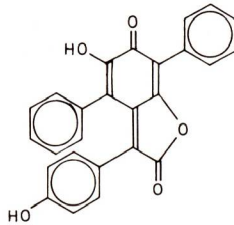


Untersuchungen an Farbstoff-produzierenden Holzpilzen*
IV. Über Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung und
der Produktion von Lipiden bei *Peniophora sanguinea*
(Fr.) Bres. durch Tyrosingabe

Von F. v. Massow und M. Tevini

Der Basidiomycet *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. bildet Farbstoffe, die zur Terphenylchinon-Gruppe gehören. Das Hauptpigment des Pilzes ist Xylerythrin (I).



I

Bei Arbeiten über die Biosynthese dieses Farbstoffes wurde festgestellt, daß ein Tyrosin-Zusatz zur Nährlösung die Farbstoffbildung anregt. Um zu prüfen, ob dieser Einfluß des Tyrosins allein auf den Farb-Stoffwechsel beschränkt ist, oder ob auch andere Stoffwechsel-Bereiche betroffen sind, wurde die Zusammensetzung der Lipide von Normalmedium-Kulturen und Kulturen mit zusätzlicher Tyrosin-Gabe einer vergleichenden Untersuchung unterworfen.

Eine frühere Untersuchung des Gesamtfettsäuremusters von *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. zeigte eine Verschiebung zu kürzerkettigen Fettsäuren und stärker gesättigten

*) Teil III: v. Massow, Fr., Tevini, M.: Arch. Mikrobiol. 94, 89–92 (1973). *Verwendete Abkürzungen:* Chl/EE = Chloroform/Essigsäureäthylester; Pä = Petroläther.

Abstract. As previously described tyrosine application modifies the fatty acid- and the lipid-metabolism in cultures of *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. Detailed investigations showed, that the fatty acid part of the sterol- and wax-esters is altered particularly, whereas the free fatty acids and the fatty acids of the diglycerides show only little or no changes. The production of diglycerides increases at the expense of the sterol- and wax-esters.

Anteilen, sofern der Nährlösung Tyrosin zugesetzt wurde (v. Massow und Tevini 1973). Welche Lipidfraktionen besonderen Fettsäureschwankungen bzw. -veränderungen ausgesetzt sind, läßt sich naturgemäß aus der Gesamtfettsäureanalyse nicht entnehmen.

Die folgenden Untersuchungen erstreckten sich daher auf freie Fettsäuren und Fettsäurehaltige Verbindungen, wobei es sich hauptsächlich um veresterte Glyceride und Wachsester handelt. Es sollte nicht die mengenmäßige Anreicherung einzelner Lipidkomponenten im Vordergrund stehen, sondern die Aussage, daß es bei *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. möglich ist, durch Tyrosingaben, den primären Fettstoffwechsel zu beeinflussen in der Weise, daß Sättigungsgrad und Kettenlänge der Fettsäuren variiert werden.

Material und Methoden

Versuchsorganismus, Medium und Kultivierung. *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. (eigene Isolierung von *Prunus cerasus*); Standkulturen bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ im Tageslicht mit je 50 ml Medium in 200 ml-Erlenmeyerkolben; Medium: Aneurin 50 μg ; Biotin 1 μg ; Inosit 50 mg; KH_2PO_4 0,5 g; MgSO_4 0,5 g; ZnSO_4 1 mg; FeCl_3 10 mg; Glucose 8 g; Maltose 15 g; Hefeextrakt 0,1 g; L-Alanin 0,6 g; L-Asparagin 0,2 g; L-Glutaminsäure 0,2 g; H_2O ad 1000 ml; Tyrosin-Kulturen erhielten nach 14 Tagen einen Zusatz von 50 μmol L-Tyrosin pro Kulturgefäß.

Extraktionsverfahren. Aus den Kulturen wurden Petroläther(Pä)-und Chloroform/Essigsäureäthylester(Chl/EE)-Extrakte gewonnen (beschrieben bei v. Massow und Tevini 1973).

Methylierung. Die Analyse der Fettsäuren erfolgte in Anlehnung an die Methode von Metcalfe *et al.* (1966).

Gaschromatographische (GC) Analyse. Die GC-Analysen wurden bei 165°C iso an einem Hewlett Packard Chromatograph 7620A durchgeführt. Als Säule diente eine Glassäule 6 feet, $1/4''$, 10 % EGSS-X auf Gaschrom Q 100/150 mesh; Trägergas N_2 -spezial; Durchflußrate ca. 40 ml/min. Die Identifizierung im GC (s. Bild 1) erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Reinsubstanzen. Die quantitativen Bestimmungen wurden durch elektronische Integration der Elutionsdiagramme vorgenommen. Für eine korrekte Auswertung sind die Integrationsparameter den Elutionsprofilen entsprechend gewählt worden.

