

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Max Rubner-Institut (MRI)

Titel der Förderung

Innovationsraum: NewFoodSystems
SustainVanil – Umsetzungsphase, TPE

Verantwortliche Autoren

Dr. Falco Beer
Dr. Sebastian T. Soukup

Förderkennzeichen

031B1238E

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1238E gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.“

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

–

Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: <i>Max Rubner-Institut (MRI)</i>	Förderkennzeichen: 031B1238E
Vorhabenbezeichnung: Verbundvorhaben: SustainVanil Teilvorhaben: <i>Innovationsraum: NewFoodSystems – SustainVanil – Umsetzungsphase, TPE</i>	
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2022 bis 31.12.2024	Berichtszeitraum: 01.01.2022 bis 31.12.2024

Vanille zählt zu den teuersten und zugleich beliebtesten Gewürzen weltweit. Eine wesentliche Herausforderung ist der hohe Arbeitsaufwand in der Kultivierung der Vanillepflanzen und der Erzeugung von Vanilleschoten, der darin begründet ist, dass z.B. im Hauptanbaugebiet Madagaskar jede Blüte manuell bestäubt werden muss. Hinzu kommt, dass es einer 2- bis 5-jährigen vegetativen Entwicklungsphase bedarf ehe die Vanille zum ersten Mal blüht und die begehrten Kapselfrüchte (Schoten) bildet. Dies begründet, neben weiteren Faktoren, die stark schwankenden Marktpreise des Vanillegewürzes.

Im Rahmen des Gesamtverbundvorhaben „SustainVanil“ (Projektpartner Hochschule Osnabrück, Symrise AG, nadicom Gesellschaft für angewandte Mikrobiologie mbH, Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG) werden u.a. die vegetative und generative Entwicklung der Vanille in geschützten Kultursystemen (Klimakammer, Hydroponik) untersucht mit dem Ziel die Anbaubedingungen so zu optimieren, dass eine stabile und hohe Produktivität erreicht wird. Um die Effekte auf molekularer Ebene besser verstehen zu können, wurden im Rahmen des Teilvorhabens des Max Rubner-Instituts (MRI) die Inhaltsstoffe in Vanille mittels etablierten Metabolomics-Methoden am MRI in Kooperation mit den Projektpartner untersucht. Die Ziele des MRI-Teilprojekts („TP4-2: Probennahme und Metabolomik“) bestanden darin, das Metabolom in verschiedenen Entwicklungsstadien zu beschreiben, den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Metabolom zu erfassen sowie Inhaltsstoffe zu identifizieren, die eine Rolle bei der Blüteninduktion spielen. Zusammenfassend wurde:

- 1) das Metabolom der Vanillepflanze umfangreich charakterisiert und die Unterschiede im Inhaltsstoffprofil von verschiedenen Pflanzenorganen (Blatt, Stängel, Luftwurzel) bzw. von Schoten unterschiedlicher Reifegrade beschrieben,
- 2) das Vanilleblattmetabolom bei Kultivierung in verschiedenen substratfreien hydroponischen Systemen analysiert und die Ergebnisse hinsichtlich eines kultursystemabhängigen Einflusses auf die vegetative Pflanzenentwicklung diskutiert,
- 3) untersucht, inwieweit eine veränderte Zusammensetzung der Nährlösung die vegetative Pflanzenentwicklung und infolge dessen das Blattmetabolom beeinflusst, und
- 4) untersucht welchen Einfluss das Phytohormon Gibberellinsäure (GA-3) und abiotische Stressfaktoren (Trockenheit, Kälte) auf die Blütenbildung haben.

Durch den Einsatz komplementärer Metabolomanalysen (LC-MS und GCxGC-MS) und mittels Inhouse-Datenbanken sowie kurerter externen Datenbanken wurde das Inhaltsstoffprofil der Vanille in

Zusammenarbeit mit Projektpartnern umfangreich charakterisiert. Insgesamt konnten 127 Metaboliten identifiziert werden, darunter auch bioaktive Sekundärmetaboliten, die bislang noch nicht für Vanille beschrieben waren. Insbesondere bei Luftwurzelpflanzen wurden signifikante organspezifische Unterschiede festgestellt, was u.a. mit erhöhten Mengen von Flavonoiden (Aglykone, C-Glykoside), phenolischen Säuren und Hydroxybenzaldehyden korrelierte. Dies verdeutlicht, dass Luftwurzeln ein besonderes Potential zur Produktion bzw. Speicherung dieser Sekundärmetaboliten besitzen und eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr spielen könnten.

In einem weiteren Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Projektpartnern das Metabolom von unter Indoor-Bedingungen erzeugten Schoten verschiedener Reifegrade (grün, fermentiert, abgereift) verglichen. Mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) ergab sich eine klare Abtrennung der grünen Schoten von den fermentierten bzw. abgereiften Schoten hinsichtlich des Inhaltsstoffprofils, was sich auf die während der Reifung ablaufenden, abiotischen bzw. biotischen Prozesse zurückführen lässt.

Der Einfluss vier verschiedener substratfreier hydroponischer Systeme auf das Vanillemetabolom wurde in Zusammenarbeit mit Projektpartnern untersucht. Die Pflanzen im Fogponik-System zeigten höhere Level an spezifischen, für die Pathogenabwehr relevante Sekundärmetaboliten wie Phenole und Terpene, was den vom Projektpartner beobachteten besseren Gesundheitszustand dieser Pflanzen erklären könnte. Demgegenüber zeigten die Pflanzen im Deepflow-System einen signifikanten Anstieg des globalen Stickstoffmetabolismus, was zu dem vom Projektpartner festgestellten stärkeren Wachstum passt. Es war möglich wurzel-nekrotische und gesunde Pflanzen anhand ihres Blattmetaboloms zu unterscheiden. Dies verdeutlicht, dass systemische Effekte auf die Pflanzengesundheit anhand der eingesetzten Metabolomics-Methoden lokal erkannt werden können noch bevor sich diese dort phänotypisch manifestieren.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss unterschiedlicher Nährlösungen (verschiedene pH- und EC-Werte) auf das Blattmetabolom in Zusammenarbeit mit Projektpartner untersucht. Hinsichtlich des pH-Wertes wurden keine Unterschiede festgestellt, wohingegen die Änderung der EC-Werte (elektrochemische Leitfähigkeit) zu signifikanten, wenn auch überschaubaren, Veränderungen im Blattmetabolom führte. Vorrangig bei Pflanzen aus der Behandlungsgruppe mit dem höchsten EC-Wert wurde für ausgewählte Verbindungen ein signifikanter Intensitätsanstieg festgestellt. Die Tatsache, dass es sich vor allem um stressassoziierte Metaboliten handelte, lässt den Schluss zu, dass die Vanille unter diesen Bedingungen einem gewissen Grad an Salzstress ausgesetzt war.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Faktoren, die möglicherweise die Blütenbildung bei der Vanille auslösen können, auf das Metabolom in Zusammenarbeit mit Projektpartner untersucht. Zum Zeitpunkt der Beprobung der Pflanzen lag keine Blütenbildung vor und es wurde geprüft, welche Behandlung (Phytohormon, Trockenstress, Kältestress) zu den größten Veränderungen im Metabolom führte, da dies einen Hinweis für eine zu erwartende Blütenbildung geben könnte. Basierend auf den Daten der PCA wurden die stärksten Effekte bei Gibberellinsäure-behandelten, trockengestressten Pflanzen beobachtet. Es wurden neun Metaboliten identifiziert, welche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhte Werte aufwiesen, darunter auch Verbindungen, die spezifisch für o.g. Behandlungsgruppe waren. Dazu zählten verschiedene Flavonoiden und Aminosäuren. Inwieweit diese Verbindungen eine Rolle bei der Blüteninduktion spielen, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilen. Erst wenn blühende Vanillepflanzen analysiert werden, kann bestimmt werden, welche Verbindungen tatsächlich in die Blüteninduktion involviert sind.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

—

Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: <i>Max Rubner-Institut (MRI)</i>	Förderkennzeichen: 031B1238E
Vorhabenbezeichnung: Verbundvorhaben: SustainVanil Teilvorhaben: <i>Innovationsraum: NewFoodSystems – SustainVanil – Umsetzungsphase, TPE</i>	
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2022 bis 31.12.2024	Berichtszeitraum: 01.01.2022 bis 31.12.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse	2
1.1 Charakterisierung des Vanillemetaboloms	3
1.2 Untersuchung des Einflusses der Kultivierung in erdelosen Anbausystemen auf das Blattmetabolom	8
1.3 Untersuchung des Einflusses des Nährstoffangebotes auf das Blattmetabolom.....	10
1.4 Untersuchungen zur Blüteninduktion	11
2. Arbeits-, Zeit- und Kostenpläne.....	13
3. F&E-Ergebnisse Dritter	14
4. Verwertung	14
5. Veröffentlichung nach Nr. 5 NABF/NAKF.....	15
6. Literaturverzeichnis	15

1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse

Die Ergebnisse des Teilvorhabens werden anhand der in der Teilvorhabenbeschreibung dargelegten Teilprojekte (TP) dargestellt. Eine Übersicht der für die MRI-Projektarbeiten relevanten bzw. vom MRI bearbeiteten TP sind im Gantt-Diagramm in **Abb. 1** dargestellt.

