

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Untersuchungen an *Beauveria tenella* (NRRL 2334, 2335, 2336; bisher *Agaricus campestris*)

II. Wachstum, Stoffwechsel, Fettspeicherung und Enzymaktivitäten

Von
H. P. MOLITORIS

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1963)

In dem vorausgegangenen Teil der Arbeit (MOLITORIS 1963 a) wurde über allgemeine Charakteristica, die Morphologie und systematische Stellung der Stämme *NRRL 2334, 2335, 2336* berichtet. Sie konnten als *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem. identifiziert werden. Im folgenden soll über die weiteren Untersuchungen bezüglich des Wachstums, des Stoffwechsels und der Fettspeicherung dieser Stämme sowie ihrer Enzymaktivitäten berichtet werden.

Die Pilze der Gattung *Beauveria* erregten zuerst Aufmerksamkeit als Erreger der im 18. und 19. Jahrhundert berüchtigten Krankheit des Seidenspinners (*Bombyx mori* L.), die damals der Seidenindustrie beträchtliche Verluste verursachte. AGOSTINO BASSI isolierte 1834 von einer infizierten Seidenspinnerraupe den später nach ihm benannten Pilz *Beauveria bassiana* als den Erreger dieser Krankheit und war damit wohl der erste Untersucher (FILDES 1951), der ein „kleines Lebewesen“ als Erreger einer Krankheit entdeckt und beschrieben hat.

Die systematische Stellung der *Beauveria*-Arten wechselte im Laufe der Zeit häufig, bis schließlich MACLEOD (1954 a, 1954 b) diese Gattung eingehend nachuntersuchte. Er reduzierte die zahlreichen Arten nach Abtrennung anderer Gattungen auf zwei, nämlich *Beauveria bassiana* und *Beauveria tenella*, die sich nur durch ihre Sporenform unterscheiden.

Die Untersuchungen an *Beauveria* wurden hauptsächlich im Hinblick auf ihren Parasitismus an Insekten durchgeführt (MADELIN 1960), einerseits als unerwünschter Erreger der Seidenspinnerkrankheit, andererseits aber auch als willkommener Helfer in der biologischen Bekämpfung von Schadinsekten wie des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* L.), des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.) und anderer (vgl. FRANZ 1961).

In jüngerer Zeit wurden auch Versuche über die Wachstumsansprüche in Submerskultur angestellt (MACLEOD 1954 b; HUBER 1958; CORDON u. SCHWARTZ 1962), sowie über die Produktion von Chitinase (HUBER 1958; CLAUS 1961), die der Pilz für die Durchdringung der Insektencuticula benötigt.

Durch die Identifizierung der bisher als *Agaricus campestris* geltenden Stämme *NRRL 2334, 2335, 2336* als *Beauveria tenella*, tragen nun auch die an ihnen durchgeführten Untersuchungen zur Kenntnis der Gattung

Beauveria bei. Diese Versuche wurden vor allem unter kommerziellen Aspekten zum Einsatz des Pilzes in der Champignonkultur, oder zur Herstellung von Mycel für Suppen und ähnlichem durchgeführt.

Sie beschäftigten sich mit Kulturverfahren, Nährstoffsansprüchen und dem Einfluß verschiedener Faktoren auf Entstehung und Verbesserung des erwünschten Champignongeschmackes (HUMFELD 1948; HUMFELD u. SUGIHARA 1949; HUMFELD 1950/51; HUMFELD u. SUGIHARA 1952; SUGIHARA u. HUMFELD 1954; SZUECS 1956; O'NEIL 1956; BENKO 1958; REUSSER, SPENCER u. SALLANS 1958; MOUSTAFA 1960; FALANGHE 1962).

Ein in Submerskultur gut wachsender Stamm des Fliegenpilzes *Amanita muscaria* L., wurde kürzlich ebenfalls als *Beauveria (bassiana)* identifiziert. Mit ihm waren bereits Submerskulturversuche über Nährstoffsansprüche und einen ausgeschiedenen Farbstoff durchgeführt worden (PACIFICI et al. 1960; Vining, KELLEHER u. SCHWARTING 1962).

A. Organismen und Methoden

1. Organismen

Es wurden wiederum die Stämme NRRL 2334, 2335, 2336 verwendet und auf Biomalzagar-Schrägröhrchen (2,5% Biomalz, 1,5% Agar, pH 5,5) durch Sporenüberimpfung vermehrt.

2. Nährmedien

Wie in der vorhergehenden Arbeit (MOLITORIS 1963 a) kamen Biomalznährösung und das Medium nach HUMFELD u. SUGIHARA (1949) zur Verwendung und wurden ebenso angesetzt. Weiterhin wurde ein Mineralmedium folgender Zusammensetzung benutzt: Grundmedium: KH_2PO_4 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,4 g; CaCl_2 0,15 g; H_2SO_4 1,0 n 1,5 ml; Spurenelementlösung ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,36 g; ZnCl_2 0,20 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; aqua dest. auf 1000 ml) 20,0 ml; C-Quelle (verschiedene Mengen Biomalz oder Glucose); aqua dest. auf 900 ml; mit NaOH auf pH 7,5. Stickstoffquelle: 1% Harnstofflösung in aqua dest., steril filtriert. Das Grundmedium wurde zu je 36 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben gefüllt, autoklaviert (15 min bei 1,2 atü) und dann unter sterilen Bedingungen mit je 4 ml der Harnstofflösung versetzt (Endkonzentration Harnstoff = 0,1%; Stickstoff = 0,05%).

Aus Testbestimmungen ergab sich, daß unter den gewählten Bedingungen die Caramelisierung der Glucose so gering war, daß sich eine getrennte Sterilisation erübrigte. Bei Versuchen mit zusätzlichen C-Quellen in kleinen Mengen (Crotonat, Acetat, Lactat, Pyruvat) wurden diese mit dem Harnstoff steril filtriert und zugegeben.

3. Methodik

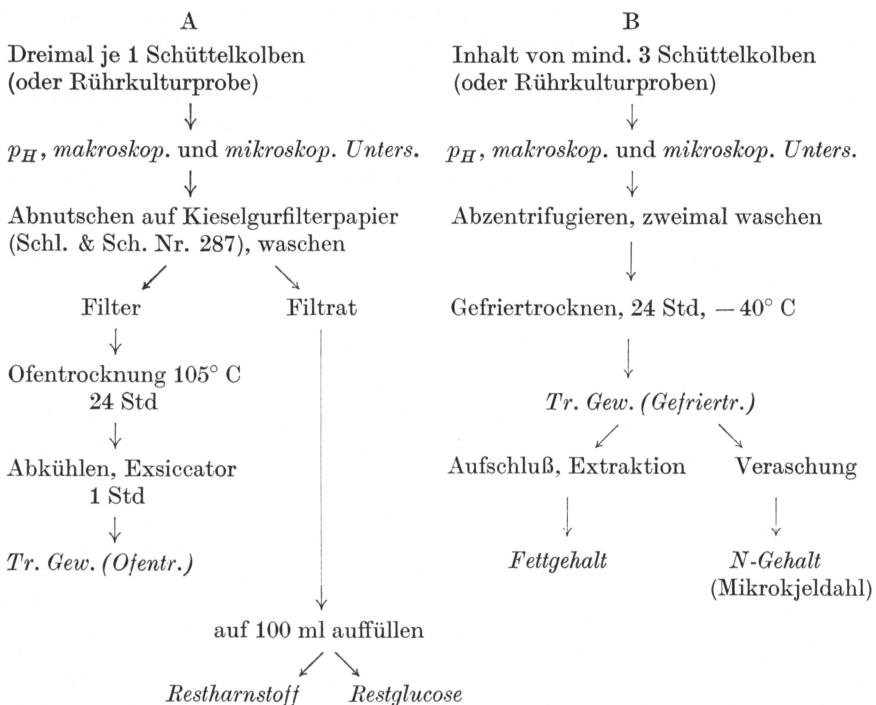
a) Zellanzucht und Ernte

Die Anzucht der Zellen erfolgte entweder in Schüttelkolben (300 ml Erlenmeyerkolben, 40 ml Inhalt, Watte oder Schaumstoffhauben, Schüttelmaschine mit 3 cm Weg und 150 Hin- und Hergängen/min) oder in Rührkultur bei jeweils 27°C im Dunkeln. Von den Kolben wurde täglich der sich bildende Rand abgeschüttelt. Die Rührkultur wurde in 2 l-Zweihals-Rundkolben durchgeführt. Diese enthielten je 1 l Nährösung, die magnetisch gerührt (etwa 650 U/min) und gleichzeitig mit steriler, befeuchteter Luft (etwa 60 l/Std/l Nährösung) durchströmt wurde (SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK 1961).

Beimpft wurde jeweils entweder direkt mit Agarmycelstückchen (5×5 mm) einer mindestens 3 Wochen alten Biomalzagarkultur oder im Verhältnis 1:10 mit

einer 3 Tage alten Vorkultur, die bei 27°C auf der Schüttelmaschine angezogen wurde.

Tabelle 1. *Aufarbeitungs-Schema der Flüssigkeitskulturen*



Die Ernte der Zellen erfolgte nach dem Schema in Tab. 1. Falls erforderlich, wurden die Zellen nach dem Abzentrifugieren bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Wenn nicht anders vermerkt, wurden für jeden Wert drei Kolben oder Proben aufgearbeitet und das Mittel der Parallelbestimmungen angegeben.

b) Bestimmungsmethoden

Das Trockengewicht der Zellen wurde wieder durch Ofentrocknung (105°C) bestimmt, oder das Material wurde in einer Gefriertrocknungsanlage der Fa. Schütt/ Göttingen bei -40°C und 10^{-2} Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in den Trocknungskolben gewogen.

Die pH-Messung wurde mit der Glaselektrode und dem pH-Meßgerät der Fa. Metrohm, Herisau/Schweiz vorgenommen.

Die Bestimmung der Glucose im Kulturmedium wurde mit dem Anthrone-Reagens nach HEWITT (1958) in einem Zeiss-Photometer (PMQ II) durchgeführt; die Methode wurde durch einige Parallelbestimmungen mit dem Fehlingschen Reagens nach LEHMANN, MAQUENNE u. SCHOORL (1932) geprüft.

Der Harnstoff im Kulturfiltrat wurde enzymatisch mit Urease (Merck 8489) nach BAUER u. MOLL (1960, modifiziert nach eigenen Erfahrungen) bestimmt.

Die Ermittlung des Mycelstickstoffgehaltes erfolgte im Mikrokjeldahl nach PELCZAR, HANSEN u. KONETZKA (1956).

c) Lipiduntersuchung

Für alle Extraktionen wurde gefriergetrocknetes Mycel verwendet.

Extraktion ohne vorhergehenden Aufschluß: Das Mycel wurde allein durch Schütteln mit verschiedenen Lösungsmitteln in Erlenmeyerkolben auf der Schüttelmaschine bei 27° C extrahiert. Anschließend wurde es auf Kieselgur-Filterpapier (Schl. & Sch., Nr. 287) abfiltriert, nachgewaschen und der Extrakt auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

Zur Extraktion im Soxhlet-Perforator wurden je 500 mg Trockensubstanz mit je 50 ml Äther bei 50° C 24 Std lang behandelt.

Aufschluß mit dem Mickle-Desintegrator: Je 250 mg Trockensubstanz wurden durch Schütteln mit je 1 cm³ Glaskugeln (1 mm Ø) und 5 ml Äther je Gefäß mechanisch aufgeschlossen. Schüttelzeit und Intensität wurden variiert. Das aufgeschlossene Mycel wurde mit 45 ml Äther in 300 ml Erlenmeyerkolben überführt und 24 Std wie oben auf der Schüttelmaschine extrahiert und weiterbehandelt.

Aufschluß im Potter-Elvehjem-Homogenisator (POTTER u. ELVEHJEM 1935): 250 mg Trockensubstanz wurden mit 10 ml Äther verschieden lange bei verschiedener Umdrehungszahl zerrieben, mit 40 ml Äther in 300 ml Erlenmeyerkolben überführt und wie oben weiterbehandelt.

Zur Bestimmung von Anwesenheit und Menge von Poly- β -Hydroxy-Buttersäure (PHBS) wurde die gewogene Mycelmenge mit Chloroform im Verhältnis 1:24 24 Std bei Zimmertemperatur extrahiert, abfiltriert und nachgewaschen. Im Filtrat kann vorhandene PHBS mit Äther ausgefällt, auf gewogener Fritte abgenutscht und nach dem Trocknen gravimetrisch bestimmt werden.

Zur gravimetrischen Bestimmung der Gesamtlipide wurde der von einer bestimmten Mycelmenge gewonnene Ätherextrakt in einem gewogenen Becherglas unter der IR-Lampe bis zur völligen Vertreibung des Lösungsmittels eingedampft, über CaCl₂ und Paraffin getrocknet und gewogen.

Die seriennäßige Lipidbestimmung wurde mit der Estergruppenbestimmung nach SNYDER u. STEPHENS (1959) vorgenommen. Prinzip: Das aus dem alkalischen Hydroxylamin und den hydrolysierten Fetten gebildete Fettsäurehydroxamat reagiert mit Fe⁺⁺⁺ im Sauren zu einem purpurnen Komplex, der gegen die reine Reagentienlösung bei 530 m μ im Zeiss-Photometer gemessen wird. Bei jeder Bestimmung liefen Triolein-Eichwerte mit. Die Reagentien wurden täglich frisch angesetzt.

d) Arbeiten mit zellfreien Extrakten

Zur Herstellung von Arylaminacetylase wurde das Aceton-trockenpulver aus frischen Taubenlebern in Anlehnung an KAPLAN u. LIPMANN (1948) hergestellt. Das teilweise gereinigte Enzym wurde im Prinzip nach CHOU u. LIPMANN (1952) und TABOR, MÉHLER u. STADTMAN (1953) nach Verwerfen der ersten Acetonfällung (44% Sättigung) als Acetonniederschlag bei 75% Sättigung hergestellt, in Phosphatpuffer (m/2000; pH 6,8; m/1000 ÄDTA¹; m/1000 Cystein) aufgenommen und bei -20° C in kleinen Portionen eingefroren.

