

Bettina Schönell

Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*

Diplomarbeit

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 1996 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832400422

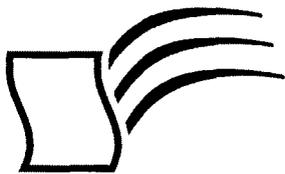
Bettina Schönell

**Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von
Linum album**

Bettina Schönell

Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album*

**Diplomarbeit
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
November 1996 Abgabe**



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

**Hermannstal 119 k
22119 Hamburg**

**agentur@diplom.de
www.diplom.de**

ID 42

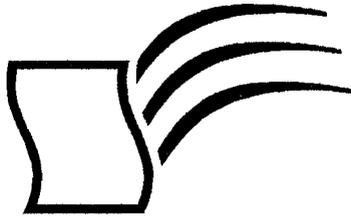
Schönell, Bettina: Enzyme der Coniferinbiosynthese in Zellkulturen von *Linum album* /
Bettina Schönell - Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 1997
Zugl.: Düsseldorf, Universität, Diplom, 1996

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR
Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg
Printed in Germany



Diplomarbeiten Agentur

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit

Ihr Team der *Diplomarbeiten Agentur*

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey —
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —

Hermannstal 119 k —
22119 Hamburg —

Fon: 040 / 655 99 20 —
Fax: 040 / 655 99 222 —

agentur@diplom.de —
www.diplom.de —

Ergebnisse dieser Arbeit wurden referiert:

Bettina Schönell, Sabine Kalenberg, Thomas Smollny, Maike Petersen, and A. Wilhelm Alfermann:

Biosynthesis of Cytotoxic Lignans in Suspension Cultures of *Linum album*

Botanikertagung Düsseldorf, 25. bis 31. August 1996

A. Henges, B. Schönell, M. Petersen, and A.W. Alfermann:

Formation of Cytotoxic Lignans in Cell Suspension Cultures of *Linum album*

Principals Regulating Biosynthesis and Storage of Secondary Products

The Phytochemical Society of Europe and the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle

September 26. - 28. 1996

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe	1
1.2 Pflanzliche Zellkulturen	3
1.3 Lignane	4
1.3.1 Allgemeines	4
1.3.2 Podophyllotoxin (Ptox)	5
1.4 <i>Linum album</i>	7
1.5 Biosynthese des Podophyllotoxins	9
1.6 Ausgewählte Enzyme des Biosyntheseweges	13
1.6.1 Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)	13
1.6.2 Zimtsäure 4-Hydroxylase (CAH)	13
1.6.3 Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase (4CL)	14
1.6.4 Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD)	15
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Pflanzenmaterial	17
2.2 Übersicht über den Aufbau dieser Arbeit	20
2.3 Herstellung der Enzymextrakte	21
2.3.1 Zimtalkohol Dehydrogenase und Phenylalanin Ammonium-Lyase	21
2.3.2 Zimtsäure 4-Hydroxylase	21
2.3.3 Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase	22
2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	22
2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten	23
2.5.1 Phenylalanin Ammonium-Lyase	23
2.5.2 Zimtsäure 4-Hydroxylase	24
2.5.3 Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase	24
2.5.4 Zimtalkohol Dehydrogenase (Rückreaktion)	26
2.5.5 Berechnung der Enzymaktivitäten	28
2.6 Versuch der Optimierung der Extraktionsbedingungen	29
2.7 Charakterisierung der Enzyme	29
2.7.1 Phenylalanin Ammonium-Lyase	29
2.7.1.1 Proteinabhängigkeit der PAL	29