Dünnschichtchromatographische (DC) Analyse. Die Pä- und Chl/EE-Extrakte wurden auf Kieselgelplatten (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 5721) mit dem Laufmittelsystem Petroläther (60–70 $^\circ\text{C}$)/Diäthyläther/Eisessig (90 : 10 : 1) aufgetrennt (s. Bild 2). Die fettsäurehaltigen Banden wurden durch Jodbedampfung markiert, ausgekratzt, mit Äthanol/Chloroform (2 : 1) eluiert, hydrolysiert und nach der Methylierung der GC unterworfen. Die Identifizierung der Einzelbanden geschah anhand von Rf-Werten in mehreren Laufmittelsystemen: Isopropyläther/Eisessig (96 : 4); Heptan/Benzol (9 : 1); Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (80 : 20 : 1).

Zur quantitativen Auswertung im CAMAG-DC-Scanner (Reflexionsmessung bei Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 400–600 nm) wurden die DC-Platten zweimal mit H_2SO_4 conc. eingesprüht und je 30 min. bei 120°C getrocknet. (Die Meßwerte sind mit einer Genauigkeit von $\pm 3,4\%$ reproduzierbar.)

Im übrigen basieren die quantitativen Aussagen auf mehreren Kulturreihen und sind im Bereich biologischer Varianz signifikant.

Ergebnisse

Lipidproduktion

Bei *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. führt Tyrosingabe zu einer Myceltrockengewichtszunahme von 460 mg auf 590 mg pro Kultur (+ 28 %). Die quantitative Bestimmung der Gesamtlipide in bezug auf gleiches Myceltrockengewicht ergab in Tyrosinkulturen mit 5,7 mg/g gegenüber 5,0 mg/g in Normalmedium-Kulturen nur einen geringfügig erhöhten Lipidanteil. Interessanterweise variiert jedoch innerhalb der Gesamtlipide der Anteil an polaren und apolaren Lipiden unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen. Normal-Kulturen enthalten ca. 48 % polare und 52 % apolare Lipide, in Tyrosinkulturen ist dagegen der Anteil der apolaren Lipide auf 74 % erhöht.

Ein Vergleich der mengenmäßigen Anteile der untersuchten Lipidkomponenten (s. Tab. 1) zeigt, daß durch Tyrosingabe die Bildung der Wachs- und Sterolester (Bande 1) zugunsten der Diglyceride (Bande 6) abnimmt. Letztere Bande nimmt als einzige sowohl bei den PÄ-leichtlöslichen wie auch bei den PÄ-schlechtlöslichen Lipiden zu. (Ansonsten sind besonders starke Veränderungen (Zunahme) nur bei den PÄ-leichtlöslichen Lipiden zu finden.) Diese Erhöhung scheint zu Lasten der Phospholipide zu gehen, wie erste halbquantitative Vergleiche der einzelnen separierten Lipidkomponenten zeigten. Tyrosinverfütterung führt bei *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. also zu einer Erhöhung des Gesamtlipidgehaltes, wobei aber die Zunahme der einzelnen Lipidkomponenten unterschiedlich stark ist. Daher findet man in Tyrosinkulturen eine veränderte prozentuale Zusammensetzung der Lipidkomponenten. Des weiteren verändert Tyrosingabe die quantitative Zusammensetzung des Fettsäure-Spektrums jeder Lipidkomponente (wenn auch in unterschiedlichem Maße). Da die Voruntersuchungen nur mäßige Veränderungen der Fettsäure-Muster erkennen ließen, wurde versucht, die apolaren/polaren Lipide zu fraktionieren. Dies geschah dadurch, daß zunächst die Petrolätherleichtlösliche Lipidfraktion aus dem Pilzmycel gewonnen wurde (PÄ-Extrakt) und dann die PÄ-schlechtlöslichen apolaren zusammen mit den polaren Lipiden durch Chl/EE extrahiert wurden. Bei der Aufarbeitung der so fraktionierten Lipide ist die Veränderung der Fettsäure-Muster in beiden Extrakten klar feststellbar. Insbesondere ließ sich bei den DC-Banden, deren Fettsäurezusammensetzung im PÄ-Extrakt konstant blieb, eine deutliche Veränderung der Fettsäure-Muster im Chl/EE-Extrakt erkennen und umgekehrt.

P ä E x t r a k t (Tabelle 2).

