

# Der Gehalt an Gallus- und Protocatechusäure in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand von *Phycomyces blakesleeanus* Bgff.

Gallic and Protocatechuic Acid Content during the Development of *Phycomyces blakesleeanus* Bgff.

Gerhard Sandmann und Willy Hilgenberg

Botanisches Institut der J. W. Goethe-Universität, Siesmayerstr. 70, D-6000 Frankfurt

Z. Naturforsch. **34 c**, 747 – 750 (1979); eingegangen am 2. Juli 1979

*Phycomyces blakesleeanus*, Gallic Acid, Protocatechuic Acid, Zinc Stimulation, Light Inhibition

A quantitative determination method of gallic and protocatechuic acid in cultures and liquid nutrient of *Phycomyces blakesleeanus* was described. Both phenolic acids were separated by TLC and the colour reaction with Folin reagent was used for a colorimetric test. This procedure was employed for investigating the formation of gallic and protocatechuic acid in cultures with optimal ( $10^{-4}$  M) and reduced ( $1.3 \times 10^{-6}$  M) zinc supply showing that their production is stimulated by zinc ions.

In addition, the inhibiting effect of light on the accumulation of gallic acid was manifested, however, its excretion into the medium was unaffected by light and protocatechuic acid was not excreted at all.

During the development of *Phycomyces* gallic and protocatechuic acid could be detected in two days old mycelium. With the sporangiophore production both acids are accumulated more rapidly in the sporangiophores. After the end of sporangiophore formation the gallic acid content increases only slightly. In contrast the total content of protocatechuic acid decreases sharply. As no excretion occurs a degradation of at least protocatechuic acid must be taken into consideration.

## Einleitung

Bernhard und Albrecht [1] konnten Gallus- und Protocatechusäure als Stoffwechselprodukte in *Phycomyces blakesleeanus* nachweisen. Mit der Biogenese dieser beiden Phenolcarbonsäuren bei *Phycomyces* beschäftigten sich Brucker und Hashem [2, 3] und Haslam *et al.* [4] in den folgenden Jahren. Als Biosynthesewege wird die Bildung aus 5-Dehydroshimikisäure [4] oder aus Abbauprodukten des Tyrosins und anderer Aminosäuren diskutiert [5, 6]. Auf Grund von hemmungsanalytischen Studien schlossen Brucker und Hashem auf eine unterschiedliche Biogenese von Gallus- und Protocatechusäure [2].

Bei allen quantitativen Bestimmungen wurden bisher nie getrennte Werte für Gallus- und Protocatechusäure angegeben. So wurde in den Arbeiten von Brucker und Mitarbeitern der Gesamtphenolgehalt dieser Substanzen mit KOH bestimmt [7]. Ähnlich verfahren Haslam *et al.* [4], die die Gallussäurekonzentration aus einem wässrigen Extrakt von *Phycomyces* nach Zugabe von Kaliumjodat colorimetrisch ermittelten. Dennison [8] bestimmte den Gehalt an Phenolcarbonsäuren der Sporangiophoren durch direkte Messung der Absorption eines Preßsaftes bei

290 nm. Das Vorhandensein der Gallussäure im Extrakt wies er mit Hilfe der Papierchromatographie nach.

In der vorliegenden Arbeit wird ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Trennung von Gallus- und Protocatechusäure beschrieben. Nach Anfärbung mit einem phenolspezifischen Reagenz können erstmals getrennt Gallus- und Protocatechusäure in Sporangiophoren, Mycel und Nährlösung von *Phycomyces* quantitativ bestimmt werden. Physiologische Faktoren wie Belichtung der Kulturen und unterschiedliche Zinkionen-Konzentrationen im Nährmedium üben einen starken Einfluß auf das Wachstum und die Sporangiophorenproduktion von *Phycomyces* aus [9]. Ob dabei Konzentrationsunterschiede an Gallus- und Protocatechusäure auftreten, sollte mit dem beschriebenen Bestimmungsverfahren untersucht werden.

