



Martina Maier; Katerina Prohaska; Birgit Herbinger; Justyna Rechthaler

# Herausforderungen bei der Produktion von Referenzsubstanzen zur Analyse von Schimmelpilzmetaboliten in Früchten mittels hochauflösender Massenspektrometrie

108 - Biotechnologie

## Abstract

---

## Keywords:

Botrytis cinerea, Sekundärmetaboliten, Kultivierung, LC-HRMS, Referenzstandardherstellung

## Einleitung

In der Produktion von Erdbeeren gilt *Botrytis cinerea* als einer der wichtigsten pflanzenpathogenen Pilze. Im Weinbau ist die Gattung *Botrytis* eine von sieben Pilzgattungen, die am häufigsten an Trauben identifiziert werden. Wirtschaftliche Schäden entstehen nicht nur durch reduzierte Erntemengen und verringerten Weinertrag, sondern auch durch eine negative Beeinflussung der Qualität des Erntegutes, z.B. durch Beeinträchtigung des Zuckergehaltes, organischer Säuren, Aromakomponenten, phenolischer Substanzen und durch Erzeugung von nicht erwünschten Fehltonen im Wein. Das Botrytis-Metabolitenspektrum ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, vor allem Studien über Erdbeeren, Weintrauben oder prozessierte Lebensmittel, wie z.B. Erdbeermarmeladen oder Weine aus den österreichischen Anbaugebieten, fehlen in diesem Zusammenhang. Die Analyse der prozessierten Lebensmittel hat vermutlich keine toxikologische Relevanz für den Endverbraucher, jedoch ist sie von erheblichem Interesse, um die Verwendung minderqualitativer Rohprodukte oder Produktfälschungen aufzuzeigen.

Grundsätzlich steht die Analytik in dem Bereich vor folgenden zentralen Herausforderungen: Für den unumgänglichen Einsatz hochauflösender Massenspektrometer in Kombination mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (LC-HRMS) werden hochreine und stabile Referenzsubstanzen zur Quantifizierung benötigt, die in diesem Fall weltweit nicht erhältlich sind, und die Konzentrationen der Metaboliten in den extrahierten Proben sind in vielen Fällen zu gering, um messtechnisch erfasst zu werden.

An der Austrian Biotech University of Applied Sciences (Fachhochschule Wr. Neustadt GmbH am Campus Tulln) wurde im Rahmen eines EFRE-Projektes (Europäische Fonds für regionale Entwicklung) die Gewinnung derartiger Referenzsubstanzen erforscht. Im vorliegenden Abstract werden die Forschungsergebnisse (Kultivierung, Reinigungsstrategie und Produktanalyse) im Zuge der Produktion eines Schimmelpilzmetaboliten als Referenzsubstanz für die genannten LC-HRMS Analysen der Früchte zusammenfassend dargestellt.

Zu Beginn wurden Vorversuche zur Isolierung von *Botrytis cinerea* aus Weintrauben durchgeführt, damit der Schimmelpilz in Reinkultur für die Produktion von zwei phytotoxischen Hauptmetaboliten, Botrydial und Dihydrobotrydial, zur Verfügung steht. Dabei hat sich herausgestellt, dass es kaum möglich ist, aus einer undefinierten Mischpopulation von Mikroorganismen, die von Freilandtrauben stammt, Reinkulturen zu isolieren, die eindeutig der Spezies *Botrytis cinerea* (anamorphe Form) bzw. *Botryotinia fuckeliana* (teleomorphe Form) zugeordnet werden können.