2.7.1.2	pH-Optimum der PAL	30
2.7.1.3	Temperaturoptimum der PAL	30
2.7.2	Zimtsäure 4-Hydroxylase	30
2.7.2.1	Proteinabhängigkeit der CAH	30
2.7.2.2	pH-Optimum der CAH	30
2.7.2.3	Temperaturoptimum der CAH	30
2.7.2.4	Optimum der DTT-Konzentration für die CAH	31
2.7.3	Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase	31
2.7.3.1	Proteinabhängigkeit der 4CL	31
2.7.3.2	pH-Optimum der 4CL	31
2.7.3.3	Temperaturoptimum der 4CL	31
2.7.3.4	Optimum der DTT-Konzentration für die 4CL	31
2.7.4	Zimtalkohol Dehydrogenase	32
2.7.4.1	Proteinabhängigkeit der CAD	32
2.7.4.2	pH-Optimum der CAD	32
2.7.4.3	Temperaturoptimum der CAD	32
2.7.5	Bestimmung der K_m -Werte	32
2.7.5.1	Bestimmung der K_m -Werte für die Substrate der PAL	33
2.7.5.2	Bestimmung der K_m -Werte für die Substrate der CAH	33
2.7.5.3	Bestimmung der K_m -Werte für die Substrate der 4CL	33
2.7.5.4	Bestimmung der K_m -Werte für die Substrate der CAD	33
2.8	Extraktion der Lignane aus den Zellen	34
2.9	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	34
2.9.1	Nachweis des Reaktionsproduktes der CAH-Reaktion mittels HPLC	35
2.9.2	Nachweis von Podophyllotoxin, 5-Methoxypodophyllotoxin und Desoxypodophyllotoxin	36
2.9.3	Nachweis von Coniferaldehyd, Coniferylalkohol und Coniferin	36
2.10	Charakterisierung der Suspensionskultur von <i>Linum album</i> im Kulturverlauf	37
2.10.1	Wachstumsparameter	37
2.10.2	Mediumsparameter	38
2.10.3	Aktivitäten der Enzyme im Kulturverlauf	44

2.10.3.1 Vereinfachte Aufarbeitung für alle untersuchten Enzyme	44
2.10.3.2 Spezifische Aktivität der PAL im Kulturverlauf	44
2.10.3.3 Spezifische Aktivität der CAH im Kulturverlauf	44
2.10.3.4 Spezifische Aktivität der 4CL im Kulturverlauf	44
2.10.3.5 Spezifische Aktivität der CAD (Rückreaktion) im Kulturverlauf	45
2.11 Identifizierung der Reaktionsprodukte der enzymatisch katalysierten Reaktionen	46
2.11.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes der PAL	46
2.11.2 Identifizierung des Reaktionsproduktes der CAH	46
2.11.3 Identifizierung der Reaktionsprodukte der 4CL	46
2.11.4 Identifizierung der Reaktionsprodukte der CAD	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Identifizierung der Reaktionsprodukte der enzymatisch katalysierten Reaktionen	48
3.2 Charakterisierung der Enzyme	50
3.2.1 Charakterisierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase	50
3.2.1.1 Optimierung der Extraktionsbedingungen	50
3.2.1.2 Stabilität der PAL	50
3.2.1.3 Abhängigkeit der Aktivität der PAL von der Proteinkonzentration	50
3.2.1.4 pH-Optimum der PAL	51
3.2.1.5 Temperaturoptimum der PAL	51
3.2.1.6 Bestimmung des K_m -Wertes für Phenylalanin	53
3.2.2 Charakterisierung der Zimtsäure 4-Hydroxylase	55
3.2.2.1 Optimierung der Aufarbeitung	55
3.2.2.2 Stabilität der CAH	55
3.2.2.3 Abhängigkeit der CAH Aktivität von der Proteinkonzentration	55
3.2.2.4 pH-Optimum der CAH	56
3.2.2.5 Temperaturoptimum der CAH	56
3.2.2.6 Optimum der DTT-Konzentration im Reaktionsansatz	58
3.2.2.7 Bestimmung des K_m -Wertes für NADPH	58
3.2.2.8 Bestimmung des K_m -Wertes für Zimtsäure	60
3.2.3 Charakterisierung der Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase	63

