

Zusammenfassung.

Mit Hilfe des chromatographischen Aufteilungsverfahrens an Al_2O_3 und durch Papierchromatographie liessen sich im Chloroform-extrakt eines neuen Handelsmusters von Ch'an Su 11 Bufogenine nachweisen, wovon 10 in reiner Form präparativ herausgearbeitet werden konnten, während das elfte (Substanz B = Desacetyl-bufotalin) nur auf indirektem Wege (durch Verseifung von Bufotalin) rein erhalten werden konnte. Die einzelnen Bufogenine waren im untersuchten Ch'an-Su-Muster in folgenden Mengen enthalten (bezogen auf die rohe Droge): Cinobufagin 4,2–4,5 %, Resibufogenin (roh) 1,7–2 %, Bufalin 1,25–1,5 %, Cinobufotalin 1,0 — 1,2 %, Gamabufotalin 0,85 bis 1,0 %, Bufotalin 0,6–0,8 %, Telocinobufagin 0,5–0,6 %, Substanz A = Desacetyl-cinobufagin 0,3–0,4 %, Substanz C = Hellebrigenin 0,17–0,2 %, Substanz D = Desacetyl-cinobufotalin 0,12–0,15 %, Substanz B = Desacetyl-bufotalin 0,10 — 0,15 %.

Die 4 in dieser Arbeit als Substanzen A, B, C und D bezeichneten Bufogenine sind zum ersten Mal im Ch'an Su aufgefunden worden.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

144. Versuche zur Aufklärung der Fettsäurebildungen bei Mikroorganismen

von Karl Bernhard, Leo Abisch und Heribert Wagner.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(29. V. 57.)

Für die Bildung der Fettsäuren in der Pflanze wurden zahlreiche Reaktionsmechanismen in Betracht gezogen¹⁾. In bezug auf die Dynamik solchen Geschehens darf man wohl annehmen, nicht alle in den Zellen nachweisbaren Fettsäuren entstünden darin gleichzeitig und in von Anfang an feststehenden Verhältnissen bzw. Mengen. Es ist vielmehr denkbar, Verbindungen mit besonderer funktioneller Bedeutung würden im Verlaufe des Wachstums zuerst gebildet, andere indessen erst in einem späteren Zeitpunkte in Erscheinung treten.

Frühere Untersuchungen liessen erkennen, dass der in Glucoselösung leicht kultivierbare und ein gut abtrennbares Mycel produzierende Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* Lipide von vielseitiger

¹⁾ T. P. Hilditch, Nature **167**, 298 (1951); Ann. Rev. Biochemistry **22**, 128 (1953); Oléagineux **10**, 83 (1955). — T. P. Hilditch, The Chemical Constitution of Natural Fats, London, S. 468 (1947).

Fettsäurezusammensetzung aufbaut²⁾). Nachdem Acetyl-Coenzym-A offenbar den wichtigsten Baustein der biologischen Fettsynthese darstellt, bestand die Möglichkeit, durch Zugabe geringer Mengen radioaktiven Acetates zur Nährösung eine Signierung der entstehenden Fettsäuren zu erreichen und auf Grund gegebenenfalls feststellbarer Aktivitätsunterschiede Einblicke in die Bildung der einzelnen Komponenten zu gewinnen.

Der Nachweis solcher Unterschiede und Sequenzen bei der Entstehung der Pilzfettsäuren setzte indessen eine einwandfreie quantitative Trennung der einzelnen Komponenten zur exakten Messung ihrer spezifischen Aktivität voraus. Nachdem uns die Ausarbeitung einer quantitativen papierchromatographischen Methode zur Analyse kleiner Mengen von Fettsäuregemischen³⁾ und im Falle aktiven Materials auch eine hinreichend exakte Bestimmung der Aktivitätsverteilung auf die einzelnen Bestandteile gelang, durfte eine erfolgreiche Bearbeitung solcher Probleme gesichert erscheinen.

