

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut und den Botanischen Anstalten
der Universität Göttingen.)

Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der Adsorptionsmethode.

(Versuche an *Chlorella*, *Scenedesmus* und *Nitzschia*).

Von

HANS KATHEN.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Februar 1949).

Die bisher bekannt gewordenen Tatsachen über das Vorkommen und die chemische Struktur pflanzlicher Fette und Lipoiden stammen zum allergrößten Teil aus Untersuchungen an höheren Pflanzen, von denen im allgemeinen unschwer genügend Untersuchungsmaterial beschafft werden kann. Bei Mikroorganismen hat man dagegen oft nur sehr geringe Mengen von Material zur Verfügung, so daß die Ausarbeitung einer Mikromethode für die Fettbestimmung wünschenswert erschien.

Eine Reihe von Untersuchungen liegt bereits vor, die die Fettbildung bei Mikroorganismen unter den verschiedensten Kulturmethode behandeln (BOKORNY, LINDNER, FINK u. JUST, DIRR u. v. SODEN, SCHWARZ, HARDER u. v. WITSCH, NILSSON, DAMM, BERNHAUER, RIFFEL-BALDÉS). Ziel dieser Untersuchungen war einmal, Einblick in den chemischen Aufbau und die stoffwechselchemische Leistungsfähigkeit der Einzeller zu bekommen, zum andern die Absicht, eine Lücke in unserem Bedarf an natürlichen Fetten zu schließen. Man beabsichtigte, auf mikrobiologischem Wege Fett für die menschliche Ernährung zu gewinnen. Von vielen heterotrophen Mikroorganismen, wie z. B. Hefe und anderen Pilzen, ist lange bekannt, daß sie unter besonderen Kulturbedingungen viel Fett in ihren Zellen bilden und speichern können. Aber auch autotrophe Mikroorganismen sind hierzu in der Lage (z. B. BARG), und HARDER und v. WITSCH gelang es, verschiedene Algen unter Bedingungen zu züchten, unter denen sie sich sehr intensiv vermehrten und auch viel lipoidlösliche Substanzen bildeten: zwei Grünalgen (eine *Chlorella*- und eine *Scenedesmus*-Art) und die Diatomee *Nitzschia palea* erwiesen sich dabei als besonders geeignet.

Über die chemische Natur der von diesen drei autotrophen Mikroorganismen gebildeten lipoidlöslichen Substanzen ist bisher nichts bekannt; sie aufzuklären war das Ziel der nachstehenden Untersuchungen. Diese Aufgabe wurde weniger im Hinblick auf ihre etwaige spätere praktische Bedeutung für die menschliche Ernährung durchgeführt als

in der Hoffnung, hier vielleicht Einblick zu gewinnen in die Frage, ob in autotrophen Mikroorganismen die gleichen Fette und Lipide vorkommen wie in den höheren Pflanzen (siehe hierüber auch RIPPENBALDES [1947]), ob diese autotrophen Einzeller also den gleichen Fermentapparat zur Fett- und Lipidsynthese besitzen wie höhere Pflanzen, und ob bei Anreicherung von Fetten und Lipoiden als Reserve- und Speichersubstanzen diese in ihrer Zusammensetzung den Fetten in Samen und Speicherorganen höherer Pflanzen gleichen.

Teil I: Ausarbeitung der Methodik.

In Anbetracht der geringen, aus den Algenkulturen zur Verfügung stehenden Fettmengen mußte zunächst eine Methode entwickelt werden, die möglichst sämtliche Komponenten eines in geringer Menge verfügbaren Lipoidgemisches quantitativ zu erfassen gestattet. Die Adsorptionsmethode, die ich wählte, ist bereits mehrfach auf dem Gebiet der Fett- und Lipoidanalyse angewandt worden (KUHN, KAUFMANN, WINTERSTEIN, WINDAUS, WAGNER-JAUREGG, THALER, WIELAND, KARRER, HÜTTEL), doch wurden in diesen früheren Arbeiten nur einige wenige Verbindungen adsorptiv abgetrennt, die zuvor durch andere Methoden aus einem komplizierten Fett- und Lipoidgemisch isoliert worden waren. Bei dieser Isolierung hatte außerdem der weitaus größte Teil des Gemisches Veränderungen erfahren, war also für eine weitere Analyse nicht geeignet.

W. TRAPPE hat als Erster systematisch unter definierten Bedingungen das Verhalten der einzelnen Fettstoffe bei der Adsorption in Abhängigkeit von dem Adsorbens und dem Lösungsmittel untersucht. Er fand folgende, von der Natur des Adsorbens und des Adsorbendums unabhängige Reihe von Lösungsmitteln mit abnehmender Elutionskraft: Methanol, Aethanol, n-Propanol, Aceton, essigsäures Aethyl, Aethylaether, Chloroform, Methylenchlorid, Benzol, Toluol, Trichloräthylen, Tetrachlorkohlenstoff, Cyclohexan, Petroläther. Die von ihm gleichfalls unter definierten Bedingungen festgestellte Adsorbilität verschiedener Fettstoffe, die als Bestandteile von Gesamtlipoidextrakten aus biologischem Material in Frage kommen, ergab unabhängig von der Natur des angewandten Adsorbens und Lösungsmittels folgende Reihe steigender Adsorbilität: Acyclische Kohlenwasserstoffe, Cholesterinester, Triglyceride, freies Cholesterin, freie Fettsäuren, Phosphatide. Danach ist es prinzipiell möglich, durch Anwendung von Adsorptionssäulen nach dem Prinzip der flüssigen Chromatogramme einzelne Lipoidfraktionen quantitativ zu isolieren. Aber TRAPPE gelang diese Trennung nicht zur vollen Zufriedenheit, auch mußte er feststellen, daß auf einer Säule aus Aluminiumoxyd eine teilweise Verseifung von Triglyceriden stattfindet, und die freien Fettsäuren und Phosphatide ließen sich mit organischen Lösungsmitteln überhaupt nicht eluieren. Von natürlichen Lipoidgemischen des tierischen Organismus untersuchte TRAPPE nur die Serum-, Leber- und Nierenlipide, beschränkte sich aber auch hierbei im wesentlichen auf die Abtrennung der Kohlenwasserstofffraktion und der Cholesterinesterfraktion bzw. auf die Gewinnung eines fettsäure- und phosphatidfreien Eluates.

In meinen Untersuchungen trat als weitere Komplikation die Anwesenheit von lipoidlöslichen Farbstoffen auf, die ebenfalls nach dem Adsorptionsverfahren abgetrennt werden sollten. In den Ätherextrakten aus den Mikroorganismen (Näheres siehe S. 617/618) war mit der Anwesenheit folgender Stoffgruppen zu rechnen: I. acyclische Kohlenwasserstoffe, II. Wachse, III. Sterinester, IV. Triglyceride, V. freie Sterine, VI. freie Fettsäuren, VII. Phosphatide, VIII. lipoidlösliche Pflanzenfarbstoffe und IX. ätherische Öle.

Während von den neun Gruppen die Gruppen I—VIII jede für sich eine etwa einheitliche Stoffgruppe darstellen, umfaßt die Gruppe der ätherischen Öle zahlreiche Verbindungen der verschiedensten Stoffe. Diese gehören teils der acyclischen, teils der isocyclischen Reihe an. Außer den zahlreichen Kohlenwasserstoffen, namentlich Terpenen, finden sich darin Alkohole, Aldehyde, Ketone, Säuren, Ester, Phenole und Phenoläther, seltener auch Basen, Sulfide, Nitrile, Senföle usw. Wegen der vielfältigen chemischen Zusammensetzung der ätherischen Öle und wegen ihrer vermutlich geringen Menge im Ätherextrakt hielt ich es für ratsam, sie in einem getrennten Arbeitsgang zu erfassen und zwar mit Hilfe der Wasserdampfdestillation. Solange man den chemischen Charakter des ätherischen Öles nicht kennt, kann man auch nicht ahnen, wo man es nach der Adsorption auf der Säule finden wird.

In einer Reihe von Modellversuchen prüfte ich zunächst aus jeder der oben aufgeführten Stoffgruppen eine oder auch mehrere Substanzen auf ihr Verhalten bei der Adsorption an Aluminiumoxyd, welches auch TRAPPE neben Siliciumdioxid und einigen Erden verwandt hatte, und Saccharose, sowie bei nachfolgender Elution. Die Saccharose kam zur Anwendung, weil sich die Chlorophylle bei der Adsorption an Aluminiumoxyd zersetzen [WINTERSTEIN (b)]. Bei den Modellversuchen wurden herangezogen: I. als Vertreter der acyclischen Kohlenwasserstoffe: Ceten und Paraffinöl; II. als Vertreter der Wachse: Walrat; III. als Cholesterinester: Cholesterylstearat; IV. als Triglycerid: Tributyrin; V. als freies Sterin: Cholesterin; VI. als Vertreter der freien Fettsäuren: Valeriansäure und Stearinsäure; VII. als Phosphatid das Lecithin. Das Lecithin wurde in Petroläther/Benzol 14:1 gelöst, alle übrigen Verbindungen nur in Petroläther.

Reinigung der organischen Lösungsmittel.

Bei den neuerlich wieder zugänglichen analysenreinen Präparaten von Petroläther, Benzol und Methanol sind besondere Reinigungsverfahren im allgemeinen nicht erforderlich; dagegen sind sie bei analysenreinem Äther und Tetrachlorkohlenstoff nötig.

1. Äther. Käuflicher Äther wurde fünfmal mit Wasser (auf 1 Liter Äther 100 ccm Wasser) zur Entfernung des Äthanols gewaschen. Dann versetzt man den Äther mit einer 10%igen Eisen II-Sulfatlösung, die mit wenig Schwefelsäure angesäuert wird (auf 1 Liter Äther 100 ccm Eisensulfatlösung) und schüttelt zwei Stunden auf der Schüttelmaschine. Die Eisensulfatlösung wird im Scheidetrichter abgetrennt, der Äther einmal mit wenig Wasser gewaschen und mit einer 10%igen Chromsäurelösung 15 Minuten lang ge-

schüttelt (auf 1 Liter Äther 50 ccm Chromsäurelösung). Daraufhin wird die Chromsäurelösung abgetrennt und der Äther mit 100 ccm einer 5%igen Sodaauslösung gewaschen, anschließend solange mit Wasser, bis bei Zusatz von 0.1 ccm 1%iger alkoholischer Phenolphthaleinlösung keine Rotfärbung mehr im Waschwasser auftritt. Man filtriert den Äther durch ein trockenes Faltenfilter und trocknet ihn 24 Stunden über geglühtem Calciumchlorid. Dann wird destilliert. Siedepunkt 34.5°. Es ist gut, sich zu überzeugen, ob der so gereinigte Äther peroxyd- und aldehydfrei ist. Sind nämlich die Aldehyde durch die Chromsäure nicht vollständig oxydiert, so bilden sich in kurzer Zeit wiederum Peroxyde (RIECHE). Bei kurzem Schütteln einer Ätherprobe mit wenigen Kubikzentimetern einer Lösung von fuchsin-schwefeliger Säure darf keine Rotfärbung auftreten; geringe Mengen Aldehyde geben schon eine stark positive Reaktion. Um zu prüfen, ob der Äther peroxydfrei ist, versetzt man wenige Tropfen Äther mit 4 ccm einer kalt gesättigten wässerigen Lösung von Benzidin mit 5 ccm gesättigter Kochsalzlösung und einigen Tropfen einer äußerst verdünnten Eisen II-Sulfatlösung (ein Körnchen Eisen II-Sulfat von Stecknadelkopfgröße in etwa 5 ccm Wasser gelöst). Sind Spuren von Peroxyden im Äther enthalten, so tritt nach wenigen Minuten eine deutliche Blaufärbung auf. Wenn der gereinigte Äther nicht sehr schnell verbraucht wird, kann man ihn so jederzeit auf seine Brauchbarkeit prüfen.