Teilprojekte (TP)		2022				2023				2024			
TP1	Kultivierungstechnik geschützter Anbau												
TP1-2	Pilotkultivierung von Vanille (Gewächshaus)												
	Kontinuierlicher Kultivation und Bonitur von Vanille												
	Anpassung des Anbausystems auf Basis der Boniturergebnisse												
TP1-3	Kultursystementwicklung und Optimierung (Indoorfarm)												
	(ii) Optimierung von Wachstums- und Entwicklungsfaktoren und (i) Systematische Phänotypisierung												
	(iii) Initialisierung der generativen Phase												
TP4	Begleitende Analytik												
TP4-2	Probennahme und Metabolomik												
	Kontinuierliche Probenahme aus dem Anbau in Deutschland												
	Kontinuierliche Probenahme aus dem Mada-Anbau (und Analyse vor Ort)												
	Kontinuierliche Analyse und Datenerfassung												
MRI	Anpassung/Optimierung der etablierten Metabolomics-Methoden an/für die Matrix Vanille												
MRI	Kontinuierliche Analyse und Datenerfassung aus dem Anbau in Deutschland												

Abb. 1: GANTT-Diagramm. Rot markiert sind die Arbeiten, die am MRI durchgeführt wurden.

TP 4: Untersuchungsbegleitende Analysen

TP4-2: Probennahme und Metabolomik

Gemäß Projektplan wurden am MRI Metabolomanalysen von ausgewählten Proben aus den TP1-2 und TP1-3 durchgeführt. Die Kultivierungsversuche in TP1-2 und TP1-3 sowie die Probennahme und der Probenversand zum MRI erfolgten durch die Projektpartner.

Die weitere Vorbereitung der Vanilleproben für die Metabolomanalysen erfolgte nach einem etablierten, standardisierten Verfahren. Jede Probe wurde gefriertrocknet, danach zu einem feinen Pulver vermahlen und abschließend für die Messungen aliquotiert. Zum Zweck der Qualitätssicherung wurden zusätzlich Qualitätskontrollproben durch Vermischung ausgewählter Studienproben hergestellt. Für die Metabolomanalysen wurden die Inhaltsstoffe der Probe mit Methanol extrahiert. Die Metabolomanalysen selbst erfolgten mittels drei Analyseverfahren an zwei komplementären Plattformen: GCxGC-MS, LC-MS mit positiver Ionisierung und negativer Ionisierung.

Anpassung und Optimierung der etablierten Metabolomics-Methoden an die Matrix „Vanille“

Zu Projektbeginn wurden die bestehenden Methoden des MRI gemäß Projektplan an die Matrix Vanille angepasst. Dabei wurden die Methodenteile „Probenvorbereitung“ und „Chromatographische Messmethoden“ betrachtet.

Ziel war es zunächst die Eignung der etablierten Metabolomics-Methoden zu prüfen. In diesem Zusammenhang war die Reproduzierbarkeit der Analysen ein entscheidender Prüfpunkt. Anhand eines Vergleichs der Ergebnisse (u.a. Chromatogramme und Analytenlisten) von mehrfach analysierten Proben konnte gezeigt werden, dass sich Vanilleproben mit der am MRI etablierten Methoden reproduzierbar analysieren lassen. Zusätzlich wurden die Datensätze auf Drifteffekte geprüft. Hinsichtlich der detektierten Massen, Intensitäten und Retentionszeiten der Analyten wurden keine Auffälligkeiten

beobachtet, welche auf einen Drift hindeuten. Somit wurden die etablierten Maßnahmen zur Vermeidung von Drifteffekten wie die Verwendung eines pufferhaltigen Eluenten (Stabilisierung der Retentionszeit), die kontinuierliche Massenkalkulation während der Messung (Minimierung des Massendriffs) und die Injektion von einer Mindestanzahl an Matrixproben (Äquilibrierung der Signalintensitäten) als ausreichend betrachtet.

Die Bedingungen für die Vermahlung der Proben wurden optimiert, sodass ein optimaler Vermahlungsgrad erreicht wurde, gleichzeitig möglichst wenig Material verloren ging und zudem das Probengut nicht erwärmt wurde. In einem weiteren Schritt wurde geprüft, ob die Aufarbeitung der getrockneten und vermahlenden Proben (methanolische Extraktion) angepasst werden muss. Hinsichtlich der LC-MS-Analysen wurde festgestellt, dass bei der für den ersten Versuch gewählten Probenverdünnung von 1:20 (mg Probe/ μ L Methanol) eine zu hohe Anzahl an Analyten im Bereich der Detektorsättigung lag. Auf dieser Grundlage wurde entschieden, die Proben bei zukünftigen Messungen stärker zu verdünnen (1:30), um möglichst viele Analyten mit hoher Signalintensität zuverlässig auswerten zu können.

Kontinuierliche Analyse und Datenerfassung aus dem Anbau in Deutschland

Die Ziele des MRI-Teilprojektes waren: das Metabolom in bestimmten Entwicklungsstadien der Vanillepflanze zu beschreiben (Kapitel 1.1), den Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf das Metabolom zu bestimmen (Kapitel 1.2 und 1.3) sowie Inhaltstoffe zu identifizieren, die eine Rolle bei der Blüteninduktion spielen (Kapitel 1.4).

1.1 Charakterisierung des Vanillemetaboloms

1.1.1 Vergleich des Metaboloms verschiedener Pflanzenorgane

Die Kultivierung der Vanillepflanzen erfolgte unter Indoor-Bedingungen und wurde bei der Fa. Symrise durchgeführt. Für eine umfangreiche Charakterisierung des Metaboloms verschiedener Organe (Blätter, „Stängel“ und Luftwurzeln) wurden die oben beschriebenen Metabolomanalysen durchgeführt. Mithilfe umfangreicher Inhouse-Datenbanken und kurerter externer Datenbanken konnten insgesamt 127 Verbindungen aus einem breiten Spektrum unterschiedlicher Verbindungsklassen identifiziert werden. Hierzu zählten Primärmetaboliten wie Aminosäuren (23), Zuckerverbindungen (21), Fettsäuren (19) und organische Säuren (13) als auch spezifische Sekundärmetaboliten. Zu letzteren gehörten insbesondere Intermediate der Vanillin-Biosynthese (18) (**Abb. 2**), v.a. Hydroxybenzoesäuren, -zimtsäuren und -benzaldehyde, Flavonoide (10), hauptsächlich methoxylierte Flavone (**Abb. 3**), sowie verschiedene Terpenoide (5).

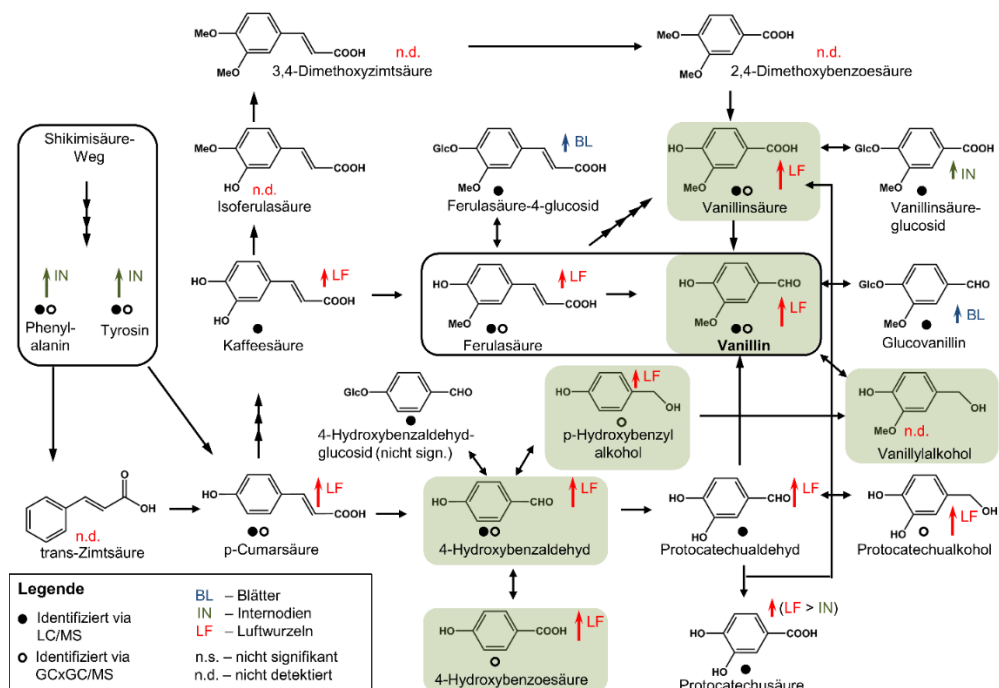


Abb. 2: Vanillin-Biosyntheseweg in *Vanilla planifolia*. Farbige Pfeile zeigen signifikante Unterschiede der Metabolitenintensitäten zwischen den Pflanzenorganen an. Die Länge des Pfeils spiegelt den berechneten Fold-Change (FC) wider: kurze Pfeile, FC < 5; lange Pfeile, FC ≥ 5. Grüne Boxen: Dies Verbindungen sind Schlüssel-Aromastoffe für Vanille. Abkürzungen sind in der Legende dieser Abbildung erläutert (in Anlehnung an Abbildung im publizierten Artikel [1]).

