

## Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao

### VII. Verhalten isolierter Lipidkörper aus Keimblättern in Suspension

GERHARD RÜHL, BÖLE BIEHL und MANFRED DAMBROTH

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

#### Einleitung

Die primären Ursachen des Keimfähigkeitsverlustes von Kakaosamen infolge Trocknung und Kühlung sind weiterhin ungeklärt. Bisherige Arbeiten konnten bereits die Existenz kritischer Grenzwerte bzgl. der Temperatur sowie der Samenhydratation mit Werten von 10 - 12 °C bzw. 17 - 19 % nachweisen (Rühl et al. 1988, 1989a).

Durch Exsudationsexperimente sowie die Betrachtung der Ultrastruktur der Samenorgane von Kakaosamen im Verlaufe der Kühlung und Dehydratation konnte gezeigt werden, daß die Keimblätter den primären Ort einer Schädigung infolge dieser Behandlungsarten darstellen (Rühl et al. 1988, 1989b). Kühlung sowie Entwässerung der Samen führte in diesen Kotyledonen zu einer irreversiblen Veränderung der subzellulären Struktur der Speicherparenchymzellen.

Dabei scheint der Fusion der Lipidkörper in diesen Speicherparenchymzellen eine entscheidende Rolle beim Keimfähigkeitsverlust von Kakaosamen beigemessen werden zu müssen (Rühl und Biehl 1989).

Zur Erhärtung dieses Befundes wurden die Lipidkörper aus den Zellen dieses Gewebes isoliert und ihre Stabilität in Suspension im Vergleich zu orthodoxen Erdnußsamen untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsanstellung werden in dieser Arbeit präsentiert.

#### 1 Material und Methoden

##### 1.1 Samenmaterial

Reife sowie vorreife Kakaofrüchte wurden vom Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza (CATIE) in Turrialba, Costa Rica, bezogen.

Fast alle Experimente mit Kakaosamen wurden an Früchten des Klons UF 613 durchgeführt. Für einige Untersuchungen wurden Früchte bekannten Entwicklungsalters (Handbestäubung) verwendet.

Die Kakaofrüchte wurden sofort nach der Ernte per Luftfracht versandt und konnten so 4 - 7 Tage nach der Ernte verarbeitet werden.

Frische Erdnußsamen (Sorte V 13) für Vergleichszwecke wurden vom Malaysian Agricultural Research and Development Institute (Mardi), Serdang, Malaysia, zur Verfügung gestellt.

##### 1.2 Keimung

Die Samen von *Theobroma cacao* wurden nach dem Entfernen aus den Früchten von der anhaftenden Pulpa sowie der Testa befreit und auf angefeuchtem Filterpapier in Petrischalen bei 30 °C zum Keimen ausgelegt.

Ein Kakaosame galt als keimfähig, wenn er nach einem normalen Keimwurzelwachstum beim Aufbrechen der Keimblätter nach ca. 7 - 14 Tagen eine gesunde Sproßachse zeigte.

##### 1.3 Kühlung

Die Kühlung erfolgte durch Einbringen der Samen in eine auf eine definierte Temperatur vorgekühlte, annähernd mit den Samen isotonische wäßrige PEG 4000-Lösung, um möglichst schnell unter Ausschluß von Einquellvorgängen die gewünschte Temperatur zu erreichen. Auch hierfür wurden die Samen vor der Behandlung aller sie umgebenden Hüllstrukturen (Fruchtwand, Samenschale) entledigt.

##### 1.4 Ermittlung der Samenhydratation

Zu diesem Zwecke wurden die Samen bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank auf 110 °C erhitzt. Generell trat nach 24 Stunden bei dieser Temperatur kein weiterer Gewichtsverlust ein. Der Wassergehalt ist, wenn nicht anders vermerkt, auf Frischgewichtsbasis (%H<sub>2</sub>O/Frischgewicht) angegeben.

##### 1.5 Lipidkörperisolierung

Verwendet wurden frische, ungekeimte Samen nach Entfernung der Samenschale und Keimachse. Es wurden folgende Methoden verglichen:

a) 4 - 5 Kotyledonenpaare (ca. 9 g) wurden in Anlehnung an Passern (1979) unter stetiger Begasung mit nachgereinigtem Stickstoff in 20 ml Isolationsmedium mit einem Braun-Messerhomogenisator 2 x 15 Sekunden bei Zimmertemperatur homogenisiert. Das hypertonische Isolationsmedium hatte folgende Zusammensetzung: 0,45 M/l Saccharose, 0,32 mM/l EDTA (Natriumsalz), 10 mM/l Natriumascorbat, 10 mM/l Tricin, 6,83 mM/l Thioglycolsäure und 1 % (g/v) Polyvinylpyrrolidon gelöst in Aqua dest. und eingestellt auf pH 7,2 mit 0,1 N NaOH. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert und die an der Oberfläche abgelagerte Fettschicht in frischem Isolationsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit Lösungen überschichtet, die sich nur hinsichtlich ihres Saccharosegehaltes (0,25 M/l; 0,125 M/l) vom Isolationsmedium unterscheiden. Nach erneuter Zentrifugation (30 min 30000 x g) wurde dieser Reinigungsschritt wiederholt.

b) wie a, jedoch fehlte dem Isolationsmedium Polyvinylpyrrolidon.

c) 4 - 5 Kotyledonenpaare ( ca. 9 g ) wurden in 20 ml einer 0,5 M NaCl-Lösung ( in 50 mM Tris-HCl-Puffer + 6,83 mM Thioglycolsäure, pH 7,2 ) eine Minute lang mit einem Braun-Messerhomogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde durch vier Lagen Baumwolltuch filtriert und bei Zimmertemperatur 30 Minuten lang mit 30000 x g zentrifugiert. Die cremige Fettschicht des oberen Teils des Zentrifugenbechers wurde mit einem Spatel entfernt und in frischem Homogenisationsmedium resuspendiert vor erneuter Zentrifugation bei 30000 x g für die Zeitspanne von 30 Minuten. Die Rehomogenisation und folgende Zentrifugation wurde 2 weitere Male wiederholt. Das so erhaltene Fett stellte die gewaschene Lipidkörperfraktion dar.

d) 4 - 5 Kotyledonenpaare ( ca. 9 g ) wurden in 15 ml Medium ( 0,5 M Saccharose, 0,07 M TRIS, 0,004 M EDTA, 6,83 mM Thioglycolsäure, pH 7,3 ) eine Minute lang im Braun-Messerhomogenisator homogenisiert und das Homogenat durch vier Lagen Baumwolltuch filtriert. Das Filtrat wurde anschließend einer 15-minütigen Zentrifugation bei 20000 x g unterworfen, die Fettschicht vom oberen Teil des Zentrifugenbechers mit einem Spatel entfernt und im Verhältnis 1:20 in 0,5 M Saccharoselösung resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation ( 20 Minuten bei 28000 x g ) und die diesmal erhaltene Fettschicht wurde nach dem Resuspendieren in 0,5 M Saccharoselösung ( 1:5 ) als Lipidkörperfraktion bezeichnet.