Bei den PÄ-Extrakten wurden die DC-Banden (Abb. 2) 4 und 5 (Triglyceride; freie Fettsäuren) sowie 6 und 7 (1,3- bzw. 1,2-Diglyceride; Monoglyceride) wegen zu geringen Anteilen von Bande 4 bzw. 7 jeweils zusammengefaßt. Eine qualitative oder quantitative Veränderung der Fettsäuren dieser Bestandteile erfolgte nicht. Unterschiede zeigten sich bei der Bande 1 (Sterol- und Wachsester). Bei dieser Bande wirkt sich eine Tyrosingabe so aus, daß es zu einer Verkürzung der Länge der Kohlenstoffkette und zu einer Abnahme der ungesättigten C₁₈-Säuren kommt. Dies ist auch ersichtlich aus einer Erhöhung des Zahlenwertes des C₁₆/C₁₈-Quotienten von 0,58 auf 1,47 und einer gleichzeitigen Verringerung des Wertes für den Anteil der Doppelbindungen pro Mol von 1,32 auf 0,85. Bei der DC-Bande 2 (0-Dialkylmonoglyceride und Alk-1-enyl-diglyceride) in Extrakten aus Tyrosin-Kulturen konnten Fettsäureanteile nur in Spuren ermittelt werden.

C h l / E E E x t r a k t (Tabelle 3).

Durch Tyrosingaben-unbeeinflußt blieb die DC-Bande 3 (Fettsäuremethylester). Leichte Veränderungen (wechselnde Verschiebungen innerhalb der Anteile von C₁₈ : 2- und C₁₈ : 3-Säuren) wiesen die Banden 2, 5 und 6 auf (0-Dialkylmonoglyceride und Alk-1-enyl-diglyceride; freie Fettsäuren; 1,3- bzw. 1,2-Diglyceride). Eine starke Veränderung (Vermehrung der C₁₆-Säuren und Verringerung der ungesättigten C₁₈-Säuren)

zeigten wie im P_ä-Extrakt die Bande 1 (Sterol- und Wachsester) und zusätzlich die Banden 4 und 7 (Triglyceride; Monoglyceride). Beispielsweise verändert sich der C₁₆/C₁₈-Quotient in der Bande 7 von 0,22 auf 1,65 und gleichzeitig der Wert für den Anteil der Doppelbindungen pro Mol von 2,43 auf 0,91.

Diskussion

Die Extraktion der Lipide mit P_ä und anschließend mit Chl/EE zeigt die veränderten Fettsäuremuster innerhalb der untersuchten Lipidfraktionen. Qualitativ löst man grundsätzlich mit beiden Lösungsmitteln Glyceride mit identischen Fettsäuren heraus; die relativen prozentualen Anteile der Fettsäuren variieren jedoch quantitativ. Im apolaren P_ä-Extrakt sollte man Glyceride mit relativ mehr C₁₆-Säuren, mit Chl/EE Glyceride mit mehr ungesättigten C₁₈-Säuren erhalten. Dies entspräche dem besseren Löslichkeitsverhalten der relativ polaren ungesättigten C₁₈-Fettsäuren in Chl/EE gegenüber den gesättigten unpolaren C₁₆-Säuren in P_ä. Der Einfluß der freien Hydroxylgruppe(n) der Mono- und Diglyceride sollte jedoch die Löslichkeit stärker verändern als die Struktur der Fettsäuren, so daß die Polarität der Fettsäuren nicht unbedingt ein Kriterium für das Auftreten in den Extrakten ist. Dies läßt sich auch daraus schließen, daß nicht in allen untersuchten Fraktionen eine gleichmäßige Anreicherung der kürzerkettigen Säuren in P_ä und der ungesättigten C₁₈-Säuren in Chl/EE zu finden ist. Es ergibt sich daher die Interpretationsalternative, daß Glyceride, die P_ä-löslich sind, keine oder nur geringe Bindungen am Proteinanteil haben. Dementsprechend erscheinen die Lipide, welche stärker proteinassoziiert sind, im polaren Extraktionsgemisch. Die relative Konstanz der quantitativen Zusammensetzung des Chl/EE-Extraktes stützt ebenfalls die Annahme einer Anreicherung der proteinassoziierten Lipide. So verändern sich in diesem Extrakt der Summenanteil der Glyceride (Normal 31,9 %; Tyrosin 33,8 %) und der Summenanteil von freien Fettsäuren und deren Methylester (Normal 31,2 %; Tyrosin 30,9 %) ebensowenig wie die Anteile der Sterol- und Wachsester (Normal 25,7 %; Tyrosin 24,7 %) sowie der O-Dialkylmonoglyceride und Alk-1-enyl-diglyceride (Normal 11,0 %; Tyrosin 10,7 %), und auch die mehr lipophilen Triglyceride sind im P_ä-Extrakt nur in Spuren vorhanden. Auf das Löslichkeitsverhalten in P_ä ist allenfalls das Auftreten der Monoglyceride in Chl/EE zurückzuführen, da die beiden freien O-H-Gruppen dieser Substanzgruppe sehr polar wirken.

