

## FETTSÄUREMUSTER IM PFLANZLICHEN ACYL-STERINGLYCOSID

W. EICHENBERGER und E.C. GROB

*Institut für organische Chemie der Universität Bern, CH-3012 Bern  
Länggassstrasse 7, Schweiz*

Received 11 November 1971

Fatty acids of acyl steryl glycoside (acyl SG) of different plants producing both green and photosynthetically inactive tissue have been analyzed. The major components are in all cases 16:0, 18:2 and 18:3 acids. The fatty acid composition of acyl SG of green parts is very similar to that of etiolated, pale or storage tissue of the same plant. Generally the degree of saturation of acyl SG is higher than that of the corresponding total lipid. Acyl SG tends to be more saturated in green parts than in colorless tissues of the same plant. Conversely, total lipid of green tissue containing large amounts of galactolipids and 18:3 acid is much less saturated than that of photosynthetically inactive tissue. Though containing smaller amounts of 18:3, and in some cases unsaturated C<sub>16</sub> acids, acyl SG does not reflect the drastic increase of these acids in the total lipid of green tissue. It is concluded that fatty acids of acyl SG originate mainly from an acyl donor other than chloroplast galactolipids.

### 1. Einleitung

Das Acyl-Steringlycosid (Acyl-SG) der Pflanzen wird durch Acylierung von Steringlycosid (SG) gebildet [1, 2]. Strukturgebundene Enzymsysteme mit Acyltransferase-Aktivität wurden in Blättern [3] gefunden, während ein entsprechendes lösliches Enzym aus Karotten erhalten wurde [2]. Wie Inkubationsversuche mit dieser lipidfreien, löslichen Proteinfraction gezeigt haben, können *in vitro* Phospholipide und Galactolipide als Acyldonoren dienen. Woher die Acylreste *in vivo* stammen, ist noch nicht geklärt, doch könnte die Kenntnis dieses Acyldonors zum Verständnis der Biosynthese der Steringlycoside und der daran beteiligten Zellstrukturen wesentlich beitragen.

Wir haben untersucht, ob Galactolipide auch *in vivo* als Acyldonoren in Betracht kommen. Diese Lipide sind in der grünen Pflanze in den Chloroplasten, die Steringlycoside dagegen in extraplastischen partikulären Strukturen konzentriert [13]. Eine Übertragung der Acylgruppen aus Galactolipiden auf SG käme somit einem Austausch von Lipidbestandteilen zwischen verschiedenen Zellorganellen gleich. Ähnliche Vorgänge wurden

zwischen Mitochondrien und Mikrosomen beobachtet [14]. Unsere Versuche gehen von der Überlegung aus, dass eine Acylierung von SG durch Fettsäuren aus den Galactolipiden der Chloroplasten im Fettsäuremuster des gebildeten Acyl-SG zum Ausdruck kommen müsste. Galactolipide enthalten nämlich vor allem 18:3-Säure [15], die wie die Galactolipide selber, in nichtgrünem Gewebe in viel geringerer Menge vorkommen. Das Fettsäuremuster im Acyl-SG müsste, falls die Fettsäuren aus den Chloroplasten stammen, demnach deutlich verschieden sein, je nachdem ob dieses in grünem (chloroplastenhaltigem) oder nichtgrünem Gewebe gebildet wurde. Wir haben für unsere Versuche daher verschiedene Pflanzen ausgewählt, die neben grünen auch nichtgrüne Organe oder Abschnitte verschiedener morphologischer Zuordnung besitzen. *Hosta undulata* (Otto und Dietr.) Bailey (Liliaceen), eine panaschierte Zierpflanze, bildet weisse Blattbezirke infolge eines genetischen Defekts. Bei *Hordeum vulgare* L. (Gramineen) wurde die Ausbildung der Chloroplasten durch äussere Faktoren (Dunkelheit) unterdrückt. *Allium porrum* L. (Liliaceen) bildet fast farblose Blattscheiden. Ferner wurden zwei Pflanzen (beides Umbelliferen) mit Speicher-

Tabelle 1  
Gehalt an E-Lipid, Chlorophyll und Acyl-SG.

	<i>H. undulata</i>		<i>H. vulgare</i>		<i>D. carota</i>		<i>A. graveolens</i>		<i>A. porrum</i>	
	grün	weiss	grün	etiolo.	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	grün	weiss
E-Lipid (% Frischgew.)	1.80	0.55	0.84	0.33	—	—	—	—	—	—
Chlorophyll (% E-Lipid)	15.7	0.27	9.4	0.075	—	—	—	—	23.8	0.97
Acyl-SG (% E-Lipid)	1.04	2.1	0.1	0.29	1.8	0.49	0.43	0.38	1.56	2.53

organ untersucht. Bei *Apium graveolens* L. wird dieses morphologisch mehrheitlich dem Spross, bei *Daucus carota* L. der Wurzel zugeordnet. Solche vergleichende Untersuchungen sind übrigens auch daher aufschlussreich, weil von den wenigen Angaben über Fettsäuremuster in Acyl-SG die meisten sich auf Speicherorgane beziehen [4–8].