2. Tetrachlorkohlenstoff. Käuflicher Tetrachlorkohlenstoff wurde mit einer 50%igen Kaliumhydroxyd-Lösung und reinem Alkohol (auf 1 Liter Tetrachlorkohlenstoff 50 ccm Kalilauge und 75 ccm Alkohol) versetzt, das Ganze auf etwa 50° erwärmt und eine halbe Stunde lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Man trennt die alkoholische Lauge ab, wäscht den Tetrachlorkohlenstoff einmal mit Wasser und filtriert ihn durch ein trockenes Faltenfilter. Der gesamte Prozeß wird zweimal wiederholt. Dann wäscht man solange mit Wasser, bis das Waschwasser alkalifrei ist (Prüfung mit Phenolphthaleinlösung). Der Tetrachlorkohlenstoff wird über Phosphorperoxyd sowohl getrocknet als auch destilliert. Siedepunkt 76.7°.

Technik der Adsorptionsversuche.

Von jeder der im Modellversuch zu prüfenden Substanzen wurden jeweils zwei etwa gleich stark konzentrierte Lösungen (40—100 mg eingewogener Substanz in 50 ccm Lösungsmittel) hergestellt. Von diesen Lösungen wurde die eine durch eine Adsorptionssäule aus 40 g Saccharose, die andere durch eine Adsorptionssäule aus 40 g Aluminiumoxyd filtriert.

Als Adsorptionsrohre wurden einfache zylindrische Glasrohre von 28 mm Durchmesser und 200 mm Höhe bzw. 35 mm Durchmesser und 350 mm Höhe benutzt. Die Rohre wurden in einen durchbohrten Gummistopfen gesteckt und in Glasfilternutschen (Schott und Gen. 3 G 3 und 11 G 3) eingeführt, so daß der untere Rand des Adsorptionsrohres auf der Filterplatte steht (siehe Abb. 1). Die Glasfilternutsche sitzt auf einem Wittschen Topf. Ehe das Adsorptionsmittel eingefüllt wird, gibt man zur Abdichtung des Rohres auf der Filterplatte etwas entfettete Watte in das Rohr.

Die Saccharose (käuflicher weißer kristallisierter Rohrzucker, in einer Porzellankugelmühle sehr fein gemahlen) wurde wegen Mangels an Petroläther nicht nach dem meist üblichen Verfahren in Petroläther

suspendiert, sondern in kleinen, nötigenfalls nochmals im Porzellanmörser zerriebenen Portionen von ungefähr 5 g in das Rohr gefüllt, wobei gleichzeitig an der Wasserstrahlpumpe gesaugt und die Saccharose mit einem Holzpistill gleichmäßig festgestampft wurde. Ist das Rohr gefüllt ($\frac{1}{3}$ bleibt frei zur Aufnahme der Lösung), so wurde auf die Saccharose noch etwas entfettete Watte gelegt, damit sie nicht beim Aufgießen der Lösung aufgewirbelt wird.

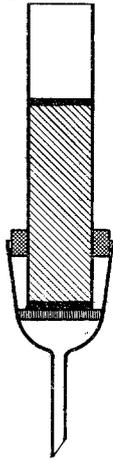


Abb. 1. Glasfilterrohr zum Adsorptionsversuch.

Das Aluminiumoxyd (käufliches Aluminiumoxyd, standardisiert nach BROCKMANN, Präparat RIEDEL DE HAEN) wurde zur Aktivierung in Portionen zu 15 g in Porzellantiegeln 15 Minuten mit dem Bunsenbrenner stark erhitzt. Für meine Versuche ließ ich es anschließend 12 Stunden an der Luft stehen, wobei es teilweise durch die Luftfeuchtigkeit entaktiviert wird. Es wurde trocken in Portionen von etwa 5 g in die Säule gegeben und unter Saugen an der Wasserstrahlpumpe mit einem Holzpistill festgestampft. Als Abschluß wurde hier ebenfalls etwas entfettete Watte darauf gelegt.

In den oberen Teil des so vorbereiteten Adsorptionsrohres wurde die Lösung mit der betreffenden Substanz eingefüllt, unter schwachem Saugen an der Wasserstrahlpumpe durch die Säule filtriert und das Filtrat in 50 cm Erlenmeyerkolben als Vorlage aufgefangen. Die Vorlage wurde gewechselt, wenn der Erlenmeyerkolben zur Hälfte gefüllt, d. h. etwa 25 cm durchfiltriert waren. Das Nachwaschen erfolgte stets mit dem gleichen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch. Die Filtrationsdauer von je 25 cm betrug bei Anwendung der Saccharose-Säule 10—15 Minuten, bei Anwendung der Aluminiumoxyd-Säule 1—2 Minuten. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde in den Erlenmeyerkolben sofort auf dem Wasserbad verdampft und der Rückstand 24 Stunden im evakuierten Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure und Paraffinschnitzeln getrocknet. Das Nachwaschen mit dem gleichen Lösungsmittel erfolgte so lange, bis das letztgewonnene Filtrat nach dem Verdampfen keinen Rückstand mehr enthielt. War die Summe aller Rückstände gleich dem Gewicht der gelösten Substanz, so war erwiesen, daß von der Substanz nichts an das Adsorptionsmittel adsorbiert wurde. Wurde aber die gelöste Substanz trotz Nachwaschens mit großen Mengen des Lösungsmittels von dem Adsorptionsmittel festgehalten, so kamen in meinen Versuchen der Reihe nach folgende Elutionsmittel zur Anwendung: Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Äther-Methanol 19:1, Methanol. Meistens gelang es, durch eines dieser Lösungsmittel die adsorbierte Substanz zu eluieren. Einige der von mir angewandten Modellsubstanzen wurden durch den Adsorptionsversuch in mehrere Komponenten zerlegt, die verschiedene chemische Eigenschaften besaßen. Daraus war zu schließen, daß diese Modellsubstanzen durch andere Verbindungen verunreinigt oder in der Säule verändert waren.

Ergebnis der Modellversuche.

I. Versuche mit acyclischen Kohlenwasserstoffen:

Versuch I A:

Säule aus je 40 g Saccharose.

39.4 mg Ceten	46.7 mg Paraffinöl
gelöst in je 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther.	
25 ccm: 37.9 mg	25 ccm: 42.1 mg
25 ccm: 1.0 mg	25 ccm: 4.9 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>	25 ccm: <u>0.0 mg</u>
38.9 mg	47.0 mg

Versuch I B:

Säule aus je 40 g Aluminiumoxyd.

41.6 mg Ceten	53.7 mg Paraffinöl
gelöst in je 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther.	
25 ccm: 38.8 mg	25 ccm: 45.1 mg
25 ccm: 2.3 mg	25 ccm: 7.6 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>	25 ccm: <u>0.0 mg</u>
41.1 mg	53.3 mg

Ergebnis: Die Kohlenwasserstoffe aus Petroläther werden weder an Saccharose noch an Aluminiumoxyd adsorbiert.

II. Versuche mit einem Wachs:

Versuch II A:

Säule aus 40 g Saccharose.
73.2 mg Walrat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 69.4 mg
25 ccm: 3.7 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>
73.1 mg

Versuch II B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.
38.7 mg Walrat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 4.1 mg
25 ccm: 22.7 mg
25 ccm: 6.4 mg
25 ccm: 1.8 mg
25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>

eluiert mit Benzol

25 ccm: 1.6 mg
25 ccm: 0.5 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>

eluiert mit Äther

25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>

38.3 mg

Ergebnis: Die Wachse verhalten sich wie die Kohlenwasserstoffe. Der aus dem Aluminiumoxyd erst mit Benzol eluierbare geringe Anteil ist kein Wachs. Walrat (Cetylpalmitat) enthält neben reinem Wachs noch geringfügige Mengen anderer Stoffe, hauptsächlich Triglyceride.

III. Versuche mit einem Sterinester:

<i>Versuch III A:</i>	<i>Versuch III B:</i>
Säule aus 40 g Saccharose.	Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.
71.9 mg Cholesterylstearat, gelöst in 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther	85.1 mg Cholesterylstearat, gelöst in 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther
25 ccm: 65.2 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 6.6 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
<u>71.8 mg</u>	eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff
	25 ccm: 53.9 mg
	25 ccm: 29.6 mg
	25 ccm: 1.3 mg
	25 ccm: <u>0.0 mg</u>
	84.8 mg

Ergebnis: Der Sterinester Cholesterylstearat wird von Saccharose nicht, wohl aber von Aluminiumoxyd aus Petroläther adsorbiert. Durch Tetrachlorkohlenstoff kann der Ester quantitativ eluiert werden.

IV. Versuche mit einem Triglycerid:

<i>Versuch IV A:</i>
Säule aus 40 g Saccharose.
80.2 mg Tributyrin, gelöst in 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther
25 ccm: 75.1 mg
25 ccm: 5.7 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>
80.8 mg
<i>Versuch IV B:</i>
Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.
109.7 mg Tributyrin, gelöst in 50 ccm Petroläther. nachgewaschen mit Petroläther
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

nachgewaschen mit Tetrachlorkohlenstoff

25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg

eluiert mit Benzol

25 ccm: 15.5 mg
 25 ccm: 41.6 mg
 25 ccm: 12.1 mg
 25 ccm: 3.2 mg
 25 ccm: 0.0 mg

Verseifungszahlen

565.8
 550.1
 575.2
 —
 —

72.4 mg 72.4 mg

eluiert mit Äther

25 ccm: 13.2 mg
 25 ccm: 12.4 mg
 25 ccm: 2.1 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg

490.1
 476.3
 —
 —
 —

27.7 mg 27.7 mg

100.1 mg

Adsorbiert: 109.7 mg

Eluiert: 100.1 mg

nicht eluiert: 9.6 mg

Ergebnis: Während das Triglycerid Tributyrin sich an Saccharose nicht adsorbieren läßt, wird es von Aluminiumoxyd adsorbiert und läßt sich auch durch Tetrachlorkohlenstoff nicht herauslösen. Erst mit Benzol wird der größere Teil des Tributyrins eluiert, während der übrige Teil sich nicht mit Benzol eluieren läßt, auch wenn man noch so oft nachwäscht. Benutzt man dann Äther als Elutionsmittel, so wird ein weiterer Teil bis auf einen geringen Rest herausgelöst. Der geringe Rest läßt sich aber mit keinem Elutionsmittel, auch nicht mit Methanol, eluieren.

TRAPPE (b) hat in seiner Arbeit festgestellt, daß der unter diesen Bedingungen nicht eluierbare Anteil aus freien Fettsäuren besteht. Er vermutet daher, daß der mit Äther eluierbare Anteil aus Mono- bzw. Diglyceriden besteht. Um dies nachzuweisen bestimmte ich die Verseifungszahlen¹ der mit Benzol und Äther eluierten Hauptanteile und des zum Versuch benutzten Tributyrins. Dabei zeigte sich eindeutig, daß das mit Benzol eluierte Tributyrin keine Veränderung erfahren hatte; die von mir in dem verwandten Tributyrin mit 553.8 ermittelte Verseifungszahl stimmt mit der in den Rückständen der Benzoleluate

¹ Da in meinen Versuchen jeweils nur geringe Triglyceridmengen zur Verfügung standen, war die Bestimmung der Verseifungszahl schwierig. Durch sorgfältige Einhaltung bestimmter Bedingungen bei der Ermittlung der Verseifungszahl gelang es, den Fehler unter $\pm 5\%$ zu drücken und dadurch mittels dieser Methode die Länge der Fettsäurekette in etwa zu ermitteln.

gefundenen praktisch überein. Aber in dem Rückstand des Äthereluates betrug die Verseifungszahl nur 490.1 und 476.3, woraus zu schließen ist, daß dieser Anteil aus Dibutyryn besteht. Diesen 27.7 mg Rückstand des Äthereluates entsprechen 10.5 mg Buttersäure, d. h. diese Menge Buttersäure würde bei der Bildung von 27.7 mg Dibutyryn aus Tributyrin frei werden. Diese Menge stimmt auch ungefähr mit dem überhaupt nicht eluierten Anteil von 9.6 mg überein, so daß durch diesen Versuch die teilweise Spaltung des Triglycerides bei der Adsorption an Aluminiumoxyd sehr wahrscheinlich gemacht, fast bewiesen ist.

