

Über das Depotfett des insektenpathogenen Pilzes *Beauveria tenella*

O. W. THIELE und H. P. MOLITORIS

Physiologisch-Chemisches Institut und Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen

Eingegangen am 2. Februar 1967

On the Depot Fat of Beauveria tenella, a Fungus Pathogenic for Insects

Summary. The depot fat of *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem. was prepared. The unesterified fatty acids totalling up to app. $\frac{1}{5}$ of the total fat were separated and analyzed by gas-liquid chromatography. The depot fat freed from unesterified fatty acids was fractionated by column chromatography; the predominant fraction consists of triglycerides as was demonstrated by thin-layer chromatography. The position of the fatty acyl groups in the triglyceride molecules and the distribution of saturated and unsaturated fatty acyl groups on different triglyceride types were calculated from pancreatic lipase analysis results.

Zusammenfassung. Aus dem insektenpathogenen Pilz *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem. wurde ein phosphatidfreies Depotfett gewonnen. Die unveresterten Fettsäuren, die etwa $\frac{1}{5}$ des Depotfettes ausmachten, wurden abgetrennt und gaschromatographisch untersucht. Das restliche Lipid wurde säulenchromatographisch fraktioniert; die Hauptfraktion bestand aus Triglyceriden. Die Stellung der Fettsäuren im Triglyceridmolekül und die Verteilung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Triglycerid-Typen wurden bestimmt.

Der insektenpathogene Pilz *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem.¹ gehört den *Fungi imperfecti*, *Moniliales*, *Moniliaceae*, an (MOLITORIS, 1963 a). Die systematische Stellung, die Anzucht in Submerskultur, das Wachstum, der Stoffwechsel und das Fettspeichervermögen des Pilzes (44,8% des gefriergetrockneten Mycels) wurden bereits ausführlich beschrieben (MOLITORIS, 1963 b), ebenfalls eine erste Analyse des Depotfettes (MOLITORIS, 1963 c). Über eine weitergehende Untersuchung des Depotfettes, das mit Äther extrahiert und bereits in einen flüssigen (ölgigen) und einen festen (wachsartigen) Anteil getrennt worden war, wird im folgenden berichtet; der feste Anteil machte 11,0% des gesamten Depotfettes aus.

Da das Lipid noch Phosphatidreste enthielt (Tab.1), wurde eine Trennung mit Aceton durchgeführt. Das gereinigte Lipid wies die in Tab.1 aufgeführten Kennzahlen auf. Die freien Fettsäuren wurden mit

¹ Der hier untersuchte Stamm wurde bisher fälschlicherweise unter der Nummer NRRL 2334 als *Agaricus campestris* geführt.

wäßriger Sodalösung ausgeschüttelt und gaschromatographisch untersucht (Tab.2); die freien Fettsäuren der öligen Fraktion bestanden vornehmlich aus ungesättigten, die der festen Fraktion vornehmlich aus gesättigten Fettsäuren. Auffallend ist die Abwesenheit von Palmitoleinsäure.

Tabelle 1. Kennzahlen des Fettes aus *Beauveria tenella*

| | Ölige Fraktion | Feste Fraktion |
|--|----------------|----------------|
| <i>Vor Acetonfällung</i> | | |
| Phosphor (nach TEORELL, 1931) | 0,17% | 0,25% |
| <i>Nach Acetonfällung</i> | | |
| Phosphor (nach TEORELL, 1931) | 0,02% | 0,02% |
| Säurezahl (mg KOH/g) | 42,0 | 51,8 |
| Verseifungszahl (mg KOH/g) | | |
| (nach KOETTSTORFER, 1879) | 196,1 | 224,0 |
| Sterine (als Cholesterin) (nach ZAK et al., 1954) | 5,4% | 8,5% |
| Mit Digitonin fällbare Sterine (als Cholesterin) (nach ZAK et al., 1954) | 2,4% | 3,4% |