Wir haben den Schimmelpilz in glucosehaltiger Nährösung in 9 Gruppen zu je 10 Kulturen gezüchtet und der ersten Gruppe bei der Impfung, der zweiten nach 24 Stunden, der dritten nach 2 Tagen usw. und schliesslich der neunten nach 8 Tagen eine bestimmte Menge ¹⁴C-Acetat zugefügt. Beim ersten Ansatz stand dasselbe also von Beginn des Wachstums an zur Verfügung, bei den folgenden Ansätzen jeweilen immer erst einen Tag später. Einzelne Versuche haben wir nach einigen Wochen wiederholt. Nach neun Tagen trennten wir die erhaltenen Mycelien ab, bestimmten ihre spezifische Aktivität und auch diejenige der verbleibenden Nährösung (Tab. 1). Dann gewannen wir durch Extraktion die Lipide und daraus Unverseifbares und Fettsäuren. Diese trennten wir über die Bleisalze in feste und flüssige Anteile und fanden im Mittel von 12 Versuchen 40,8 bzw. 59,2%. Die spezifischen Aktivitäten sind in der Tab. 2 angeführt, aus welchen sich unter Berücksichtigung der erhaltenen Fettsäuremengen der prozentuale Acetat-Einbau bezogen auf die applizierte Aktivität berechnen liess. In der Folge haben wir eine papierchromatographische Trennung sowohl des Gemisches der flüssigen als auch der festen Fettsäuren durchgeführt und den Anteil der einzelnen Komponenten am Gesamtgemisch erhalten (vgl. Tab. 3). Die Zusammensetzung der flüssigen Fettsäuren wurde mittels des Isomerisierungs-Verfahrens nachgeprüft und bestätigt.

Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Fettsäureflecken auf dem Papier erfolgte vermittelst einer automatischen Zählapparatur. Die errechneten prozentualen und spezifischen Aktivitäten sind in der Tab. 4 dargestellt.

²⁾ K. Bernhard & H. Albrecht, *Helv.* **31**, 977, 2214 (1948); H. Albrecht, Dissertation, ETH. Zürich, 1948.

³⁾ H. Wagner, L. Abisch & K. Bernhard, *Helv.* **38**, 1536 (1955).

Tabelle 1.
Aktivitäten von Mycel und Nährösung.

Ver- suchs- Nr.	Aktives Acetat		Mycel			Nährösung		
	Tag der Zugabe	c/min ·10 ⁷	Gewicht g	Spez. Aktivität ·10 ⁴	Aktivitäts- Einbau in %	Gewicht g	Spez. Aktivität ·10 ²	Aktivitäts- Einbau in %
1	0	4,70	3,82	—	—	20,88	—	—
2	0	15,00	3,28	1,41	30,8	20,40	5,84	7,94
3	1	7,65	3,47	1,17	53,0	20,34	1,75	4,64
4	2	7,73	3,53	1,23	56,0	19,43	3,22	8,09
5	3	9,30	3,40	1,40	51,1	19,93	1,80	3,86
6	3	14,10	3,60	1,88	48,0	21,40	3,14	4,76
7	4	9,10	3,42	1,17	44,4	21,25	1,57	3,70
8	4	14,10	3,51	0,68	19,4	22,80	1,64	2,67
9	5	7,60	3,47	0,89	40,6	21,08	—	—
10	6	9,83	3,97	1,07	43,2	17,04	3,59	6,22
11	6	17,00	3,35	1,11	21,9	16,85	4,18	4,15
12	7	8,00	3,46	0,83	35,9	22,60	1,92	5,41
13	8	14,00	3,54	1,03	26,0	20,85	1,85	2,76

Tabelle 2.

Spezifische Aktivitäten der Fettsäuren und des Unverseifbaren.

Acetat- Zugabe Tage	Spezifische Aktivität ·10 ⁴			% Einbau			Unver- seif- bares	
	Fettsäuren		Unver- seif- bares	Fettsäuren		Unver- seif- bares		
	gesamt	feste		gesamt	feste	flüssige		
0	—	2,03	7,34	3,66	—	3,41	2,37	6,46
0	7,00	2,24	6,44	4,88	12,30	1,28	5,54	3,58
1	4,79	1,12	4,80	3,20	10,9	0,85	5,21	4,10
2	6,50	2,27	6,10	5,30	14,6	1,03	4,90	4,32
3	5,18	3,63	6,00	5,30	14,6	3,24	6,96	3,48
3	6,56	4,50	7,61	10,10	19,1	4,02	10,50	3,52
4	5,00	5,03	4,30	2,90	15,3	4,36	5,31	1,79
4	6,26	7,72	4,98	4,32	7,45	1,54	1,73	2,33
5	3,67	2,71	2,25	1,96	7,73	2,25	2,34	2,89
6	4,75	4,66	4,31	2,08	12,10	2,80	3,55	5,04
6	5,25	4,61	5,05	4,87	8,30	2,61	3,50	1,78
7	3,00	3,06	2,99	2,78	8,40	1,99	2,35	2,57
8	4,10	3,55	3,50	2,78	7,85	2,03	1,80	1,79

Tabelle 3.
Zusammensetzung des Fettsäuregemisches.