Herstellung zellfreier Extrakte: Normale Schüttelkulturzellen von Humfeld-Medium wurden nach 27 stündiger Hauptkultur aus der aktivsten Wachstumsphase

¹ Die folgenden Abkürzungen werden benutzt: Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A; ADP = Adenosindiphosphat; ÄDTA = Äthylendiamintetraessigsäure; BTS = Brenztraubensäure; F-6-P = Fructose-6-Phosphat; F-1,6-DP = Fructose-1,6-Diphosphat; IDP = Inosindiphosphat; NADH₂ = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert); PEP = Phosphoenolbrenztraubensäure; Ri-5-P = Ribose-5-Phosphat; Ru-1,5-DP = Ribulose-1,5-Diphosphat; Tr.S. = Trockensubstanz; Tris-Puffer = Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-HCl-Puffer.

geerntet und mit der Cepa-Schnellzentrifuge (C. Padberg, Lahr/Baden) bei $14000 \cdot g$ abzentrifugiert, in Phosphatpuffer (m/20; pH 7,4; m/2000 ÄDTA; m/2000 Cystein; 0° C) aufgenommen, nochmals zentrifugiert und bei -20° C in kleinen Portionen eingefroren.

Für die Herstellung der Extrakte zur Bestimmung der BTS-Dehydrogenase, Phosphoketolase und Aldolase wurde das Zellmaterial nach HUGHES (1951) in der sogenannten „Hughes-Presse“ (Schandon Scientific Co./London) auf -30° C unterkühlt, die gefrorene Zellmasse dann hydraulisch durchgepreßt und dabei aufgeschlossen. Die Abtrennung der Zellreste erfolgte durch Zentrifugieren (30 min, $17000 \cdot g$, 0° C). Das Überstehende wurde soweit nötig, bis zur Weiterverarbeitung in kleinen Portionen bei -20° C eingefroren.

Da bei der Bestimmung der Ru-1,5-DP-Carboxylase, PEP-Carboxylase und Triosephosphat-Isomerase Phosphationen stören, wurde das Mycel hierfür vor dem Aufschluß mit reichlich Pufferlösung (pH 7,4; m/2000 ÄDTA; m/2000 Cystein) gewaschen, wie oben aufgeschlossen und anschließend in Tris-Puffer (m/20; pH 7,6) aufgenommen, abzentrifugiert und eingefroren.

Bestimmungsmethoden: Die Proteinbestimmung wurde nach der von BEISENHERZ et al. (1955) abgewandelten Biuretmethode vorgenommen. Zur Entfernung störender Salzkonzentrationen im Enzymextrakt wurden die Proteine nach BÜCHER (unveröffentlicht) umgefällt und der nach Reagenszugabe entstehende gefärbte Komplex bei 546 m μ im Eppendorf-Photometer gemessen.

Aldolase wurde mit der Boehringer Testkombination „Aldolase“ (Boehringer a) bestimmt. Meßgröße war dabei die Abnahme der NADH₂-Extinktion bei 366 m μ im Eppendorf-Photometer. Nach Auftragen der Extinktionswerte gegen die Zeit kann aus dem Bereich der linearen Extinktionsabnahme ΔE /Zeiteinheit bestimmt werden. Aus ΔE , dem molaren Extinktionskoeffizienten des Substrats und dem Proteingehalt des Enzymextraktes kann die spezifische Aktivität des Enzyms in μ M Substrat/mg Enzymprotein/min berechnet werden.

Triosephosphat-Isomerase wurde nach Biochemica-Boehringer (Boehringer b) bestimmt. Meßgröße war wiederum die Abnahme der NADH₂-Extinktion.

BTS-Dehydrogenase und Phosphoketolase wurden in einem kombinierten optischen Test (SCHINDLER, persönliche Mitteilung) bestimmt. Als Substrate der Phosphoketolase wurden F-6-P und Ri-5-P eingesetzt.

Zur Bestimmung von Ru-1,5-DP-Carboxylase wurde der Einbau von radioaktivem CO₂ und dessen Nachweis in den entstehenden Triosephosphaten nach PETERKOFSKY u. RACKER (1961) geprüft. Nach Abstoppen der Reaktion und Abzentrifugieren wurde 0,1 ml des Überstehenden auf ausgestanzte Aluminiumplättchen mit „Josephspapier“ aufgetragen und unter der IR-Lampe getrocknet (LAFFERTY 1963).

PEP-Carboxylase wurde nach SUZUKI u. WERKMAN (1958) untersucht. Dabei wird der Einbau von radioaktivem CO₂ in PEP im dadurch markierten Oxalacetat nachgewiesen.

Die Anwesenheit von Oxalessigsäure-Carboxylase wurde im gleichen Ansatz durch Zugabe von ADP (Boehringer) geprüft. Das Oxalacetat wurde mit dem 2,4-Dinitrophenylreagens nach SHRINER et al. (1956) ausgefällt und auf einem Membranfilter niedergeschlagen (SCHLEGELE u. LAFFERTY 1961) und getrocknet.

Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem Endfensterzählrohr (Massenbelag 1,15 mg/cm²) im Abstand von 5,0 mm gemessen. Die Meßeinrichtung (Friesseke & Hoepfner/Erlangen) bestand aus dem Probenwechsler FH 448, dem Zählgerät FH 49 und dem Zeitdrucker FH 449.

B. Versuche und Ergebnisse

1. Wachstumsphysiologische Versuche

Es sollte das Wachstum der drei Stämme mit verschiedenen Substraten und unter varierten Kulturbedingungen untersucht und schließlich durch Aufnahme einer Wachstumskurve der zeitliche Verlauf des Wachstumsvorganges verfolgt werden.

a) Einfluß des Nährmediums und des pH-Wertes

Wie bereits HUMFELD u. SUGIHARA (1949), SZUECS (1956) sowie REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1958) gefunden hatten, konnte eine ganze Reihe definierter und komplexer C-Quellen zum Wachstum verwertet werden, Ausnahmen bildeten lediglich Lactose, L-Rhamnose und

Tabelle 2. Vergleich der Trockensubstanzbildung in verschiedenen Nährmedien

Nährmedium	Ernte- tag	St. 2334		St. 2335		St. 2336	
		Tr. S. ¹ mg/ml	Ausb. ² %	Tr. S. ¹ mg/ml	Ausb. ² %	Tr. S. ¹ mg/ml	Ausb. ² %
5% Gluc. (Humfeld-Med., pH 4,5)	6.	15,4	30,8	16,6	33,2	14,6	29,2
1% Gluc. (MacLeod-Med.)	6.	3,0	30,0	3,0	30,0	3,2	32,0
5% = 0,28 m Gluc. (Humfeld-Med., pH 4,5)	7.	16,7					
4,1% = 0,28 m Acetat (Humfeld-Med., pH 4,5)	7.	0,3 ³					
2,3% = 0,28 m Crot. (Humfeld-Med., pH 4,5)	7.	0,3 ³					
5% Gluc. (Humfeld-Med., pH 4,5)	9.	18,5	37,0			15,7	31,4
5% Gluc. (Humfeld-Med., pH 6,0)	9.	14,9	29,8				
2% Gluc. + Min. Lösg. + Harnst.	9.	6,6	30,3	6,9	34,5	5,9	29,5
5% Biomalz + Min. Lösg.	9.	6,5	13,0	5,8	11,6	5,2	10,4
5% Biomalzlösung	9.	5,1	10,2	7,1	14,2	4,5	9,0

¹ Tr. S. = Trockensubstanz, Ofentrocknung, 24 Std 105° C.

² Ausb. = % Ausbeute: $\frac{\text{g gebildete Trockensubstanz}}{\text{g eingesetzte C-Quelle}} \cdot 100$

³ Praktisch kein Wachstum.

Die Beimpfung erfolgte in allen Fällen durch Agarmycelstückchen.

Na-Carboxymethylcellulose. Um Vergleichswerte über das Wachstum der drei Stämme zu erhalten und um einige weitere Substrate zu testen, wurden wie üblich Schüttelkulturen angesetzt und mit Agarmycelstückchen beimpft. Die Zusammensetzung der Nährösungen, der Erntezeitpunkt sowie die erzielten Trockensubstanzmengen gehen aus Tab. 2 hervor.

Demnach konnte von den untersuchten Substraten das Medium nach HUMFELD am besten verwertet werden. Ein Anfangs- pH von 4,5 erwies sich dabei als günstiger. Acetat und Crotonat waren als alleinige C-Quellen ungeeignet. Der Stamm *NRRL 2335* lag in der Trockensubstanzbildung meist an der Spitze.

b) Wachstumskurven

Einfluß verschiedener Substrate, Impf- und Kulturverfahren

Da in den vorangegangenen Versuchen der Zeitfaktor nicht berücksichtigt worden war, wurden mit den bereits vorher untersuchten Nährmedien Wachstumskurven mit Stamm *NRRL 2334* aufgenommen und dabei pH und Trockengewicht bestimmt. Beimpft wurden die Kolben mit Agarmycelstückchen. Mit dem Medium, das sich bei diesen Versuchen als das günstigste herausstellte, sollte dann in weiteren Versuchen der Einfluß von Impf- und Kulturverfahren auf das Wachstum festgestellt werden.

Die Abhängigkeit des Wachstums und pH -Wertes von der Kulturdauer bei verschiedenen Nährmedien ist in Abb. 1 dargestellt. Bei allen Nährmedien wurde das Maximum der Trockensubstanzbildung zwischen dem 5. und 6. Kulturtag erreicht, bei Medium C (2% Glucose) am ersten, bei Medium A (Humfeld-Medium, 5% Glucose, $\text{pH} = 4,5$) am letzten. Ansatz C erbrachte im Verhältnis zur eingesetzten Kohlenhydratmenge etwas höhere Erträge, doch waren im Hinblick auf die weiteren Versuche die Nährmedien günstiger, die bei höherer Substratkonzentration auch erhöhte Mycelmengen bringen. Die beiden Wachstumskurven mit dem Medium nach HUMFELD zeigten wieder eine leichte Überlegenheit eines niedrigen Anfangs- pH und bestätigten so die Ergebnisse des vorhergehenden Versuches.

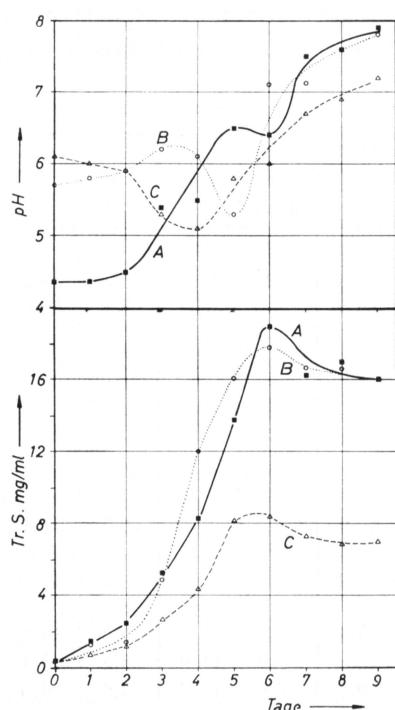


Abb. 1. Wachstumskurven. Abhängigkeit der Trockensubstanzbildung und des pH -Wertes von der Kulturdauer bei verschiedenen Nährmedien. A ■—■ 5% Glucose, 0,3% Harnstoff (Humfeld-Medium, $\text{pH} = 4,5$); B ○····○ 5% Glucose, 0,3% Harnstoff (Humfeld-Medium, $\text{pH} = 6,0$); C △—△ 2% Glucose, 0,1% Harnstoff und Mineralmedium. Schüttelkultur, Beimpfung mit Agarmycelstückchen Stamm *NRRL 2334*

Der vor allem bei Ansatz A (mit niedrigem Anfangs- pH), in geringerem Maße aber auch bei B zu beobachtende anfängliche Anstieg des pH -Wertes bis zu einem Maximum, ist durch die Spaltung des Harnstoffes zu erklären. Bei Medium C, dessen Harnstoffgehalt um zwei

Drittel unter dem der anderen Medien lag, kam es zu keinem anfänglichen pH-Anstieg. Bei allen Ansätzen fällt der pH-Wert unmittelbar vor oder bei Erreichen des Maximums der Trockensubstanzbildung auf ein Minimum ab, hervorgerufen durch die völlige Aufnahme der Ammonium-Ionen in die Zellen. Der anschließende Anstieg des pH-Wertes zeigt dann die beginnende Autolyse des Zellmaterials an, wobei N-haltige Substanzen ins Medium abgegeben werden.

Um Daten über die Ökonomie der Umwandlung des Kohlenhydrats in Zellmaterial zu erhalten, wurde bei den folgenden Versuchen neben Trockensubstanz und pH auch die Restglucose im Medium bestimmt.

Obwohl im vorhergehenden Versuch für jeden Punkt der Wachstumskurve 3—5 Kolben geerntet und getrennt aufgearbeitet wurden, streuten die Werte zu stark. Das konnte sicher großenteils auf die Impfmethode zurückgeführt werden. Ziel des folgenden Versuches war es daher, die Beimpfung durch Agarmycelstückchen und mit flüssiger Vorkultur bezüglich ihrer Einwirkung auf die Streuung unter den Parallelen, die zeitliche Verschiebung der Wachstumskurve und die Höhe des Ertrages zu untersuchen. Weiterhin sollten Rühr- und Schüttelkultur hinsichtlich ihres Einflusses auf das Wachstum und ihre methodischen Vor- und Nachteile verglichen werden.

