



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Factors affecting galanthamine production in *Narcissus*

Akram, M.N.

Citation

Akram, M. N. (2020, June 24). *Factors affecting galanthamine production in Narcissus*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/133432>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/133432>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/133432> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Akram, M.N.

Title: Factors affecting galanthamine production in *Narcissus*

Issue Date: 2020-06-24

Samenvatting

Muhammad Nadeem Akram

Natural Products Laboratory, Institute of Biology, Leiden University,

Sylviusweg 72 2333 BE, Leiden, The Netherlands.

Narcissus is een economisch belangrijk gewas met een groot aantal soorten, hybriden en /of variëteiten. Wereldwijd is het een zeer populaire sierplant. Als gewas voor de sierteelt kwam *Narcissus* in opkomst in de tweede helft van de 19e eeuw, en de interesse voor het gewas is in de loop van de tijd gegroeid. Narcissen staan bij consumenten in het Verenigd Koninkrijk op de tweede plaats van alle snijbloemen. Dat is opvallend gezien het feit dat narcissen maar beschikbaar zijn gedurende een korte periode van het jaar. Nederland staat aan de top van de lijst van producenten van narcissen. Per jaar wordt ca. 1700 hectare aan narcissen geteeld in Nederland, tegenover ca. 1000 hectare in het Verenigd Koninkrijk. Volgens een economisch rapport van 2009, bedraagt de jaarlijkse verkoop van bloembollen, waaronder bollen van narcissen, in Nederland in totaal 800 miljoen euro.

De decoratieve waarde van narcissen is reeds lang bekend, maar sinds kort is het ook een waardevolle bron van geneesmiddelen. Soortspecifieke secundaire metabolieten, zoals alkaloiden zijn in narcissen aanwezig, deze stoffen gebruikt de plant mogelijk voor de afweer tegen ziekten en plagen.

De belangrijkste verbindingen zijn *Narcissus* alkaloiden waaraan verschillende geneeskrachtige eigenschappen worden toegeschreven. Galanthamine is een *Narcissus* alkaloid dat met succes op de markt is gebracht als geneesmiddel. Galanthamine is een tertiair, isochinoline alkaloid dat het enzyme acetylcholine esterase (AChE) remt op een competitieve en reversibele manier. Daarmee is het een belangrijk therapeutisch middel voor de behandeling van de ziekte van Alzheimer (AD). De ziekte van Alzheimer (AD) is een complexe, neurodegeneratieve, multifactoriële, progressieve ziekte die voornamelijk tot uiting komt bij ouderen. Naar schatting 50-60% van de gevallen van dementie is onder personen ouder dan 65 jaar. De kenmerkende symptomen van deze ziekte zijn geheugenverlies en bijzondere waardevermindering van meerdere cognitieve en emotionele functies.

Het doel van dit PhD onderzoek was het vinden van methodes die de galanthamine productie zouden kunnen verhogen in narcissen. Daartoe is onderzoek gedaan naar verschillende stadia van het productie proces, van de productie in het veld tot aan de

behandeling van de bollen na het oogsten. Mogelijk dat daarmee dit gewas ook naast de sierteelt voor geneesmiddelen productie gebruikt kan worden.

In het 2e Hoofdstuk van dit proefschrift worden belangrijke biotische en abiotische factoren, die de productie van galanthamine kunnen beïnvloeden besproken. Daarbij werden onder andere verschillende plantaardige bronnen in kaart gebracht die kunnen worden gebruikt voor de productie van galanthamine. Van alle bekende plantaardige bronnen geven narcissen de hoogste opbrengst aan galanthamine per hectare. Omdat narcissen op grote schaal worden geteeld voor de bloemenmarkt, alsmede voor de verkoop van de bollen, is er veel informatie over de agronomische praktijken, die worden gebruikt voor deze doeleinden. Er is echter nog weinig bekend over lokalisatie en de functie van galanthamine in de plant. Het is belangrijk om de factoren te onderzoeken die bij de teelt van bollen leiden tot een verhoogd galanthamine gehalte. Er is ook geen informatie over het effect van ziekten en plagen op de productie van galanthamine. Studies naar het effect van ziekten en herbivorie zijn nodig voor een beter begrip van de resistentie in planten en de mogelijke rol daarin van alkaloiden in het algemeen en in het bijzonder van galanthamine.