3.2.3.1	Nachweis der enzymatischen Reaktion	63
3.2.3.2	Optimierung der Extraktionsbedingungen	63
3.2.3.3	Abhängigkeit der 4CL-Aktivität von der Proteinkonzentration	64
3.2.3.4	pH-Optimum der 4CL	64
3.2.3.5	Temperaturoptimum der 4CL	66
3.2.3.6	Optimum der DTT-Konzentration im Reaktionsansatz	66
3.2.3.7	Bestimmung des K_m -Wertes für <i>p</i> -Cumarsäure	67
3.2.3.8	Bestimmung des K_m -Wertes für Ferulasäure	69
3.2.3.9	Bestimmung des K_m -Wertes für Kaffeesäure	71
3.2.3.10	Bestimmung des K_m -Wertes für Coenzym A	73
3.2.3.11	Bestimmung des K_m -Wertes für ATP	75
3.2.4	Charakterisierung der Zimtalkohol Dehydrogenase (Rückreaktion)	77
3.2.4.1	Optimierung der Extraktionsbedingungen	78
3.2.4.2	Stabilität der CAD	78
3.2.4.3	Proteinabhängigkeit der CAD	78
3.2.4.4	pH-Optimum der CAD	78
3.2.4.5	Temperaturoptimum der CAD	79
3.2.4.6	Bestimmung des K_m -Wertes für NADP [⊕]	81
3.2.4.7	Bestimmung des K_m -Wertes für Coniferylalkohol	83
3.2.4.8	Bestimmung des K_m -Wertes für Sinapylalkohol	85
3.3	Charakterisierung der Suspensionskultur von <i>Linum album</i> im Kulturverlauf	88
3.3.1	Wachstumsparameter	88
3.3.2	Mediumsparameter	89
3.3.3	Enzymaktivitäten	94
3.3.3.1	Proteingehalt der <i>Linum album</i> -Zellen	94
3.3.3.2	Spezifische Aktivität der PAL im Kulturverlauf	95
3.3.3.3	Spezifische Aktivität der CAH im Kulturverlauf	95
3.3.3.4	Spezifische Aktivität der 4CL im Kulturverlauf	96
3.3.3.5	Spezifische Aktivität der CAD (Rückreaktion) im Kulturverlauf	97
3.3.4	Lignangehalt der Zellen	98
3.3.5	Gehalte an Coniferaldehyd, Coniferylalkohol und Coniferin	99

4 Diskussion	102
4.1 Charakterisierung der Enzyme	102
4.1.1 Charakterisierung der Phenylalanin Ammonium-Lyase	102
4.1.2 Charakterisierung der Zimtsäure 4-Hydroxylase	104
4.1.3 Charakterisierung der Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase	105
4.1.4 Charakterisierung der Zimtalkohol Dehydrogenase (Rückreaktion)	111
4.2 Charakterisierung der Suspensionskultur von <i>Linum album</i> im Kulturverlauf	115
5 Zusammenfassung	124
6 Literaturverzeichnis	127
7 Anhang	137
7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	137
7.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	138
7.3 Geräte	141

1 EINLEITUNG

1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe

Als Sekundärstoffe werden Verbindungen bezeichnet, die im Primärstoffwechsel der Pflanze offensichtlich keine entscheidende Rolle spielen (RICHTER, 1988). Sie sind jedoch für das Überleben einer Pflanze in ihrer natürlichen Umwelt von besonderer Bedeutung. Sekundärstoffe ermöglichen der Pflanze, sich an ihrem Standort zu behaupten und dienen somit der Arterhaltung. Zum Teil sind bestimmte Verbindungen auf einzelne systematische Pflanzengruppen beschränkt, so daß Sekundärstoffe als Merkmal für die Klassifikation von Familien, Ordnungen und Überordnungen herangezogen werden können (RIMPLER, 1990). Weit mehr als 20.000 dieser Sekundärstoffe sind uns bekannt (MENKE, 1990). Einige Sekundärstoffe scheinen Endprodukte von Biosynthesewegen oder Exkretionsprodukte zu sein. Die Eliminierung dieser Stoffe kann bei Pflanzen, abgesehen vom Laubfall, auch durch Überführung der oftmals lipophilen Toxine in ihre wasserlöslichen Glykoside erfolgen, die in der Zentralvakuole gespeichert werden (TEUSCHER, 1984; MENKE, 1990).