e,f) Diese Aufarbeitungsgänge entsprachen c und d, nur wurde dem jeweiligen Medium 1 % ( g/v ) Polyvinylpolypyrrolidon zugefügt.

g) Maximal 1 mm dicke Scheiben von Kakao- bzw. Erdnußkotyledonen wurden in schmelzendem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Anschließend wurde das Gefrierpulver im Isolationsmedium ( s. a ) oder 0,45 M Saccharoselösung 10 Minuten lang bei 2 °C inkubiert und durch vier Lagen Baumwolltuch filtriert. Das Filtrat wurde einer Zentrifugation ( 30 min 30000 x g ) unterworfen und die Fettschicht im Isolationsmedium bzw. in 0,45 M Saccharoselösung resuspendiert. Nach Übersichtung dieser Probe mit Isolationsmedium geringeren Saccharosegehaltes ( 0,25 M und 0,125 M ) bzw. reiner Saccharoselösung der gleichen Konzentration wurde erneut zentrifugiert ( 30 min 30000 x g ). Diese Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde ein zweites Mal wiederholt. Lipidkörper aus Kakaokotyledonen mußten anschließend noch 10 Minuten bei 38 °C zwecks Verflüssigung inkubiert werden.

h) In diesem Falle wurde wie unter g) verfahren mit der Ausnahme, daß das Gefrierpulver zusätzlich einer Gefrier-trocknung ( Temperatur-Gefrietrocknungsanlage GT 1 der Fa. Leybold-Heraeus GmbH & Co. ) vor der anschließenden Inkubation unterworfen wurde.

## 1.6 Mikroskopie der isolierten Lipidkörper

Isolierte Lipidkörper aus Kakao- und Erdnußsamen wurden direkt im wäßrigen Medium lichtmikroskopisch beurteilt.

## 2 Ergebnisse

Da die Fusion der Lipidkörper in den Kotyledonen von Kakaosamen exakt mit dem Zeitpunkt des Verlustes der

Keimfähigkeit dieser Samen infolge Trocknung und Kühlung zusammenfällt ( R ü h l et al. 1989 b, R ü h l und B i e h l 1989 ), erschien es sehr interessant, das Verhalten dieser Kompartimente nach Isolierung aus den Kotyledonarzellen mit demjenigen isolierter Erdnußlipidkörper in Suspension zu vergleichen.

Dabei galt das Hauptinteresse der Untersuchung, ob die in vivo ablaufende Fusion der Lipidkörper aus Kakaosamen im isolierten Zustand reproduzierbar ist und ob sie durch bestimmte Zusätze oder Behandlungen in Suspension induziert bzw. verhindert werden kann.

Die angesprochenen Behandlungen schließen den pH-Wert, die Elektrolytkonzentration, Kühlung sowie Erwärmung ein, als Zusätze zu Kakaolipidkörpersuspensionen wurden PVP, RSA, Lecithin und entfettetes Erdnußhomogenat eingesetzt.

Es werden zunächst die eingangs genannten Isolierungsmethoden auf ihre Eignung für die Lipidkörperisolierung hin geprüft.

### 2.1 Lipidkörper aus Kakaokotyledonen

Für diese Experimente wurden ausschließlich reife Kakaosamen mit einem Wassergehalt von 32 - 39 % eingesetzt. Vor der Homogenisation wurden stets die Keimachsen aus den Samen entfernt, die verbleibenden Keimblätter mit der Hand in etwa 5 x 5 mm große Fragmente überführt und sofort in das jeweilige Isolationsmedium eingebracht. Dieses beinhaltete grundsätzlich zur Verhinderung von Gerbungsreaktionen einerseits Thioglykolsäure als Oxidationsschutzmittel sowie das Reduktionsmittel Ascorbinsäure. EDTA fungierte als Komplexbildner für bivalente Kationen.

Eine Homogenisation mit einem Messerhomogenisator ( Fa. Braun ) und eine Zerkleinerung mittels eines Ultra-Turrax ( Fa. Polytron ) resultierte zwar in recht hohen Lipidausbeuten von 30 - 60 %, führte jedoch stets auch zu einem Zerschlagen der Lipidkörper zu einer Partikelgröße von 0,2 - 2,0 µm. Das bedeutet, die Methoden a - f ( s.v. ), die größtenteils in Anlehnung an bestehende Verfahren zur Isolierung von Lipidkörpern aus orthodoxen Samen- oder Pflanzenteilen konzipiert worden waren, erwiesen sich generell als in der beschriebenen Form nicht praktikabel, denn auch Zusätze von PVP, RSA und Lecithin ( jeweils 0,01 - 2,0 %ig ) sowie entfettetem Erdnußhomogenat brachten keine Verbesserung dieser Situation.

Deshalb wurde prinzipiell dazu übergegangen, die Zerkleinerung der Keimblätter mit Hilfe eines Mörsers vorzunehmen. Die Effektivität dieser Vorgehensweise wurde durch Zusatz von feinkörnigem Quarzsand zum Homogenisationsmedium gesteigert.

Doch auch in diesem Falle konnte kein zufriedenstellendes Resultat erzielt werden. Führt man das Mörsern nur über einen Zeitraum von bis zu 5 Minuten aus, so erhielt man nach Zentrifugation in der oben aufgelagerten Fettschicht Lipidausbeuten von maximal 2 - 3 %. Eine mikroskopische Analyse des Sedimentes demonstrierte, daß die gewählte Homogenisationszeit einen Aufschluß des Gewebes nur maximal bis zur Stufe von Einzelzellen erbrachte. Dehnte man die Zeitdauer des Mörserns aus, so erhöhte man zwar die Lipidausbeute in der Fettschicht ( maximal 10 % ), jedoch zeigten die darin befindlichen Lipidkörper erneut zu kleine Durchmesser von 0,4 - 4,0 µm. Auch hier erwiesen sich Zusätze von PVP, RSA und Lecithin sowie entfettetem Erdnußhomogenat als unwirksam.

Diese offensichtlich schlechtere Aufschließbarkeit des Kotaldonargewebes von Kakaosamen im Vergleich zu dem der Erdnußsamen (s. 2.2) konnte weder durch eine Variation des Saccharosegehaltes (0,1 - 1,0 M) noch des pH-Wertes (pH 5 - 9) im Isolationsmedium kompensiert werden.

Als einziger Ausweg aus diesem Dilemma wurde die Möglichkeit erachtet, kleine Fragmente der Keimblätter schockzufrieren und das Material im gefrorenen Zustand zu homogenisieren (s. 1.5 g,h). Diese extrem hohe Kühlgeschwindigkeit war erforderlich, um den Temperaturbereich, in dem eine Kühlschädigung in Form einer Lipidkörperfusion auftritt (Rühl et al. 1989 b), so schnell wie möglich zu überbrücken.