Als Substrat wurde das Humfeld-Medium mit einem Anfangs-pH von 4,5 verwendet, das sich in den vorhergehenden Versuchen als günstigstes erwiesen hatte. Als Impfmateriel für die Ansätze mit flüssiger Vorkultur wurde eine 3 Tage alte Vorkultur verwendet, deren Mycel sich, wie der letzte Versuch gezeigt hatte, in der aktivsten Wachstumsphase befindet. Die Proben wurden täglich zur gleichen Zeit entnommen. Für jeden Punkt der Wachstumskurve wurden mindestens drei Bestimmungen durchgeführt.

In Abb. 2 sind die Versuchsergebnisse in Kurvenform wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß die mit Agarmycel beimpften Ansätze das Maximum ihrer Trockensubstanzbildung am 6. (Schüttelkultur), bzw. am 7. Tag (Rührkultur) erreichten, also jeweils etwa 4 Tage später als bei Beimpfung mit einer flüssigen Vorkultur. Die Impfmethode beeinflußte die Höhe der Trockensubstanzbildung kaum, wohl aber die Kulturmethode, indem die Maximalwerte des Wachstums bei der Schüttelkultur jeweils höher lagen. Bei den mit einer Zellsuspension beimpften Kulturen setzte die Autolyse der Zellen langsamer ein, und die Trockensubstanz nahm weniger stark ab als bei der anderen Impfmethode.

In allen Fällen war die Glucose zum Zeitpunkt des Maximums der Trockensubstanzbildung völlig verbraucht.

Der Vergleich der Kultur- und Impfmethoden zeigte, daß bei der Schüttelkultur und bei Beimpfung mit flüssiger Vorkultur das Maximum des Ökonomischen Koeffizienten (Ö.K.)¹ jeweils eher erreicht wurde.

Wie schon im vorhergehenden Versuch beobachtet, stieg der pH-Wert zunächst bis zu einem Maximum an, das 1—2 Tage vor dem Höhepunkt der Trockensubstanzbildung erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren

¹ Ö.K. = $\frac{\text{g gebildete Tr. S.} \times 100}{\text{g verbrauchte C-Quelle}}$ (PFEFFER 1895).

die pH-Werte inzwischen wieder auf ein Minimum abgesunken, um mit einsetzender Autolyse wieder zuzunehmen. Sie stiegen zunächst steil, dann flacher an, bis sie einen Sättigungswert erreichten, der bei den Schüttelkulturen jeweils höher lag.

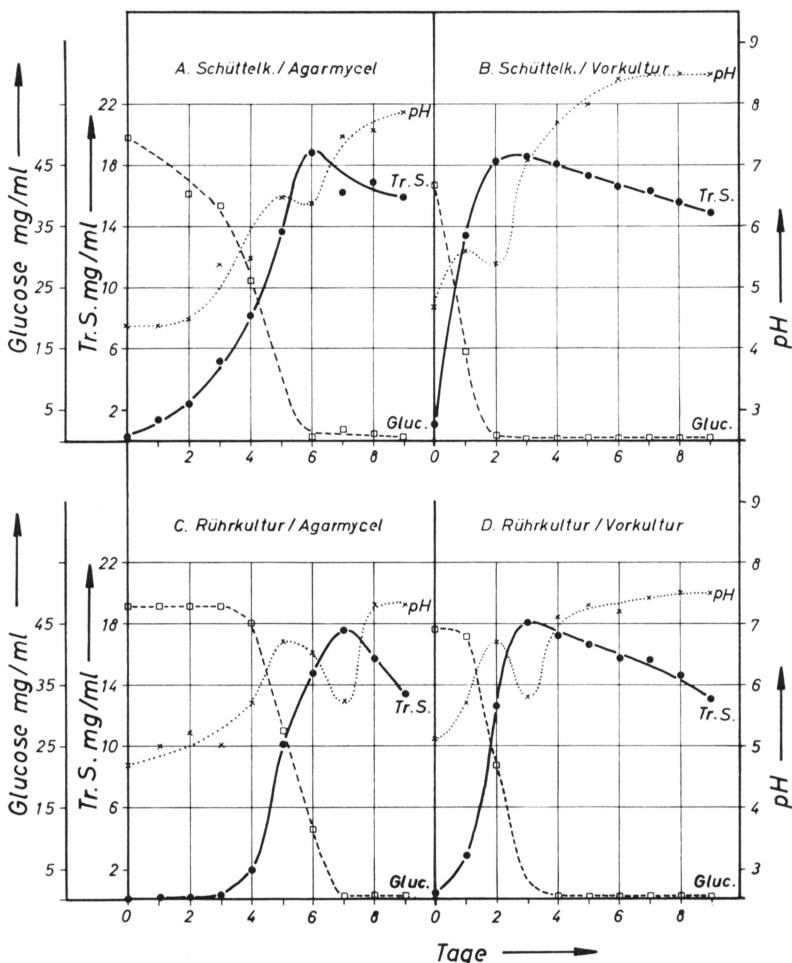


Abb. 2. Wachstumskurven. Abhängigkeit des Wachstums von verschiedenen Beimpfungs- und Kulturverfahren. pH ($\times \cdots \times$) pH-Wert; Tr. S. (●—●) Trockensubstanz (Ofentrocknung); Gluc. (□—□) Restglucose im Medium. A Schüttelkultur, beimpft mit Agarmycel; B Schüttelkultur, beimpft mit 10% einer 3 Tage alten Vorkultur; C Rührkultur, beimpft mit Agarmycel; D Rührkultur, beimpft mit 10% einer 3 Tage alten Vorkultur, Humfeld-Medium, pH 4,5. Stamm NRRL 2334

In den Versuchen zeigte sich die Beimpfung der Kulturen mit flüssiger Vorkultur dem anderen Verfahren durch größere Homogenität des Zellmaterials, bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und schnelleres Wachstum eindeutig überlegen und wurde im folgenden stets angewendet.

Da bei Rührkulturen im Verlaufe des Wachstums starke Klumpenbildung am Rande des Kulturgefäßes und an den Belüftungsstutzen auftrat und sich die Wachstumsbedingungen im Rührkolben durch die tägliche Probenentnahme und die Austrocknung ständig unkontrollierbar veränderten, wurde dem Schüttelverfahren der Vorzug gegeben. Hier liegt zudem das Maximum der Trockensubstanzbildung höher, es wird eher erreicht, die Infektionsgefahr ist geringer, und es bietet sich der Vorteil vieler voneinander unabhängiger Parallelen.

2. Stoffwechselphysiologische Versuche

a) Vorversuche

Lipidnachweis. Es war bereits bei den mikroskopischen Untersuchungen, vor allem während der Aufstellung der Wachstumskurven aufgefallen, daß im Verlaufe der Kultur in zunehmender Zahl kleine, stark

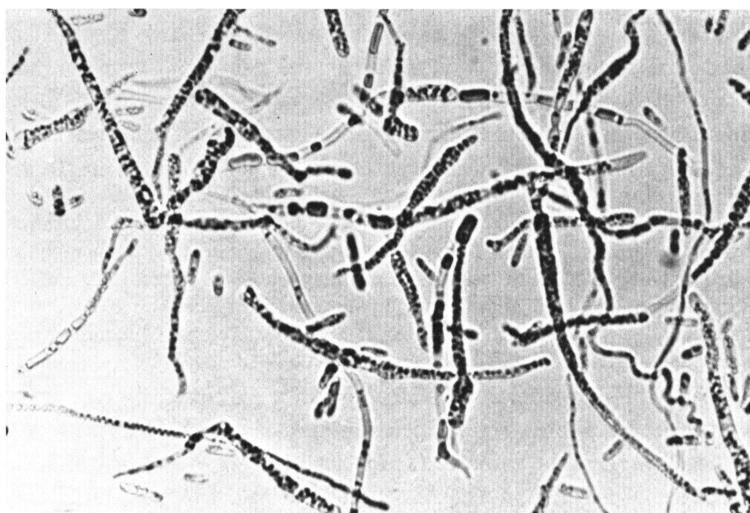


Abb. 3. Fettgranula und Kugeln im Mycel, Submerskultur, Humfeld-Medium, ungefärbt, Stamm NRRRL 2335 ($\times 640$)

lichtbrechende Granula in den Zellen gebildet wurden, die mit zunehmender Kulturdauer immer größer wurden und schließlich zu einer oder mehreren großen Kugeln je Zelle zusammenflossen (Abb. 3). Beim Übergang der Zellen in das Autolysestadium traten dann sich vergrößernde Vacuolen auf, wobei die erwähnten lichtbrechenden Kugeln wieder kleiner wurden. Diese Granula ließen sich mit Sudanrot und Sudanschwarz nach den üblichen Verfahren gut anfärben, bestanden demnach also aus einer lipidartigen Substanz.

Es wurde zunächst auf Anwesenheit von Poly- β -Hydroxy-Buttersäure untersucht. Da in dem Chloroformextrakt der gefriergetrockneten

Zellen bei Ätherzusatz kein Niederschlag auftrat, konnte die Anwesenheit von Poly- β -Hydroxy-Buttersäure ausgeschlossen werden.

Es ließen sich dagegen in dem Chloroformextrakt nach SNYDER u. STEPHENS (1959) größere Lipidmengen nachweisen. Da diese Methode sich als rasch, zuverlässig und auch für größere Zahlen von Bestimmungen als geeignet erwies, wurde sie für die weiteren Untersuchungen zur quantitativen Lipidbestimmung verwendet.

Um die Mengenangaben in Äquivalent Ester, die man nach dieser Methode erhält, in Gewichtsprozente der Trockensubstanz umrechnen zu können, wurde eine größere Mycelmenge extrahiert und aliquote Teile des so gewonnenen Rohlipids einmal nach SNYDER u. STEPHENS (als μ -Äquivalente Ester/mg Tr.S.) und zum anderen gravimetrisch (als Gewichts-Prozent der Tr.S.) bestimmt. Es ergab sich daraus, daß unter den gegebenen Bedingungen ein Mikroäquivalent Ester des untersuchten Rohlipides 387 γ an Gewicht entsprach.

Lipidextraktion. Da sich Schwierigkeiten bei der Extraktion der Lipide aus dem gefriergetrockneten Mycel ergaben, wurden zunächst einige Vorversuche zur Methodik der Extraktion des Lipids angestellt, um ein für die gegebenen Bedingungen geeignetes Verfahren zu finden.

Die für diese Untersuchungen benötigte Mycelmenge wurde im Rührkulturrefahren (Humfeld-Medium, Agarmycelstücke, Ernte 7. Tag) angezogen, wie üblich geerntet und gefriergetrocknet. Die Lipidgebung selbst erfolgte nach verschiedenen Methoden: Zunächst wurden die Zellen ohne vorherigen mechanischen Aufschluß 24 Std durch Schütteln in Erlenmeyerkolben extrahiert. Dabei wurde der Einfluß verschiedener organischer Lösungsmittel (Diäthyläther, Petrolbenzin = Petroläther, Siedebereich: 60–70° C; Trichloräthylen, Chloroform) auf die Menge des extrahierten Lipids untersucht.

Obwohl Chloroform die größte Lipidmenge extrahierte, wurde für die weiteren Versuche schließlich doch Äther als Extraktionsmittel genommen, da er das reinste Lipid lieferte, während mit Chloroform auch größere Mengen höherer Alkohole und Wachse aus den Zellen herausgelöst werden (PRUESS 1934). Die Ergebnisse sind in Abb. 4 unter A₁ gezeigt.

Weiterhin wurde der Einfluß der Extraktionszeit, bzw. einer mehrmaligen Extraktion auf die Menge des extrahierten Rohlipids untersucht (Abb. 4, A₂, A₃).

In einem anderen Ansatz wurden die in einer Gesamtextraktionszeit von 24 Std nach verschiedenen Verfahren gewonnenen Lipidmengen verglichen (Abb. 4, A₄).

Da die verhältnismäßig derbe Pilzzellwand für die Extraktion ebenfalls ein Hindernis bildet, wurde weiterhin untersucht, inwieweit die Lipidausbeute durch mechanischen Aufschluß des Mycels vor der Extraktion gesteigert werden kann. Einmal wurde dazu der „Mickle-Desintegrator“ benutzt, wobei Schüttelzeit und Frequenz variiert

wurden (Abb. 4, B₁), zum anderen wurde das Mycel mit dem Potter-Elvehjem-Gerät aufgeschlossen. Hierbei wurden Aufschlußzeit und Umdrehungszahl des Kolbens verändert (Abb. 4, B₂).