Phospholipide finden sich aufgrund ihres polaren Baus überwiegend in der Chl/EE-Phase. Dort wurde Phosphatidylcholin nachgewiesen, allerdings bei mehreren verschiedenen Kulturreihen in stark schwankenden Konzentrationen. Obwohl hierfür kein eindeutiger Zusammenhang mit der Farbstoffproduktion von *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. hergeleitet werden konnte, deuten erste Analysen solche Tendenzen an.

Die allgemeine Erwartung, daß Tyrosingabe bestenfalls die Sekundärstoffwechselkette der Farbstoffbildung beeinflusst, erfüllt sich nach den hier vorgelegten Ergebnissen nicht. Durch Tyrosin läßt sich eindeutig auch ein Einfluß auf den Fettsäuremetabolismus erkennen. Wahrscheinlich werden von *Peniophora sanguinea* (Fr.) Bres. bei Tyrosinüberschuß neben anderen auch solche Sekundärstoffe in erhöhtem Maße gebildet, deren Ausgangsbasis Acetat und Malonat sind. Dies könnte bedeuten, daß ein großer Teil des frei verfügbaren Acetat/Malonat-Angebotes für die Fettsäuresynthese verlorenggeht. Möglicherweise werden aufgrund dieser Mangelsituation die letzten Verlängerungsschritte der Fettsäurebiosynthese etwa zu den C₁₈-Säuren stark beeinträchtigt bzw. behindert.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

v. MASSOW, Fr., TEVINI, M. (1973): Untersuchungen an Farbstoff-produzierenden Holzpilzen. III. Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Lipide bei *Peniophora sanguinea*. (Fr.) Bres. durch Tyrosingabe. Arch. Mikrobiol. 94, 89–92

METCALFE, L. D., SCHMITZ, A. A., PELKA, J. R. (1966): Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 38, 514–515.

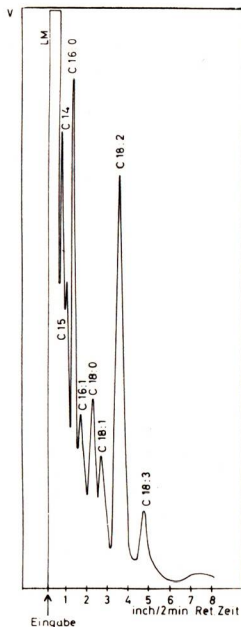


Bild 1: Beispiel einer GC-Trennung der Fettsäuren von DC-Bande 4 (Angaben siehe unter Material und Methoden).

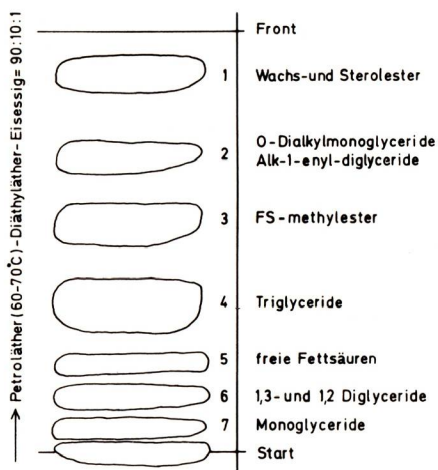


Bild 2: DC-Trennung der Lipide.

Tab. 1: Relativer prozentualer Anteil der untersuchten Lipid-Komponenten (1–7) des Gesamt-, PÄ- und Chl/EE-Extraktes aus Normal- und Tyrosin-Kulturen (siehe Legende Abb. 2).

DC-Bande	Normal			Tyrosin		
	Gesamt	Pä	Chl/EE	Gesamt	Pä	Chl/EE
1	31,2	38,8	25,7	25,6	27,1	24,7
2	15,3	21,4	11,0	13,2	(17,3) ¹	10,7
3	13,7	3,1	21,2	14,4	11,3	16,5
4	1,1	+	1,8	1,1	+	1,8
5	9,5	8,7	10,0	12,2	8,9	14,4
6	19,9	28,0	14,2	26,2	35,4	20,2
7	9,3	+	15,9	7,1	+	11,8

1 Bei der Untersuchung dieser Bande wurden unverständlicherweise nur minimale Fettsäure-Anteile gefunden (s. Tab. 2).

Tab. 2: Relative prozentuale Fettsäure-Zusammensetzung der durch DC erhaltenen Lipidkomponenten der PÄ-Extrakte aus Normal- und Tyrosin-Kulturen (siehe Legende Abb. 2).