Of het nu om onderzoek naar galanthamine gaat in planten of om de haalbaarheid van de commerciële productie van deze stof; in alle gevallen zijn het bepalen van de hoeveelheid galanthamine in de planten en welke planten kunnen worden gebruikt als uitgangsmateriaal voor de productie de meest belangrijke en fundamentele stappen.

De analyse van galanthamine en verwante stoffen wordt besproken in Hoofdstuk 3. Deze methoden worden in de loop van de tijd steeds gewijzigd onder andere door de ontwikkeling van nieuwe soorten apparatuur en nieuwe soorten stationaire fases voor chromatografie. In het verleden waren analyses van galanthamine in plantmateriaal vooral gebaseerd op dunnelaagchromatografie (TLC), maar deze techniek is later vervangen door High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Tegenwoordig worden technieken gebruikt zoals High Performance Liquid Chromatography (HPLC) met photodiode array (PDA) en massaspectroscopie (MS) als detectie methode, gaschromatografie (GC) in combinatie met vlamionisatiedetector (FID) of MS en nucleaire magnetische resonantie spectroscopie (NMR). Hoewel handmatige

TLC-methode nog steeds wordt gebruikt voor een snelle kwalitatieve analyse, wordt de voorkeur gegeven aan de automatische instrumentele methodes die beter reproduceerbaar en robuster zijn en een hogere detectie gevoeligheid hebben. Voor de kwantitatieve analyse van galanthamine in planten en biologische monsters is TLC nu grotendeels vervangen door HPLC.

Voor de kwantitatieve analyse van specifieke verbindingen worden meestal HPLC met UV of PDA gebruikt. Wat betreft de detector bij GC, is FID geschikt voor dit doel. Daarbij is het voordeel van de GC-FID dat de te analyseren stoffen een vergelijkbare detectierespons vertonen. Bij detectiemethoden zoals UV en MS zijn er grote verschillen in de gevoeligheid voor verschillende stoffen. De verschuiving naar meer brede algemene detectie methodes heeft geleid tot een aantal veranderingen, die tot doel hebben een algemeen beeld van alle metabolieten te geven in plaats van een gerichte analyses van een bepaalde groep van stoffen. Voor zeer complexe mengsels is de extra dimensie van LC-MS interessant omdat het een extra dimensie toevoegt en een hogere mate van zekerheid bij de identificatie van de pieken geeft. Het doel van metabolomics is het identificeren en kwantificeren van zoveel mogelijk stoffen in een organisme. Chromatografische methoden in combinatie met MS en NMR zijn nu de meest gebruikte hulpmiddelen in metabolomics. Voor de kwalitatieve analyse van een groot aantal verbindingen zijn chromatografie gebaseerde methoden het meest geschikt, terwijl NMR de beste techniek is voor absolute kwantificering. Hoewel NMR eerder werd gebruikt voor de identificatie van zuivere stoffen, wordt deze techniek nu steeds vaker gebruikt voor het meten van extracten voor metabolomics en metabonomics analyse. Dit is vanwege de eenvoudige monstervoorbereiding en snelle analyse, waar in één run met slechts één interne standaard een groot aantal verbindingen kunnen worden gekwantificeerd. NMR-gebaseerde metabolomics wordt ook toegepast op de analyse van bollen en voor de kwantitatieve analyse van galanthamine.

Voor de grootschalige winning van galanthamine worden verschillende conventionele extractie methodes gebruikt om het alkaloid uit plantaardige bronnen te winnen. De zuivering wordt ook wel gedaan met behulp van centrifugale partitie chromatografie, superkritische extractie of microgolven ondersteunde extractie. Een aantal werkwijzen voor de extractie van galanthamine op grote schaal zijn gepubliceerd, maar de maximale

hoeveelheid die werd gewonnen uit de plant was in de meeste gevallen ongeveer 0,12%. Dit is aanzienlijk lager dan de hoeveelheid die in de bollen aanwezig is, waaruit blijkt dat er nog veel ruimte voor verbetering van het proces is.

