

Chemie der Pilze
I. Chemische Untersuchungen der Sporenmasse
des Pilzes *Ustilago tragopogonis-pratensis* (Pers.) Rouss.

Von Yngve Solberg

Einleitung

In Verbindung mit meinem Interesse am Studium der chemischen Komponenten der Pilze habe ich eine weitere Untersuchung der Sporenmasse des Pilzes *Ustilago tragopogonis-pratensis* angestellt. Der Pilz parasitiert in den Blüten von *Tragopogon pratensis* und bildet eine schwarze, staubige Sporenmasse, ähnlich wie Ruß oder Rost.

Der Zweck dieser Untersuchungen war es, von Anfang an hauptsächlich den Gehalt an freien und protein-gebundenen Aminosäuren, freien Monosacchariden und die quantitative Zusammensetzung der Polysaccharidfraktion zu bestimmen. Später wurden die Untersuchungen durch ein analytisches Studium der verschiedenen anorganischen Komponenten erweitert.

Während der Untersuchungen der nicht-proteinischen Fraktion wurden drei unbekannte, ninhydrin-positive Verbindungen entdeckt. In der Bemühung, diese Komponenten zu identifizieren, wurden mehrere bekannte und natürlich vorkommende, ninhydrin-positive Substanzen mitchromatographiert und verglichen. In dem säulen-chromatographischen System hatten einige der Substanzen Eluierungsvolumina, die sehr nahe, aber nicht identisch mit irgendeiner der unbekannten Verbindungen waren. Eine unbekannte Zucker-Verbindung wurde auf den Papierchromatogrammen entdeckt.

Experimentelles

Vorbereitung des Pilzmaterials. Die Pilze (98 g) wurden in den Monaten Juni und Juli in Süd-Norwegen eingesammelt. Das Material wurde vollständig von den abgerissenen Pflanzenteilen der Wirtspflanze befreit und sofort am Einsammlungsort luftgetrocknet. Im Laboratorium wurde der Pilz weiter bei 40–50°C getrocknet und durch ein Sieb mit einer Maschenöffnung von 0,25 mm gesiebt.

Analysenmethoden. Bei den Bestimmungen der anorganischen Komponenten habe ich empfindliche photometrische Verfahren benutzt. Die Bestimmungen von Wasser, Asche und Stickstoff wurden, wie früher beschrieben, ausgeführt (Solberg, 1967). Der Stickstoff gab nach der Methode von Dumas beinahe denselben Wert. Die individuellen Zucker-Komponenten und Aminosäuren, die Hydrolyseverfahren von Polysacchariden und Proteinen wurden nach Methoden von Solberg (1969, 1970

a,b) festgelegt. Bei Hydrolyse von Polysacchariden wurden 15 N Ameisensäure und verdünnte Schwefelsäure angewandt. Die Resultate stimmten in allen Fällen überein.

In dieser Studie wurden die Protein-Hydrolysate in 0,05 N Salzsäure aufgenommen und nur mit Hilfe eines Ionenaustauschers (Dowex 2, Cl^-) gereinigt. Die Säulen-Chromatographie der Aminosäuren, mit Ausnahme von Tryptophan, habe ich mit einem automatischen Aminosäure-Analysator (Beckman/Spinco Modell 120 B) ausgeführt. Die Lage der einzelnen Aminosäuren auf den Analysator-Chromatogrammen wurde mit Standardsubstanzen festgelegt.

Die Austauscher-Kolonnen in dem Analysator waren mit Beckman Harz PA-35 (für die basischen Aminosäuren) und PA-28 (für die neutralen und sauren Aminosäuren) gefüllt. Die Durchflußgeschwindigkeiten der Citrat-Puffer (0,38 N – pH 5,28 und 0,2 N – pH 3,25/4,25) betrugen 40 ml beziehungsweise 30 ml pro Stunde und die Temperatur 50°C für beide Systeme.

