



Der Reservestoffwechsel fruktanhaltiger Nutzpflanzen

Marco FREHNER, Institut für Pflanzenwissenschaften, Gruppe Futterbau und Ertragsbildung, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich

Fruktan ist ein fruktosereiches wasserlösliches Kohlenhydrat, das in vielen Nutzpflanzen als Reservestoff vorkommt. In Futtergräsern hat es eine grosse Bedeutung für die Überwinterung und den Wiederaustrieb nach einer Nutzung. Bei Getreidearten ist das Fruktan eine wichtige Komponente der Ertragsicherheit. In der Modellpflanze Topinambur ist der Fruktanstoffwechsel gut erforscht und dient als Basis zum Verständnis dieses Stoffwechsels in den Gräsern und Getreidearten.

Bedeutende Anteile der landwirtschaftlich genutzten Flächen der Schweiz sind Natur- oder Ansaatwiesen. Die häufigsten pflanzlichen Vertreter darin sind die Gräser. Dies wird ihnen unter anderem dadurch ermöglicht, dass sie in ihren vegetativen Geweben Reserven aufbauen, die nach einer Nutzung - Schnitt oder Weide - sowie im Frühjahr in einen raschen Wiederaustrieb umgesetzt werden. Aus diesen Gründen sind die Kohlenhydratreserven der Gräser in unserer Gruppe wiederholt auf Interesse gestossen (Bucher *et al.* 1987; Dubois *et al.* 1990; Frehner *et al.* 1993; Monteil *et al.* 1989; Winzeler *et al.* 1989). Erstaunlicherweise sind diese Kohlenhydrate, die Fruktane, ungeachtet ihrer Bedeutung nicht allgemein bekannt. Ebenso wird der Stoffwechsel der Fruktane und dessen Regulation erst sehr lückenhaft verstanden (Pollock und Cairns 1991). Längerfristig möchten wir den Einfluss der Umwelt und verschiedener Nutzungsarten auf die Physiologie der Fruktane möglichst genau verstehen. Mit diesem Wissen könnten unseren Bedürfnissen besser entsprechende Sorten gezüchtet und gezieltere Bewirtschaftungsmassnahmen erarbeitet werden.

Topinambur als Modellpflanze

Um den Auf- und Abbau der Fruktane zu untersuchen, benützen wir Modellpflanzen. Dies sind einerseits solche mit einem möglichst «einfachen» Fruktanstoffwechsel und andererseits sollte eine solide Basis ihrer Biologie und Physiologie vorliegen. Ein Beispiel einer solchen Pflanze ist die weniger bekannte Kulturpflanze Topinambur (Reust 1992). Ihre Knollen enthalten

ein Gemisch aus wasserlöslichen Kohlenhydraten, die sich aus Glukose, Fruktose, Saccharose und Zuckern der Inulinreihe - Fruktane - zusammensetzen. Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Knollen sind durch charakteristische Abläufe im Inulinstoffwechsel gekennzeichnet und in einem grundlegenden biochemischen Modell des Fruktanstoffwechsels festgehalten (Edelman und Jefford 1968). Die Elemente dieses Modells, die Inulinmoleküle und die auf- und abbauenden Enzyme wurden später innerhalb der Zelle allesamt der Zentralvakuole der Speicherparenchymzelle zugeordnet (Abb. 1; Frehner *et al.* 1984). Da hier die Zuckermoleküle und die auf sie einwirkenden Enzyme räumlich ungetrennt vorliegen, stellt sich die Frage, wie

der Stoffwechsel der Fruktane kontrolliert wird.

Fruktanstoffwechsel

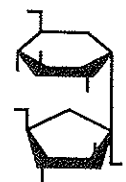
Die Frage nach der Kontrolle versuchen wir zu lösen, indem wir zuerst die zentralen Elemente - die Fruktane und die Enzyme - möglichst genau kennenlernen und anschliessend die übergeordneten Regelmechanismen, die ihrerseits die Enzyme kontrollieren. Aus geeignetem Pflanzenmaterial werden die einzelnen Enzyme rein gewonnen und *in vitro* ihre biochemischen Eigenschaften wie die Substratspezifität, Identifizierung und Wirkung von Hemmstoffen und pH-Abhängigkeit der Aktivität ermittelt. Damit lassen sich oft schon einfache Regelmechanismen aufdecken. Längerfristig sind die Mechanismen anzugehen, die den Fruktanauf- oder -abbau etwa durch die Regulierung von Enzymmengen beeinflussen, also die Genexpression betreffen. Gleichzeitig versuchen wir die bekannten Elemente von der Modellpflanze auf die Gräser zu