Voor de optimalisatie van de extractie van galanthamine en analoge verbindingen, moeten extractie en pre-analytische methoden worden geëvalueerd. Voor dit doel (Hoofdstuk 4) werd een studie uitgevoerd naar factoren die mogelijk effect hebben op de extractie, zoals de hoeveelheid te extraheren plantenmateriaal (aantal bollen), het gewicht van het monster en de hoeveelheid extractieoplosmiddel. Daarnaast werd de ook de optimale sonicatie tijd onderzocht. Met behulp van ¹H NMR analyse werden de extracten vergeleken, o.a. voor de galanthamine opbrengst. Bovendien werd de bruining die wordt veroorzaakt door schade aan de bollen tijdens de oogst bestudeerd als factor in de galanthamine productie. De resultaten laten zien dat de bemonsteringsgrootte een significant effect had op de reproduceerbaarheid van galanthamine opbrengst in deze steekproef. Echter een groot aantal bollen voor slechts een kleine steekproef vereisen grotere afzuigapparatuur en grotere hoeveelheden oplosmiddel, wat vanuit ecologisch en economisch oogpunt niet de voorkeur heeft. Qua monstergewicht waren er weinig, maar geen significante veranderingen in het gehalte aan galanthamine, hoewel er significante veranderingen in het gehalte van metabolieten in het algemeen waren en in fenolen in het bijzonder. De studies met de verschillende condities wat betreft monster: oplosmiddel verhouding lieten zien dat de galanthamine productie niet significant beïnvloed wordt in absolute opbrengst. Maar de relatieve hoeveelheden van andere metabolieten veranderen, bovendien blijkt er een verzadiging op te treden voor verschillende metabolieten bij hoge verhoudingen monster:oplosmiddel. In het geval van koolhydraten en vetzuren, is het geëxtraheerde gehalte direct gerelateerd aan het gewicht van het monster. Een groter gewicht van het monster resulteerde in een hoger gehalte aan koolhydraten en vetzuren. Wat betreft de hoeveelheid oplosmiddel die vereist is om galanthamine en andere metabolieten te extraheren voor analyse en kwantificering blijkt dat een kleine verandering in de monster:oplosmiddel verhouding een significant effect heeft op de productie galanthamine. Uit de resultaten werd duidelijk dat 1,6 ml oplosmiddel een significant hoger galanthamine niveau geeft. Het is ook opmerkelijk dat de extractie van sommige metabolieten negatief kan worden beïnvloed door de aanwezigheid van grotere

hoeveelheid suikers en vetzuren in het extract. Dat uit zich in de afname van de opbrengst van deze metabolieten bij een verhoogde hoeveelheid suikers en vetzuren in het extract. Qua lengte van de sonicatietijd voor optimale alkaloïde extractie, blijkt uit de resultaten dat een langere ultrasonicatietijd een significant positief effect heeft op de opbrengst van galanthamine. Daar bij moet gezegd worden dat dit bij een licht verhoogde temperatuur was. De absolute galanthamine kwantificering met ¹H NMR laat zien dat een optimale duur van ultrasonificatie 60-75 minuten is voor de productie van galanthamine en verwante metabolieten.

De bruining als gevolg van letsel tijdens de oogst of de opslag is een proces dat vooral voorkomt in fruit en groenten. Polyfenol oxidase is het enzym dat betrokken is bij dit proces. Dit bruiningsproces vindt ook plaats in narcissenbollen wanneer ze in meerdere stukken gesneden werden. De resultaten van mijn onderzoek laten zien dat de oppervlakte en tijd van blootstelling een belangrijke rol spelen (Hoofdstuk 5). De productie van galanthamine en andere alkaloïden veranderde niet significant met een langere tijdsduur na het in stukken snijden van de bollen. Uit de resultaten bleek dat de maximale productie van galanthamine werd verkregen wanneer bollen werden gesneden en dan na een tijdsduur van 15-30 minuten werden geëxtraheerd. Alhoewel alle onderzochte pre-analytische processen significante effecten hebben op de productie van galanthamine, moeten verdere proeven met verschillende combinaties uitgevoerd worden om te zien hoe de maximale hoeveelheid galanthamine uit het plantenmateriaal geëxtraheerd kan worden..

