

ÜBER DEN EINFLUSS VON ANORGANISCHEM STICKSTOFF-GEHALT IN DER NÄHRLÖSUNG AUF DIE FETTSÄURE-BIOSYNTHESE IN GRÜNALGEN

P. POHL, T. PASSIG und H. WAGNER

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, Germany

(Received 23 March 1970)

Zusammenfassung—Die Fettsäure-Zusammensetzung einzelliger Grünalgen (*Bracteacoccus minor*, *Chlorella vulgaris* und drei Subspecies von *Chlorella fusca*) hängt in charakteristischer Weise vom Ammonium- bzw. Nitrat-Gehalt der Nährlösung ab. Bei niedrigem Stickstoffgehalt werden vor allem die Palmitinsäure (C_{16}) und die Ölsäure ($C_{18}(1=)$) gebildet, während bei hohem Stickstoffgehalt die ungesättigten $C_{16}(2=)$ -, $C_{16}(3=)$ -, $C_{16}(4=)$ -, $C_{18}(2=)$ - und $C_{18}(3=)$ -Fettsäuren überwiegen. Die Resultate deuten darauf hin, daß möglicherweise der Stickstoffgehalt des Wassers einer der Faktoren ist, die für die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung von Rot-, Braun und Grünalgen verantwortlich sind.

Abstract—The fatty acid composition of various green algae (*Bracteacoccus minor*, *Chlorella vulgaris* and three subspecies of *Chlorella fusca*) depends characteristically on the content of ammonium or nitrate in the nutrient medium. At low nitrogen levels mainly palmitic acid (C_{16}) and oleic acid ($C_{18}(1=)$) are synthesized whereas at high nitrogen levels the unsaturated $C_{16}(2=)$, $C_{16}(3=)$, $C_{16}(4=)$, $C_{18}(2=)$ and $C_{18}(3=)$ fatty acids predominate. The results indicate that the content of nitrogen in water is possibly one of the factors responsible for the different fatty acid composition of red, brown and green algae.

EINLEITUNG

DIE EINZELNEN Gruppen des Pflanzenreiches unterscheiden sich in charakteristischer Weise hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biosynthese ungesättigter C_{16} -, C_{18} -, C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren.¹⁻²⁰ Besonders auffällig sind diese Unterschiede bei den ungesättigten C_{16} -Fettsäuren (Δ^7 - $C_{16}(1=)$, Δ^7 , 10 - $C_{16}(2=)$, Δ^7 , 10 , 13 - $C_{16}(3=)$ und Δ^4 , 7 , 10 , 13 - $C_{16}(4=)$), über deren Biosynthese und Funktion bis jetzt aber nur wenig bekannt ist.

¹ H. SCHLENK und J. L. GELLERMANN, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **42**, 504 (1965).

² H. WAGNER und P. POHL, *Phytochem.* **5**, 903 (1966).

³ I. A. WOLFF, *Science* **154**, 1142 (1966).

⁴ A. RADUNZ, *Phytochem.* **6**, 399 (1967).

⁵ C. Y. HOPKINS und M. J. CHISHOLM, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **45**, 176 (1968).

⁶ C. F. KREWSON, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **45**, 250 (1968).

⁷ P. POHL und H. WAGNER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, im Druck.

⁸ J. ERWIN und K. BLOCH, *Biochem. Z.* **338**, 496 (1963).

⁹ D. HULANICKA, J. ERWIN und K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **239**, 2778 (1964).

¹⁰ E. D. KORN, *J. Lipid Res.* **5**, 352 (1964).

¹¹ A. ROSENBERG, J. GOUAUX und P. MILCH, *J. Lipid Res.* **7**, 733 (1966).

¹² G. CONSTANTOPOULOS und K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **242**, 3538 (1967).

¹³ A. ROSENBERG und J. GOUAUX, *J. Lipid Res.* **8**, 80 (1967).

¹⁴ B. W. NICHOLS und R. S. APPLEBY, *Phytochem.* **8**, 1907 (1969).

¹⁵ E. KLENK und W. KNIPPRATH, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **317**, 243 (1959).

¹⁶ E. KLENK, W. KNIPPRATH, D. EBERHAGEN und H. P. KOOF, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **334**, 44 (1963).

¹⁷ H. WAGNER und P. POHL, *Biochem. Z.* **341**, 476 (1965).

¹⁸ P. POHL, Dissertation, Universität München (1965).

¹⁹ P. POHL und H. WAGNER, *Phytochem.* **7**, 1565 (1968).

²⁰ R. G. ACKMAN und C. S. TOCHER, *J. Fisheries Res. Board Can.* **25**, 1603 (1968).