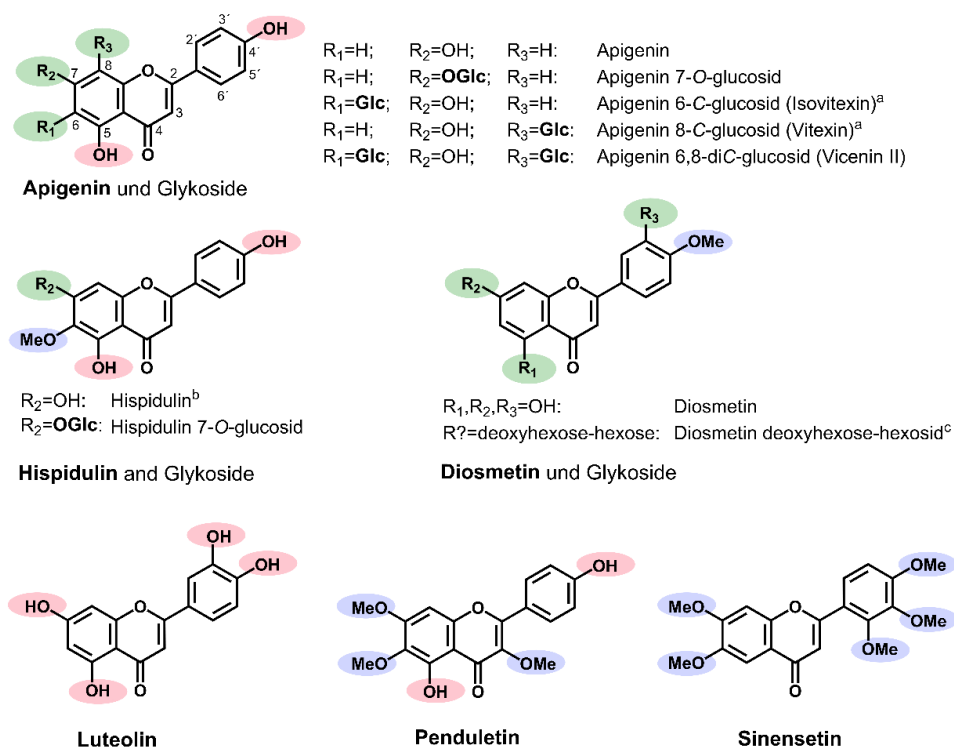


Abb. 3: Identifizierte Flavonoide bzw. deren Glykoside. ^a: Apigenin-6-C-Glucosid und -8-C-Glucosid anhand der verwendeten LC-MS-Methode nicht eindeutig unterscheidbar; ^b: Identifizierung aufgrund der Koelution mit der isomeren Verbindung Diosmetin unsicher (in Anlehnung an Abbildung im publizierten Artikel [1]).

Um die in der Hauptkomponentenanalyse (PCA) beobachteten pflanzenorganspezifischen Unterschiede (Abb. 4) besser verstehen und deuten zu können, wurden die Intensitäten der identifizierten Metaboliten in den Pflanzenorganen unter Verwendung univariater statistischer Verfahren (Kruskal-Wallis-Test und Steel-Dwass-Post-hoc-Test) miteinander verglichen. Dabei zeigten 98 von 127 Metaboliten signifikante Unterschiede. In den Luftwurzelpuben wurden generell höhere Mengen von Flavonoiden (Aglykone z.B. Apigenin und Apigenin-C-Glykoside; Abb. 3), phenolischen Säuren (z.B. Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure; Abb. 2) und Hydroxybenzaldehyden (z.B. 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin; Abb. 2) nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass Luftwurzeln ein besonderes Potential zur Produktion bzw. Speicherung dieser Sekundärmetaboliten besitzen und eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, z.B. *Fusarium oxysporum*, spielen könnten. Für Flavone im Allgemeinen sowie für das in dieser Studie detektierte C-Glucosid (Abb. 3) sind in der Literatur bereits antifungale Wirkungen gegenüber *Fusarium oxysporum* beschrieben [2, 3]. Auf der anderen Seite waren für O-glykosidisch gebundene Sekundärmetaboliten (Glucovanillin, Ferulasäure-4-glucosid siehe Abb. 2; Flavonoid-O-Glykoside siehe Abb. 3) tendenziell erhöhte Intensitäten in Blatt- und/oder Stängelproben im Vergleich zu Luftwurzelpuben nachweisbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich Aglykone (als bioaktivere Form) bevorzugt dort anreichern, wo sie die Pflanze benötigt, wohingegen O-Glykoside vorrangig als Transport- und Speicherform fungieren.

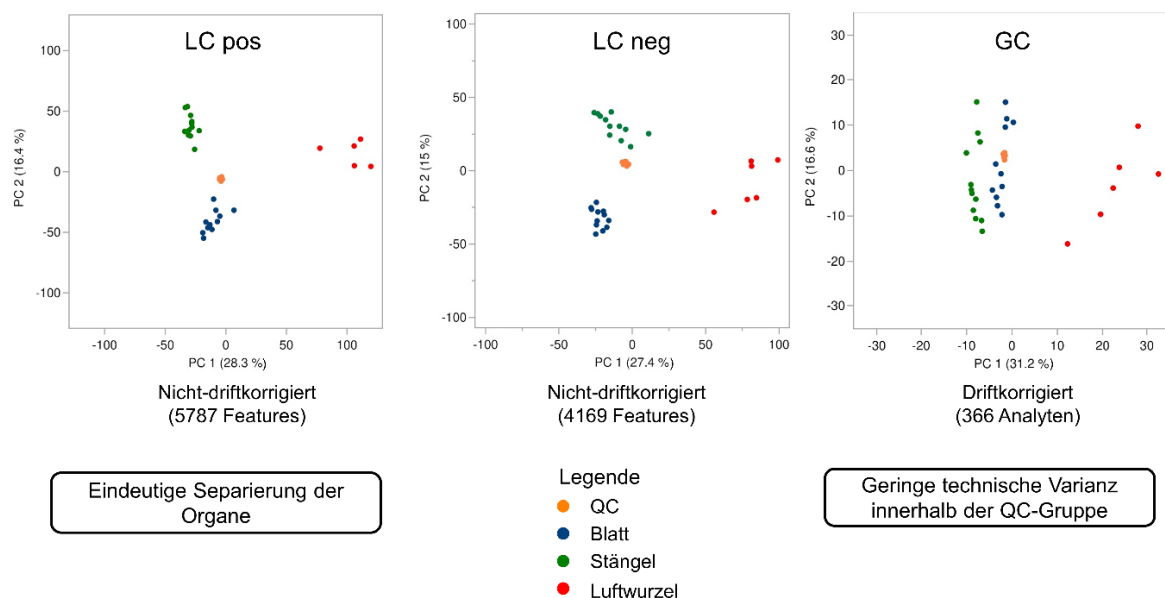


Abb. 4: Vergleichs des Metaboloms verschiedener Pflanzenorgane anhand einer Hauptkomponentenanalyse (in Anlehnung an Abbildung im publizierten Artikel [1]).

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass es sich nach unserem Wissen um die erste Studie handelte, die eine derart umfangreiche Charakterisierung des Metaboloms der Vanillepflanze einschließlich eines detaillierten Vergleichs unterschiedlicher Organe (Blätter, Stängel und Luftwurzeln) ermöglichte. Die Ergebnisse dieser Studie bildeten eine wichtige Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse der nachfolgenden Versuche (siehe Folgekapitel).

Im September 2023 wurden die Ergebnisse auf dem Jahresmeeting der Deutschen Gesellschaft für Metabolomforschung (DGMet) im Rahmen eines Vortrags präsentiert. Zudem wurden die Daten und

Ergebnisse im Juni 2024 in der Fachzeitschrift „Phytochemical Analysis“ veröffentlicht [1]. Weitere Details können dieser Publikation entnommen werden.

1.1.2 Vergleich von Schoten unterschiedlicher Reifegrade

Ende 2024 wurden vom Projektpartner (Fa. Symrise) Vanilleschoten aus dem Indoor-Anbau zur Verfügung gestellt. Dazu zählten Proben von unreifen (grünen) und fermentierten (braunen) Schoten sowie ethanolische Extrakte von grünen, fermentierten und abgereiften Schoten. Um einen besseren Vergleich mit den bei Symrise generierten Extrakten zu ermöglichen, wurde bei der Extraktion des festen Schotenmaterials vom Standardprotokoll abgewichen und anstelle von Methanol ein Ethanol/Wasser-Gemisch als Extraktionsmittel verwendet. Für die Auswertung der Metabolomdaten wurde im ersten Schritt eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Anschließend wurden die Schlüssel-Aromakomponenten identifiziert und deren Gehalte mittels Einpunktkalibrierung grob abgeschätzt.

Erwartungsgemäß zeigten sich im Metabolom der Schotenextrakte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Reifegraden. Aus den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse wurde ersichtlich, dass die Proben von abgereiften Schoten deutlich näher mit den Proben fermentierter Schoten clustern (**Abb. 5**). Daraus lässt sich ableiten, dass die Proben fermentierter und abgereifter Schoten inhaltstofflich höhere Ähnlichkeiten aufweisen und sich andererseits deutlich von den Proben grünen Schoten unterscheiden.