V. Versuche mit freiem Sterin:

<i>Versuch V A:</i>	<i>Versuch V B:</i>
Säule aus 40 g Saccharose.	Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.
60.5 mg Cholesterin,	68.3 mg Cholesterin,
gelöst in 50 ccm Petroläther,	gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther	nachgewaschen mit Petroläther
25 ccm: 59.6 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 1.4 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: <u>0.0 mg</u>	
61.0 mg	nachgewaschen mit
	Tetrachlorkohlenstoff
	25 ccm: 0.0 mg
	25 ccm: 0.0 mg
	25 ccm: 0.0 mg
	nachgewaschen mit Benzol
	25 ccm: 0.0 mg
	25 ccm: 0.0 mg
	25 ccm: 0.0 mg
	eluiert mit Äther
	25 ccm: 43.8 mg
	25 ccm: 21.6 mg
	25 ccm: 2.3 mg
	25 ccm: 0.0 mg
	25 ccm: <u>0.0 mg</u>
	67.7 mg

Ergebnis: Cholesterin als freies Sterin wird aus Petroläther an Saccharose nicht, wohl aber an Aluminiumoxyd adsorbiert. Daraus ist es weder mit Tetrachlorkohlenstoff noch mit Benzol, sondern erst mit Äther eluierbar.

VI. Versuche mit freien Fettsäuren:

<i>Versuch VI A:</i>	
Säule aus je 40 g Saccharose.	
57.6 mg Valeriansäure	51.2 mg Stearinsäure
gelöst in je 50 ccm Petroläther,	
nachgewaschen mit Petroläther	

25 ccm: 38.4 mg	25 ccm: 18.5 mg
25 ccm: 17.3 mg	25 ccm: 27.7 mg
25 ccm: 2.2 mg	25 ccm: 4.9 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
<u>57.9 mg</u>	<u>51.1 mg</u>

Versuch VI B:

Säule aus je 40 g Aluminiumoxyd.

49.8 mg Valeriansäure

64.1 mg Stearinsäure

gelöst in je 50 ccm Petroläther.

Weder durch Nachwaschen mit Petroläther noch mit Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther und Äther/Methanol = 19:1 (jeweils dreimal 25 ccm) ließ sich die freie Fettsäure in wägbarer Menge eluieren.

Ergebnis: Die freien Fettsäuren werden von Aluminiumoxyd so stark adsorbiert, daß sie durch die oben genannten Lösungsmittel nicht eluiert werden können. Von der Saccharose hingegen werden die freien Fettsäuren aus Petroläther nicht adsorbiert.

VII. Versuche mit Phosphatid:

Versuch VII A:

Säule aus 40 g Saccharose.

63.4 mg Lecithin (Schering),

gelöst in 50 ccm Petroläther/Benzol 14:1,

nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1

25 ccm: 34.7 mg

25 ccm: 0.4 mg

25 ccm: 0.0 mg

25 ccm: 0.0 mg

35.1 mg

35.1 mg = 55.4 % (enthalten keinen Phosphor)

eluiert mit Äther

25 ccm: 0.6 mg

25 ccm: 0.0 mg

25 ccm: 0.3 mg

0.9 mg

eluiert mit Methanol

25 ccm: 256 mg

25 ccm: 216 mg

25 ccm: 199 mg

25 ccm: 221 mg

892 mg

Versuch VII B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.

76.0 mg Lecithin (Schering),

gelöst in 50 ccm Petroläther/Benzol 14:1,

nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1

25 ccm:	8.6 mg	
25 ccm:	6.1 mg	
25 ccm:	4.0 mg	
25 ccm:	0.3 mg	
	<u>19.0 mg</u>	19.0 mg = 25.0 % (enthalten keinen Phosphor)
eluiert mit Äther		
25 ccm:	0.6 mg	} Cholesterinkristalle
25 ccm:	1.8 mg	
25 ccm:	1.4 mg	
25 ccm:	1.2 mg	
25 ccm:	0.0 mg	
	<u>5.0 mg</u>	5.0 mg = 6.6 % (enthalten keinen Phosphor)
		24.0 mg = 31.6 %

Ergebnis: Für diese Phosphatidversuche wurde das Lecithinpräparat der Firma Schering benutzt, ein Handelsprodukt, das nicht nur aus dem Phosphatid Lecithin besteht, sondern noch andere Fettbestandteile enthält; denn der Phosphorgehalt verschiedener Lecithine beträgt nach Literaturangaben 3.8—4.3 %, den Phosphorgehalt des von mir benutzten Lecithins ermittelte ich aber nur zu 1.9 %². In Übereinstimmung damit wurden in dem unter Verwendung von Saccharose als Adsorptionsmittel durchgeführten *Versuch VII A* die nicht adsorbierten 35.1 mg = 55.4 % der verwandten „Lecithin“menge phosphorfrei gefunden. Das Phosphatid als solches, nämlich die Differenz der verwandten abzüglich der nicht adsorbierten Lecithinmenge, also 28.3 mg = 44.6 % war adsorbiert und wurde vermutlich erst mit Methanol eluiert. Denn in der mit Methanol eluierten großen Substanzmenge von 892 mg, die im wesentlichen aus Saccharose bestand, da Saccharose in geringer Menge in Methanol löslich ist, fanden sich nach Veraschung 1.189 mg P. Diese auf die 28.3 mg adsorbierte Substanz berechnet ergeben einen Prozentgehalt von 4.2 %, einen Wert, der mit den in der Literatur angegebenen P-Werten für Lecithin gut übereinstimmt.

In dem unter Verwendung von Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel durchgeführten *Versuch VII B* waren 19.0 mg nicht adsorbierter und 5.0 mg mit Äther eluierter Substanz, insgesamt 24.0 mg = 31.6 % P-frei. Die 5 mg mit Äther eluierter Substanz bestanden aus Cholesterin. Nicht eluiert wurden 52.0 mg = 68.4 %. Unter Zugrundelegung des Ergebnisses von Versuch VII A mit Saccharose, demzufolge in dem Schering-Lecithin nur 44.6 % Phosphatid enthalten sind, könnten in den in Versuch VII B verwandten 76.0 mg Schering-Lecithin nur 33.9 mg Phosphatid enthalten sein, die sicher noch nicht eluiert waren, also

² Zur Bestimmung des Phosphatidphosphors wurde ein eingewogener Anteil des Phosphatids im Kjeldahlkolben mit konzentrierter Schwefelsäure und Perhydrol p. a. verascht und in der Aschenlösung P kolorimetrisch nach LOHMANN und JENDRASSIK mit dem Pulfrichstufenphotometer bestimmt.

in den 52.0 mg noch adsorbierter Substanz enthalten sind. Die Differenz 52.0 mg — 33.9 mg, also 18.1 mg = 23.8 % bestehen auf Grund der Erfahrungen in den Versuchen mit freien Fettsäuren wahrscheinlich aus freien Fettsäuren. Demnach hätte das von mir verwandte Handelspräparat Lecithin der Firma Schering folgende Zusammensetzung:

44.6 %	Phosphatid
23.8 %	freie Fettsäuren
6.6 %	Cholesterin
25.0 %	Triglyceride
<hr/>	
100.0 %	

Diese Feststellung der prozentualen Zusammensetzung des Präparates war wichtig, da es noch für einen weiteren Modell-Adsorptions-Versuch benutzt wurde.

Aus den bisherigen Modellversuchen ergibt sich also, daß — in Bestätigung der Ergebnisse von TRAPPE — die freien Fettsäuren und die Phosphatide von Aluminiumoxyd sehr stark adsorbiert werden und sich mit den von mir verwandten Lösungsmitteln allein nicht eluieren lassen. Ferner zeigte sich in meinen Versuchen, daß die freien Fettsäuren aus petrolätherischer Lösung von Saccharose nicht adsorbiert werden, wohl aber die Phosphatide, und daß letztere nur mit Methanol quantitativ von der Saccharose eluierbar sind. Da Chlorophylle, Phaeophytine und sauerstoffhaltige Carotinoide ebenfalls von Saccharose aus einer Lösung von Petroläther/Benzol 14:1 adsorbiert werden, prüfte ich, welchen Platz das Phosphatid bei der Adsorption auf einer solchen Säule einnimmt. Zu diesem Zweck stellte ich mir nach einer im GATTERMANN-WIELAND angegebenen Vorschrift aus Spinatblättern einen Farbstoffextrakt her, der im wesentlichen die Chlorophylle Phaeophytine und Carotinoide enthält. Diese Petroläther und Benzol enthaltende Farbstofflösung filtrierte ich durch eine Saccharosesäule und fand auf der Säule, wie bekannt, von oben nach unten folgende Zonen: Chlorophyll b (gelb-grün), Chlorophyll a (blau-grün), Xanthophyll (gelb), Phaeophytin b (gelb bis olivfarben), Phaeophytin a (hellgrau). Chlorophyll b wird also am stärksten adsorbiert und im obersten Teil der Säule festgehalten, während die Carotine α , β und γ und die Xanthophyllester nicht adsorbiert werden und ins Filtrat gehen. Durch die so präparierte, zur Entwicklung des Chromatogramms mit Petroläther/Benzol 14:1 nachgewaschene Säule filtrierte ich eine Lösung von Lecithin in Petroläther/Benzol 14:1. Beim Durchfiltrieren dieser Lösung wurden allmählich alle Farbstoffzonen auf der Säule ein Stück weiter nach unten verdrängt, über der Chlorophyll b Zone zeigte sich eine neue farblose Zone, in der ich das Phosphatid vermutete. Beim Nachwaschen mit Petroläther/Benzol 14:1 änderte sich das Bild auf der Säule nicht. Sämtliche Zonen, auch die farblose Zone, wurden abgegraben und die adsorbierten Verbindungen einzeln mit Methanol aus der Saccharose herausgelöst. Nach Verdampfen des Lösungsmittels

wurden die Rückstände feucht verascht und in der Asche jeweils der Phosphorgehalt nach LOHMANN und JENDRASSIK kolorimetrisch bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß nur die aus der obersten farblosen Zone herausgelöste Substanz Phosphor enthielt, die aus den Farbstoffzonen herausgelösten Substanzen phosphorfrei waren.

