

Isolierung und Identifizierung von Sterinen im Metabolismus des Pilzes *Botrytis cinerea*

Isolation and Identification of Sterols in the Metabolism of the Fungus *Botrytis cinerea*

Peter Flesch, Lutz Gwinner*, Sylvia Müller** und Peter Simon***

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

Z. Naturforsch. **38c**, 207–211 (1983); eingegangen am 8. Oktober 1982

Mycosterols, β -Sitosterol, Cerevisterol, Ergosterol peroxide, *Botrytis cinerea*

The fungus *Botrytis cinerea*, which belongs to the class of ascomycetes, has been analysed for its sterol composition. It is able to produce ergosterol, cerevisterol, lanosterol/dihydrolanosterol and cholesterol besides β -sitosterol. The identification of the sterols is carried out with different analytical methods including mass spectrometry. In the extracts of the mycelium also squalene has been identified.

Einleitung

Es wird heute allgemein angenommen, daß die bei der Biosynthese der Steroide ablaufende Cyclisierung des Squalenepoxids bei Pilzen und Tieren zum Lanosterin und bei photosynthetischen Pflanzen zum Cycloartenol führt [1]. Vom Lanosterin abzuleitende Sterine sind z. B. Zymosterin, Cholesterin, Ergosterin, Fucosterin und Cerevisterin, vom Cycloartenol abzuleitende β -Sitosterin, Stigmasterin und α -Spinasterin.

Nach früheren Untersuchungen wird Cholesterin als das Sterin der Wirbeltiere angesehen. Ergosterin als Hefesterin und β -Sitosterin sowie Stigmasterin als die Sterine der höheren Pflanzen. Es mehren sich aber die Arbeiten, wonach in Pilzen auch die Zoosterine Cholesterin und Desmosterin, außerdem die Phytosterine Stigmasterin und Fucosterin anzutreffen sind; β -Sitosterin wurde noch nicht identifiziert.

Eigene dünn-schichtchromatographische Untersuchungen haben Hinweise dafür ergeben, daß vom *Botrytis cinerea*-Pilz neben Ergosterin, Lanosterin/Dihydrolanosterin und Cholesterin auch β -Sitosterin gebildet werden kann, außerdem Cerevisterin. Es bestand also die Notwendigkeit einer eindeutigen Identifizierung der genannten Sterine, vor allem des β -Sitosterins.

Material und Methoden

Microorganismen: *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) Stamm Geisenheim (G) [2] und *Botrytis cinerea* Stamm Nackenheim (N)*. Es handelt sich um Isolate von Traubenbeeren.

Kulturmedium: Traubensaft-Nährlösung, pH 3,4 [2].

Züchtung: Die Züchtung des Pilzes erfolgte als Oberflächenkultur in Penicillin- bzw. Fernbachkolben im Dunkeln bei 26 °C. Das Abernten wurde nach 10 bis 12 Wochen durchgeführt.

Chemikalien: β -Sitosterin (Fa. Roth, D-7500 Karlsruhe), Cycloartenol und Campesterin**, Cerevisterin***, Desmosterin und Stigmasterin (Fa. Serva, D-6900 Heidelberg). Falls erforderlich, wurden die Substanzen mit Hilfe der TLC gereinigt.

Gewinnung der Steroidrohextrakte: Die Steroidrohextrakte wurden wie bei Flesch u. Robbel [2] angegeben erhalten.

Dünn-schichtchromatographische Untersuchung: Kieselgelplatten Woelm F254 Nr. 4630 der Fa. Woelm Pharma, D-3340 Eschwege. Laufmittelmischung: Chloroform-Methanol (95:5); Petroleumben-

* Teil der Diplomarbeit L. Gwinner, Mainz 1979.

** Teil der Diplomarbeit S. Müller, Mainz 1979.

*** Teil der Diplomarbeit P. Simon, Mainz 1980.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. P. Flesch.

0341-0382/83/0300-0207 \$ 01.30/0

* Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Theis, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität, D-6500 Mainz

** Für die Bereitstellung dieser Steroide wird Herrn Professor D. N. Kirk, Westfield College, Hamstead, London, Great Britain, NW3–7ST, bestens gedankt.

