

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

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

III. Analyse des Speicherfettes

Von

H. P. MOLITORIS

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1963)

Im Teil II dieser Arbeit (MOLITORIS 1963 b) ist über die Abhängigkeit der Speicherfettbildung bei *Beauveria tenella* von verschiedenen Faktoren sowie den zeitlichen Verlauf dieses Vorganges berichtet worden. Gegenstand dieser Mitteilung ist die Isolierung und analytische Untersuchung des gebildeten Speicherfettes.

Bei der Isolierung der Lipide aus den Pilzzellen geht eine Vielzahl von Verbindungen in Lösung, deren Trennung nicht ohne weiteres durchgeführt werden kann. Zum einfacheren und schnelleren Vergleich mit Lipiden anderer Herkunft führt man daher üblicherweise zunächst summarische Untersuchungen durch. Auf diese Weise gelingt es in vielen Fällen bereits einen Einblick in die Zusammensetzung des Lipidgemisches zu erhalten, bevor es im weiteren Verlauf der Untersuchung aufgetrennt und analytisch bestimmt wird. Diese Verfahren werden auf chemischem Gebiet als Kennzahlbestimmungs-Methoden bezeichnet und ermöglichen zusammen mit den physikalischen Konstanten einen Vergleich mit anderen Lipidgemischen.

A. Material und Methoden

1. Mycelanzucht und Lipidgewinnung

Nach den in der vorangegangenen Arbeit (MOLITORIS 1963 b) gewonnenen Erfahrungen wurden Schüttelkulturen des Stammes NRRL 2334 angesetzt (Vorkultur: Humfeld-Medium, 3 Tage, 10% Inoculum; Hauptkultur: Humfeld-Grundmedium mit 5% Glucose und 0,04% Harnstoff = 0,2 mg N/ml) und das Mycel am 10. Kulturtag geerntet. Die Ernte betrug insgesamt 104 g gefriergetrocknetes Mycel. Um das Lipid möglichst quantitativ aus den Zellen herauszulösen, und um Zeit zu sparen, wurde das Mycel mit dem Mickle-Homogenisator aufgeschlossen und mehrmals mit Äther extrahiert [je Aufschluß zwei Proben mit je 500 mg Tr.S., 1 cm³ Glaskugeln, 5 ml Äther, 10 min bei maximaler Intensität; Inhalt dreier Aufschlußgefäße + 35 ml Äther 24 Std auf der Schüttelmaschine bei 27° C extrahiert; Zellreste auf Kieselgur-Filterpapier (Schl. & Sch. Nr. 287) abfiltriert].

Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Trocknen des Rohlipids über CaCl₂ und Paraffin im Exsiccator wurden so aus den 104 g Trockensubstanz 46,6 g Rohextrakt gewonnen, was einem Lipidgehalt des Mycels von 44,8% entspricht. Das Lipid wurde bis zur Weiterverarbeitung jeweils vor Luft und Licht geschützt im Kühlraum aufbewahrt.

2. Physikalische Methoden

Die Dichte wurde gravimetrisch nach KÜSTER, THIEL u. FISCHBECK (1958) bestimmt als ρ_{24} bezogen auf Wasser von 4° C.

Die Refraktion wurde gemessen als n_D^{20} mit einem Abbé-Refraktometer bei 20,2° C und der Na-D-Linie des Spektrums.

Die relative Viscosität gegenüber Wasser wurde nach MATULA (1932) mit einem Ostwald-Viscosimeter ermittelt.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte nach der Blasenmethode (EUCKEN u. SUHRMANN 1954) in dyn/cm.

Die spezifische Drehung wurde mit dem Polarisationsgerät der Fa. Schmidt und Haensch/Berlin, untersucht.

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss-Photometer (PMQ II) aufgenommen und gegen reines Lösungsmittel gemessen. Im UV-Bereich wurde n-Hexan und Methanol, im sichtbaren Spektralbereich Äther als Lösungsmittel verwendet.

Die gravimetrische Fettbestimmung erfolgte wie in der vorangegangenen Arbeit (MOLITORIS 1963 b).