Das Einfrieren erfolgte aus diesem Grunde über schmelzendem Stickstoff. Die Keimblätter wurden in Scheiben einer Dicke von maximal 0,5 mm geschnitten und anschließend schnell portionsweise eingefroren. Da die verfügbaren Homogenisatoren nicht für einen Einsatz bei einer solch extrem niedrigen Temperatur geeignet waren, mußte für die anschließende Zerkleinerung wieder ein Mörser zu Hilfe genommen werden, der ebenso wie das Pistill zunächst auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, bevor man ihn mit dem tiefgefrorenen Material beschickte.

Das Mörsern wurde entweder in flüssigem Stickstoff oder nach Abdampfen desselben ohne Flüssigkeit vorgenommen. Dabei reichte die Kältekapazität des Mörsers aus, ein Erwärmen des Materials auf Temperaturen von mehr als -80 °C zu verhindern. Beides führte zum selben Ergebnis, auch das Einschleiben eines Gefriertrockenvorganges nach dem Zerkleinern veränderte das Resultat nicht.

Während des gesamten Gefriertrockenprozesses (24 Stunden) sowie der Nachtrocknung (6 Stunden) wurde gleichbleibend eine Temperatur von -20 °C eingehalten.

Das Auftauen des Gefrier- bzw. Gefriertrockenpulvers wurde in der 10-20-fachen Masse des Isolationsmediums (s. 1.5 a) mit einer Temperatur von 20 °C vorgenommen. Im weiteren Versuchsverlauf wurde stets dieses Isolationsmedium verwendet.

Im Gegensatz zum Erdnußhomogenat (s. 2.2) erforderte die Abtrennung des Lipids vom Kakaohomogenat stets eine Zentrifugation bei mindestens 20000 x g (besser 30000 x g) über die Dauer von 30 Minuten. Resuspension in Isolationsmedium bzw. 0,45 M Saccharoselösung führte zu Lipidkörpern, die gemäß lichtmikroskopischer Betrachtung eine unregelmäßige Gestalt besaßen und deren Inhalt sich im festen Aggregatzustand befand. Außerdem waren die Lipidkompartimente nicht isoliert, sondern hafteten in kleineren Gruppen aneinander, welche in der Aufsicht im Mittel 15 Lipidkörper erkennen ließen (Abb. 1a).

Kurzzeitige Erwärmung (5 Minuten) der Suspension auf 38 °C - also eine etwas oberhalb des Schmelzbereiches von Kakaobutter gelegene Temperatur - erzielte eine Überführung der Lipidaggregate in flüssige, isolierte Lipidkörper eines Durchmessers von 2 - 8 µm (Abb. 1b).

Kühlte man anschließend diese Lipidsuspension auf 2 °C, so blieben die Lipidkörper erstaunlicherweise zunächst unverändert. Erst nach etwa zwei Stunden zeigte sich eine nennenswerte Veränderung. Während die Lipidkörper im PVP-haltigen Isolationsmedium lediglich eine leichte Tendenz zur Zusammenlagerung aufwiesen (Abb. 1c), traten in der Saccharoseprobe (Lipidkörper in 0,45 M Saccharoselösung) bereits vereinzelte Fusionen benachbarter Lipidtröpfchen sowie

eine Kristallisation mancher dieser Fusionsprodukte auf (Abb. 1d). Sechsstündige Einwirkung einer Temperatur von 2 °C führte bereits zu einer fast vollständigen Kristallisation des Lipids sowohl in der PVP-haltigen Probe als auch in der Saccharoseprobe (Abb. 2a).

Eine Temperatur von 20 °C ergab hingegen nach 6 Stunden erst vereinzelte Fusionsprodukte (Abb. 1e) bzw. Lipidkristallisationen (Abb. 1f), der Hauptanteil des Lipids bestand weiterhin aus flüssigen, isolierten Lipidkörpern unveränderter Größe.

Wurden die sich nach dem Schockgefriervorgang im festen Aggregatzustand befindlichen Lipidkörper vor dem Erwärmen auf 38 °C zunächst zweimal gewaschen (d.h. zweimal resuspendiert und zentrifugiert sowie erneut resuspendiert), so traten unabhängig vom Resuspensionsmedium (0,45 M Saccharose = S<sub>2</sub>-Probe, Isolationsmedium = IM<sub>2</sub>-Probe) Lipidtröpfchen auf, die infolge einer Fusion zahlreicher Lipidkörper einen Durchmesser von bis zu 45 µm besaßen (Abb. 2b). Eine anschließende erneute Zentrifugation (30 Minuten 30000 x g) resultierte in großen, offensichtlich strukturlosen Fettmassen, die sich erneut im festen Aggregatzustand befanden und nur von einigen wenigen isolierten, flüssigen Lipidkörpern ursprünglicher Größe (2 - 8 µm) umgeben waren (Abb. 2c). Eine Inkubation dieser Suspension bei 38 °C bestätigte das Fehlen einer Struktur dieser Lipidmassen, denn es bildeten sich riesige Lipidtröpfchen mit Durchmessern von bis zu 250 µm (Abb. 2d), die obendrein noch untereinander fusionierten (Abb. 2e, s. Pfeil). Betrachtet man diese Suspensionen nach zweistündigem Stehen bei 20 bzw. 2 °C, so konnte man eine beginnende Kristallisation des Lipids beobachten. Diese beschränkte sich bei 20 °C zunächst nur auf die großen Lipidtröpfchen, die feine, nadelförmige Kristalle beinhalteten, während die infolge der vorangegangenen Behandlung unberührt gebliebenen Lipidkörper unverändert flüssig und isoliert vorlagen (Abb. 2e).

Im Falle einer Temperatur von 2 °C wiesen die großen, flüssigen Fettmassen im Inneren an vielen Stellen kleinere feste Lipidbereiche auf. Auch die Lipidkörper unveränderter Größe (2 - 8 µm) waren in den festen Aggregatzustand übergewechselt (Abb. 2f).

Zur Überprüfung dieser offensichtlich geringeren Stabilität zweimal gewaschener Lipidkörper gegenüber nur einmal gewaschenen wurden Lipidkörper aus Kakaogefriertrockenpulver nach einmaligem Zentrifugieren und Resuspendieren 5 Minuten lang auf 38 °C erwärmt (IM<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>) und anschließend für die Dauer von 8 Stunden bei 2 °C inkubiert. Als Resultat ergaben sich feste isolierte Lipidkörper eines Durchmessers von ca. 3 - 12 µm (Abb. 3a) sowie kleinere Fettmassen, in denen sich lichtmikroskopisch noch die Grenzflächen der sie aufbauenden Lipidkörper erkennen ließen (Abb. 3 b, s. Pfeile). Erneutes Erwärmen auf eine Temperatur von 38 °C ließ wiederum flüssige, voneinander getrennte Lipidkörper entstehen, die - unabhängig vom gewählten Isolationsmedium - bereits nach zwei Stunden bei 2 °C fusionierten sowie kristallisierten (Abb. 3c).

