

Über die Bildung von Cholesterin durch *Botrytis cinerea* nach Lanosterinzugabe

The Production of Cholesterol by *Botrytis cinerea* after Addition of Lanosterol

Peter Flesch * und Lutz Robbel **

Institut für Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität, Joh. Joachim Becher-Weg 30, D-6500 Mainz

Z. Naturforsch. **35 c**, 88–92 (1980); eingegangen am 16. August/11. Oktober 1979

Mycosterols, Lanosterol, Cholesterol, *Botrytis cinerea*

The fungus *Botrytis cinerea*, which is found on the grapes, is able to produce cholesterol after addition of lanosterol to the culture medium. The identification of cholesterol is carried out with different analytical methods including mass spectrometry. Under the same conditions ergosterol arises from squalene and not cholesterol.

Einleitung

Der auf der Traubenbeere vorkommende Pilz *Botrytis cinerea* bildet hefetoxische Stoffwechselprodukte, die nach unseren Untersuchungen wahrscheinlich Steroidcharakter haben. Im Verlaufe der Arbeiten wurde die Beobachtung gemacht, daß unter submersen Züchtungsbedingungen in der Nährlösung von *Botrytis cinerea* deutliche Mengen Cholesterin nachzuweisen sind, wenn der Kultur Lanosterin zugesetzt worden ist. Ohne Zusatz von Lanosterin ist Cholesterin entweder nicht oder nur spurenweise aufzufinden.

Während Lanosterin und die tetracyclischen Triterpene wie Eburicosäure und Polyporensäure als Derivate des Lanosterins bei Pilzen häufig anzutreffen sind [1, 2], ist der Nachweis von Cholesterin bisher auf einige wenige Fälle beschränkt geblieben.

Chen und Haskins [3] berichten wohl als erste, daß Cholesterin von *Penicillium funiculosum* gebildet werden kann. Dann finden McCorkindale *et al.* [4] Cholesterin in Pilzen der Ordnungen Saprolegniales und Leptomitales sowie Mucorales, und von Bu'Lock und Osagie [5] wird bei *Saprolegnia ferax* die *in vivo*-Umwandlung von Cycloartenol und Lanosterin in Cholesterin und andere Sterine untersucht. Dagegen wurde bei Fungi imperfecti, zu

denen *Botrytis cinerea* gehört, noch kein Cholesterin aufgefunden.

Daß Ergosterin unter normalen Kultivierungsbedingungen im Mycel und in der Nährlösung von *Botrytis cinerea* nachgewiesen werden konnte, ist nicht überraschend, denn dieses Sterin wird häufig bei Pilzen angetroffen. Bemerkenswert ist allerdings unsere Feststellung, daß Squalen, als Vorstufe eingesetzt, die Biosynthese von Ergosterin eindeutig fördert. Lanosterin und Cholesterin sind dann nicht nachweisbar. Schon Schwenk und Alexander [6] stellten bei Verwendung von zellfreiem Hefeautolysat fest, daß Squalen wie auch Acetat und Lanosterin in Ergosterin umgewandelt werden.

Material und Methoden

Microorganismus: *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.), isoliert von einer Traubenbeere*. Der Pilz gehört zu der Klasse der Ascomyceten und stellt die Konidienform (Nebenfruchtform) von *Sclerotinia fructigena* dar.

Kulturmedien: a) Traubensaft-Nährlösung, pH 3,4: Zur Herstellung wird Traubensaft mit Wasser 1:1 verdünnt. b) Czapek-Dox-Nährlösung nach Raper und Fernell [7], pH 4,4: 20 g/l Glucose, 5 g/l NaNO₃, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl, 0,5 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 0,01 g/l FeSO₄ · 7H₂O. c) Malzextrakt-Agar (Difco), pH 5,6. Alle Medien wurden bei 121 °C 20 min lang autoklaviert. Bei Verwendung von Glucose wurde diese getrennt sterilisiert.

* Herrn Professor Dr. Dietrich Jerchel zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Teil der Dissertation L. Robbel, Mainz 1979.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. P. Flesch.
0341-0382/80/0100-0088 \$ 01.00/0

* Für die Überlassung der Pilzkultur sei der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau in Geisenheim/Rhein bestens gedankt.