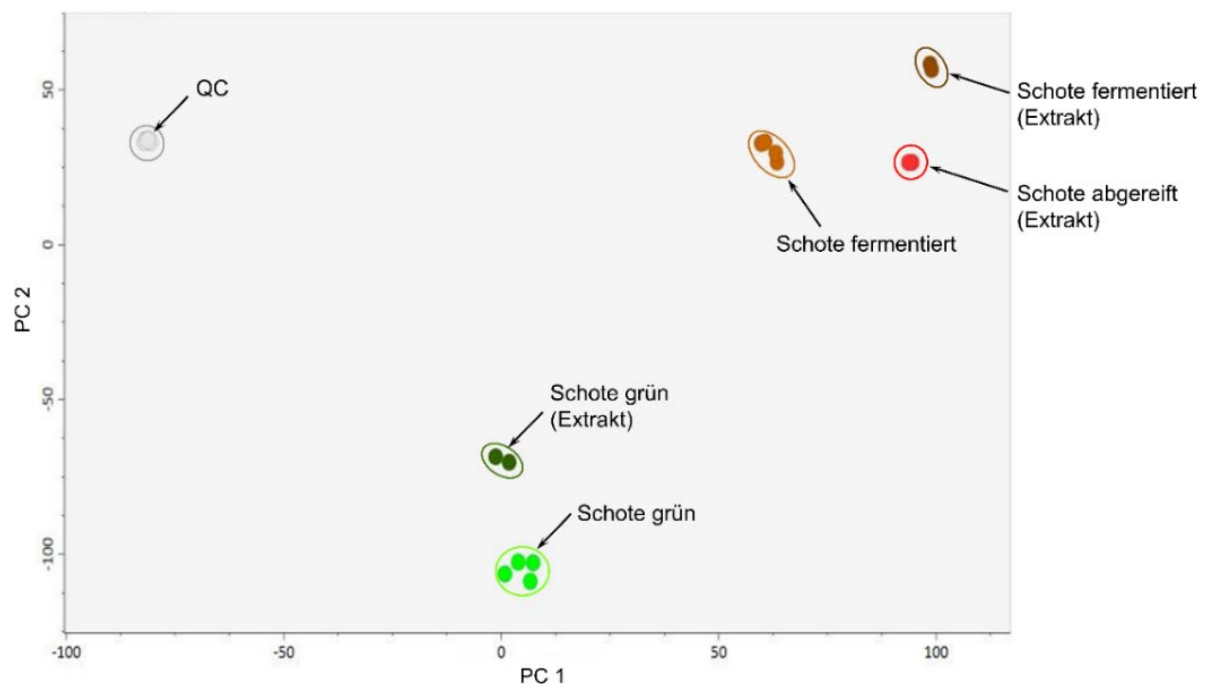


Abb. 5: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse des Metaboloms von grünen Schoten sowie unterschiedlich gereiften (fermentierten bzw. abgereiften) Schoten.

Die Konzentrationen des Hauptaromastoffs Vanillin und seiner Hauptbegleitstoffe (4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure) in der Schote bzw. in daraus hergestellten Extrakten stehen in natürlich-charakteristischen Verhältnissen zueinander und können in Form sogenannter Verhältniszahlen zur Authentizitätsprüfung herangezogen werden. Hierzu hat die

Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh) in einem Positionspaper Referenzwerte für die Bewertung natürlicher Vanillearomen veröffentlicht, welche die Schwankungsbreiten der Konzentrationsverhältnisse von Vanillin zu seinen Hauptbegleitstoffen berücksichtigen, wie sie in verschiedenen wissenschaftlichen Studien ermittelt worden sind [4]. Die angegebenen Schwankungsbereiche der Referenzwerte (**Tab. 1**) spiegeln, wie bei Naturprodukten üblich, Abhängigkeiten von den Anbau- und Bearbeitungsbedingungen (u.a. Klima, Bodenverhältnisse, Erntezeitpunkt, Fermentationsverfahren) wider. Für die Bestimmung der Kennzahlen wurden zunächst die Absolutgehalte (angegeben in g / 100 g Trockengewicht (TW)), von Vanillin und seinen Hauptbegleitstoffen sowie weiteren aromaaktiven Verbindungen mittels externer Einpunktkalibrierung abgeschätzt.

Zwischen den verschiedenen Gruppen wurden sowohl hinsichtlich der Absolutgehalte als auch der Konzentrationsverhältnisse deutliche Unterschiede festgestellt (**Tab. 1**). Hierbei zeigten sich zwischen grünen und fermentierten bzw. abgereiften Schoten erwartungsgemäß die größten Unterschiede. Gleichzeitig waren die Aromaprofile abgereifter und fermentierter Schoten vergleichsweise ähnlich. Beide Beobachtungen standen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Hauptkomponentenanalyse (**Abb. 5**). Bei den grünen Schoten wurden im Vergleich zu fermentierten Schoten um Faktor 5,8 bzw. Faktor 8 höhere Vanillin/4-Hydroxybenzaldehyd-Verhältnisse bzw. Vanillin/Vanillinsäure-Verhältnisse bestimmt, was vor allem auf den 15-fach bzw. 23-fach höheren Gehalt von 4-Hydroxybenzaldehyd (0,106 vs. 0,007 g/100 g TW) bzw. Vanillinsäure (0,138 vs. 0,006 g/100 g TW) in den fermentierten Schoten zurückzuführen war (**Tab. 1**).

Tab. 1: Aus den abgeschätzten Gehalten der Hauptaromakomponenten bestimmte Konzentrationsverhältnisse (Kennzahlen) in Vanilleschoten (*Vanilla planifolia*) variierender Reifegrade und die Referenzwerte der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh) [4].

Verhältnis (Kennzahl)	Schoten grün	Schoten fermentiert	Schoten grün (Extrakt)	Schoten fermentiert (Extrakt)	Schoten abgereift (Extrakt)	Referenzwerte GdCh [a] ([b,c])
Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd	41,32	7,10	4,17	6,46	5,78	10- 20 (9 - 28)
Vanillin / Vanillinsäure	43,80	5,45	45,77	3,03	2,33	12 - 29 (4 - 29)
Vanillinsäure / 4-Hydroxybenzaldehyd	0,94	1,30	0,09	2,13	2,49	0,53 - 1,50 (0,61 - 3,48)

Literatur: [a] DGCCRF, Note d'information n 2003-61: http://julientap.free.fr/travail_fichiers/vanille.pdf

[b] Mosandl A (2001) GC/IRMS-Multielementanalyse zur Authentizitätsbewertung von Vanilleschoten; FEI-Bericht AiF-FV 12062 N, 11.06.2001

[c] Scharrer A, Mosandl A (2001) Dt. Lebensmittel-Rundschau 97:449-456

Des Weiteren wurde für Glucovanillin eine Abnahme von 0,399 g/100 g TW in den grünen Schoten auf 0,042 g/100 g TW in den fermentierten Schoten festgestellt. Die Erklärung hierfür ist, dass während der Fermentation Glucovanillin in Anwesenheit von mikrobiellen β -Glucosidasen zu Vanillin umgewandelt wird [5]. Für Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzaldehyd wurde ein vergleichbarer Trend beobachtet, auch deren Glucoside wiesen in den fermentierten Schoten höhere Werte auf. Die Konzentrationsverhältnisse in den Extrakten fermentierter Schoten liegen bei vier von fünf Kennzahlen knapp oberhalb der unteren Grenze des Referenzbereichs. Einzig das Vanillin/4-Hydroxybenzaldehyd-Verhältnis (7,1) liegt darunter. Im Vergleich dazu wurden bei den zur Verfügung gestellten Extrakten fermentierter Schoten die Referenzwerte bei den auf Vanillin bezogenen Kennzahlen unterschritten (**Tab. 1**). Auch bei den grünen Schoten waren zwischen zur Verfügung gestellten und den am MRI vorbereiteten Extrakten signifikante Unterschiede nachweisbar (**Tab. 1**). Dies spiegelt sich auch darin wider, dass die Proben der zur Verfügung gestellten Extrakte und die Proben der am MRI generierten Extrakte separate Punktwolken im PCA-Plot bildeten (**Abb. 5**). Die Unterschiede lassen sich eventuell auf Alterungseffekte und/oder variierende

Bedingungen während der Extraktion, z.B. abweichende Temperaturen und/oder Extraktionszeiten, zurückführen. Bei den zur Verfügung gestellten Extrakten sind die Konzentrationsverhältnisse bei fermentierten und abgereiften Schoten gut vergleichbar, jedoch unterscheiden sich die Absolutgehalte z.T. deutlich. Für Vanillin und seine Hauptbegleitstoffe sowie für die weiteren Aromakomponenten Vanillylalkohol und 4-Hydroxybenzylalkohol wurden in den Extrakten abgereifter Schoten im Vergleich zu fermentierten Schoten 2-5-fach erhöhte Werte bestimmt.

Die markanten Unterschiede zwischen abgereiften bzw. fermentierten Schoten und grünen Schoten können auf die während der Reifung ablaufenden, komplexen abiotischen bzw. biotischen Prozesse zurückgeführt werden. Im Rahmen des Projektes konnte kein Schotenmaterial aus klassischem Freilandanbau zur Verfügung gestellt werden, sodass ein direkter Vergleich des Schoten-Inhaltstoffprofils, welches mit unserer Metabolomics-Methode erfasst wird, zwischen den Produktionsweisen Freiland vs. Indoor möglich war. Somit konnte dieser Aspekt im Rahmen der Projektlaufzeit nicht näher beleuchtet werden.