Nach diesen Modellversuchen mit den einzelnen Stoffen bzw. Stoffgruppen bezüglich ihres Verhaltens bei der Adsorption und Elution führte ich noch Modellversuche durch an einem Gemisch, das aus jeder Stoffgruppe eine Verbindung, bei den Farbstoffen mehrere, enthielt. Einen dieser Modellversuche bringe ich als Beispiel, in dem das Gemisch folgendermaßen zusammengesetzt war:

Ceten	29.0 mg
Walrat (Cetylpalmitat)	22.2 mg
Cholesterylstearat	30.6 mg
Tributyryn	113.5 mg
Cholesterin	19.6 mg
Cholesterin (aus Lecithin)	2.1 mg
Stearinsäure	32.7 mg
freie Fettsäure (aus Lecithin)	7.5 mg
Lecithin (Phosphatid)	14.0 mg
Pflanzenfarbstoffe ³	15.3 mg
Triglyceride (aus Walrat und Lecithin)	9.8 mg
	<hr/>
	296.3 mg

Dieses Gemisch löste ich in 100 ccm Petroläther/Benzol 14 : 1 und filtrierte die Lösung durch eine Säule aus 300 g Saccharose. Das Nachwaschen erfolgte mit 100 ccm Petroläther/Benzol 14 : 1, dann mit 100 ccm Petroläther. Jeweils 50 ccm Filtrat wurden in 100 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen. Diese enthielten nach Verdampfung des Lösungsmittels folgende Substanzmengen:

1. Filtrat	252.3 mg
2. Filtrat	8.1 mg
3. Filtrat	4.5 mg
4. Filtrat	0.5 mg
5. Filtrat	0.4 mg
	<hr/>
	265.8 mg

Da die letzten beiden Filtrate praktisch kaum noch einen Rückstand enthielten, wurde das Filtrieren nicht mehr fortgesetzt. Die Bilanz ist folgende:

Ausgangsmenge:	296.3 mg
Im Filtrat 1—5:	265.8 mg
adsorbiert:	30.5 mg

Zu erwarten war, daß 14.0 mg Phosphatid
15.3 mg Pflanzenfarbstoffe

29.3 mg adsorbiert würden. Die Menge der nicht an Saccharose adsorbierbaren α , β und γ Carotine und der Xan-

³ Wie oben angegeben aus Spinatblättern hergestellt.

thophyllester war mit 0.5 mg (s. Seite 617) so gering, daß sie praktisch vernachlässigt werden konnte.

Auf der Säule waren folgende Zonen zu beobachten:

1. Zone, fast farblos, leicht grün gefärbt (oberste Zone)
2. Zone, gelb-grün
3. Zone, blau-grün
4. Zone, gelb
5. Zone, hellgelb bis olivfarben
6. Zone, hellgrau
7. Zone, farblos.

Die oberste Zone wurde abgegraben, mit Methanol eluiert, dieses verdampft und der Rückstand feucht verascht. Der Phosphorgehalt der Asche betrug 610 γ . Dem entsprechen 14.5 mg Phosphatid bei einem P-Gehalt von 4.2 Prozent.

Die Elution der adsorbierten Farbstoffe erfolgte mit Äther/Aceton 1:1. Der Rückstand der gesamten Farbstoff-Eluate betrug 19,1 mg. Das Gewicht sämtlicher eluierten Substanzmengen beträgt demnach:

Filtratrückstände 1—5	265.8 mg
Farbstoffe	19.1 mg
Phosphatid (berechnet aus der P-Analyse)	<u>14.5 mg</u>
	299.4 mg (Ausgangsmenge 296.3 mg).

Der Gesamtrückstand der Filtrate 1—5 vom Gewicht 265.8 mg wurde anschließend in 50 ccm Petroläther gelöst und die Lösung durch eine Säule aus 100 g Aluminiumoxyd filtriert. Die Elution der adsorbierten Verbindungen erfolgte wie bei den vorigen Versuchen mit Tetrachlorkohlenstoff, Benzol und Äther.

Säule aus 100 g Aluminiumoxyd.

265.8 mg Substanz (Filtrate 1—5),
gelöst in 50 ccm Petroläther

nachgewaschen mit Petroläther	Verseifungszahlen
1. 25 ccm: 16.6 mg (flüssig)	0.0
2. 25 ccm: 11.7 mg (flüssig)	0.9
3. 25 ccm: 5.1 mg (halbfest)	—
4. 25 ccm: 16.6 mg (fest)	110.7
5. 25 ccm: 1.5 mg (fest)	—
6. 25 ccm: <u>0.6 mg</u>	—
52.1 mg	52.1 mg
eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff	Verseifungszahlen
7. 25 ccm: 19.3 mg (fest)	84.4
8. 25 ccm: 9.7 mg (fest)	—
9. 25 ccm: 0.8 mg	—
10. 25 ccm: <u>0.5 mg</u>	—
30.3 mg	30.3 mg

eluiert mit Benzol		Verseifungszahlen
11.	25 ccm: 35.4 mg (flüssig)	545.4
12.	25 ccm: 29.3 mg (flüssig)	553.9
13.	25 ccm: 13.1 mg (flüssig)	544.9
14.	25 ccm: 4.2 mg (flüssig)	—
15.	25 ccm: 3.9 mg (flüssig)	—
16.	25 ccm: 4.5 mg (flüssig)	—
17.	25 ccm: 2.8 mg	—
18.	25 ccm: 1.6 mg	—
19.	25 ccm: 1.5 mg	—
20.	25 ccm: 1.0 mg	—
21.	25 ccm: 0.8 mg	—
	<u>98.1 mg</u>	
		98.1 mg
eluiert mit Äther		Verseifungszahlen
22.	25 ccm: 18.1 mg (fest)	1.9
23.	25 ccm: 2.1 mg (fest)	—
24.	25 ccm: 0.0 mg	—
25.	25 ccm: 17.6 mg (halbfest)	479.1
26.	25 ccm: 0.0 mg	—
27.	25 ccm: 0.0 mg	—
	<u>37.8 mg</u>	
		<u>37.8 mg</u>
		218.3 mg

Bilanz:

Substanz	265.8 mg
Stearinsäure	— 32.7 mg
freie Fettsäuren	— 7.5 mg
	<u>225.6 mg</u>
Eluat (zu erwartender Wert)	225.6 mg
Eluat (gefundener Wert)	<u>218.3 mg</u>
Verlust	7.3 mg (abgespaltene Buttersäure!)
17.6 mg Dibutyrin =	6.7 mg Buttersäure.

Wie das Ergebnis zeigt, ist das Gesamtgewicht der Eluatrückstände mit 218.3 mg kleiner als das Gesamtgewicht der verwandten Filtratrückstände 1—5. Dieser Verlust ist, wie später noch erörtert wird, durch die Nicht-Eluierbarkeit der freien Fettsäuren bedingt. Ceten als Vertreter der Kohlenwasserstoffe und Walrat als Vertreter der Wachse finden sich erwartungsgemäß in der Petrolätherfraktion wieder, u. zwar, wie sich aus den Verseifungszahlen ergibt, das Ceten in den beiden ersten Vorlagen, das Walrat hauptsächlich in der vierten Vorlage. Der Sterinester (30.6 mg Cholesterylstearat) ist im Tetrachlorkohlenstoff-Eluat enthalten, seine Verseifungszahl stimmte mit der von mir im Ausgangsmaterial ermittelten überein. In der Benzolfraktion, die die gesamten Triglyceride (123.3 mg) enthalten sollte, sind Verluste eingetreten, und zwar durch die oben (Seite 609) erörterte Umwandlung von Triglyceriden in Diglyceride auf der Aluminiumoxydsäule. Die Diglyceride sind, wie aus dem Modellversuch IV B ersichtlich war, nicht mehr

mit Benzol, sondern erst mit Äther eluierbar. Diese Umwandlung des Triglycerids in ein Diglycerid zeigen auch die Verseifungszahlen an, die im Benzoleluat dem Tributyrin, in der vierten Vorlage des Äthereluates dem Dibutyryn entsprechen. In den beiden ersten Vorlagen des Äthereluates finden sich die freien Sterine wieder, die Verseifungszahl ist praktisch Null. An freien Fettsäuren waren in dem Ausgangsfettgemisch 32.7 mg Stearinsäure und 7.5 mg freie Fettsäuren aus Lecithin vorhanden. Bei der Umwandlung der im Benzoleluat nicht wieder gefundenen 25.2 mg Triglyceride (eingesetzt als Tributyrin) in Dibutyryn würden 19.4 mg Dibutyryn und 7.3 mg Buttersäure entstehen. Werden diese in die Bilanz eingesetzt, so ist sie praktisch ausgeglichen.

Auffallend war, daß beim Eluieren mit Benzol und Äther die Eluate gelb gefärbt waren. Neben den Triglyceriden, Diglyceriden und freien Sterinen werden nämlich auch die drei Carotine α , β und γ und die Xanthophyll-Ester eluiert. Um festzustellen, ob diese in so großer Menge vorhanden sind, daß sie die Bestimmung der Kennzahlen, der Verseifungszahlen und der in den späteren Versuchen (siehe Seite 622) bestimmten Jod- und Rhodanzahlen merklich stören können, habe ich ihre Menge in den Filtraten 1—5 der Saccharose-Säule bestimmt. Diese Bestimmung wurde nach KUHN und BROCKMANN kolorimetrisch mit der petrolätherischen Lösung vor der Adsorption an Aluminiumoxyd durchgeführt. Als kolorimetrischer Standard diente eine Lösung von 14.5 mg reinstem Azobenzol in 100 ccm 96%igem Äthanol. Diese Lösung ist farbgleich einer Lösung von 0.00235 mg α - oder β -Carotin. Für die Xanthophyll-Ester liegt der Wert ungefähr doppelt so hoch. Da ich für meine Zwecke nur ungefähr den Gehalt an diesen Carotinoiden bestimmen wollte und eine Trennung der Farbstoffe nicht vornahm, so setzte ich die Lösung von 14.5 mg Azobenzol in 100 ccm Alkohol gleich dem mittleren Wert von 0.0035 mg der genannten Carotinoide. Die Bestimmung wurde mit dem Autenrieth-Kolorimeter durchgeführt; ich fand einen Wert von 0.5 mg. Diese Menge stört die Bestimmung der Kennzahlen praktisch nicht.

Teil II. Untersuchung der Algenlipoide.

Die Algen wurden nicht von mir selbst, sondern in den Botanischen Anstalten nach den dort ausgearbeiteten Methoden (HARDER und v. WIRSCH) kultiviert.

Chlorella und *Scenedesmus* wurden in zylindrischen, senkrecht stehenden Glasrohren von 60 mm Durchmesser und 1400 mm Höhe in einem normal temperierten Gewächshaus bei Tageslicht (etwa 5000—10 000 Lux) gezüchtet. Die Rohre enthielten als Nährlösung in 1000 ccm Leitungswasser 5.5 ccm 10%ige Kaliumnitratlösung, 0.4 ccm 10%ige Kaliumphosphatlösung (primär), 1 ccm 10%ige Magnesiumsulfatlösung, 1 ccm Eisenlaktatlösung (enthaltend 5.8 mg Eisenlaktat) und 10—20 ccm Erdabkochung. Durch die Rohre wurde von unten Luft eingeleitet, um die Zellen mit Kohlendioxyd und Sauerstoff zu versorgen. Dabei wurden gleichzeitig die Zellen aufgewirbelt und gleichmäßig über das ganze Rohr verteilt. *Nitzschia palea* wurde ebenfalls in durchlüfteten Glasrohren, aber in kleineren (30 mm Durchmesser, 250 mm Höhe) und außerdem in der Dunkelkammer bei elektrischer Belichtung (3000 Lux, gewöhnliche Glühlampe) kultiviert. Die Zusammensetzung der

Nährlösung war etwas anders, nämlich in 1000 ccm Leitungswasser 0.5 ccm einer 10%igen Natriumnitratlösung, 0.5 ccm einer 25%igen Natriumphosphatlösung (sekundär), 0.5 g Natriumsilikat und 100 ccm Erddekokt.