Die Bacteriophyta sind nicht zu ihrer Biosynthese fähig. *Euglena gracilis* (Phytoflagellatae) bildet relativ große Mengen dieser Verbindungen.⁸⁻¹⁴ Bei den am höchsten entwickelten pflanzlichen Organismen, den Landpflanzen, findet man sie nicht oder nur in geringen Mengen.^{21,22}

Sehr unterschiedlich ist ihr Vorkommen bei den Algen:¹⁵⁻²⁰ Während man bei den Grünalgen regelmäßig die $C_{16}(1=)$ -, $C_{16}(2=)$ - und $C_{16}(3=)$ - und vereinzelt auch die $C_{16}(4=)$ -Fettsäuren in relativ großen Mengen findet,¹⁵⁻¹⁹ bilden die Rot- und Braunalgen^{16-18,20} nur geringe Mengen an $C_{16}(1=)$ - und $C_{16}(2=)$ -Fettsäuren. Charakteristisch für die Rot- und Braunalgen ist also ihre Unfähigkeit zur Bildung der $C_{16}(3=)$ - und der $C_{16}(4=)$ -Fettsäuren. Die Gründe hierfür sind bisher unbekannt.

Bei Züchtungsversuchen mit verschiedenen Grünalgen machten wir nun die Beobachtung, daß bei Verwendung von Nährlösungen, denen Hefe-Extrakt zugesetzt worden war, die betreffenden Algen stets verhältnismäßig große Mengen an höher ungesättigten C_{16} -Fettsäuren bildeten, während bei Züchtung in rein anorganischen Nährmedien diese Verbindungen meist nur in geringer Konzentration vorhanden waren. Da die Aussicht bestand, hier einen für die Biosynthese der obigen C_{16} -Fettsäuren wichtigen Faktor zu finden, wurden Züchtungsversuche unter Verwendung verschiedener Bestandteile von Hefe-Extrakt gemacht. Dabei stellte sich heraus, daß der hohe Gehalt des Hefe-Extrakts an organisch gebundenem Stickstoff für die verstärkte Bildung der ungesättigten Fettsäuren verantwortlich war.

Im Folgenden wird daher über den Einfluß des Stickstoffgehaltes der Nährlösung auf die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Grünalgen bei Verwendung von NH_4Cl bzw. KNO_3 als alleinige Stickstoffquellen berichtet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die folgenden Grünalgen wurden bakterienfrei als 500 ml-Kulturen in 1 l-Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln bei 25° unter Tageslicht (ca. 800 lx) und den in den Tabellen angegebenen Gehalten an Ammonium bzw. Nitrat gezüchtet: *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova var. *minor*,²³ *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Chlorella fusca* 211-8b, *Chlorella fusca* Cz-115 und *Chlorella fusca* var. *rubescens*.

In den Tabellen 1-4 sind die Trockengewichte, der Gehalt an Lipoiden und die prozentuale Fettsäurezusammensetzung der gezüchteten Algen angegeben. Wie in Vorversuchen ermittelt wurde, benötigt jede Alge für optimales Wachstum einen etwas anderen Stickstoffgehalt in der Nährlösung. Dementsprechend variieren auch die untersten Stickstoffkonzentrationen, bei denen die Algen gerade noch wachsen können. Daraus erklären sich die in den Tabellen 1-4 angegebenen, von Alge zu Alge verschiedenen Gehalte an NH_4Cl bzw. KNO_3 .

(A) Trockengewichte und Lipoidgehalt

Bei sinkendem Gehalt an Ammonium bzw. Nitrat in der Nährlösung tritt eine Verminderung der produzierten Algenmengen (ausgedrückt durch die Trockengewichte) ein. Dies ist zu erwarten, da sinkender Stickstoffgehalt für die Algen eine Verschlechterung der Lebensbedingungen bedeutet. Dagegen bleibt der prozentuale Lipoidgehalt im allgemeinen ziemlich konstant, teilweise steigt er sogar bei sehr niedrigen Stickstoffgehalten an.

²¹ A. RADUNZ, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **343**, 294 (1966).

²² F. T. WOLF, J. G. CONIGLIO und J. T. DAVIES, *Plant Physiol.* **37**, 83 (1962).

²³ J. FRIEDMANN und R. OCAMPO-PAUS, *Nova Hedwigia* **10**, 481 (1965).