## 2. Material und Methoden

Lauch (*Allium porrum*), Karotten (*Daucus carota*) und Sellerie (*Apium graveolens*) wurden vom Markt bezogen. *Hosta undulata* (Otto und Dietr.) Bailey stammte aus dem hiesigen Botanischen Garten. Gerste (*Hordeum vulgare*) Sorte "Nympe", wurde auf Teralit 10 Tage unter Kunstlicht oder in Dunkelheit angezogen. Blattmaterial wurde in einer Walzenmühle, Speicherorgane in einem Bühler-Homogenisator zerkleinert und sofort mit Methanol und Aether erschöpfend extrahiert. Die aetherlöslichen Anteile (E-Lipid) wurden anschliessend auf der 10-fachen Menge Kieselsäure Mallinckrodt (100 mesh) fraktioniert. Zur Elution wurden je 100 ml Petroläther-Aether 10:1 (v/v), 1:1, 3:7 und Chloroform verwendet. Das erhaltene noch unreine Acyl-SG wurde auf DC-Platten (Kieselgel G, 0.3 mm Schichtdicke) mit Aether (wassergesättigt) – Isopropanol – Wasser 100:4.5:3 [9] oder mit Chloroform–Methanol 6:1 nachgereinigt. Das reine Produkt ergab im gleichen Laufmittel durch Sprühen mit  $\text{HClO}_4$  bei  $100^\circ$  einen einheitlichen Fleck. Die Umesterung der Fettsäuren zu Methylestern mit Methanol/HCl erfolgte wie früher beschrieben [10]. Unter diesen Bedingungen

wird teilweise auch die Glycosidbindung gespalten und dadurch Sterin freigesetzt. Zur Abtrennung dieser Sterine wurden die Fettsäuremethylester auf Kieselgel G-Platten mit Petroläther-Aether 100:5 (v/v) chromatographiert. Bei *A. porrum* zum Beispiel ergab die Berechnung, dass aus 1 Mol Acyl-SG 0.95 Mol Fettsäure freigesetzt werden konnte, was dem theoretischen Wert von 1.0 sehr nahe kommt. Die Trennung der Fettsäuremethylester erfolgte auf einem Gaschromatographen Perkin-Elmer 990 mit FID (Kolonnenlänge 6 ft., Durchmesser 1/8 in., 5% DEGS auf Chromosorb W 80–100 mesh, Strömungsgeschwindigkeit 12 ml  $\text{N}_2$ /min,  $145^\circ$ ). Die Identifizierung der Komponenten erfolgte durch Vergleich der Retentionsdaten mit denen von Standardgemischen. Die ungesättigten Säuren wurden zudem durch Silbernitratchromatographie [11] und Bildung von Quecksilber-acetat-Addukten [12] charakterisiert. Die quantitativen Auswertungen erfolgten aufgrund experimentell bestimmter individueller Korrekturfaktoren.

## 3. Resultate und Diskussion

In Tabelle 1 ist der Gehalt an Acyl-SG und, soweit bestimmt, an E-Lipid und Chlorophyll in verschiedenen Pflanzen und Organen aufgeführt. Die Anteile des Acyl-SG im E-Lipid liegen durchwegs im Bereich der früher gefundenen Werte [13].

Die Fettsäurezusammensetzung im Acyl-SG und E-Lipid ist in Tabelle 2 enthalten. Wie zu erwarten ist das Fettsäuremuster im E-Lipid grüner Organe gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an 18:3-

Tabelle 2  
Fettsäurezusammensetzung\* im Acyl-SG und E-Lipid grüner und nichtassimilierender Pflanzenorgane.

	<i>H. undulata</i>						<i>H. vulgare</i>						<i>A. porrum</i>						<i>A. graveolens</i>						<i>D. carota</i>					
	grün			weiss			grün	etioliert	grün	weiss	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe	Blätter	Rübe
	A	L	t	A	L	t	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L
12:0	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	t	t	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-
16:0	53.3	15.1	51.0	72.0	17.5	50.5	34.1	69.3	24.6	69.0	27.4	35.2	16.8	42.3	24.3	16.9	16.3	24.1	20.7											
16:1 tr	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-	-	2.8	-	-											
16:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	t	-	-											
16:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.2	19.0	-	-	1.4	15.6	-											
18:0	6.3	t	4.3	2.8	1.3	t	1.0	t	1.1	t	t	2.6	t	1.8	1.0	t	-	t	1.5											
18:1	3.0	t	4.3	4.6	t	t	2.5	4.5	-	-	2.0	4.9	1.2	t	2.3	2.0	2.5	1.0	6.3											
18:2	24.2	20.1	32.0	41.6	12.1	9.9	25.0	30.8	21.6	24.0	25.4	55.4	48.3	18.8	51.7	65.8	58.3	19.2	66.3											
18:3	13.1	61.0	8.0	32.0	13.7	69.9	20.5	30.0	7.9	51.0	3.1	11.9	8.1	42.3	1.4	6.3	19.6	44.5	4.0	4.7										
20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-											

% ge-

sättigt 59.6 17.5 55.3 21.7 73.3 18.2 51.5 34.9 70.4 24.6 69.0 27.4 38.3 17.2 44.9 25.9 16.9 16.3 24.1 22.2

\* in Gewichtsprozent der Gesamtfettsäuren.