Die spektrophotometrische Methode, beschrieben von Solberg (1969), wurde für die Bestimmung von Tryptophan benutzt. Der Amid-Stickstoff ist identisch mit dem Ammoniak-Stickstoff, der durch eine Hydrolyse in drei Stunden mit N-Salzsäure bei 100°C gebildet wurde.

Alle Bestimmungen wurden mindestens dreimal wiederholt und sind in den Tabellen als Durchschnittszahlen zusammengestellt. Mit Rücksicht auf die Hydrolysen-Verluste sind die Werte von den Aminosäuren Threonin und Serin in diesen Untersuchungen korrigiert.

Ergebnisse und Diskussion

Der Wasserstoffgehalt ist in der Literatur selten angegeben. Ainsworth und Sussman (1965) berichteten, daß der durchschnittliche Wert bei Pilzzellen zwischen 6 und 8 % liege, und Hilpert et al. (1937) teilte mit, daß das Mycel von *Aspergillus niger* einen Gehalt von 6,7 % Wasserstoff habe. Die obengenannten Werte stimmen mit einem Wert von 7,2 % überein, wie ihn meine Untersuchungen ergaben. Die Werte von Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor, die hier in der Sporenmasse von *Ustilago tragopogonis-pratensis* gefunden wurden, scheinen eine gemäß derselben Literatur erwartete Größenordnung zu haben.

Die Elemente Kalium, Magnesium, Eisen, Zink, Mangan, Kupfer und Molybdän scheinen essentiell für alle Pilze zu sein (Ainsworth und Sussman, S. 169). Calcium ist wesentlich für einige Pilze, aber für andere nicht. Nur wenige vollständige Analysen in bezug auf Mineralstoffgehalt von Pilzzellen sind in der Literatur beschrieben. Deshalb ist eine Folgerung aus den Ergebnissen in dieser Studie unmittelbar nicht zu ziehen. Jedoch möchte ich besonders auf den hohen Gehalt an Eisen aufmerksam machen.

Die Ergebnisse der Bestimmungen von Asche, Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphor und einer Reihe von Metallen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Pilzsporen und Pilzmycelium haben gewöhnlich einen größeren Gehalt an Kalium als an anderen Metallen (Ainsworth u. Sussman 1965, S. 169). In der vorliegenden Untersuchung muß man indessen den sehr hohen Gehalt an Kalium im Verhältnis zum Natrium (33 zu 1) besonders beachten.

Untersuchung der freien Zucker und Aminosäuren. Der Nachweis von freien Zuckern im Wasserauszug wurde mit Hilfe der Papier-Chromatographie erbracht. Die niedrigmolekularen Kohlenhydrate Mannose und Glucose wurden in kleiner Menge nachgewiesen. Zusätzlich zu diesen zwei Hexosen wurde ein unbekanntes Oligosaccharid auf den Chromatogrammen mit untenstehendem R_f -Wert* beobachtet.

Glucose	1,00
Saccharose	0,38
Maltose	0,26
Unbekanntes	
Oligosacch.	0,17
Raffinose	0,11

Das unbekannte Saccharid gab mit Anilin-Phthalat eine gelbbraune Farbreaktion und war mit den Oligosacchariden Cellobiose, Melibiose oder Trehalose nicht identisch.

Die 27 bekannten Aminosäuren und anderen ninhydrin-positiven Substanzen in dem Auszug sind in Tabelle 2 in abnehmender Reihenfolge zusammengefaßt. Die Werte der Komponenten sind Resultate von wiederholten Bestimmungen. Die gefundenen Ergebnisse sind mit gegenwärtiger Methode wahrscheinlich noch ungenau, weil möglicherweise ein Verlust unter den verschiedenen Stufen der Extraktion und Reinigung stattfindet.

Glutaminsäure, Arginin und 4-Aminobuttersäure zeigen sich als vorherrschende Säuren in dem Auszug der Sporenmasse. Der größere Teil der Aminosäuren ist nur in kleiner Menge vorhanden.