Höhere Fettsäuren (C ₂₂ —C ₂₆)	24%	Ölsäure	26%
Stearinsäure	4%	Linolsäure	17%
Palmitinsäure	13%	γ-Linolensäure	16%

Tabelle 4.

Aktivitäten der einzelnen Fettsäuren.

A = Aktivität in % der Aktivität der Gesamt-Fettsäuren.

B = Spezifische Aktivität, $a \cdot 10^4$.

Acetat-Zugabe Tage	Höhere Fettsäuren		Stearinsäure		Palmitinsäure		Ölsäure		Linolsäure		Linolensäure	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	3,6	0,75	2,9	3,4	11,2	4,3	23,1	4,4	12,4	3,5	46,4	14,7
1	5,2	0,72	2,5	2,0	6,3	1,6	28,6	3,6	13,6	2,6	43,8	9,3
2	10,0	1,9	3,4	3,7	7,0	2,5	32,2	5,6	13,1	3,4	34,3	10,0
3	13,6	3,3	4,5	6,1	10,9	4,9	27,5	5,3	10,6	3,0	32,9	10,5
4	36,0	8,2	2,9	3,6	9,4	3,8	20,1	3,5	15,2	4,0	19,4	5,7
5	33,2	3,4	2,9	1,7	9,1	1,7	18,8	1,8	18,8	2,6	17,2	2,7
6	21,8	4,2	3,8	4,1	15,2	5,5	22,7	4,0	20,8	5,6	15,6	4,8
7	15,3	2,0	5,5	4,4	21,1	5,0	20,8	2,4	20,8	3,6	17,4	3,4
8	15,8	2,4	6,1	5,1	19,1	5,3	25,8	3,5	20,5	4,1	12,8	2,9

Experimentelles.

Pilzzüchtung. Dieselbe vollzog sich, wie früher angegeben²⁾, in einer Nährösung, enthaltend 50 g Glucose, 2 g Asparagin, 1 g Hefeeextrakt, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g KH_2PO_4 und 50 γ Aneurin pro 1 Wasser. Für jede Versuchsserie verwendeten wir 10 Erlenmeyer-Kolben von 300 ml mit je 50 ml Nährösung, die 20 Min. bei 125° sterilisiert wurden. Die Impfung erfolgte mit 3 Tropfen einer wässrigen Sporen-Suspension von *Phycomyces Blakesleeanus*. Die Kulturen wurden vor direktem Sonnenlicht geschützt und in einem Temperatur-konstanten Raum bei 20° gehalten und ihr Standort zwecks regelmässiger Belichtung turnusmässig gewechselt. Die Zugabe des radioaktiven Acetates bedingte keinerlei Infektionen. Die Mycelien eines jeden Ansatzes haben wir nach Abbruch des Versuches von der Nährösung getrennt, mit destilliertem Wasser ausgewaschen, im Vakuumtrockenschränk bei 45° getrocknet und dann auf Fettsäuren aufgearbeitet (Ausbeuten der einzelnen Gruppen zu 10 Kulturen siehe Tab.).

Tag der Acetat-Zugabe	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Fettsäuren: in mg . . .	261	174	174	263	275	160	250	224	268
in % des Mycelgewichtes	6,8	5,0	4,9	7,7	8,0	4,6	6,3	6,5	8,1

Alle Fettsäuregemische wurden papierchromatographisch analysiert³⁾ und andererseits papierchromatographisch getrennt und auf ihre Aktivität geprüft. Von jedem Gemisch haben wir gleichzeitig zwei Proben auf einem Papierstreifen chromatographiert, denselben auseinander geschnitten und auf der einen Hälfte die Säureflecken in der angegebenen Weise sichtbar gemacht. Aus der zweiten Hälfte des Papiers wurde ein 2 cm breiter Streifen so ausgeschnitten, dass seine Mittellinie senkrecht zur Startlinie lag und durch den Startpunkt ging. Den Bereich der Fettsäureflecken haben wir sodann in 1 cm lange Stücke geschnitten, dieselben auf Kupferplättchen geklebt und im Tracerlab Super-scaler die Aktivität bestimmt, indem 3 mal 600 Stösse gezählt wurden⁴⁾. Die Resultate

