwei Ansätze herangezogen, die schon bei den Untersuchungen zum Einfluss der Saccharose im Nährmedium als Kontrolle bei der HPLC-Messung fungierten.

Die Analyse der Frischgewichte, dargestellt in Tabelle 5 (S. 59), ergab das größte Gewicht beim Medium B5 und das geringste bei $\frac{1}{2}$ MS. Diese Medien unterschieden sich hinsichtlich des Frischgewichts signifikant voneinander

Aus Tabelle 5 (S. 59) sind die Ergebnisse des Trockengewichts in den verschiedenen Medien ablesbar. Der Einfluss der Medien auf das Trockengewicht war mit dem auf das Frischgewicht ident. Das höchste durchschnittliche Trockengewicht wurde bei den Kulturen in B5 erzielt und das niedrigste im Medium $\frac{1}{2}$ MS allerdings konnte kein signifikanter Unterschied im Trockengewicht in den verschiedenen Medien festgestellt werden.

Das Verhältnis zwischen Frischgewicht und Trockengewicht in den Medien $\frac{1}{2}$ MS und MS war mit einem Unterschied der beiden Faktoren von 1,7 etwas stärker. Zwischen dem Medium B5 und den beiden letzteren kam es zu einem Faktorunterschied von weniger als 1.

Bei der optischen Betrachtung der Kulturen war bei keinem der verwendeten Medien eine Verfärbung der „hairy roots“ feststellbar. Bei allen Kulturen in den verschiedenen Medien wurde eine Kallusbildung beobachtet, wobei die Kulturen in $\frac{1}{2}$ MS die geringste aufwiesen.

Tabelle 5: Einfluss der verschiedenen Medien auf Frisch (FG)- und Trockengewicht (TG), Verfärbung und Kallusbildung der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Medium	FG (g)	TG (g)	FG/TG	Verfärbung	Kallusbildung
½ MS	4,29 ± 0,42 ^a	0,42 ± 0,05 ^a	10,2	-	-/+
MS	5,42 ± 1,00 ^{ab}	0,64 ± 0,21 ^a	8,5	-	+
B5	6,39 ± 0,22 ^b	0,68 ± 0,03 ^a	9,4	-	+

Bei der Analyse der Zuwachsrate in Prozent (Diagramm 35) konnte der positive Einfluss des Mediums B5 im Vergleich zu den anderen verwendeten Medien bestätigt werden. So zeigte sich hier eine Zuwachsrate von 794%, die somit um 277% höher lag als der niedrigste Zuwachs bei ½ MS mit 517%. Die Kulturen in B5 hatten somit eine signifikant höhere Zuwachsrate als die Kulturen im ½ MS-Medium, sie unterschied sich jedoch nicht signifikant vom Zuwachs der Kulturen im MS-Medium.

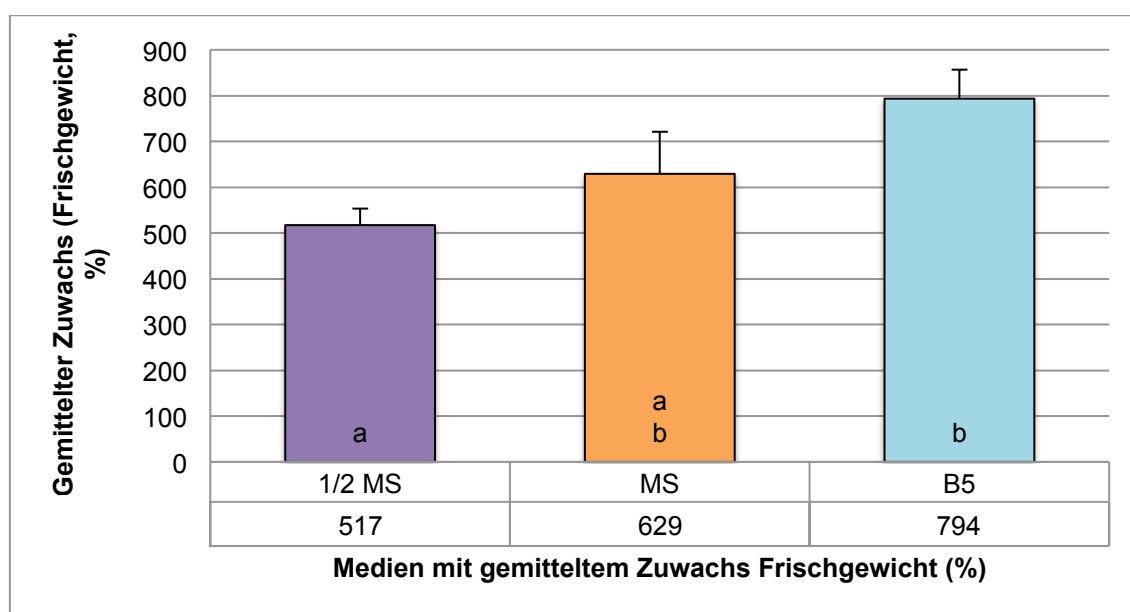


Diagramm 35: Einfluss des Mediums auf den Biomassezuwachs der „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Bei der Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Biomasse konnte festgestellt werden, dass sich der Einfluss der drei Medien sowohl in Frisch- und Trockengewicht, als auch in der Zuwachsrate widerspiegeln. Das Medium ½ MS führte bei den „hairy-roots“-Kulturen stets zu den niedrigsten Biomassewerten im Vergleich zu den Medien MS und B5. Das stickstoffreiche

B5-Medium erzielte im Gegensatz zu beiden anderen Medien sowohl ein höheres Frischgewicht als auch eine höhere Zuwachsrate, gegenüber $\frac{1}{2}$ MS sogar signifikant, und ist somit das vorteilhafteste Medium für die Kultivierung der „hairy roots“-Kulturen von *Peucedanum osthrotium* unter den angegebenen Kultivierungsbedingungen.

3.3.2. Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrum

Zur Beurteilung der Inhaltsstoffe wurden die beiden Ansätze der Medien $\frac{1}{2}$ MS und MS mittels HPLC vermessen und überdies die vorhandenen HPLC-Ergebnisse der beiden Ansätze des Mediums B5 des Saccharoseversuches herangezogen. Daraufhin erfolgte der Vergleich der UV-Spektren und Retentionszeiten mit den Ergebnissen von Vogl et al. (2011). In diese Analyse flossen die Messergebnisse aus zwei Messungen je Ansatz ein, ausgenommen ist ein Ansatz vom MS-Medium mit einer Messung. Miteinbezogen in diese Auswertung der Peakflächenanteile der Inhaltsstoffe an der Gesamtpeakfläche wurden wiederum die Inhaltsstoffe A bis D mit den HPLC-Peaks, die schon in den anderen Kapiteln erläutert wurden, da diese auch hier einen größeren Teil der Gesamtpeakfläche einnehmen.

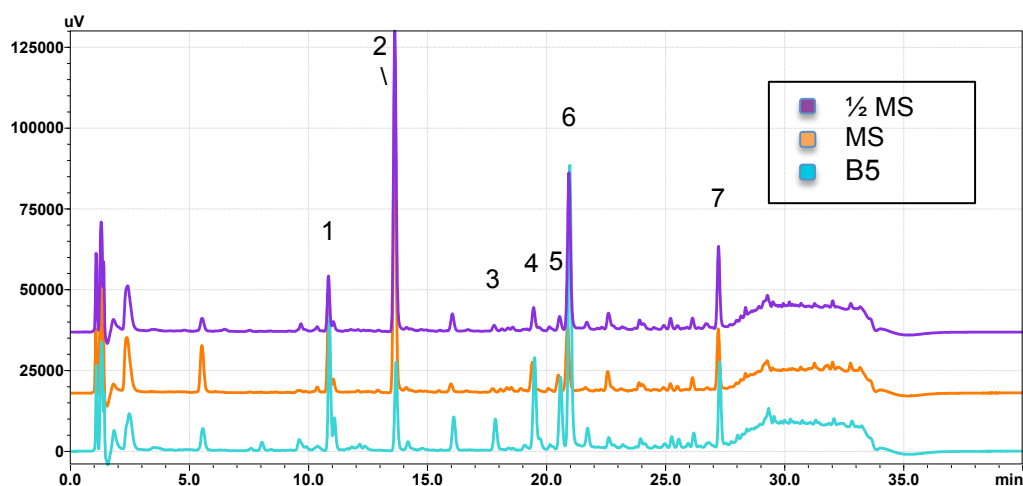


Abbildung 4: HPLC- Chromatogramme der Medien $\frac{1}{2}$ MS, MS und B5 mit den bewerteten Peaks. (1) Inhaltsstoff A, (2) Inhaltsstoff B, (3) Imperatorin, (4) Cnidilin/Phellopterin, (5) Inhaltsstoff C, (6) Isoimperatorin, (7) Inhaltsstoff D

Identifizierte Inhaltsstoffe

Anders als bei den bisherigen Versuchen konnte Imperatorin bei den Kulturen in den Medien $\frac{1}{2}$ MS und MS nicht eindeutig identifiziert werden. Daher ist B5 das Medium das zur Imperatoringewinnung angewendet werden sollte. Die Ergebnisse zu Imperatorin in B5 mit 3% Saccharose im Nährmedium sind dem Diagramm 2 auf Seite 17 zu entnehmen.

Isoimperatorin konnte durch die UV-Spektren bei den „hairy roots“-Kulturen in den drei Medien bei einer Retentionszeit von etwa 20,9 Minuten identifiziert werden. Der prozentuelle Peakflächenanteil von Isoimperatorin an der Gesamtpeakfläche wurde durch die Kultivierung in den drei verschiedenen Medien stark beeinflusst (Diagramm 36, S. 62). Der höchste Cumarinanteil konnte mit 17,84% bei den Kulturen im Medium B5 festgestellt werden. Der niedrigste Wert mit 5,16% bei den Kulturen im Medium MS entsprach somit nur einem Drittel des Gehaltes an Isoimperatorin bei jenen in B5, Daraus resultierte ein signifikanter Unterschied bei der Produktion von Isoimperatorin zwischen den Kulturen in den Medien MS und B5. Das Medium $\frac{1}{2}$ MS konnte mit einem Wert von 9,98% nicht signifikant von den anderen Medien unterschieden werden.