## Material und Methoden

*Phycomyces blakesleeanus* Stamm 1+ der Sammlung Halbsguth wurde in einem Asparagin-Glucose Nährmedium nach Bürstell und Hilgenberg [10] kultiviert. Der Pilz wuchs entweder im Dauerdunkel oder im Dauerlicht ( $5 \times 10^4$  erg · cm<sup>-2</sup> · sec<sup>-1</sup>) zweier Philips Leuchtstoffröhren TL 55 und TL 32 de Luxe heran.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Willy Hilgenberg.

0341-0382/79/0900-0747 \$ 01.00/0

Die  $Zn^{2+}$ -Konzentration der Nährlösung (NL) nach Zugabe von  $ZnSO_4$  betrug  $10^{-4}$  M, die NL ohne Zinkzusatz (Zn arme NL) enthielt im Durchschnitt  $1,3 \times 10^{-6}$  M  $Zn^{2+}$ . Die Zn-Bestimmung der Zn-armen NL erfolgte mit einem Atomabsorptions-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer, Modell 290 B. Nach dem Ernten wurden die Kulturen entweder in Sporangiophoren und Mycel getrennt oder ungetrennt 5 Tage lang gefriergetrocknet und mit einer Kugelmühle (Teflonbehälter mit Korundkugeln) unter  $CO_2$ -Kühlung zerkleinert. Die Extraktion der Phenolcarbonsäuren erfolgte nach Zugabe von Methanol über 20 Stunden bei  $4^\circ C$ . Das Filtrat wurde eingengt, mit Wasser versetzt und auf pH 2,5 eingestellt. Dieser angesäuerte Extrakt wie auch die angesäuerte Nährlösung wurden 3mal mit peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem  $Na_2SO_4$  getrocknet, am Rotationsverdampfer eingedampft und in einem definierten Volumen aufgenommen.

Die Trennung der Säuren wurde dünnschichtchromatographisch auf einer Kieselgel-G-Platte mit dem Laufmittel Diisopropyläther/Essigsäure (95 : 5) durchgeführt. Gallus- und Protocatechusäure wurden durch Co-Chromatographie mit Vergleichssäuren identifiziert. Die  $R_F$ -Werte betragen für Gallussäure 0,69 und für Protocatechusäure 0,81. Zur Sichtbarmachung und quantitativen Auswertung wurden die Platten erst mit 20%  $Na_2CO_3$ -Lösung und dann mit Folin-Ciocalteus-Reagenz, 1 : 10 verdünnt, besprüht. Nach 10-minütigem Erhitzen auf  $100^\circ C$  wurden die angefärbten Flecke der Gallus- und Protocatechusäure ausgekratzt, mit 2 ml Wasser versetzt und kurz zentrifugiert. Danach wurde die Färbung sofort bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Zur Aufstellung der Eichkurven wurden definierte Mengen Gallus- und Protocatechusäure auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, chromatographiert und wie beschrieben bestimmt.

## Ergebnisse

Das in Material und Methoden beschriebene Trennungs- und Bestimmungsverfahren erwies sich als gut geeignet für die Bestimmung von Gallus- und Protocatechusäure aus Kulturextrakten und aus der Nährlösung von *Phycomyces*. Die untere Grenze des Verfahrens liegt um etwa  $0,5 \mu g$  sowohl für Gallus- als auch für Protocatechusäure. Die aufgestellten Eichkurven gehen für beide Säuren durch den Null-

punkt und verlaufen bis etwa 0,1 Extinktionseinheit als Gerade. Über diesen Wert hinaus flachen die Kurven ab und gehen in eine weitere Gerade mit geringerer Steigung über.