⁴⁾ L. Abisch, Dissertation, Basel 1956.

trugen wir auf Millimeterpapier auf, wobei wir für jede Säure die den Nullwert (30–31 Stöße/Min.) übersteigenden Stosszahlen addierten (vgl. Fig. 1). Aus diesen Werten wurde das prozentuale Verhältnis der Aktivitäten berechnet.

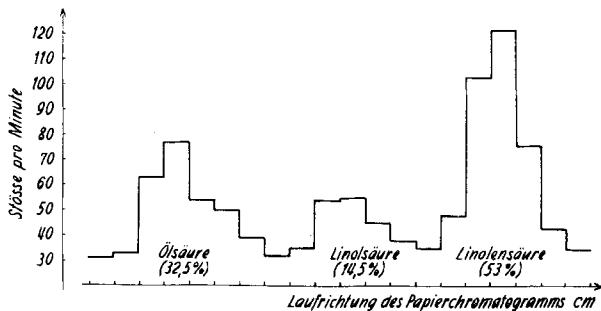


Fig. 1.

Messung der Aktivität flüssiger Fettsäuren nach papierchromatographischer Trennung.

Die prozentualen Aktivitätsverteilungen trug man in ein Koordinatensystem ein (vgl. Fig. 2) und berechnete für die erhaltenen Punktscharen ihre Regressionsgrade und ihr Bestimmtheitsmass B. Dabei wurde in einigen Fällen ein aufsteigender und ein absteigender Ast (0.—4. Tag, 5.—8. Tag) unterschieden. Es ergaben sich für das Bestimmtheitsmass B folgende Werte:

	B		B
γ -Linolensäure	0,91	Ölsäure	0,35
Höhere Fettsäuren: 0.—4. Tag	0,93	Palmitinsäure	0.—4. Tag
5.—8. Tag	0,88		5.—8. Tag
Linolsäure	0.—3. Tag	Stearinsäure	0.—3. Tag
4.—8. Tag	0,69		4.—8. Tag
			0,71

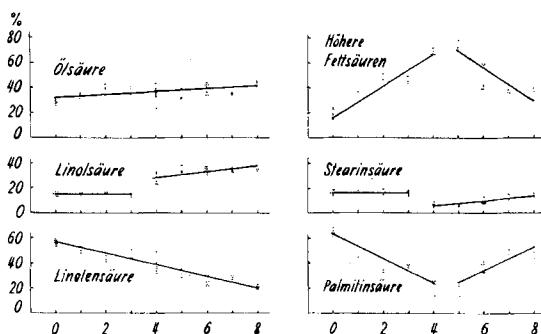


Fig. 2.

Die hohen B-Werte von 0,93, 0,88, 0,93 zeigen an, dass die berechneten Geraden der wirklichen Verteilung der Punkte sehr gut entsprechen. Für die Werte 0,71, 0,69 lässt sich feststellen, dass noch rund 70% der Punkte einer Geraden zugehören. Indessen besteht bei ganz kleinen Werten keine Abhängigkeit der y- von den x-Werten. Diese Geraden verlaufen fast horizontal.

Diskussion der Ergebnisse.