3. Chemische Verfahren

Säurezahl, Verseifungszahl, Esterzahl und Äquivalentgewicht wurden nach WINKLER (in BAUER u. MOLL 1960) bestimmt durch Titration und Verseifung des Lipids mit n-propylalkoholischer 0,5 n KOH.

Die Jodzahl wurde nach KAUFMANN (in BAUER u. MOLL 1960) bestimmt.

Zur Verseifung des Lipids und zur Gewinnung des Unverseifbaren und der freien Fettsäuren wurde wie üblich vorgegangen: Die Arbeiten erfolgten unter CO₂-Schutz. Es wurde mit methylalkoholischer 0,5 n KOH verseift. Das Unverseifbare wurde mit Petroläther/Äthergemisch ausgeschüttelt, abgetrennt, eingedampft und gewogen. Aus der methyl-alkoholischen Phase wurden die Fettsäuren durch Ansäuern mit HCl freigesetzt, durch Schütteln mit Petroläther/Äther abgetrennt, getrocknet, eingedampft und gewogen. Die freien Fettsäuren wurden bis zur Weiterverarbeitung in trockenem p.a. Aceton gelöst und unter Luftabschluß bei -20° C aufbewahrt.

Die Methyl ester der freien Fettsäuren wurden nach GLICK (1960) hergestellt, doch wurde an Stelle der methanolischen HCl mit methanolischer H₂SO₄ gearbeitet. Das Material wurde in trockenem p.a. Aceton unter Luftabschluß bei -20° C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

4. Gaschromatographie und Auswertung

Es wurde ein Argon-Gaschromatograph der Fa. Pye Co., Cambridge, verwendet. Die benutzte Säule hatte eine Länge von 122 cm und einen Durchmesser von 0,4 cm. Das Trägermaterial war Chromosorb W, die aufgezoogene stationäre Phase (10%) bestand aus Polyäthylenglykol-Adipat (PEGA). Als Trägergas wurde Argon verwendet. Die Verdampfertemperatur lag bei 275° C, die Säulentemperatur bei 175° C.

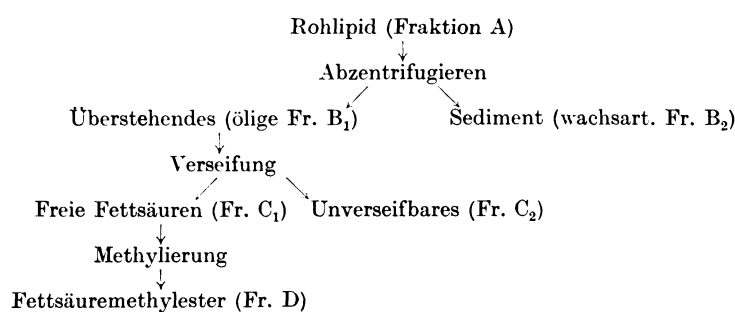
Die qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach JAMES (1962). Nach Berechnung der korrigierten Retentionsvolumina aus den Kurven und den Versuchsbedingungen wurden die einzelnen Fettsäuren durch Vergleich mit den Werten reiner Eichsubstanzen ermittelt.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Flächen der einzelnen Gipfel durchgepaust, ausgeschnitten und gewogen. Die Summe der Gewichte wurde gleich 100% gesetzt und daraus der prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuren(methyl ester) an der Gesamtmenge errechnet.

B. Versuche und Ergebnisse

1. Aufarbeitung des Ätherextraktes

Das Rohlipid war bei 25° C von gelblich-brauner Farbe, öligler Konsistenz und enthielt einen geringen Bodensatz von farblosen, wachsartigen Schuppen. Die Aufarbeitung und Auftrennung in die einzelnen Fraktionen wurde nach folgendem Schema durchgeführt.



Um für die Untersuchungen ein homogenes Material zu erhalten, wurde zunächst durch mehrmaliges Zentrifugieren (25° C, 30 min, 5000 U/min) die wachsartige Fraktion B₂ von der öligen Fraktion B₁ abgetrennt.