Drei unbekannte Komponenten, die nach der Aminosäure Leucin eluieren, wurden in dieser Untersuchung gefunden. Diese Komponenten sind in der Figur als A, B und C bezeichnet. Die Figur zeigt auch die Lage der Spitzen im Vergleich zu den anderen Aminosäuren im Extrakt und den zugesetzten Standard-Komponenten allo-Isoleucin und 3(2-Thienyl)-alanin. Die Retentionszeit für die größte der unbekannten Spitzen, B, beträgt 415 Minuten und liegt zwischen Thienylalanin und Tyrosin. Das Verhältnis der Flächen unter der 440-nm- und 570-nm-Absorptions-Spitze ist 0,32 (Conkerton, 1968 und Solberg, 1969). Die Substanz B ist nicht identisch mit Glucosamin, Homocystin oder 3,4-Dihydroxyphenylalanin und zeigt eine vollkommene Stabilität bei Erwärmen auf 110°C mit 6 N Salzsäure von 20 Stunden Dauer. Die Verbindung wurde nicht in den Hydrolysaten von extrahiertem Material gefunden und daraus folgt, daß B als eine freie Substanz in der Sporenmasse anwesend sein muß.

Chromatographische Bestimmung der Hydrolyse-Produkte. Nach der Abtrennung der löslichen Zucker und Aminosäuren wurde die getrocknete Sporenmasse mit Ameisensäure, verdünnter Schwefelsäure und 6 N Salzsäure hydrolysiert. Danach wurden die freigesetzten Monosaccharide und Aminosäuren auf chromatographischem Wege quantitativ bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden merkwürdigerweise nur die Monosaccharide Glucose und Mannose gefunden, und zwar in folgender Menge:

Glucose =	6,6 g / 100 g Sporenmasse
Mannose =	16,7 g / 100 g Sporenmasse

* Papier: Whatman Nr. 4; Laufmittel: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (80 + 20 + 10)

Im Gegensatz zu den Angaben von Nebel, ist die Summe der zwei Hexosen überraschend niedrig. In keinem Fall wurden Fructose, Galactose oder Hexuronsäuren entdeckt.

Nebel berichtete 1955 über die Zusammensetzung der Polysaccharide von 41 Basidiomyceten und Ascomyceten. Nur die Hexosen Glucose, Galactose und Mannose wurden gefunden. In zwei Fällen fand er 11,8 % und 16,9 % Mannose, während der Gehalt der übrigen Pilzhydrolysate in allen Fällen unter dem Wert von 5,5 % Mannose-Anhydrid lag.

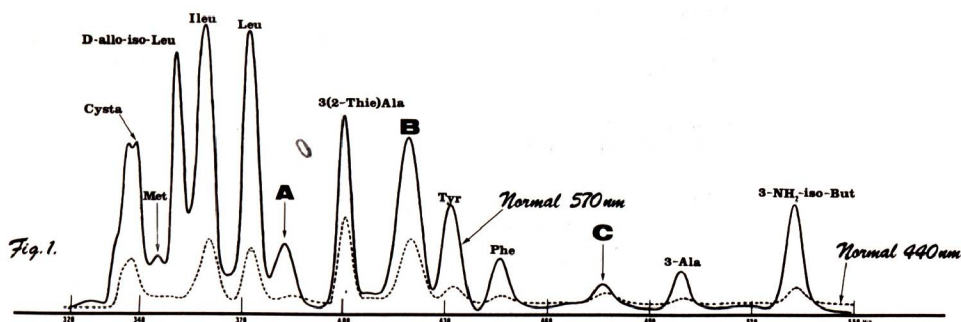
Die Ergebnisse hinsichtlich der einzelnen Aminosäuren in der Protein-Fraktion sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Ich mache auf den hohen Gehalt an Arginin, Lysin und Glutaminsäure aufmerksam; Cysteinsäure und Methioninsulfon sind jedoch nur in kleiner Menge vorhanden. Die Resultate in der Tabelle sind als Durchschnittswerte von mehreren Hydrolysaten und als Prozent Aminosäure-Stickstoff der totalen Stickstoff-Menge des Pilzes ausgedrückt. Die Summe von diesem Aminosäure-Stickstoff (Ammoniak, Glucosamin und das unlösliche Fragment, das bei der Hydrolyse gebildet wird, hinzugefügt) beträgt mehr als 98 % des totalen Stickstoff-Wertes. Von großem Interesse, aber nicht unerwartet, ist der überaus hohe Gehalt an Stickstoff bei dem nichthydrolysierten Rest, der durchschnittlich 29,5 % betrug. Wie Altschul 1958 berichtete, liegt ungefähr 80 % des Gesamtstickstoffes der Hefe als Protein vor. In der vorliegenden Arbeit über *Ustilago tragopogonis-pratensis* beträgt der Protein-Stickstoff etwa 66 %. An der großen Menge des Ammoniaks (7,28 %), die während der Hydrolyse entsteht, ist die Desaminierung der Säureamide Glutamin und Asparagin, die Zersetzung der Hexosamine und der Zerfall von Threonin und Serin schuld. Der Amid-Stickstoff-Gehalt betrug durchschnittlich 4,70 % des Gesamtstickstoffes. Im Vergleich ist der Amid-Wert auffallend hoch.