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß vorheriger Aufschluß des Mycels die Lipidausbeute beträchtlich erhöht und daß bei den beiden untersuchten Methoden die extrahierte Lipidmenge sowohl von der

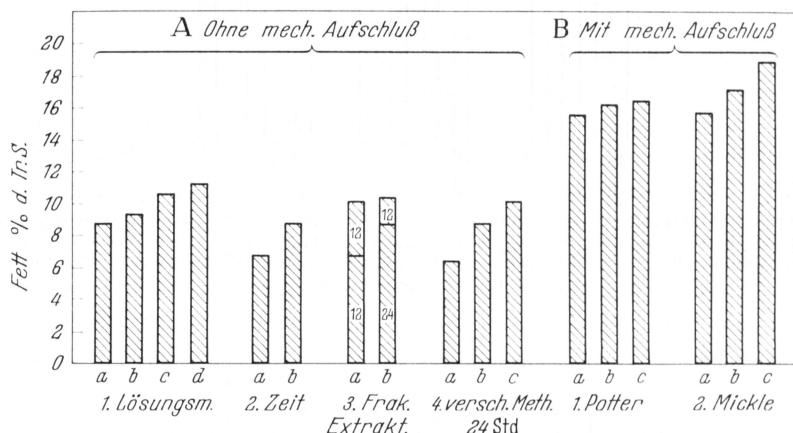


Abb. 4. Abhängigkeit der gewonnenen Lipidmenge von der Methodik. Lipidbestimmung nach SNYDER u. STEPHENS (1953). Material: Gefriergetrocknetes Mycel (Rührkultur, Humfeld-Medium, Ernte am 7. Tag), Stamm *NRRL 2334*. A Ohne vorherigen mechanischen Mycelaufschluß, 1. verschiedene Lösungsmittel: Äther (a), Petroläther (b), Trichloräthylen (c), Chloroform (d); 2. verschiedene Extraktionszeiten (Schütteln mit Äther) a 12 Std, b 24 Std; 3. fraktionierte Extraktion (Schütteln mit Äther) a 12 + 12 Std, b 24 + 12 Std; 4. verschiedene (Äther-)Extraktionsverfahren, Dauer 24 Std Soxhlet (a), 24 Std Schütteln mit Äther (b), 12 + 12 Std Schütteln mit Äther (c). B Nach vorherigem mechanischen Mycelaufschluß (Ätherextraktion, Schüttelmaschine). 1. Potter-Elvehjem-Gerät. a Aufschluß 5 min bei 600 Umdrehungen; b Aufschluß 5 min bei 1100 Umdrehungen; c Aufschluß 10 min bei 1100 Umdrehungen, 2. Mickle-Gerät. a Aufschluß 10 min, maximale Intensität (nicht geschüttelt); b Aufschluß 5 min, halbe Intensität (geschüttelt); c Aufschluß 10 min, maximale Intensität (geschüttelt)

Schüttelfrequenz bzw. der Umdrehungszahl als auch von der Aufschlußzeit abhängig ist. Obwohl ein Mycelaufschluß mit dem Mickle-Gerät eine etwas höhere Ausbeute ergab, wurde für die folgenden quantitativen Serienbestimmungen doch mit dem Potter-Gerät gearbeitet, da hier die Streuung geringer und die Ergebnisse besser reproduzierbar waren.

b) Stammteste

Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Lipidbildung

Zunächst sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße Zusätze von 0,5% Acetat, Pyruvat und Lactat zu dem normalen, 5% Glucose enthaltenden Humfeld-Medium zur Zellsubstanz- und Fettsynthese verwertet werden können. Gleichzeitig sollte unter den drei Stämmen derjenige ermittelt werden, der die günstigsten Werte für die Fettsynthese aufweist.

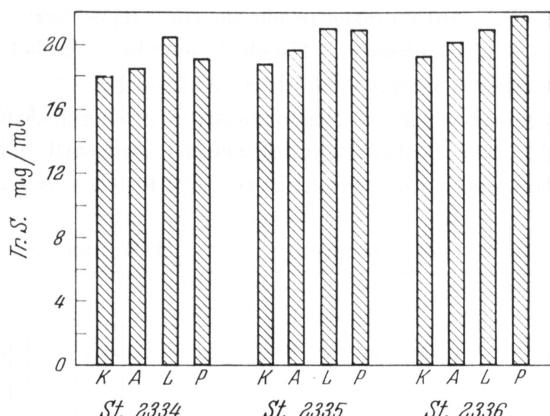


Abb. 5. Abhängigkeit der Mycelproduktion der Stämme *NRRL* 2334, 2335, 2336 von verschiedenen Zusätzen zum Medium. *K* Kontrolle, 5% Glucose (im Humfeld-Medium); *A* 5% Glucose + 0,5% Acetat (im Humfeld-Medium); *L* 5% Glucose + 0,5% Lactat (im Humfeld-Medium); *P* 5% Glucose + 0,5% Pyruvat (im Humfeld-Medium)

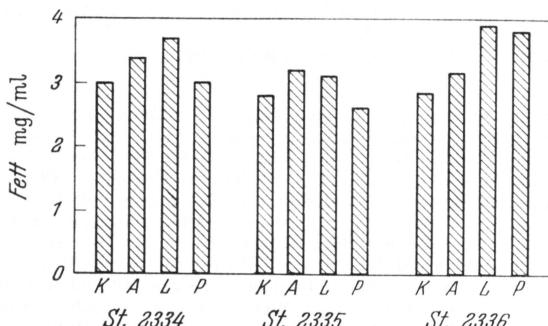


Abb. 6. Abhängigkeit der absoluten Fettproduktion von verschiedenen Zusätzen zum Medium. Erklärung siehe Abb. 5

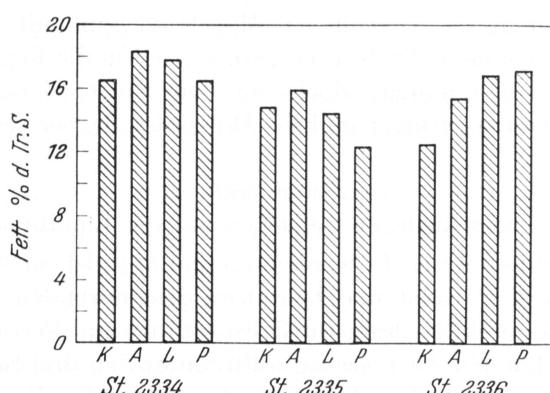


Abb. 7. Abhängigkeit des Fettgehaltes des Mycels von verschiedenen Zusätzen zum Medium. Erklärung siehe Abb. 5

Die Zusätze wurden mit dem Harnstoff steril filtriert und zugegeben. Die Zellen wurden in Schüttelkultur angezogen (3 Tage alte Vorkultur, 10% Inoculum) und am 4. Tage der Hauptkultur geerntet.

Die Ergebnisse sind aus den Abb. 5, 6 und 7 ersichtlich. In allen Fällen trat eine Erhöhung der Trockensubstanzmenge gegenüber der Kontrolle ein (Abb. 5). Dabei konnte Lactat am besten, Acetat am schlechtesten in Zellsubstanz umgesetzt werden. Zwischen den drei Stämmen selbst bestanden nur geringe Unterschiede. Es zeigte sich bei diesem Versuch also, daß Acetat, wenn es zusammen mit Glucose gegeben wurde, in geringem Umfange verwertet werden konnte, während es sich als alleinige C-Quelle als ungeeignet erwiesen hatte (vgl. Tab. 2). Die Zusätze bewirkten gegenüber den Kontrollen nicht nur eine Erhöhung der absolut gebildeten Lipidmenge (Abb. 7, bis auf Stamm *NRRL 2335* mit Pyruvat), sondern auch eine Steigerung des Lipidgehaltes der Trocken- substanz (Abb. 7, bis auf Stamm *NRRL 2335* bei Pyruvat und Lactat). Da für die folgenden Untersuchungen besonders ein hoher Fettgehalt des Mycels interessant war und Stamm *NRRL 2334* damit den anderen Stämmen überlegen war, wurde er für die weiteren Versuche eingesetzt.

c) Abhängigkeit der Lipidbildung von der Kohlenhydrat- und Stickstoffkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener C- und N-Gehalte sowie verschiedener C/N-Verhältnisse des Mediums auf die Fettbildung wurde der C-Gehalt des Nährmediums von 1—30% Glucose gesteigert, einmal bei einem gleichbleibenden N-Gehalt von 1,0 mg N/ml (Reihe A = steigendes C/N-Verhältnis) und einmal bei parallel gesteigertem N-Gehalt von 0,2—6,0 mg N/ml (Reihe B = gleichbleibendes C/N-Verhältnis).

Der Versuch wurde in Schüttelkultur (3 Tage Vorkultur, 10% Inoculum, Humfeld-Grundmedium) durchgeführt und am 4. Tage geerntet. Für jede Substratkombination wurden fünf Kolben geerntet, in denen einzeln pH-Wert, Trocken- gewicht (Ofen- und Gefriertrocknung) Restglucose und Reststickstoff im Medium, Stickstoffeinbau in die Zellen (Mikrokjeldahl) und der Fettgehalt bestimmt wurden.

Die Abb. 8—10 zeigen die Ergebnisse. Mit zunehmendem Kohlenhydratgehalt des Mediums stiegen also die Trockensubstanz- und Fettbildung (mg/ml und Prozent der Tr.S.) an (Abb. 8). In den Parallelen mit dem jeweils höheren N-Gehalt wurde mehr Trockensubstanz, jedoch weniger Fett je ml Nährlösung gebildet, auch der Fettgehalt des Mycels lag hier jeweils niedriger (Abb. 9). Die Tatsache, daß Lipid- und Zell- materialsynthese um die C-Quelle konkurrieren, geht auch aus dem Vergleich der Ökonomischen Koeffizienten und Fettkoeffizienten (F.K.)¹ hervor (Abb. 10). Ein höherer Ökonomischer Koeffizient ist jeweils mit

¹ F.K. = $\frac{\text{g gebildetes Fett} \cdot 100}{\text{g verbrauchte C-Quelle}}$ (RIPPEL 1940).

einem niedrigeren Fettkoeffizienten gekoppelt (über die Ausnahmen bei 20 und 30% Glucose im Medium siehe unten). Der synthetische Wirkungsgrad nimmt allgemein mit steigendem Kohlenhydratgehalt des Mediums ab. Es zeigte sich weiter, daß der N-Gehalt des Pilzmycels variabel und stark vom N-Gehalt des Mediums abhängig ist.

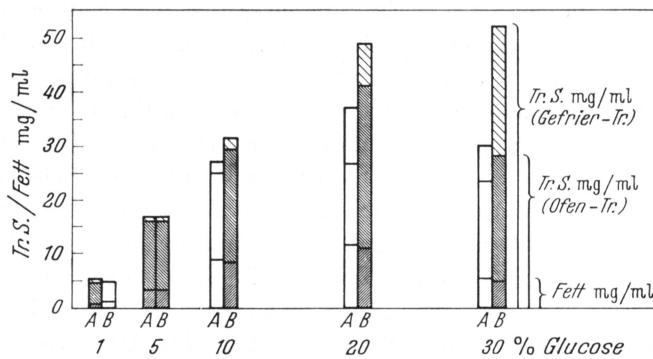


Abb. 8. Abhängigkeit der Fett- und Trockensubstanzbildung von der Kohlenhydrat- und Stickstoffkonzentration. Schüttelkultur, Grundmedium nach HUMFELD, beimpft mit 10% einer 3 Tage alten Vorkultur, Ernte am 4. Tag, Stamm NRRL 2334. A steigendes C/N-Verhältnis (4,2/1; 21/1; 84/1; 126/1); B konstantes C/N-Verhältnis (21/1). □ Parallelen mit dem jeweils niedrigeren N-Gehalt;

▨ Parallelen mit dem jeweils höheren N-Gehalt

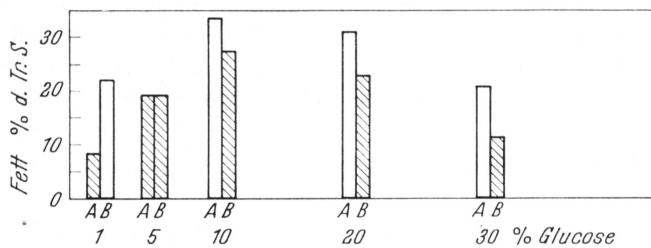


Abb. 9. Abhängigkeit des Fettgehaltes von der Zusammensetzung des Mediums. Erklärung siehe Abb. 8

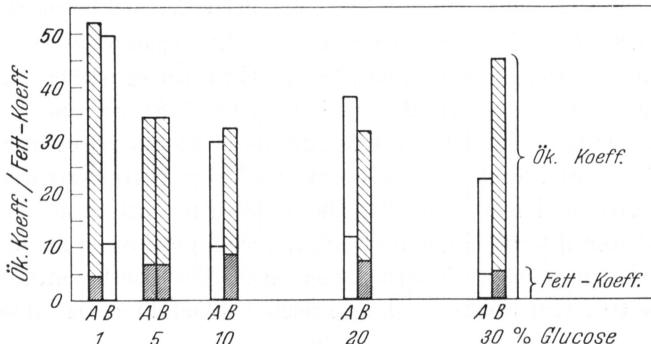


Abb. 10. Abhängigkeit des Fett- und Ökonomischen Koeffizienten von der Zusammensetzung des Mediums. Erklärung siehe Abb. 8

Ein Vergleich der Trockengewichtsbestimmungen mit Ofen- und Gefriertrocknung (Abb.8) zeigt, daß die durch Ofentrocknung gewonnenen Werte jeweils niedriger liegen, daß bei diesem Verfahren also offenbar flüchtige Substanzen entweichen. Der Gehalt des Mycels an diesen Substanzen nimmt mit größerem Kohlenhydratgehalt des Mediums zu, entsprechend größeren Differenzen zwischen beiden Bestimmungsarten.

Wie aus den Werten der Mycel- und Fettproduktion für die Medien mit 20%, besonders aber 30% Glucosegehalt ersichtlich ist, hat hier die Wachstumskurve am Erntetag offenbar ihr Maximum noch nicht erreicht. Das geht auch daraus hervor, daß Glucose und teilweise auch der Stickstoff des Mediums noch nicht völlig verbraucht waren. Da hier die Kulturdauer als begrenzender Faktor auftrat, sind die Werte der Medien mit 20 und 30% Glucose kaum mit denen vergleichbar, die von Substraten mit geringerer Kohlenhydratkonzentration gewonnen wurden.

d) Abhängigkeit der Lipidbildung vom C/N-Verhältnis und der Zeit

Um die Zeit als begrenzenden Faktor für Mycel- und Fettsynthese auszuschalten, wurden Wachstumskurven über einen längeren Zeitraum hinweg bei täglicher Ernte aufgenommen. Dabei wurde der Einfluß des im Nährmedium verfügbaren Stickstoffs auf die Fettbildung untersucht.