TABELLE 1. *Bracteacoccus minor*: ZÜCHTUNG IN ANORGANISCHEM NÄHRMEDIUM MIT UNTERSCHIEDLICHEM GEHALT AN NH_4Cl

	Gehalt an NH_4Cl im Nährmedium						
	0,025 %	0,005 %	0,0025 %	0,001 %	0,0005 %	0,00025 %	0,0001 %
Trockengewicht (mg)	49,40	36,45	34,20	28,18	11,98	8,71	7,74
Gesamtlipide (mg)	12,95	8,60	10,00	7,60	3,85	2,90	2,25
Prozentualer Lipoid-Gehalt (in %, bezogen auf Trockengew.)	26,3	24,6	29,3	27,0	32,2	33,2	34,4
Fettsäuren							
C_{12}	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	2,6	Sp
C_{14}	1,0	0,8	0,9	0,4	0,3	3,0	0,7
C_{16}	1,9	11,2	11,5	15,4	10,4	12,2	9,9
$\text{C}_{16}(1=)$	2,9	4,8	3,8	1,8	1,2	4,4	0,6
$\text{C}_{16}(2=)$	26,0	18,5	18,1	5,0	2,5	3,5	1,3
$\text{C}_{16}(3=)$	5,4	1,6	1,5	0,5	0,3	1,3	0,7
$\text{C}_{16}(4=)$	28,1	11,3	6,1	0,4	Sp	Sp	0,6
C_{18}	2,1	0,8	0,8	0,5	0,6	Sp	0,7
$\text{C}_{18}(1=)$	1,7	4,5	12,2	45,2	66,3	46,7	63,7
$\text{C}_{18}(2=)$	7,7	16,8	28,3	22,6	14,2	17,9	16,4
$\text{C}_{18}(3=)$	23,3	29,7	16,8	8,1	4,1	8,3	5,3

TABELLE 2. *Chlorella vulgaris*: ZÜCHTUNG IN ANORGANISCHEM NÄHRMEDIUM MIT UNTERSCHIEDLICHEM GEHALT AN NH_4Cl

	Gehalt an NH_4Cl im Nährmedium					
	0,025 %	0,005 %	0,001 %	0,0005 %	0,0001 %	0,00005 %
Trockengewicht (mg)	76,91	73,80	65,55	27,85	26,50	16,15
Gesamtlipide (mg)	25,4	22,6	18,74	7,48	8,20	8,76
Prozentualer Lipoid-Gehalt (in %, bezogen auf Trockengew.)	33,1	30,6	28,6	26,9	31,0	54,2
Fettsäuren						
C_{12}	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
C_{14}	0,4	1,4	1,4	3,2	3,0	1,4
C_{16}	1,3	2,3	9,4	11,7	18,5	32,2
$\text{C}_{16}(1=)$	0,4	0,9	1,0	1,1	1,4	0,7
$\text{C}_{16}(2=)$	13,7	4,0	3,1	1,6	1,6	0,6
$\text{C}_{16}(3=)$	25,0	12,9	11,3	3,3	2,9	0,7
C_{18}	Sp	Sp	Sp	Sp	1,6	8,9
$\text{C}_{18}(1=)$	Sp	0,3	3,1	8,5	12,4	27,4
$\text{C}_{18}(2=)$	2,9	7,5	13,0	29,5	22,9	13,0
$\text{C}_{18}(3=)$	56,2	70,7	57,7	41,2	35,4	14,4

TABELLE 3. *Bracteacoccus minor* UND *Chlorella vulgaris*: ZÜCHTUNG IN ANORGANISCHEM NÄHRMEDIUM MIT UNTERSCHIEDLICHEM GEHALT AN KNO_3

	<i>Bracteacoccus minor</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Gehalt an KNO_3 im Nährmedium 0,01 %	0,003 %	0,0015 %	Gehalt an KNO_3 im Nährmedium 0,01 %	0,0015 %	0,0003 %
Trockengewicht (mg)	29,54	25,47	24,50	34,55	44,33	19,47
Gesamtlipoide (mg)	11,50	8,08	7,83	11,34	16,83	9,60
Prozentualer Lipidgehalt (in %, bezogen auf Trockengew.)	38,4	31,2	31,4	32,0	37,9	49,3
Fettsäuren						
C_{12}	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
C_{14}	0,5	0,4	0,5	0,8	1,0	1,1
C_{16}	15,7	14,4	15,0	13,8	20,6	28,8
$\text{C}_{16}(1=)$	3,6	4,1	1,0	2,9	1,7	0,8
$\text{C}_{16}(2=)$	7,8	6,8	4,1	5,8	3,4	0,4
$\text{C}_{16}(3=)$	0,7	1,4	1,2	8,9	6,2	0,9
$\text{C}_{16}(4=)$	6,3	6,1	1,9	—	—	—
C_{18}	2,6	2,0	1,0	Sp	1,0	4,8
$\text{C}_{18}(1=)$	8,7	13,5	44,4	1,1	8,6	30,0
$\text{C}_{18}(2=)$	20,9	22,2	18,5	14,9	17,9	14,2
$\text{C}_{18}(3=)$	33,2	29,1	12,1	51,6	39,6	19,0

TABELLE 4. *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella fusca* UND *Halochlorella rubescens*: ZÜCHTUNG IM SÜSSWASSER-MEDIUM (MIT 0,081 % KNO_3) UND SEEWASSER-MEDIUM (MIT 0,01 % KNO_3)