Deshalb wurden zwei Stämme zur Produktion der Metaboliten gekauft: *Botrytis cinerea* DSM877 von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) und *Botryotinia fuckeliana* CECT2996 von der CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), da dieser Stamm gemäß der Angaben der CECT die Metaboliten Botrydial und Dihydrobotrydial bilden kann. (Collado *et al.* 1995)

Mit dem Ziel, ideale Kultivierungsparameter für die Bildung von Botrydial und Dihydrobotrydial durch die genannten Stämme zu ermitteln, wurden zahlreiche Kultivierungsversuche mit dem Fokus auf Substrat, Lichteinfluss und Inkubationsdauer durchgeführt (Crous *et al.* 2009). Die Inkubationstemperatur wurde aufgrund der Voruntersuchungen bei 22 °C festgelegt. Die Kultivierung beider Stämme wurde sowohl in flüssigem Medium (pasteurisierter Traubensaft) in Form von Schüttelkulturen als auch direkt auf Trauben (kernlose Tafeltrauben aus regionalen Supermärkten) durchgeführt. Alle Ansätze wurden massenspektrometrisch auf das mögliche Vorhandensein der Hauptmetaboliten getestet und es stellte sich heraus, dass nur die Kultivierungen auf Trauben als Substrat erfolgreich bei der Metabolitenbildung waren. Da es sich bei Botrydial und Dihydrobotrydial um Sekundärmetaboliten handelt, ist es möglich, dass sie erst dann in größeren Mengen gebildet werden, wenn der Schimmelpilz aufgrund eines äußeren Anlasses Vorteile davon hat (Achleitner 2008, Farooq *et al.* 2002). Im vorliegenden Fall könnte die Haut der Trauben so ein Anlass sein, weil sie vom Schimmelpilz überwunden werden muss, um zu den Inhaltsstoffen der Trauben zu gelangen. Bei der Kultivierung der beiden Stämme auf Tafeltrauben zeigte sich zudem in mehreren Ansätzen, dass die asexuelle Form des Pilzes *B. cinerea* auf den Trauben kaum wachsen kann. Die teleomorphe Form *B. fuckeliana* zeigte hingegen ein sehr gutes Wachstum. Die massenspektrometrischen Messungen (die Ermittlung exakter Massen) zeigten, dass die Kultivierung von *B. fuckeliana* auf dem natürlichen Substrat Tafeltrauben zur Produktion von Botrydial und Dihydrobotrydial geeignet sein kann.

Für die Gewinnung von Reinsubstanzen wurde nach der jeweiligen Kultivierung eine Flüssig/Flüssig-Extraktion durchgeführt. Die so genannten Roh-Extrakte wurden anschließend auf das Vorhandensein der beiden Metaboliten mittels hochauflösender Orbitrap-Massenspektrometrie (direkte Infusion in die Elektrospray-Ionenquelle) geprüft, indem die jeweilige Ionenintensität, vorzugsweise im negativen Ionenmodus, ermittelt wurde. Diejenigen Roh-Extrakte, die zu den vergleichsweise höchsten Ionenausbeuten von Botrydial und Dihydrobotrydial geführt haben, wurden anschließend mittels semipräparativer HPLC fraktioniert, um vorgereinigte Lösungen von Botrydial und Dihydrobotrydial zu erhalten. Zur Überprüfung, in welcher HPLC-Fraktion sich die genannten Substanzen befinden, wurden die Fraktionen ebenfalls mittels hochauflösender Orbitrap-Massenspektrometrie vermessen. Die Fraktionen mit signifikant höheren Intensitäten von Botrydial und Dihydrobotrydial im Vergleich zum Lösungsmittel-Blank wurden gesammelt und vereinigt.