Onder veldcondities, worden in de dagelijkse praktijk de bloemen gesneden van de plant. Dit heeft als doel meer voedingsstoffen in de plant beschikbaar te maken voor de bollen, de grotere bollen betekenen een hogere productie. Een deel van de bloemen is voor de productie van snijbloemen, een tweede bron van inkomsten. Het is belangrijk om te weten welke effecten het snijden van de bloem heeft op het metabool van de plant in het algemeen en in het bijzonder op het galanthamine-gehalte. In Hoofdstuk 6 is onderzoek beschreven naar dit aspect. Bloemen werden gesneden van de planten in een kas op verschillende tijdstippen van de groeicyclus en op verschillende manieren om de beste manier en tijd van het snijden van de bloemen te bepalen. De resultaten geven aan dat het snijden van de bloem een significant effect heeft op galanthamine niveaus en de groei van

de bol. De beste tijd voor het snijden van de bloemen was tijdens het uitkomen van de bloemknoppen, dat leidde tot een verhoogd gewicht van de bollen en tegelijkertijd werd de productie van galanthamine verhoogd. Het snijden moet zo laat mogelijk gebeuren voor de bloemopening anders heeft het geen significant effect meer op de bol- en galanthamine productie. Omdat veel bollen gekweekt worden op grond die verzilt, werd het effect van het zoutgehalte van de grond getest om te controleren hoe de planten zich gedragen onder zoutstress. Een verhoogd zoutgehalte resulteerde in smalle bladeren en vroegtijdige veroudering van de bladeren en daardoor een significant verlies van de bladmassa. Daarentegen verhoogt het de bolgewicht aanzienlijk, wat de totale opbrengst per hectare beïnvloedt, bovendien gaat dit gepaard met een significante toename van galanthamine niveaus in vergelijking met de controle monsters.

Een kritische factor voor galanthamine productie is de leeftijd van de bollen op het moment van oogsten. Wereldwijd wordt ongeveer 70% van alle *Narcissus* bollen geproduceerd in Nederland en het Verenigd Koninkrijk, maar de de landbouwkundige praktijken in beide landen verschillen veel van elkaar. In Nederland worden de narcissen en de bollen jaarlijks geoogst. In het Verenigd Koninkrijk is dit een tweejaarlijks proces waar de helft van het gewas na een jaar uit het veld wordt gehaald, terwijl de andere helft nog twee jaar in het veld wordt gelaten voor een vermeende hogere productie en om productiekosten te verlagen. Vanwege deze verschillen tussen de Britse en Nederlandse productiewijze, is het effect van de leeftijd van bollen op het gehalte aan alkaloiden onderzocht (Hoofdstuk 7). Onder normale omstandigheden produceren de bollen in het derde jaar dochterbollen, die van de bol kunnen worden gescheiden en gebruikt worden als nieuwe bol in het komende jaar. Resultaten van de experimenten laten duidelijk zien dat een jaarlijkse oogst beter is in vergelijking met die van een twee-jaarlijkse oogst, want hoewel de twee jaar oude bollen een hoger gehalte aan galanthamine hebben is de opbrengst van galanthamine per hectare hoger in het jaarlijkse productiesysteem.

De locatie van de teelt is ook belangrijk omdat verschillende bodems op verschillende locaties verschillende effecten hebben op de productie van de bollen en de gehalte aan inhoudstoffen en aan alkaloiden in het bijzonder. Aangezien Nederland en het Verenigd Koninkrijk samen de top producenten van narcissen zijn, werden de bollen die geproduceerd worden in deze landen vergeleken op het gehalte aan alkaloiden en meer

specifiek op het gehalte aan galanthamine. Dit werd bepaald met behulp van NMR, GC-MS en GC-FID. GC-MS en GC-FID werden specifiek gebruikt voor de analyses van alkaloiden. Er werd vastgesteld dat bollen die in een bepaalde plaats in Nederland (Lisse) een hoger gehalte hadden aan totaal alkaloiden en specifiek ook aan galanthamine in vergelijking met de andere locaties.