	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		<i>Chlorella fusca</i>		<i>Halochlorella rubescens</i>	
	0,08 %	0,01 %	0,08 %	0,01 %	0,08 %	0,01 %
Trockengewicht (mg)	54,35	53,0*	42,80	77,84*	44,0	55,0*
Gesamtlipoide (mg)	9,54	6,29	6,81	15,54	7,82	7,93
Prozentualer Lipidgehalt (in %, bezogen auf Trockengew.)	17,6	11,9	15,9	20,0	17,8	14,4
Fettsäuren						
C_{12}	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
C_{14}	0,5	0,2	0,3	Sp	0,5	0,7
C_{16}	18,2	22,3	21,2	22,5	22,7	26,0
$\text{C}_{16}(1=)$	6,5	8,0	4,9	3,2	2,7	3,4
$\text{C}_{16}(2=)$	1,7	5,0	4,6	2,7	4,3	2,2
$\text{C}_{16}(3=)$	11,9	2,7	5,0	0,5	5,4	0,9
C_{18}	Sp	1,1	Sp	Sp	Sp	Sp
$\text{C}_{18}(1=)$	24,8	26,9	25,4	60,5	24,8	58,3
$\text{C}_{18}(2=)$	11,4	15,9	17,4	5,9	18,4	5,2
$\text{C}_{18}(3=)$	25,0	7,8	21,2	4,8	21,1	3,3

* Ungenauer Wert, da relativ hoher Salzzrückstand im gefriergetrockneten Material.

(B) Fettsäure-Zusammensetzung

Bei den Fettsäuren äußert sich die Änderung des Ammonium-bzw. Nitratgehalts sehr deutlich: Bei sinkendem Stickstoffgehalt der Nährlösung sinken bei allen Algen zuerst die ungesättigten $C_{16}(4=)$ -, $C_{16}(3=)$ - und $C_{16}(2=)$ -Fettsäuren in der angegebenen Reihenfolge ab. Bei einem Gehalt von etwa 0,001 bis 0,0005 Prozent NH_4Cl sind sie nur noch in sehr geringer Menge vorhanden. Die ungesättigten $C_{18}(3=)$ - und $C_{18}(2=)$ -Fettsäuren sinken etwas 'später' bei noch niedrigeren Stickstoffwerten ab und durchlaufen teilweise zunächst sogar noch ein Synthese-Maximum. Bei Werten zwischen 0,0005 und 0,0001 Prozent NH_4Cl erfahren aber auch diese Verbindungen einen deutlichen Rückgang.

In scharfem Gegensatz zu diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren stehen die Palmitinsäure (C_{16}) und die Ölsäure ($C_{18}(1=)$), die beide deutlich ansteigen.

Bei unseren Versuchen wurden jeweils genau 2 mg Gesamtlipide unter gleichen Bedingungen transmethyliert und aliquote Mengen der erhaltenen Fettsäuremethylester unter genau gleichen Bedingungen gaschromatographiert. Die bei der Gaschromatographie erhaltenen Peak-Flächen sind daher ein relatives Maß für die in den Lipiden vorhandenen Fettsäuremengen.

Wie aus Abb. 1 am Beispiel von *Chlorella vulgaris* (Züchtung mit KNO_3) hervorgeht, sinken bei tieferen Stickstoffwerten die absoluten Mengen an höher ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren deutlich ab, während die Mengen an C_{16} - und $C_{18}(1=)$ -Fettsäuren ansteigen.

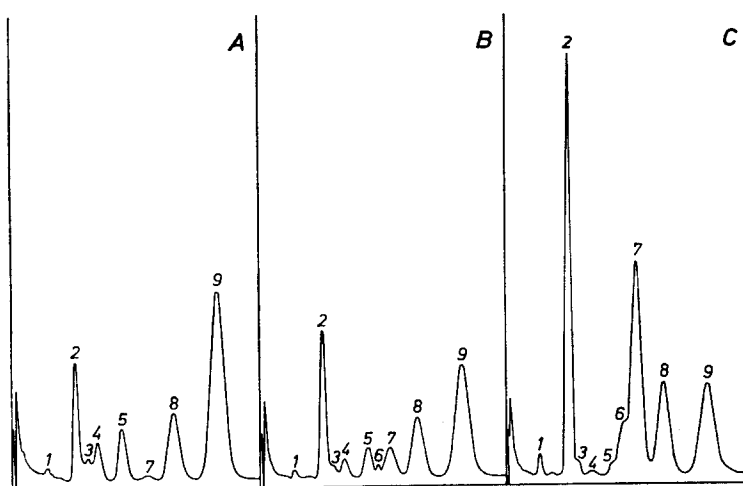


ABB. 1. *Chlorella vulgaris*: GASCHROMATOGRAPHIE ALIQUOTER MENGEN AN FETTSÄUREMETHYLESTERN (ZÜCHTUNG UNTER VERSCHIEDENEM NITRAT-GEHALT; VGL. TABELLE 3).