1.2 Untersuchung des Einflusses der Kultivierung in erdelosen Anbausystemen auf das Blattmetabolom

Den Anbau von Vanille wurde beim Projektpartner Hochschule Osnabrück in vier erdelosen hydroponischen Kultivierungsversuchen untersucht: Deep-Flow-Technik (DFT), Nutrient Film Technique (NFT), Aeroponik-System (APS), Fogponik-System (FPS). Die Systeme unterscheiden sich im technischen Aufbau und vor allem hinsichtlich der Art und Weise, wie die Vanillepflanze mit Nährstoffen versorgt wurden. Bei DFT bzw. NFT befanden sich die Wurzeln bzw. Wurzelspitzen permanent in der Nährstofflösung, bei APS bzw. FPS wurden die Wurzeln dagegen nur periodisch mit einer Nährstofflösung besprüht (Druckluft) bzw. benebelt (Ultraschallvernebler).

Mithilfe des ungerichteten Metabolomics-Ansatzes und multivariater Statistik konnten wir zeigen, dass die verschiedenen Kultivierungssysteme das Metabolom der Pflanzen signifikant beeinflussen. In Verbindung mit den vom Projektpartner in Osnabrück erhobenen pflanzenphysiologischen Daten, wurde deutlich, dass der Grad der homogenen Pflanzenentwicklung mit der gruppenspezifischen Streuung in den Metabolomdaten korrelierte. So zeigten die Proben von sich besonders homogen entwickelnden Pflanzen (DFT, FPS) im Vergleich zu Proben von Pflanzen aus inhomogenerer Entwicklung (APS, NFT) eine deutlich geringere Streuung im Inhaltsstoffprofil. FPS und DFT trennten sich in der statistischen Analyse (PCA) vollständig voneinander ab und zeigten auch phänotypisch die größten Unterschiede. Für die von der Hochschule Osnabrück festgestellten Unterschiede bei der Pflanzengesundheit und dem Wachstum konnten mit Hilfe unserer Metabolomdaten erste Erklärungsansätze abgeleitet werden. Im Fall der „gesünderen“ FPS-Pflanzen waren spezifische, für die Pathogenabwehr relevante Sekundärmetaboliten erhöht, darunter Phenole wie Sinapinsäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und fünf Terpene ([Abb. 6](#)).

Substanzklasse	Metabolit	Feature-ID	Plattform	Mittelwerte der Intensitäten				x-fache Änderung der Intensität		
				APS	DFT	FPS	NFT	FPS/DFT	FPS/APS	FPS/NFT
Aminosäuren und Amine	Glycin 3TMS	A0051_c	GC	2,52E+07	7,09E+07	1,41E+06	3,58E+07	0,02	0,06	0,04
	Glutamin 3TMS	A0164_c	GC	1,58E+07	6,38E+07	1,93E+06	2,73E+07	0,03	0,12	0,07
	Serin 3TMS	A0062_c	GC	8,17E+06	2,34E+07	9,84E+05	1,08E+07	0,04	0,12	0,08
	N-alpha-Acetyllysine 2TMS	A0229_c	GC	1,08E+06	1,70E+06	8,29E+04	1,07E+06	0,05	0,08	0,08
	Tryptophan 2TMS	A0289_c	GC	9,42E+05	1,23E+06	6,33E+04	7,40E+05	0,06	0,07	0,09
	Homoserin 3TMS	A0077_c	GC	4,17E+05	1,05E+06	6,63E+04	5,54E+05	0,06	0,16	0,12
	Alanin 2TMS	A0015_c	GC	9,33E+06	3,37E+07	2,45E+06	1,21E+07	0,07	0,26	0,20
	Valin 2TMS	A0035_c	GC	1,28E+06	3,43E+06	2,55E+05	1,57E+06	0,07	0,20	0,16
	Threonin 3TMS	A0069_c	GC	6,80E+06	1,63E+07	1,35E+06	8,46E+06	0,08	0,20	0,16
	beta-Cyanolanin 2TMS	A0066_c	GC	1,06E+06	2,38E+06	2,01E+05	1,22E+06	0,08	0,19	0,16
	Asparagin-ähnlich 4TMS	A0124_c	GC	4,69E+06	1,07E+07	9,29E+05	5,14E+06	0,09	0,20	0,18
	Oxoprolin 2TMS	A0099_c	GC	5,96E+06	2,13E+07	1,93E+06	8,15E+06	0,09	0,32	0,24
	Prolin 2TMS	A0049_c	GC	4,42E+05	9,42E+05	8,64E+04	5,63E+05	0,09	0,20	0,15
	Asparagin 3TMS	A0136_c	GC	8,01E+07	1,50E+08	1,73E+07	7,86E+07	0,12	0,22	0,22
	Aminosäure-ähnlich (RI = 1267; M ⁺ : n.d.)	A0121_c	GC	9,35E+05	2,09E+06	1,98E+05	1,04E+06	0,09	0,21	0,19
	Aminosäure-ähnlich (RI = 1247; M ⁺ : n.d.)	A0115_c	GC	4,23E+05	8,79E+05	1,00E+05	4,12E+05	0,11	0,24	0,24
	Isoleucin 2TMS	A0048_c	GC	3,97E+05	1,02E+06	1,20E+05	4,23E+05	0,12	0,30	0,28
	Asparaginderivat-ähnlich	A0207_uc	GC	1,55E+05	4,87E+05	6,65E+04	2,05E+05	0,14	0,43	0,32
	Asparaginderivat-ähnlich 2 TMS	A0123_uc	GC	4,51E+04	4,15E+05	6,59E+04	1,58E+05	0,16	1,46	0,42
	Ornithin 4TMS	A0179_uc	GC	2,58E+05	3,24E+05	5,37E+04	1,56E+05	0,17	0,21	0,34
	5-Hydroxynorvalin-Isomer 3TMS	A0110_c	GC	4,26E+06	6,75E+06	1,31E+06	4,87E+06	0,19	0,31	0,27
	Asparaginsäure 3TMS	A0100_c	GC	8,11E+06	1,26E+07	3,44E+06	9,37E+06	0,27	0,42	0,37
	gamma-Aminobuttersäure 3TMS	A0102_c	GC	1,24E+06	1,50E+06	5,32E+05	1,20E+06	0,35	0,43	0,44
	Glutaminsäure 3TMS	A0125_c	GC	1,01E+07	1,49E+07	6,00E+06	1,06E+07	0,40	0,60	0,57
	Spermidin	X00238	LCpos	1,44E+04	1,58E+04	7,45E+03	1,24E+04	0,47	0,52	0,60
	Ethanolamin 3TMS	A0043_c	GC	4,22E+06	5,65E+06	3,34E+06	4,62E+06	0,59	0,79	0,72
Lipide (Terpenoide)	beta-Stigmasterol TMS	A0442_c	GC	5,41E+06	4,19E+06	5,92E+06	5,23E+06	1,41	1,09	1,13
	Phytol TMS-Isomer2	A0283_c	GC	1,58E+06	9,75E+05	1,78E+06	1,41E+06	1,83	1,13	1,27
	Neophytadien oder Isomer (RI = 1512; M ⁺ : 278)	A0186_c	GC	3,98E+06	3,45E+06	6,70E+06	5,36E+06	1,94	1,12	1,25
	Neophytadien oder Isomer (RI = 1553; M ⁺ : 278)	A0213_c	GC	9,68E+05	4,84E+05	1,09E+06	8,56E+05	2,25	1,12	1,27
	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen (phytyl-2) oder Isomer	A0191_uc	GC	1,39E+05	5,90E+04	1,99E+05	8,67E+04	3,37	1,43	2,29
Sonstige	Adenin	X00184	LCpos	1,38E+03	1,33E+03	2,24E+03	1,37E+03	1,69	1,62	1,64
	Citrat 4TMS	A0181_c	GC	5,91E+06	1,07E+07	3,36E+06	5,98E+06	0,31	0,57	0,56
Organische Säuren	2-Isopropyläpfelsäure	X00265	LCneg	3,15E+04	6,29E+04	2,10E+04	4,32E+04	0,33	0,67	0,49
	Maleinsäure 2TMS	A0053_c	GC	5,05E+06	6,27E+06	2,74E+06	5,34E+06	0,44	0,54	0,51
	Citramalsäure 3TMS	A0083_c	GC	1,22E+07	1,64E+07	8,78E+06	1,26E+07	0,53	0,72	0,70
	Fumarsäure 2TMS	A0059_c	GC	1,99E+06	2,67E+06	1,46E+06	2,31E+06	0,55	0,73	0,63
	3-Methylglutaminsäure-Isomer 2TMS	A0089_c	GC	4,73E+05	5,48E+05	3,07E+05	4,87E+05	0,56	0,65	0,63
	Bernsteinsäure 2TMS	A0055_c	GC	2,94E+06	3,91E+06	2,20E+06	3,52E+06	0,56	0,75	0,62
	Sinapsinsäure	X01216	LCpos	1,31E+03	1,05E+03	1,88E+03	1,27E+03	1,78	1,44	1,48
Phenolische Säuren und Derivate	4-Hydroxybenzaldehyd	X00083	LCneg	8,92E+03	6,90E+03	1,25E+04	9,53E+03	1,80	1,40	1,31
	Disaccharid/Glykosid	A0395_c	GC	5,37E+05	4,48E+05	5,61E+05	5,00E+05	1,25	1,05	1,12
Zuckerverbindungen	Phosphoryliertes Polyol (C5-Region)	A0158_c	GC	2,56E+06	2,66E+06	4,29E+06	3,55E+06	1,61	1,20	1,21
	C5-Zuckersäure	A0156_c	GC	2,26E+05	4,36E+05	9,59E+04	2,81E+05	0,22	0,42	0,34
Zuckerverbindungen (Zuckersäuren)	Threonsäure 4TMS	A0114_c	GC	7,80E+05	1,25E+06	4,80E+05	9,94E+05	0,38	0,62	0,48
	Erythronsäure 4TMS	A0108_c	GC	3,87E+05	4,70E+05	2,05E+05	4,27E+05	0,44	0,53	0,48

Abb. 6: Identifizierte Metaboliten in Blattproben von *Vanilla planifolia*, welche signifikante Intensitätsunterschiede zwischen den untersuchten Kultursystemen (DFT, NFT, APS, FPS) zeigten (in Anlehnung an Abbildung im publizierten Artikel [6]).