Stammhaltung: Die Stammhaltung des Pilzes erfolgte auf Traubensaft-Nährlösung oder auf Malz-extrakt-Agar bei 4 °C im Kühlschrank.

Fermenter: Es stand das Gerät Biostat S der Fa. Braun, Melsungen, für die batch-Versuche zur Verfügung.

Die Dauer der Fermenterversuche betrug durchschnittlich 10 Tage, die optimale Züchtungstemperatur 26 °C. Um Schaumbildung zu vermeiden, wurde allen Versuchsansätzen Desmophen zugegeben (1 ml/l Nährlösung).

Chemikalien: Lanosterin und Ergosterin (Fa. Roth, Karlsruhe), Cholesterin (Fa. Merck, Darmstadt), Squalen (Fa. Schuchardt, Hohenbrunn), Desmophen 3600 (Fa. Bayer, Leverkusen).

Gewinnung der Steroidrohextrakte

a) Nährlösungsextrakt: Die vom Mycel befreite Nährlösung wurde auf pH 5,0 eingestellt und in einem Extrakteur (Gerät der Fa. Schott & Gen., Mainz) mit Methylenchlorid extrahiert, die erhaltene Extraktionslösung mit Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer bei 50 °C vom Methylenchlorid befreit. Der Rückstand löste sich weitgehend in Chloroform-Methanol (1:1), weniger gut in Äthanol.

b) Mycelextrakte: Das lufttrockene Mycel wurde fein gemahlen und in Soxhlet zuerst mit Petroläther entfettet, sodann mit Methylenchlorid extrahiert. Die Rohextrakte wurden in Chloroform-Methanol (1:1) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung auf Steroide

DC-Platten: Kieselgelplatten Woelm F 254 Nr. 4630 der Fa. Woelm Pharma, D-3440 Eschwege. Laufmittelgemische: Chloroform-Methanol (95 + 5); Chloroform-Aceton (80 + 20). Identifizierung: UV-Licht 254 bzw. 366 nm; Vanillin-Phosphorsäure; Phosphormolybdänsäure; Reagenz nach Liebermann-Burchards.

Gaschromatographische Untersuchung auf Steroide

Gerät: Gaschromatograph der Fa. Packard, Frankfurt/M., Serie 428, Modell 2802*. Trägermaterial:

* Herrn Dr. P. Beneš, Hautklinik der Universität Mainz, sei für die Bereitstellung des Geräts und für Hinweise zur Gaschromatographie der Steroide bestens gedankt.

1% Silicon OV 210 + 1,8% Silicon OV 225 auf Chromosorb WHP (80–100 mesh). Temperaturen: Ofen 220 °C, Detektor und Injektionsblock 250 °C. Trägergas: Stickstoff. Die Derivatisierung erfolgte mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (MSTFA), 0,1 ml Substanz + 0,1 ml Reagenz.

Enzymatischer Nachweis von Cholesterin

Verwendet wurde der Testansatz der Fa. Boehringer, Mannheim, Nr. 15886 (enzymatischer Farbstest mit Cholesterin-Oxidase).

Massenspektrometrischer Nachweis von Cholesterin

Nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung der Extrakte wurde das Kieselgel derjenigen Zonen, die Cholesterin enthielten, von der Platte abgehoben und in einer Mikroapparatur mit Methylenchlorid p. a. eluiert. Die Eluate wurden dann in einem Minirotationsverdampfer unter Trockeneiskühlung zur Trockne eingedampft. Von den so vorbereiteten Proben wurden die Massenspektren (EI-Spektren) aufgenommen. Vergleichsspektren mit Cholesterin waren zuvor angefertigt worden. Gerät: Varian MAT CH 711, doppelfokussierend. Bedingungen: Elektronenenergie 70 eV, Probenverdampfungstemperatur 110 °C.

Ergebnisse

Wenn *Botrytis cinerea* in Traubensaft-Nährlösung gezüchtet wurde, konnten nach Beendigung der Fermenterkultivierung ca. 200 mg steroidhaltiger Rohextrakt je Liter Nährlösung erhalten werden. Bisher wurde im Rohextrakt nur Ergosterin eindeutig identifiziert. Im Mycel des Pilzes fanden sich außer Ergosterin kleine Mengen an Lanosterin und Squalen.