A: Acyl-SG;

L: E-Lipid;

t: weniger als 1%.

Säure. In einzelnen Fällen enthält das E-Lipid grüner Organe ausserdem noch ungesättigte C<sub>16</sub>-Säuren (16:3, 16:2 und 16:1 trans). Da die 18:3-Säure vorwiegend, wenn auch nicht ausschliesslich, aus den Chloroplastenlipiden stammt, tritt sie in den nicht-assimilierenden Organen derselben Pflanze weit weniger stark in Erscheinung. Die ungesättigten C<sub>16</sub>-Säuren fehlen in den Lipiden nichtgrüner Organe sogar vollständig. Die Fettsäurezusammensetzung des E-Lipids ändert sich somit drastisch, je nachdem ob im betreffenden Gewebe Chloroplasten zugegen sind oder nicht. Das Fettsäuremuster des Acyl-SG verhält sich grundsätzlich anders. Innerhalb derselben Pflanze ist nämlich die Fettsäurezusammensetzung im Acyl-SG grüner und nichtgrüner Organe sehr ähnlich und damit weitgehend unabhängig von der Zusammensetzung des E-Lipids. Dies zeigt sich auch darin, dass der Sättigungsgrad der Fettsäuren im Acyl-SG generell höher ist als der des E-Lipids. In drei Fällen ist dieser Wert in grünen Organen zudem höher als in nichtgrünen, während das E-Lipid grüner Organe durchwegs weniger gesättigt ist als das nichtgrüner Organe. Diese Resultate zeigen, dass die typischen Chloroplastenfettsäuren im Acyl-SG, gemessen an deren Menge im E-Lipid, deutlich untervertreten sind. Wir ziehen daraus den Schluss, dass bei der Acylierung von SG *in vivo* die Glycolipide der Chloroplasten als Acyldonoren nur eine untergeordnete Rolle spielen, und dass die zur Synthese des Acyl-SG nötigen Fettsäurereste zur Hauptsache aus Donoren ausserhalb der Plastiden stammen. Die Tatsache, dass das Acyl-SG auch 18:3-Säure enthält, steht damit nicht in Widerspruch, da diese Säure nicht ausschliesslich auf Plastiden beschränkt ist [15]. Hingegen bleibt durch weitere Untersuchungen abzuklären, welchen Ursprungs die im Acyl-SG von *A. graveolens* und *D. carota* vorkommenden ungesättigten C<sub>16</sub>-Säuren sind. Der Vergleich

der verschiedenen untersuchten Pflanzenarten zeigt ausserdem, dass im Acyl-SG stets 16:0, 18:2 und 18:3 die vorherrschenden Säuren sind. Das Mengenverhältnis und vor allem der Sättigungsgrad, der zwischen 17% in Karotten und 73% in grünen Gerstenblättern schwankt, scheinen sich in kein einheitliches Schema einzufügen. In Kartoffeln wurde sogar ein noch höherer Wert gefunden [7]. Zwischen den mehrheitlich gesättigten und den überwiegend ungesättigten Mustern dürften somit beliebige Uebergänge existieren.

### Danksagung

Die Arbeiten wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

### Literatur

- [1] W. Eichenberger und E.C. Grob, *Chimia* 23 (1969) 368.
- [2] W. Eichenberger und E.C. Grob, *Chimia* 24 (1970) 394.
- [3] W. Eichenberger und E.C. Grob, *Chimia* 22 (1968) 46.
- [4] T. Kiribuchi, T. Mizunaga und S. Funahashi, *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966) 770.
- [5] T. Galliard, *Phytochemistry* 7 (1968) 1907.
- [6] T. Galliard, *Phytochemistry* 7 (1968) 1915.
- [7] M. Lepage, *Lipids* 3 (1968) 477.
- [8] A.C. Thompson, R.D. Henson, R.C. Gueldner und P.A. Hedin, *Lipids* 5 (1970) 283.
- [9] E. Heinz, *Biochim. Biophys. Acta* 144 (1967) 321.
- [10] E.C. Grob und W. Eichenberger, *FEBS Letters* 5 (1969) 335.
- [11] L.J. Morris, *J. Lipid Res.* 7 (1966) 717.
- [12] A. Radunz, Dissertation Köln 1964.
- [13] W. Eichenberger und E.C. Grob, *FEBS Letters* 11 (1970) 177.
- [14] A. BenAbdelkader und P. Mazliak, *European J. Biochem.* 15 (1970) 250.
- [15] A.T. James und B.W. Nichols, *Nature* 210 (1966) 372.