2. Physikalische und chemische Kennzahlen und Eigenschaften

Die Lipidfraktion B₁ wurde zunächst auf diese Daten hin untersucht. Die Ergebnisse sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Bei der Untersuchung der Absorptionseigenschaften wurde das UV-Spektrum der Substanz in 0,01% Lösung in n-Hexan im Bereich von 218–340 m μ aufgenommen (Abb. 1, Kurve A). Die Kurve zeigt ein starkes Maximum bei 230 m μ (zwei konjugierte Doppelbindungen) sowie einen zunächst steilen, dann flacher werdenden Abfall bis 340 m μ , unterbrochen von einer Schulter zwischen 247 und 257 m μ . Da die Absorptionsmaxima von einfach ungesättigten Fettsäuren unter dem Meßbereich (215 m μ) liegen, konnten aus der aufgenommenen Kurve auf deren Anwesenheit und Menge keine Schlüsse gezogen werden.

Unter anderem führt auch eine größere Anzahl konjugierter Doppelbindungen zu gefärbten Produkten, die also im sichtbaren Spektralbereich absorbieren. Da die Fraktion B₁ gelb-braun gefärbt war, wurde auch für den sichtbaren Bereich ein Absorptionsspektrum aufgenommen (50% Lösung in Diäthyläther).

Die Substanz absorbiert im Bereich unterhalb von 400 m μ sehr stark, die Absorption sinkt dann zu längeren Wellenlängen hin sehr schnell ab und weist nur noch bei 680 m μ ein kleineres und bei 750 m μ ein etwas größeres Maximum auf.

Tabelle 1. *Physikalische und chemische Eigenschaften des Rohlipids (Ätherextrakt)*

<i>Fraktionierungsergebnis</i>			
Rohextrakt (Fr. A)	44,8% d. Tr. S		
Ölfraction (Fr. B ₁)	39,9% d. Tr. S	89,0% d. Fr. A	
Wachsfraction (Fr. B ₂)	4,9% d. Tr. S	11,0% d. Fr. A	
Freie Fettsäuren (Fr. C ₁)			62,6% d. Fr. B ₁
Unverseifbares (Fr. C ₂)			37,4% d. Fr. B ₁
<i>Physikalische Eigenschaften der Fraktion B₁</i>			
Dichte (bezogen auf Wasser + 4° C)		$d_{24} = 0,9081$	
Relative Viscosität gegenüber Wasser (24° C)		= 70,4	
Oberflächenspannung (24° C)		= 30,9 dyn/cm	
Refraktion		$n_D^{20} = 1,4708$	
Spezifische Drehung		= optisch inaktiv	
<i>Absorptionsspektren¹</i>			
UV-Bereich	Maxima: 230 (254) m μ		
	Minima: 219 (250) m μ		
Sichtb. Bereich	Maxima: (525, 580), 680, 750 m μ		
	Minima: (520, 575), 645, 705 m μ		
<i>Chemische Kennwerte der Fraktion B₁</i>			
Säurezahl		14,1	
Esterzahl		152,4	
Verseifungszahl		166,5	
Jodzahl		76,11	
Mittleres Äquivalentgewicht der Fettsäuren		337,0	
Mittleres Molekulargewicht der Fette (Triglyceride) ²		1010,0	

¹ Werte in Klammern bezeichnen unbedeutende Maxima und Minima.

² Unter der Annahme, daß praktisch alle Fettsäuren als Triglyceride vorliegen.
Fr. = Fraktion des Rohextrakts.

3. Gaschromatographische Untersuchung der Fettsäuremethylester

Aus den durch Verseifung gewonnenen freien Fettsäuren wurden zunächst mit 0,5 n methanolischer H₂SO₄ die Methylester (GLICK 1960, modifiziert) hergestellt.

Diese wurden in einem Argon-Gaschromatographen (Pye, Cambridge) analysiert. Die Probenmengen wurden dabei so variiert, daß einmal die Hauptkomponenten (Abb. 2) und einmal die Nebenkomponten (Abb. 3) des Fettsäuregemisches auf den gewonnenen Kurven die für die qualitative und quantitative Auswertung günstigsten Werte hatten.