In dem synthetischen Nährmedium nach Czapek-Dox waren die Wachstumsbedingungen für *Botrytis cinerea* nicht so günstig wie im Traubensaft, auch war die Steroidsynthese schwächer. Im Mycel der Fermenterkulturen konnte im Gegensatz zu entsprechenden Standkulturen ein Steroidnachweis nicht schlüssig geführt werden, ausgenommen Ergosterin.

Von den daraufhin angestellten Versuchen zur Beeinflussung der Steroidsynthese des Pilzes seien hier die Ergebnisse unter Verwendung von Lanosterin und Squalen angeführt.

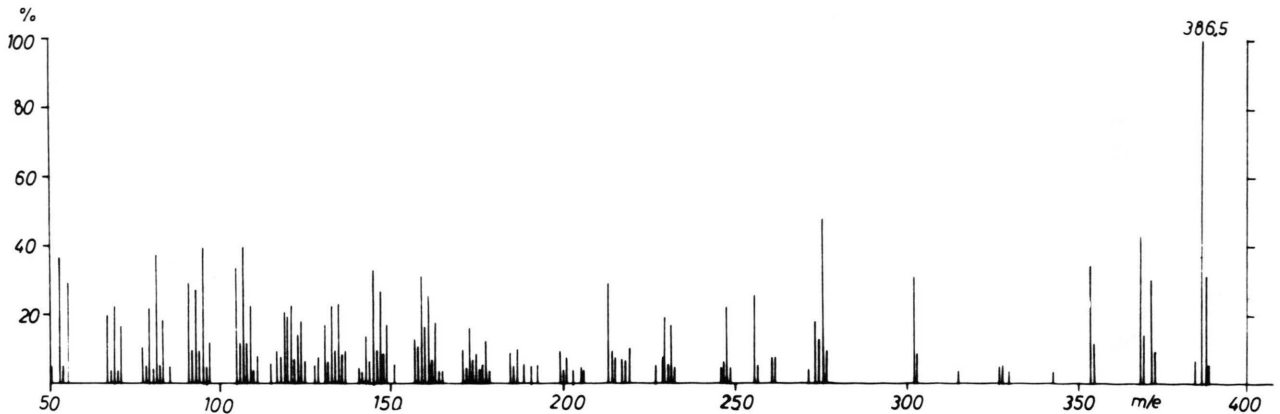


Abb. 1. Massenspektrum von Cholesterin. m/e 386,5 (100%) = M^+ ; 371,6 (30,3%) = $M-15$ (CH_3^+); 368,6 (14,4%) = $M-18$ (H_2O); 353,5 (34,4%) = $M-33$ (H_2O ; CH_3^+); 301,5 (30,9%) = $M-85$ ($C_8H_{13}^+$); 275,3 (47,5%) = $M-111$ ($C_8H_{13}^+$); 273,3 (18,0%) = $M-113$ ($C_8H_{17}^+$); 255,3 (25,3%) = $M-131$ (H_2O ; $C_8H_{17}^+$).

Lanosterin, das am 3. Züchtungstag in einer Menge von 200 bzw. 300 mg/l (suspendiert in Desmophen) der Czapek-Dox-Nährlösung zugegeben wurde, bewirkte, daß sich die anfänglich gebildete Pelletwuchsform des Mycels in eine fadenförmige Form umwandelte; auch verlangsamte sich das Wachstum. Das Myceltrockengewicht betrug am Ende der Fermentation nur noch 2 g/l. Wie die dünnschichtchromatographische Analyse der Nährlösungsextrakte zeigte, nahm das zugesetzte Lanosterin in seiner Menge im Verlaufe der Kultivierung ab, und es erschien in entsprechender Konzentration eine neue Verbindung, die sich als Cholesterin erwies. Auch wurde ein verstärktes Auftreten von Squalen im Nährlösungsextrakt beobachtet.