Die Kohlenhydratkonzentration wurde mit 5% Glucose so gewählt, daß eine hohe Populationsdichte (ungenügende O_2 -Versorgung) ebenfalls nicht begrenzend wirken konnte. Die N-Konzentration des Mediums wurde so eingestellt, daß einmal die Glucose (bei 5,0 mg N/ml) und einmal der Stickstoff (bei 0,2 mg N/ml) zuerst als begrenzende Faktoren auftreten mußten, während bei 1,4 mg N/ml zu erwarten war, daß Stickstoff und C-Quelle etwa gleich schnell verbraucht würden.

Die drei Versuchsreihen I, II, III (mit 0,2, 1,4 und 5,0 mg N/ml) und je 5% Glucose im Humfeld-Medium wurden in Schüttelkultur durchgeführt (3 Tage alte Vorkultur, 10% Inoculum). Täglich wurden je Versuchsreihe neun Kolben entnommen und für die verschiedenen Bestimmungen aufgearbeitet.

In Kultur I (0,2 mg N/ml, Abb.11) kommt nach Verbrauch des im Medium enthaltenen Stickstoffs das Wachstum am zweiten Kulturtag praktisch zum Stillstand, während die Fettsynthese bis zu ihrem Maximum am 8. Kulturtag weiterläuft. Die nach dem 2. Kulturtag noch erfolgende geringe Zunahme des Wachstums (als Trockensubstanz) ist nur scheinbar. Sie beruht darauf, daß eine stärkere absolute Zunahme an Fett die bereits einsetzende schwache Autolyse überdeckt. Ein Ansteigen des N-Gehaltes des Mediums weist ebenfalls auf die einsetzende Autolyse hin. Es zeigte sich hier also, daß bei N-Mangel aus noch verfügbarem Kohlenhydrat weiter Fett synthetisiert werden kann. Der Fettgehalt der Zellen stieg dabei noch von 12,6% am 2. Kulturtag auf 34,1% am 8. Kulturtag an.

Bei Kultur II (1,4 mg N/ml, Abb. 12) wird bei gleichzeitigem völligem Verbrauch der Stickstoff- und Kohlenhydratquelle am 2. Kulturtag auch das Maximum der Trockensubstanz- und Fettbildung erreicht. Der Fettgehalt der Zellen steigt bis zum 3. Kulturtag noch geringfügig von 13,9 auf 14,1% an. Vom 2. Tag an, wo Stickstoff und Kohlenhydrat bereits als wachstumsbegrenzende Faktoren auftraten, erfolgte mit einsetzender

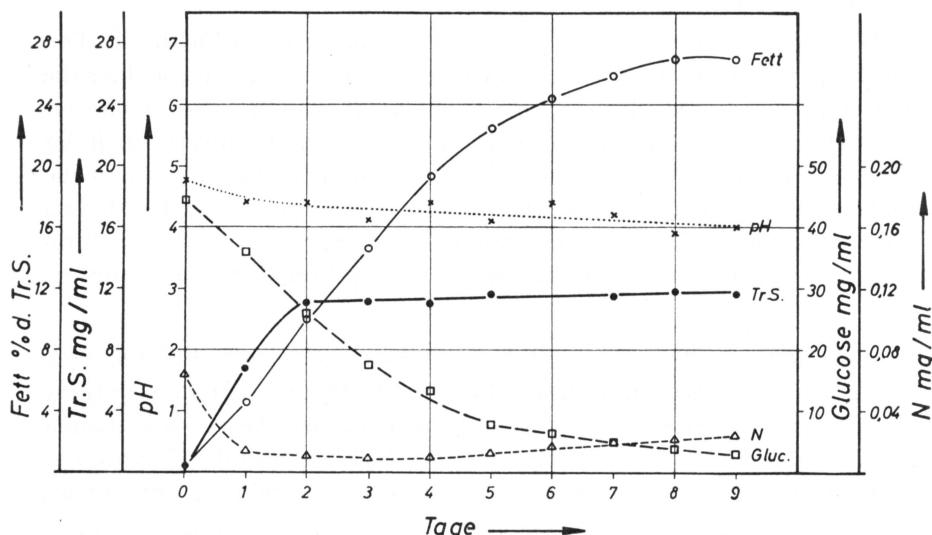


Abb. 11. Wachstumskurve. Zeitlicher Verlauf der Trockensubstanz- (Tr. S. ●—●) und Fettbildung (○—○), des pH-Wertes (×····×) sowie der Abnahme der Glucose (Gluc. □····□) und des Stickstoffs (N △····△) im Medium. Schüttelkultur, Beimpfung mit 10% Vorkultur (3 Tage alt) Medium I. Humfeld-Medium mit 5% Glucose und 0,2 mg N/ml. Stamm NRRL 2334

Autolyse eine etwa parallel verlaufende Abnahme von Zellsubstanz und Fett. Ein Ansteigen des N-Gehaltes des Mediums deutete wieder auf die autolytischen Vorgänge in den Zellen hin.

In Versuchsreihe III (5,0 mg N/ml, Abb. 13) ist ebenfalls am 2. Kulturtag das verfügbare Kohlenhydrat bereits verbraucht, und Mycel und Fettproduktion haben ihr Maximum erreicht. Da aber noch genügend Stickstoff im Medium verfügbar ist, tritt nur der Kohlenhydratmangel als begrenzender Faktor auf. Es kommt zur Autolyse, wobei die Zellsubstanz wesentlich schneller abnimmt als das Fett (absolut und prozentual).

Während sich der pH-Wert bei Ansatz I wegen der geringen NH_4^+ -Mengen, die aus dem wenigen Harnstoff freigesetzt werden können, im Verlauf der Kultur nur wenig ändert, steigt er in Kultur II und III anfangs steil an. Am 1. Kulturtag erreicht er ein Maximum, sinkt am 2. Kulturtag, dem Maximum der Trockensubstanz und Fettproduktion, auf ein Minimum ab (Aufnahme des im Medium gelösten NH_4^+ in die

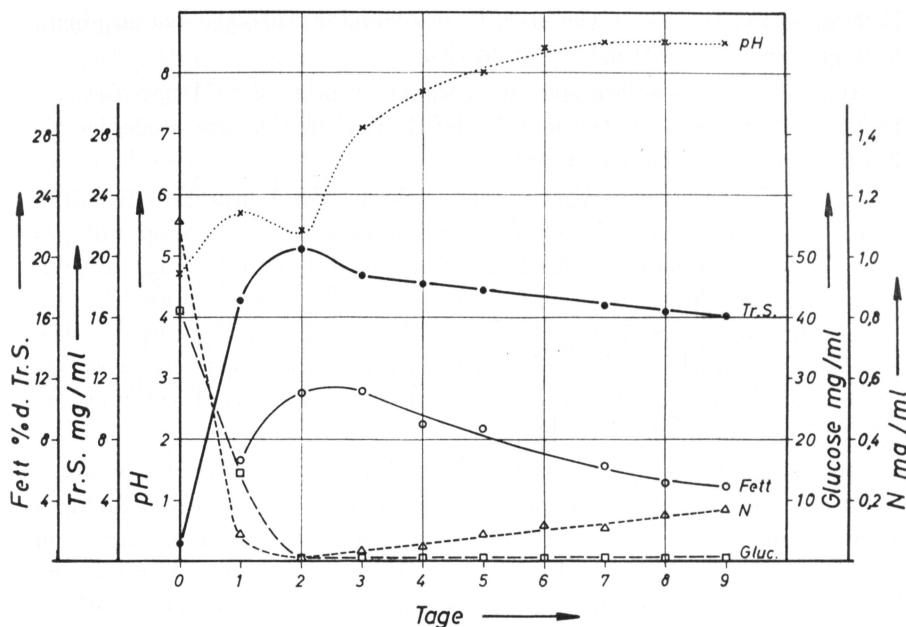


Abb.12. Wachstumskurve. Zeitlicher Verlauf der Trockensubstanz- (Tr. S. ●—●) und Fettbildung (○—○), des pH-Wertes (×····×), sowie der Abnahme der Glucose (Gluc. □····□) und des Stickstoffs (N △····△) im Medium. Medium II. Humfeld-Medium mit 5% Glucose und 1,4 mg N/ml. Sonstige Bedingungen wie Abb.11

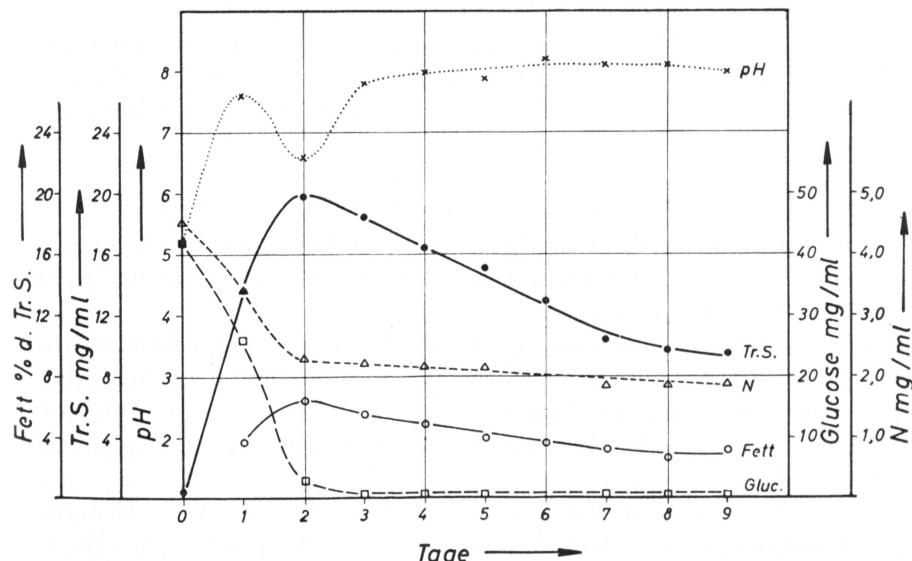


Abb.13. Wachstumskurve. Zeitlicher Verlauf der Trockensubstanz- (Tr. S. ●—●) und Fettbildung (○—○), des pH-Wertes (×····×), sowie der Abnahme der Glucose (Gluc. □····□) und des Stickstoffs (N △····△) im Medium. Medium III. Humfeld-Medium mit 5% Glucose und 5 mg N/ml. Sonstige Bedingungen wie Abb.11

Zellen) und steigt dann wieder mit einsetzender Autolyse bis zu einem Sättigungswert an (Abb. 11, 12 und 13).

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, nimmt die Menge des gebildeten Fettes mit steigendem N-Gehalt der Medien ab, wogegen die Zellsubstanzproduktion zunimmt.

Diese Verhältnisse spiegeln sich auch in den Umsatzkoeffizienten wieder. Das Maximum des Ökonomischen Koeffizienten steigt mit zunehmendem N-Gehalt des Mediums und ist mit 57,6 (1. Tag) im Medium III am höchsten und mit 48,2 (1. Tag) in Medium I am niedrigsten. Umgekehrt weist die Fettsynthese in Medium I mit dem niedrigsten N-Gehalt den höchsten Fettkoeffizienten mit 8,8 (8. Tag) auf, wogegen der maximale Fettkoeffizient im Medium III mit einem Wert von nur 3,5 (2. Tag) am niedrigsten liegt.

Der Versuch zeigt also, daß Zellsubstanz- und Fettsynthese unter günstigen Bedingungen gleichzeitig ablaufen, jedoch durch Kohlenhydratmangel beide zum Stillstand gebracht werden, unabhängig von der noch im Medium verfügbaren N-Menge. Dagegen kommt bei N-Mangel nur das Wachstum zum Stillstand, während Fettsynthese und -Speicherung weiterlaufen, sofern noch Kohlenhydrat verfügbar ist.

Der Versuch zeigt ferner die Kulturbedingungen, unter denen am günstigsten eine größere Menge Fett zur Analyse gewonnen werden kann.

3. Untersuchungen an zellfreien Extrakten

Im folgenden sollten einige Hauptenzyme des Embden-Meyerhof-Abbauweges der Kohlenhydrate, sowie charakteristische Enzyme anderer Stoffwechselwege nachgewiesen und in ihrer Aktivität bestimmt werden.

a) Schlüsselenzyme des Embden-Meyerhof-Abbauweges

Die zur Spaltung des F-1,6-DP nötige Aldolase wurde in einem zellfreien Extrakt nachgewiesen und ihre Aktivität bestimmt mit $0,074 \mu\text{M}$ F-1,6-DP/mg Protein/min.

Triosephosphat-Isomerase, welche die Bildung des Glycerinaldehydphosphats aus dem zunächst durch die Aldolase hauptsächlich gebildeten Dioxyacetophosphat katalysiert, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität betrug $1,704 \mu\text{M}$ Triosephosphat/mg Protein/min.

Eine zentrale Stellung im Stoffwechsel für Abbau-, Energiegewinnungs- und Synthesevorgänge nimmt die „aktivierte Essigsäure“, das Acetyl-CoA ein. Es entsteht durch Decarboxylierung der im Verlauf des Embden-Meyerhof-Abbauweges gebildeten BTS. Das dabei beteiligte Enzym BTS-Dehydrogenase wurde nachgewiesen

und seine spezifische Aktivität bestimmt mit $0,012 \mu\text{M BTS}/\text{mg Protein}/\text{min}$. Ohne α -Liponsäure wurde zwar keine Verminderung der Enzymaktivität festgestellt, doch kann daraus noch nicht unbedingt geschlossen werden, daß die Reaktion keiner katalytischen Mengen dieser Substanz bedarf, da mit einem rohen Enzymextrakt gearbeitet wurde, der Spuren der wirksamen Substanz enthalten konnte.

b) Phosphoketolase-Aktivität

Um die Frage zu klären, ob auch auf anderem Wege aktive Acetyl-einheiten gebildet werden können, wurde der Enzymextrakt auf die Anwesenheit von Phosphoketolase untersucht. Diese spaltet Acetyl-phosphat von bestimmten Zuckerphosphaten ab. Als Substrate wurden F-6-P und Ri-5-P eingesetzt. Es konnte jedoch keine Phosphoketolase-Aktivität festgestellt werden. Die Reaktionsfähigkeit der Ansätze selbst ließ sich durch Zugabe eines aktiven *Lactobacillus*-Extraktes und die dadurch bewirkte Extinktionsabnahme beweisen.

c) Einbau von $^{14}\text{CO}_2$

Die Anwesenheit carboxylierender Enzyme wurde in dem zellfreien Extrakt durch Einbauversuche mit $^{14}\text{CO}_2$ nachgeprüft.