Die Gerüstsubstanz der Pilze, das Chitin, ist eine sehr stickstoffreiche und wichtige Verbindung und als ein Derivat der Cellulose zu betrachten. Glucosamin ist das 2-Amino-2-desoxy-Derivat der Glucose und wird bei der Hydrolyse des Chitins gebildet. Die Verbindung wurde in den Hydrolysaten des hier untersuchten Pilzes gefunden, der Wert ist jedoch sehr klein (0,23 %).

Ein Teil der Sporenmasse wurde während 48 Stunden mit einem großen Überschuß an 6 N Salzsäure hydrolysiert, weitere 24 Stunden mit 3 N NaOH und endlich mit konzentrierter Salzsäure behandelt. Das zurückgebliebene Material wurde mit viel Wasser, Äthanol und Aceton gewaschen. Vor der Elementaranalyse wurde das unhydrolysierte Material mehrere Stunden bei ca. 80°C getrocknet. Die Asche von diesem säure- und alkalibeständigen Rückstand betrug 2,4 %. Die chemische Zusammensetzung, im Vergleich mit Chitin, ist in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigt sich, daß dieser Bruch kein reines Chitin, sondern eine komplexe Mischung von schwer hydrolysierbaren Stickstoff-Verbindungen der Sporenmasse sein muß. Altschul berichtete auch, daß ein Teil des Stickstoffes in Purinen, Pyrimidinen, Cholin und anderen nichtproteinösen Komponenten vorhanden sei.

Literatur

- AINSWORTH, G. C. u. A. S. SUSSMAN (1965) – The Fungi, An Advanced Treatise, Volume I: The Fungal Cell. Academic Press.
- ALTSCHUL, A. M. (1958) – Processed Plant Protein Foodstuffs. New York.
- CONKERTON, E. J., COLL, E. E. u. R. L. ORY (1968) – A Computer Program for Identifying Anomalous Peaks in Automatic Amino Acid Analyses. Analytical Letters 1 (5), 303–310.
- HILPERT, R. S., BECKER, D. u. W. ROSSEE (1936) – Untersuchungen an Flechten, Pilzen und Algen. Biochem. Zschr. 289, 179–192.
- NEBEL, H. J. (1955) – Die Kohlenhydrate einiger Pilze. Dissertation, Universität Würzburg.
- SOLBERG, Y. (1967) – IV. The chemical composition of some Norwegian lichen species. Ann. Bot. Fenn. 4, 29–34.
- SOLBERG, Y. (1969) – VII. The chemical investigations of the lichen species *Lecanora (Aspicilia) myrinii* (Fr.) Nyl. Z. Naturforsch. 24 b, 447–451.
- SOLBERG, Y. (1970 a) – VIII. An examination of the free sugars and ninhydrin-positive compounds of several Norwegian lichen species. Lichenologist 4, 271–282.
- SOLBERG, Y. (1970 b) – IX. Quantative determination of monosaccharides and amino acids in hydrolysates of several Norwegian lichen species. Lichenologist 4, 283–288.