In Tab. I sind die unter verschiedenen Kulturbedingungen im Pilz akkumulierten und in die Nährlösung ausgeschiedenen Gallussäuremengen angegeben. So bewirkt die Erhöhung des Zn-Gehalts des Nährmediums auf  $10^{-4}$  M eine 4 bis 6fache Steigerung der Gallussäureproduktion. Starke Unterschiede treten dabei sowohl im Gallussäuregehalt des Pilzes als auch bei der ausgeschiedenen Menge auf. Der Gallussäuregehalt wird deutlich erhöht, wenn die *Phycomyces*kulturen im Dunkeln angezogen werden. Diese Zunahme bezieht sich überwiegend auf die Kulturen selbst. Die Lichtverhältnisse scheinen dagegen auf die ausgeschiedene Menge keinen Einfluß zu haben. Auch die Bildung der Protocatechusäure ist von der Zn-Konzentration der Nährlösung abhängig, hier wird ebenfalls eine höhere Produktion durch höhere Zn-Gaben erzielt (Tab. II). Allerdings zeigen Hell- und Dunkelkulturen bei gleichem Zinkangebot keine Unterschiede in der Protocatechusäurekonzentration. Für Protocatechusäure war im Gegensatz zur Gallussäure keine Exkretion in das Außenmedium festzustellen. Sowohl in der

Tab. I. Gallussäuregehalt (mg/g Tg) von *Phycomyces* in 5 Tage alten Hell- und Dunkelkulturen und deren Nährlösung bei unterschiedlichem Zinkgehalt der Kulturlösung.

		Gehalt der Kultur	Gehalt der Nährlösung	Gesamtmenge
mit Zn-Zusatz	Hellkultur	$2,54 \pm 0,66$	$2,97 \pm 0,39$	5,51
	Dunkelkultur	$5,56 \pm 1,52$	$3,30 \pm 0,43$	8,86
Zn-arm	Hellkultur	$0,18 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,49$	1,47
	Dunkelkultur	$0,37 \pm 0,06$	$1,21 \pm 0,47$	1,58

Tab. II. Protocatechusäuregehalt (mg/g Tg) von *Phycomyces* in 5 Tage alten Hell- und Dunkelkulturen bei unterschiedlichem Zn-Gehalt der Nährlösung.

	mit Zn-Zusatz	Zn-arm
Hellkulturen	$0,41 \pm 0,15$	$0,012 \pm 0,005$
Dunkelkulturen	$0,41 \pm 0,19$	$0,013 \pm 0,004$

In der Nährlösung war keine Protocatechusäure nachzuweisen.

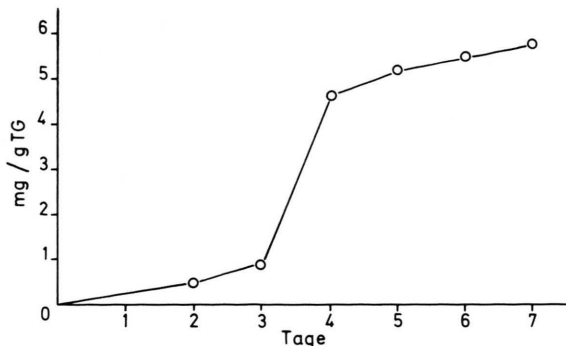


Abb. 1. Gallussäureakkumulation in Dunkelkulturen im Laufe der Entwicklung. Der Zn-Gehalt der Nährlösung betrug  $10^{-4}$  M.

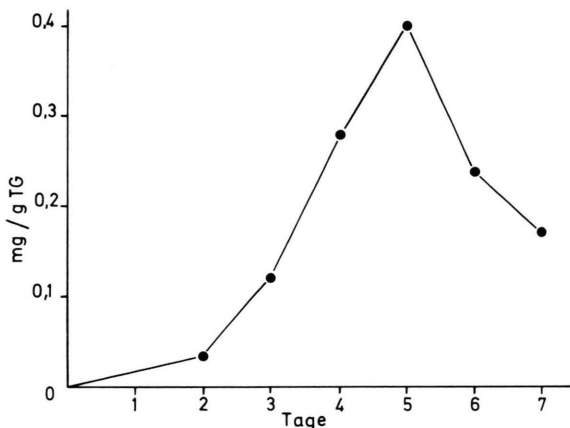


Abb. 2. Protocatechusäureakkumulation in Dunkelkulturen im Laufe der Entwicklung. Der Zn-Gehalt der Nährlösung betrug  $10^{-4}$  M.