Eine weitere interessante Analyse stellte die Untersuchung des Verhaltens einer Lipidkörpersuspension bei Erhöhung der Elektrolytkonzentration dar, da bekannterweise besonders bivalente Kationen die Eigenschaften von Grenzflächen stark beeinflussen können.

Dieses sollte die Applikation von Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf eine Lipidkörpersuspension zeigen (IM<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>). Im Falle der Verwendung des Isolationsmediums wurde hierbei auf einen Zusatz von EDTA verzichtet. Es wurden CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen im

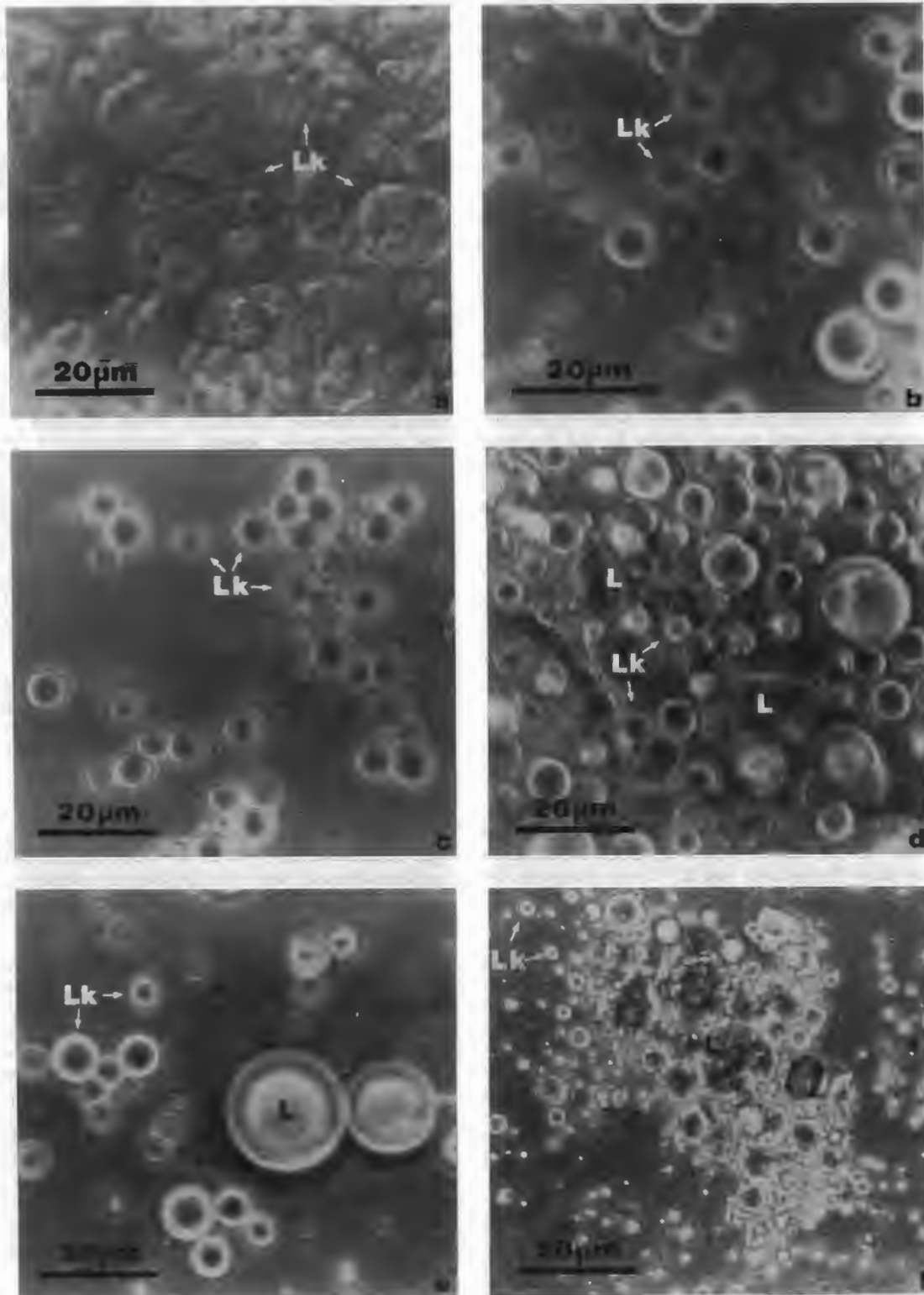


Abbildung 1: Struktur isolierter Lipidkörper aus Kakaokotyledonen und ihr Verhalten in Suspension.

Bei Aufnahme von Gefrier- bzw. Gefriertrockenpulver in Isolationsmedium (IM, s. 1.5a) oder 0,45 M Saccharoselösung erhält man nach Zentrifugation die Lipidkörper als kleinere Aggregate in fester Form (a). Nach fünfminütiger Inkubation bei 38 °C verflüssigen sie und liegen isoliert vor (b). Zwei Stunden Lagerung bei 2 °C bringt die Lipidkörper in IM nur zu einer leichten Zusammenlagerung (c), während die Lipidkörper in 0,45 M Saccharose sowohl wieder eine Kristallisation als auch leichte Fusionen aufweisen (d). Nach 6 Stunden bei 20 °C treten sowohl in der IM-Probe als auch in der Saccharoseprobe vereinzelt größere, flüssige Lipidtropfen (e) sowie kristalline Lipidbereiche (f) auf, den Hauptanteil bilden jedoch weiterhin isolierte Lipidkörper unveränderter Größe (2 - 8 μm).

