

Untersuchungen zur Sterinsynthese des Ascomyceten *Aureobasidium (Dematium) pullulans*

Studies of the Sterolsynthesis in the Fungus *Aureobasidium (Dematium) pullulans*

Peter Flesch und Michael Schaefer*

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

Z. Naturforsch. **40c**, 309–312 (1985); received August 15, 1984/January 18, 1985

Mycosterols, Lanosterol, Desmosterol, Cholesterol, Stigmasterol, β -Sitosterol, *Aureobasidium (Dematium) pullulans*

Isolation and identification of sterols from culture extracts of the fungus *Aureobasidium (Dematium) pullulans* yielded metabolites with key function in sterol synthesis. By proof of squalene, lanosterol/dihydrolanosterol, desmosterol, ergosterol, cholesterol, stigmasterol and β -sitosterol it was possible to work out a general synthesis-scheme for the building-up of sundry sterols in Ascomycetes.

Einleitung

Die auf früheren Untersuchungen basierende Annahme, daß bestimmte Sterine wie Cholesterin und Desmosterin nur bei höheren Tieren und Stigmasterin sowie β -Sitosterin nur bei photosynthetischen Pflanzen vorkommen, wurde durch weiterführende Arbeiten in Frage gestellt. So fand man bei Pilzen neben Ergosterin und Ergosterinderivaten vereinzelt Vertreter der anderen „Sterinkategorien“:

- Cholesterin bei *Penicillium funiculosum* [1] und Saprolegniales-, Leptomitales- sowie Mucorales-Arten [2]
- Stigmasterin bei *Aureobasidium (Dematium) pullulans* [3]
- Lanosterin/Dihydrolanosterin, Cholesterin und β -Sitosterin bei *Botrytis cinerea* [4, 5].

Die Isolierung weiterer Sterine aus Extrakten des Ascomyceten *Aureobasidium (Dematium) pullulans* unter Anwendung moderner analytischer Methoden konnte Aufschluß über dessen Steroidmetabolismus geben und den Entwurf eines Syntheseschemas ermöglichen.

Die Identifikation der Schlüsselmetabolite des Syntheseschemas sollte mit Hilfe chromatographischer Verfahren und der vergleichenden Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektroskopie (EI-MS) gegen authentische Standards erfolgen.

Material und Methoden

Mikroorganismus: *Aureobasidium (Pullularia, Dematium) pullulans*, Stamm Würzburg*, Isolat von Traubenbeeren. Kulturmedium: Traubensaft-Nährlösung, pH 3,4 [5]. Züchtung: Oberflächenkulturen in Penicillin- bzw. Fernbachkolben (im Dunkeln bei 26 °C); bedarfsgemäßes Abernten nach 8–14 Wochen.

Chemikalien: Cholesterin (Merck, p.a.), Desmosterin (Merck, p.a.), Squalen (Merck-Schuchard, 97%), Lanosterin (Roth, purum), Stigmasterin (Serva, p.a. 99%), β -Sitosterin (Serva, p.a. 95%), Ergosterin (Fluka, purum; aus Ethanol umkristallisiert).

Gewinnung der Steroidrohextrakte: Die Extraktionsmethode wurde gegenüber der beschriebenen [5] nur unwesentlich modifiziert.

Gewinnung der Sterinkomponenten: Reversed-Phase – Säulenchromatographie (RP – LC): SEP – PAK C₁₈ Kartuschensystem (Fa. Waters GmbH, D-6240 Königstein). Binäre (CH₃OH/H₂O) und ternäre (CH₃OH/CHCl₃/H₂O) Elutionsgemische absteigender Polarität wurden zur Fraktionierung der Rohextrakte benutzt. Dickschichtchromatographie: Glasplatten, 20×20 cm, selbst belegt mit einer 2 mm dicken Schicht aus Kieselgel 60 F 254 und KG 60 F 366 (Fa. Merck). Laufmittel: CHCl₃/CH₃OH (90:10, vertikale, 3-malige Entwicklung), Substanzen wurden abgehoben und mit CHCl₃/CH₃OH (1:1) eluiert. Dünnschichtchromatographie (DC): Kiesel-

* Teil der Diplomarbeit M. Schaefer, Mainz 1984.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. P. Flesch.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/85/0500–0309 \$ 01.30/0

* Für die Überlassung der Pilzkultur sei Frau Dr. I. Benda von der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, D-8700 Würzburg, bestens gedankt.



gelfertigplatten F 254 (Fa. Woelm); Laufmittel: (a) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), (b) Petrolether/Aceton (10:3, 2 \times entwickelt); Detektion: 10%ige H_2SO_4 sowie Vanillin- H_3PO_4 [6].