Zwecks Charakterisierung der gesammelten Hauptfraktionen aus der semipräparativen HPLC hinsichtlich Anwesenheit von Botrydial und Dihydrobotrydial bzw. anderer möglichen Metaboliten wurde eine NMR Analyse des Materials durchgeführt. Hierfür wurden ca. 8 mg nahezu trockener Probe aus 70 mL der gepoolten HPLC-Hauptfraktionen unter schonenden Eindampfbedingungen ( $N_2$ -Atmosphäre) generiert. Das gewonnene Material wurde zur NMR-Untersuchung in ein zertifiziertes Labor (Bundesanstalt für Materialforschung und – prüfung in Berlin) eingeschickt. Es wurde ein  $^1H$  und ein  $^{13}C$  Spektrum gemessen, eine zweidimensionale  $H,H$ -COSY NMR sowie eine  $H,C$  HSQC Auswertung und ein HMBC Plot erstellt. Anhand dieser Daten konnte eine Struktur der Substanz AcTHBO zugeordnet werden (3-Acetoxy-8, 9, 11-trihydroxy-probotrydial, Summenformel  $C_{17}H_{28}O_5$ , Abbildung 1). Dieser Metabolit wurde auch bei Durán-Patrón *et al.* 2003 und Reino *et al.* 2003 beschrieben. Die Signale des publizierten  $^{13}C$ -NMR Spektrums entsprechen den im Bericht angeführten Daten, die auch die von Collado *et al.* 2007 publizierten Daten widerspiegeln. Die Summenformel und die Masse von AcTHBO entsprechen exakt der Summenformel und der Masse von Dihydrobotrydial (DHBO), der ursprünglich angenommenen Substanz (Abbildung 2). AcTHBO ist für die befallene Pflanze weniger toxisch als DHBO und dient dem Pilz zur Aufrechterhaltung der Intoxikation bei gleichzeitiger Lebenserhaltung für den Pilz. Die so gewonnene Substanz AcTHBO kann nun als Referenzsubstanz in der LC-HRMS Analytik eingesetzt werden.

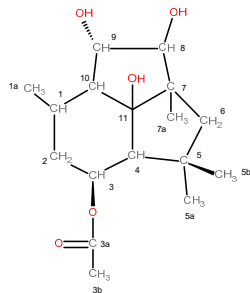


Abbildung 1. Die gewonnene Referenzsubstanz 3-Acetoxy-8, 9, 11-trihydroxy-probotrydial (AcTHBO).

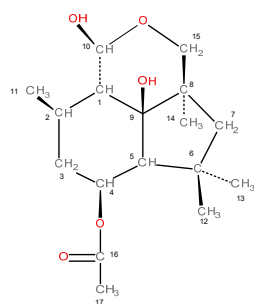


Abbildung 2. Die erwartete Referenzsubstanz Dihydrobotrydial (DHBO).

Im Laufe der Kultivierung von *B. fuckeliana* auf Tafeltrauben als Wachstums substrat für die Produktion von AcTHBO Referenzstandard zeigte sich jedoch ein Hauptnachteil: Bei den einzelnen Chargen der Trauben wurden große Unterschiede hinsichtlich der natürlich vorkommenden Mikroflora beobachtet. Diese Mikroflora (inkl. Sporen von Schimmelpilzen) ließ sich bei der Vorbereitung der Trauben für die Kultivierungsansätze nicht immer vollständig eliminieren, da bei der Vorbehandlung der Trauben

(Entkeimung) möglichst schonend vorgegangen werden muss, um die Beeren bzw. die Beerenhaut möglichst nicht zu verändern bzw. zu beschädigen. So kam es bei einzelnen Kultivierungsansätzen zur Kontamination und im Weiteren zum Co-Wachstum eines Schimmelpilzes, der sich von den *Botrytis* Kulturen durch seinen deutlich erkennbaren grünen Pilzrasen (vermutlich *Penicillium spec.*, Walter 2008) unterschied. Diese Ansätze konnten nicht weiter für die Gewinnung und Analysen des Metaboliten verwendet werden.