Aus den HPLC-Messungen ergab sich hiermit, dass das Medium B5 den besten Einfluss auf die Isoimperatorinproduktion in den „hairy roots“ hatte und das Medium MS im Vergleich hierzu signifikant schlechtere Ergebnisse erbrachte.

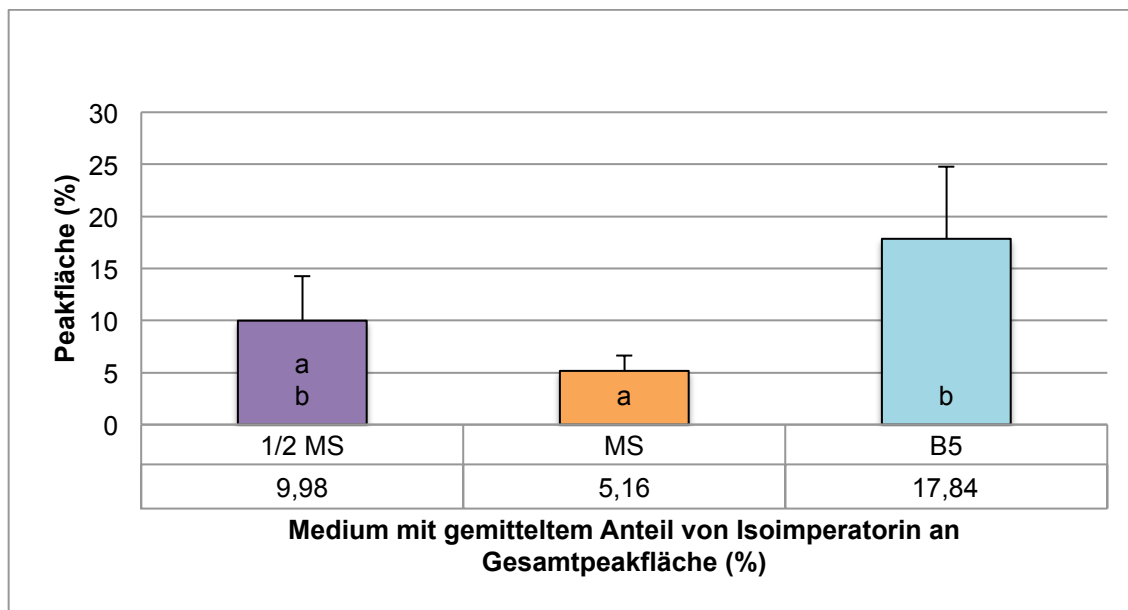


Diagramm 36: : Einfluss der verschiedenen Medien auf die Produktion von Isoimperatorin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Cnidilin bzw. Phellopterin

Dieser Inhaltsstoff konnte wie zuvor nicht eindeutig als Cnidilin oder Phellopterin identifiziert werden, da mit den gewählten Methoden zwischen diesen beiden Substanzen keine Unterscheidung möglich war. Jedoch konnte durch UV-Spektren-Vergleich mit den Standards festgestellt werden, dass es sich um eine dieser beiden Substanzen handelte. Der HPLC-Peak, der mittels UV-Spektrum als Cnidilin bzw. Phellopterin identifiziert wurde, trat bei einer Retentionszeit von etwa 19,4 Minuten auf.

Die Kulturen in den drei verglichenen Medien wiesen stark unterschiedliche prozentuelle Peakflächenanteile von Cnidilin bzw. Phellopterin auf, wie in Diagramm 37 (S. 63) dargestellt. Der höchste Wert trat bei den Kulturen im Medium B5 mit 5,13% auf und erreichte hiermit mehr als das Doppelte des niedrigsten Wertes mit 1,75% bei den Kulturen im Medium ½ MS. Das Ergebnis beim Medium MS war mit 2,84% ebenfalls niedriger als bei B5. Die Auswertung der Resultate zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen in B5 und denen in den beiden anderen Medien. Daraus lässt sich schließen, dass das Medium B5 den besten Einfluss auf die Produktion von Cnidillin bzw. Phellopterin hatte.

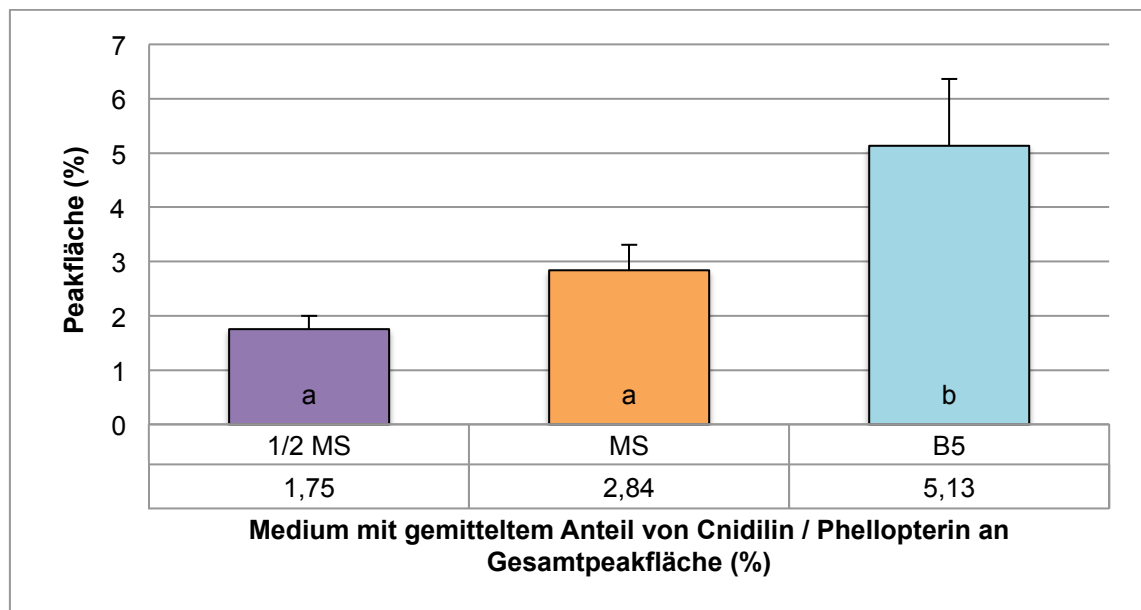


Diagramm 37: Einfluss der verschiedenen Medien auf die Produktion von Cnidilin / Phellopterin in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

Nicht identifizierte Cumarine

Dieselben vier nicht identifizierten Inhaltsstoffe, die schon vorher Gegenstand der Untersuchungen waren, traten auch bei dieser Versuchsreihe auf und werden entsprechend abgehandelt. Das Diagramm 38 (S. 64) gibt einen Überblick über die Ergebnisse zu den vier Inhaltsstoffen in den drei getesteten Medien.

Inhaltsstoff A erschien bei der HPLC-Messung bei einer Retentionszeit von 10,8 Minuten und hatte den höchsten prozentuellen Peakflächenanteil von 6,39% an der Gesamtpeakfläche bei den Kulturen im Medium MS, ein signifikanter Unterschied konnte zum niedrigsten Wert mit 3,68% beim Medium ½ MS festgestellt werden.

Bei einer Retentionszeit von ungefähr 13,6 Minuten wurde der Inhaltsstoff B erfasst. Die höchste Produktion konnte mit einem Peakflächenanteil von 20,93% an der Gesamtpeakfläche beim Medium ½ MS nachgewiesen werden. Zwischen den Ergebnissen der Medien ½ MS und MS bestand keine nennenswerte Differenz, jedoch unterschieden sie sich signifikant von den niedrigeren Ergebnissen im Medium B5.

Beim Inhaltsstoff C war die Produktion in den „hairy roots“, im Vergleich mit den anderen drei nicht identifizierten Inhaltsstoffen, am niedrigsten. Bei einer Retentionszeit von etwa 20,5 Minuten wurde der höchste prozentuelle Anteil

des Inhaltsstoffes C mit 3,43% bei den Kulturen im Medium B5 gemessen und wies somit einen signifikanten Unterschied zu den Werten in den beiden anderen Medien auf.

Der Inhaltsstoff D erschien bei einer Retentionszeit von circa 27,1 Minuten und wurde bei den Kulturen im Medium 1/2 MS mit 5,97% Peakflächenanteil am stärksten und bei jenen im Medium B5 mit 3,95% am geringsten produziert. Signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen in den verschiedenen Medien konnten bei diesem Inhaltsstoff nicht festgestellt werden.