*** Im Labormaßstab hergestellt von E. Müller [3].



zin-Aceton (10:3). Um die Trennqualität zu erhöhen, wurden die Chromatogramme zweimal entwickelt. Identifizierung: *o*-Phosphorsäure-Wasser (1:1), Vanillin-Phosphorsäure, Antimontrichlorid-Eisessig [4].

Verteilungschromatographie mit Hilfe der „Reversed Phase“-Technik (HPTLC): RP-8 Fertigplatten für Nano-DC der Fa. Merck, D-6100 Darmstadt, mit Fluoreszenzindikator 254 nm. Laufmittelgemisch: Methanol-Wasser (18:1). Identifizierung: Antimontrichlorid in Chloroform [4].

Isolierung der Steroide (Vortrennung): Die Isolierung der Steroide erfolgte mittels Kieselgel-Dickschichtplatten der Fa. Macherey-Nagel, D-5160 Düren (SIL G-200 UV₂₅₄) unter bandförmigem Auftragen. Die Platten sind nur für solche Steroide anwendbar, deren R_f -Werte genügend weit auseinander liegen. In den anderen Fällen ließ sich mit Hilfe von Dünnschichtplatten und geeigneter Wahl des Laufmittels eine Trennung herbeiführen. Das Kieselgel der betreffenden Bereiche wurde abgekratzt und in einer Mikroapparatur mit Chloroform-Methanol (1:1) eluiert, das Eluat in einem entsprechend dimensionierten Rotationsverdampfer bei 30 °C zur Trockne eingedampft. Anreicherung und Reinigung der Steroidrohextrakte wurden auch mit halbpräparativen RP C₁₈-Säulen durchgeführt (SEP PAK C₁₈ Kartuschen der Fa. Waters GmbH, D-6240 Königstein/Ts.). Die durch erforderlichenfalls kombinierte Anwendung der Verfahren erhaltenen Sterine waren rein genug, um mittels Gaschromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder Massenspektrometrie bestimmt zu werden.

Gaschromatographische Untersuchung: Gerät: Gaschromatograph Mod. 3200 der Fa. Dani, D-6503 Mainz-Kastell. Trägermaterial: 1% Silicon OV 210 + 1,8% Silicon OV 225 auf Chromosorb WHP (80–100 mesh) der Fa. WGA, D-4000 Düsseldorf. Temperatur: Ofen 230 °C isotherm, Detektor FID 280 °C, Injektionsblock 250 °C. Trägergas: Stickstoff 1,3 bar, FID-Brenner Wasserstoff 0,7 bar; synthetische Luft 0,9 bar. Die Derivatisierung der Sterine in ihre TMS-Äther erfolgte mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (MSTFA) (0,1 mg Substanz + 0,1 ml Reagenz, 60 min. bei 60 °C).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Cerevisterin: Gerät: Waters ALC/GPC 201, Säule 10 µm C₁₈-Bondapak (30 × 0,4 cm). Mobile Phase:

Methanol-Wasser (80:20), Durchflußrate 2,5 ml/min, Detektion mittels LC-UV-Detektor Pye Unicam bei 210 nm.

Massenspektrometrischer Nachweis der Sterine: Die Sterinfraktionen wurden ebenso wie die authentischen Sterine in ein Massenspektrometer zur Aufnahme der EI-Spektren gegeben. Gerät Varian MAT CH 711, doppelfokussierend. Bedingungen: Elektronenenergie 70 eV, Probenverdampfungstemperatur 110 °C. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit Hilfe des Datensystems SS 100 der Fa. Varian auf Magnetband. Die Ionenströme wurden über einen Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) registriert.