Wat betreft insecten brengt alleen de Narcissus-vlieg schade toe aan de planten. Daarentegen veroorzaken verschillende ziekten, in het bijzonder schimmelziekten, veel schade aan narcissen in het veld. Basale rot veroorzaakt de meeste schade aan de narcis. Deze ziekte wordt veroorzaakt door *Fusarium oxysporum*, een schimmel die jarenlang onder zware omstandigheden kan overleven in de bodem. Het effect van de rot veroorzaakt door deze schimmel op de metabolieten van Narcissus is onderzocht tijdens verschillende stadia van infectie en de plaats van infectie (Hoofdstuk 8). Hiertoe werden *Narcissus* bollen geplant in met schimmel geïnficeerde bodem en geoogst op verschillende tijdstippen na de vorming van bladeren en de besmetting begon aan te slaan. Uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat basale rot een aanzienlijk toename van galanthamine en andere alkaloiden veroorzaakt. Echter met het vorderen van de infectie, neemt de bollen opbrengst af wat betreft gewicht. Dit betekent dat hoe groter de infectie, hoe groter het verlies in opbrengst van bollen. Bij het vergelijken van het effect van de plaats van de infectie blijkt dat de infectie op de basale plaat aan de onderkant van de bol, zeer schadelijk is voor de bollen productie in vergelijking met rot aan de nek van de bol waarbij de verliezen door de rot niet zo hoog waren. Wat betreft het gehalte aan galanthamine was een aanzienlijke toename waar te nemen in de planten met basale rot. Rot aan de nek van de bol veroorzaakte slechts een kleine toename van het gehalte aan galanthamine. Dit was echter niet significant in vergelijking met de controlegroep en de met basale rot geïnficeerde planten. In het algemeen kan worden geconcludeerd dat het nuttig zou zijn voor de kwekers om het gewas, in geval van basale rot, zo vroeg mogelijk te oogsten en om de bollen voor galanthamine productie te verkopen om hun verliezen te dekken.

Met het doel het effect van bodemnutriënten (Hoofdstuk 9) en de verbetering van de bolproductie en galanthamine accumulatie te bestuderen, werden water met verschillende pH en humuszuur toegevoegd aan de bodem waarin bollen werden gekweekt. Beide

behandelingen geven geen extra voedingsstoffen, maar beïnvloeden de beschikbaarheid van mineralen en voedingsstoffen die van nature in de bodem aanwezig zijn, wat de planten ten goede komt. Uit visuele inspectie van de planten bleek dat humuszuur de plantengroei verbeterde. Dit was zichtbaar door een groener en breder blad en een groter aantal bloemen per bol en dus een betere kwaliteit van de planten. De productie van galanthamine bleek significant verhoogd door toediening van humuszuur, in het geval van water met verschillende pH werd een kleine toename van het gehalte aan galanthamine waargenomen.

Uit de resultaten van de bovengenoemde experimenten met betrekking tot verschillende stappen van de productie van galanthamine, blijkt dat de galanthamine opbrengst kan worden verbeterd door verschillende factoren in het veld tijdens de bollen productie en een aantal wijzigingen in het extractieproces. Uit dit proefschrift kan in het algemeen worden geconcludeerd dat een goede plaats voor de bollen productie met een hoog gehalte aan alkaloiden Lisse (Nederland) is. De beste leeftijd voor het hoogste gehalte aan galanthamine is 2 jaar wanneer de bollen een maximum gewicht hebben na de oogst uit het veld. Voor hoogste productie van galanthamine per hectare heeft éénjarige teelt de voorkeur. Voor de productie van de bollen kunnen zilte bodems nuttig zijn voor een hogere opbrengst van bollen. Het telen van *Narcissus* kan hiermee aantrekkelijk zijn in gebieden met zilte grond die ongeschikt zijn voor andere gewassen. Wat betreft de praktijk in het veld, kan een toediening van humuszuur, twee of driemaal, in kleine hoeveelheden zeer nuttig zijn voor de productie van bollen in het algemeen en galanthamine productie in het bijzonder. De normale praktijk van het snijden van de bloem in het veld voordat bloemen uitkomen vergroot de productie van biomassa van bollen en het gehalte aan galanthamine significant. Al deze factoren in overweging nemend, kan worden geconcludeerd dat de productie van galanthamine aanzienlijk kan worden vergroot door enkele veranderingen in de werkwijze en het toevoegen van enkele nieuwe behandelingen.