Es wurden zwei Proben der Substanz B₁ völlig unabhängig voneinander verseift, verestert, im Gaschromatographen analysiert und quantitativ ausgewertet. Da die Werte beider Bestimmungen gut übereinstimmen, sind ihre Mittelwerte in Tab. 2 angegeben.

Es geht daraus hervor, daß nur drei Fettsäuren, nämlich Palmitin-, Octadecen- und Octadecadien-Säure zu etwa gleichen Anteilen fast drei

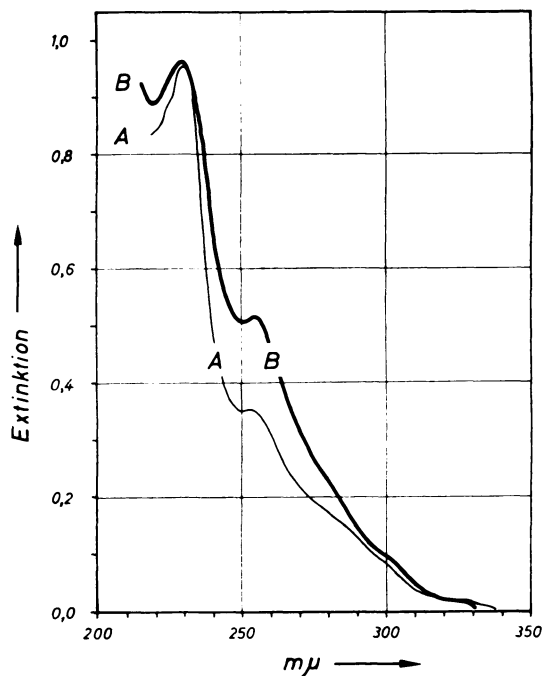


Abb. 1. Spektrale Absorptionskurven (UV). Kurve A 0,01% Lösung der Fraktion B₁ in n-Hexan; Kurve B 0,03% Lösung der Fettsäure-Methylester in Methylalkohol

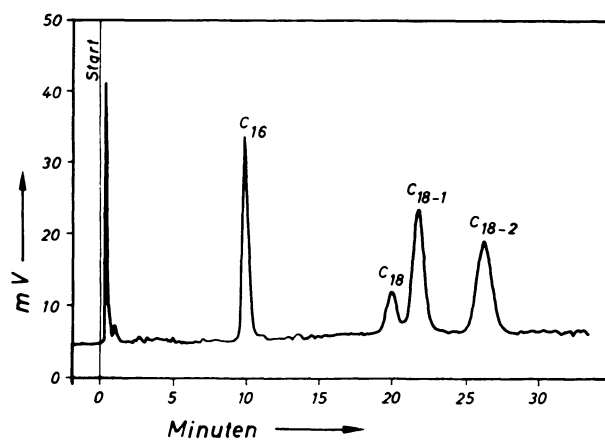


Abb. 2. Gaschromatogramm der Hauptkomponenten der Fettsäuremethylester. Pye-Gaschromatograph. Säule 122 cm lang, Durchmesser 0,4 cm, gefüllt mit Chromosorb W und 10% Polyäthylenglykoladipat (PEGA). Trägergas Argon, Druck 1,095 atü, Durchflußgeschwindigkeit 10 ml/10,2 sec, Verdampfertemperatur 265° C, Säulentemperatur 175° C. Zellspannung 1500 V, Meßbereich 10 x. Luftdruck 760,2 Torr. Probenmenge 0,1 μ l