Ru-1,5-DP-Carboxylase, die die Bildung von 2 Mol 3-Phosphoglycerinsäure aus 1 Mol Ru-1,5-DP und 1 Mol $^{14}\text{CO}_2$ katalysiert, ließ sich nicht nachweisen. Auch PEP-Carboxylase konnte in Form markierten Oxalacetats in dem zellfreien Extrakt nicht nachgewiesen werden durch Inkubation von PEP mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Da auch bei Zugabe von ADP zu obigem Ansatz kein markiertes Oxalacetat nachweisbar war, konnte auch die Anwesenheit der ADP-(oder IDP-)bedürftigen Oxalessigsäure-Carboxylase ausgeschlossen werden.

C. Diskussion

Wie aus den vorangegangenen Versuchen anderer Autoren zu erwarten war, erwies sich der Organismus wegen seines homogenen, hefähnlichen Wachstums und der einfachen Nährstoffansprüche in Submerskultur für die geplanten stoffwechselphysiologischen Untersuchungen als sehr geeignet. Zur Gewinnung genauer qualitativer und quantitativer Daten über Menge und Zusammensetzung des Zellmaterials, sowie über die Veränderungen im Kulturmedium war die Submerskultur das geeignete Verfahren. Parallelversuche mit Rühr- und Schüttelkultur ließen letztere wegen ihrer überwiegenden Vorteile als die Methode der Wahl erscheinen.

Die Spezifität der drei untersuchten Stämme von *Beauveria tenella* für bestimmte C-Quellen war im Gegensatz zu vielen anderen vergleichbaren Pilzen nicht sehr ausgeprägt. So konnten nach HUMFELD u. SUGIHARA (1949), REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1958), sowie MOUSTAFA

(1960) und eigenen Untersuchungen als C-Quelle verwertet werden: An komplexen Substraten die Abfallflüssigkeit bei der Spargel- und Birnenkonservierung („asparagus butt juice“, „pear waste juice“), Reisschrot-Extrakt („rice bran extract“), Mais-Sirup, Gerstenkeim-Extrakt („malt sprout extract“), Malz-Sirup („malt syrup“), Biomalz, Melasse und lösliche Stärke, an definierten C-Quellen d-Glucose, d-Galactose, d-Mannose, d-Fructose, d-Xylose, d-Arabinose, Maltose, Saccharose, Dextrin, Lactat und Pyruvat. Acetat konnte, als einzige C-Quelle verabreicht, nicht verwertet werden. Aus den Untersuchungen ging weiter hervor, daß Lactat, Pyruvat und Acetat nicht nur die Ausbeute an Trockensubstanz, sondern auch an Fett steigerten. Das stimmt überein mit den Ergebnissen, die HOPPE (1960) von Versuchen an Hefen zitiert. KLEINZELLER (1944) dagegen konnte bei *Torula lipofera* keine vermehrte Fettbildung durch Lactat-, Pyruvat- und Acetatzugabe beobachten. Als C-Quellen ungeeignet waren Crotonat, L-Rhamnose, Na-Carboxymethylcellulose und Lactose. Da die Hydrolyseprodukte der Lactose, Galactose und Glucose jedoch gut verwertet werden können, scheint dem Organismus nur das hydrolysierende Enzym, die Lactase zu fehlen. Es kann sich jedoch auch um eine Frage der Permeabilität handeln.

Daß Lactose und Cellulose eine schlechte C-Quelle für Pilze darstellen, ist häufig beobachtet worden (HEIDE 1939; MARGOLIN 1942; ESTIENNE, CASTAGNE u. BERTRAND 1947; LILLY u. BARNETT 1953; COCHRANE 1958). Dies wird auch durch Untersuchungen von HUBER (1958) an *Beauveria bassiana* bestätigt, der in Submerskultur einerseits ein ähnlich weites Spektrum von verwertbaren definierten und komplexen C-Quellen fand, andererseits aber ebenfalls feststellte, daß Lactose selbst schlecht genutzt werden konnte, während ihre Spaltprodukte gute C-Quellen darstellten. Er fand weiterhin lipolytische Aktivität, indem der Pilz verschiedene Fette als Substrat verwerten konnte (besonders deren Glycerinanteil). Dies paßt gut zu den Befunden, daß besonders das Fettgewebe der befallenen Insekten von dem Pilz angegriffen wird.

Da Glucose schnell und gut in Zellsubstanz und Lipide umgesetzt werden kann und leicht erhältlich ist, wurde sie als Haupt-C-Quelle benutzt.

Auch hinsichtlich der N-Quellen ist der Organismus sehr anspruchslos. Er kann sowohl Ammonsalze, Aminosäuren und Harnstoff, wie auch komplexe Formen organischen Stickstoffs verwerten (MACLEOD 1954a; HUMFELD u. SUGIHARA 1952). Auch an *Beauveria bassiana* fand HUBER (1958), daß eine ganze Reihe anorganischer (NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und organischer N-Quellen (Aminosäuren, Pepton, Casein, Harnstoff) gut verwertbar waren. Da Harnstoff bei seiner Verwertung den pH-Wert des Mediums nicht zu stark beeinflußt, wurde er als einzige N-Quelle benutzt.

Diese Anspruchslosigkeit bezüglich der Nährstoffe dürfte auch eine der Hauptursachen für die weite Verbreitung von *Beauveria* darstellen

(MACLEOD 1954a und 1954b; HUBER 1958; MADELIN 1960; FRANZ 1961). Der Besitz von Chitinase (HUBER 1958; CLAUS 1961) erklärt besonders die Befähigung zum Parasitismus an Insekten, doch wurde *Beauveria* auch von höheren Tieren (SMITH 1897), ja sogar vom Menschen (KURU 1932) isoliert. Auch eine saprophytische Lebensweise wurde vereinzelt gefunden (VINCENS 1923; SACCAS 1948; MOLITORIS 1963a), zumindest wurde das häufige Auftreten von *Beauveria* im Boden in der Richtung diskutiert, daß die Rückkehr zum Saprophytismus dem Pilz die Möglichkeit biete, ungünstige Lebensbedingungen zu überdauern (MADELIN 1960; FRANZ 1961). HUBER (1958) dagegen kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß *Beauveria* zu einer saprophytischen Lebensweise im Boden nicht befähigt sei.

Da im Verlauf der Untersuchungen insbesondere der Fettbildung und ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren nachgegangen werden sollte, mußte der Methodik der Lipidgewinnung und Untersuchung zunächst besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Die Lipide der Zellen sind nicht nur in den verschiedenen organischen Lösungsmitteln zu verschiedenen Anteilen löslich, sondern auch die Zellwand besitzt für sie nicht die gleiche Durchlässigkeit. Weiterhin sind die Lipidtröpfchen in den Zellen teilweise von Proteinmembranen umgeben oder die Lipide liegen als „gebundene Lipide“ in schwer löslicher Form in Strukturelementen der Zelle vor. Die Ergebnisse der Lipidbestimmung sind daher in hohem Maße von der angewandten Methodik abhängig.

Die Problematik dieser Bestimmungen wird bei FOSTER (1949), COCHRANE (1958) und HOPPE (1960) diskutiert. Der Einfluß von Lipid-Lösungsmitteln und Extraktionsmethoden wurde bei verschiedenen Organismen von PRUESS (1934), PECK (1947) und BERNHAUER (1950) eingehend untersucht. In eigenen Voruntersuchungen wurden diese Angaben für das spezielle Untersuchungsobjekt bestätigt.

Zur Extraktion wurde schließlich Diäthyläther verwendet, da er das reinste Lipid ergibt. Das gefriergetrocknete Mycel wurde vor der Extraktion noch mechanisch aufgeschlossen. Dadurch konnte die Lipidausbeute auf etwa das Doppelte gesteigert werden. Obwohl durch eine Hydrolyse die Ausbeute an Fett gegebenenfalls noch weiter zu steigern gewesen wäre, wurde auf sie verzichtet, da bei dieser neben der Aufspaltung der Lipidsymplexe auch eine Zerlegung des Neutralfettes und vor allem der Phosphatide erfolgt. Der Fehler kann bei hohen Phosphatidgehalten bis 30% betragen (HOPPE 1960).

Bei den wachstumsphysiologischen Versuchen stellte sich heraus, daß der Ökonomische Koeffizient mit sinkender Kohlenhydratkonzentration der Medien zunimmt und auch von deren C/N-Verhältnis insofern abhängt, als er bei dessen Zunahme abfällt (vgl. Abb. 10). Die Beeinflussung der Trockensubstanzbildung durch den Anfangs-pH des Mediums war nur gering, doch konnte bei niedrigen pH-Werten stets eine etwas bessere Ernte erzielt werden.

MOUSTAFA (1960), der allerdings bei seinen Untersuchungen den Zeitfaktor unberücksichtigt ließ, fand in einem Glucosemedium mit komplexen organischen Bestandteilen ebenfalls bei niedrigen Kohlenhydrat-Konzentrationen (2,3% Glucose) die höchsten Zellsubstanz-Ausbeuten und ein Ansteigen der Ausbeute mit sinkendem C/N-Verhältnis (Maximalwerte der Ausbeute bei C/N = 19/1 : 46—51%). Der Anfangs-pH beeinflußte in seinen Untersuchungen den Endertrag kaum.

Pilze verwerten im allgemeinen Kohlenhydrate besser und bilden mehr Zellsubstanz aus einer vorgegebenen Substratmenge als beispielsweise Bakterien. Wie bei den Hefen gibt es auch unter anderen niederen und verschiedenen höheren Pilzen einige, deren Fähigkeit zur Fettsynthese besonders ausgeprägt ist. Man nimmt an, daß das Fett intracellulär, wahrscheinlich im Zusammenhang mit cytoplasmatischen Partikeln gebildet wird. Die Hauptmenge findet man dabei in vacuolären Kugeln, geringere Anteile auch fein im Plasma verteilt und den Rest an Strukturen gebunden. Wie von verschiedenen Autoren auch schon an anderen Mikroorganismen beobachtet (HEIDE 1939; STEINER u. HEINEMANN 1954; HEINEMANN 1956) und bei HOPPE (1960) ausführlich besprochen worden ist, tritt das Fett in den Zellen häufig zuerst in Form sehr vieler kleiner, sich ständig vergrößernder Kugeln auf, die dann im weiteren Kulturverlauf zusammenfließen. STEINER u. HEINEMANN (1954) beobachteten die Fettbildung an Grana mit positiver Nadi-Reaktion, was mit verschiedenen Befunden übereinstimmen würde, nach denen in den Mitochondrien ein Großteil der Enzyme der Oxydoreduktion, also auch der Fettsynthese lokalisiert ist. Neuere elektronenoptische Untersuchungen lieferten dagegen besonders bei höher organisierten Zellen, so bei Vertebraten und Insekten (BARGMANN u. KNOOP 1959; v. GAUDECKER 1963), Hinweise dafür, daß die Fettsynthese nicht im Zusammenhang mit den Mitochondrien steht, sondern im Erythroplasma der Zelle vor sich geht.

Über die Fettbildung der untersuchten Stämme ist bisher kaum etwas bekannt. Die von HUMFELD u. SUGIHARA (1949); REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1958) sowie von FALANGHE (1962) vorliegenden Untersuchungen geben einen Fettgehalt des Mycels zwischen 3,1 und 9,9%, je nach Stamm und Kulturbedingungen, an. Da jedoch Erntedatum, Substratzusammensetzung und Fettbestimmungsmethode entweder nicht angegeben sind oder von den in dieser Arbeit benutzten Verfahren abweichen, sind diese Daten nicht ohne weiteres mit den hier vorliegenden Ergebnissen vergleichbar.

Bei der Untersuchung der Fettbildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums, ohne Berücksichtigung des Zeitfaktors, ließ sich bereits feststellen, daß steigende Kohlenhydratmengen eine Steigerung der Trockensubstanz- und Fettbildung bedingen, wobei letztere besonders durch ein hohes C/N-Verhältnis gefördert wurde. Die mit steigenden Kohlenhydratmengen erhöhte Speichersubstanzbildung hatte einerseits ein Absinken des Ökonomischen Koeffizienten, andererseits aber ein Ansteigen des Fettkoeffizienten zur Folge, da die C-Quelle in steigendem Maße in intracellulär angehäuftes Fett umgewandelt wurde. Mit 52,1 und 11,6 erreichten dabei Ökonomischer bzw. Fettkoeffizient vergleichsweise hohe Werte¹.

Während die Versuche über die Fettbildung ohne Berücksichtigung des Zeitfaktors nur bedingt allgemeingültige Aussagen zulassen, worauf

¹ Zu Berechnungen über die Korrelation Ökonomischer Koeffizient/Fettkoeffizient vgl. RIPPEL (1940).

besonders auch COCHRANE (1958) hinweist, ergeben die Versuche über die Fettbildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Nährmedien und von der Zeit ein wesentlich klareres Bild.