Glukose



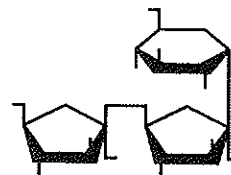
Fruktose



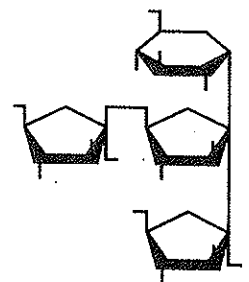
Saccharose



1-Kestose
kleinstes
Inulinmolekül



6-Kestose
kleinstes
Levanmolekül



Bifurcose
kleinstes
Graminanmolekül

Struktur der Fruktane und ihrer Einheiten.

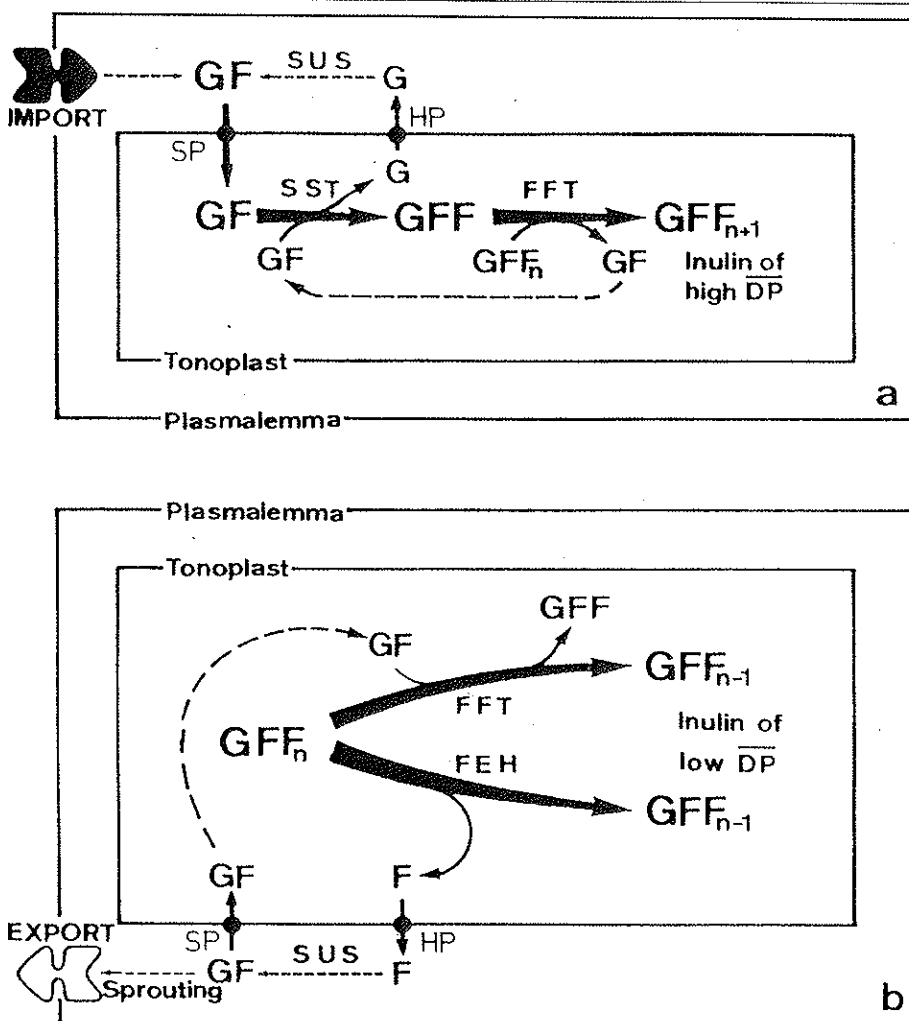


Abb. 1. Subzelluläre Organisation und Biochemie des Inulinstoffwechsels in Speicherparenchymzellen von Topinamburknollen (nach Frehner *et al.* 1984). a) Knollenwachstum und Inulineinlagerung: Saccharose (GF) wird aus dem Zytoplasma durch die Vakuolenmembran (Tonoplast) in die Vakuole aufgenommen. Dort entsteht aus zwei Saccharosemolekülen mittels SST die 1-Kestose (GFF) und Glukose (G). Die FFT bewirkt dann die Kettenverlängerung durch wiederholten Fruktosyltransfer auf 1-Kestose beziehungsweise kurzkettige Inuline. b) Ruhe- und Inulinabbauphase: Langkettiges Inulin (GFF_n) wird von der FEH zu Fruktose (F) hydrolysiert und durch Fruktosyltransfer mittels FFT auf Saccharose (GF) verkürzt. Fruktose wird im Zytoplasma zu Saccharose (GF) regeneriert (SUS) und bei Bedarf exportiert.

übertragen. Die Fruktane der Gräser weisen komplexere Strukturen mit Verzweigungen und zusätzlichen Bindungstypen unter den Fruktoseeinheiten auf als das Inulin der Korbblütler. Daher sind bei Gräsern zusätzliche Enzymaktivitäten des Fruktanstoffwechsels zu erwarten, die das geordnete physiologische Zusammenspiel in der Pflanzenzelle ermöglichen.

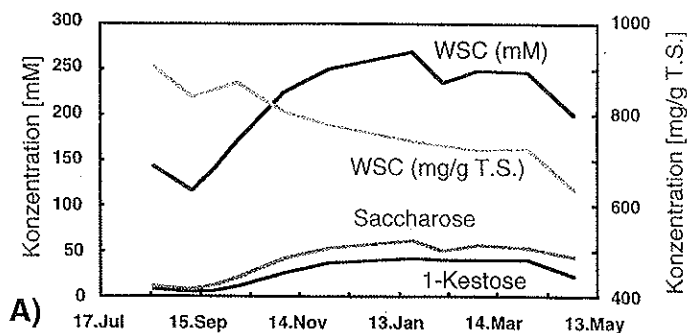
Umlagerung der Inuline