Bei der Ernte der Algen wurde kein Wert darauf gelegt, daß die Kulturen maximale Fettspeicherung hatten. Jedoch wurden niemals ganz junge, noch in intensiver Vermehrung begriffene Kulturen verwendet, da diese sehr wenig Fett enthalten, sondern nur ältere, bei denen bereits eine deutliche Fettspeicherung eingesetzt hatte. Die Ernte der Algen fand stets am Vormittag statt. Der Inhalt der Rohre wurde dazu in große flache Schalen entleert und die bis zum nächsten Morgen sedimentierten Zellen nach Abgießen der überstehenden klaren Nährlösung in Zentrifugengläser überführt. Die durch scharfes Zentrifugieren von der restlichen Nährlösung abgetrennten Algenzellen kamen in eine dickwandige, mit Gummistopfen verschlossene Steilbrustflasche von 300 ccm Inhalt. Die Flasche wurde in ein kaltes Wasserbad eingetaucht, das Wasser im Bad langsam zum Kochen gebracht und die Flasche gleichzeitig mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Während dieser Trocknung wurde Kohlendioxyd, das in einer Waschflasche mit Wasser gewaschen und in einem Trockenturm mit Calciumchlorid getrocknet war, zur Verdrängung des Luftsauerstoffes durch eine Kapillare in die Flasche eingeleitet. In fünf Stunden sind nach diesem Verfahren die Zellen trocken.

Die getrockneten Zellen wurden mit grobem Quarzsand (Präparat Merck) möglichst fein zerrieben und im Soxleth-Apparat mit Äther extrahiert. Auch während dieser Extraktion wurde durch eine seitlich in den Kolben eingeschlitzte Rohr Kohlendioxyd (gewaschen und getrocknet wie oben) eingeleitet und somit der Luftsauerstoff aus dem Soxleth-Apparat verdrängt. Nach 24 Stunden ist die Extraktion praktisch beendet. Der Äther wurde abgedampft und der Rückstand gewogen. Er war bei allen drei Algen dunkelgrün gefärbt und von ölartiger Konsistenz. Er wurde in Benzol gelöst und mit Petroläther verdünnt, so daß das Verhältnis Benzol/Petroläther 1:14 beträgt. Man verwendet am besten für 100 mg Substanz je 20 ccm Lösungsmittelgemisch. Die Lösung wurde wie in den Modellversuchen mit nicht zu großer Geschwindigkeit durch die Saccharosesäule gesaugt und die Filtrate in 100 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen. Der Gesamtückstand dieser Filtrate wurde anschließend in Petroläther gelöst, diese Lösung durch eine Aluminiumoxydsäule filtriert und die Filtrate und Eluate in 50 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen.

Von den drei verschiedenen Algenextrakten wurden je drei Adsorptionsversuche durchgeführt. Die an *Chlorella* gewonnenen Analyseergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt.

Bei der Filtration der Petroläther/Benzol-Lösung durch die Saccharosesäule wurden 80.1%, 81.8% und 83.5% der Lipoidfraktion nicht adsorbiert. Adsorbiert waren Phosphatide und Farbstoffe.

Die Menge der Phosphatide wurde durch die Bestimmung des P-Gehaltes im Eluat des obersten Teiles der Saccharosesäule entsprechend den auf S. 613 geschilderten Erfahrungen ermittelt. Sie war gering, betrug 1% und weniger der gesamten Lipoidmenge. Dies ist

nicht verwunderlich; denn aus der Literatur ist bekannt (VAGELER, REWALD, DIEMAIR), daß die vollständige Abtrennung der Phosphatide aus pflanzlichem Material sehr schwierig ist. Sicher ist bei meiner Ätherextraktion nur ein geringer Bruchteil der gesamten Phosphatide aus den getrockneten Algen extrahiert worden. Da ich aber nur die ätherlöslichen Lipide der Algen analysieren wollte, habe ich die ätherunlöslichen Phosphatidanteile nicht weiter berücksichtigt.

Die Farbstoffe wurden aus den Farbstoffzonen der Saccharose-säule gemeinsam mit Äther/Aceton 1 : 1 (siehe Seite 615) eluiert, ihre Mengen betragen 11.5—15.5% der Gesamtlipide. Sie wurden keiner eingehenden Analyse unterzogen, da mir kein geeignetes Spektroskop zur Verfügung stand. In einem besonderen Versuch habe ich die Farbstoffzonen getrennt eluiert, die Chlorophylle a und b und die Phaeophytine a und b ließen sich spektroskopisch nachweisen. Die Wellenlängen-Einteilung des Spektroskopes reichte jedoch nicht aus, um die Carotinoidfarbstoffe zu unterscheiden.

Bei der Filtration durch die Aluminiumoxydsäule zeigte sich, daß der Anteil der Kohlenwasserstoffe und Wachs, d. h. der aus Petroläther an Aluminiumoxyd nicht adsorbierte Anteil der Lipide, bei Chlorella sehr gering ist. Er betrug in den einzelnen Kolben meist weniger als 1 mg, insgesamt nur 0.5% der Gesamtlipoidfraktion, und ist so gering, daß man diesen Betrag vielleicht als Wägefehler ansehen muß.

Die Menge der mit Tetrachlorkohlenstoff aus der Aluminiumoxyd-Säule eluierbaren Substanzen, zu denen auch die Sterinester gehören, betrug bei den Chlorellalipoiden im Durchschnitt 2.4%. Sicher handelt es sich aber hierbei nicht ausschließlich um Sterinester; denn bei der Verseifung dieses Rückstandes mit Natriumäthylat und nachfolgender Fällung mit Digitonin erhielt ich nur ungefähr 3 mg Digitonid. Berechnet man daraus die Menge des Sterins bzw. des Sterinesters, so erhält man ungefähr 0.8 mg bzw. 1.2 mg. Die Sterinester der Chlorellalipide sind demnach von Substanzen begleitet, die die gleiche Adsorptionsaffinität wie die Sterinester besitzen.

Die im Äthereluat befindlichen freien Sterine ließen sich in den Rückständen gut erkennen, da sie sich durch einen hohen Schmelzpunkt und gute Kristallisationsfähigkeit auszeichneten. Leider war ihre exakte Abtrennung von den Diglyceriden mit Hilfe der Adsorptionssäule und Ätherelution nicht möglich. Vermutlich läßt sich die Trennung besser durchführen, wenn die Adsorptionssäulen länger sind. Um die wirkliche Menge an Sterinen zu erfassen, wurde in den Rückständen die gravimetrische Digitoninfällung durchgeführt. Die Menge der freien Sterine betrug 0.2—0.4%.

Die Bestimmung der Sterinester und freien Sterine wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Die Sterinester wurden nach MÜHLBOCK und KAUFMANN mit Natriumäthylat verseift: zu je 10 mg Ester kamen 10 ccm Alkohol und etwa 300 mg metallisches Natrium. Dieses Gemisch wurde vier Stunden auf einem

Tabelle I. Analysenergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *C. Morella*.

1. Adsorptionsversuch	2. Adsorptionsversuch	3. Adsorptionsversuch
Ausgangsmenge: 1.50 g Trockensubstanz ergaben 407.5 mg (= 27.2%) ätherlösl. Lipoid	Ausgangsmenge: 1.50 g Trockensubstanz ergaben 400.7 mg (= 26.7%) ätherlösl. Lipoid	Ausgangsmenge: 2.00 g Trockensubstanz ergaben 580.6 mg (= 29.0%) ätherlösl. Lipoid
407.5 mg = 100%	Säule aus 300 g Saccharose. 400.7 mg = 100%	580.6 mg = 100%
gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1, nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1.		
Filtrate: 1. 315.8 mg 2. 4.0 mg 3. 3.3 mg 4. 2.2 mg 5. 1.0 mg	302.9 mg 19.7 mg 2.5 mg 1.8 mg 0.8 mg	465.6 mg 11.3 mg 6.1 mg 1.4 mg 0.4 mg
Phosphatide: 326.3 mg = 80.1%	327.7 mg = 81.8%	484.8 mg = 83.5%
Farbstoffe: 3.3 mg = 0.8%	4.2 mg = 1.0%	4.9 mg = 0.8%
53.1 mg = 13.0%	46.2 mg = 11.5%	90.0 mg = 15.5%
382.7 mg = 93.9%	378.1 mg = 94.3%	579.7 mg = 99.8%
	Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther	
in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 407.5 mg	in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 400.7 mg	in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 580.6 mg
Filtr.: 1. 0.6 mg 2. 0.7 mg 3. 0.7 mg	0.7 mg 0.7 mg 0.4 mg	0.5 mg 1.7 mg 0.7 mg
2.0 mg = 0.5%	1.8 mg = 0.5%	2.9 mg = 0.5%

kochenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt, danach mit Wasser verdünnt (auf je 10 ccm Alkohol 15 ccm Wasser) und viermal mit je 20 ccm Petroläther das freie Sterin ausgeschüttelt. Die petrolätherische Lösung wurde jedesmal durch dasselbe Faltenfilter filtriert und nach Abdampfen des Petroläthers das freie Sterin gewogen. Durch Verseifen von Cholesterylstearat überzeugte ich mich von der quantitativen Spaltung des Esters.

2. Die freien Sterine wurden als Digitonide gravimetrisch bestimmt. Dabei wurde das Sterin in 1 ccm 96%igem Alkohol gelöst (eventuell unter gelindem Erwärmen) und mit einer 1%igen Lösung von Digitonin in 90%igen Alkohol versetzt. Zu je 1 mg Sterin kamen 0.5 ccm Digitoninlösung. (Erhöht man die Menge der Digitoninlösung, so steigt die Menge des Digitonids über den theoretischen Wert an.) Aus dem Gewicht des Digitonids berechnete ich den Betrag des Sterins durch Multiplikation mit dem Faktor 0.25. (Der theoretische Faktor für Cholesterin wäre 0.2431, für Stigmasterin 0.2555. Da aber die genaue chemische Zusammensetzung der Sterine der untersuchten Algen nicht bekannt war, multiplizierte ich mit dem Faktor 0.25.)

Die im Benzoleluat befindlichen Triglyceride wurden, da sie in größerer Menge zur Verfügung standen, einer genaueren Analyse unterzogen. Ich bestimmte neben den Verseifungszahlen auch die Jod- und Rhodanzahlen. Da aber zur gleichzeitigen Bestimmung dieser drei Kennzahlen die Rückstände jedes einzelnen Eluates nicht ausreichten, wurde in den Benzoleluaten des ersten Adsorptionsversuches die Rhodanzahl (RhZ.), in denen des zweiten die Jodzahl (JZ.) und in denen des dritten die Verseifungszahl (VZ.) ermittelt.

Die Bestimmung der Jodzahl erfolgte nach der Vorschrift von H. P. KAUFMANN (1935, S. 23) an 10 bis 100 mg Fett in den als Vorlage benutzten 50 ccm Erlenmeyerkolben, die Bestimmung der Rhodanzahl ebenfalls nach H. P. KAUFMANN (1935, S. 73).