Die Funktionen der Sekundärstoffe liegen in der Anpassung an extreme Standortbedingungen, der Infektionsabwehr, der Beeinträchtigung von Konkurrenten (Allelopathie), der Abschreckung von Fraßfeinden und der Anlockung von bestäubenden Organismen oder Symbionten. Einige Sekundärstoffe haben gleich mehrere Aufgaben, wie dies am Beispiel eines Flavonoides deutlich wird. Hierbei handelt es sich sowohl um einen Farbstoff als auch um eine Substanz, die eine Funktion bei der Ausbildung von Symbiosen innehat. Gegenüber dieser Divergenz zeigt sich Konvergenz beispielsweise bei Farbstoffen, wie Flavonoiden, Carotinoiden und Betalainen, die trotz unterschiedlicher Struktur allesamt auch der Insektenanlockung dienen (TEUSCHER, 1984).

Die Abschreckung von Fraßfeinden und die Anlockung von bestäubenden Organismen sind eng miteinander verknüpft. Aufgrund fehlender Mobilität sind Pflanzen ihren Schädlingen wie Insekten und Säugetieren jederzeit ausgeliefert, jedoch ist der Kontakt mit Insekten als Bestäubern zumindest bei zoophilen Pflanzen notwendig. Wichtige pflanzliche Insektizide sind das Nikotin aus *Nicotiana*-Arten, Alkaloide aus den Samen des Weißen Germers, die halluzinogen wirkende Aminosäure Ibotensäure aus Fliegenpilzen und Pyrethrine aus Margeritenarten, wie zum Beispiel aus *Chrysanthemum cinerariifol-*

lium. Abwehrfunktion haben einige Glykoside, wie z.B. die Schwefelverbindungen der Zwiebel und die cyanogenen Glykoside. Bei einer Gewebeerletzung überführen cytoplasmatische Glucosidasen diese in leichtflüchtige Verbindungen, die von nachteiliger Wirkung auf den Angreifer sein können. Viele Pflanzen, insbesondere Farne und Nadelhölzer, enthalten Steroide mit Hormoncharakter, die sich auf den Hormonhaushalt der Fraßfeinde auswirken können. So synthetisieren einige Pflanzen Substanzen, die im Aufbau Ecdyson und dem Juvenilhormon ähneln und somit in Wachstums- und Metamorphose-Prozesse der Insekten eingreifen (MENKE, 1990). Durch spezifische Anpassungen sind einige Insekten jedoch in der Lage, von Pflanzen gebildete Toxine zu ihrem Vorteil zu nutzen. So können die Larven des Monarch-Schmetterlings (*Danaus plexipus*) Herzglykoside speichern, die sie durch Verzehr ihrer Futterpflanze der Gattung *Asclepias* aufgenommen haben. Dies macht sie, aber auch die adulten Schmetterlinge, für ihre Fraßfeinde ungenießbar (HARBORNE, 1978). Als Lockstoffe für Insekten können visuelle Reize aber auch Duftstoffe zum Tragen kommen. Allelopathische Effekte auf Konkurrenten dürften erstmals beim Walnußbaum (*Juglans regia*) beobachtet worden sein. Der spärliche Unterwuchs unter Walnußbäumen, der auf Freisetzung von Juglon zurückzuführen ist, wurde bereits zur Römerzeit durch Plinius beschrieben (MENKE, 1990). Zum Schutz vor Infektionen kommen entweder konstitutiv synthetisierte Stoffe zum Tragen oder solche, die erst bei einer akuten Infektion produziert werden wie z.B. Phytoalexine bei einem Pilz- oder mikrobiellen Befall. Bei der Anpassung an Extremstandorte spielen Sekundärstoffe eine herausragende Rolle. So wirken Prolin und Glycinbetain bei der Salz- und Kälteadaptation mit, während metallbindende Peptide oder Proteine (Phytochelatine) bestimmten Pflanzen zu einer Schwermetalltoleranz verhelfen (HARBORNE, 1982; SCHLEE, 1986). Sekundärstoffe haben aber auch Einfluß auf den Menschen. Neben stimulierenden Sekundärstoffen wie Koffein, Theophyllin, Theobromin und Nikotin, die im Kaffee, Tee, Kakao oder Tabak vorkommen, gibt es auch medizinisch genutzte, wie beispielsweise Morphin, Kodein und Herzglykoside. Der Einsatz der Sekundärstoffe erfolgt zudem in der Kosmetik- und Parfümbranche. Aber auch Menschen und Tiere werden täglich mit diversen Sekundärstoffen konfrontiert. Die Zufuhr von Geschmacks-, Geruchs- und auch Farbstoffen durch die Nahrung beeinflusst Vorlieben oder Abneigungen gegenüber bestimmten Nahrungsmitteln.