Während der ersten Knollenbildungsphase (August bis Oktober) ist der Gehalt der Gesamtkohlenhydrate hoch (ca. 80 % der TS). Nach Abschluss der Vegetationsperiode und während der Überwinterung der Knollen im Boden sinkt der Gehalt erst langsam, dann aber beim Austreiben schneller (Abb. 2A). Interessant ist der Verlauf der molaren Konzentration der

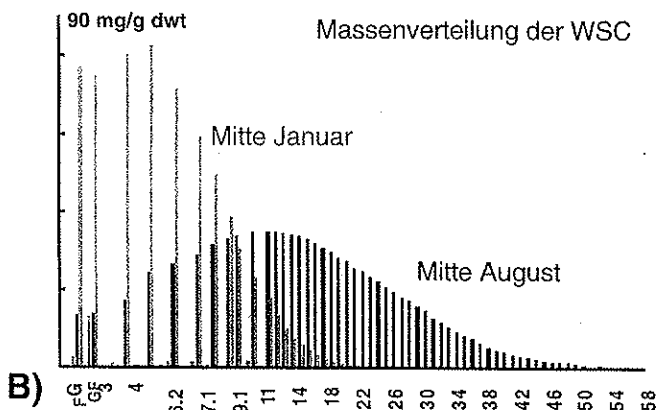
gelösten Kohlenhydrate, der bis in den Winter hinein ansteigt. Dies ist nicht auf einen Wasserverlust des Gewebes zurückzuführen, sondern darauf, dass die Masse der gebundenen Zucker (Fruktane) auf eine grössere Anzahl Moleküle verteilt wird, wie dies aus dem Anstieg der Saccharose- und 1-Kestosekonzentration ersichtlich wird. Zwei detaillierte Analysen der Fruktane aus verschiedenen Entwicklungszeitpunkten von Topinamburknollen verdeutlichen die Verschiebung der Masse von den langkettigen Inulinen zu den kurzkettigen und zur Saccharose (Abb. 2B). Weil diese interne Umverteilung der Reservefruktane oft mit einer Temperaturabsenkung korreliert, kann dies zum Beispiel als Anpassung an die Kälte durch einen erhöhten Frostschutz im Zellsaft betrachtet werden. Die Erhöhung der molaren Konzentration und die gleich-

zeitige Senkung der mittleren Kettenlänge des Fruktans in den Knollen werden durch eine vorübergehende ansteigende Konzentration der freien Fruktose begleitet (Abb. 3A). Ebenso deutet eine vorübergehende Abweichung des Verhältnisses von Saccharose zu 1-Kestose auf eine sich ändernde Massenverteilung der Fruktane hin.