Gaschromatographie (GC). Analytische GC: vergleichend gegen Standards als TMS – Ether; Gerät: DANI Gaschromatograph 3200 (Fa. DANI, D-6503 Mainz-Kastel) mit Detektor DANI FID 321. Säule: silanisiertes Glasrohr, $l = 2 \text{ m}$, i.D. = 2 mm. Säulenmaterial: 3% Silicon OV 61 auf GasChrom Q (100–120 mesh; Fa. Macherey u. Nagel, D-5160 Düren). Chromatographieparameter: Temperatur Ofen: 250 °C, Injektor: 280 °C, Detektor: 300 °C. Trägergas: N_2 (1,6 bar); Brennergas: H_2 (0,8 bar) und synthet. Luft (1,0 bar). Derivatisierungsmittel: N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (MSTFA, Fa. Macherey u. Nagel). Präparative GC: Sterine wurden an OV 61 in underivatisierter Form getrennt, wozu ein Effluent-Splitter am Säulenende (Glasrohrabzweigung im Ofen) diene. Auftrennung der Trägergasvolumina $V_{\text{analyt.}} : V_{\text{präp.}} = 1:5$. Kühlfallen: Glaskapillaren ($l = 20 \text{ cm}$, i.D. = 2 mm).

Verteilungschromatographie mit Hilfe der Reversed-Phase-Technik (RP-HPTLC) RP-8 F 254s – Fertigplatten, $10 \times 10 \text{ cm}$, für die Nano-DC (Fa. Merck). Laufmittel: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5). Entwicklung: 2 \times in HPTLC-Linearentwicklungskammer (CAMAG 28510), $10 \times 10 \text{ cm}$. Auftragung: CAMAG Nanomat (27770), Einwegkapillaren ($5 \times 10^{-3} \text{ ml}$) und Kapillardispensersystem der Fa. CAMAG. Detektion: Antimontrichlorid in CHCl_3 , gesättigt [6].

Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektroskopie (EI-MS): Gerät: Varian MAT CH 7A; Elektronenaustrittsenergie: 70 eV. Probenverdampfungstemperatur: 120 °C. Aufnahme und Speicherung der Spektren erfolgte mit einem Datenerfassungssystem der Fa. DIETZ.

Ergebnisse

Durch die gekoppelte Anwendung von präparativer Dickschichtchromatographie und präparativer Gaschromatographie gelang die Isolierung von Squalen, Lanosterin/Dihydrolanosterin, Desmosterin, Cholesterin, Ergosterin, Stigmasterin und β -Sitosterin aus Extrakten von unbeeinflusst gewachsenen Kulturen des Pilzes *Aureobasidium pullulans*.

Die Identifikation der Substanzen erfolgte allgemein gegen authentische Standards mit Hilfe von RP-HPTLC und GC. Tab. I gibt die erhaltenen Daten wieder.

Zur eindeutigen Identifizierung von Lanosterin/Dihydrolanosterin, Desmosterin, Cholesterin und β -Sitosterin wurde zusätzlich die Massenspektroskopie herangezogen. Spektren von isoliertem Cholesterin und β -Sitosterin vergleichend gegen Standards sind bereits an früherer Stelle angegeben [4, 5], ebenso wie die Erläuterungen und die Diskussion der Zerfallsschemata [7–10].

Desmosterin als zentraler Metabolit der Sterinsynthese ist in der vorliegenden Arbeit erstmals im Stoffwechsel des untersuchten Pilzes neben Lanosterin, β -Sitosterin und Cholesterin nachgewiesen worden. Dieser Befund erlaubt eine Vervollständigung des Biosyntheseschemas der Sterine (s. Diskussion). In Abb. 1 ist das EI-Massenspektrum von isoliertem Desmosterin dargestellt. Die Identität ist eindeutig, zieht man das Standardspektrum zum Vergleich heran (Abb. 2).