Ergebnisse

Der Befund, daß β -Sitosterin von unbeeinflusst gewachsenen Kulturen des Pilzes *Botrytis cinerea* Stamm G als Inhaltsstoff des Pilzmycels gebildet werden kann, wurde mit verschiedenen Methoden erhalten. Zunächst gelang der dünnsschichtchromatographische Nachweis mit Hilfe der „Reversed Phase“-Technik auf HPTLC-Platten mit C₈-Phase. Bei dieser Methode kommt es im Gegensatz zur Chromatographie auf Kieselgelplatten zu einer Trennung zwischen β -Sitosterin und Cholesterin (Abb. 1). Die R_s -Werte von β -Sitosterin und Cholesterin sind in dem angegebenen System 0,81 und 1,00.

Ein weiterer Hinweis für das Vorliegen von β -Sitosterin lieferte die gaschromatographische Untersuchung des Pilzextraktes. Die R_G -Werte von isoliertem und authentischem β -Sitosterin (als TMS-Äther) betrugen unter den angewendeten Bedingungen 1,59.

Der eindeutigste Beweis für das Vorhandensein von β -Sitosterin im Pilzmycel von *Botrytis cinerea* Stamm G erbrachte die Massenspektrometrie. Die Abbildungen 2 und 3 geben die Massenspektren von isoliertem β -Sitosterin und des authentischen β -Sitosterins wieder. Bei den Peaks mit der Massenzahl 414 handelt es sich jeweils um das Molekül-Ion. Von den Fragment-Ionen sind neun charakteristische mit Buchstaben gekennzeichnet. Auch hier findet man völlige Übereinstimmung zwischen Versuchs- und Testsubstanz.

Die Peaks a_3 , b_3 und c_3 sind bei nahezu allen 3-Hydroxysteroiden anzutreffen [5]. Sie entstehen durch Abspaltung einer angulären Methylgruppe (C-13) [5], von Wasser (C₂–C₃) [6] bzw. einer Methyl-

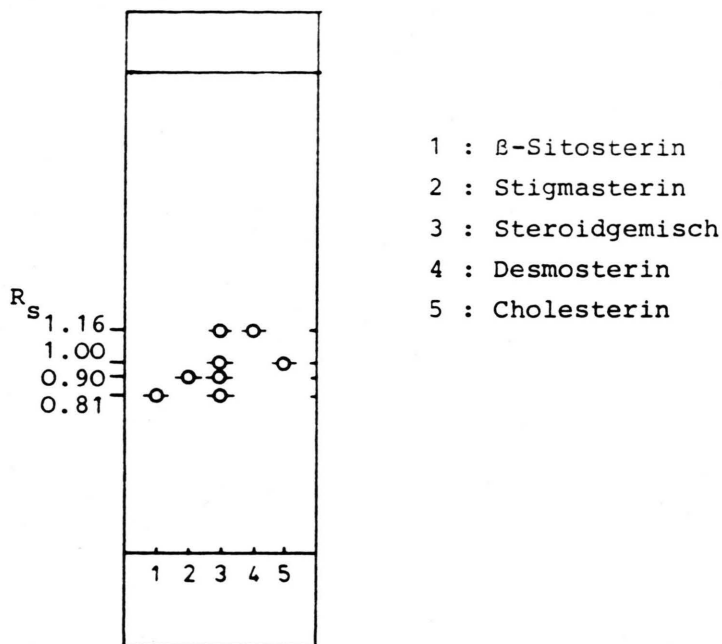


Abb. 1. Trennung von Cholesterin, Stigmasterin, Desmosterin und β -Sitosterin auf einer HPTLC-RP 8-Platte. Laufmittelgemisch Methanol-Wasser (18:1), dreimal chromatographiert, Laufstrecke 7,5 cm.

gruppe und Wasser [6, 7]. β -Sitosterin ist thermisch ähnlich labil wie Cholesterin [8]. Demzufolge treten die Peaks a_3 bis e_3 (vermindert um die Seitenketten-Massenzahldifferenz von 28) auch beim Cholesterin auf. Peak f_3 mit der Massenzahl 273 entspricht dem Molekülteil, das die Seitenkette nicht mehr hat, Peak

g_3 dem Molekül-Ion vermindert um Wasser und Seitenkette. Bei den Peaks h_3 und i_3 sind außer Wasser größere Bruchstücke abgespalten [9]. Die Fragmente e_3 und $e_3 + 26$ treten bei $\Delta 5$ -en-3 ol Steroiden auf. Sie sind das charakteristischste Zeichen für das Vorliegen einer $\Delta 5$ -Doppelbindung in einem Steroid [5].