Das Auftreten und die biochemischen Eigenschaften der Enzyme des Inulinstoffwechsels können die beobachteten entwicklungsabhängigen Konzentrationsverläufe der Fruktane und Zucker der Topinamburknolle weitgehend erklären. Das Schlüsselenzym der Fruktansynthese, die SST ist nur während der Fruktaneinlagerung der wachsenden Knolle aktiv (Edelman und Jefford 1968). Hingegen ist das kettenverlängernde Enzym FFT während des ganzen Lebenszyklusses der Knollen aktiv. So bleibt während der ersten Phase der Kettenverkürzung (Oktober, Abb. 3A) die FFT aktiv. Zur selben Zeit tritt der Fruktoseabbau durch die Hydrolase FEH und dessen Umsetzung in Saccharose in Erscheinung (Abb. 2A und 3). Die Saccharose ist ein sehr guter Empfänger für Fruktosyleinheiten, die von länger-kettigen Inulinen mittels FFT transferiert werden (Lüscher *et al.* 1993a). Dies geschieht nun so lange, bis wieder ein dynamisches Gleichgewicht unter den Inulinen und der Saccharose erreicht wird (Abb. 3A). Während der Winterruhe der Knolle wirkt die FFT also als kettenverkürzendes Enzym. Die inulinabbauende FEH bleibt jedoch nach ihrem ersten Auftreten aktiv (Abb. 3B), ohne dass das gespeicherte Inulin wesentlich abgebaut würde. Dieses Phänomen ist am wahrscheinlichsten erklärbar durch die Eigenschaft der FEH selbst, dass sie von Saccharose gehemmt wird. Zusätzlich verlangsamen die winterlichen Temperaturen den pflanzlichen Stoffwechsel wesentlich. Es ist nun sehr wahrscheinlich, dass gegen den Schluss des Lebenszyklusses der Knolle, wenn die Inulinreserven zur Versorgung des neuen Sprosses abgebaut werden, die Hemmung der FEH durch Saccharose wegfällt. Dies ist ein plausibler Vorgang, da die Saccharose aus der Vakuole des Speichergewebes abgezogen und zum neuen Trieb transportiert wird. Daher sinkt die lokale Konzentration des Hemmstoffes Saccharose in der Vakuole, was wiederum die FEH zu einer beschleunigten Hydrolyse der konzentrierten kurzkettigen Inuline freigibt ohne eine messbare Aktivitätszunahme der FEH. Auch die messbare Durch-