Die von den unveresterten Fettsäuren befreiten Neutrallipide wurden in maßstäblicher Anpassung an die vorhandenen Mengen säulenchromatographisch getrennt (HIRSCH u. AHRENS, 1958; ZÖLLNER u. KIRSCH, 1960) (Abbildung). Die Hauptfraktion (Fraktion III) erwies sich dünn-schichtchromatographisch als reines Triglyceridgemisch. Auf Grund der Gewichte der säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen bestanden die von unveresterten Fettsäuren befreiten Neutrallipide zu 67,9% (bei der öligen Fraktion) bzw. zu 51,2% (bei der festen Fraktion) aus Triglyceriden. Die Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride wurde gaschromatographisch ermittelt und die Stellung der Fettsäuren im Triglyceridmolekül durch gaschromatographische Untersuchung der Spaltprodukte nach selektiver Abspaltung der 1,3-Acyreste mit Hilfe von Pankreas-Lipase bestimmt (LUDDY et al., 1964). Die Untersuchungen wurden an der öligen und festen Fraktion getrennt durchgeführt; die Ergebnisse wurden aber zwecks besserer Übersicht auf Gesamt-Triglyceride umgerechnet. Wie Tab.3 zeigt, sind die ungesättigten Fettsäuren vornehmlich (48,3% statt 33,3% bei einer Gleichverteilung) in 2-Stellung der Triglyceride anzutreffen. Dies entspricht den Erfahrungen, die man mit den Triglyceriden der meisten bisher darauf untersuchten höheren Organismen (Pflanzen und Tieren) gemacht hat (BARFORD et al., 1965; JURRIENS et al., 1964; COLEMAN u. FULTON, 1961).

Errechnet man nun die Verteilung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die vier hauptsächlichen Glycerid-Typen (S_3 , S_2U , SU_2 ,

Tabelle 2. Zusammensetzung der Fraktion der unversäerten Fettsäuren (in Gew.-% der Gesamtfettsäuremethylester) aus *Beauveria tenella*

| Gesättigte Fettsäuren | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|------|
| | C ₁₂ -C ₁₄ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₇ | C ₁₈ | C ₂₀ | C ₂₂ | C ₂₄ | unbekannt | Σ |
| Ölige Fraktion | 1,2 | 1,2 | 21,2 | — | 6,7 | 1,1 | 0,6 | — | — | 32,0 |
| Feste Fraktion | 4,9 | 3,9 | 39,8 | 4,2 | 3,4 | 11,7 | 11,4 | 8,7 | 0,1 | 88,1 |
| Ungesättigte Fettsäuren | | | | | | | | | | |
| | C _{18:1} | | C _{18:2} | | unbekannt | | Σ | | | |
| Ölige Fraktion | 2,2 | 22,8 | 27,5 | — | — | — | — | — | — | 68,0 |
| Feste Fraktion | — | 4,3 | 5,8 | — | — | — | — | — | — | 11,9 |

 Tabelle 3. Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride von *Beauveria tenella*

| Fettsäuren (Mol.-%) | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|------|------|
| | C ₁₂ * | C ₁₆ ** | C ₁₈ *** | C ₂₄ | C _{16:1} | C _{18:1} | C _{18:2} | S | U | |
| Triglyceride | (a) | 0,4 | 31,3 | 9,3 | 0,1 | 1,7 | 31,7 | 25,5 | 41,1 | 58,9 |
| 2 Monoglyceride nach Lipase- | (b) | 0,4 | 11,4 | 2,5 | 0,3 | 2,8 | 47,3 | 35,3 | 14,6 | 85,4 |
| einwirkung | (c)**** | 33,3 | 12,1 | 9,0 | 100 | 54,9 | 49,7 | 46,2 | 11,8 | 48,3 |
| in 2-Stellung (in Prozent jeder Fettsäure) | | | | | | | | | | |

S = gesättigte Fettsäurereste; U = ungesättigte Fettsäurereste.

* Mit Spuren von C₁₂. — ** Mit Spuren von C₁₅. — *** Mit Spuren von C₁₇ und C₁₉. — **** Errechnet nach $c = 100 \cdot b/3 \cdot a$.

Tabelle 4. Glyceridverteilung des Fettes von *Beauveria tenella*

| | Glycerid-Typ (Mol.-%) | | | | Isomere Formen (Mol.-%) | | | |
|---|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|-------------------------|------|------|------|
| | S ₃ | S ₂ U | SU ₂ | U ₃ | SUS | SSU | USU | UUS |
| A | 4,3 | 32,5 | 45,4 | 17,8 | 25,2 | 7,2 | 3,0 | 42,4 |
| B | 6,9 | 29,9 | 42,8 | 20,4 | 10,0 | 19,9 | 14,3 | 28,5 |

A = errechnet auf Grund der Bestimmung in Triglyceriden und 2-Monoglyceriden (a und b in Tab.3) („1,3 random, 2 random pattern“) nach VANDER WAL (1963).