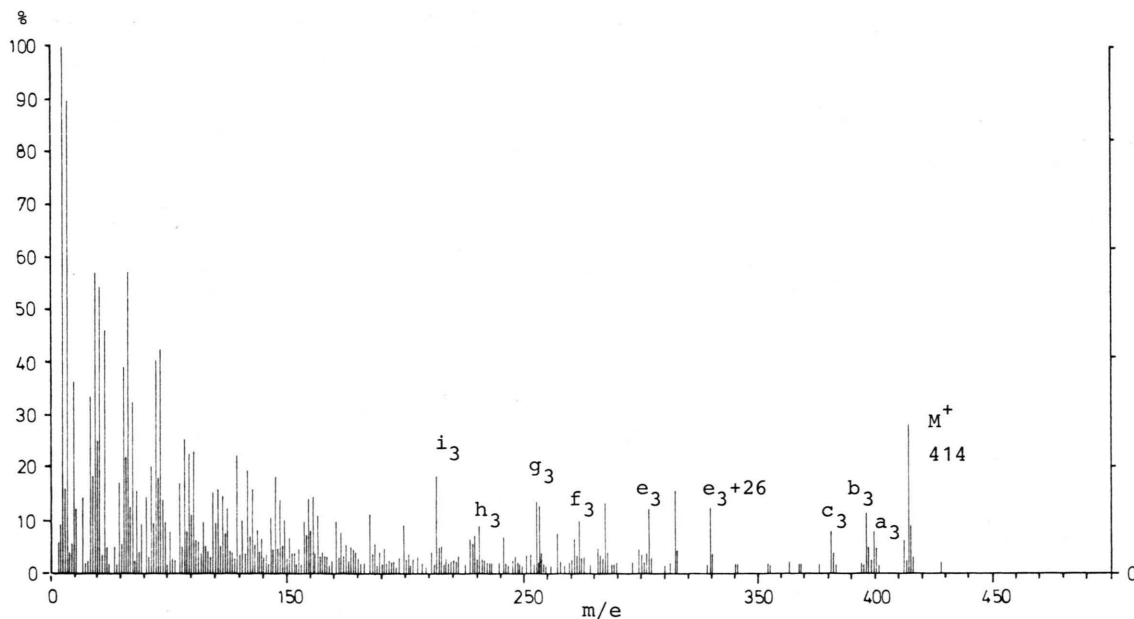


Abb. 2. Massenspektrum von β -Sitosterin, isoliert aus einem Myceleextrakt von *Botrytis cinerea* Stamm G.