(A) 0,01 %; (B) 0,0015 %; (C) 0,0003 % KNO_3 in der Nährlösung. 1: C_{14} ; 2: C_{16} ; 3: $C_{16}(1=)$; 4: $C_{16}(2=)$; 5: $C_{16}(3=)$; 6: C_{18} ; 7: $C_{18}(1=)$; 8: $C_{18}(2=)$; 9: $C_{18}(3=)$. Säule: 20 Prozent Reoplex 400 auf Chromosorb WS.

Bei den Süß- und Salzwasserversuchen mit den drei Subspecies von *Chlorella fusca* (s. Tabelle 4) tritt das oben geschilderte Verhalten auch bei der in diesem Fall von uns gewählten relativ hohen unteren Nitratgrenze (0,01 %) deutlich in Erscheinung. In zusätzlichen Versuchen (unveröffentlicht) stellten wir hier fest, daß die unterschiedlichen

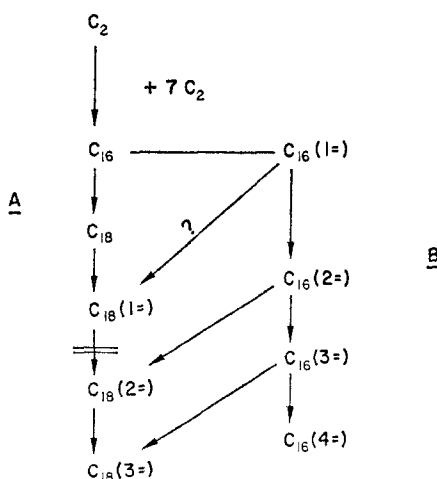
Konzentrationen an NaCl, MgCl_2 und MgSO_4 keinen Einfluß auf die Fettsäurezusammensetzung der drei Subspecies von *Chlorella fusca* hatten.

Die C_{12} -, C_{14} -, C_{18} - und $\text{C}_{16}(1=)$ -Fettsäuren, die meist nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, werden durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte nicht wesentlich beeinflusst. Lediglich die C_{18} -Fettsäure bei *Chlorella vulgaris* (Tabelle 2 und 3) verhält sich bei sehr niedrigem Stickstoff-Gehalt wie die C_{16} - und $\text{C}_{18}(1=)$ -Fettsäuren und steigt an.

Aus den obigen Resultaten ergeben sich zwei bemerkenswerte Befunde. Erstens ist bei den ungesättigten C_{18} -Fettsäuren das völlig entgegengesetzte Verhalten der Ölsäure ($\text{C}_{18}(1=)$) gegenüber den $\text{C}_{18}(2=)$ - und $\text{C}_{18}(3=)$ -Fettsäuren und die Übereinstimmung mit dem Verhalten der Palmitinsäure (C_{16}) bemerkenswert. Zweitens fällt vor allem die starke Abhängigkeit der Biosynthese der ungesättigten $\text{C}_{16}(2=)$ -, $\text{C}_{16}(3=)$ - und der $\text{C}_{16}(4=)$ -Fettsäuren vom Stickstoffgehalt der Nährlösung auf.

Die geringe Menge an diesen Fettsäuren und der hohe Gehalt an Palmitinsäure bei niedrigem Stickstoffspiegel deuten daraufhin, daß unter diesen Bedingungen vor allem die Dehydrierung der Palmitinsäure zu den ungesättigten C_{16} -Fettsäuren behindert wird. Das insgesamt übereinstimmende Verhalten der $\text{C}_{16}(2=)$ -, $\text{C}_{16}(3=)$ -, $\text{C}_{18}(2=)$ - und $\text{C}_{18}(3=)$ -Fettsäuren (hoher Gehalt an diesen Verbindungen bei hohem Stickstoffgehalt in der Nährlösung und umgekehrt) läßt vermuten, daß die $\text{C}_{16}(2=)$ und $\text{C}_{16}(3=)$ zu den $\text{C}_{18}(2=)$ - und $\text{C}_{18}(3=)$ -Fettsäuren verlängert werden. Bei niedrigem Stickstoffgehalt sinkt jedoch die absolute Menge der ungesättigten C_{16} -Fettsäuren stärker ab als die der ungesättigten C_{18} -Fettsäuren, sodaß der relative Anteil der $\text{C}_{18}(2=)$ und $\text{C}_{18}(3=)$ -Fettsäuren im Vergleich zu den $\text{C}_{16}(2=)$ und $\text{C}_{16}(3=)$ -Verbindungen ansteigt. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Aus unseren Versuchen läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, ob der Stickstoffgehalt der Nährlösung einen direkten Einfluß auf die Kettenverlängerung der $\text{C}_{16}(2=)$ - und $\text{C}_{16}(3=)$ - zu den $\text{C}_{18}(2=)$ - und $\text{C}_{18}(3=)$ -Fettsäuren hat.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß unter den obigen Bedingungen für Palmitin- und Ölsäure einerseits und für die höher ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren andererseits getrennte Biosynthesewege zu bestehen scheinen, wie es in Schema 1 gezeigt ist.