B = errechnet auf Grund der Bestimmung in Triglyceriden (a in Tab.3) („random distribution“).

S = gesättigte Fettsäurereste.

U = ungesättigte Fettsäurereste.

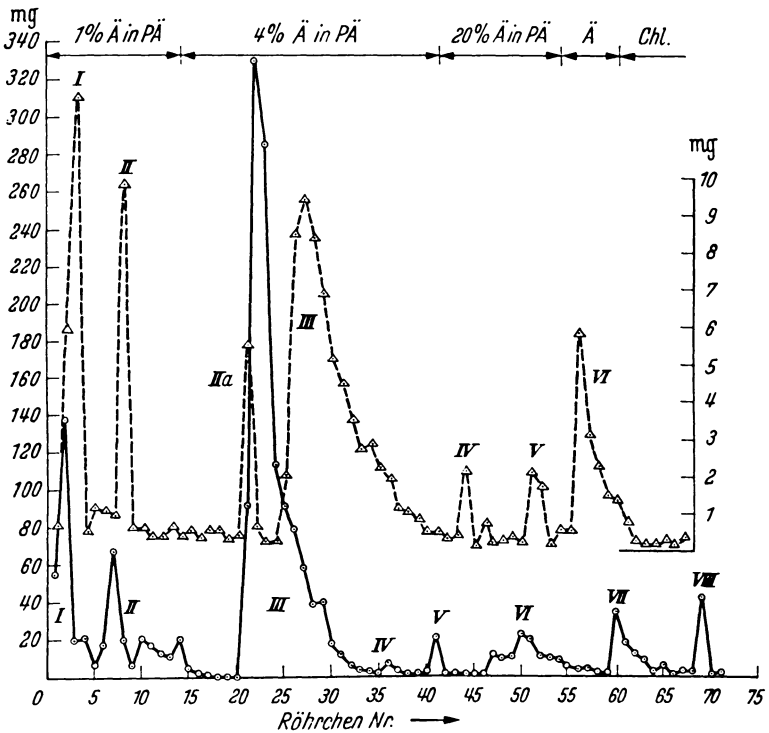


Abb.1. Säulenchromatographische Trennung des von unveresterten Fettsäuren befreiten Depotfettes aus *Beauveria tenella*. ●—● ölige Fraktion, Einwäge 1,9610 g, Fraktionen zu 100 ml. Δ—Δ feste Fraktion, Einwäge 0,1829 g, Fraktionen zu 9,4 ml. Elutionsmittel: 1 Vol.-% Äther in Petroläther, 4 Vol.-% Äther in Petroläther, 20 Vol.-% Äther in Petroläther, Äther, Chloroform. Die für den Wechsel des Elutionsmittels angegebenen Punkte gelten für die feste Fraktion

U₃), so erhält man eine annähernd zufällige Verteilung (Tab.4); denn die Werte für die Zufallsverteilung („random distribution“), die aus dem Fettsäuregehalt der Triglyceride erhalten wurden, decken sich annähernd mit denjenigen, die für die Zufallsverteilung unter Berücksichtigung der in 2-Stellung gefundenen Fettsäuren („1,3 random, 2 random pattern“) errechnet wurden. Berücksichtigt man jedoch die isomeren Formen von S₂U und SU₂, so findet man, daß ein größerer Anteil von symmetrischen S₂U-Glyceriden und von unsymmetrischen SU₂-Glyceriden vorliegt, als dem Zufall entspricht (Tab.4). Auch dieser Befund, in dem sich die bevorzugte 2-Stellung ungesättigter Fettsäuren äußert, entspricht den bei den meisten Triglyceriden höherer Organismen (von bemerkenswerten Ausnahmen abgesehen) erhobenen Befunden (BARFORD et al., 1965; JURRIENS et al., 1964; COLEMAN u. FULTON, 1961; PERKINS, 1964). Für die Auswahl bestimmter Fettsäuren zur Acylierung bei der Biosynthese der Triglyceride ist daher für *Beauveria tenella* ein gleicher Mechanismus anzunehmen wie für die meisten höheren Organismen.