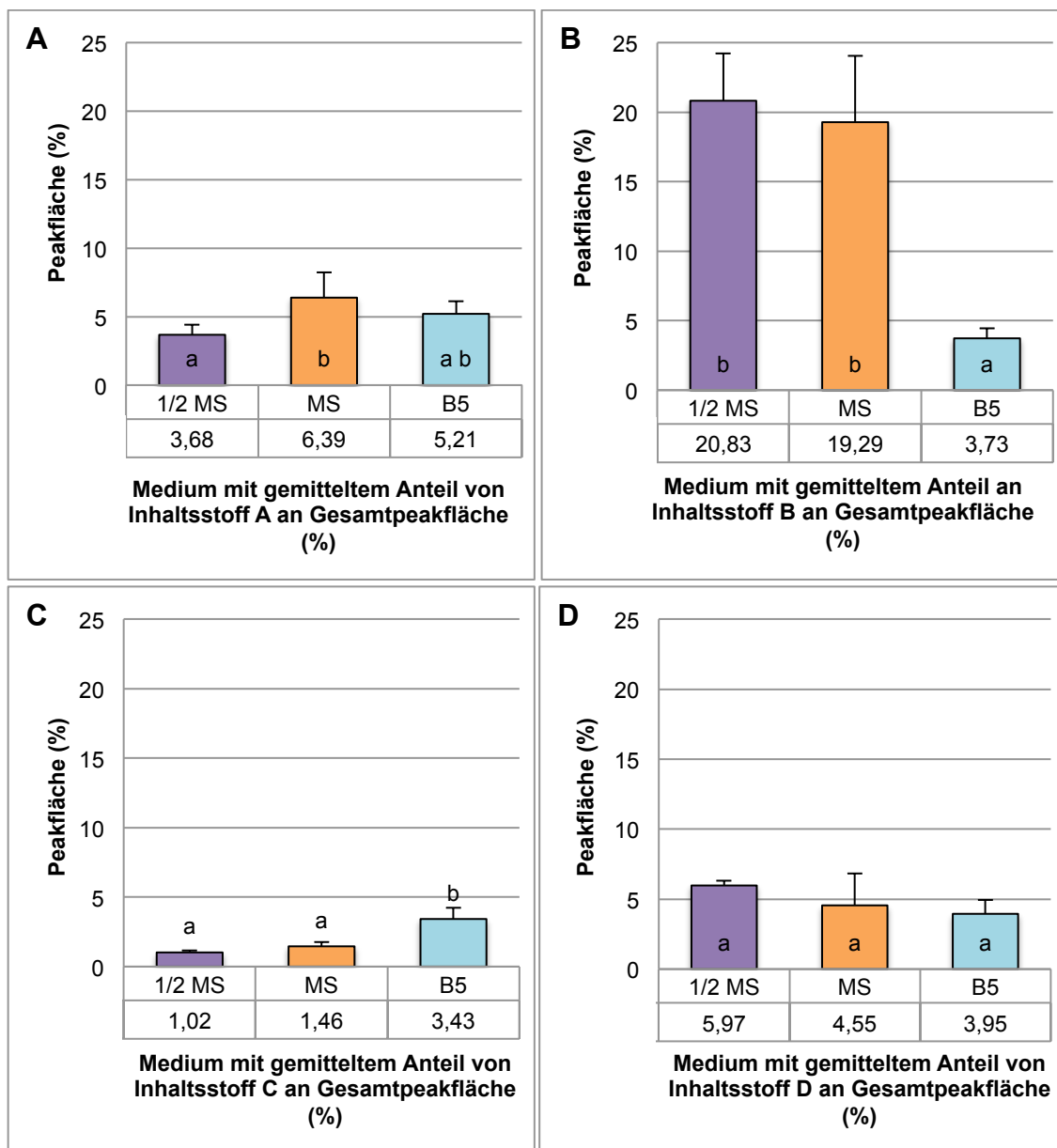


Diagramm 38: Einfluss der verschiedenen Medien auf die Produktion der Inhaltsstoffe A bis D in „hairy roots“. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben angegeben.

3.3.3. Gesamtübersicht der Ergebnisse des Medienvergleiches

Der Vergleich der drei Medien $\frac{1}{2}$ MS, MS und B5 zeigte die unterschiedlichen Auswirkungen der Ionenstärke einerseits auf die Biomasse und andererseits auf das Inhaltsstoffspektrum.

Das Medium B5 zeigte einen günstigen Einfluss auf die Zuwachsrate und auf die Produktion der identifizierten Inhaltsstoffe. Die Kulturen in diesem Medium wiesen die höchste Produktion von Isoimperatorin und Cnidilin bzw. Phellopterin auf, außerdem konnte im Vergleich zu den anderen Medien Imperatorin nur hier eindeutig identifiziert werden.

Bei Betrachtung der anderen Medien konnte bei $\frac{1}{2}$ MS festgestellt werden, dass es hinsichtlich der Biomasse den geringsten wachstumsfördernden Effekt hatte, jedoch auf die Inhaltsstoffe B und D sowie Isoimperatorin einen günstigeren Einfluss ausübte als das Medium MS. Überdies konnte durch die Kultivierung in $\frac{1}{2}$ MS auch die Produktion von Inhaltsstoff B und D in den Kulturen im Medium B5 übertroffen werden. Die Ergebnisse des Medium MS befanden sich meist im Mittelfeld und waren nur beim Inhaltsstoff A besser als bei den beiden anderen Medien.

Die Ergebnisse dieses Medienvergleiches machen deutlich, dass das Medium B5 am vorteilhaftesten war, da es zwar nicht immer die höchsten Werte erreichte, jedoch das Wachstum der „hairy roots“ und die Produktion fast aller Inhaltsstoffe inklusive Imperatorin in einem ausreichenden Maß förderte. Die beiden anderen Medien zeigten stark variierende Ergebnisse und sollten daher je nach dem gewünschten Inhaltsstoff zur Kultivierung der „hairy roots“-Kulturen gewählt werden.

3.4. HPLC-MS der Cumarine

Durch die Messungen mit HPLC-MS sollte die Identifizierung der Inhaltsstoffe mittels UV-Spektren und Retentionszeiten bestätigt werden. Dabei kam es im Vergleich zu den vorhergehenden HPLC-Messungen zu einer Verschiebung der Retentionszeiten, jedoch immer um denselben Faktor.

Die Abbildung 5 (S. 66) zeigt das sich ergebende HPLC-Chromatogramm mit den nummerierten Peaks, die sechs der sieben bereits besprochenen Inhaltsstoffe darstellen. Der Schlusspeak des Inhaltsstoffes D konnte wegen

Überlagerungen der Signale nicht eindeutig von anderen Signalen differenziert werden.

Die Identifizierung von Imperatorin und Isoimperatorin wurde anhand von Referenzsubstanzen vorgenommen und durch Vergleich der MS-Spektren konnte das Vorhandensein von Imperatorin und Isoimperatorin bestätigt werden (Abbildung 6, S. 67 und Abbildung 7, S. 67). Die Fragmentierung der Moleküle der beiden Furanocumarine mit dem $[M+H]^+$ von 270,9 zeigte jeweils ein Fragmentierungssion von m/z 202,5, das durch die Abspaltung der sauerstoffgebundenen Seitenkette erhalten wurde. Eine Differenzierung von Imperatorin und Isoimperatorin erfolgte durch die Fragmentierung dieser Ionen im MS^3 (Vogl et al. 2011). In Tabelle 6 (S. 67) sind die Hauptfragmentierungssionen der einzelnen besprochenen Substanzen mit einer relativen Intensität von über 10% angeführt. Dabei war eine Identifizierung der Inhaltsstoffe A bis D mittels MS-Spektren nicht möglich (Abbildung 8, S. 68).

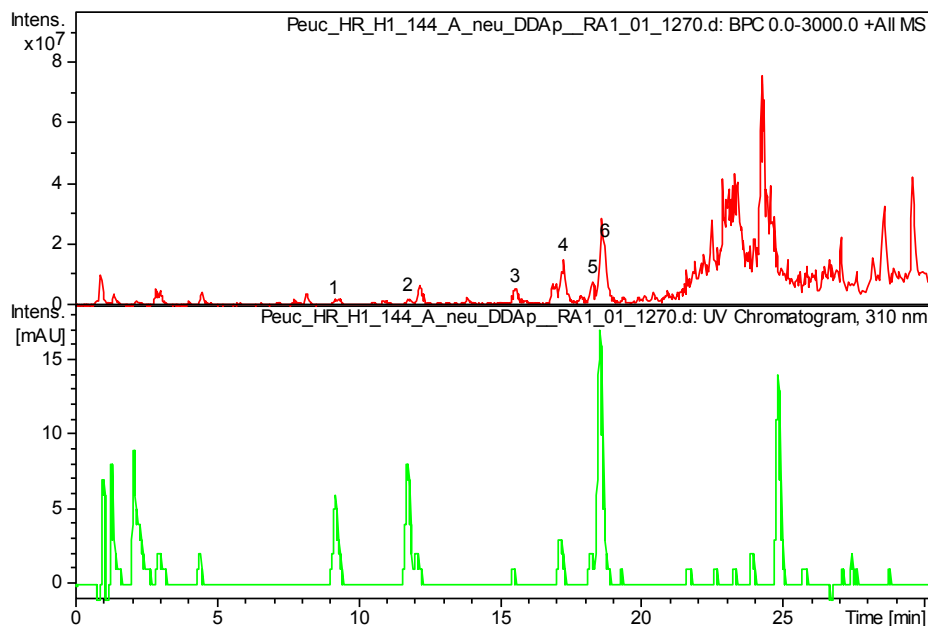


Abbildung 5: (Oben): HPLC-Chromatogramm von der HPLC-MS-Messung mit den nummerierten Peaks der Inhaltsstoffe. (1) Inhaltsstoff A, (2) Inhaltsstoff B, (3) Imperatorin, (4) Cnidilin/Phellopterin, (5) Inhaltsstoff C, (6) Isoimperatorin. (Unten) : UV-Chromatogramm der HPLC-MS-Messung

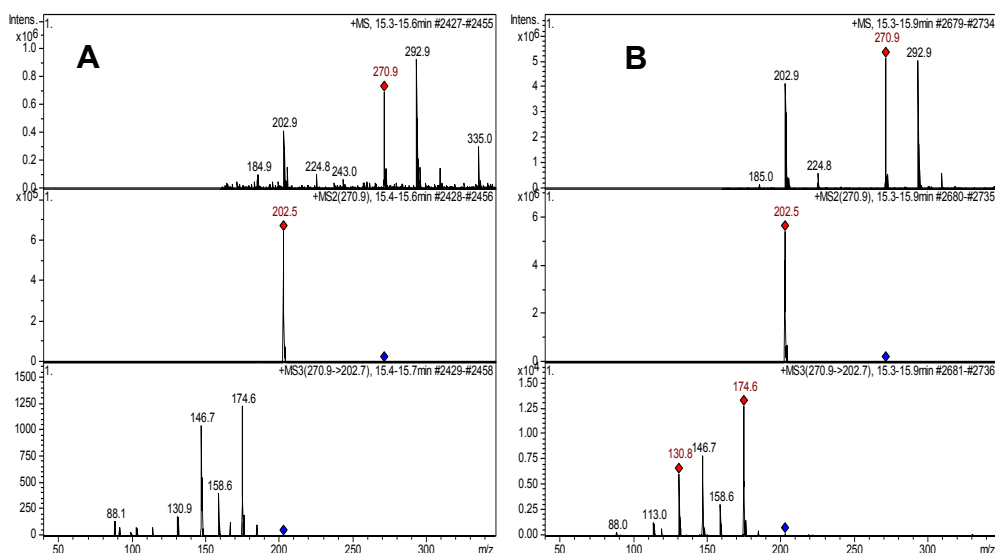


Abbildung 6: MS-Spektren von Imperatorin. (A) Imperatorin der Probe, (B) Imperatorin Standard