SCHEMA 1.

Der Übergang von der Ölsäure zur Linolsäure und der Biosyntheseweg B zu den höher ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren scheinen bei zu niedrigen Stickstoffwerten nicht mehr möglich zu sein, wie aus dem Anstieg der C_{16} - und $C_{18}(1=)$ -Fettsäuren und dem Absinken der $C_{16}(2=)$ -, $C_{16}(3=)$ -, $C_{16}(4=)$ -, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$ -Fettsäuren hervorgeht.

Die geschilderte Stickstoffabhängigkeit vor allem der ungesättigten C_{16} -Fettsäuren wirft die Frage auf, ob sie eine Erklärung für die unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung der Rot-, Braun- und Grünalgen liefert. Zwischen diesen Algenstämmen bestehen in dieser Hinsicht charakteristische Unterschiede.^{2,16-18,20}

Rotalgen besitzen vor allem ungesättigte C_{20} -Fettsäuren ($C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$) neben geringeren Mengen an ungesättigten C_{18} -Fettsäuren ($C_{18}(1=)$ bis $C_{18}(4=)$) und sehr niedrigen Konzentrationen an ungesättigten C_{16} -Fettsäuren ($C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$). Braunalgen enthalten in etwa gleichen Anteilen die obigen ungesättigten C_{18} - und C_{20} -Fettsäuren und ebenfalls sehr geringe Mengen an ungesättigten $C_{16}(1=)$ - und $C_{16}(2=)$ -Fettsäuren. Bei den Grünalgen findet man überwiegend ungesättigte C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren mit 1 bis 4 Doppelbindungen neben geringeren Mengen an ungesättigten C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren.

Rot- und Braunalgen unterscheiden sich also von den Grünalgen vor allem durch das Fehlen der $C_{16}(3=)$ - und $C_{16}(4=)$ -Fettsäuren.

Es ergibt sich die Frage, ob diese Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung ebenso wie bei den oben untersuchten gezüchteten Grünalgen auf den Stickstoffgehalt des Meerwassers zurückgeführt werden können.

Seewasser enthält anorganischen Stickstoff in Form von Ammonium, Nitrit und Nitrat.²⁴⁻²⁸ Unter Berücksichtigung der saisonbedingten Schwankungen^{24,27,28} und bei Umrechnung des gesamten Ammonium-, Nitrit- und Nitrat-Stickstoffs in NH_4Cl ergibt sich ein Gehalt von etwa 0,000005 bis 0,00005 Prozent NH_4Cl . Dieser Stickstoffgehalt erweist sich häufig als wachstumsbegrenzender Faktor:²⁴ Während er im Winter ein Maximum erreicht, sinkt der Stickstoffgehalt nach Ausbruch des Diatomeen-Wachstums im Frühling bis fast auf Null ab. Während der Sommermonate ist der Stickstoffgehalt, bedingt durch den Verbrauch durch Algen, stets sehr niedrig.

Süßwasser^{29,30} enthält etwa 0,0006 bis 0,003 Prozent NH_4Cl , ebenfalls unter Einrechnung allen Ammonium-, Nitrit- und Nitrat-Stickstoffs. Stewart³⁰ gibt als Ammonium-Gehalt von Bodenproben ('soil solution') sogar 13,5 mg NH_2-N/l , entsprechend etwa 0,0052 Prozent NH_4Cl an.

Wenn man voraussetzt, daß die Biosynthese der ungesättigten C_{16} -Fettsäuren bei den Meeresalgen annähernd ähnliche Bedingungen erfordert wie bei den gezüchteten Grünalgen, bedeuten diese Zahlen, daß für die meist im offenen und tieferen Meerwasser lebenden Rot- und Braunalgen der Stickstoffgehalt zu gering für die Biosynthese der höher ungesättigten C_{16} -Fettsäuren ist. Diese erforderte nach unseren Versuchen (s.o.) etwa 0,0005 bis 0,001 Prozent NH_4Cl . Dagegen können bei einem Gehalt von 0,00005 Prozent NH_4Cl (s. Tabelle 2) noch ungesättigte $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$ -Fettsäuren gebildet werden. Tat-

²⁴ L. H. N. COOPER, *J. Mar. Biol. Ass. UK* **18**, 677 (1933).