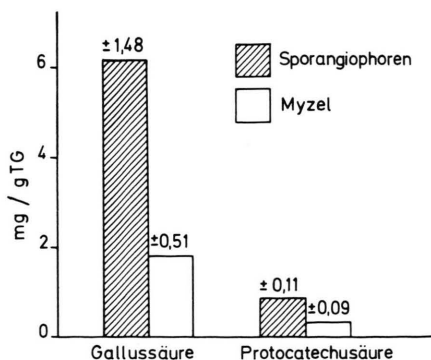


Abb. 3. Gallus- und Protocatechusäurekonzentration von Sporangiphoren und Myzel einer 5 Tage alten Dunkelkultur mit Zinkzusatz.

Nährlösung von 5 als auch 7 Tage alten Kulturen ließ sich Protocatechusäure nicht nachweisen.

Bereits 2 Tage nach dem Impfen ist Gallussäure in der Kultur zu finden (Abb. 1). Der Gehalt nimmt bis zum 3. Tag langsam zu, dann erfolgt ein steiler Anstieg bis zum folgenden Tag. Ab dem 4. Tag liegt die Zuwachsrate wieder in der gleichen Größenordnung wie zwischen dem 2. und dem 3. Tag. In Abb. 2 ist der Verlauf der Bildung von Protocatechusäure während der Entwicklung aufgezeigt. Bis zum 5. Tag ist der Kurvenverlauf ähnlich wie für die Gallussäure. Doch vom 5. Tag an nimmt der Protocatechusäuregehalt der Kultur merklich ab. Am 7. Tag ist nur noch etwa 50% der Höchstmenge, die am 5. Tag erreicht ist, vorhanden. Abb. 3 läßt erkennen, daß der steile Anstieg der Bildung beider Phenolcarbonsäuren auf die in diesem Zeitraum stattfindende Ausbildung der Sporangiphoren zurückzuführen ist. Der Gehalt an Gallussäure und Protocatechusäure liegt in den Sporangiphoren jeweils um den Faktor 3 höher als im abgetrennten Mycel.

**Diskussion**

Ødegard [11] konnte zeigen, daß *Phycomyces blakesleanus* eine  $Zn^{2+}$ -Zugabe zum Nährmedium benötigt, um ein optimales Trockengewicht zu erreichen. Ein geringes Zinkangebot manifestiert sich, außer im Gesamtgewicht, in einem Rückgang der Sporangiphorenbildung [9]. Wie aus Tab. I und II zu entnehmen ist, gelang es erstmals, durch Zinkmangel die Produktion zweier Stoffwechselprodukte, in diesem Fall Gallus- und Protocatechusäure, deutlich zu reduzieren.

Der Einfluß des Lichts auf die Gallussäurebildung wirkt sich antagonistisch zu der stimulierenden Wirkung der Zinkionen aus. Die erhöhte Gallussäurebildung in Dunkelkulturen muß in Zusammenhang mit verschiedenen Reaktionen des Intermediärstoffwechsels von *Phycomyces* gesehen werden, die in Dunkelkulturen im Vergleich zu Hellkulturen verstärkt ablaufen. So liegt in Dunkelkulturen von *Phycomyces* ein deutlich höherer Gehalt an Alanin sowie Äpfel- und Citronensäure als in Hellkulturen vor [12]. Im Gegensatz zur Gallussäurebildung kann durch Belichtung keine Steigerung des Protocatechusäuregehalts der Kulturen, wie auch der Exkretion in die Nährlösung erreicht werden (Tab. II). Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Biosynthesewege für Gallus- und Protocatechusäure teilweise