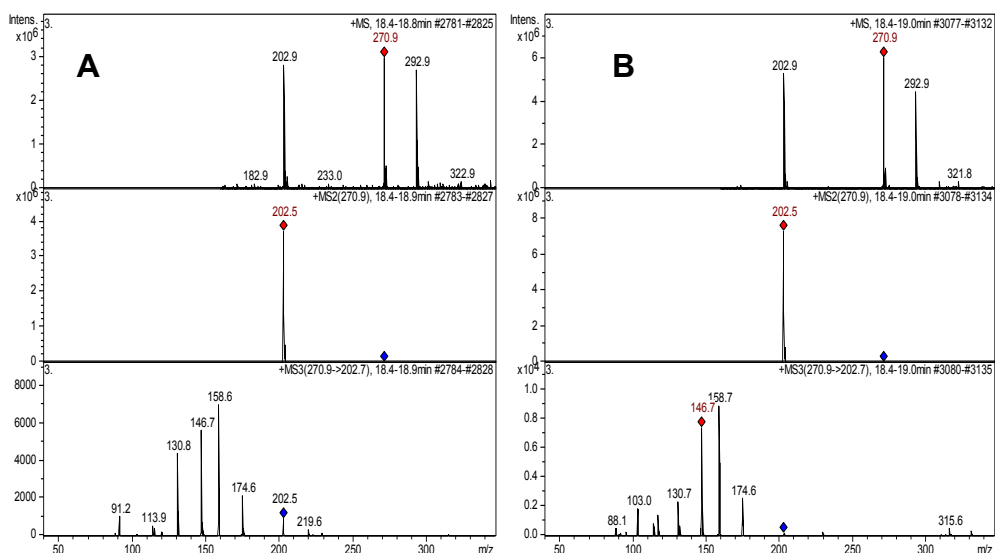


Abbildung 7: MS-Spektren von Isoimperatorin. (A) Isoimperatorin der Probe, (B) Isoimperatorin Standard

Tabelle 7: Fragmentierungsmuster der Inhaltsstoffe mit den Hauptfragmentierungionen mit einer Intensität >10%.

Nr; Inhaltsstoff	[M+ H] ⁺	MS ²	MS ³
1; Inhaltsstoff A	230.9	[230.9]: 174.6	[174.6]: 146.8, 109.3
2; Inhaltsstoff B	378.9	[378.9]: 184.6	[184.6]: 169.5, 154.8
3; Imperatorin	270.9	[270.9]: 202.5	[202.5]: 174.6, 166.5, 158.6, 147.3, 146.7, 130.9, 88.1
4; Cnidillin/Phellopterin	300.9	[300.9]: 232.5	[232.5]: 217.5
5; Inhaltsstoff C	300.9	[300.9]: 232.6	[232.6]: 217.5, 172.6
6; Isoimperatorin	270.9	[270.9]: 202.5	[202.5]: 174.6, 158.6, 146.7, 130.8, 91.2

Der Peak bei der Retentionszeit von 19,4 Minuten, der durch die HPLC-Messungen und die UV-Spektren nicht eindeutig als Cnidilin oder Phellopterin identifiziert werden konnte, zeigte auch beim MS-Spektrum keine Fragmentierung, die eine eindeutige Identifizierung möglich gemacht hätten. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde das MS-Spektrum der Probe mit den MS-Spektren der Standards von Cnidilin und Phellopterin verglichen, die ebenfalls analysiert wurden.

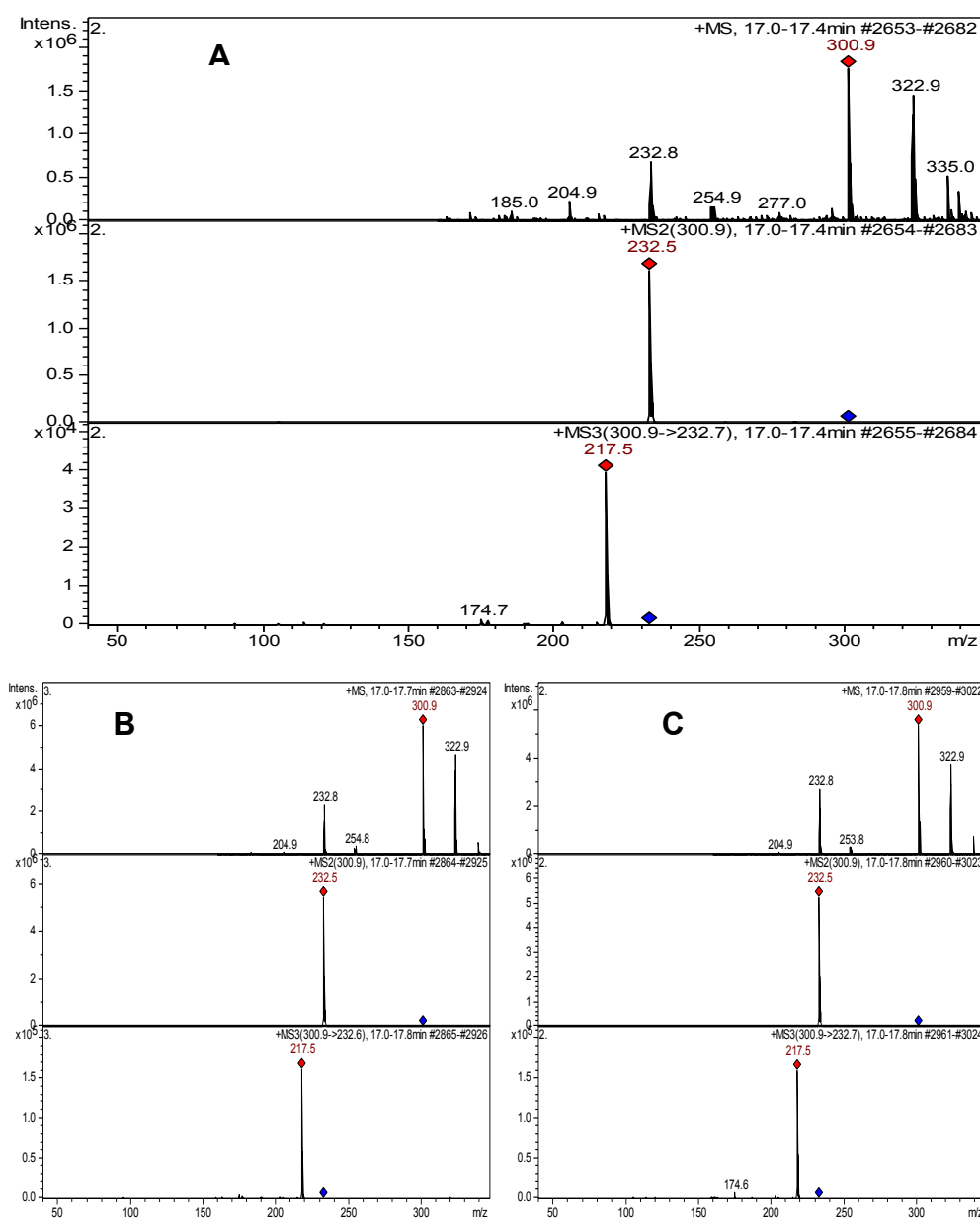


Abbildung 8: MS-Spektren von (A) Cnidilin bzw. Phellopterin der Probe, (B) Cnidilin Standard, (C) Phellopterin Standard.

3.5. Dünnschichtchromatographie von Cnidilin und Phellopterin

Die Unterscheidung von Cnidilin und Phellopterin war mit HPLC-Chromatogramm, UV-Spektren und MS-Spektren nicht eindeutig. Daher wurde mittels einer Dünnschichtchromatographie versucht hier eine Trennung zu erreichen (zu den Parametern siehe Kap. 2.7, S. 11). Diese Methode des Trennverfahrens machte jedoch bei den genannten Parametern eine Differenzierung zwischen den beiden Cumarinen nicht möglich. Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie zeigte demnach bei den verschiedenen getesteten Konzentrationen und Mischungen nur jeweils eine Substanzzone. Daraus konnte geschlossen werden, dass die beiden Cumarine unter diesen Bedingungen dasselbe Wanderverhalten auf der DC-Platte besitzen und nicht voneinander getrennt werden können (Abbildung 9).