Die Verseifungszahlen waren bei den Chlorellatriglyceriden unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode in den untersuchten sechs aufeinanderfolgenden Eluaten gleich, während die Jod- bzw. Rhodanzahlen bei fortschreitender Elution anstiegen. Die Rhodanzahlen waren immer niedriger als die Jodzahlen. Diese Tatsachen unterstützen die Theorie, daß Verbindungen um so stärker adsorbiert bzw. um so schwerer eluiert werden, je ungesättigter sie sind. Die gefundenen Jod- und Rhodanzahlen bewiesen, daß nicht nur einfach ungesättigte, sondern auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den Triglyceriden enthalten sind. Da die Verseifungszahlen nicht anstiegen und ungefähr den Wert für Tristearin besaßen, darf man annehmen, daß es sich um Triglyceride handelt, deren Fettsäuren die durchschnittliche C-Atomzahl 18 besitzen. In anderen hier nicht beschriebenen Versuchen an Chlorellalipoiden ergab die Bestimmung der Verseifungszahl der mit Äther eluierten Diglyceride ungefähr den Wert für Distearin; die beiden Fettsäuren der Diglyceride besaßen also im Mittel ebenfalls 18 C-Atome. Die Rhodan- und Jodzahlen der Chlorellatriglyceride stiegen von 63.8 bzw. 93.1 im Rückstand des ersten Eluates auf 93.5 bzw. 167.9 im Rückstand des letzten Eluates an. Aus der Höhe

dieser Rhodan- und Jodzahlen war zu schließen, daß in den Triglyceriden mindestens zwei ungesättigte Fettsäuren vorkommen müssen, von denen wiederum eine mehrfach ungesättigt sein muß. Ferner ließ sich aus der Höhe dieser Zahlen errechnen, daß im Rückstand des ersten Eluates pro Mol Triglycerid 2 Mol Rhodan und 3 Mol Jod, im Rückstand des letzten Eluates 3 Mol Rhodan und 6 Mol Jod pro Mol Triglycerid aufgenommen wurden. Abb. 2 bringt dieses graphisch zum Ausdruck.

Da Triglyceridmoleküle immer nur ganzzahlige Halogenmoleküle anlagern, ist bei einem Anstieg der Rhodanzahl von zwei auf drei pro Triglyceridmolekül anzunehmen, daß bei *Chlorella* nur zwei Triglyceride vorkommen. Der progressive und nicht sprunghafte Anstieg der Rhodanzahl — und ebenso auch der Jodzahl — ist darauf zurückzuführen, daß bei der Adsorption und bei der Elution keine scharfe Trennung der Triglyceride erfolgt, so daß im Rückstand des ersten Eluates wohl das erste Triglycerid enthalten ist, während die folgenden in zunehmendem Maße mit dem zweiten Triglycerid vermenget sind und erst im letzten Eluat das zweite Triglycerid allein enthalten ist.

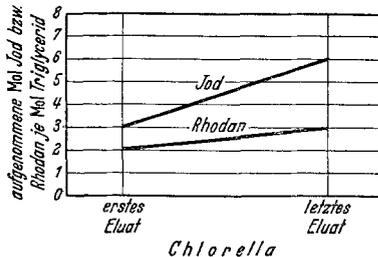


Abb. 2. Jod- und Rhodanaufnahme beim Triglycerid von *Chlorella*.

Da die Hauptmenge der Triglyceride im Chlorellafett Fettsäuren mit der durchschnittlichen C-Atom-Zahl 18 besitzt und die ungesättigten Fettsäuren in natürlichen Fetten meist vom Typ der Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese auch in den Chlorellalipoiden vorkommen. Leider war es wegen der geringen Extraktmengen nicht möglich, die Fettsäuren näher zu analysieren. Die Annahme, daß es sich bei den Fettsäuren hauptsächlich um Ölsäure und Linolsäure handelt, wird durch die Höhe der Jod- bzw. Rhodanzahlen höchstwahrscheinlich gemacht. Im Chlorellalipoid kann man daher zwei Triglyceride folgender Zusammensetzung annehmen:



Jede andere Zusammensetzung würde ein anderes Verhältnis zwischen den Jod- und Rhodanzahlen ergeben.

Die Menge der im Äthereluat neben dem freien Sterin erfaßten Diglyceride, die bei der Adsorption von Triglyceriden an Aluminiumoxyd entstanden sind (siehe Versuch IV B Seite 608/609), ist als Triglycerid in die Bilanz eingesetzt worden. Die Summe der in sämtlichen Eluaten aus der Aluminiumoxydsäule erfaßten Substanzen betrug praktisch 100% der verwandten Substanzmengen, so daß sich daraus ergibt, daß präformierte freie Fettsäuren im Chlorellafett nicht in nachweisbarer Menge enthalten sind.

Tabelle II. Analyseergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *Nitzschia palea*.

1. Adsorptionsversuch		2. Adsorptionsversuch		3. Adsorptionsversuch	
Ausgangsmenge: 1.00 g Trockensubstanz ergaben 194.1 mg (= 19.4%) ätherlösl. Lipoiden		Ausgangsmenge: 1.65 g Trockensubstanz ergaben 283.3 mg (= 17.2%) ätherlösl. Lipoiden		Ausgangsmenge: 1.25 g Trockensubstanz ergaben 219.0 mg (= 17.5%) ätherlösl. Lipoiden	
194.1 mg = 100%		Säule aus 300 g Saccharose. 283.3 mg = 100%		219.0 mg = 100%	
gelöst in je 100 cem Petroläther/Benzol 14 : 1, nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14 : 1		gelöst in je 100 cem Petroläther/Benzol 14 : 1, nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14 : 1		gelöst in je 100 cem Petroläther/Benzol 14 : 1	
Filtrate: 1.	126.4 mg	215.5 mg	183.9 mg	191.9 mg = 87.6%	
2.	27.6 mg	5.9 mg	5.4 mg	1.3 mg = 0.6%	
3.	8.0 mg	3.9 mg	2.0 mg	28.3 mg = 12.9%	
4.	4.5 mg	4.2 mg	0.6 mg	221.5 mg = 101.1%	
5.	0.5 mg	0.2 mg	0.0 mg		
Phosphatide:	167.0 mg = 86.0%	229.7 mg = 81.1%	191.9 mg = 87.6%		
Farbstoffe:	0.8 mg = 0.4%	1.1 mg = 0.4%	1.3 mg = 0.6%		
	28.3 mg = 14.6%	57.8 mg = 20.4%	28.3 mg = 12.9%		
	196.1 mg = 101.0%	288.6 mg = 101.9%	221.5 mg = 101.1%		
Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 cem Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther		Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 cem Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther		Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 cem Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther	
	in % der zum Adsorptions- versuch verwandten 194.1 mg	in % der zum Adsorptions- versuch verwandten 283.3 mg	in % der zum Adsorptions- versuch verwandten 283.3 mg	in % der zum Adsorptions- versuch verwandten 219.0 mg	
Filtr.: 1.	0.2 mg	1.3 mg	2.5 mg	2.5 mg	
2.	0.1 mg	1.0 mg	2.6 mg	2.6 mg	
3.	0.4 mg	0.8 mg	1.1 mg	1.1 mg	
	0.7 mg = 0.4%	3.1 mg = 1.1%	6.2 mg = 2.8%	6.2 mg = 2.8%	

		eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff			
Eluate:	1. 1.5 mg	0.9 mg		1.7 mg	
	2. 0.7 mg	1.5 mg		1.3 mg	
	3. 0.3 mg	1.3 mg		1.6 mg	
	2.5 mg	3.7 mg	= 1.3%	4.6 mg	2.1%
		eluiert mit Benzol			
Eluate:	1. 7.1 mg	3.8 mg		4.4 mg	
	2. 23.8 mg	12.4 mg	JZ.*) 85.8	19.5 mg	VZ.*) 193.8
	3. 45.2 mg	36.8 mg	" 96.3	22.7 mg	" 189.3
	4. 42.7 mg	34.6 mg	" 100.1	27.8 mg	" 189.4
	5. 6.2 mg	22.8 mg	" 110.2	28.7 mg	" 194.9
	6. 3.1 mg	23.4 mg	" 109.2	16.4 mg	" 193.0
	7. 2.0 mg	19.1 mg	" 115.9	18.5 mg	" 189.0
	8. 0.0 mg	9.2 mg	—	8.1 mg	—
	9. 0.0 mg	9.0 mg	—	8.4 mg	—
	10. 0.0 mg	6.6 mg	—	9.7 mg	—
	11. 0.0 mg	0.0 mg	—	0.7 mg	—
	130.1 mg	177.7 mg	= 67.0%	164.9 mg	= 75.3%
		eluiert mit Äther			
Eluate:	1. 9.2 mg	1.4 mg	= 0.0 mg St.**)	10.6 mg	= 4.4 mg St.**)
	2. 15.5 mg	27.5 mg	= 4.1 mg St.	2.5 mg	= 0.0 mg St.
	3. 2.3 mg	1.5 mg	—	0.0 mg	—
	4. 0.0 mg	0.0 mg	—	0.0 mg	—
	27.0 mg	30.4 mg		13.1 mg	
	— 2.1 mg	— 4.1 mg		— 4.4 mg	
	24.9 mg	26.3 mg	= Diglyceride	8.7 mg	= Diglyceride
	Diglyceride berechnet als	Diglyceride berechnet als		Diglyceride	berechnet als
	Triglyceride: = 17.9%	Triglyceride: = 13.0%		Triglyceride: = 5.6%	
Gesamteluat:	= 87.7%	= 79.6%		= 87.8%	

*) RhZ. = Rhodanzahl, JZ. = Jodzahl, VZ. = Verseifungszahl

**) St. = Sterin.

Tabelle III. Analysenergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *Scenedesmus*.

1. Adsorptionsversuch		2. Adsorptionsversuch		3. Adsorptionsversuch	
Ausgangsmenge: 1.75 g Trockensubstanz ergaben 174.8 mg (= 10.0%) ätherlösl. Lipoid		Ausgangsmenge: 1.75 g Trockensubstanz ergaben 168.2 mg (= 9.6%) ätherlösl. Lipoid		Ausgangsmenge: 2.70 g Trockensubstanz ergaben 336.9 mg (= 12.5%) ätherlösl. Lipoid	
Säule aus 300 g Saccharose 174.8 mg = 100%		Säule aus 300 g Saccharose 168.2 mg = 100%		336.9 mg = 100%	
gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1,		gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1,		gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1	
Filtrate: 1.	98.9 mg	101.3 mg	176.9 mg		
2.	1.6 mg	0.8 mg	18.4 mg		
3.	0.2 mg	0.5 mg	1.6 mg		
4.	0.3 mg	0.5 mg	1.2 mg		
5.	0.0 mg	0.0 mg	0.1 mg		
	<u>101.0 mg = 57.8%</u>	<u>103.1 mg = 61.5%</u>	<u>198.2 mg = 58.8%</u>		
Phosphatide:	0.3 mg = 0.2%	1.7 mg = 1.0%	2.5 mg = 0.8%		
Farbstoffe:	<u>74.3 mg = 42.5%</u>	<u>60.4 mg = 35.9%</u>	<u>129.3 mg = 38.4%</u>		
	175.6 mg = 100.5%	165.2 mg = 98.4%	330.0 mg = 98.0%		
Säule aus 100 g Aluminiumoxyd,					
gelöst in je 100 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther					
in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 174.8 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 168.2 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 336.9 mg	
Filtr.: 1.	6.9 mg	6.0 mg	11.1 mg VZ.*	89.7	
2.	0.0 mg	0.4 mg	1.2 mg		
3.	0.0 mg	0.0 mg	0.4 mg		
4.	0.0 mg	0.0 mg	0.5 mg		
	<u>6.9 mg</u>	<u>6.4 mg</u>	<u>13.2 mg</u>		<u>= 3.9%</u>

		eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff			
Eluate:	1. 0.1 mg	0.4 mg		0.4 mg	
	2. 0.5 mg	0.4 mg		0.1 mg	
		0.8 mg	= 0.3 %	0.5 mg	= 0.1 %
		eluiert mit Benzol			
Eluate:	1. 3.8 mg	7.9 mg		6.8 mg	
	2. 10.7 mg RhZ. *) 90.2	30.6 mg JZ. *) 138.3		50.1 mg VZ. *) 189.5	
	3. 31.0 mg " 85.3	18.6 mg " 139.3		41.0 mg " 184.5	
	4. 26.4 mg " 87.6	14.7 mg " 135.6		38.7 mg " 193.1	
	5. 3.3 mg	3.6 mg		3.4 mg	
	6. 3.0 mg	3.0 mg		3.5 mg	
	7. 0.0 mg	0.3 mg		1.9 mg	
	8. 0.0 mg	0.0 mg		0.0 mg	
	78.2 mg	78.7 mg	= 44.7 %	145.4 mg	= 43.2 %
		eluiert mit Äther			
Eluate:	1. 2.3 mg = 0.2 mg St.**)	2.4 mg = 0.6 mg St.**		9.4 mg = 1.3 mg St.**)	
	2. 2.0 mg = 0.5 mg St.	2.6 mg = 1.6 mg St.		11.0 mg = 6.2 mg St.	
	3. 1.6 mg = 1.0 mg St.	2.0 mg = 1.3 mg St.		5.0 mg = 4.1 mg St.	
	4. 1.5 mg = 1.2 mg St.	2.2 mg = 1.8 mg St.	= 3.8 %	2.3 mg = 0.3 mg St.	= 3.5 %
	5. 3.5 mg = 2.4 mg St.	1.5 mg = 0.7 mg St.		0.6 mg = 0.0 mg St.	
	6. 2.0 mg = 1.4 mg St.	0.9 mg = 0.2 mg St.		0.8 mg = 0.0 mg St.	
	7. 0.0 mg	0.0 mg		0.0 mg	
	12.9 mg	11.6 mg		29.1 mg	
	6.7 mg Sterin	5.7 mg Sterin		11.9 mg Sterin	
	6.2 mg = Diglyceride	5.9 mg = Diglyceride		17.2 mg = Diglyceride	
Diglyceride berechnet als	Triglyceride: = 5.0 %	Diglyceride berechnet als	Triglyceride: = 4.9 %	Diglyceride berechnet als	Triglyceride: = 7.1 %
Gesamteluat:	= 57.7 %	= 59.4 %		= 57.8 %	

*) RhZ. = Rhodanzahl, JZ. = Jodzahl, VZ. = Verseifungszahl. **) St. = Sterin.

Wie schon im Anfang der Arbeit (Seite 604) gesagt wurde, lassen sich die ätherischen Öle zunächst nicht durch die Adsorptionmethode erfassen. Um ihre Menge festzustellen, wurden in besonderen Versuchen die Chlorellalipoide der Wasserdampfdestillation unterworfen. Da die Destillate verhältnismäßig wenig ätherisches Öl enthielten, extrahierte ich es aus dem Destillat mit Äther. Der Äther wurde verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator kurz evakuiert und anschließend gewogen. In einem solchen als Beispiel hier mitgeteilten Versuch erhielt ich von 409.1 mg Ausgangsmaterial 6.2 mg = 1.5% ätherisches Öl. Das Öl besaß einen mehr oder minder scharfen, etwas senföartigen Geruch und zeichnete sich durch sehr hohe Viskosität aus. Wegen der geringen Menge war es nicht möglich, eine nähere Analyse durchzuführen. Mit fuchsinschwefeliger Säure ließen sich keine Aldehyde, mit Eisen III-Chlorid keine Phenole und mit Lackmus keine Carbonsäuren nachweisen.

Die voranstehenden Tabellen II und III zeigen, daß die *Nitzschia*- und *Scenedesmus*-Lipoide ähnlich zusammengesetzt sind wie die *Chlorella*-Lipoide.

Der Gehalt der an der Saccharosesäule adsorbierten Phosphatide betrug auch bei diesen beiden Algen weniger als 1%, der Gehalt an Farbstoffen war bei *Nitzschia* etwa gleich groß, bei *Scenedesmus* etwa dreimal so groß wie bei *Chlorella*. Von grünen Farbstoffen enthielt *Scenedesmus* Chlorophyll a und b und die Phaeophytine a und b, während bei *Nitzschia* nur Chlorophyll a und Phaeophytin a nachweisbar waren. Bei der Diatomee wurde auf der Saccharosesäule neben dem Xanthophyll noch ein gelber, wahrscheinlich sauerstoffhaltiger Farbstoff erkennbar, der von der Saccharose stärker als Xanthophyll und schwächer als Chlorophyll a adsorbiert wurde. Da dieser unbekannte Farbstoff im Entmischungsversuch in 90%iges Methanol, aber nicht in 70%iges Methanol überging, ist er nicht mit Fucoxanthin identisch.

Die Fraktion der Kohlenwasserstoffe und Wachse ist bei *Nitzschia* kaum größer als bei *Chlorella*, dagegen bei *Scenedesmus* mit 3.9% deutlich erhöht und auch fast ausschließlich im Filtrat 1 enthalten. Bei der im 3. *Scenedesmus*-Adsorptionsversuch zur Verfügung stehenden größeren Menge von 11.1 mg wurde die Verseifungszahl bestimmt und mit 89.7 ermittelt. Dies beweist, daß die Substanz kein Kohlenwasserstoff ist. Der Größenordnung nach könnte es ein Sterinester sein, aber nach dem Verhalten im Adsorptionsversuch muß es ein Wachs sein. Zur Bestätigung seiner Wachsatur wurden die im 2. *Scenedesmus*-Adsorptionsversuch gewonnenen 6.0 mg Substanz mit Natriumäthylat verseift und nach Verdünnen mit Wasser die Äthylatlösung mit Petroläther extrahiert. Der nach Verdampfen des Petroläthers erhaltene Rückstand war fest. Da er in wenig Alkohol gelöst auf Zusatz alkoholischer Digitoninlösung keinen Niederschlag gab, kann es sich nicht um einen Sterinester handeln, sondern um ein

Wachs. Wegen der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Wachses ist die Verseifungszahl sicherlich mit einem verhältnismäßig großen Fehler belastet, so daß sich vorerst über die Komponenten des Wachses keine Aussagen machen lassen.

Sterinester waren bei *Scenedesmus* kaum vorhanden; bei *Nitzschia* betrug ihre Menge im Mittel der drei Adsorptionsversuche 1.6%. Es ist aber auch hier wie bei *Chlorella* (siehe Seite 619) fraglich ob es sich ausschließlich um Sterinester handelt.

Die Menge der freien Sterine war bei *Nitzschia* mit 1.5% im Mittel höher als bei *Chlorella* (0.3%) und bei *Scenedesmus* mit 3.6% am höchsten.

In der Triglyceridfraktion zeigten wie bei *Chlorella* die Rückstände aller aufeinanderfolgenden Eluate sowohl bei *Nitzschia* wie bei *Scenedesmus* die gleichen Verseifungszahlen, auch stimmte die Größe der Verseifungszahlen mit den bei *Chlorella* ermittelten überein, so daß auch die Triglyceride von *Nitzschia* und *Scenedesmus* Fettsäuren mit der durchschnittlichen C-Atomzahl 18 enthalten dürften. Auch waren die Rhodanzahlen bei *Nitzschia* und *Scenedesmus* stets

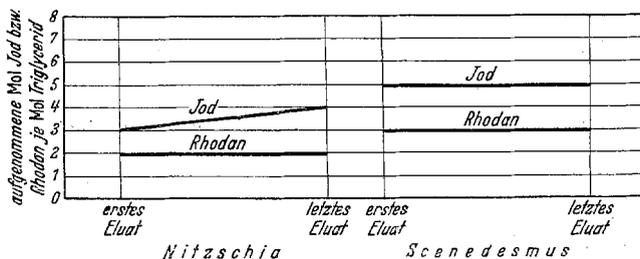


Abb. 3. Jod- und Rhodanaufnahme bei den Triglyceriden von *Nitzschia* und *Scenedesmus*.

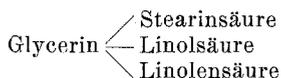
niedriger als die Jodzahlen. Aber die Rhodanzahlen blieben bei diesen beiden Algenlipoiden im Gegensatz zum Verhalten der *Chlorella*-triglyceride in allen aufeinanderfolgenden Eluatrückständen gleich, bei *Scenedesmus* blieben auch die Jodzahlen in den aufeinanderfolgenden Eluatrückständen unverändert, und nur bei *Nitzschia* stiegen die Jodzahlen wie bei *Chlorella* kontinuierlich an. Auch hier ließ sich aus der Höhe der Jod- und Rhodanzahlen die auf ein Triglyceridmolekül entfallende Jod- und Rhodanmenge errechnen. Sie betrug bei *Nitzschia* im ersten eluierten Triglycerid pro Mol 3 Mol Jod und 2 Mol Rhodan, im letzten eluierten Triglycerid 4 Mol Jod und 2 Mol Rhodan. Von den *Scenedesmus*-Triglyceriden wurden pro Mol stets nur 5 Mol Jod und 3 Mol Rhodan aufgenommen. Graphisch ist dieses Verhalten in Abb. 3 wiedergegeben.

Unter Zugrundelegung der auf Seite 623 gemachten Ausführungen und der ermittelten Kennzahlen ist anzunehmen, daß in den Lipoiden

von *Nitzschia* zwei Triglyceride, und zwar von folgender Zusammensetzung



vorkommen, in den Lipoiden von *Scenedesmus* nur eines von der Zusammensetzung



Diglyceride waren auch bei *Nitzschia* und *Scenedesmus* wie bei *Chlorella* im Äthereluat enthalten. Anhaltspunkte für die Anwesenheit präformierter freier Fettsäuren ergaben sich auch hier nicht.

An ätherischen Ölen wurden bei *Nitzschia* aus 93.4 mg Substanz durch Wasserdampfdestillation 8.9 mg = 9.5% abgetrennt, bei *Scenedesmus* aus 221.8 mg Substanz 4.5 mg = 2.0%. Beide Öle waren sehr viskos und rochen senfölig. Die gleichen Reaktionen, die bei dem ätherischen Öl aus *Chlorella* negativ verlaufen waren (siehe Seite 628), waren auch hier negativ.

Zur besseren Übersicht sind die Analysenergebnisse der an den Algenlipoiden durchgeführten Versuche in Tabelle IV anschaulich dargestellt:

Tabelle IV. Prozentuale Zusammensetzung der Lipoide.

Gesamtlipoide in % der Trockensubstanz	<i>Chlorella</i> 27.6	<i>Nitzschia</i> 18.0	<i>Scenedesmus</i> 10.7
darin Farbstoffe	14.3%	16.0%	38.9%
Phosphatide	0.9%	0.5%	0.7%
Kohlenwasserstoffe und Wachse	0.5%	1.4%	3.9%
Sterinester?	2.4%	1.6%	0.3%
Freie Sterine	0.3%	1.5%	3.6%
Triglyceride	78.5%	80.5%	50.6%
Freie Fettsäuren	—	—	—
	96.9%	101.5%	98.0%

Wie man aus dieser Darstellung besonders deutlich sieht, ist die Zusammensetzung der ätherlöslichen Lipoidfraktion bei *Chlorella* und *Nitzschia* sehr ähnlich, bei *Scenedesmus* ist die Triglyceridfraktion prozentual geringer und dafür die Farbstoff-Fraktion — und auch die übrigen Fraktionen — prozentual erhöht. Der Gehalt der ätherlöslichen Lipoidfraktion an ätherischem Öl war bei *Nitzschia* mit 9.5% erheblich höher als bei den Grünalgen, was vielleicht für die Verwertbarkeit dieser Algenfette für die menschliche Ernährung von Bedeutung sein könnte.