Für Pflanzen im DFT-System wurde ein deutlicher Anstieg des Stickstoffmetabolismus im Vergleich zu allen anderen Systemen beobachtet, erkennbar u.a. durch erhöhte Aminosäurelevel (Abb. 6). Insgesamt lässt sich die effizientere Stickstoffaufnahme im DFT-System gut damit erklären, dass sich die Wurzeln in DFT über den gesamten Versuchszeitraum komplett in der Nährlösung befanden. Daneben konnten auf Basis der PCA-Plots zwei Ausreißer in der APS-Gruppe identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Pflanzen, bei denen zum Ende des Untersuchungszeitraums nekrotische Veränderungen an der Wurzelspitze auftraten. Im Unterschied zu den gesunden Pflanzen waren in diesen Proben erhöhte Mengen des unspezifischen Stressmarkers γ -Aminobuttersäure nachweisbar. Zudem waren spezifische Sekundärmetaboliten, darunter 4-Hydroxybenzaldehyd sowie Flavonoide (z.B. Hispidulin-4-O-Glucosid) und phenolische Säuren (z.B. Ferulasäure-4-O-Glucosid) bzw. davon abgeleitete Derivate wie *N*-trans-Feruloyltyramin signifikant erhöht. Diese Verbindungen sind bekanntermaßen in der Lage die Pflanzenabwehr gegenüber Pathogenen zu stärken. Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mittels ungerichteter Metabolomanalysen von Blattmaterial phänotypische Auffälligkeiten an einem anderen Organ (hier: der Wurzel) nachzuweisen. Dies unterstreicht die hohe Leistungsfähigkeit der eingesetzten Metabolomics-Methoden.

Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die den Anbau von Vanille in erdelosen hydroponischen Systemen und deren Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum, die Entwicklung und metabolische Veränderungen untersucht hat. Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden zusammen mit der Hochschule Osnabrück in der Fachzeitschrift „The Journal of Horticultural Science and Biotechnology“ publiziert [6]. Weitere Details können dieser Publikation entnommen werden.

1.3 Untersuchung des Einflusses des Nährstoffangebotes auf das Blattmetabolom

Ziel dieses von der Hochschule Osnabrück durchgeführten Versuchs war es den Einfluss von Nährstofflösungen unterschiedlicher pH-Werte und elektrochemischer Leitfähigkeiten/Ionengehalten (EC-Werten) zu untersuchen und somit grundlegende Erkenntnisse über die optimalen Wachstumsbedingungen der Vanille zu gewinnen. Dabei wurden Nährlösungen unterschiedlicher pH- und EC-Werte appliziert. Die von der Hochschule Osnabrück bereitgestellten Vanilleblattproben wurden gemäß der oben beschriebenen Metabolomics-Methode analysiert. Um neben dem Einfluss der einzelnen Faktoren auch die Wechselwirkungen zwischen pH-Wert und EC-Wert zu berücksichtigen, wurden alle neun möglichen Faktorkombinationen hinsichtlich Unterschiede im Blattmetabolom statistisch getestet.

Für die statistische Auswertung wurden die Metabolomdaten zunächst einer PCA unterzogen. Anhand der zugehörigen PCA-Plots war jedoch keine Unterscheidung der neun Behandlungsgruppen möglich. Dies zeigte, dass die pH- bzw. EC-bedingten Unterschiede im Metabolom im Vergleich zur biologischen Varianz innerhalb der Einzelgruppen verhältnismäßig gering sind.

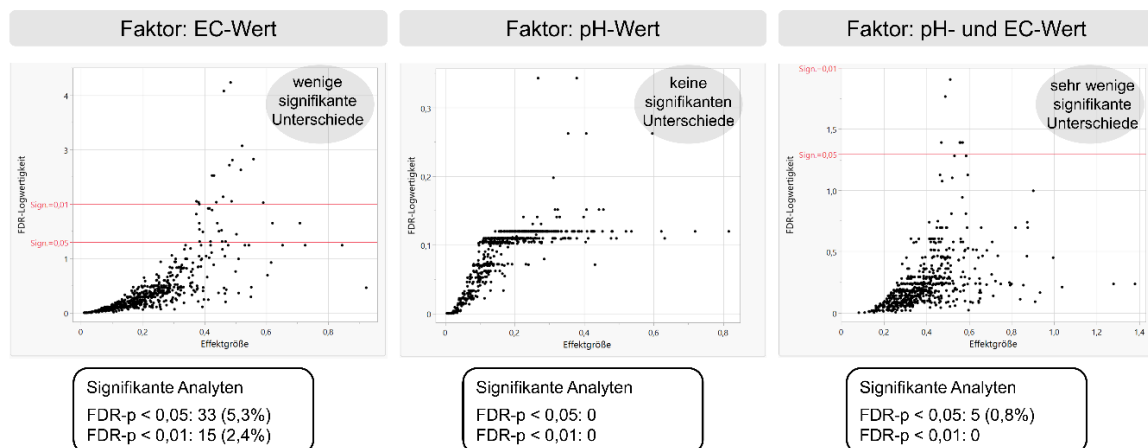


Abb. 7: Ergebnisse des Response-Screenings am Beispiel der GCxGC-MS-Daten unter Berücksichtigung des Faktors EC-Wert (links), des Faktors pH-Wert (Mitte) sowie der Kombination „pH- und EC-Wert“ (rechts).

Um zu prüfen, ob auf Einzelmetabolitenebene ggf. trotzdem signifikante Unterschiede bestehen, wurde ein sogenanntes Response-Screening durchgeführt. Bei diesem statistischen Verfahren werden die Intensitäten aller Analyten über alle Gruppen hinweg hinsichtlich vorhandener signifikanter Unterschiede miteinander verglichen. Als signifikanter Unterschied wurde ein False discovery rate (FDR) korrigierte p-Wert des betreffenden Features/Analyten von kleiner als 0,05 bzw. 0,01 definiert. Das Response-Screening wurde sowohl für die Gruppenkombination „pH- und EC-Wert“ (Vergleich von 9 Gruppen) als auch für die Einzelfaktoren pH-Wert bzw. EC-Wert durchgeführt (Vergleich von je 3 Gruppen). Signifikante Ergebnisse beim Response-Screening wurden im Anschluss mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-hoc-Tukey-Test verifiziert.

Die Ergebnisse des Response-Screening am Beispiel der GC-Daten verdeutlichten, dass die Variation des pH-Wertes keinen relevanten Einfluss auf das Metabolom hatte (Abb. 7, Mitte). Hinsichtlich des Faktors EC-Wert (Abb. 7; links) wurden jedoch für einzelne Signale signifikante Intensitätsunterschiede in den Gruppen bestimmt. Allerdings waren die Effekte nur für einen geringen Anteil der Analyten (5,3% bei $\text{FDR-p} < 0,05$ bzw. 2,4% bei $\text{FDR-p} < 0,01$) signifikant. Für die beiden LC-Datensätze wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt). Generell ist zu bemerken, dass die Intensitätsunterschiede,

sofern vorhanden, verhältnismäßig gering waren (Fold-Changes: 0,5–2,0) und signifikante Unterschiede nur bei Pflanzen der Behandlungsgruppe mit dem höchsten EC-Wert (1,8 mS) auftraten. Eine Ursache könnte sein, dass die Pflanzen unter diesen Bedingungen einem gewissen Grad an Salzstress ausgesetzt gewesen waren. Diese These wird durch die Identifizierung verschiedener osmolytisch-aktiver Aminosäuren und Zuckerverbindungen gestützt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem Versuch die unterschiedlich zusammengesetzten Nährlösungen nur einen geringen Einfluss auf das Blattmetabolom der Vanille hatten. Es ist geplant diese Ergebnisse zusammen mit den Daten aus einem zweiten von der Hochschule Osnabrück durchgeführten Nährstoffversuch zu vereinen und gemeinsam mit den Projektpartnern in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift zu veröffentlichen.