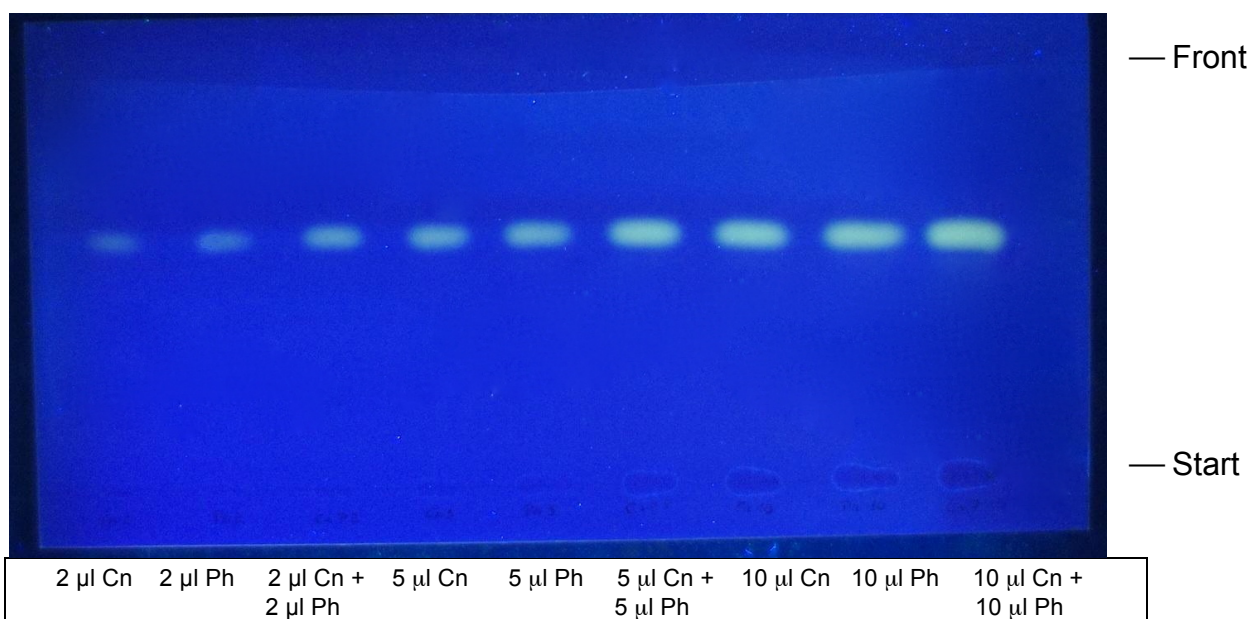


Abbildung 9: Dünnschichtchromatogramm von Cnidilin und Phellopterin, detektiert bei 366nm (Cn: Cnidilin, Ph: Phellopterin; Parameter siehe Kap. 2.7., S. 11).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss abiotischer Elizitierung mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen, biotischer Elizitierung mit Hefeextrakt sowie von unterschiedlichen Nährmedien auf das Wachstum und die Bildung sekundärer Inhaltsstoffe in „hairy roots“-Kulturen von *Peucedanum ostruthium* untersucht. Vorrangiges Ziel dabei war, die bereits von Vogl et al. (2011) in den Wurzeln von *Peucedanum ostruthium* nachgewiesenen einfachen Cumarine Ostruthin und Osthon, die Furanocumarine Oxypeucedanin, Oxypeucedanin Hydrat, Ostruthon, Imperatorin, Isoimperatorin und Oxypeucedanin Ethanolat und das Chromon Peucenin nachzuweisen und eventuell vermehrt zu gewinnen.

Der Einsatz von „hairy roots“ erfolgte wegen der Vorteile dieses Gewebetyps. Denn „hairy roots“-Kulturen zeigen viele interessante Eigenschaften, die für die Gewinnung von sekundären Inhaltsstoffen für z.B. die pharmazeutische und kosmetische Industrie genutzt werden (Georgiev et al. 2007). Zum Beispiel zeigte sich in früheren Untersuchungen, dass auch sekundäre Metaboliten gebildet werden können, die in der intakten Pflanze nur in den oberirdischen Organen synthetisiert werden. So wurde zwar dokumentiert, dass die Bildung von Artemisinin in den oberirdischen Organen stattfindet (Wallaart et al. 1999), jedoch konnte gezeigt werden, dass es auch in „hairy roots“-Kulturen zu einer Artemisinin-Produktion kam (Weathers et al. 1994; Jaziri et al. 1995).

Wie bereits eingangs erwähnt, werden „hairy roots“ bevorzugt verwendet, um sekundäre Metaboliten zu produzieren, da sie ein schnelles Wachstum und genetische Stabilität aufweisen (Shanks und Morgan 1999; Georgiev et al. 2007) sowie die in den Wurzeln der Mutterpflanze gebildeten sekundären Metaboliten oft im selben oder sogar höherem Ausmaß bilden (Flores et al. 1999; Veena und Taylor 2007). Diese Eigenschaften konnten bei *Hyoscyamus muticus* nachgewiesen werden, wobei festgestellt wurde, dass die biosynthetische Kapazität über 15 Jahre hinweg mit monatlichem Überimpfen der Kulturen stabil blieb (Flores et al. 1999). Daher haben sich „hairy roots“ zu einem experimentellen Modell entwickelt, um wurzelspezifische Stoffwechselwege zu erforschen.

Überdies eröffnen „hairy roots“-Kulturen die Möglichkeit zur Produktion neuer, pharmazeutisch interessanter Inhaltsstoffe. Als Beispiel sei hier die Isolierung von neuen Flavonoiden aus „hairy roots“ von *Glycyrrhiza glabra* durch Li et al. (2000) erwähnt. Auch Berkov et al. (2003) konnten von einem neuen Tropanalkaloid berichten, dessen Biosynthese in „hairy roots“ von *Datura stramonium* stattfand.

Die Wachstumsrate und die Biosynthese von sekundären Inhaltsstoffen in „hairy roots“ werden durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu gehören etwa die Stickstoffquellen im Medium, sowohl bezüglich ihrer Art als auch ihrer Menge. Darüber hinaus können auch exogene Wachstumshormone, die Saccharosekonzentration, Licht, Temperatur und diverse Chemikalien Einfluss auf Wachstum und Sekundärmetabolismus nehmen (Giri und Narusu 2000). Nebst der Variation der Saccharosekonzentration (abiotische Elizitierung) gibt es auch die Möglichkeit der Einflussnahme auf das Wachstum und die Produktion der sekundären Metaboliten durch biotische Elizitierung. Bei der Methode der Elizitierung wird die Abwehrreaktion der Pflanze gegen biotischen und abiotischen Stress genutzt, wodurch in der Folge sekundäre Metaboliten, die sogenannten Phytoalexine, gebildet werden (Zhao et al. 2005; Vasconsuelo und Boland 2007).

Der Mechanismus der Elizitierung wurde vor allem für biotische Elizitoren untersucht, hingegen wurde der Effekt von abiotischen Elizitoren auf die vermehrte Produktion sekundärer Metaboliten noch wenig erforscht. Es wird angenommen, dass Ca^{2+} -Ionen, Faktoren, die in die Membranintegrität eingreifen, sowie die Hemmung bzw. Aktivierung von intrazellulären Signalwegen in die Elizitierung involviert sind, und z.B. die Veränderung des osmotischen Drucks als Stressfaktor agiert (Angelova et al. 2006).

Wie sich im vorliegenden Experiment zur abiotischen Elizitierung mit fünf verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium zeigte, kam es im Bezug auf das Frischgewicht bis 4% Saccharose zu einer Steigerung der Biomasse und danach wieder zu einer Verminderung des Frischgewichts. Bei Betrachtung der Ergebnisse zum Trockengewicht ergab sich jedoch, dass es zu einer stetigen Steigerung der Biomasse mit steigenden Saccharosekonzentrationen kam und die höchste Biomasse bei 5% Saccharose ausgebildet wurde.

Ähnliche Beobachtungen machten schon Ahn et al. (2006) bei ihren Untersuchungen an „hairy roots“-Kulturen von *Bupleurum falcatum*. Das hier vermindert aufgetretene Frischgewicht bei gleichzeitig gestiegenem Trockengewicht bei höheren Saccharosekonzentrationen wurde mit unterschiedlicher Zelldichte und variablem Feuchtigkeitsgehalt der Kulturen begründet.

Die Erhöhung des Trockengewichts der untersuchten „hairy roots“ bei erhöhten Saccharosekonzentrationen konnte auch im Experiment von Xu et al. (2009) an „hairy roots“-Kulturen von *Angelica gigas* nachgewiesen werden. Hierbei wurden dieselben Saccharosekonzentrationen wie in unserem Versuch angewendet, wobei das höchste Trockengewicht bei Kultivierung der „hairy roots“ im Nährmedium mit 4% Saccharose auftrat. Yu et al. (1996) untersuchten hingegen die Wirkung verschiedener initialer Saccharosekonzentrationen zwischen 2% und 12% auf „hairy roots“ von *Solanum aviculare*. Die Auswertung der Resultate bezüglich der Biomasse zeigte dabei ebenfalls eine Steigerung des Trockengewichts bis zur Konzentration von 6% Saccharose im Nährmedium, bei höheren Konzentrationen nahm das Gewicht wieder ab.

Eine Bestätigung des positiven Einflusses von Saccharose als Kohlenstoffquelle im Nährmedium erbrachten Jeong et al. (2002), indem „hairy roots“ von *Panax ginseng* in Medien mit verschiedenen Zuckern wie z.B. Fructose, Glucose und Saccharose kultiviert wurden und die Kulturen im Medium mit Saccharose dabei das beste Wachstum zeigten. Außerdem konnte hier im Zuge von Untersuchungen zur Wirkung verschiedener initialer Saccharosekonzentrationen von 1% bis 10% ein günstiger Effekt von 3% Saccharose und ein hemmender Einfluss der höheren Konzentrationen auf das Wachstum der „hairy roots“ dokumentiert werden. Überdies konnten auch Sivakumar et al. (2005) anhand ihrer Untersuchungen an „hairy roots“ von *Panax ginseng* nachweisen, dass Saccharose einerseits gegenüber anderen Kohlenstoffquellen wie Fructose, Glucose und Maltose in besserem Wachstum der Kulturen resultierte, und andererseits, dass die getesteten Saccharosekonzentrationen von 1% 2%, 3%, 5%, 7% und 9% mit gesteigerter Konzentration auch zu einer Erhöhung der Wachstumsrate und des Trockengewichts führten.

Die Auswirkung der verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf die Produktion von sekundären Inhaltsstoffen zeigte sich im

vorliegenden Experiment als stark variierend. Die Biosynthese der beiden Cumarine Imperatorin und Isoimperatorin wurden dabei vor allem von der höchsten Saccharosekonzentration von 5% positiv beeinflusst. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch bei „hairy roots“ von *Angelica gigas*, die ebenfalls mit Saccharosekonzentrationen von 1% bis 5% kultiviert wurden und dabei der Gehalt der Pyranocumarine Decursin und Decursinol-Angelat vor allem durch Kultivierung mit 4% Saccharose gesteigert werden konnte (Xu et al. 2009).