Die wie oben beschrieben von jeder Versuchsserie gesammelten und verseiften Pilzmycete enthielten im Mittel 6,9% des Mycelgewichtes an Fettsäuren. Unverseifbares und Fettsäuren erwiesen sich als radioaktiv, und es ergaben sich hinsichtlich der spezifischen Aktivität der einzelnen Fettsäuren charakteristische Unterschiede (siehe Fig. 3). Nach Acetatzugabe im Zeitpunkte der Impfung wies die γ -Linolensäure die höchste Aktivität auf. Da sie also bevorzugt synthetisiert wird, kommt ihr offensichtlich eine besondere Bedeutung für das Pilzwachstum zu. Die Linolsäure besaß in den ersten Tagen des Wachstums eher eine geringe, später in der reproduktiven Phase aber höhere Aktivität. Einen ausgesprochenen Aktivitätsanstieg zeigten während der vegetativen Phase die höheren Säuren mit 22–26 C-Atomen. Ölsäure dürfte während der ganzen Dauer des Pilzwachstums gleichmäßig auf- bzw. abgebaut werden und ist auf Grund der ihr zukommenden Aktivität keinesfalls die Muttersubstanz für die Synthese höher ungesättigter Säuren. *Simmons & Quackenbush*⁵⁾ haben die Fettbildung bei Sojabohnen durch Züchtung in radioaktiver Glucose-haltiger Nährlösung untersucht und höchste Aktivitäten in der Ölsäure, geringere in den gesättigten Säuren, der Linol- und der Linolensäure festgestellt. Es wird daraus geschlossen, Ölsäure werde weitgehend in die andern Fettsäuren umgewandelt.

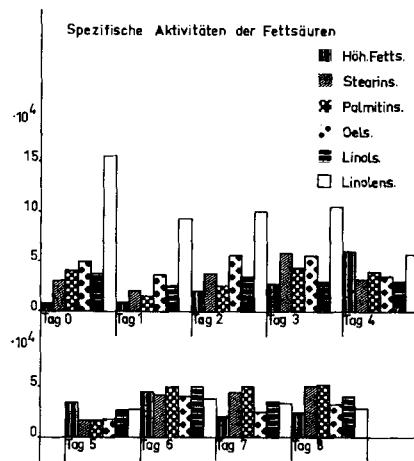


Fig. 3.

⁵⁾ R. O. Simmons & F. W. Quackenbush, J. Amer. Oil Chemist Soc. 31, 441 (1954).

Wir stellten für die meisten der geprüften Säuren im Zeitpunkte des Überganges von der vegetativen zur reproduktiven Phase (5–6 Tage) ausgesprochene Änderungen in der Aktivitätsverteilung als sichtbaren Ausdruck sich vollziehender Stoffwechselumstellungen fest.

Bei den hier mitgeteilten Befunden haben wir alle Mycelien nach neuntägigem Wachstum aufgearbeitet, wobei der Zeitpunkt der Acetatzugabe verschieden gewählt wurde. Über weitere Versuche bei einheitlicher Acetatzugabe zu Beginn der Impfung, aber zu verschiedenen Zeiten des Pilzwachstums durchgeführter Aufarbeitungen und Aktivitätsbestimmungen werden wir später berichten.

Für die mitgeteilten Untersuchungen erfreuten wir uns einer finanziellen Unterstützung durch die *CIBA-Stiftung*, Basel, was wir dankbar hervorheben möchten.

Zusammenfassung.

Wir versuchten mit Hilfe der Isotopentechnik Einblicke in den Bildungsmechanismus von Fettsäuren bei Pflanzen zu gewinnen und verwendeten als zweckmässiges Objekt den zum Aufbau vielseitig zusammengesetzter Lipide befähigten Mikroorganismus *Phycomyces Blakesleeanus*. Zugabe von radioaktivem Acetat an aufeinanderfolgenden Tagen nach vorgenommener Beimpfung zur glucosehaltigen Nährösung führte zu ^{14}C -Fettsäuren, die durch Papierchromatographie quantitativ untersucht und auf ihre Aktivität geprüft wurden.

Nach Acetatzugabe im Zeitpunkte der Impfung wies die γ -Linolensäure die höchste spezifische Aktivität auf. Sie wird bevorzugt gebildet und ist für das Pilzwachstum vielleicht besonders wichtig.

Die Fettsäuren mit 22, 24 und 26 C-Atomen zeigten anfänglich eine geringe, später eine bemerkenswerte Aktivität und verhielten sich somit der Linolensäure entgegengesetzt.

Die Aktivität der Ölsäure und der Linolsäure war während der ganzen Versuchsperiode nur geringen Veränderungen unterworfen. Ölsäure wird offenbar nicht in höher ungesättigte Säuren übergeführt.

Für die Palmitinsäure, die von den gesättigten Fettsäuren die höchste Aktivität besass, ergaben sich gewisse Veränderungen, nicht aber für die Stearinäure.

Die Aktivitäten aller untersuchten Säuren veränderten sich während des Überganges des Mikroorganismus von der vegetativen zur reproduktiven Phase deutlich.

Basel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.