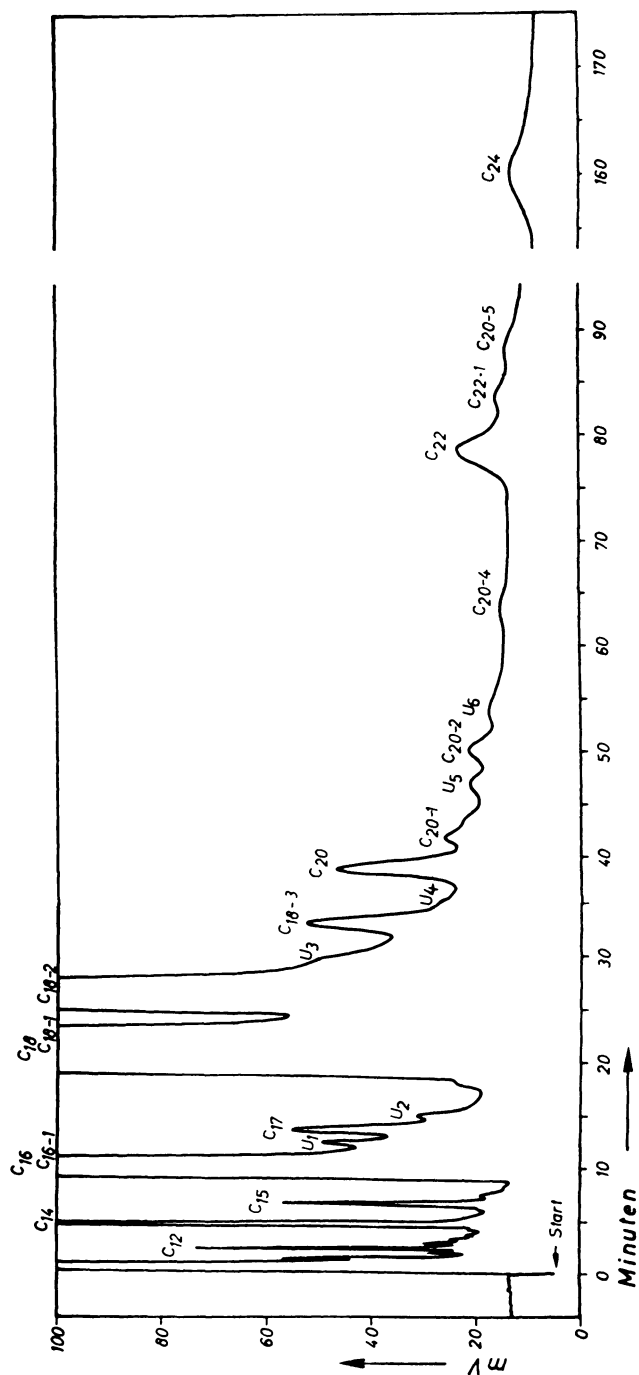


Abb. 3. Gaschromatogramm der Nebenkomponenten der Fettsäuremethylester. Gerät wie Abb. 2. Trägergas Argon, Druck 1,09 atü, Durchfließgeschwindigkeit 10 ml/10 sec. Verdampfer Temperatur 276° C, Säulentemperatur 175° C. Zellspannung 1500 V, Meßbereich 10 ×. Luftdruck 748,1 Torr. Probemenge 1,0 µl