A) 17.Jul 15.Sep 14.Nov 13.Jan 14.Mar 13.May

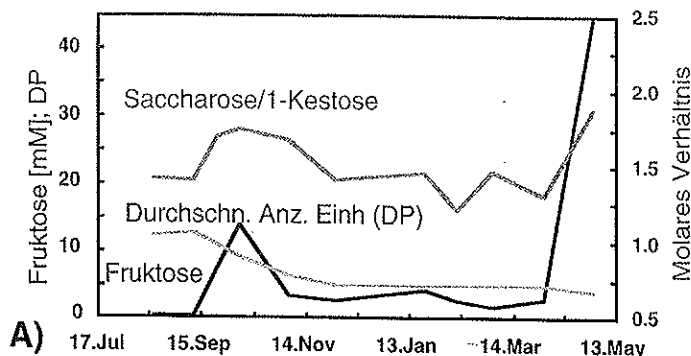


B) F: Fructose, G: Glukose, GF: Saccharose

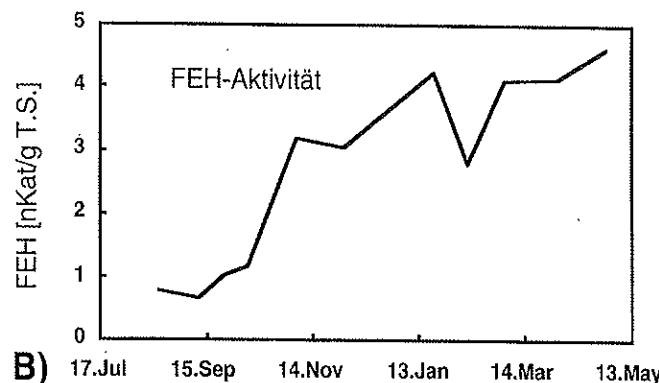
schnittskonzentration der Saccharose braucht sich nicht zu ändern (Abb. 2A), jedoch wird dieser Vorgang durch den rasanten Anstieg der Konzentration der freien Fruktose unübersehbar (Abb. 3A).

Übertragung auf Gramineen

Der sich nur langsam verändernde Gehalt an Gesamtkohlenhydrat der Topinamburknolle von der Bildung bis zum Austrieb (Abb. 2A) scheint lediglich auf eine Ruhephase hinzuweisen. Bei genauerer Analyse zeigt sich jedoch, dass die Physiologie der Knollen nicht einfach ruht (Abb. 2B). Das Kohlenhydratmuster wird drastisch verändert: Inulin wird in Saccharose überführt, die den eigentlichen Auslöser zu einem scheinbaren Abbau der langkettigen Inuline und Neuaufbau von kurz-kettigen bildet. Dieser Prozess wird tatsächlich durch eine teilweise Hydrolyse von Inulin gespiesen. Die aus dem Abbauprodukt Fruktose entstehende Saccharose dient dem immer vorhandenen und sehr aktiven Enzym FFT als Grundbaustein zur Bildung kurz-kettiger Inuline durch den Transfer von Fruktosyleinheiten von länger-kettigen Inulinen. Diese Eigenschaft



A) 17.Jul 15.Sep 14.Nov 13.Jan 14.Mar 13.May



B) 17.Jul 15.Sep 14.Nov 13.Jan 14.Mar 13.May

Abb. 3. Inulinabbau in Freilandtopinamburknollen vom Sommer 1992 bis Frühjahr 1993. A) Fruktosegehalt, Durchschnittliche Anzahl Einheiten pro Inulinmolekül (DP) und das molare Verhältnis von Saccharose zu 1-Kestose. B) Verlauf der Inulinabbauenden Aktivität FEH.

der FFT ist auch aus Löwenzahn (*Taraxacum officinale* Weber) bekannt (Lüscher *et al.* 1993b). Der vollständige Abbau der Inuline wird durch das Abziehen der Saccharose aus der unmittelbaren Umgebung und somit durch die Enthemmung der FEH ausgelöst.

Der gesamte nun weitgehend durchschaubare Prozess des Inulinauf- und abbaus in der Modellpflanze Topinambur kann segmentweise im Fruktanstoffwechsel der Gräser getestet und ergänzt werden. Neben dem bisher besprochenen Inulin mit β -

2,1-Bindungen weist das Fruktan der Gräser einen weiteren Bindungstyp unter den Fruktosyleinheiten auf: Die linear verketteten Moleküle mit den β -2,6-Bindungen heißen Levan. Oft liegen Mischungen aus vorwiegend Levan mit sehr wenig Inulin und einem unterschiedlichen Anteil des verzweigten Graminans vor (Lewis 1993). Folglich sind weitere das Topinamburmodell ergänzende Elemente zu erwarten (z.B. Lüscher und Nelson 1995). Ein Modell, um die Mechanismen des Levanabbaus zu erforschen sind die Stop-

Kohlenhydratanalysen

Eine genaue und detaillierte Analyse von Fruktanen wird mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie vorgenommen. Die Extrakte der wasserlöslichen Kohlenhydrate werden, unter sehr basischen Bedingungen ionisiert, auf einer Ionenaustauschersäule mittels eines Natriumacetatgradienten in Natronlauge in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. Die sehr empfindliche elektrochemische Detektion erlaubt es, Mengen im Submikrogramm-Bereich zu messen.