Die Elutionschromatographische Aminosäuretrennung eines Extraktes des Pilzes *Ustilago tragonis-pratensis* nach der hier beschriebenen Methode.

Tabelle 1. Die chemische Zusammensetzung der Sporenmasse von *Ustilago tragopogonis-pratensis* aus Süd-Norwegen. Die Werte sind auf getrocknetes Material bezogen.

Asche	4,15	}	g per 100 g Sporenmasse
Kohlenstoff	50,80		
Wasserstoff	7,20		
Stickstoff	3,68		
Phosphor	0,33		
Schwefel	0,21		
Kalium	0,66	}	
Natrium	0,02		
Calcium	0,21		
Magnesium	0,10		
Eisen	111,0	}	mg per 1000 g Sporenmasse
Zink	37,3		
Mangan	18,2		
Kupfer	4,3		
Molybdän	14,2		
Kobalt	4,0		
Bor	< 5		
Selen	< 10		

Tabelle 2. Der Gehalt an freien Aminosäuren, Cystathionin, Äthanolamin und Methionin-Sulfoxid in *Ustilago tragopogonis-pratensis*. Die Werte sind als mg Aminosäuren pro 100 g getrocknete Sporenmasse ausgedrückt.

Glutaminsäure	239	
Arginin	185	
4-Aminobuttersäure	180	
Asparagin	}	126
Glutamin		
Alanin	}	37
Asparaginsäure		31
Lysin		16
Threonin		15
Ornithin, Glycin	}	> 5, < 10
Valin, Cystathionin		
Histidin, Tyrosin,	}	> 1, < 5
3-Amino-isobuttersäure,		
Isoleucin, Leucin		
Phenylalanin, 3-Alanin,	}	< 1
Sarcosin, Serin, Prolin,		
Methionin, Cysteinsäure,		
Methioninsulfoxyd,		
Äthanolamin		

Tabelle 3. Der Anteil der einzelnen Aminosäuren an der Protein-Fraktion der Sporenmasse von *Ustilago tragopogonis-pratensis*. Die Werte sind als Prozent Aminosäure-Stickstoff auf die totale Stickstoff-Menge des Pilzes ausgedrückt.

Lysin	5,89
Histidin	2,88
Arginin	9,96
Asparaginsäure	4,41
Threonin	2,72
Serin	3,75
Glutaminsäure	5,40
Prolin	2,42
Glycin	4,45
Alanin	4,88
Valin	3,06
Methionin	0,71
Isoleucin	2,49
Leucin	3,93
Tyrosin	1,21
Phenylalanin	1,62
Cysteinsäure	0,78
Tryptophan	1,14
Amide	4,70
Die totale Menge des Aminosäure-Stickstoffes	66,40
Glucosamin	0,23
Ammoniak	2,28*
Stickstoff-Rest	29,54
Der Gesamtwert	98,45

* Die Summe des Ammoniums des Pilzes und des Ammoniaks, das während der Hydrolyse durch die Zersetzung der Hexosamine gebildet wird.

Tabelle 4. Die Elementaranalyse des unhydrolysierten Materials der Sporenmasse, im Vergleich mit gereinigtem Chitin.

		Chitin (C ₈ H ₁₃ NO ₅) _x
C	64,6	47,3
H	4,0	6,4
N	5,7	6,9
O	24,1	39,4
S	0,4	—
Total	98,8	100,0

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Pilzkunde](#)

Jahr/Year: 1974

Band/Volume: [40_1974](#)

Autor(en)/Author(s): Solberg Yngve

Artikel/Article: [Chemie der Pilze I. Chemische Untersuchungen der Sporenmasse des Pilzes Ustilago tragopogonis-pratensis \(Pers.\) Rouss. 221-228](#)