1.2 Pflanzliche Zellkulturen

Pflanzliche Sekundärstoffe sind, wie oben beschrieben, in vielerlei Hinsicht von großer Bedeutung für den Menschen. Aus diesem Grund werden zur Gewinnung pflanzlicher Sekundärstoffe vielfach Pflanzen angebaut oder ihren natürlichen Beständen entnommen. Dieses Sammeln von Pflanzen ist mit Problemen behaftet, da zum einen die Qualität des Materials durch sich ändernde Umweltbedingungen nicht gleichbleibend ist, und zum anderen die Gefahr der Ausrottung einer Pflanze gegeben ist. Die chemische Synthese ist, falls überhaupt möglich, meist nicht wirtschaftlich, da die Struktur der Sekundärstoffe oftmals von äußerster Komplexität ist. Die Zellkulturtechnik bietet die Möglichkeit, pflanzliches Zellmaterial ohne Einfluß von Jahreszeiten, Klima und Pflanzenkrankheiten zu kultivieren. Dabei können sowohl undifferenzierte Zellen als Suspensions- und Kalluskulturen, als auch differenzierte Gewebe wie Sprosse und Wurzeln kultiviert werden. Sekundärstoffe können aus Zellkulturen bereits nach einer ein- bis zweiwöchigen Kulturperiode gewonnen werden, während die Pflanze zuvor meist mehrere Monate zum Wachstum benötigt (ZENK, 1991). Die Produktivität der Zellkulturen kann sehr unterschiedlich sein. Einige Zellkulturen synthetisieren bestimmte Sekundärstoffe in großer Menge und zum Teil über das Maß der intakten Pflanze hinaus, während andere nur wenig oder keine Synthese bzw. Akkumulation dieser Stoffe vollziehen. Zum Teil werden aber auch Sekundärstoffe gebildet, die in der intakten Pflanze nicht zu finden sind (BERLIN et al., 1986). Oftmals ist es so, daß die Bildung bestimmter Sekundärstoffe an differenzierte Strukturen wie Blätter oder Wurzeln gebunden ist. Ein Beispiel ist das Chinin in der Rinde von *Cinchona*-Arten. Desweiteren bestehen Probleme bezüglich der oftmals geringen Stabilität bestimmter Zellkulturen. So kann die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Substanzen mit der Zeit verloren gehen (SEITZ et al., 1985).

Trotz der bekannten Nachteile existieren bereits vielfältige Anwendungsgebiete der Zellkulturtechnik bei Pflanzen. Im industriellen Maßstab findet bereits die Synthese von Shikonin in Japan statt, das sowohl als Farbstoff für Seide und in Kosmetik als auch als Antibiotikum Verwendung findet. Shikonin wird aus Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) gewonnen (TABATA et al., 1974; TABATA und FUJITA, 1985). Abschließend sei noch erwähnt, daß die Zellkulturtechnik beträchtliche Vorteile für die Aufklärung der Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe bietet, insbesondere, wenn die Sekundärstoffproduktion die Akkumulation in intakten Pflanzen übersteigt (ZENK, 1991).