Proteinreinigung

Die FEH von Topinambur und Raigras wurden mittels Aussalzen mit Ammoniumsulfat vorgereinigt. Darauf folgten Schritte, die Proteine nach ihren Zuckerderivaten und Ladungseigenschaften auftrennen. Die FEH jeder Reinigungsstufe wurde mittels ihrer Hydrolyseaktivität gegen hochgereinigte Fruktanmoleküle des Levan-, Inulin- oder Graminantyps festgestellt. Die Reinheit bezüglich Molekulargewicht oder Ladungsverteilung der FEH wurde mit denaturierender SDS-Polyacrylamidelektrophorese oder isoelektrischer Fokussierung geprüft.

Glossar

Glukose: Traubenzucker, Dextrose

Fruktose: Fruchtzucker

Saccharose: Gewöhnlicher Zucker, Rüben- oder Rohrzucker, besteht aus je einer Einheit Glukose und Fruktose

Fruktan: Mehrheitlich aus Fruktoseeinheiten bestehendes Kohlenhydrat, intaktes pflanzliches Fruktan enthält eine Glukoseeinheit pro Molekül

Inulin: Fruktan, dessen Fruktoseeinheiten β -2,1-glycosidisch verbunden sind

Levan: Fruktan, dessen Fruktoseeinheiten β -2,6-glycosidisch verbunden sind

Graminan: Verzweigtes Fruktan mit Inulin- und Levanbindungen

1-Kestose: kleinstes Inulinmolekül, bestehend aus drei Einheiten (1x Glukose, 2x Fruktose)

SST: 1-Kestose bildendes Enzym (Saccharose: Saccharosefruktosyltransferase)

FFT: Kettenverlängerndes Enzym (Fruktan: Fruktanfruktosyltransferase)

FEH: Fruktan abbauendes Enzym (Fruktanexohydrolase)

pein geschnittener Gräser. Darin werden die Fruktanreserven abgebaut und zur Neubildung von Blattfläche verwendet (Volenc 1986). Die Hydrolyse der Gramine und Levane ist erwartungsgemäss nicht so trivial wie im Falle der linear verketteten Inuline. Da bisher bei der Suche nach solchen Hydrolasen dem Unterschied zwischen den Levanen und den Inulinen zuwenig Rechnung getragen wurde, sind fast ausnahmslos inulinabbauende FEH-Enzyme beschrieben worden (Bonnert *et al.* 1994). Uns ist es jedoch gelungen, eine levanspezifische FEH aus austreibenden Stoppeln von Englischem Raigras zu isolieren. Dieses Enzym wird durch Schnitt induziert und wie im Falle der Topinambur-FEH durch Saccharose gehemmt (Manuskript in Vorbereitung).

Zukunft und Anwendungen in der Züchtung

Es zeichnen sich in neuerer Zeit Fortschritte im Verständnis sowohl des Aufbaus als auch des Abbaus von Gramineen-Fruktan ab. Wir werden Laborresultate vermehrt auf ihre physiologische Wichtigkeit in der Pflanze und unter Feld- oder feidnahen Bedingungen überprüfen.

In absehbarer Zeit dürfte der Fruktanstoffwechsel durch gemeinsame Anstrengungen auch in Gramineen soweit erforscht sein, dass physiologisch abgestützte Merkmale in Züchtungsprogrammen den

Reservestoffwechsel besser berücksichtigen werden. Beim Weizen scheint die Mobilisation der Stengelreserven nach der Blüte ein Element der Ertragssicherung zu sein (Winzeler *et al.* 1989).

DANK

Herr S. Marx hat Ergebnisse zu den FEH-Enzymen von Topinambur und Raigras für diesen Artikel grosszügig freigegeben.

LITERATUR

Bonnert G.D., Sims J.M., St. John J.A. and Simpson R.J., 1994. Purification and characterization of fructans with β -2,1- and β -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist* 127 (2), 261-269.

Bucher H.P., Mächler F. and Nösberger J., 1987. Storage and remobilization of carbohydrates in meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *J Plant Physiol* 130, 101-109.

Dubois D., Winzeler M. and Nösberger J., 1990. Fructan accumulation and sucrose:sucrose fructosyltransferase activity in stem of spring wheat genotypes. *Crop Sci* 30, 315-319.