Tabelle 2. Gaschromatographische Analyse der Fettsäure-Methylester

Fettsäuren		VR	VR ₁₆	Menge %	Haupt- Komp. (> 10%)	Neben- Komp. (1-10%)	Spuren (< 1%)	Menge %
Kettenlänge	Syst. Name							
Fettsäuren unter C ₁₂ nicht berücksichtigt								
C ₁₂ -C ₁₆	ohne einz. aufgef. Fettsäuren							
C ₁₂	Dodecansäure	Laurinsäure	1,59	0,27	0,4		0,4	
C ₁₄	Tetradecansäure	Myristinsäure	3,05	0,51	0,4		0,4	< C ₁₆ 2,4
C ₁₅	Pentadecansäure		4,28	0,72	0,4		0,8	
C ₁₆	Hexadecansäure	Palmitinsäure	5,94	1,00	24,0		0,4	
C ₁₆₋₁	Hexadecensäure		6,75	1,14	3,0	3,0		
U ₁			7,92	1,33	1,0	1,0		
C ₁₇	Heptadecansäure	Margarinsäure	8,61	1,41	1,0	1,0		C ₁₆ -C ₁₈ 91,4
U ₂			9,41	1,58	0,6		0,6	
C ₁₈	Octadecansäure	Stearinsäure	12,33	2,08	9,2	9,2		
C ₁₈₋₁	Octadecensäure		13,15	2,21	25,6			
C ₁₈₋₂	Octadecadiensäure		15,85	2,67	23,7			
U ₃			18,19	3,06	1,8	1,8		
C ₁₈₋₃	Octadecatriensäure		20,68	3,48	1,5	1,5		
U ₄			21,60	3,64	0,6		0,6	
C ₂₀	Eicosansäure	Arachinsäure	24,82	4,18	1,2	1,2		
C ₂₀₋₁	Eicosensäure		26,63	4,48	0,7		0,7	
U ₅			29,92	5,04	0,5		0,5	
C ₂₀₋₂	Eicosadiensäure		31,98	5,38	0,5		0,5	
U ₆			34,53	5,81	0,4		0,4	
C ₂₀₋₄	Eicosatetraensäure		39,60	6,67	0,3		0,3	
C ₂₂	Docosansäure	Behensäure	48,67	8,19	0,9		0,9	
C ₂₂₋₁	Docosensäure		51,81	8,72	0,4		0,4	
C ₂₀₋₅	Eicosapentaensäure		54,64	9,20	0,3		0,3	
C ₂₄	Tetracosansäure	Lignocerinensäure	99,01	16,67	0,8		0,8	
			100,0	100,0		18,7	8,0	100,0

1 % der Gesamtmenge; VR = korrigiertes Retentionsvolumen; VR₁₆ = korrigiertes Retentionsvolumen, bezogen auf r₁₆ (Palmitinsäure) = 1. Gerät: Pye-Gaschromatograph; Säulenfüllung: Chromosorb W mit 10% Polyäthylenglykolladpat (PEG-10); Trägergas Argon.

Viertel der Gesamtfettsäuren ausmachen. Fast 60% bestehen aus ungesättigten Fettsäuren. Diese nehmen mit zunehmendem Sättigungsgrad auch an Menge zu. Dreifach und höher ungesättigte Fettsäuren sind kaum vorhanden. Die unbekanntes Fettsäuren machen mit etwa 5% ebenfalls nur einen geringen Anteil der Gesamtmenge aus. Der Anteil der Fettsäuren mit 16–18 C-Atomen beträgt über 90%.

Das UV-Spektrum der Methylester (Abb. 1, Kurve B) in 0,03% Lösung in p.a. Methanol glich im wesentlichen dem der Fraktion B₁. Das Maximum bei 230 m μ deutet auf die Anwesenheit von Fettsäuren mit zwei konjugierten Doppelbindungen hin.

C. Diskussion der Ergebnisse

Die analytische Untersuchung der Fraktion B₁ des Ätherextraktes ergab bei den physikalischen Konstanten keine Besonderheiten. Es ist auch durchaus die Regel, daß gemischte Glyceride der natürlichen Fette in ihrer Gesamtheit optisch inaktiv sind, obwohl einzelne gemischtsäurige Glyceride durch ihr asymmetrisches C-Atom selbst optisch aktiv sein müssen (HOPPE 1960). Die Fraktion des Unverseifbaren, die nach der Definition von KAUFMANN (1937) die natürlichen unverseifbaren Stoffe (Sterine, Kohlenwasserstoffe, Fettalkohole usw.) sowie die bei 100° C nichtflüchtigen unverseifbaren organischen Stoffe (Mineralöle usw.) umfaßt, macht mit 37,4% einen verhältnismäßig hohen Anteil der Fraktion B₁ aus. Das kann jedoch teilweise durch die Extraktionsmethode bedingt sein.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse des Fettsäuregemisches bestätigen einen allgemein erhobenen Befund (FOSTER 1949; HILDITCH 1956; COCHRANE 1958), daß die C₁₆- und C₁₈-Säuren den Hauptteil der Gesamtfettsäuren ausmachen, daß die ungesättigten Säuren dabei überwiegen und Octadecensäure (wahrscheinlich Ölsäure) den höchsten Prozentsatz unter den Einzelfettsäuren ausmacht. Auch daß die Zahl und Menge der Fettsäuren mit weniger als 10 und mehr als 22 C-Atomen nur sehr gering ist, entspricht der allgemeinen Erfahrung. Aus der gaschromatographischen Analyse ist an sich nur die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der Fettsäuren zu ersehen, doch kann man bei Vergleich mit anderen Untersuchungsergebnissen wohl annehmen, daß die gefundenen ein- und zweifach ungesättigten C₁₈-Säuren im wesentlichen aus Öl- bzw. Linolsäure bestehen.