Vergleicht man die Zusammensetzung der von mir untersuchten Lipidfraktionen autotropher Mikroorganismen mit der von Lipoiden heterotropher Mikroorganismen und höherer Pflanzen, z. B. Samen-fetten, so findet man keine grundsätzlichen Unterschiede. In den Fetten niederer wie höherer Pflanzen kommen Triglyceride vor mit einem sehr hohen Prozentsatz ungesättigter, vor allem auch mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Zum Vergleich seien in Tabelle V einige Kennzahlen und die prozentuale Beteiligung einiger Lipoidbestandteile bei dem Chlorellaöl, dem Öl der Nektarhefe und dem Mohnöl nebeneinandergestellt:

Tabelle V. *Zusammensetzung einiger Lipoide.*

	Chlorellaöl	Öl der Nektarhefe (RIPPEL-BALDES, 1947)	Mohnöl (BÖHMER)
Verseifungszahl	Mittel 190	197	189—194
Jodzahl	93—168	70	131—143
Rhodanzahl	64— 94	—	76— 79
Phosphatide	weniger als 1%	—	Spur
Freie Sterine	0.3%	—	0.2%
Sterinester	0.3%	—	0.02%
Unverseifbares	wenig. als 0.8%*)	0.21%	0.4—0.6%

*) ohne Farbstoffe.

Bei dem Öl der heterotrophen Nektarhefe sind erst wenige Daten bekannt, so daß ein befriedigender Vergleich dieses Öles mit den beiden anderen Ölen noch nicht möglich ist. Insgesamt aber zeigt sich, daß die autotrophen und wahrscheinlich auch die heterotrophen Mikroorganismen die gleichen bzw. ähnlich zusammengesetzte Lipoide zu bilden vermögen wie höhere Pflanzen, daß meist nur in quantitativer Hinsicht individuelle Unterschiede bestehen. Nur eine Ausnahme ist mir nach Abschluß dieser Arbeit dank einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. G. E. FOGG vom Department of Botany vom University College London bekannt geworden: H. T. CLARKE und A. MAZUR berichten im Journal of Biological Chemistry **141**, 283—289 (1941), daß sie in frisch gesammelten marinen *Diatomeen* einen hohen Gehalt an freien Fettsäuren (80%) neben 17% Estern fanden. Ob dieser ungewöhnlich hohe Gehalt an freien Fettsäuren sich auch in anderen marinen Mikroorganismen findet oder ob die Art der Aufarbeitung eine andere war, vermag ich im Augenblick nicht zu klären.

Eine weitere Analyse bzw. genauere Identifizierung der einzelnen Bestandteile der Lipoide autotropher Mikroorganismen ist sicherlich möglich, sobald größere Mengen von Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen. Dabei würde sich auch der prozentuale Fehler bei der Wägung der einzelnen Rückstände verkleinern. Immerhin zeigen bereits die in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche, daß mittels der Adsorptionsmethode

die Analyse eines Lipoidgemisches auch an wenig Ausgangsmaterial möglich ist.

Nachtrag bei der Korrektur.

Aus der Carnegie Institution of Washington, Division of Plant Biology, Stanford, California, sind inzwischen Arbeiten erschienen, die sich gleichfalls mit der Zusammensetzung des in *Chlorella*-Kulturen (*Chlorella pyrenoidosa*) gebildeten Fettes beschäftigen [H. A. SPOEHR: Carnegie Institution of Washington Year Book No. 46, 94 (1947); H. W. MILNER: Journ. of Biol. Chem. 176, 813 (1948); H. A. SPOEHR u. H. W. MILNER: Plant Physiology 24, 120 (1949); H. A. SPOEHR, J. H. C. SMITH, H. H. STRAIN, H. W. MILNER u. G. J. HARDIN: Fatty acid antibacterials from plants, Carnegie Institution of Washington Publication 586 (1949)]. Um die Gesamtlipoide möglichst vollständig zu erfassen, wurden die getrockneten Algen (27.15 % Trockensubstanzgehalt), nach Vorbehandlung mit Wasser, mehrmals nacheinander abwechselnd mit Methylalkohol und Petroläther, zum Schluß mit Äther extrahiert. Nach Entfernung der organischen Lösungsmittel im Vakuum aus den vereinigten Extrakten wurde der Rückstand mit Äther extrahiert und der nach Entfernung des Äthers verbleibende Rückstand im Vakuum zur Konstanz getrocknet. Dieser Gesamtlipoidgehalt konnte durch Variation der äußeren Bedingungen bei der Kultur der Algen von 23 % bis auf 76 % der getrockneten Algen gebracht werden. Davon waren 7 bis 69 % Neutralfett, der Rest Unverseifbares. Bei geringem Gesamtlipoidgehalt der Algen war der Anteil an Unverseifbarem und an wasserlöslichen Verseifungsprodukten wesentlich größer als bei hohem Gesamtlipoidgehalt, der Chlorophyllgehalt z. B. sank von 6 % auf 0.03 %.

Eine Fraktionierung der Lipoide in der von mir durchgeführten Art erfolgte nicht, vielmehr wurden die Gesamtlipoide (aus 50—1000 g getrockneter Algen) verseift und die Fettsäuren über die Bleisalze und Methyl ester in üblicher Weise getrennt. 54—70 % der gesamten Fettsäuren gehörten zu den C₁₈ Fettsäuren, der Rest zu den C₁₆ Fettsäuren, und die ungesättigten Fettsäuren übertrafen an Menge mit 83—88 % der gesamten Fettsäuren die gesättigten bei weitem. Die Jodzahlen schwankten in den einzelnen Ansätzen zwischen 125 und 163, ließen auf die Anwesenheit von dreifach ungesättigten Fettsäuren schließen und waren bei geringem Gesamtlipoidgehalt der Algen am höchsten. Das durchschnittliche Molekulargewicht blieb mit Schwankungen zwischen 269 und 274 in allen Ansätzen fast konstant.

Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit meinen Ergebnissen überein. Daß sich in meinen Versuchen keine Anhaltspunkte für die Anwesenheit von C₁₆ Fettsäuren ergaben, kann darauf beruhen, daß ihre Menge zu gering war, als daß sie bei meinem indirekten Verfahren erfaßt wurden, kann aber auch auf dem andersartigen Kulturverfahren der Algen oder einer anderen als der von mir verwandten *Chlorella*-Art oder auf dem andersartigen Extraktionsverfahren beruhen.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit hat im wesentlichen folgendes ergeben:

1. Auf Grund von Modellversuchen an verschiedenen Lipoiden ist eine Methode nach dem Prinzip des Adsorptionsverfahrens entwickelt worden, mit deren Hilfe geringe Mengen (1 g und weniger) eines

Lipoidgemisches in relativ kurzer Zeit analysiert werden können. Die Brauchbarkeit der Methode ist an einem künstlich zusammengestellten Lipoidgemisch gezeigt worden.

2. Mit dieser Methode wurden Lipoidgemische aus zwei Grünalgen (*Chlorella* und *Scenedesmus*) und einer Diatomee (*Nitzschia palea*), alle drei aus künstlicher Kultur, analysiert.

3. Die drei Algenfette bestanden zu 50—80% aus Triglyceriden, zu 14—39% aus Pflanzenfarbstoffen (Chlorophylle und Carotinoide), zu 3—4% aus freien und gebundenen Sterinen, zu 0.5—0.9% aus ätherlöslichen Phosphatiden und zu 0.5—4% aus Kohlenwasserstoffen bzw. Wachsen. Präformierte freie Fettsäuren waren nicht nachweisbar. Die Menge der durch Wasserdampfdestillation abgetrennten ätherischen Öle betrug 1.5—9.5%.

4. Die Triglyceridfraktion wurde durch die Bestimmung der Verseifungs-, Jod- und Rhodanzahlen näher analysiert und aus diesen Zahlen auf die Konstitution der am Triglyceridaufbau beteiligten Fettsäuren geschlossen.

5. Die Zusammensetzung der Algenlipoide ist ähnlich der der Fette in heterotrophen Mikroorganismen und in Samen höherer Pflanzen, wie aus einer Gegenüberstellung (Seite 631) ersichtlich wird.

Herrn Professor Dr. R. HARDER, der die Anregung zu dieser Arbeit gab, und Herrn Professor Dr. H. J. DEUTICKE, unter dessen Leitung sie ausgeführt wurde, danke ich herzlich für ihre Unterstützung.

Literatur.

BARG, T.: Ber. Deutsch. botan. Ges. **61**, 13 (1942). — BERNHAUER, K. und Mitarbeiter: Biochem. Z. **319**, 77, 94, 102 (1948). — BOKORNY, Th.: Biochem. Z. **75**, 346 (1916). — BÖHMER, A., A. JUCKENACK u. J. TILMANS: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. IV. Berlin 1939.

DAMM, H.: Chem. Zeitg., **67**, 47 (1943). — DIEMAIR, W., B. BLEYER u. W. SCHMIDT: Biochem. Z. **294**, 353 (1937). — DIRR, K. u. O. v. SODEN: Biochem. Z. **312**, 263 (1942).

FINK, H. u. F. JUST: Biochem. Z. **300**, 84 (1939).

GATTERMANN, L. u. H. WIELAND: Die Praxis des organ. Chemikers **31**. Auflage, 399 (1944). — GROSSFELD, I.: Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel- bzw. Lebensmittel **62**, 447 (1931).

HARDER, R. u. H. v. WITSCH: Ber. Deutsch. botan. Ges. **60**, 146 (1942); Der Forschungsdienst, Sonderheft **16**, 270 (1942). — HÜTTEL, R. u. H. BEHRINGER: Z. physiol. Chem. **245**, 175 (1937).

KARRER, P. u. H. SALOMON: Helv. chim. Acta **20**, 424 (1937). — KAUFMANN, H. P.: Studien auf dem Fettgebiet. Berlin (1935). — KAUFMANN, H. P.: Angew. Chem. **53**, 98 (1940). — KUHN, R., A. WINTERSTEIN u. E. LEDERER: Z. physiol. Chem. **197**, 141 (1931). — KUHN, R. u. E. LEDERER: ebenda **200**, 108 (1931). — KUHN, R. u. H. BROCKMANN: ebenda **206**, 41 u. **213**, 192 (1932).

LINDNER, P.: Angew. Chem. **35**, 110 (1922). — LOHMANN, K. u. L. JENDRASSIK: Biochem. Z. **178**, 419 (1927).

MÜHLBOCK, O. u. C. KAUFMANN: *Biochem. Z.* **233**, 222 (1931).

NILSSON, R., L. ENEBO, H. LUNDIN u. K. MYRBÄCK: *Svensk Kemisk Tidskrift* **55**, 41 (1943).

REWALD, B.: *Biochem. Z.* **202**, 399 (1928). — RIECHE, A.: *Angew. Chem.* **44**, 896 (1931). — RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*. Berlin und Göttingen, S. 70, (1947). — RIPPEL-BALDES, K. PIETSCHMANN-MEYER u. W. KÖHLER: *Arch. f. Mikrobiol.* **14**, 113 (1948).

SCHWARZ, W.: *Angew. Chem.* **50**, 294 (1937).

THALER, H.: *Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel bezw. Lebensmittel*, **75**, 130 (1938). — TRAPPE, W.: a) *Biochem. Z.* **305**, 150 (1940). — TRAPPE, W.: b) *Ebenda* **306**, 316 (1940). — TRAPPE, W.: c) *Ebenda* **307**, 97 (1940/41).

VAGELER, H.: *Biochem. Z.* **17**, 201, (1909).

WAGNER-JAUREGG, TH.: *Z. physiol. Chem.* **247**, 135 (1937). — WIELAND, H., H. PASEDACH u. A. BALLAUF: *Liebigs Ann.* **529**, 68 (1937). — WIELAND, H. u. Y. KANAOKA: *ebenda* **530**, 146 (1937). — WINDAUS, A. u. O. STANGE: *Z. physiol. Chem.* **244**, 218 (1936). — WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: a) *Z. physiol. Chem.* **220**, 247 (1933). — WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: b) *ebenda* **220**, 263 (1933).