Der Cholesterin-Nachweis erfolgte dünnschichtchromatographisch, gaschromatographisch und mas-

senspektrometrisch, außerdem enzymantisch. Abb. 1 zeigt das Massenspektrum des Cholesterins, das aus dem Nährlösungsextrakt eines Lanosterinversuches dünnschichtchromatographisch abgetrennt worden war. Es erwies sich identisch mit dem Spektrum der Testsubstanz. Übereinstimmend ist z. B. die Molekülion mit der Massenzahl 386,5. Von den Fragmentationen seien nur die mit $M-18$, $M-33$ und $M-131$ angeführt, die unter Abspaltung von Wasser, von Wasser und einer Methylgruppe als Radikal und von Wasser und der Seitenkette des Cholesterins als Radikal entstanden sind.

In weiteren Versuchen war der Czapek-Dox-Nährlösung Squalen zugesetzt worden, und zwar 200 mg/l. Im Gegensatz zu den Lanosterinversuchen konnte keine verstärkte Autolyse des Mycels bemerkt werden. Bei der dünnschichtchromatischen Analyse der

Tab. I. Fermenterkulturen von *Botrytis cinerea* in Czapek-Dox-Nährlösung mit und ohne Zugabe von Lanosterin bzw. Squalen. Gehalt der Kulturen an Sterinen und Squalen am Versuchsende (NL = Nährlösungsextrakt; M = Myceleextrakt).

Versuchsbezeichnung	Zugabe	Cholesterin [mg/l]	Lanosterin [mg/l]	Ergosterin [mg/l]	Squalen [mg/l]	Extrakt
8 R	Lanosterin 300 mg/l	119	—	—	135	NL
Kontr.	—	Spur	Spur	—	Spur	NL
10 R	Lanosterin 200 mg/l	53	99	115	Spur	M
Kontr.	—	—	—	55	Spur	M
28 R	Squalen 200 mg/l	—	—	89	85	NL + M
Kontr.	—	—	—	30	Spur	NL + M

Nährlösung wurde eine Abnahme der Squalenkonzentration mit der Züchtungsdauer festgestellt. Gleichzeitig erschien ein weiterer Fleck, der als Ergosterin identifiziert werden konnte. Auch das Mycel enthielt relativ viel Ergosterin, wie gaschromatographisch ermittelt wurde. Andere typische Steroide sind nicht aufgefunden worden.

Die Kontrollversuche wurden ohne Lanosterin bzw. Squalen durchgeführt, jedoch enthielt die Nährlösung Desmophen. Die anfänglich sich bildende Pelletform des Mycels wandelte sich nur zögernd in fadenförmiges Mycel um, das für die Steroidsynthese des Pilzes erforderlich zu sein scheint. Die Myceltrockengewichte lagen am Ende der Kultivierung bei 7 g/l. In den Nährlösungen dieser Kulturen ließen sich zwar Sterine nachweisen, aber nur in geringen Konzentrationen. Identifiziert werden konnten Ergosterin und Squalen, in einem Falle auch Lanosterin und Cholesterin.

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuche mit den hier interessierenden Befunden gibt Tab. I. Die Werte wurden gaschromatographisch und dünn-schichtchromatographisch ermittelt.

Diskussion

Über die bei *Botrytis cinerea* festgestellte Biosynthese von Cholesterin nach Zugabe von Lanosterin kann nur im Vergleich zu anderen Organismen etwas ausgesagt werden. Prinzipiell ist Lanosterin beim tierischen Organismus Zwischenstufe für die Cholesterin-Biosynthese, während bei den meisten Pilzen Lanosterin zu Ergosterin umgewandelt wird. Beiden Wegen gemeinsam sind folgende Reaktionen: Demethylierung des Lanosterins zu 14-Demethyllanosterin, Verlust der beiden C-4-Methylgruppen des Demethyllanosterins unter Bildung von Zymosterin und Verlagerung der Doppelbindung $\Delta 8,9 \rightarrow \Delta 5,6$ zu Desmosterin. Cholesterin kann dann aus Desmosterin durch Hydrierung der Doppelbindung der Seitenkette ($\Delta 24, 25$) entstehen.

Bei unseren Untersuchungen ist es bisher nicht gelungen, das eine oder andere genannte Zwischenprodukt der Lanosterinumwandlung zu identifizieren, obschon die DC-Analyse der Extrakte noch unbekannte Steroide aufweist.