1.4 Untersuchungen zur Blüteninduktion

Die Blütenbildung stellt die Voraussetzung für die Ernte der begehrten Vanilleschoten dar. Vanille gehört zu den Orchideen und blüht zum ersten Mal i.d.R. erst nach 2-5 Jahren der Kultivierung. In einem von der Hochschule Osnabrück durchgeführten Versuch sollte der Einfluss von verschiedenen Umwelteinflüssen auf die Blütenbildung der Vanille wissenschaftlich untersucht werden. Hierfür wurden die Vanillepflanzen über einen bestimmten Zeitraum mit dem Phytohormon Gibberellinsäure (GA-3) behandelt bzw. Trockenstress und/oder Kältestress ausgesetzt. Die zu Versuchsbeginn eingesetzten Pflanzen waren unterschiedlich alt und wurden entweder im Phytotron oder im Dachgewächshaus kultiviert. Während des Untersuchungszeitraums konnten vom Projektpartner bei keiner Pflanze Blüten oder Blütenansätze nachgewiesen werden. Das von der Hochschule Osnabrück zur Verfügung gestellte Blatt- bzw. Luftwurzelmaterial wurde am MRI nach Standardprotokoll vorbereitet und mittels LC/MS- bzw. GCxGC-MS-Metabolomics analysiert.

Im ersten Schritt wurde geprüft, welche Behandlung (Faktor oder Faktorkombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu den größten Veränderungen im Metabolom führten, da dies einen ersten Hinweis hinsichtlich der zu erwartenden Blütenbildung geben könnte. Hierzu wurden die bereinigten Metabolomdaten mittels PCA statistisch ausgewertet. Wie aus einer vorangegangenen Studie zum Pflanzenorganvergleich (siehe Unterkapitel 1.1.1) bereits zu erwarten war, ließen sich Blatt- und Luftwurzelproben eindeutig voneinander unterscheiden. Da von Luftwurzeln deutlich weniger Einzelproben zur Verfügung standen, wurden bei der nachfolgenden statistischen Analyse ausschließlich Blattproben berücksichtigt.

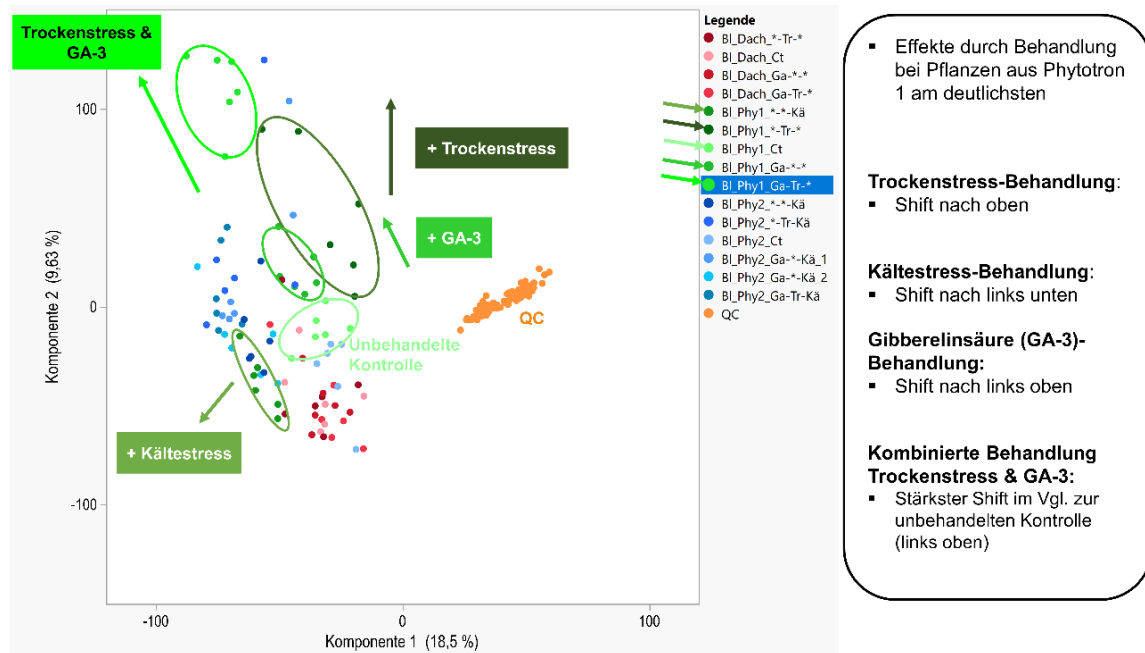


Abb. 8: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt für Blattproben von unter variierenden Bedingungen kultivierten Vanillepflanzen.

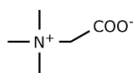
Es wurde festgestellt, dass sich das Blattmetabolom behandelter Pflanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im PCA-Plot wie folgt unterschied (**Abb. 8**):

1. Die Kältestressbehandlung führte zu einem Shift der Proben nach links unten.
2. Pflanzen, die mit Gibberellinsäure behandelt wurden, shiften nach links oben.
3. Pflanzen, die Trockenstress ausgesetzt waren, shifteten deutlich nach oben.
4. Die größten Veränderungen wurden bei GA-3-behandelten trockengetressten Pflanzen beobachtet, d.h. die Kombination der Faktoren Trockenstress und Phytohormonbehandlung veränderte das Blattmetabolom stärker als die jeweiligen Einzelbehandlung, was auf einen synergistischen Effekt hindeutet.

Ob die beobachteten Effekte auf das Metabolom einen Einfluss auf die Blütenbildung haben, ließ sich nicht ableiten.

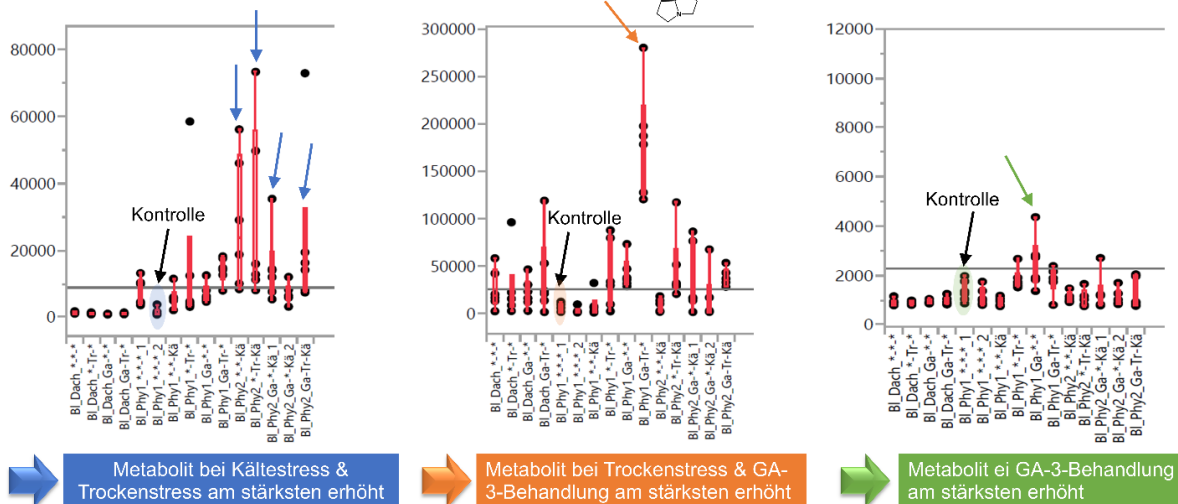
Im nächsten Schritt wurde geprüft, welche individuellen Verbindungen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sind. Insgesamt konnten 24 Metaboliten identifiziert werden. Hierbei wurden neun Verbindungen detektiert, die bisher nicht in Vanille nachgewiesen werden konnten. Ein Beispiel ist Thesinin-4-O- β -D-glucosid, welches in Luftwurzeln in erhöhten Mengen nachweisbar war. Die Fähigkeit zur Biosynthese von Pflanzenstoffen der Thesinin angehörigen Strukturklasse wurde jedoch bereits in Wurzelspitzen und jungen Blütenknospen der Orchidee *Phalaenopsis* gezeigt [7].

Insgesamt wurden neun Metaboliten identifiziert, welche im Vergleich zu der zugehörigen unbehandelten Kontrolle erhöhte Intensitäten aufwiesen. Bei kältegestressten Pflanzen wurden drei charakteristische Verbindungen identifiziert: die quartäre Ammoniumverbindung Betain (**Abb. 9**), ein bekannter Kältestress-Marker [8], die phenolische Säure Sinapinsäure sowie Naringenin/Naringenchalkon, frühe Intermediate des Flavonoid-Stoffwechselweges [9].



d

Chemical structure of compound 10, showing a pyrrolidine ring substituted with a methyl group and a side chain containing an ester, a trans-alkene, a phenyl ring, and a glucose moiety.

O=C1C=CNc2ccccc12

Bei trockengestressten und GA-3-behandelten Pflanzen, wurden neben letztgenannter Verbindung auch Apigenin 6-C/8-C-Glucosid, sowie verschiedene Aminosäuren in erhöhten Mengen gefunden. Indol-3-carbaldehyd wurde als diskriminierender Marker für GA-3-behandelte, nicht-gestresste Pflanzen identifiziert (**Abb. 9**). Inwieweit diese Metaboliten eine Rolle bei der Blüteninduktion spielen, lässt sich anhand der zugrundeliegenden Daten nicht beurteilen. Hierfür müssen zwingend Daten von blühenden Vanillepflanzen erhoben und diese mit den Daten nicht blühender Pflanzen verglichen werden. Erst dann kann ermittelt werden, welche Verbindungen (Marker) bei der Blüteninduktion eine Rolle spielen.