DC-Bande	Normal					Tyrosin				
	1	2	3	(4+)5	6(+7)	1	2	3	(4+)5	6(+7)
Fett- säure										
C ₁₄ :0	12,4	7,6	4,1	1,1	1,2	24,3	–	0,3	1,4	1,8
C ₁₅ :0	+	–	–	2,0	1,6	33,9	–	–	1,7	1,6
C ₁₆ :0	55,1	29,6	34,9	19,3	18,3	28,5	–	59,4	20,4	20,4
C ₁₆ :1	–	–	–	2,4	2,8	+	–	–	1,6	1,1
C ₁₈ :0	1,8	5,9	1,9	6,1	2,9	+	–	3,8	5,1	2,7
C ₁₈ :1	–	0,8	1,8	3,9	1,1	+	–	2,2	4,0	1,4
C ₁₈ :2	17,9	37,3	41,1	63,9	70,8	+	–	18,8	63,7	66,5
C ₁₈ :3	10,4	18,4	15,8	0,4	1,3	13,0	–	15,5	1,1	3,5
C ₂₀ :0	2,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C ₂₂ :0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C ₂₄ :0	–	0,1	0,3	1,0	–	–	–	–	1,0	1,0
C ₂₄ :1	–	0,3	0,1	–	–	–	–	–	+	+
C ₁₆ /C ₁₈	1,83	0,47	0,58	0,29	0,28	2,19	–	1,47	0,30	0,29
mol% Doppel- bindungen	0,67	1,31	1,32	1,35	1,49	0,39	–	0,85	1,36	1,36

Tab. 3: Relative prozentuale Fettsäure-Zusammensetzung der durch DC erhaltenen Lipidkomponenten der Chl/EE-Extrakte aus Normal- und Tyrosin-Kulturen (siehe Legende Abb. 2).

DC-Bande	Normal							Tyrosin						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Fett-säure														
C ₁₄ :0	9,0	–	0,3	1,8	–	0,6	–	–	12,3	0,5	10,2	1,4	–	11,0
C ₁₅ :0	–	–	1,4	1,6	–	2,6	–	–	–	1,2	+	1,5	–	–
C ₁₆ :0	22,7	21,1	15,4	28,6	21,5	22,9	18,2	57,0	20,2	17,6	42,8	23,9	19,9	55,3
C ₁₆ :1	–	1,6	1,7	0,8	–	3,3	–	0,2	0,5	1,4	–	1,3	–	–
C ₁₈ :0	0,9	0,1	1,2	6,4	0,2	3,3	0,2	1,0	1,1	2,8	12,7	3,2	4,8	1,0
C ₁₈ :1	0,1	0,1	1,5	1,4	–	2,8	0,1	+	1,0	3,2	14,4	3,1	1,5	0,9
C ₁₈ :2	1,0	65,4	75,8	53,4	21,8	62,0	19,6	2,0	16,4	70,6	2,3	60,7	30,8	4,3
C ₁₈ :3	66,2	11,7	1,6	5,8	56,5	1,3	61,5	36,0	48,0	0,1	17,6	4,2	40,8	27,3
C ₂₀ :0	–	–	0,2	–	–	–	–	3,3	–	–	–	–	2,1	–
C ₂₂ :0	–	–	0,3	–	+	–	–	+	0,3	–	–	–	–	–
C ₂₄ :0	–	–	0,4	–	–	1,0	0,2	0,5	0,2	2,1	–	0,4	0,1	–
C ₂₄ :1	–	–	0,2	–	–	0,2	–	–	–	0,5	–	0,3	–	–
C ₁₆ /C ₁₈	0,33	0,29	0,21	0,44	0,27	0,38	0,22	1,47	0,31	0,25	0,91	0,35	0,26	1,65
mol% Doppel- bindungen	2,01	1,68	1,60	1,26	2,03	1,34	2,43	1,12	1,78	1,47	0,72	1,39	1,86	0,91

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1975

Band/Volume: [41_1975](#)

Autor(en)/Author(s): Massow F. v., Tevini Manfred

Artikel/Article: [Untersuchungen an Farbstoff-produzierenden Holzpilzen* IV. über Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung und der Produktion von Lipiden bei *Peniophora sanguinea* \(Fr.\) Bres. durch Tyrosingabe 99-106](#)