Offensichtlich kann *Botrytis cinerea* nicht wie andere Schimmelpilze, z. B. *Fomes officinalis*, die Sei-

tenkette des Lanosterins um 1 C-Atom verlängern und C-31-Steroide entsprechend der Eburicosäure oder Polyporensäure bilden. Es wurden vielmehr die „überschüssigen“ Methylgruppen des Lanosterins am C-4 und C-14 eliminiert. Beim tierischen Organismus werden diese Reaktionen durch Oxydationsenzyme bewirkt (Gautschi und Bloch [8]). Die Frage, ob solche Enzyme auch beim Botrytispilz vorkommen, konnte noch nicht bearbeitet werden.

Die Ergosterin-Biosynthese aus Squalen nimmt, wie schon dargelegt, bis zum Desmosterin denselben Verlauf wie die Cholesterin-Biosynthese. Es erfolgt dann die Einführung einer Methylgruppe am C-24. Methylgruppen-Donator ist S-Adenosylmethionin (Alexander *et al.* [9]). Außerdem muß am C-22 eine Doppelbindung eingeführt und die Doppelbindung am C-24 hydriert werden [10].

Ob die Cyclisierung des Squalens durch *Botrytis cinerea* wie bei pflanzlichen Organismen Cycloartenol liefert oder wie bei Hefe, bestimmten Pilzen und den tierischen Organismen Lanosterin, kann letztlich noch nicht entschieden werden, obschon bei nachfolgenden Untersuchungen unter normaler Züchtung des Pilzes sowohl kleine Mengen Lanosterin wie auch des Phytosterins β -Sitosterin aufgefunden wurden [11].

Dies kann so gewertet werden, daß der Pilz möglicherweise über eine Cyclosterin-Isomerase verfügt, die Cycloartenol in Lanosterin umwandeln kann. Bu'Lock und Osagie [5] haben bei Phycomyceten einen entsprechenden Nachweis geführt. Sie konnten auch feststellen, daß aus Lanosterin unter anderen Steroiden sich Cholesterin gebildet hatte.

Die im methodischen Teil angegebenen dünn-schichtchromatographischen Trennverfahren sind, wie auch weitere in der Literatur beschriebene, für Cholesterin und Ergosterin nur bedingt brauchbar. Cholesterin ist jedoch, wenn es neben Ergosterin vorliegt, an seiner graugrünen Färbung mit Vanillin-Phosphorsäure zu erkennen. Auch das enzymatische Verfahren für Cholesterin erfaßt noch andere Sterine mit einer β -C-3-OH-Gruppe. Lanosterin reagiert nach unseren Feststellungen nicht mit dem Reagenz. Das angegebene gaschromatographische Verfahren bewirkt hingegen eine eindeutige Trennung von Cholesterin und Ergosterin. Die außerdem durchgeführte massenspektrometrische Analyse brachte einen weiteren Beweis für das Vorliegen von Cholesterin.

Danksagung

Wir danken Frau Dipl.-Biol. Silvia Müller für die Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen, Frau Margot Krummeck für technische

Hilfe, Herrn Dr. M. Przybilsky, Organisch chemisches Institut der Universität Mainz, für die Aufnahme der Massenspektren sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit durch Gewährung einer Sachbeihilfe (Fl 92/1).

- [1] H. Wieland u. W. M. Stanley, *Ann. Chem.* **489**, 31–42 (1931).
- [2] C. W. Shoppee, *Chemistry of the Steroids*. Butterworth, London 1964.
- [3] Y. S. Chen u. R. H. Haskins, *Can. J. Chem.* **41**, 1647–1650 (1963).
- [4] N. J. McCorkindale, S. A. Hutchinson, B. A. Pursey, W. T. Scott u. R. Wheeler, *Phytochemistry* **8**, 861–867 (1969).
- [5] J. D. Bu'Lock u. A. U. Osagie, *Phytochemistry* **15**, 1249–1251 (1976).
- [6] E. Schwenk u. J. Alexander, *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 65–74 (1958).
- [7] K. B. Raper u. D. I. Fernell, *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore 1965.
- [8] F. Gautschi u. K. Bloch, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 684–689 (1957).
- [9] G. J. Alexander, A. M. Gold u. E. Schwenk, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 2967 (1957).
- [10] J. D. Weete, *Phytochemistry* **12**, 1843–1848 (1973).
- [11] L. Gwinner, Diplomarbeit Mainz 1979.