LINDNER spricht bereits 1922 im Zusammenhang mit der Fettbildung bei *Endomyces vernalis* von zwei Synthesephasen, die zeitlich aufeinanderfolgen: 1. Die Eiweißgeneration. Hier findet in erster Linie Wachstum unter Eiweißbildung und rascher N-Aufnahme statt, solange noch größere Mengen Stickstoff in der Nährlösung vorhanden sind. 2. Die Fettgeneration. Sie tritt ein, sobald der Stickstoff der Nährlösung verbraucht ist. In dieser Phase wird aus noch verfügbarem Kohlenhydrat in der Hauptsache nur noch Fett gebildet.

Diese zwei Phasen wurden auch von verschiedenen anderen Autoren, besonders an Hefen, gefunden (FOSTER 1949; LUNDIN 1950; MAAS-FÖRSTER 1955; HOPPE 1960).

Umgekehrt wurden jedoch auch Fälle berichtet, in denen die Fettgeneration zeitlich neben der Eiweißgeneration herläuft (RAAF 1942; GOODWIN u. WILLMER 1952).

Besonders die Ergebnisse von RAAF zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von den NRRL-Stämmen gewonnenen Daten. Durch die Zusammensetzung des Nährmediums (C/N-Verhältnis) ließ sich bei den hier beschriebenen Versuchen von vornherein entweder die Eiweißgeneration oder die Fettgeneration einseitig fördern. Die Wachstums geschwindigkeit war bei den Versuchen in der Eiweißgeneration (niedriges C/N-Verhältnis) etwa doppelt so hoch wie bei der Fettgeneration (vgl. auch RAAF 1942). Die Versuche zeigten weiter, daß Kohlenhydratmangel Wachstum und Fettsynthese zum Stillstand bringt, unabhängig von der noch verfügbaren N-Menge. Dagegen kommt bei alleinigem N-Mangel nur das Wachstum (Proteinsynthese) zum Stillstand, während Fettsynthese- und Speicherung weiterlaufen, sofern noch assimilierbares Kohlenhydrat vorhanden ist. Die Ergebnisse der Versuche über die Einwirkung des C/N-Verhältnisses auf die Fettbildung stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren (zitiert in HOPPE 1960), wonach eine Behinderung der Eiweißsynthese eine vermehrte Fettbildung zur Folge hat. Die inverse Beziehung zwischen Protein- und Fettsynthese in der lebenden Zelle geht wahrscheinlich auf eine Konkurrenz der beteiligten Enzyme um das Substrat zurück, wobei die Geschwindigkeit der Aminosäuresynthese offenbar beträchtlich höher ist als die der Fettsynthese.

Das intracellulär gebildete und gespeicherte Fett wird allgemein als Reserve substanz betrachtet, die bei Kohlenhydratmangel unter sonst günstigen Bedingungen (genügend N, P, S) Proteinbildung ermöglicht (PRILL 1935; CHIBNALL 1939; RAAF 1942; YEMM u. FOLKES 1954). Dabei unterscheidet BELIN (1926) zwei Fraktionen: 1. „élément constant“, den für die Lebensfähigkeit der Zelle unbedingt notwendigen Lipidanteil (Phospholipide, Lipoproteine, besondere Teile des Plasmas), der ein gewisses Minimum nicht unterschreiten darf, und 2. „élément variable“ als Reserve material, dessen Menge in weiten Grenzen schwanken kann und das nicht als echter Teil des Protoplasmas anzusehen ist.

Es sind aber auch Fälle beschrieben worden, in denen dem Fett keine Funktion als Reservesubstanz zukommt, es also bei C-Mangel nicht abgebaut wird und nur als unverwertbares Speicherprodukt vorliegt¹. Dazu wären auch die Fälle einer „degenerativen Fettbildung“ aus Plasmasubstanzen, besonders bei höherem Kulturalter zu zählen (KORDES 1923; GEFFERS 1937; KLEINZELLER 1944).

Die eigenen Versuche geben keinen eindeutigen Aufschluß über die physiologische Wertigkeit des gespeicherten Lipids, das zwar nach Verbrauch des Kohlenhydrats im Medium, während der Autolyse absolut und prozentual (zur Trockensubstanz) abnimmt, doch wesentlich weniger stark als die Zellsubstanz selbst.

Unter natürlichen Lebensbedingungen findet bei den Mikroorganismen im allgemeinen keine nennenswerte Fettbildung statt, bei unphysiologisch hohen Kohlenhydratkonzentrationen im Nährmedium wird jedoch mehr Kohlenhydrat gespalten, als zum Zellaufbau und zur Energiegewinnung verwendet werden kann. Der das Substrat völlig oxydierende Enzymmechanismus wird so abgesättigt (FOSTER 1949: „bottle-neck enzymes“, „overflow metabolism“) und die im Überschuß vorhandenen, teilweise oxydierten Abbauprodukte werden entweder ausgeschieden oder zu sekundären Hilfsenzymsystemen weitergeleitet. Diese können nur verhältnismäßig geringe Veränderungen an den Zwischenprodukten vornehmen, die daraufhin ausgeschieden oder wie im Falle der Lipide, intracellulär angehäuft werden.

Obwohl die Pilze aerobe Organismen sind, bauen sie im allgemeinen die Hauptmenge der angebotenen Kohlenhydrate über den an sich anaeroben Embden-Meyerhof-Stoffwechselweg ab. So konnten SHU, FUNK u. NEISH (1954) durch Isotopenversuche nachweisen, daß *Aspergillus niger* etwa 80% der angebotenen Glucose auf diesem Wege abbaut. Es zeigte sich, daß der Embden-Meyerhof-Weg nicht auf anaerobe Bedingungen beschränkt ist, sondern auch unter aeroben Verhältnissen streckenweise zum Kohlenhydrat-Abbau beschritten werden kann, indem er terminal mit aeroben Prozessen gekoppelt ist. Dabei wird reduziertes Co-Enzym durch ein Oxydase-System regeneriert. Die Decarboxylierung des Pyruvats zur aktiven Essigsäure stellt dabei die Verbindung zum Tricarbonsäure-Cyclus her, der eine hohe Energieausbeute aus dem abgebauten Kohlenhydrat gewährleistet. Das für die terminale Oxydation benötigte Cytochrom-System scheint in Pilzen ebenso wie die Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges allgemein vorhanden zu sein (COCHRANE 1958).

In den eigenen Versuchen konnte ebenfalls durch den Nachweis der Schlüsselenzyme Aldolase, Triosephosphat-Isomerase und BTS-Dehydrogenase dieser Abbauweg und die Verbindung zum Tricarbonsäure-Cyclus nachgewiesen werden. Die letztgenannte Reaktion liefert die

¹ Vgl. hierzu STEINER u. KATING (1963).

Acetyl-CoA-Einheiten für den Tricarbonsäure-Cyclus und die Fettsynthese. Da aus dem Tricarbonsäure-Cyclus für weitere Synthesen Dicarbonsäuren abgezweigt werden, ist, um ein Weiterlaufen des Cyclus zu gewährleisten, eine *de novo*-Bildung von Dicarbonsäuren auf anderem Wege nötig, etwa über den Glyoxylsäure-Cyclus oder durch Carboxylierungs-Reaktionen. Bei Pilzen wurde häufig eine Wachstumsförderung durch CO_2 nachgewiesen und auch der Einbau von CO_2 in Brenztraubensäure, Milchsäure, Oxalessigsäure, Bernsteinsäure und Citronensäure (CLELAND u. JOHNSON 1954) festgestellt (COCHRANE 1958). Im Rohextrakt des Mycels der *NRRL*-Stämme ließ sich jedoch eine Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ in Oxalacetat weder durch PEP-Carboxylase (BANDURSKI 1955), noch durch Oxalessigsäure-Carboxylase (UTTER, KURAHASHI u. ROSE 1954; SUZUKI u. WERKMAN 1958), ebensowenig wie die Carboxylierung des Ru-1,5-DP durch die Ru-1,5-DP-Carboxylase nachweisen. Dieses Enzym wurde unter anderem bisher im Spinat und in anderen grünen Pflanzen (JAKOBY, BRUMMOND u. OCHOA 1956), Algen (CALVIN 1956; PETERKOFSKI u. RACKER 1961) und chemolithotrophen Mikroorganismen (TRUDINGER 1956) gefunden. Auch die Phosphoketolase, die von Zuckerphosphaten Acetylphosphat abspaltet und bisher bei Lactobacillen (LAMPEN, GEST u. SOWDEN 1951; HEATH et al. 1958), bei *Leuconostoc* (HURWITZ 1958) und *Acetobacter* (SCHRAMM, KLYBAS u. RACKER 1958), nicht jedoch bei Pilzen gefunden wurde, ließ sich in dem Enzymextrakt von *Beauveria* nicht nachweisen.

Zusammenfassung

Für die serienmäßige quantitative Lipidbestimmung bei *Beauveria tenella* auf der Grundlage der optischen Hydroxamsäureester-Bestimmung wurde eine für die vorliegenden Bedingungen geeignete Mycelaufschluß- und Extraktionsmethode entwickelt. Das gefriergetrocknete Mycel wurde im Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Äther aufgeschlossen und auf der Schüttelmaschine extrahiert. In Submerskulturversuchen wurde das Wachstum der drei Stämme *NRRL 2334, 2335, 2336* in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Quelle und ihrer Konzentration, dem Zusatz anorganischer Salze und vom pH-Wert geprüft.

Es wurden Wachstumskurven mit Rühr- und Schüttelkultur aufgenommen. Als günstigste Methode erwies sich die Schüttelkultur, beimpft mit einer flüssigen Vorkultur.

Die Fettbildung der Stämme in Abhängigkeit von verschiedenen zusätzlichen Kohlenstoffquellen wurde geprüft. Acetat, Pyruvat und Lactat konnten in Zellsubstanz und Fett umgewandelt werden. Stamm *NRRL 2334* war der beste Fettbildner.

Die Auswirkung verschiedener Kohlenhydrat- und Stickstoffkonzentrationen auf die Lipidsynthese wurde untersucht. Trockensubstanz-

und Lipidsynthese nehmen mit steigendem Kohlenhydratgehalt des Mediums zu, doch sinkt dabei der synthetische Wirkungsgrad. Ein hohes C/N-Verhältnis begünstigte die Fettbildung. Fett- und Zellsubstanzbildung konkurrieren um die Kohlenstoff-Quelle. Ein höherer ökonomischer Koeffizient ist jeweils mit einem niedrigeren Fettkoeffizienten gekoppelt. Es wurde in Wachstumskurven die Abhängigkeit der Lipidsynthese vom C/N-Verhältnis und der Zeit bestimmt. Die Fettbildung setzt schon ein, bevor Stickstoff zum wachstumsbegrenzenden Faktor wird. Sie schreitet nach Aufbrauch der Stickstoff-Quelle bis zu einem Fettgehalt von 34% des Mycel-trockengewichts fort.

Als Schlüsselenzyme des Embden-Meyerhof-Abbauweges wurden in zellfreien Extrakten Aldolase, Triosephosphat-Isomerase und Brenztraubensäure-Dehydrogenase nachgewiesen und in ihrer Aktivität bestimmt.

Phosphoenolbrenztraubensäure-Carboxylase, Oxalessigsäure-Carboxylase und Ribulose-1,5-Diphosphat-Carboxylase ließen sich nicht nachweisen; $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit den entsprechenden Enzymsubstraten nicht eingebaut. Phosphoketolase konnte ebenfalls nicht aufgefunden werden.

Summary

A method for the breaking up and extraction of fungal mycelium (*Beauveria tenella*) prior to the quantitative determination of lipids by means of the hydroxamic acid-ester reaction was developed. The lyophilized mycelium, suspended in ether, was broken up using a Potter-Elvehjem homogenisor and further extracted on a shaker.

The growth of three fungal strains (*NRRL 2334, 2335, 2336*) in relation to the carbon source and concentration, the presence of inorganic salts and the pH-value of the medium was examined.

Growth curves of shaken and stirred cultures were recorded. The best growth method found was the shake-culture method using a liquid pre-culture.

The production of fat in these strains in relation to the carbon source utilized was investigated. Acetate, pyruvate and lactate were incorporated into cell-substance and fats. Strain *NRRL 2334* was the best fat-producer.

The effect of various carbohydrate and nitrogen concentrations on lipid synthesis was examined. The synthesis of cell material and lipids increases with higher concentrations of carbohydrates; at the same time, the synthetic efficiency is lowered. A high C/N ratio favoured fat production. The synthesis of fat and cell material from carbohydrates is a competitive reaction. A higher economic coefficient is coupled with a

lower fat-coefficient. The relationship between lipid synthesis and the C/N ratio and between lipid synthesis and time was determined. Lipid production commences before nitrogen becomes growth-limiting. Following complete consumption of the nitrogen-source the fat content rises to a maximum of 34% on a dry-weight basis.

The key enzymes of the Embden-Meyerhof scheme—aldolase, triose-phosphate-isomerase and pyruvic dehydrogenase—were found and their activity determined.

The presence of phosphoenol pyruvate-carboxylase, oxalacetic-carboxylase and ribulose-1,5-diphosphate-carboxylase could not be demonstrated; $^{14}\text{CO}_2$ was not incorporated in enzymatic tests with the respective substrates. Phosphoketolase activity could not be found.

Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Herrn Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für sein reges Interesse an der Arbeit und ihre stete Förderung.

Fräulein MARITA MAU danke ich für stets zuverlässige Hilfeleistung bei den abschließenden Versuchen.