Edelman J. and Jefford T.G., 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol* 67, 517-531.

Frehner M., Keller F. and Wiemken A., 1984. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J Plant Physiol* 116, 197-208.

Frehner M., Lüscher M. and Nösberger J., 1993. Fructan accumulation in cell suspension cultures of *Phleum pratense* L. In: Fuchs A. Ed., Inulin and inulin-containing crops, Vol 3. Elsevier, Amsterdam. 185-190.

Lewis D.H., 1993. Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytol* 124 (4), 583-594.

Lüscher M., Frehner M. and Nösberger J., 1993a. Purification and characterization of fructan:fructan fructosyltransferase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *New Phytologist* 123, 717-724.

Lüscher M., Frehner M. and Nösberger J., 1993b. Purification and some properties of fructan:fructan fructosyl transferase from dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *New Phytologist* 123, 437-442.

Lüscher M. and Nelson C.J., 1995. Fructosyltransferase activities in the leaf growth zone of tall fescue. *Plant Physiology* 107, 1419-1425.

Monteil P., Winzeler M. and Nösberger J., 1989. Genotypic differences in the translocation of temporarily stored 14C from the stem to the grains in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agr Crop Sci* 162, 57-64.

Pollock C.J. and Cairns A.J., 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 77-101.

Reust W., 1992. Nachwachsende Rohstoffe und Alternativkulturen: Ertragspotential von Topinambur, Zuckerhirse und einer Wolfsmilch. *Landwirtschaft Schweiz* 5 (10), 509-516.

Volenc J.J., 1986. Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. *Crop Science* 26, 122-127.

Winzeler M., Monteil P. and Nösberger J., 1989. Grain growth of tall and short spring wheat genotypes at different assimilate supplies. *Crop Sci* 29, 1487-1491.

RÉSUMÉ

Le métabolisme des carbohydrates de réserve dans les plantes cultivées contenant des fructanes

Durant leur formation, les tubercules de topinambour (*Helianthus tuberosus*) contiennent des fructanes (poly fructosyl sucrose) dont le degré de polymérisation (DP) peut aller jusqu'à 60. Pendant l'hiver le DP moyen baisse à environ 7. Ce changement est dû à la dégradation de fructane par la fructane exohydrolase (FEH), au recyclage du fructose en sucrose et, en même temps, au fait que les unités terminales des fructanes sont transférées sur le sucrose par la fructane:fructane fructosyl transferase. Les FEH de topinambour et du raigras sont inhibées par le sucrose. Par conséquent, dans les deux cas, la dégradation des fructanes peut être contrôlée de façon similaire.

SUMMARY

Metabolism of the storage carbohydrates in fructan containing cultivated plants

During tuber formation in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), the tubers contain fructans (polyfructosyl sucrose) composed of up to 60 monosaccharide units. During the winter, average degree of polymerization (DP) shifts to 7. This shift is due to fructan hydrolysis by fructan exo-hydrolase (FEH), recycling of fructose to sucrose and, at the same time, transfer of fructosyl units to sucrose by fructan:fructan fructosyltransferase. FEH of *H. tuberosus* and of *Lolium perenne* share the inhibition by sucrose. Hence fructan degradation of both plants may be regulated in a similar way.

KEY WORDS: fructan, sucrose, *Helianthus tuberosus*, *Lolium perenne*, fructan exo-hydrolase, fructosyl transferase

RIASSUNTO

Metabolismo dei carboidrati di riserva nelle piante coltivate contenenti fruttani

Durante la formazione dei tuberi nel topinambur (*Helianthus tuberosus*) questi contengono fruttani (poli fruttosil saccarosio) composti di un massimo di 60 unità. Durante l'inverno il grado di polimerizzazione medio si abbassa a 7. Questo cambiamento è dovuto all'idrolisi di fruttano tramite la fruttano esohidrolasi (FEH), il riciclaggio del fruttosio formando saccarosio e contemporaneamente gruppi di fruttosio vengono trasferiti sul saccarosio dalla fruttano:fruttano fruttosil trasferasi. La FEH di *H. tuberosus* e di *Lolium perenne* sono comunemente inibite dal saccarosio. Dunque la degradazione sarà regolata in maniera simile nelle due piante.