Yu et al. (1996) untersuchten den Einfluss initialer Saccharosekonzentrationen von 2%, 3%, 4%, 6%, 9% und 12% auf die Steroidalkaloidproduktion in „hairy roots“-Kulturen von *Solanum aviculare*. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Bildung der Steroidalkaloide bei niedrigen Konzentrationen an Saccharose besser war als bei hohen, und dass es bei Konzentrationen über 6-9% Saccharose sogar fast zum Stagnieren der Produktion von Steroidalkaloiden kam. Auch die Arbeit von Sivakumar et al. (2005) zeigte, dass sich mittlere Saccharosekonzentrationen besser auf die Ginsenosidproduktion von „hairy roots“ von *Panax ginseng* auswirkten. Es zeigte sich, dass 2-5% Saccharose einen fördernden und 1% sowie 7-9% einen hemmenden Einfluss auf die Inhaltsstoffbildung hatten. Bei einer Untersuchung der Biosynthese von Saikosaponin in *Bupleurum falcatum* wiederum zeigte sich, dass die höchste untersuchte Konzentration von 8% Saccharose den besten, die niedrigste Konzentration von 2% noch einen guten und 6% einen negativen Effekt auf die Inhaltsstoffproduktion hatten (Ahn et al. 2006).

Wie sich aus der Literatur und den vorliegenden Ergebnissen schließen lässt, hat die Saccharosekonzentration im Nährmedium nachweislich einen Einfluss auf das Wachstum von „hairy roots“ sowie auf die Bildung der sekundären Metaboliten. Jedoch lässt sich hierbei keine einheitliche Wirkung feststellen, sondern sie kann je nach Pflanzenspezies und Inhaltsstoff variieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden „hairy roots“ von *Peucedanum ostruthium* auch mit einem aufgereinigten Hefeextrakt elizitiert, um die Cumarinproduktion zu steigern. Weiters wurde der Einfluss auf die Biomasse sowie der Einfluss der Kultivierungsdauer nach der Zugabe des Hefeextrakts untersucht.

Bei Analyse der Biomasse zeigte sich, dass die Elizitierung nur einen geringen Einfluss auf diese hatte. Über 48 und 96 Stunden hinweg zeigte sich beim Frischgewicht und beim Trockengewicht ein ähnlicher Einfluss des Elizitors, wobei jeweils eine Hefeextraktkonzentration von 0,1 g/l zu einer Verminderung

der Biomasse führte. Die anderen Konzentrationen resultierten zumeist in einer Steigerung der Gewichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nicht elizitiert wurde, jedoch meist in einem nicht signifikanten Ausmaß. Bei 144 Stunden Einwirkzeit konnte kein positiver Effekt der Elizitierung festgestellt werden, sondern es ergab sich bei der Hefeextraktkonzentration von 10 g/l sogar ein signifikant niedrigeres Frisch- und Trockengewicht im Vergleich zur Kontrollkultur. Im Bezug auf die Zuwachsrate zeigten die Konzentrationen von 0,5 g/l bis 10 g/l Hefeextrakt über 48 und 96 Stunden bessere Ergebnisse als die Kontrolle, und über 144 Stunden waren die Konzentrationen von 2 g/l und 5 g/l die vorteilhaftesten.

Ähnliche Beobachtungen wie beim vorliegenden Versuch über 144 Stunden wurden bereits von Rhee et al. (2010) bei *Angelica gigas* gemacht, wobei es ebenfalls zu einem gesteigerten Frischgewicht kam, das jedoch bei den höchsten Konzentrationen von 5 g/l und 10 g/l Hefeextrakt wieder rückläufig war.

Eine Steigerung des Trockengewichts der „hairy roots“ von *Salvia miltiorrhiza* bei höheren Hefeextraktkonzentrationen konnte von Chen et al. (2001) durch Zugabe von 0 ml, 0,1 ml, 0,25 ml 0,5 ml und 1 ml Hefeextraktlösung zu den Kulturen nachgewiesen werden. Bei der Durchführung einer kinetischen Studie wurden jeder Kultur 0,5 ml der Hefeextraktlösung zugesetzt und über neun Tage hinweg täglich Wurzelproben geerntet. Hierbei konnte sieben Tage nach der Elizitierung eine Verdopplung des Trockengewichts gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen der „hairy roots“-Kultur konnten Chen und Chen (2000) bei einer Suspensionskultur von *Salvia miltiorrhiza* eine Hemmung des Wachstums durch verschiedene Hefeextraktkonzentrationen nachweisen. Dabei wurde neben dem geringen Zellwachstum bei höheren Elizitorkonzentrationen auch Apoptose beobachtet. Als mögliche Erklärung wird ein hemmender Einfluss der Elizitierung und des damit ausgelösten Abwehrmechanismus auf den Primärmetabolismus diskutiert. Ebenso hatte die Elizitierung reduzierenden Einfluss auf den Wassergehalt der Zellen, was aus dem Sinken des Verhältnisses FG/TG ersichtlich wurde.

In einer weiteren Untersuchung an Zellsuspensionskulturen von *Panax ginseng* wurde nicht nur auf die Konzentration des Hefeextrakts und die Elizitierungsdauer geachtet, sondern besonders auf den Zeitpunkt des Zusatzes des Elizitors zur Kultur. So konnte hier gezeigt werden, dass der

Hefeextrakt fördernde Wirkung auf die Biomasse hatte, wenn er am Tag der Inokulation beigelegt wurde, jedoch einen hemmenden Effekt aufwies, wenn er fünf bis fünfzehn Tage danach zugesetzt wurde (Lu et al. 2001).

Ge und Wu (2005) zeigten ebenfalls anhand von „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza*, dass die Elizitierung mit Hefeextrakt bzw. Ag⁺ oder einer Kombination aus beiden einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der „hairy roots“ hatte.

Bei der Analyse der Cumarine in den „hairy roots“-Kulturen von *Peucedanum ostruthium* zeigte sich, dass die Inhaltsstoffbildung je nach Elizitoreinwirkzeit und -konzentration unterschiedlich beeinflusst wurden. Die Elizitierung mit Hefeextrakt konnte meist als geeignete Methode zur Gewinnung bestimmter Inhaltsstoffe festgehalten werden, jedoch ist zu beachten, dass die Hefeextrakteinwirkzeiten und -konzentrationen je nach gewünschtem Inhaltsstoff entsprechend zu wählen sind. Imperatorin z.B. erreichte in den Kulturen, die über 96 Stunden mit 5 g/l Hefeextrakt elizitiert wurden, die höchste Konzentration in den „hairy roots“, weshalb diese Kombination am geeignetsten wäre.

Zum Verständnis der Wirkung der Elizitierung mit Hefeextrakt sollen hier einige andere Untersuchungen angeführt werden. Ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit wurden auch von Putalun et al. (2007) bei der Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen von *Artemisia annua* dokumentiert. Hierbei wurden die Kulturen ebenfalls 2, 4 und 6 Tage nach der Zugabe des Elizitors Hefeextrakt geerntet, und bei der Analyse der Artemisininproduktion erwies sich die längste Einwirkzeit über 6 Tage als die effektivste bezüglich einer gesteigerten Inhaltsstoffbildung. In Bezug auf die drei getesteten Elizitorkonzentrationen von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml konnte festgestellt werden, dass über 6 Tage alle drei eine Steigerung der Artemisininproduktion zur Folge hatten. Bei den kürzeren Elizitierungszeiträumen wurde nur bei bestimmten Konzentrationen eine Erhöhung des Artemisiningehalts gegenüber der Kontrolle festgestellt.

Die Elizitierung mit Hefeextrakt hatte auch Einfluss auf die Bildung von Decursinol-Angelat in Wurzelkulturen von *Angelica nigra*. Hier wurden die Hefeextraktkonzentrationen 0,1 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l und 10 g/l über 48 Stunden als Elizitor eingesetzt und die Auswertung zeigte eine Steigerung der

Bildung des Cumarins bei allen Behandlungen, am deutlichsten bei den mittleren Konzentrationen von 1 g/l und 2 g/l (Rhee et al. 2010).

Anhand von „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* wurde der Einfluss von Hefeextrakt in vier Konzentrationen auf die Produktion von Tanshinonen untersucht. Zu diesem Zweck wurden 20 Tage alte „hairy roots“ in 50ml Nährmedium mit 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml oder 1ml Hefeextrakt überführt. Dies führte bei allen Elizitorkonzentrationen zu einer erhöhten Bildung der Tanshinone Cryptotanshinon, Tanshinon I und Tanshinon IIA, wobei es insbesondere bei Cryptotanshinon bei den beiden höheren Konzentrationen zu einer sehr ausgeprägten Steigerung der Produktion gegenüber der Kontrolle kam. Außerdem wurde eine kinetische Studie durchgeführt, indem die Kulturen nach dem Zusatz des Elizitors täglich geerntet und analysiert wurden. Hier zeigte sich bei den drei Inhaltsstoffen gegenüber den unbehandelten Kulturen eine Steigerung der Produktion ab dem 6. Tag nach der Elizitierung (Chen et al. 2001).

Bei verschiedenen „hairy roots“-Klonlinien von *Coleus blumei* zeigte sich eine variierende Wirkung von Hefeextrakt auf die unterschiedlichen Klonlinien. Die Bildung von Rosmarinsäure wurde einen Tag nach der Zugabe des Elizitors bei manchen Klonlinien gehemmt, bei manchen erhöht und bei manchen Klonlinien kam es zu keiner Veränderung der Akkumulation von Rosmarinsäure in den „hairy roots“ (Bauer et al. 2009).

Weiters wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Basismedien auf das Wachstum der „hairy roots“ und auf die Cumarinproduktion untersucht. Zu diesem Zweck kultivierten wir die „hairy roots“ von *Peucedanum ostruthium* in den Medien B5, MS und $\frac{1}{2}$ MS.