Literatur

- BANDURSKI, R. S.: Further studies on the enzymatic synthesis of oxal-acetate from phosphorylenol-pyruvate and carbon-dioxide. *J. biol. Chem.* **217**, 137—150 (1955).
- BARGMANN, W., u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion: Licht- und elektronenoptische Studien an der Milchdrüse der Ratte. *Z. Zellforsch.* **49**, 344—388 (1959).
- BAUER, H., u. H. MOLL: Die organische Analyse, 4. Aufl. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest u. Portig KG. 1960.
- BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBÄDE, E. MEYER-AHRENDT u. G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555—577 (1955).
- BELIN, P.: Généralité de la distinction entre deux catégories de matières grasses: Élément constant et élément variable. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **8**, 1081 bis 1102, 1120—1150 (1926).
- BENKO, P. J.: Studies on the submerged cultivation of edible mushrooms. M. S. Thesis, Univ. Calif., Calif. (1958).
- BERNHAUER, K. P., P. MÜLLER u. E. THEILE: Beiträge zur mikrobiologischen Eiweiß- und Fettsynthese. V. Mitteilung. Notiz über die vergleichende Prüfung verschiedener Verfahren zur Fettextraktion von Pilzmycel. *Biochem. Z.* **320**, 294—298 (1950).
- Boehringer, C. F., & Soehne, Mannheim: a) Firmenschrift: Biochemica „Boehringer“. Aldolase-Test.
— b) Firmenschrift: Biochemica „Boehringer“. Triosephosphat-Isomerase (1961).
- BÜCHER, TH.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **1**, 292 (1947).
- CALVIN, M.: Der Photosynthese-Cyclus. *Angew. Chem.* **68**, 253—264 (1956).
- CHIBNALL, A. C.: Protein metabolism. New Haven: Yale Univ. Pr. 1939.

- CHOU, T. C., and F. LIPPMANN: Separation of acetyl transfer enzymes in pigeon-liver extract. *J. biol. Chem.* **196**, 89—103 (1952).
- CLAUS, L.: Untersuchungen über die Chitinasewirkung des insektentötenden Pilzes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arch. Mikrobiol.* **40**, 17—46 (1961).
- CLELAND, W. W., and M. J. JOHNSON: Tracer experiments of the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*. *J. biol. Chem.* **208**, 679—689 (1954).
- COCHRANE, V.: Physiology of fungi. New York: J. Wiley, Sons Inc. 1958.
- CORDON, T. C., and J. H. SCHWARTZ: The fungus *Beauveria tenella*. *Science* **138**, 1265 (1962).
- ENEBO, L.: Sätt att framställa fett på mikrobiell väg. Schwed. Pat. 127186. (Zusatz z. Schwed. Pat. 124071) (1950).
- ESTIENNE, V., E. CASTAGNE et E. BERTRAND: La lactase des champignons. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **29**, 620—627 (1947).
- FALANGHE, H.: Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. *Appl. Microbiol.* **10**, 572—576 (1962).
- FILDES, Sir P.: The evolution of microbiology. *Proc. roy. Soc. B* **138**, 65—74 (1951).
- FRANZ, J. M.: Biologische Schädlingsbekämpfung. In SORAUER, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. VI, 3. Liefg., 2. Aufl. Berlin: Parey 1961.
- FOSTER, J. W.: Chemical activities of fungi. New York: Academic Press Inc. 1949.
- GAUDECKER, B. v.: Über den Formwechsel einiger Zellorgane bei der Bildung der Reservestoffe im Fettkörper von *Drosophila*-Larven. *Z. Zellforsch.* (im Druck) (1963).
- GEFFERS, H.: Untersuchungen über das Fettbildungsvermögen bei Pilzen der Gattung *Oospora* Wallroth (em. Sacc.). *Arch. Mikrobiol.* **8**, 66—98 (1937).
- GOODWIN, T. W., and J. S. WILLMER: Studies in carotenogenesis. 4. Nitrogen metabolism and carotene synthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem. J.* **51**, 213—217 (1952).
- HEATH, E. C., J. HURWITZ, B. L. HORECKER and M. GINSBURG: Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. I. The cleavage of xylulose-5-phosphate by phosphoketolase. *J. biol. Chem.* **231**, 1008—1064 (1958).
- HEIDE, S.: Zur Physiologie und Cytologie der Fettbildung bei *Endomyces vernalis*. Mit einem Beitrag zur Methodik der quantitativen Bestimmung kleinsten Fettmengen. *Arch. Mikrobiol.* **10**, 135—188 (1939).
- HEINEMANN, H.: Untersuchungen über die Physiologie und Cytologie der Fettbildung bei Pilzen. Diss. d. math.-nat. Fak. Univ. Bonn (1956).
- HEWITT, B. R.: Spectrophotometric determination of total carbohydrate. *Nature (Lond.)* **184**, 246—247 (1958).
- HOPPE, W.: In REIFF, F., R. KAUTZMANN, H. L. LÜERS u. M. LINDEMANN: Die Hefen. I. Band. Die Lipide der Hefen, S. 465—507. Lipidstoffwechsel, S. 819 bis 872. Nürnberg: H. Carl 1960.
- HUBER, H.: Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. *Arch. Mikrobiol.* **29**, 257—267 (1958).
- HUGHES, D. E.: A press for disrupting bacteria and other microorganisms. *Brit. J. exp. Path.* **32**, 97—109 (1951).
- HUMFELD, H.: The production of mushroom mycelium in submerged culture. *Science* **107**, 273—275 (1948).
- Production of mushroom mycelium. US. Dept. Agric., Yearbook Agric. 242 to 246 (1950/51).
- , and T. F. SUGIHARA: Mushroom mycelium production by submerged propagation. *Food Technol.* **3**, 355—356 (1949).
- — The nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. *Mycologia (N. Y.)* **44**, 605—620 (1952).

- HURWITZ, J.: Pentose phosphate cleavage by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **28**, 599—602 (1958).
- JAKOBY, W. B., D. O. BRUMMOND and S. OCHOA: Formation of 3-phosphoglyceric acid by carbon dioxide fixation with spinach leaf enzymes. *J. biol. Chem.* **218**, 811—822 (1956).
- KAPLAN, N. O., and F. LIPPMAN: The assay and distribution of coenzyme A. *J. biol. Chem.* **174**, 37—44 (1948).
- KLEINZELLER, A.: Fat formation in *Torulopsis lipofera*. *Biochem. J.* **38**, 480—492 (1944).
- KORDES, H.: Biologische Untersuchungen über das in Dauerzellen und Hyphen verschiedener Pilze auftretende Fett. *Bot. Arch.* **3**, 282—311 (1923).
- KURU, M.: Über einen neuen pathogenen Schimmelpilz „*Isaria shiotae*, nov. spec.“ von einem pseudoxanthomatosen Herde des Menschen kultiviert. *Japan. J. Med. Sci. IX. Surg.* **2**, 327—358 (1932).
- LAFFERTY, R. M.: Kohlendioxyd-Fixierung durch organotrophe Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **44**, 373—405 (1963).
- LAMPEN, I. O., H. GEST and I. C. SOWDEN: Observations on the mechanism of fermentation of 1-¹⁴C-D-Xylose by *Lactobacillus pentosus*. *J. Bact.* **61**, 97—98 (1951).
- LEHMANN, F., L. MAQUENNE u. N. SCHOORL: Zuckerbestimmung. In KLEIN, G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse*. II. Band. 1. Teil. Wien: Springer 1932.
- LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: Utilisation of sugars by fungi. *West Va. Univ. agr. exp. Sta. Bull.* **362T**, 1—58 (1953).
- LINDNER, P.: Das Problem der biologischen Fettbildung und Fettgewinnung. *Z. angew. Chem.* **35**, 110—114 (1932).
- LUNDIN, H.: Fettsynthese durch Mikroorganismen und Möglichkeiten ihrer technischen Verwertung. *Mitt. Vers. Anst. Gärungsweg.* **1—2**, 5—12 (1950).
- MAAS-FÖRSTER, M.: Der Fett- und Eiweißstoffwechsel von *Endomyces vernalis* unter dem Einfluß von Phosphor- und Kaliummangel. *Arch. Mikrobiol.* **22**, 115—144 (1955).
- MACLEOD, D. M.: Natural and cultural variation in entomogenous fungi imperfecti. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 58—70 (1954a).
— Investigation on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canad. J. Bot.* **32**, 818—890 (1954b).
- MADELIN, M. F.: Pilze als Insektenparasiten. *Endeavour* **XIX** **76**, 181—190 (1960).
- MARGOLIN, A. S.: The effect of various carbohydrates upon the growth of some fungi. Thesis, West Va. Univ. (1942).
- MOLITORIS, H. P.: Untersuchungen an *Beauveria tenella* (NRRL 2334, 2335, 2336; bisher *Agaricus campestris*). I. Systematik. *Arch. Mikrobiol.* **47**, 57—71 (1963a).
- MOUSTAFA, A. M.: Nutrition and the development of mushroom flavor in *Agaricus campestris* mycelium. *Appl. Microbiol.* **8**, 63—67 (1960).
- O'NEIL, J. J.: Studies in the submerged culture production of mushroom mycelium. M. S. Thesis, Mass. Inst. Technol, Cambridge, Mass. (1956).
- PACIFICI, L. R., R. N. BLOMSTER, H. J. LUKOWSKI and A. E. SCHWARTING: Preliminary growth and nutrition studies of *Amanita muscaria* in submerged culture. *Lloydia* **23**, 43—50 (1960).
- PECK, R. L.: In: NICKERSON, W. J.: *Biology of pathogenic fungi*. S. 167—188. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co. (1947).
- PELCZAR, M. J., A. HANSEN and W. A. KONETZKA: Quantitative bacterial physiology. Laboratory Experiments. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1956.

- PETERKOFSKY, A., and E. RACKER: The reductive pentose phosphate cycle. III. Enzyme activities in cell-free extracts of photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* **36**, 409—414 (1961).
- PFEFFER, W.: Über Elektron organischer Nährstoffe. *Jb. wiss. Bot.* **28**, 205—268 (1895).
- POTTER, V. R., and C. A. ELVEHJEM: A modified method for the study of tissue oxidations. *J. biol. Chem.* **114**, 495—504 (1936).
- PRILL, E. A., P. R. WENCK and W. H. PETERSON: The chemistry of mould tissue. VI. Factors influencing the amount and nature of the fat produced by *Aspergillus fischeri*. *Biochem. J.* **29**, 21—33 (1935).
- PRUESS, L. M., E. C. EICHINGER and W. H. PETERSON: The chemistry of mould tissue. III. Composition of moulds with special reference to the lipid content. *Zbl. Bakt.*, II. Abt. **89**, 370—377 (1934).
- RAAF, H.: Beiträge zur Kenntnis der Fett- und Eiweißsynthese bei *Endomyces vernalis* und einigen anderen Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* **12**, 131—182 (1942).
- REUSSER, F., J. F. T. SPENCER and H. R. SALLANS: Protein and fat content of some mushrooms grown in submerged culture. *Appl. Microbiol.* **6**, 1—4 (1958).
- RIPPEL, A.: Energetische Betrachtungen zur Ökonomie der Fettbildung bei Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* **11**, 271—284 (1940).
- SACCAS, A.: Étude morphologique et biologique d'un nouveau champignon papyriole, la *Beauveria heimii* sp. nov. *Rev. Mycol.* **13**, 61—81 (1948).
- SCHLEGEL, H. G., u. R. M. LAFFERTY: Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 52—54 (1961).
- H. KALTWASSER u. K. GOTTSCHALK: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 209—222 (1961).
- SCHRAMM, M., V. KLYBAS and E. RACKER: Phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate by fructose-6-phosphate phosphoketolase. *J. biol. Chem.* **233**, 1283—1288 (1958).
- SHRINER, L. R., R. C. FUSON and D. Y. CURTIN: The systematic identification of organic compounds, 4. Aufl. New York: J. Wiley Sons Inc. 1956.
- SHU, P., A. FUNK and A. C. NEISH: Mechanism of citric acid formation from glucose by *Aspergillus niger*. *Canad. J. Biochem.* **32**, 68—80 (1954).
- SMITH, A. L.: British mycology. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1**, 70 (1897).
- SNYDER, F., and N. STEPHENS: A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **34**, 244—245 (1959).
- STEINER, M.: Zur Verwendung von Permutit bei Stoffwechselversuchen mit Mikroorganismen. *Biochem. Z.* **307**, 330—332 (1941).
- , u. H. HEINEMANN: Grana mit positiver Nadi-Reaktion als Ort der primären Fettbildung in Pilzzellen. *Naturwissenschaften* **41**, 40—41 (1954).
- , u. H. KATING: Ist das Fett von *Penicillium javanicum* im Reservestoff? *Arch. Mikrobiol.* **46**, 185—189 (1963).
- SUGIHARA, T. F., and H. HUMFELD: Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. *Appl. Microbiol.* **2**, 170—172 (1954).
- SUZUKI, J., and C. H. WERKMAN: Chemoautotrophic carbon dioxide fixation by extracts of *Thiobacillus thiooxidans*. I. Formation of oxalacetic acid. *Arch. Biochem.* **76**, 103—111 (1958).
- SZUECS, J.: Submerged culture. *Mushroom Sci.* III, 269—272 (1956).
- TABOR, H., A. H. MEHLER and E. R. STADTMAN: The enzymatic acetylation of amines. *J. biol. Chem.* **204**, 127—138 (1953).

- TRUDINGER, P. A.: Fixation of carbon dioxide by extracts of the strict autotroph *Thiobacillus denitrificans*. Biochem. J. **64**, 274—286 (1956).
- UTTER, M. F., K. KURAHASHI and I. A. ROSE: Some properties of oxalacetic carb-oxylase. J. biol. Chem. **207**, 803—819 (1954).
- VINCENS, F.: Observations sur le *Sclerotium oryzae* faites en Cochinchine. Rev. pathol. végétale et entomol. agr. **10**, 112—131 (1923).
- VINING, L. C., W. J. KELLEHER and A. E. SCHWARTING: Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. Canad. J. Microbiol. **8**, 931—933 (1962).
- YEMM, E. W., and B. F. FOLKES: The regulation of respiration during the assimilation of nitrogen in *Torulopsis utilis*. Biochem. J. **57**, 495—508 (1954).

Dr. H. P. MOLITORIS,

Institut für Mikrobiologie der Universität, 34 Göttingen, Goßlerstraße 16