unabhängig voneinander ablaufen. In der Nährlösung von 5 Tage alten *Phycomyces*kulturen war nur Gallussäure zu finden, nicht aber Protocatechusäure. Die Angabe von Bernhard und Albrecht [1] über Protocatechusäure in der Nährlösung von *Phycomyces*kulturen, die das Wachstum bereits eingestellt haben, läßt sich mit dem Freisetzen von Protocatechusäure durch Autolyse des Mycel erklären. In 2 Tage alten Kulturen ohne Sporangiothoren konnten bereits Gallus- und Protocatechusäure gefunden werden. Parallel zu dem Auftreten der ersten Sporangiothoren zwischen dem 3. und 4. Tag [13] setzt eine verstärkte Bildung der beiden Phenolcarbonsäuren ein. Eine bevorzugte Akkumulation in den Sporangiothoren ist aus Abb. 3 ersichtlich. Ein höherer Gesamtphenolgehalt der Sporangiothoren gegenüber dem Mycel wurde von Schröter [14] bereits angedeutet, doch fehlen in seiner Arbeit die entsprechenden Werte.

Nachdem der Höhepunkt der Sporangiothorenbildung überschritten ist, erfolgt die Gallussäurereak-

kumulation der Kultur wieder langsamer mit vergleichbaren Raten wie vor der Ausbildung der Sporangiothoren. Anders verhält sich jedoch der Gehalt an Protocatechusäure, er nimmt vom 5. Tag an deutlich ab. Da keine Exkretion in das Nährmedium erfolgt, ist durch diesen Befund ein Protocatechusäure abbauendes System in *Phycomyces* zu fordern. Die bisher vorherrschende Ansicht, daß die Phenolcarbonsäuren in *Phycomyces* Stoffwechselendprodukte darstellen [15], muß zumindest für Protocatechusäure revidiert werden. Protocatechusäure kann bei Pilzen über zwei Wege abgebaut werden. In *Neurospora crassa* erfolgt eine oxidative Umwandlung von Protocatechusäure zu  $\beta$ -Carboxymuconsäure und weiter über dessen Lakton zu  $\beta$ -Keto adipinsäure [16]. Andererseits kann der erste Schritt des Protocatechusäureabbaus eine Decarboxylierung zu Brenzkatechin sein, wie für *Aspergillus niger* beschrieben [17]. Möglicherweise wird in *Phycomyces* Protocatechusäure nichtoxidativ abgebaut, das Reaktionsprodukt Brenzkatechin wurde bereits in *Phycomyces* nachgewiesen [4].

- [1] K. Bernhard u. H. Albrecht, Helv. Chim. Acta **30**, 627 (1947).  
 [2] W. Brucker u. M. Hashem, Ber. Dtsch. Bot. Ges. **75**, 3 (1962).  
 [3] M. Hashem u. W. Brucker, Flora **152**, 57 (1962).  
 [4] R. Haslam, R. D. Haworth u. P. F. Knowles, J. Chem. Soc., **1961**, 1854.  
 [5] W. Brucker, Planta **48**, 627 (1957).  
 [6] W. Brucker u. U. Drehmann, Arch. f. Mikrobiol. **30**, 396 (1958).  
 [7] W. Brucker, Flora **142**, 343 (1955).  
 [8] D. S. Dennison, Nature **184**, 2036 (1959).  
 [9] W. Hilgenberg u. F. Hofmann, Physiol. Plant. **40**, 235 (1977).  
 [10] H. Bürstell u. W. Hilgenberg, Biol. Zbl. **94**, 235 (1975).  
 [11] K. Ødegard, Physiol. Plant. **5**, 583 (1952).  
 [12] G. Sandmann u. W. Hilgenberg, Z. Pflanzenphysiol., im Druck (1979).  
 [13] G. Sandmann u. W. Hilgenberg, Biochem. Physiol. Pflanzen, im Druck (1979).  
 [14] H. B. Schröter, Kulturpflanze, Beiheft **1**, 49 (1956).  
 [15] K. Bergmann, P. V. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C. N. David, M. Delbrück, K. W. Foster, E. W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, Z. Zalokar, D. S. Dennison u. W. Shropshire Jr., Bacteriol. Review **33**, 99 (1969).  
 [16] S. R. Gross, R. D. Gafford u. E. L. Tatum, J. Biol. Chem. **219**, 781 (1956).  
 [17] S. M. Bocks, Phytochemistry **6**, 785 (1967).