Im Bezug auf das Wachstum der „hairy roots“ führte das Medium B5 sowohl beim Frisch- und Trockengewicht als auch bei der Zuwachsrate zu den besten Ergebnissen, das Medium $\frac{1}{2}$ MS hingegen schnitt diesbezüglich am schlechtesten ab.

Diese Ergebnisse bestätigen die positive Wirkung vom Medium B5, die bereits in der Diplomarbeit von Gössnitzer (2012) dokumentiert wurde. Jedoch unterschieden sich die Ergebnisse beim Zuwachs der „hairy roots“ in den Medien MS und $\frac{1}{2}$ MS. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erwies sich damals das Medium $\frac{1}{2}$ MS dem Medium MS überlegen. Diese Tatsache lässt sich möglicherweise durch die starke Kallusbildung erklären, die z.B. auch bei

„hairy roots“-Kulturen von *Pimpinella anisum* in den Medien ½ MS, ½ B5 und B5 auftrat. Nach längerer Kultivierung konnte hier eine starke Kallusbildung und eine Dedifferenzierung in ½ MS sowie zusätzlich der Verlust des Wurzelphenotyps in den Medien ½ B5 und B5 beobachtet werden (Santos et al. 1999). Die Ursachen für die starke Kallusbildung nach längerer Kultivierung können die mechanische Verletzung bei der Subkultivierung sowie ein zu großes Inokulum sein (Hamill et al. 1987).

Die Auswirkung verschiedener Medien auf das Wachstum von „hairy roots“ wurde auch anhand von *Azadirachta indica* dokumentiert. Beim Vergleich der drei Medien ON, MS und B5 wurden das Wachstum und die Azadirachtinproduktion durch das Medium ON am besten stimuliert, gefolgt von den Nährmedien B5 und MS. Somit war hier das Medium B5 dem Medium MS vorzuziehen (Satdive et al. 2007).

Im Hinblick auf die Produktion von Cumarinen in *Peucedanum ostruthium* konnte eine Veränderung des Inhaltsstoffspektrums im Vergleich zu den Ergebnissen von Gössnitzer (2012) festgestellt werden. So zeigten die Kulturen im Medium ½ MS keine erfassbare Imperatorinbildung mehr. Andererseits wurde nur in der vorliegenden Arbeit in den Kulturen im Medium ½ MS Isoimperatorin aufgefunden. Auch der Vergleich der Inhaltsstoffproduktion im Medium MS zeigte ein anderes Bild als in der vorangegangenen Arbeit, da Isoimperatorin und Cnidilin / Phellopterin aufgefunden werden konnten. Im Medium B5 wiederum konnte weder Oxypeucedanin noch Ostruthin in den aktuell untersuchten Kulturen nachgewiesen werden, was sich möglicherweise in der Kallusbildung begründet. Denn dadurch kann es zu einer drastischen Reduktion der Biosyntheseleistung der „hairy roots“ kommen (Hamill et al. 1987). Weiters lässt sich die Abwesenheit von Inhaltsstoffen im Wurzelgewebe durch die Abgabe der Substanzen ins Nährmedium erklären (Hamill et al. 1987; Chen und Chen 2000).

Die Synthese von ätherischem Öl in *Pimpinella anisum* wurde ebenfalls durch die Kallusbildung an den „hairy roots“ beeinflusst: Im Medium B5 und B5/2 kam es sogar zum Verlust des Wurzelphenotyps und es entwickelten sich Zellsuspensionskulturen mit reduzierter Biosyntheseleistung (Santos et al. 1999).

Der nicht eindeutig identifizierte Peak, der Cnidilin bzw. Phellopterin darstellen könnte, trat in allen von uns untersuchten Kulturen auf. Cnidilin wurde bereits von Chinou et al. (2007) in *Peucedanum luxurians* aufgefunden und

Phellopterin konnte von Eeva et al. (2004) in der Apiaceae *Angelica archangelica* identifiziert werden. Um diesen auftretenden Peak sowie auch die vier anderen unbekannten Inhaltsstoffe zu identifizieren, ist in weiterführenden Untersuchungen der Einsatz der NMR-Spektroskopie zu empfehlen.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse lässt sich die positive Wirkung der Medienoptimierung bzw. der abiotischen Elizitierung durch Saccharose und die biotische Elizitierung mit Hefeextrakt gegenüber der Kontrollen bestätigen, jedoch konnte in den „hairy roots“ nicht dasselbe Inhaltsstoffspektrum wie in normalen Wurzeln (Vogl et al. 2011) beobachtet werden. Das Wachstum wurde durch die veränderte Saccharosekonzentration, insbesondere in höheren Bereichen, begünstigt. Die Elizitierungen mit Hefeextrakt hatten auf das Wachstum wenig Einfluss, jedoch konnte aufgrund der Gesamtpeakfläche in beiden Versuchen eine meist positive Wirkung auf die Inhaltsstoffe beobachtet werden. Weiterführende Untersuchungen an „hairy roots“-Kulturen von *Peucedanum ostruthium* könnten mit einem besonderen Augenmerk auf das Medium durchgeführt werden. Bei den bereits durchgeführten Versuchen zeigte sich der positive Einfluss der höheren Saccharosekonzentrationen auf die Kultur. Daher sollten in zukünftigen Versuchen auch die Wirkung noch höherer Saccharosekonzentrationen oder anderer Kohlenstoffquellen untersucht werden. Aufgrund unserer Ergebnisse empfiehlt sich das Medium B5 von Gamborg et al. (1968) als das Nährmedium, das für weiterführende Versuche verwendet werden sollte, da sich damit ein gutes Wachstum und ein positiv beeinflusster sekundärer Metabolismus der „hairy roots“ ergaben. Überdies sollte auch untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Inhaltsstoffe auch ins Nährmedium abgegeben werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden Versuche an „hairy roots“-Kulturen von *Peucedanum ostruthum* (L.) Koch durchgeführt, die vor allem auf die Steigerung der Biomasse und der Bildung sekundärer Metaboliten, insbesondere der Cumarine, abzielten.

Zu diesem Zweck wurden die „hairy roots“- Kulturen mit unterschiedlicher Saccharosekonzentration und damit einem abiotischen Elizitor, sowie mit dem biotischen Elizitor Hefeextrakt kultiviert. Außerdem konnte der Einfluss der Ionenstärke im Nährmedium auf Zuwachs und Inhaltsstoffbildung anhand der drei Medien B5, MS und ½ MS untersucht werden. Die Auswirkung der verschiedenen Parameter wurde durch HPLC-DAD-und HPLC-MS-Messung ermittelt.

Ein positiver Einfluss der Saccharosekonzentrationen von 1-5% zeigte sich bereits bei der Analyse des Trockengewichts, hier kam es zu einem Anstieg des Gewichts mit steigender Saccharosekonzentration. Die Inhaltsstoffbildung wurde besonders durch die Kultivierung mit 1% und 5% Saccharose positiv beeinflusst und erbrachte dabei bessere Ergebnisse als bei der Standardkultivierung mit 3% Saccharose.

Die Elizitierung der „hairy roots“-Kulturen erfolgte stets am 21. Kultivierungstag mit verschiedenen Konzentrationen des Elizitors Hefeextrakt. Die Kulturen wurden nach 48, 96 und 144 Stunden geerntet und damit der Einfluss der Einwirkzeit des Elizitors untersucht. Das Trockengewicht zeigte sich durch die Elizitierung über 48 und 96 Stunden positiv beeinflusst, über 144 Stunden zeigte sich meistens eine negative Auswirkung gegenüber der Kontrolle. Bezüglich der Inhaltsstoffe waren unterschiedliche Wirkungen der Elizitorkonzentrationen und -zeiträume auf die verschiedenen Inhaltsstoffe zu beobachten. Die Konzentration der Cumarine Imperatorin und Isoimperatorin konnte durch die Elizitierung über 96 Stunden deutlich gesteigert werden. Hierbei wurden die höchsten Werte bei der Konzentration von 5 g/l Hefeextrakt für Imperatorin und 0,1 g/l Hefeextrakt für Isoimperatorin gemessen.

Die Ionenstärke der getesteten Medien ½ MS, MS und B5 hatte unterschiedlichen Einfluss auf die Biomasse und die Produktion der Inhaltsstoffe. Das Medium B5 führte dabei zur besten Zuwachsrate und zur

höchsten Cumarinbildung. Überdies zeichnete sich das Medium B5 im Vergleich zu den beiden anderen Medien dadurch aus, dass nur hier Imperatorin nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte durch geänderte Saccharosekonzentrationen, Elizitierung mit Hefeextrakt und die Ionenstärke des Mediums B5 ein durchaus positiver Effekt auf die Biomasse und die Biosynthese der Cumarine beobachtet werden.

6. Summary

In this diploma thesis experiments with hairy root cultures of *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch were performed, which above all aimed at stimulation of biomass formation and of the biosynthesis of secondary metabolites, particularly coumarin derivatives. To this end the hairy roots were cultivated with different sucrose concentration as abiotic elicitor, and with the biotic elicitor yeast extract. In addition the influence of different ion concentrations on growth rate and compound formation was tested with the three nutrient media B5, MS and $\frac{1}{2}$ MS. The results of the different experiments were determined by HPLC-DAD and HPLC-MS measurements.

A positive effect of sucrose concentrations of 1–5% on dry weight could be observed as an increase of weight with increased sucrose concentration. The formation of the secondary compounds was positively influenced in particular through cultivation with 1% or 5% sucrose, which produced better results than the standard cultivation with 3% sucrose.

Elicitation of the hairy root cultures always took place on the 21st day of cultivation and was realized with different concentrations of the elicitor yeast extract. The cultures were harvested after 48, 96 or 144 hours and the influence of the duration of elicitation was investigated. The dry weight appeared to be influenced positively by elicitation over 48 and 96 hours, whereas over 144 hours a negative influence as compared to the control was mostly found. Concerning the secondary compounds different effects of elicitor concentrations and duration were observed. The concentration of the coumarins imperatorin and isoimperatorin was considerably increased by elicitation over 96 hours. The highest amounts of imperatorin were measured at the concentration of 5 g/l yeast extract while 0,1 g/l yeast extract resulted in the highest isoimperatorin production.