Diskussion

Über das Vorkommen von Sterinen in Extrakten des Pilzes *Aureobasidium pullulans* war bisher auf-

	R_f	R_{st}	t_R [min]	t_{Rst}
Squalen	0,17	0,56	3,0	0,29
Lanosterin/Dihydrolanosterin	0,20	0,66	20,5/17,2	1,96/1,64
Cholesterin	0,305	1,00	10,5	1,00
Desmosterin	0,35	1,15	12,1	1,15
Ergosterin	0,35	1,15	14,0	1,33
Stigmasterin	0,25	0,82	17,5	1,67
β -Sitosterin	0,24	0,79	21,5	2,05
	RP-HPTLC		Gaschromatographie (TMS-Derivate)	

Tab. I. Chromatographische Daten der Sterinkomponenten.

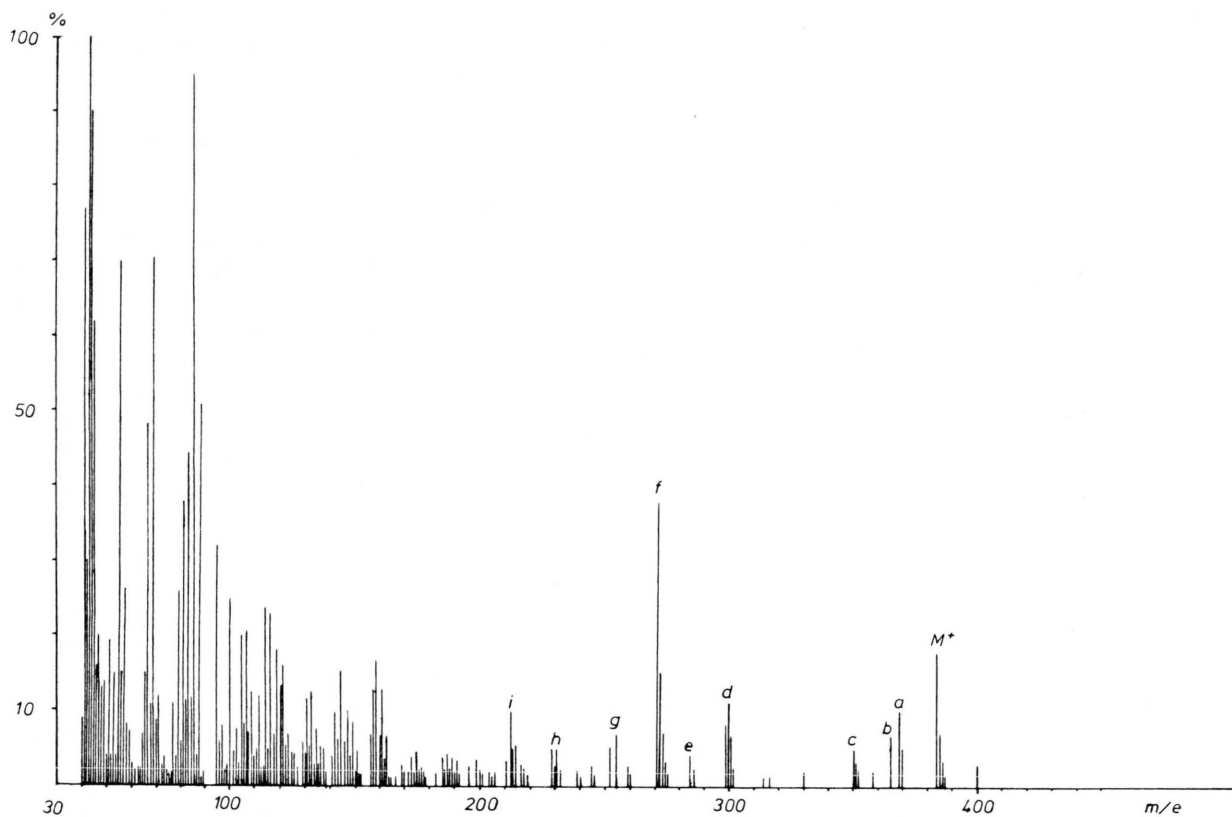


Abb. 1. EI-Massenspektrum von isoliertem Desmosterin.