²⁵ A. C. REDFIELD und A. B. KEYS, *Biol. Bull.* **74**, 83 (1938).

²⁶ L. H. N. COOPER, *J. Mar. Biol. Ass. UK* **22**, 183 (1938).

²⁷ F. A. J. ARMSTRONG und E. I. BUTLER, *J. Mar. Biol. Ass. UK* **38**, 41 (1959).

²⁸ F. A. J. ARMSTRONG und E. I. BUTLER, *J. Mar. Biol. Ass. UK* **39**, 299 (1960).

²⁹ G. GIEBLER, Chem. Wasserstatistik der Wasserwerke in der BRD und West-Berlin, Verlag R. Oldenbourg, München (1959).

³⁰ W. D. P. STEWART, *Ann. Bot.* **31**, 385 (1967).

sächlich findet man bei Rot- und Braunalgen¹⁶⁻¹⁸ ziemlich genau die theoretisch möglichen Fettsäure-Gehalte, nämlich sehr geringe Mengen an $C_{16}(1=)$ - und $C_{16}(2=)$ -Fettsäuren und etwas größere Mengen an $C_{18}(2=)$ - und $C_{18}(3=)$ -Fettsäuren neben den dominierenden C_{16} - und $C_{18}(1=)$ -Fettsäuren sowie den für Rot- und Braunalgen charakteristischen $C_{20}(4=)$ - und $C_{20}(5=)$ -Fettsäuren. Die $C_{16}(3=)$ - und $C_{16}(4=)$ -Fettsäuren fehlen bei Rot- und Braunalgen.

Grünalgen leben im allgemeinen in Küstennähe und flacheren Gewässern, in denen höhere Stickstoffgehalte gefunden werden²⁵ und wo vor allem im Brackwasser bei Vermischung mit Süßwasser höhere Stickstoffwerte die Biosynthese der $C_{16}(3=)$ - und der $C_{16}(4=)$ -Fettsäuren ermöglichen. Das Gleiche gilt dann natürlich umso mehr für die in reinem Süßwasser lebenden Grünalgen.

Allgemein kann man aus unseren Untersuchungen daher folgern, daß im Verlauf der pflanzlichen Evolution der Stickstoff-Gehalt der Gewässer vermutlich eine sehr wichtige Rolle gespielt hat.

EXPERIMENTELLER TEIL

Algen

(1) *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova var. minor.²³ Diese Alge wurde uns von Herrn Dr. I. Friedmann, Universität Jerusalem, zur Verfügung gestellt.

(2) *Chlorella vulgaris Beijerinck*. Bezogen vom Pflanzenphysiologischen Institut, Göttingen.

(3) *Chlorella fusca* 211-8b. (*Chlorella pyrenoidosa*).

(4) *Chlorella fusca* Cz-115.

(5) *Chlorella fusca* var. *rubescens* (Halochlorella *rubescens*). Diese drei Algen wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. F. Czygan, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Alle Algen wurden bakterienfrei als 500 ml-Kulturen in 1 l-Erlenmeyer-Kolben unter ständigem Schütteln bei 25° unter Tageslicht (ca. 800 lx) bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet.

Nährmedien

Nährlösung für *Bracteacoccus minor* und *Chlorella vulgaris* (Modifizierte Nährlösung nach M. Cramer und J. Myers.³¹ K_2HPO_4 : 1,3 g/l.; KH_2PO_4 : 1 g/l.; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g/l.; Na-Zitrat $\cdot 11H_2O$: 0,8 g/l.; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,02 g/l.; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$: 3 mg/l.; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 1,8 mg/l.; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$: 1,3 mg/l.; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,4 mg/l.; H_2MoO_4 : 0,2 mg/l.; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,02 mg/l.; Thiamin-HCl: 0,01 mg/l.; Vit. B_{12} : 0,0005 mg/l.; NH_4Cl : 0,0005 bis 0,25 g/l. (s. Tabelle 1 und 2). Gegebenenfalls statt NH_4Cl KNO_3 : 0,003 bis 0,1 g/l.; (s. Tabelle 3).

Süßwasser-Nährlösung für *Chlorella fusca*—Subspecies.* KNO_3 : 0,81 g/l.; NaCl: 0,47 g/l.; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$: 0,47 g/l.; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 0,36 g/l.; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,25 g/l.; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,0134 g/l.; EDTA (Titriplex III): 0,008 g/l.; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,006 g/l.; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 0,0005 g/l.; H_3BO_3 : 0,0005 g/l.; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,0002 g/l.; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0,00002 g/l.;

Salzwasser-Nährlösung für *Chlorella fusca*—Subspecies.* NaCl: 27,65 g/l.; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 6,92 g/l.; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 5,51 g/l.; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,9 g/l.; KCl: 0,65 g/l.; $NaHCO_3$: 0,25 g/l.; KNO_3 : 0,1 g/l.; NaBr: 0,1 g/l.; K_2HPO_4 : 0,02 g/l.; $SrCl_2 \cdot 6H_2O$: 0,015 g/l.; EDTA (Titriplex III): 0,008 g/l.; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,006 g/l.; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 0,0005 g/l.; H_3BO_3 : 0,0005 g/l.; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,0002 g/l.; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0,00002 g/l.