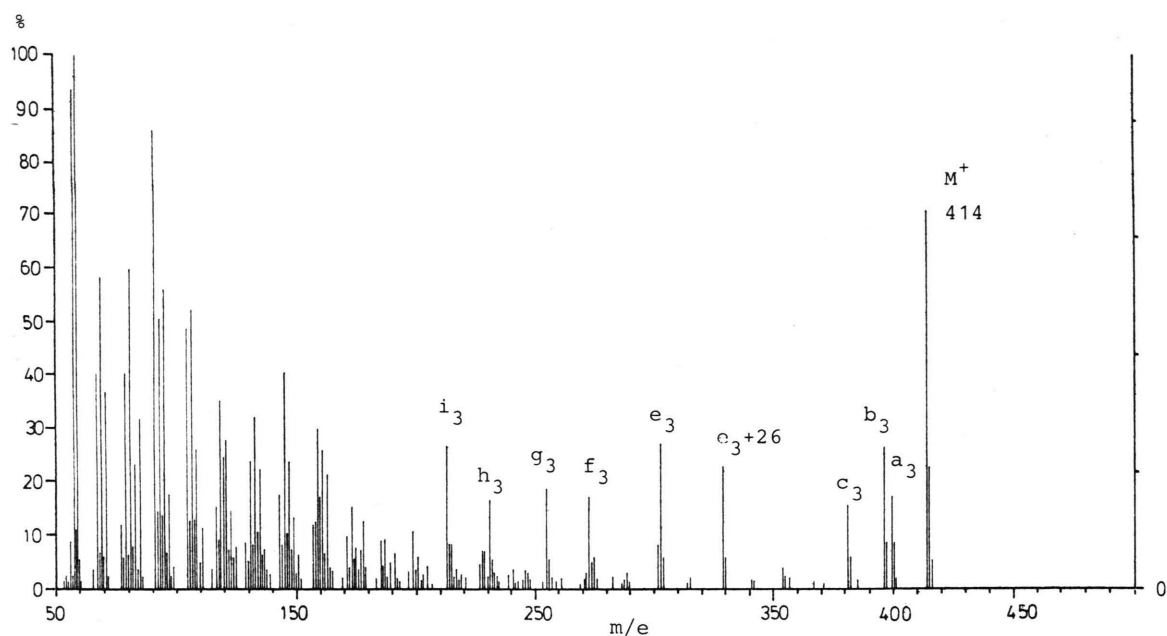


Abb. 3. Massenspektrum von authentischem β -Sitosterin.

Cerevisterin konnte im Petroläther-Extrakt des Mycels vom *Botrytis cinerea*-Stamm G sowie im Methylenchlorid-Extrakt des Mycels vom *Botrytis cinerea*-Stamm N dünnschichtchromatographisch ermittelt werden, und zwar deshalb, weil es auf den Platten mit Antimontrichlorid-Eisessig und Vanillin-Phosphorsäure vor dem Erhitzen einen rosafarbenen Fleck ergeben hat [10]. Als Testsubstanz wurde ein von E. Müller [3] hergestelltes Präparat verwendet, dessen Identität als Cerevisterin anhand von IR- und Massenspektren erwiesen war. Die aus dem Pilzmycel extrahierte Cerevisterinmenge war äußerst gering und da die Trennung von den übrigen Sterinen nur auf RP-8 Platten zufriedenstellend gelang, ist eine weitere Identifizierung mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer Bondapak C₁₈-Säule durchgeführt worden. Das isolierte Cerevisterin und die Testsubstanz hatten denselben R_f-Wert von 10,37 min (Range 0,16; Attenuator 5).

An weiteren Sterinen, die von unbeeinflusst gewachsenen Kulturen des *Botrytis*-Pilzes Stamm G gebildet wurden, sind durch verschiedene analytische Methoden einschließlich der Massenspektrometrie identifiziert worden: Ergosterin, Ergosterinperoxid, Cholesterin, Lanosterin/Dihydrolanosterin, außerdem Squalen.

Diskussion

Das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Untersuchungen ist der Nachweis von β -Sitosterin im Mycel des Pilzes *Botrytis cinerea* Stamm G. Die Suche nach Cycloartenol als Vorstufe des β -Sitosterins bzw. nach Stigmasterin als einem weiteren Folgeprodukt des Cycloartenols war bisher vergeblich. Der Nachweis des β -Sitosterins ist durch die Anwendung der Verteilungschromatographie auf RPTLC-RP 8-Platten erstmals möglich geworden. Nur dieses Verfahren gestattet die Abtrennung des β -Sitosterins vom Cholesterin sowie vom Stigmasterin und Desmosterin. Aufgrund der Massenspektren kann es sich beim β -Sitosterin auch nicht um Stigmasterin (22-Dehydro-sitosterin) handeln, das bei Pilzen schon nachgewiesen worden ist [11]. Ebenfalls erwies sich der als Nährlösung verwendete Traubensaft frei von β -Sitosterin.