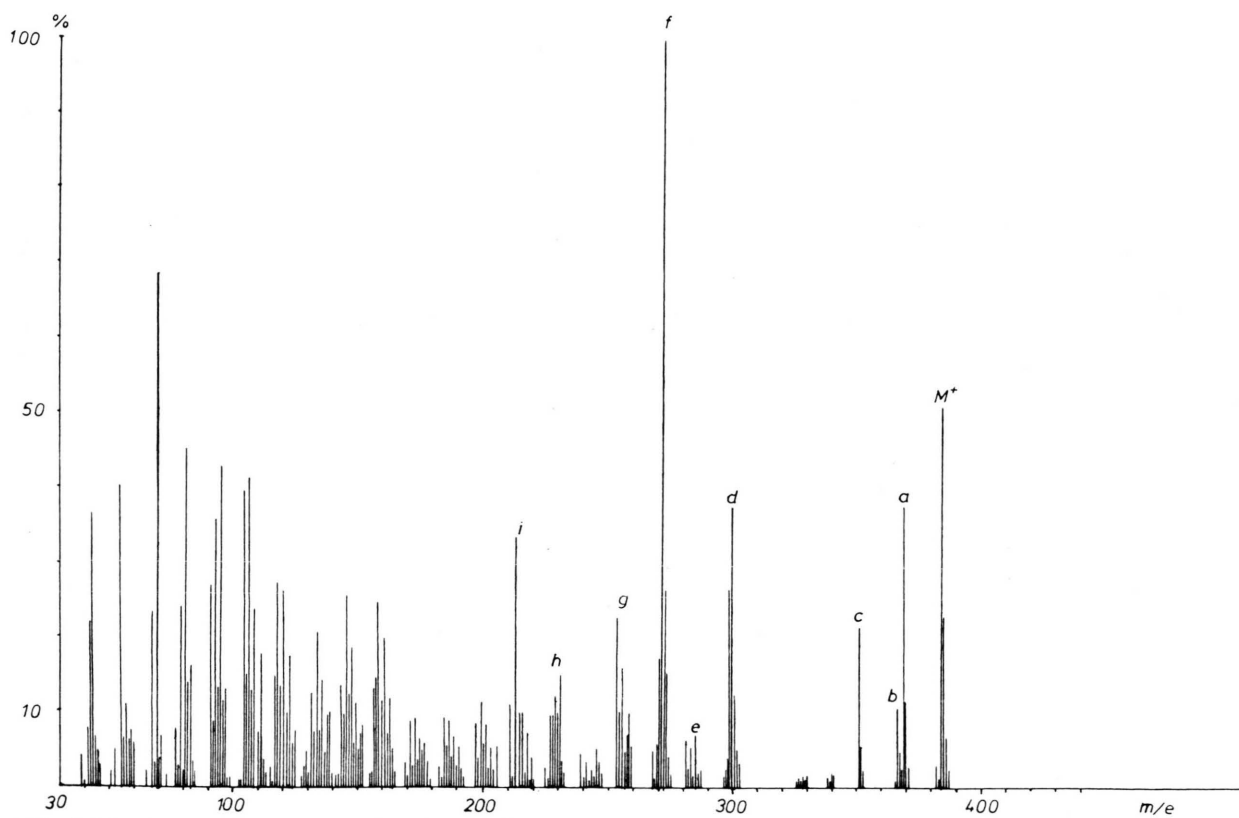


Abb. 2. EI-Massenspektrum von authentischem Desmosterin.