Lipoid-Extraktion

Die Algen wurden kurz nach Beginn der stationären Wachstumsphase abzentrifugiert, gefriergetrocknet, gewogen, mit Seesand fein zerrieben und viermal 2 Stdn. mit je 25 ml Chloroform-Methanol (1:2) unter Stickstoff und unter Schütteln bei Zimmertemperatur extrahiert. Die abfiltrierte Lösung der Gesamtlipoide wurde in einem Erlenmeyer-Kolben bei 45° im Stickstoffstrom eingeeengt, in ein tarirtetes Reagenzglas überführt, im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt und die Lipoide im Vakuum-Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

* Die Zusammensetzung dieser Nährlösungen wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. F. C. Czygan, Institut für Pharmakognosie der Universität Würzburg mitgeteilt.

³¹ M. CRAMER und J. MYERS, *Arch. Mikrobiol.* 17, 384 (1952).

Darstellung der Fettsäuremethylester

Die Lipide wurden mit Chloroform-Methanol (1 + 2) zu einer Lipoid-Standardlösung (genau 5 mg Lipide auf 1 ml Lösungsmittel) gelöst. Von dieser Lösung wurden genau 0,4 ml (entsprechend 2 mg Gesamtlipide) in ein 50 ml Reagenzglas pipettiert, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 2,5 ml Methanol p.a. gelöst, 2,5 ml einer 2 *N*-Natriummethylat-Standardlösung (4,6 g metallisches Natrium in 100 ml Methanol) zugegeben und diese Mischung 20 min bei Zimmertemperatur unter häufigem Umschütteln stehen gelassen. Dann wurde mit 1 ml 37%-HCl angesäuert, mit 20 ml Wasser verdünnt, die Mischung in kaltem Wasser abgekühlt und in einen 250 ml-Schütteltrichter überführt. Nach mehrmaligem Nachspülen mit Wasser sowie mit 1 ml Methanol wurde die Mischung mit Wasser auf 70 ml aufgefüllt und dreimal mit je 30 ml Petroläther-Äther (1:1) extrahiert. Die vereinigten Oberphasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, im N₂-Strom vollständig eingeeengt, der Rückstand mit 3 × 5 ml Petroläther-Äther in ein Reagenzglas überführt, das Lösungsmittel abermals im N₂-Strom entfernt und der Rückstand mit 3 × 0,5 ml Chloroform quantitativ in ein 2 ml Reagenzglas überführt. Erst unmittelbar vor der Gaschromatographie wurden die Fettsäuremethylester im N₂-Strom vollständig eingeeengt und in genau 0,1 ml Chloroform gelöst. Aliquote Mengen (z.B. je 6 µl) dieser Lösungen einer Versuchsreihe wurden dann nacheinander am gleichen Tag bei gleichbleibender Einstellung des Apparats gaschromatographiert. Auf diese Weise ergaben die bei der GC erhaltenen Peak-Flächen ein relatives Maß für die in den obigen 2 mg Gesamtlipiden tatsächlich vorhandenen Fettsäuremengen. Bei zahlreichen Versuchen erwies sich die obige Methode der Transmethylierung kleiner Lipoidmengen als sehr gut reproduzierbar. Der in der Lösung der Fettsäuremethylester mitenthaltene unverseifbare Anteil störte bei der gaschromatographischen Analyse nicht.

*Gaschromatographie**Modell. Packard.*

Säulenmaterial. (a) 20 Prozent Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45–60 mesh), Säule: 3 m × 4 mm Säulentemperatur: 190°, Einlaßtemperatur: 215°, Detektortemperatur: 220°.

(b) 15 Prozent EGSS-X auf Gaschrom P (100–120 mesh) Säule: 2,5 m × 4 mm, Säulentemperatur: 185°, Einlaßtemperatur: 210°, Detektortemperatur: 215°.

(a) und (b): Gasdurchfluß: 60 ml Argon/Min

Papiervorschub: 1 inch/5 Min

Empfindlichkeit: Schreiber: 10⁻⁷

Detektor: 1 × 10⁻⁸ und höher bei 750 V

Einspritzmenge: ca. 0,01 mg

Die Reoplex-Säule (a) dient zur Trennung des kritischen Fettsäurepaares C₁₆(3=) und C₁₈(1=). Die EGSS-X-Säule (b) trennt das kritische Fettsäurepaar C₁₆(4=) und C₁₈.

Anerkennung—Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.