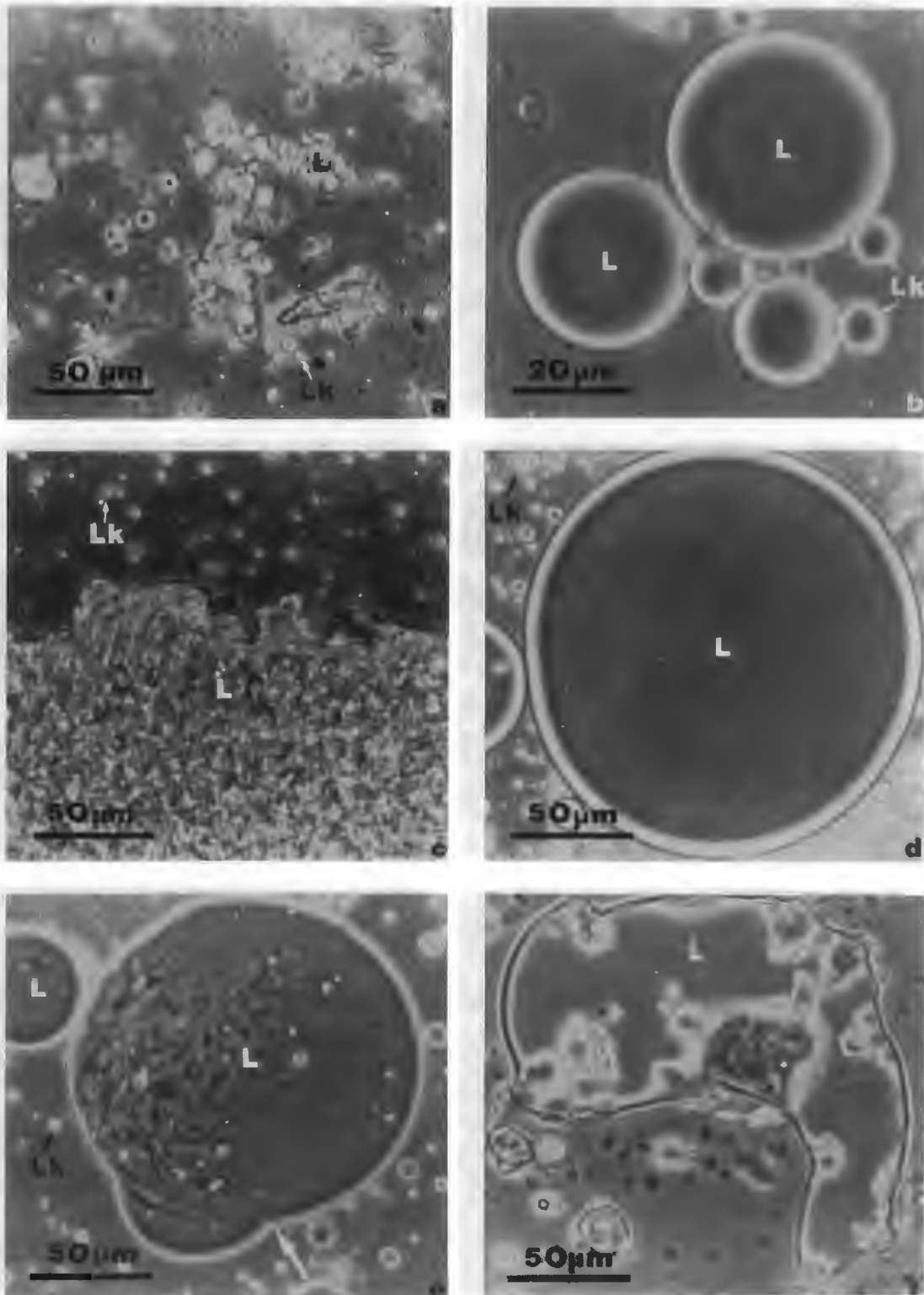


Abbildung 2: Stabilität isolierter Lipidkörper aus Kakaokotyledonen in Abhängigkeit von Behandlung und Temperatur.

Nach sechsständiger Einwirkung einer Temperatur von 2 °C ist nahezu das gesamte Lipid auskristallisiert (a). Erwärmt man die Lipidkörperprobe erst nach zweimaligem Zentrifugieren und Resuspendieren (IM<sub>2</sub>,S<sub>2</sub>), so erhält man bereits teilweise sehr große Lipidtropfen (b), die nach erneuter Zentrifugation große Lipidmassen festen Aggregatzustandes bilden (c). Erwärmt man anschließend erneut, so entstehen riesige Lipidtropfen (d), die sehr bald zu kristallisieren beginnen (e: 2 h 20 °C; f: 2 h 2 °C) und auch miteinander fusionieren können (e, s. Pfeil).

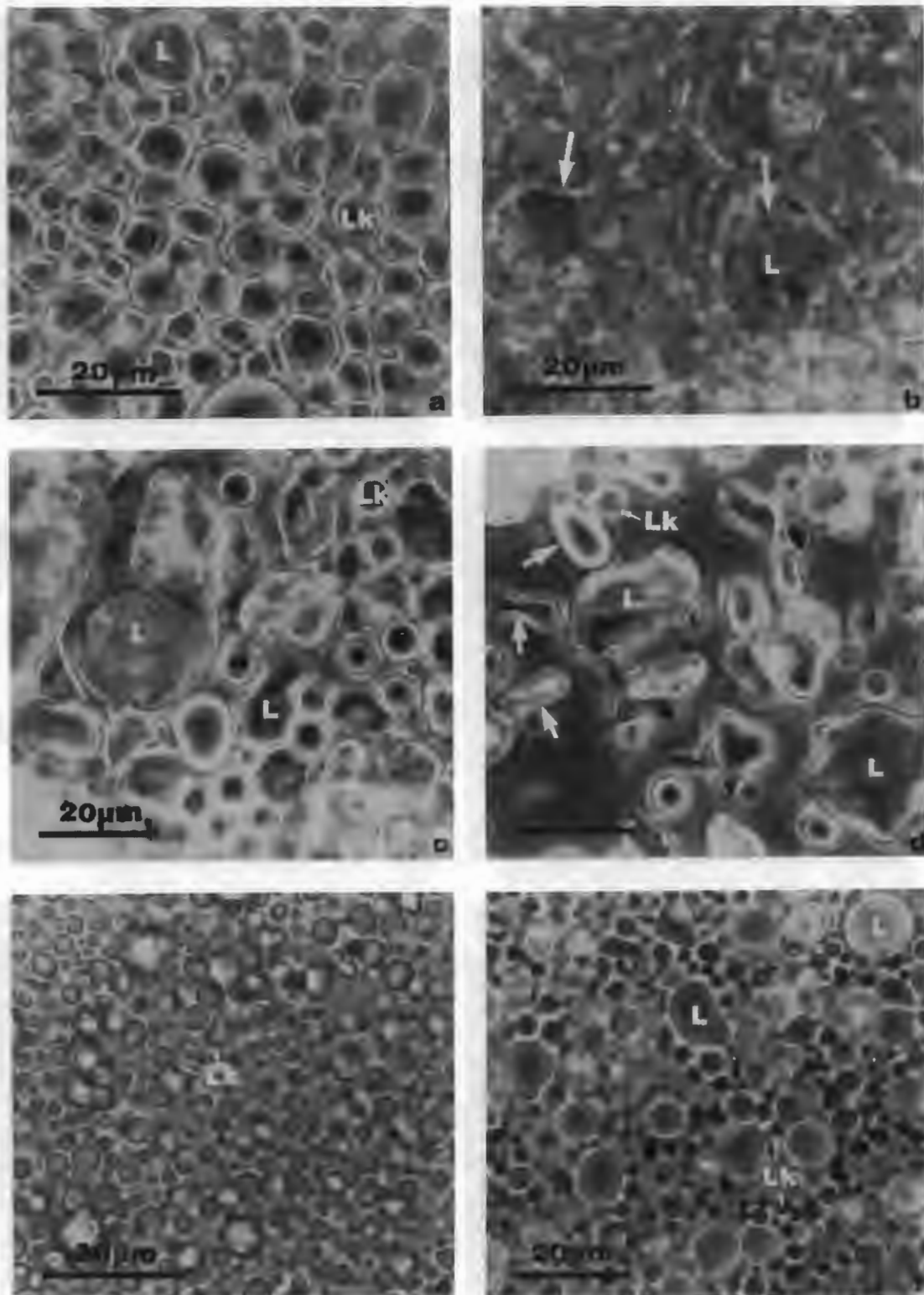


Abbildung 3: **Stabilität isolierter Lipidkörper aus Kakaokotyledonen im Vergleich zu Lipidkörpern aus Erdnußkotyledonen.**