Arbeitsplan laut Antrag	Stand der Arbeiten
TP4-2	abgeschlossen

Für den Projektzeitraum (01.01.2022 – 31.12.2024) wurde das finanzielle Budget (lt. Finanzierungsplan: 172.751,74 €) mit entstandenen Gesamtkosten von 172.750,33 € nahezu vollständig ausgeschöpft. Die Personalkosten (Pos. 0812) beliefen sich auf 162.918,53 € und wurden für die Finanzierung eines Wissenschaftlers (E13) vom 10.08.2022 bis 31.12.2025 verwendet. Für Reisen (Pos. 0846) wurden 1.330,70 € ausgegeben. Diese Mittel wurden für Reisen zu Projekttreffen bei den Projektpartnern (20.-21.09.2022, Osnabrück und 12.-13.06.2023, Holzminden) sowie für die Teilnahme an einer Tagung (Jahresmeeting der Deutschen Gesellschaft für Metabolomforschung, 27.-28.09.2023) verwendet. Die

sonst. sächlichen Verwaltungsausgaben (Pos. 0843) beliefen sich auf 8.501,10 € für Kosten im Zusammenhang mit den Metabolomanalysen. Davon entfielen 5.286,38 € auf Verbrauchsmaterial (z.B. Lösungsmittel, Vials, Einwegspritzen), 1.791,05 € auf Kalibrationslösungen, 1.148,54 € auf eine HPLC-Säule und 275,13 € auf Referenzstandards.

Für weitere Details wird auf die zugehörigen Verwendungsnachweise verwiesen.

3. F&E-Ergebnisse Dritter

Es sind keine F&E-Ergebnisse Dritter über den Stand des Wissens, der bereits im Antrag beschrieben ist, bekannt geworden.

4. Verwertung

Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Nach unserem derzeitigen Kenntnisstand wurden keine Schutzrechte erteilt und es liegen keine Anmeldungen für Erfindungen bzw. Schutzrechte vor.

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Eine wirtschaftliche Verwertung der Projektergebnisse ist für das MRI als Bundesforschungsinstitut selbst nicht relevant. Jedoch hat der Erfahrungsaustausch im Verbund zu einer Kompetenzerweiterung des MRI im Bereich Indoor bzw. Vertical Farming beigetragen, der als neuer Kompetenzbereich am MRI aufgebaut werden soll. Dieses Projekt wird die Grundlage für die Beantragung weiterer Forschungsprojekte und Vorhaben in diesem Forschungsbereich bilden. Ein aktuelles Beispiel ist die Beteiligung des MRI an einer Ausschreibung zum Indoor-Anbau von Nahrungspflanzen mit wertgebenden Inhaltsstoffen im Rahmen der Bekanntmachung „Innovationen für zukunftsweisende Produktionssysteme“ des BMLEH (zuvor BMEL). Derzeit befindet sich das Projekt noch in Begutachtung. Mit einer Entscheidung wird im Herbst 2025 gerechnet. Eine erfolgreiche Projektmittelbeantragung konnte bereits durch die Bewilligung des im Innovationsraum NewFoodSystems verorteten Projekts „FoxyVanil“ (01/2024-12/2025) erreicht werden.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Projektergebnisse verdeutlichen, dass sich unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, abhängig von der Intervention, unterschiedlich stark auf das Pflanzenmetabolom auswirken und dass diese Veränderungen besonders effizient mittels der Metabolomics-Technologie erfasst werden können. Ein Beispiel dafür ist der Einsatz und Vergleich hydroponischer Kultivierungssysteme. Hier zeigte sich, dass sich die verschiedenen Systeme in unterschiedlicher Weise auf das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit auswirken können. Mithilfe der am MRI etablierten Metabolomics-Methoden und mithilfe der umfangreichen Inhouse-Datenbanken war es möglich die zugrundeliegenden molekularen Stoffwechselprozesse näher zu beschreiben und die beobachteten Veränderungen zu interpretieren. Zudem deuten erste Ergebnisse aus diesem Projekt darauf hin, dass eine Pathogeninfektion der Vanillepflanze zu deutlichen Veränderungen im Metabolom führt. Mittels der eingesetzten Metabolomics-Methoden konnten wir zeigen, dass pathogen-induzierte Veränderungen im Blattmetabolom nachweisbar sind, selbst dann, wenn die phänotypischen Schäden (Nekrosen) an einem

anderen Organ auftraten (siehe Kapitel 1.2). Ein vielversprechender Ansatz könnte daher darin bestehen Markerverbindungen für eine Pathogeninfektion zu identifizieren bzw. die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogen näher zu beleuchten. Dadurch ließen sich die konkurrierende Abwehrstrategien von Pflanze und Pathogen besser verstehen, und die daraus gewonnenen Erkenntnisse für eine Optimierung des Pflanzenanbau nutzen. Ein solcher Ansatz wird aktuell im oben erwähnten FoxyVanil-Projekt verfolgt, in welchem die Wechselwirkung zwischen Vanillepflanze und dem Schadpilz *Fusarium oxysporum* untersucht wird.

Teile der Projektergebnisse werden im Jahr 2025 auf der Konferenz „Towards New Food Systems“ (28.–30. Oktober) in Berlin sowie auf dem Konsortialtreffen in Karlsruhe (26.–27. November) präsentiert. Ein wissenschaftlicher Fachartikel zum hydroponischen Anbau von Vanille wurde kürzlich publiziert (siehe Kapitel 1.2) [6]. Ein mit den Projektpartner verfasste Übersichtsartikel, der insbesondere die Herausforderungen im Vanilleanbau thematisiert, befindet sich zurzeit in Begutachtung. Gemeinsam mit den Projektpartnern ist ein weiterer wissenschaftliche Fachartikel geplant, welcher die Daten zur Nährstoffversorgung der Vanille umfassen soll (siehe Kapitel 1.3). Für weitere Details zu allen bisherigen und geplanten Publikationen siehe Projektbericht Teil III, Kapitel 1).

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Die durch das Verbundvorhaben gewonnen Erkenntnisse, Ergebnisse und Erfahrungen, die gemeinsam mit den Projektpartnern im Bereich Indoor-Farming erzielt wurden, ermöglichen es dem MRI neue Forschungsfragen abzuleiten und neue Forschungsprojekte zu initiieren. Ein Beispiel ist das bereits das im Abschnitt „Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende“ beschriebene Projekt FoxyVanil. Ein zweites Beispiel ist das in der Begutachtung befindliche Projekt, welches sich mit dem Indoor-Anbau von Nahrungspflanzen mit wertgebenden Inhaltsstoffen beschäftigt und den Fokus auf unterirdisch wachsende Pflanzenprodukte legt, da zum Indoor-Anbau dieser Produkte bisher noch keine verlässlichen Systeme existieren. Der Schwerpunkt des MRI wird auch hier auf der Bewertung der Qualität und Sicherheit der Pflanzenprodukte liegen mit dem Ziel neue Konzepte zur Sicherung und Verbesserung der Qualität und Sicherheit von pflanzlichen Lebensmitteln zu entwickeln.

5. Veröffentlichung nach Nr. 5 NABF/NAKF

Bezugnehmend auf Nr. 5.4 NABF und Nr. 5.4 NKBF 2017 wird dieser Schlussbericht an die Technische Informationsbibliothek Hannover (TIB) übersendet.

6. Literaturverzeichnis

[1] Beer, F., Weinert, C. H., Wellmann, J., Hillebrand, S., *et al.*, Comprehensive metabolome characterization of leaves, internodes, and aerial roots of *Vanilla planifolia* by untargeted LC–MS and GC × GC–MS. *Phytochem. Anal.* 2025, 36, 30-51.

- [2] Mierziak, J., Wojtasik, W., Kostyn, K., Czuj, T., *et al.*, Crossbreeding of transgenic flax plants overproducing flavonoids and glucosyltransferase results in progeny with improved antifungal and antioxidative properties. *Mol. Breed.* 2014, *34*, 1917-1932.
- [3] Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A., Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* 2014, *19*, 16240-16265.
- [4] Gesellschaft deutscher Chemiker: Grundlagenpapier der Arbeitsgruppe Aromastoffe und der Arbeitsgruppe Stabilisotopenanalytik in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft zum Thema: Herkunft und Authentizität von Vanillearomen, 2010, 1-12.
- [5] Havkin-Frenkel, D. B., F. C., *Handbook of Vanilla Science and Technology*, Wiley-Blackwell 2011.
- [6] Vahl, M., Soukup, S. T., Beer, F., Weinert, C. H., *et al.*, Influence of hydroponic cultivation subsystems on vegetative growth, vigour, and metabolite profiles in vanilla. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2025, doi:10.1080/14620316.2025.2515959.
- [7] Anke, S., Gondé, D., Kaltenegger, E., Hänsch, R., *et al.*, Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Phalaenopsis* orchids: Developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flower buds. *Plant Physiol.* 2008, *148*, 751-760.
- [8] Zinta, G., Singh, R. K., Kumar, R., Cold adaptation strategies in plants—An emerging role of epigenetics and antifreeze proteins to engineer cold resilient plants. *Front. Genet.* 2022, *13*.
- [9] Davies, K. M., Jibran, R., Zhou, Y., Albert, N. W., *et al.*, The Evolution of Flavonoid Biosynthesis: A Bryophyte Perspective. *Front. Plant Sci.* 2020, *11*.