The ion concentration of the tested media $\frac{1}{2}$ MS, MS and B5 had different influence on biomass and the production of the compounds. The medium B5 led to the best growth rate and the highest production of the coumarins. Moreover, only with medium B5 imperatorin was formed.

In summary, through changed sucrose concentration, elicitation with yeast extract and the ion concentration of the culture medium B5 a positive effect on biomass and the production of the secondary compounds could be observed.

7. Literaturverzeichnis

Abraham K., Wöhrlin F., Lindtner O., Heinemeyer G. und Lampen A. (2010), Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data, Mol. Nutr. Food Res. **54**: 228-239.

Ahn J. C., Chong W. S., Kim S. K. und Hwang B. (2006), Optimization of the sucrose and ion concentrations for saikosaponin production in hairy root culture of *Bupleurum falcatum*, Biotechnol. Bioprocess Eng. **11**: 121-126.

Angelova Z., Georgiev S. und Roos W. (2006), Elicitation of plants, Biotechnol. Biotechnol. Equip. **20**: 72-83.

Bauer N., Kiseljak D. und Jelaska S. (2009), The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots, Biol. Plant. **53**: 650-656.

Berkov S., Pavlov A., Kovacheva P., Stanimirova P. und Philipov S. (2003), Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*, Z. Naturforsch. (C) **58**: 42-46.

Chen H. und Chen F. (2000), Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high, tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture, Process Biochem. **35**: 837-840.

Chen H., Chen F., Chiu F. C. K. und Lo C. M. Y. (2001), The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*, Enzyme Microb. Technol. **28**: 100-105.

Chinou I., Widelski J., Fokialakis N., Magiatis P. und Glowinski K. (2007), Coumarins from *Peucedanum luxurians*, Fitoterapia **78**: 448-449.

Cisowskia W., Sawickaa U., Mardarowicz M., Asztemborska M. und Luczkiewicz M. (2001), Essential oil from herb and rhizome of *Peucedanum ostruthium* (L. Koch) ex DC, Z. Naturforsch. (C) **56**: 930-932.

da Silva V. B., Kawana D. F., Carvalhol I., da Conceicao E. C., de Freitas O. und da Silva C. H. T. P. (2009), Psoralen and bergapten: in silico metabolism and toxicophoric analysis of drugs used to treat vitiligo, J. Pharm. Pharm. Sci. **12**: 378-387.

Eeva M., Rauha J.-P., Vuorela P. und Vuorela H. (2004), Computer-assisted, high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of coumarins in *Peucedanum palustre* and *Angelica archangelica*, Phytochem. Anal. **15**: 167-174.

Flores H. E., Vivanco J. M. und Loyola-Vargas V. M. (1999), Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism, Trends Plant Sci **4**: 220-226.

Gamborg O. L., Miller R. A. und Ojima K. (1968), Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res. **50**: 148-151.

Garcia-Argaez A. N., Ramirez Apan T. O., Parra Delgado H., Velazquez G. und Martinez-Vazquez M. (2000), Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, Planta Med. **66**: 279-281.

Ge X. und Wu J. (2005), Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor, Plant Sci. **168**: 487-491.

Georgiev M. I., Pavlov A. I. und Bley T. (2007), Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances, Appl. Microbiol. Biotechnol. **74**: 1174-1185.

Gerlach S. (2007), Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich, Dissertation, Univ. Wien.

Giri A. und Narusu M. L. (2000), Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22.

Gössnitzer F. (2012), Hairy roots of *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch: Establishment and HPLC analysis, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P. K., Rideau M. und Gantet P. (2006), Hairy root research: recent scenario and exciting prospects, *Curr .Opin. Plant Biol.* **9**: 341-346.

Gutierrez M.-C., Parry A., Tena M., Jorin J. und Edwards R. (1995), Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower, *Phytochemistry* **38**: 1185-1191.

Hadacek F., Müller C., Werner A., Greger H. und Proksch P. (1994), Analysis, Isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae), *J. Chem. Ecol.* **20**: 2035-2054.

Hahn M. G. und Albersheim P. (1978), Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of elicitor from yeast extract, *Plant Physiol.* **62**: 107-111.

Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C., Robins R. J. und Walton N. J. (1987), New routes to plant secondary products, *Nat. Biotechnol.* **5**: 800-804.

Hiermann A. und Schantl D. (1998), Antiphlogistic and antipyretic activity of *Peucedanum ostruthium*, *Planta Med* **64**: 400-403.

Jaziri M., Shimomura K., Yoshimatsu K., Fauconnier M.-L., Marlier M. und Homes J. (1995), Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production, J. Plant Physiol. **145**: 175-177.

Jeong G., Park D., Ryu H., Lee W., Park K., Kang C., Hwang B. und Wo J. (2002), Optimum conditions for transformed *Panax ginseng* hairy roots in flask culture, Appl. Biochem. Biotechnol. **98-100**: 1129-1139.

Joa H., Vogl S., Atanasov A. G., Zehl M., Nakel T., Fakhrudin N., Heiss E. H., Picker P., Urban E., Wawrosch C., Saukel J., Reznicek G., Kopp B. und Dirsch V. M. (2011), Identification of ostruthin from *Peucedanum ostruthium* Rhizomes as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation, J. Nat. Prod. **74**: 1513-1516.

Koch W. D. J. (1824), Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum Exhibentia Ephemerides sive Observationes Historias et Experimenta, **12**: 95.

Li W., Asada Y. und Yoshikawa T. (2000), Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures, Phytochemistry **55**: 447-456.

Lu M. B., Wong H. L. und Teng W. L. (2001), Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*, Plant Cell Reports **20**: 674-677.

Luszczki J. J., Adres-Mach M., Glensk M. und Skalicka-Wozniak K. (2010), Anticonvulsant effects of four linear furanocoumerins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study, Pharmacol. Rep. **62**: 1231-1236.

McKenna K. E. (2004), Iatrogenic skin cancer: induction by psoralen/ultraviolet A and immunosuppression of organ transplant recipients, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. **20**: 289-296.

Murashige T. und Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant* **15**: 473-497.

Putalun W., Wluealon W., De-Eknamkul W., Tanaka H. und Shoyama Y. (2007), Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Biotechnol. Lett.* **29**: 1143-1146.

Rhee H. S., Cho H.-Y., Son S. Y., Yoon S.-Y. H. und Park J. M. (2010), Enhanced accumulation of decursin and decorsinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **101**: 295-302.

Santos P. M., Figueiredo A., Oliveira M. M., Barroso J. G., Pedro L. G., Deans S. G., Younus A. K. M. und Scheffer J. J. C. (1999), Morphological stability of *Pimpinella anisum* hairy root culture and time-course study of their essential oils, *Biotechnol. Lett.* **21**: 859-864.

Satdive R. K., Fulzele D. P. und Eapen S. (2007), Enhanced production of azadirachtin by hairy root culture of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization, *J. Biotechnol.* **128**: 281-289.

Schinkovitz A., Gibbons S., Stavri M., Cocksedge M. J. und Bucar F. (2003), Ostruthin: an antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*, *Planta Med.* **69**: 369-371.

Shanks J. V. und Morgan J. (1999), Plant 'hairy root' culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 151-155.

Shrivastava A. und Gupta V. (2011), Methods for the determination of limit of detection and limit of the quantitation of the analytical methods, *Chron. Young Sci.* **2**: 21-25.

Sivakumar G., Yu K. W., Hahn E. J. und Paek K. Y. (2005), Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors, *Cur. Sci.* **89**: 641-649.

Urbain A., Marston A. und Hostettmann K. (2005), Coumarins from *Peucedanum ostruthium* as inhibitors of acetylcholinesterase, *Pharm. Biol.* **43**: 647-650.

Vasconsuelo A. und Boland R. (2007), Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Plant Sci.* **172**: 861-875.

Veena V. und Taylor C. G. (2007), *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **43**.

Vogl S., Zehl M., Picker P., Urban E., Wawrosch C., Reznicek G., Saukel J. und Kopp B. (2011), Identification and quantification of coumarins in *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS, *J. Agric. Food Chem.* **59**: 4371-4377.

Waldbauer K. (2011), Erstellung der Monographien "Safran" und "Meisterwurz" für das österreichische Arzneibuch, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Wallaart T. E., Pras N. und Quax W. J. (1999), Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthetic precursor of artemisinin, *J. Nat. Prod.* **62**: 1160-1162.

Weathers P. J., Cheetham R. D., Follansbee E. und Teoh T. (1994), Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*, *Biotechnol. Lett.* **16**: 1281-1286.

Xu H., Park J. H., Kim Y. K., Park N. I., Lee S. Y. und Park S. U. (2009), Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai, *J. Med. Plants Res.* **3**: 978-981.

Yan Q., Shi M., Ng J. und Wu J. Y. (2006), Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, Plant Sci. **170**: 853-858.

Yu S., Kwok K. H. und Doran P. M. (1996), Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots, Enzyme Microb. Technol. **18**: 238-243.

Zhao J., Davis L. C. und Verpoorte R. (2005), Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, Biotechnol. Adv. **23**: 283-333.

Lebenslauf

Name: Judith Strauhs

Ausbildung

Volkschule: 1992 bis 1996, Grillparzer Volksschule,
St. Pölten

Gymnasium: 1996 bis 2004, BG/BRG Josefstraße,
St. Pölten

Studium: Studium der Pharmazie seit 2004, Universität
Wien

Praktisches Arbeiten für die Diplomarbeit am
Department für Pharmakognosie von März
2011 bis November 2011

Berufserfahrung:

01.07.2008 - 31.08.2008

Baxter AG Recombinant Cell Lines

01.07.2010 - 30.07.2010

Apotheke Süd in St. Pölten