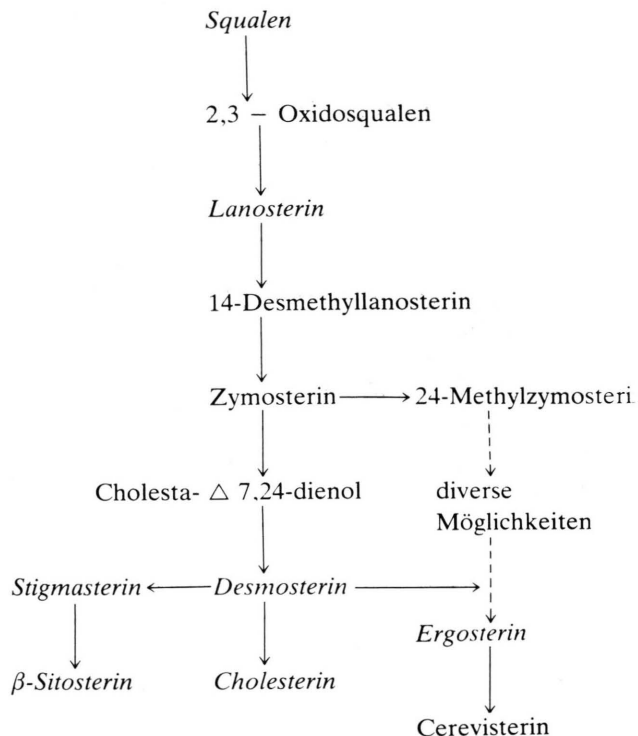
grund von DC- und GC-Untersuchungen von Merdinger *et al.* [3] bekannt, daß Ergosterin und Stigmasterin anzutreffen sind. Das Vorliegen von Squalen wird von den Autoren als wahrscheinlich angenommen. Vor einigen Jahren durchgeführte eigene Arbeiten bestätigten das Vorkommen von Ergosterin (EI-MS), außerdem wurde mittels HPLC Cerevisterin identifiziert [11].

Die nunmehr vorliegenden Ergebnisse belegen, daß außer den genannten Verbindungen noch Lanosterin, Desmosterin, Cholesterin und β -Sitosterin vorhanden sind. Sie konnten durch mehrere Analysetechniken identifiziert werden, wobei der EI-Massenspektroskopie die bedeutendste Rolle zukommt. Dieser Befund unterstützt die Aussage, daß unbeeinflusst gewachsene Kulturen von Ascomyceten in der Lage sein können, Vertreter aus jeder Steringruppe (Cholestanserie, Ergostanserie, Stigmastanserie) zu synthetisieren [5].

Darüber hinaus läßt der Nachweis von Metaboliten wie Squalen, Lanosterin und Desmosterin die Aufstellung eines generellen Syntheseschemas der Sterine, ausgehend von Squalen, sowohl für *Botrytis cinerea* als auch für *Aureobasidium pullulans* zu (s. Syntheseschema).

Die kursiv gedruckten Verbindungen sind in der vorliegenden Arbeit hinreichend identifiziert worden. Lanosterin wurde wie auch Desmosterin und Cholesterin zuvor in Phycomyceten nachgewiesen, Lanosterin und Desmosterin außerdem in Hefen [12].

Der Nachweis von Desmosterin gestaltete sich schwierig, da die Verbindung offensichtlich vom Pilz schnell zu Cholesterin und Stigmasterin umgesetzt wird.



Dank

Wir danken der Meßabteilung des Organisch-chemischen Instituts der Universität Mainz für die Aufnahme der Massenspektren sowie Frau Margot Krummeck für technische Unterstützung.

- [1] Y.S. Chen und R.H. Haskins, *Can. J. Chem.* **41**, 1647–1650 (1963).
- [2] N.J. McCorkindale, S.A. Hutchinson, B.A. Pursey, W.T. Scott und R. Wheeler, *Phytochemistry* **8**, 861–867 (1969).
- [3] E. Merdinger, P. Kohn und R.C. McClain, *Can. J. Microbiol.* **14**, 1021–1027 (1968).
- [4] P. Flesch, L. Gwinner, P. Simon und S. Müller, *Z. Naturforsch.* **38c**, 207–211 (1983).
- [5] P. Flesch und L. Robbel, *Z. Naturforsch.* **35c**, 88–92 (1980).
- [6] E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie*. Springer Verlag, Berlin 1962.

- [7] Z.V. Zaretskij, *Mass-Spectrometry of Steroids*. Halsted Press, New York 1976.
- [8] C. Brunnée und W. Nickels, *Forschungsberichte der Atlas Meß- und Analysetechnik GmbH*, Bremen 1962.
- [9] R. Ryhage und E. Stenhagen, *J. Lipid. Res.* **1**, 361–390 (1960).
- [10] G. Spiteller, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*. Verlag Chemie, Weinheim 1966.
- [11] P. Simon, *Diplomarbeit im Inst. f. Biochemie*, Mainz 1980.
- [12] J.D. Weete, *Fungal Lipid Biochemistry*. Plenum Press, New York 1974.