Die Folgeprodukte des Lanosterins auf dem Wege zum Cholesterin, nämlich Zymosterin und Desmosterin, wurden auch unter Anwendung der verbesserten analytischen Methoden nicht gefunden. Dagegen war wie zu erwarten Ergosterin nachzuweisen. Cerevisterin ist als ein Folgeprodukt des Ergosterins aufzufassen.

Eine Verwechslung von Cholesterin mit Desmosterin (24-Dehydrocholesterin) ist nicht zuletzt aufgrund der Massenspektren ausgeschlossen. Nach der bisherigen Kenntnis des Biosyntheseweges der Steroide können sich aus Desmosterin sowohl Cholesterin wie auch Ergosterin und mit einiger Wahrscheinlichkeit die Phytosterine Stigmasterin und β -Sitosterin bilden. So gesehen ist *Botrytis cinerea* in der Lage, aus jeder Gruppe der Sterine (Cholanserie, Ergostanserie und Stigmastanserie) mindestens einen Vertreter zu synthetisieren.

Eine weitere Substanz aus dem Pilzextrakt vom *Botrytis cinerea* Stamm G erwies sich anhand des Massenspektrums als Ergosterin, obwohl das Laufverhalten bei der Dünnschichtchromatographie nicht auf Ergosterin schließen ließ, sondern auf ein Sterin mit polaren Eigenschaften. Ein der Substanz entsprechender Fleck fand sich auch auf den Chromatogrammen mit länger unter Lichtzutritt aufbewahrter Standardlösung von Ergosterin, sowie mit selbst hergestelltem Ergosterinperoxid. Somit ist an-

zunehmen, daß es sich bei diesem Sterin um Ergosterinperoxid handelt, das sich deshalb einem massenspektrometrischen Nachweis entzieht, weil es beim Erhitzen im Hochvakuum des Gerätes den Peroxidsauerstoff verliert. Obschon Ergosterinperoxid ein Inhaltsstoff von Pilzmycel sein kann, wie von einigen Autoren angenommen wird [12], soll es dahingestellt bleiben, ob es in diesem Falle eine Stoffwechselprodukt oder ein Artefakt ist. Adam *et al.* [13] haben in ihren Untersuchungen den artifiziellen Charakter des Ergosterinperoxids aus Pilzmycel nachgewiesen.

Dank

Wir danken Herrn Dr. M. Przybilsky, Organisch-chemisches Institut der Universität Mainz, für die Aufnahme der Massenspektren, Frau Margot Krummeck für technische Hilfe sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit durch Gewährung einer Sachbeihilfe (FI 92/3).

- [1] J. D. Weete, Fungal Lipid Biochemistry. Plenum Press, New York 1974.
- [2] P. Flesch u. L. Robbel, Z. Naturforsch. **35c**, 88–92 (1980).
- [3] E. Müller, Diplomarbeit Mainz 1979.
- [4] E. Stahl, Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag, Berlin 1962.
- [5] Z. V. Zaretskij, Mass Spectrometry of Steroids. Halsted Press, New York 1976.
- [6] C. Brunnée u. W. Nickels, Forschungsberichte der Atlas Meß- u. Analysentechnik GmbH, Bremen 1962.
- [7] R. Ryhage u. E. Stenhagen, J. Lipid Res. **1**, 361–390 (1960).
- [8] C. Djerassi, Pure and Appl. Chem. **9**, 159–178 (1964).
- [9] G. Spiteller, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen. Verlag Chemie, Weinberg 1966.
- [10] H. A. Goldsmith, Chem. A. **55**, 10502 (1961).
- [11] E. Merdinger, P. Kohn u. R. C. McClain, Can. J. Microbiol. **14**, 1021–1027 (1968).
- [12] P. Wieland u. V. Prelog, Helv. Chim. Acta **30**, 1028–1030 (1974).
- [13] K. H. Adam, I. M. Campbell u. N. J. McCorkendale, Nature **216**, 397 (1967).