Aus den Gesetzmäßigkeiten über das Ansteigen des Retentionsvolumens bei zunehmender Kettenlänge der Fettsäuren (JAMES 1962) und der Tatsache, daß bei Vorhandensein einer größeren Menge einer Fettsäure meist auch die um 2 C-Atome kürzere und längere Fettsäure in dem Gemisch vorhanden ist, könnte man auch darauf schließen, daß unter den nicht durch Eichsubstanzen identifizierten Fettsäuren U₁ bis

U_6 die Fettsäuren U_1 , U_2 und U_3 einer C_{16} (zweifach-ungesättigten), einer C_{19} und C_{21} gesättigten Fettsäure entsprechen. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 4 die Verteilung der Fettsäuren nach Menge, Kettenlänge und Sättigungsgrad unter Einschluß dieser Annahme gezeigt. Ungeradzahlige Fettsäuren, die in den Lipiden der hier diskutierten Stämme

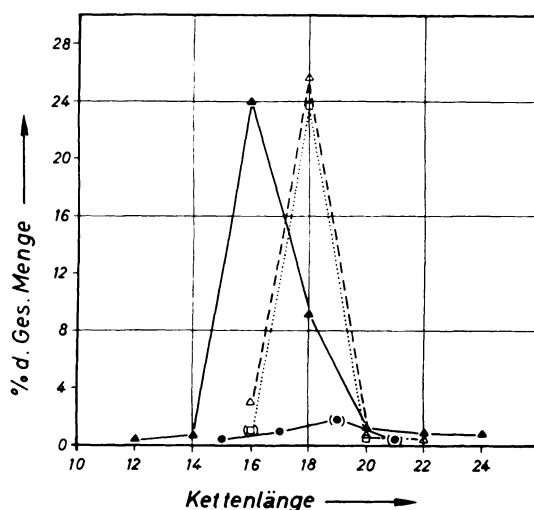


Abb. 4. Fettsäureverteilung nach Kettenlänge und Sättigungsgrad. \blacktriangle — \blacktriangle geradzahlig, gesättigt; \triangle — \triangle geradzahlig, 1× ungesättigt; \square ···· \square geradzahlig, 2× ungesättigt; \bullet — \bullet ungeradzahlig, gesättigt. Werte in (): Fettsäure nicht sicher identifiziert

nachgewiesen wurden, sind bisher nur in wenigen Fällen in Mikroorganismen aufgefunden worden. Nach O'LEARY (1962) wurden C_{15} - und C_{17} -Säuren in Bakterien (Gaschromatographie) gefunden, HUGHES (1963) fand eine C_{17} -Säure bei *Agaricus* (Gaschromatographie) und FOSTER (1949) gibt einige Autoren an, die C_{19} -Fettsäuren bei anderen Pilzen festgestellt haben. Der seltene Nachweis dieser ungeradzahligen Fettsäuren kann vor allem auch methodisch bedingt sein, da sie nur in geringen Mengen vorkommen und so leicht dem Nachweis entgehen, sofern nicht mit sehr empfindlichen Methoden wie Papier-, Dünnschicht- oder Gaschromatographie gearbeitet wurde.

Zusammenfassung

Die physikalischen und chemischen Kennzahlen und Daten des durch Ätherextraktion gewonnenen Rohlipids von *Beauveria tenella* wurden bestimmt und spektrale Absorptionskurven aufgenommen.

Die Methylester der Fettsäuren wurden gaschromatographisch analysiert. Die einzelnen Fettsäuren wurden identifiziert und ihr mengenmäßiger Anteil ermittelt.