De belangrijkste analytische instrumenten die gebruikt werden om het gehalte aan galanthamine en algemene metaboliëprofielen in de narcissenbollen te bepalen, waren GC-MS, HPLC, en ¹HNMR spectroscopie. Met deze methoden kan galanthamine kwantitatief geanalyseerd worden, en tegelijkertijd kwalitatieve en kwantitatieve

informatie over metabolieten in andere stofklassen verkregen worden. Hoewel een gerichte benadering voor analyse met HPLC-DAD werd gebruikt voor galanthamine identificatie en kwantificatie, kunnen niet-gerichte benaderingen (metabolomics) worden gebruikt voor een algemene metabolietenanalyse b.v. met GC-MS en NMR. In de *Narcissus* studies waren de beperkingen van de NMR-methode voornamelijk gerelateerd aan het relatief kleine aantal metabolieten dat detecteerbaar is in de extracten van de bol. De overlap van signalen maakte identificatie een uitdaging, waarin 2DNMR een belangrijk hulpmiddel is in de structuuropheldering en identificatie.

Tweedimensionale NMR-experimenten verbeteren de resolutie van de signalen waardoor meer verbindingen kunnen worden geïdentificeerd. Ten behoeve van de studies in dit proefschrift kon de verbinding galanthamine ook nauwkeurig worden gekwantificeerd met de NMR metabolomics methode. De combinatie van ^1H NMR metabolomics gegevens met die van andere benaderingen leiden tot een beter begrip van de waargenomen effecten. De ^1H NMR-analyse zoals hier gebruikt is niet alleen een goede analytische methode voor het kwantificeren van verbindingen in plantenextracten, maar is ook de basis van metabolomics, en daarmee een goede eerste stap voor het identificeren van pathways of groepen van verbindingen voor verder onderzoek. Metabolomics is een uitstekende methode om hypothesen te genereren, maar voor het beantwoorden van diepgaande fysiologische vragen is aanvullende informatie van complementaire technieken nodig.

Toekomstige studies op het gebied *Narcissus* zouden zich moeten richten op vragen waarom planten galanthamine aanmaken en om zo te weten te komen hoe dit gemodificeerd kan worden om de hoeveelheid galanthamine die door de plant wordt geproduceerd te verhogen. Bestaande gewassen die geproduceerd worden op grote schaal, zoals de decoratieve bolgewassen in Nederland, vormen een goed uitgangspunt voor het zoeken naar nieuwe verbindingen of producten voor industrieel gebruik. Dat het plantmateriaal al op grote schaal beschikbaar is, is een belangrijk voordeel. Het lijkt erop dat voor de opbrengst per hectare de weerstand tegen ziekten, zoals met name *Fusarium*, belangrijk is. Er is ook behoefte aan variëteiten die meer galanthamine kunnen produceren en betere opbrengsten geven van bollen voor de grootschalige productie van galanthamine. Echter, de tijd die nodig is voor het ontwikkelen van een nieuwe variëteit

is 10-15 jaar en dat is een belangrijke hindernis voor het ontwikkelen van nieuwe variëteiten voor alkaloid productie. Bovendien is met betrekking tot de biosynthese, de identificatie van tussenproducten, enzymen en genen een must. De recente ontwikkeling in de integratie van de 'omics' technologieën maken de weg vrij voor het in kaart brengen van de biosynthese van galanthamine op het niveau van het genoom, transcriptoom, proteoom en metabool, en van de moleculaire regulatie van deze route. Dat zou metabolic engineering van de plant mogelijk maken en zelfs een synthetische biologie benadering met het introduceren van de biosynthese in andere, efficiëntere organismen, zoals bacteriën of gisten. Voor de veredeling zou het doel een *Narcissus* variëteit voor multifunctioneel gebruik moeten zijn, dat wil zeggen één cultivar die gebruikt kan worden voor de productie van bloemen, sierplanten en geneesmiddelen.