Lagert man eine Lipidkörperprobe, die nach einmaligem Zentrifugieren und Resuspendieren 5 Minuten lang auf 38 °C erwärmt wurde (IM<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>), bei 2 °C, so sind nach ca. 8 Stunden alle Lipidkörper in den festen Aggregatzustand gewechselt und sind entweder noch voneinander isoliert (a) oder bilden größere Fettmassen, die jedoch noch Grenzflächen beinhalten (b, s. Pfeile). Erneutes Erwärmen auf 38 °C läßt wieder flüssige Lipidkörper unterschiedlicher Größe entstehen, die bereits nach 2 Stunden sowohl in IM als auch in Saccharose fusionieren sowie

**kristallisieren (c). Zugabe von Calciumionen (ad 0,25 M CaCl<sub>2</sub>) zu einer Lipidkörperprobe (IM<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>) führt zu einer schnellen Kristallisation und Fusion (d, 30 min 0,25 M CaCl<sub>2</sub>). Lipidkörper aus Erdnußkotyledonen sind - unabhängig von der Isolierungsmethode - stets flüssig und besitzen einen Durchmesser von 0,5 - 4,5 µm (e). Zugabe von Calciumionen (ad 0,25 M CaCl<sub>2</sub>) führt selbst nach 48 Stunden nur zu leichten Fusionen (f), aber nicht zur Kristallisation.**

Bereich von 0,05 - 0,5 M/l angewandt. Alle getesteten Ca<sup>2+</sup>-Mengen erreichten eine schnelle Kristallisation der Lipidkörper ( Abb. 3d ). Die Schnelligkeit dieser Reaktion verhinderte offenbar die Bildung größerer Fusionsprodukte, das Auftreten gegenüber der Kontrolle vergrößerter Kristalle und länglicher flüssiger Lipidbereiche ( Abb. 3d, s. Pfeile ) macht jedoch deutlich, daß nicht nur die Kristallisation, sondern auch das Zusammenfließen von Lipidkörpern durch Ca<sup>2+</sup>-Zugabe drastisch beschleunigt wird.

Erwärmt man die Suspension anschließend auf 38 °C, so erzielt man keinen bleibenden Übergang der Kristalle in den flüssigen Aggregatzustand. Sofort nach Unterschreiten des Schmelzbereiches für Kakaobutter liegt das Fett erneut fest vor.

Abschließend seien noch einige grundsätzliche Bemerkungen zu den Experimenten gemacht. Alle unter 1.5 a - f aufgelisteten Isolationsmedien führten bei Verwendung von Gefrierpulver zu gleichen Ergebnissen. Zum Zwecke der Reinigung der Lipidkörperfraktion sind sacharosehaltige Medien salzhaltigen vorzuziehen, da sich eine Dichtegradientenzentrifugation durchführen läßt. Wie vorstehend bereits genannt, wurden die hier beschriebenen Resultate alle mit dem unter 1.5 a erläuterten Isolationsmedium erzielt.

Generell läßt sich sagen, daß Zusätze von RSA, Lecithin und fettfreiem Erdnußhomogenat keine Verbesserung der Stabilität von Lipidkörpern aus Kakaokeimblättern erbrachten, PVP hingegen eine - wenn auch nur geringfügige - Verzögerung der Fusion bzw. Kristallisation dieser Kompartimente erwirkte.

Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Isolationsmedium ( 1.5 c,e ) bis auf 3 M/l zeigte ebenfalls keine Wirkung.

Gegenüber einer Veränderung des pH-Wertes erwiesen sich Kakaolipidkörper als sehr unempfindlich. Erst unphysiologisch hohe bzw. niedrige pH-Werte unter 0 bzw. über 13 führten zu einer Fusion sowie zu Kristallisationserscheinungen.

Besonders interessant wäre weiterhin das Verhalten der isolierten Lipidkörper bei Trocknung gewesen. Diese Dehydratation einer solchen Suspension hätte jedoch eine Zeitspanne erfordert, welche diejenige überschreitet, während der die Lipidkörper aus den Keimblättern von Kakaosamen stabil sind. Aus diesem Grunde mußte auf diese sehr reizvolle Versuchsanstellung verzichtet werden.

## 2.2 Lipidkörper aus Erdnußkotyledonen

Die Lipidkörper aus Erdnußkotyledonen offenbarten sich als außerordentlich stabil gegenüber sämtlichen angewandten Homogenisierungsmethoden. Keinerlei Unterschied zeigte sich zwischen den Lipidkörpersuspensionen, die mittels eines Braun-Messerhomogenisators bzw. eines Mörsers erzielt wurden, außerdem konnten alle vorstehend beschriebenen Isolierungsmethoden mit Erfolg angewandt werden. Dabei konnte die zur Reinigung erforderliche Zentrifugation im Gegensatz zur Situation bei der Isolierung von Kakaolipidkörpern mit nur 5000 x g durchgeführt werden, um bereits nach 15 Minuten eine vollständige Abtrennung des Lipids vom restlichen Homogenat zu erzielen.

Wurde die Homogenisation - nach Schockgefrieren dünner Scheiben des Kotyledonargewebes in schmelzendem Stickstoff - bei -196 °C unter flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers praktiziert, so erhielt man im weiteren Arbeitsgang (s. 2.1.) bereits nach dem ersten Zentrifugationsschritt wieder flüssige, isolierte Lipidkörper ( Abb. 3e ). Diese besaßen einen Durchmesser von 0,5 - 4,5 µm, waren also im Mittel nur unerheblich größer als die Lipidkörper bei elektronenmikroskopischer Betrachtung von Gewebeblöckchen aus Erdnußkotyledonen (Durchmesser 0,5 - 3,0 µm, Rühl und B i e h l 1989). Bedenkt man die in dieser Publikation vorgestellte geringfügige Fusion einzelner benachbarter Lipidkörper, so ist das Auftreten derartiger etwas größerer Lipidkompartimente durchaus verständlich.

Da alle angewandten Isolierungsmethoden das gleiche mikroskopische Bild erbrachten, wurde auf weitere Darstellungen verzichtet.

Gegenüber einer pH-Änderung erwiesen sich die Lipidkörper in Suspension ( 0,45 M Saccharose ) als außerordentlich unempfindlich. Erst pH-Werte von 13 bzw. 0 führten zu einer Aggregation der Lipidkörper unter teilweisem Zusammenfließen derselben zu Partikeln einer Größe von 10 - 20 µm.

Da im Falle der Erdnuß grundsätzlich bei Temperaturen unterhalb von 4 °C gearbeitet wurde, konnte man davon ausgehen, daß Kühlung keinen Effekt auf isolierte Erdnußlipidkörperkompartimente ausübt.