Deshalb musste die weitere Produktion der Referenzsubstanz auf Tafeltrauben-Substrat eingestellt werden. Voraussetzungen für ein passendes Substrat sind, dass es in möglichst konstanter Qualität verfügbar ist, dass eine natürliche Mikroflora vollständig entfernt werden kann, dass die Stämme *B. fuckeliana* CECT2996 bzw. *B. cinerea* DSM877 gut auf diesem Substrat wachsen und die gewünschten Metaboliten Botrydial und Dihydrobotrydial bzw. AcTHBO in ausreichender Menge gebildet werden. Analog zu diesen Anforderungen wurde Reis als Substrat für beide Pilzstämme ausgewählt, da laut Literatur (Freitas 2011) bei manchen Schimmelpilzen die Bildung von bestimmten Stoffwechselprodukten bei der Kultivierung auf Reis stark ausgeprägt ist. Es wurde Langkornreis verwendet, der nach dem Quellen in Wasser autoklaviert wurde. Durch diese Behandlung des Reises stand ein steriles, mikroflorafreies Substrat zur Verfügung. Bei der Kultivierung unter Lichtausschluss bei 22 °C in insgesamt 19 Ansätzen à 100 g Reis zeigte sich, dass sowohl *B. fuckeliana* CECT2996 als auch *B. cinerea* DSM877 gut auf dem steril vorbehandelten Reis wachsen kann. Die massenspektrometrischen Analysen ergaben, dass die Ionenintensitäten der gemessenen Signale den exakten Massen von Botrydial und Dihydrobotrydial bzw. AcTHBO entsprechen, und bei den Ansätzen mit *B. fuckeliana* generell höher sind, als bei den Ansätzen mit *B. cinerea*. Die ersten Versuche wurden unternommen, die aus den Kultivierungsansätzen von *B. fuckeliana* auf der Reismatrix gewonnenen semipräparativen HPLC-Fractionen bis zur Trockene einzuengen, um ein einwiegbares Produkt der gewünschten Metaboliten zu erhalten. Die Reismatrix führte jedoch im Zuge des Eindampfens zu einer viskosen Flüssigkeit, weil sie naturgemäß wesentlich komplexer als die Traubenmatrix ist. Im Umgang mit der Reismatrix werden daher künftig zusätzliche Probenvorbereitungsschritte für die Referenzstandardgewinnung erforderlich sein. Die selektive Isolierung eines hochreinen Produktes aus der Kultivierung von *B. fuckeliana* auf Reis ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

## Literaturverzeichnis

Achleitner D. (2008): Untersuchungen zur latenten Infektion von Weintrauben durch *Botrytis cinerea*. Wien: Institut für Pflanzenschutz der Universität für Bodenkultur, Dissertation.

Collado, I. G./Hernández-Galán, R./Durán-Patrón, R./Cantorol, J. M. (1995): Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. In: Phytochemistry 38, 647–650.

Collado, I. G./Sánchez, A. J. M./Hanson, J. R. (2007): Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In: Nat. Prod. Rep. 24, 674–686.

Crous, P. W./Verkely, G. J. M./Groenewald, J. Z./Samson, R. A. (2009): Fungal Biodiversity. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Durán-Patrón, R./Collado, I. G./Colmenares, A. J./Montes, A./Hanson, J. R./Hernández-Galán, R. (2003): Studies on the biosynthesis of secobotryane skeleton. In: Tetrahedron 59, 6267 – 6271.

Farooq, A./Tahara, S./Choudhary, M. I./Atta-ur-Rahman/Ahmed, Z./Hüsni, C. B./Demirci, F. (2002): Biotransformation of (-)- $\alpha$ -Pinene by *Botrytis cinerea*. In: Z. Naturforsch. C. 57, 303 – 306.

Freitas, R. C. M. (2011): Bioaktive Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen - Isolierung, Strukturaufklärung und Charakterisierung der biologischen Aktivität. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität, Dissertation.

Reino, J. L./Durán-Patrón, R./Segura, I./Hernández-Galán, R./Riese, H. H./Collado, I. G. (2003): Chemical Transformations on Botryane Skeleton. Effect on the Cytotoxic Activity. In: J. Nat. Prod. 66, 344 – 349.

Walter, R. (2008): Untersuchungen zur Grünfäule (*Penicillium spec.*) an Weintrauben. Stuttgart: Universität Hohenheim, Dissertation.