Die übrigen durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen konnten wegen ihrer geringen Menge nicht identifiziert werden. Einige von ihnen wurden durch Spektren, chemische Analysen und ihr dünnschichtchromatographisches Verhalten charakterisiert. So ergab sich Fraktion I (siehe Abbildung) als Kohlenwasserstoff (85,96% C, 13,84% H) zu erkennen. Fraktion II ist wahrscheinlich ein Sterinester, der die Gruppierung eines α,β -ungesättigten Ketons enthält (Absorptionsmaximum bei 320 m μ , Vorbande bei 270 m μ , $\alpha = 80,9$ bzw. 7,20 cm \cdot l/g). In Fraktion VI befinden sich mehrere Liebermann-Burchard-positive Sterine, die dünnschichtchromatographisch unterscheidbar sind. Fraktion VII ist ein dünnschichtchromatographisch einheitlich erscheinendes Liebermann-Burchard-positives Sterin, das im IR-Spektrum eine Ketongruppe erkennen läßt, im UV-Bereich aber nicht absorbiert.

Für technische Hilfe danken wir Fräulein G. THIELE. Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen in dankenswerter Weise unterstützt.

Literatur

- BARFORD, R. A., F. E. LUDDY, S. E. HERB, P. MAGIDMAN, and R. W. RIEMENSCHNEIDER: Glyceride distribution in adipose and liver glycerides of animals. J. Amer. Oil chem. Soc. **42**, 446–448 (1965).
- COLEMAN, M. H., and W. C. FULTON: Enzymes of lipid metabolism, p. 127–137. Oxford: Pergamon Press 1961.
- HIRSCH, J., and E. H. AHRENS: The separation of complex lipide mixtures by the use of silic acid chromatography. J. biol. Chem. **233**, 311–320 (1958).
- JURRIENS, G., B. DE VRIES, and L. SCHOUTEN: Quantitative semimicro analysis of triglyceride fatty acid distribution in a Congo palm oil. J. Lipid Res. **5**, 366–368 (1964).
- KOETTSTORFER, J.: Neue Methode zur Untersuchung der Butter auf fremde Fette. Z. analyt. Chem. **18**, 199–207 (1879).

- LUDDY, F. E., R. A. BARFORD, S. F. HERB, P. MAGIDMAN, and R. W. RIEMENSCHNEIDER: Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Amer. Oil chem. Soc.* **41**, 693—696 (1964).
- MOLITORIS, H. P.: Untersuchungen an *Beauveria tenella*, I. (Systematik). *Arch. Mikrobiol.* **47**, 57—71 (1963a).
- Untersuchungen an *Beauveria tenella*, II. (Wachstum, Stoffwechsel, Fettspeicherung und Enzymaktivitäten). *Arch. Mikrobiol.* **47**, 72—103 (1963b).
- Untersuchungen an *Beauveria tenella*, III. (Analyse des Speicherfettes). *Arch. Mikrobiol.* **47**, 104—114 (1963c).
- PERKINS, E. G.: The effect of dietary fat on the glyceride structure of rat carcass fat. *J. Amer. Oil chem. Soc.* **41**, 285—289 (1964).
- TEORELL, T.: Spektrophotometrische Mikrobestimmung des Phosphors. *Biochem. Z.* **23**, 1—9 (1931).
- VANDER WAL, R. J.: The determination of glyceride structure. *J. Amer. Oil chem. Soc.* **40**, 242—247 (1963).
- ZAK, B., R. C. DICKENMAN, E. C. WHITE, H. BURNETT, and P. J. CHERNEY: Rapid estimation of free and total cholesterol. *Amer. J. clin. Path.* **24**, 1307—1315 (1954).
- ZÖLLNER, N., u. K. KIRSCH: Die säulenchromatographische Trennung der Plasma-lipoide, I. (Methodik und Identifizierung der Fraktionen). *Z. ges. exp. Med.* **134**, 10—28 (1960).

Prof. Dr. O. W. THIELE
Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität
34 Göttingen, Humboldtallee 7

Dr. H. P. MOLITORIS
Institut für Allgemeine Botanik
der Universität
463 Bochum-Querenburg, Im Lottental