Auch Suspensionen von Erdnußlipidkörpern wurde CaCl<sub>2</sub>-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,05 - 0,5 M/l hinsichtlich dieser Komponente zugesetzt.

Unabhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration in diesem gewählten Konzentrationsbereich traten bereits nach ca. 30 Minuten geringfügige Fusionen einzelner benachbarter Lipidkörper auf, die sich jedoch auch nach einer Einwirkungs-dauer von 48 Stunden bei 2 °C nicht mehr weiter veränderten ( Abb. 3f ).

Das bedeutet, Erdnußlipidkörper zeigen in Suspension nur bei drastischen pH-Änderungen und - in geringem Umfang - infolge Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des Isolationsmediums Fusionserscheinungen, eine Kristallisation des Lipids konnte jedoch keine der applizierten Behandlungen erwirken.

Zieht man aus diesen Experimenten ein Fazit, so lassen sich folgende Unterschiede im Verhalten isolierter Lipidkörper aus den Keimblättern von Kakao- und Erdnußsamen nennen:

1. Erdnußlipidkörper sind erheblich leichter isolierbar als Kakaolipidkörper ( Messerhomogenisatoren einsetzbar, nur leichtes Mörsern erforderlich, Zentrifugation bei 5000 x g ausreichend ).
2. Lipidkörper aus Erdnußkotyledonen befinden sich im Gegensatz zu denen aus Kakaokeimblättern nach Schockgefrieren und Homogenisation im flüssigen Aggregatzustand.
3. Ungewaschene oder einmal gewaschene Lipidkörper aus Kakaokotyledonen sind in Suspension deutlich instabiler als

solche aus Erdnußkeimblättern, unabhängig vom verwendeten Resuspensionsmedium (Fusion, Kristallisation).

4. Wiederholtes Waschen läßt im Falle einer Kakaolipidkörpersuspension infolge des Zusammenfließens zahlreicher Lipidkörper sehr große Lipidtropfen entstehen. Erdnußlipidkörper zeigen dieses Verhalten in Suspension nicht.

5. Kühlung auf 2 °C verringert die Stabilität der Kakaolipidkörper in Suspension, wenn auch ein Zusammenfließen und Kristallisieren der Kompartimente erst nach etwa 2 Stunden auftritt.

6. Ca<sup>2+</sup>-Zugabe führt selektiv nur bei Kakaolipidkörpern zur Fusion mit anschließender Kristallisation, Erdnußlipidkörper zeigen nur vereinzelte kleinere Fusionsprodukte, jedoch grundsätzlich keinen Übergang in den festen Aggregatzustand.

### 3 Diskussion

Die wohl wesentlichste, folgenreichste Veränderung bei Unterschreitung des kritischen Feuchtebereiches von Kakaosamen sowie nach Kühlung der Samen unter den kritischen Temperaturbereich ist die sprunghafte Fusion der Lipidkörper ausschließlich in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen (Rühl und Biehl 1989, Rühl et al. 1989 b). Entscheidend ist dabei, daß sich die Phasen in der Zelle umkehren, also nach der Lipidfusion eine kontinuierliche Lipidphase vorliegt, in der verbliebene cytoplasmatische Anteile wie "Inseln" anmuten.

Trockene Erdnußsamen weisen bei ultrastruktureller Betrachtung der Speichergewebe aus Keimachse und Keimblättern ebenfalls ein geringfügiges Zusammenfließen einiger weniger benachbarter Lipidkörper auf (Rühl und Biehl 1989). Auch Öpik (1980) beschreibt für OsO<sub>4</sub>-rauchfixierte Koleoptilzellen trockener Reiskörner, manchmal scheine eine Reihe Lipidkörper zu fusionieren. Jedoch niemals wurde aus subzellulären Beobachtungen trocknender oder trockener orthodoxer Samen ein solches Ausmaß der Lipidfusion beschrieben, wie es in Kakaosamen nach Trocknung auf die kritische Hydratation bzw. nach Kühlung unter den kritischen Temperaturbereich vorliegt.

Slack et al. (1980) zeigten, daß in gerührten Lipidkörpersuspensionen aus Saflor- und Leinsamen bereits eine pH-Senkung auf Werte von 7,1 - 6,7 eine Lipidfusion induziere, jedoch nach erneuter Anhebung des pH auf 8,3 trete wieder eine Dispergierung der Lipidkörper ein. Phospholipidhydrolyse mittels Phospholipase A2 resultierte hingegen in keiner Fusion. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß die pH-Wirkung auf die Lipidkörper auf eine Funktion der Proteine in der Lipidkörperbegrenzung hindeute.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang die in dieser Publikation vorgestellte erheblich geringere Stabilität isolierter Lipidkörper aus den Kotyledonen von Kakaosamen gegenüber solchen aus Erdnußsamen. Sie tendieren bereits nach relativ kurzer Zeit zur Kristallisation bzw. zur Fusion und erweisen sich im Gegensatz zu Erdnußlipidkörpern als außerordentlich empfindlich gegenüber bivalenten Kationen wie Ca<sup>2+</sup>, die eine Kakaolipidkörpersuspension in kürzester Zeit zur vollständigen Kristallisation bringen.

Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, daß Lipidkörper aus Kakao- und Erdnußsamen unterschiedlich zusammengesetzte Begrenzungen besitzen, also hinsichtlich Protein- bzw. Phospholipidkomponente voneinander abweichen.

Nun ist heutzutage akzeptiert, daß Lipidkompartimente in Zellen nicht von einer Elementarmembran umgeben, sondern von einem "monolayer" begrenzt sind, also einer monomolekularen Schicht polarer Lipide, deren hydrophobe Ketten zum Lipid hin ausgerichtet sind (Yatsu und Jacks 1972, Sommer 1973, Webster und Leopold 1977, Bair und Snyder 1980).

Daneben häufen sich die Anhaltspunkte, die für eine spezifische Einbindung essentieller Proteine in diese Grenzschicht sprechen, wobei sich eine Verwandtschaft dieser Proteine mit denjenigen der Grenzschichten anderer Zellkompartimente nachweisen ließ (Yatsu und Jacks 1972, Bair und Snyder 1980). Das heißt, betrifft die von Erdnußsamen abweichende Komposition in Kakaosamen die Proteinkomponente der Membranen, so wäre es möglich, daß alle zellulären Membranen die gleiche Sensitivität gegenüber Kälte aufweisen, daß Lipidkörper aber aufgrund der eventuell instabileren monomolekularen Begrenzung mit eventueller Tendenz zur Bildung einer stabileren Doppelblattstruktur etwas frühzeitiger eine Schädigung erleiden.

Da aber eine wäßrige Homogenisation von Kakaosamen aufgrund der Sensitivität der Lipidkörper gegenüber geringeren Temperaturen als 12 °C (Rühl et al. 1989a) stets bei Zimmertemperatur durchgeführt werden mußte, wäre auch nach Dekompartimentierung ein enzymatischer Angriff auf die Lipidkörperkontur durch Phospholipasen, Proteasen, etc. denkbar. Das Fehlen einer solchen Reaktion bei der Lipidkörperextraktion aus Erdnußsamen bei Raumtemperatur könnte auf einen Mangel an derartigen hydrolytischen Enzymen zurückzuführen sein.