Etwa 90% der Fettsäuren haben eine Kettenlänge von 16—18 Kohlenstoffatomen. Nahezu 60% der Fettsäuren sind ungesättigt; der prozentuale Anteil dieser Säuren nimmt mit steigender Zahl der Doppelbindungen ab.

Octadecensäure hatte mit 25,6% den größten Anteil an der Gesamtmenge.

An seltenen Fettsäuren konnte unter anderem eine gesättigte C₁₇- und C₂₄-Fettsäure nachgewiesen und das Vorkommen einer gesättigten C₁₉- und C₂₁-Fettsäure wahrscheinlich gemacht werden.

Summary

The physical and chemical constants and the spectral absorption curves of crude lipids of *Beauveria tenella*, obtained by means of ether-extraction, were determined.

The methyl esters of the fatty acids were analyzed using gas-liquid chromatography. The individual fatty acids were identified and the amount of each in the complete sample determined.

Approximately 90% of the fatty acids had a 16—18 carbon-chain length, while almost 60% of the fatty acids were unsaturated. The percentage of fatty acids with unsaturated bonds was reciprocally proportional to the number of double bonds present.

Octadecenoic acid comprised 25,6% of the total fatty acids and represented the largest single amount of a specific fatty acid present.

With respect to unusual fatty acids, a saturated C₁₇ and a C₂₄ fatty acid were identified, while the presence of a C₁₉ and a C₂₁ fatty acid was indicated.

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

Für die Möglichkeit zur Benutzung der Geräte und seinen Rat bei der Gaschromatographie der Fettsäuren danke ich Herrn Privatdozenten Dr. O. W. THIELE.

Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- COCHRANE, V.: Physiology of fungi. New York: J. Wiley Sons Inc. 1958.
 EUCKEN, A., u. R. SUHRMANN: Physikalisch-Chemische Praktikumsaufgaben. 4. Aufl. Leipzig: Akademie-Verlagsgesellschaft 1954.
 FOSTER, J. W.: Chemical activities of fungi. New York: Academic Press Inc. 1949.
 GLICK, D.: Methods of biochemical analysis. New York: Interscience Publishers Inc. 1960.
 HILDITCH, T. P.: The chemical constitution of natural fats. New York: J. Wiley Sons Inc. 1956
 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.
 HUGHES, D. H.: Preliminary characterisation of the lipid constituents of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci. V, 540—546 (1962).

- JAMES, A. T.: Qualitative and quantitative determination of the fatty acids by gas-liquid chromatography. In GLICK, D.: Methods of biochemical analysis, Vol. VIII, p. 1—61. New York: Interscience Publishers 1962.
- KAUFMANN, H. P.: Bericht über die 8. Versammlung der Internationalen Kommission zum Studium der Fettstoffe. Fette u. Seifen **44**, 480—482 (1937).
— In BAUER, H., u. H. MOLL: Die organische Analyse, 4. Aufl., S. 16. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest u. Portig KG. 1960.
- KÜSTER, F. W., A. THIEL u. K. FISCHBECK: Logarithmische Rechentafeln. Berlin: W. de Gruyter 1958.
- MATULA, J.: Allgemeine physikalische Methoden. In KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Band I, S. 324—341. Wien: Springer 1931.
- MOLITORIS, H. P.: Untersuchungen an *Beauveria tenella* (NRRL 2334, 2335, 2336; bisher *Agaricus campestris*). II. Wachstum, Stoffwechsel, Fettspeicherung und Enzymaktivitäten. Arch. Mikrobiol. **47**, 104—114 (1963 b).
- O'LEARY, W. M.: The fatty acids of bacteria. Bact. Rev. **26**, 421—447 (1962).
- WINKLER, L. W.: In BAUER, H., u. H. MOLL: Die organische Analyse. 4. Aufl. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest u. Portig KG. 1960.

Dr. H. P. MOLITORIS,
Institut für Mikrobiologie der Universität, 34 Göttingen, Göttingerstraße 16