Widersprochen wird dieser Möglichkeit lediglich durch die Tatsache, daß auch mittels Gefriertrocknung nach Schockgefrieren in schmelzendem Stickstoff eine derartige unterschiedliche Stabilität der Kakao- und Erdnußlipidkörper bestehen bleibt. Nach dieser Art der Homogenisation fallen Kakaolipidkörper allerdings aufgrund des gegenüber Erdnußlipid höherer Schmelzpunktes von Kakaobutter in fester Form an und müssen durch kurzzeitige Inkubation bei einer oberhalb des Schmelzpunktes gelegenen Temperatur verflüssigt werden. D.h. durch diese Kristallisation besteht zumindest die Möglichkeit, daß bestimmte Komponenten aus der Grenzkontur entfernt oder verändert wurden. Biehl (unveröffentlicht) konnte auch nach einjähriger Lagerung von Kakaosamen bei -20 °C keine Kristallisation des Kakaolipids in den Speicherparenchymzellen der Keimblätter feststellen.

Der von Jänicke (1973) gezeigte erheblich höhere Anteil ungesättigter Fettsäuren im Speicherfett der Rindenparenchymzellen der Keimachse von Kakaosamen im Vergleich zu den Speicherparenchymzellen der Keimblätter könnte jedoch auch einen auf der Basis eines erhöhten Prozentsatzes ungesättigter Fettsäuren der polaren Lipide operierenden Mechanismus der Kälteadaptation selektiv nur in den Keimachsen von Kakaosamen andeuten. Denn es konnte ja gezeigt werden, daß Keimachsen keine subzellulären Veränderungen bei Temperatursenkung bis herab auf 2 °C erleiden (Rühl und Dambroth 1989). Ein experimenteller Nachweis eines derartigen Mechanismus, der in den Keimblättern in Epidermiszellen und subepidermalen Zellen ebenfalls zumindest teilweise vorliegen könnte, steht jedoch noch aus.

Ganz generell läßt sich also aussagen, daß die Grenzflächen und Membranen in Kakaosamen durch Kühlung und Trocknung destabilisiert werden und diese Tatsache den Keimfähigkeitsverlust der Samen bedingt.



## Zusammenfassung

Nachdem eine frühere mikroskopische Analyse sowohl für Kühlung als auch für Trocknung von Kakaosamen eine Fusion der Lipidkörper in den Speicherparenchymzellen der Keimblätter als gravierendste subzelluläre Schädigung offenbarte, wird in dieser Arbeit die Stabilität dieser Lipidkörper in Suspension im Vergleich zu Lipidkörpern aus Erdnußkeimblättern untersucht.

Lipidkörper aus dem Speicherparenchym von Kakaosamen erwiesen sich dabei als deutlich schlechter isolierbar und erheblich weniger stabil. Mögliche Ursachen dieses Verhaltens werden im Zusammenhang mit dem Keimfähigkeitsverlust von Kakaosamen infolge Trocknung und Kühlung diskutiert.

## Investigations in the causes of sensitivity to cold and water stress of tropical seeds, represented by cacao seeds

### VII. Stability of isolated lipid bodies from cotyledons

Since the microscopical analysis of cooling and desiccating cacao seeds revealed the fusion of lipid bodies in cotyledonary storage parenchyma cells as most serious damage, this publication deals with the stability of these lipid bodies after isolation and purification in comparison with peanut lipid bodies.

Lipid bodies from storage parenchyma cells of cacao seed cotyledons are much less easy to isolate and considerably less stable. Possible causes of this behaviour are discussed in respect to the loss of germinability due to cooling and dehydration of cacao seeds.

### Abkürzungen:

EDTA = Ethylendiamin-N,N,N'-tetraessigsäure (Dinatriumsalz); IM = Isolationsmedium; L = Lipid; Lk = Lipidkörper; PVP = Polyvinylpyrrolidon; RSA = Rinderserumalbumin; S = 0,45 M Saccharoselösung; TRIS =  $\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris(hydroxymethyl)-methylamin.

### Literatur

Bair, L.M. und Snyder, H.E.: Electron microscopy of soybean lipid bodies. - J. Amer. Oil Chem. Soc. 57, (1980), S. 279 - 282.

Jänicke, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Samen und Blättern von *Theobroma cacao* L. (Kakao). - Examensarbeit, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Öpik, H.: The ultrastructure of coleoptile cells in dry rice (*Oryza sativa* L.) grains after anhydrous fixation with osmium tetroxide vapour. - New Phytol. 85, (1980), S. 521 - 529.

Passern, D.: Zur Aktivität und zellulären Kontrolle saurer Proteasen während Samenentwicklung, Keimung und Fermentation von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.). - Dissertation, Techn. Universität Braunschweig, (1979).

Rühl, G.F.; Dambroth, M.; Biehl, B.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. II. Trocknungsparameter und Exsudation trocknender Kakaosamen

und Kakaosamenorgane. - Landbauforschung Völkenrode 38 (3), (1988b), S. 235 - 251.

Rühl, G.F. und Dambroth, M.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. III. Ultrastruktur des Rindenparenchyms der Radikula trocknender Kakaosamen. - Landbauforschung Völkenrode 39, (1989), S. 1 - 14.

Rühl, G.F. und Biehl, B.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. IV. Ultrastruktur des Speicherparenchyms der Kotyledonen trocknender Kakaosamen. - Landbauforschung Völkenrode 39, (1989), S. 15 - 27.

Rühl, G.F.; Dambroth, M.; Biehl, B.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. V. Kritische Temperatur und Exsudation gekühlter Kakaosamen und Samenorgane. - Landbauforschung Völkenrode 39, (1989a), S. 87 - 99.

Rühl, G.F.; Biehl, B.; Dambroth, M.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. VI. Ultrastrukturelle Veränderungen vorreifer und reifer Kakaosamen infolge Kühlung. - Landbauforschung Völkenrode 39, (1989b), S. 183 - 192.

Slack, C.R.; Bertaud, W.S.; Shaw, B.D.; Holland, R.; Browne, J.; Wright, H.: Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linseed (*Linum usitatissimum*). - Biochem. J. 190, (1980), S. 551 - 561.

Sommer, J.: Elektronenmikroskopische Analyse des Aktivitätswechsels bei Samen von *Agrostemma githago* L. während der Reifung, Ruhe und Keimung. - Dissertation, Technische Universität Hannover, (1973).

Webster, B.D. und Leopold, A.C.: The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. - Amer. J. Bot. 64, (1977), S. 1286 - 1293.

Verfasser: Rühl, Gerhard, Dr. rer. nat., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. Manfred Dambroth.

Biehl, Böle, Prof. Dr. rer. nat., Botanisches Institut der Technischen Universität Braunschweig.