

Kohlenhydrate, freie Aminosäuren und Protein- zusammensetzung einiger mariner Diatomeen und der limnischen Diatomee *Melosira varians*

HORST KLEINKAUF

Botanisches Institut der Technischen Hochschule Braunschweig

ABSTRACT: Carbohydrates, free amino acids and protein composition of some marine diatoms and the limnetic diatom *Melosira varians*. Six different sugars could be identified in a mixture of marine diatom species (primarily *Coscinodiscus concinnus*, *C. grani* and *Biddulphia sinensis*), namely, 3 hexoses: galactose, glucose and mannose, and 3 pentoses: arabinose, xylose and ribose. In the limnetic diatom *Melosira varians*, however, only glucose and xylose were found. With respect to the amino acids no qualitative differences could be detected between the marine and limnetic diatoms, neither in the free amino acids, nor in the protein-hydrolysate. On the other hand, there are significant quantitative differences, such as the remarkably high amount of the aromatic amino acids, phenylalanine and tyrosine, in the marine diatoms. In the hydrolysate, glutamic acid and aspartic acid dominate, in the free amino acids, alanine and glutamic acid.

EINLEITUNG

Die Diatomeen zählen zu einer Algengruppe, über deren Inhaltsstoffe wenig bekannt ist. 1951 berichtete VON STOSCH über das Auftreten von Leucosin in Diatomeen und erkannte eine Parellelität im chemischen und physikalischen Verhalten zum Laminarin der Phaeophyceen. 1955 isolierte QUILLET Leucosin aus *Hydrurus foetidus*. Er analysierte es als reines Glucoseprodukt, das aus mindestens 8 Glucosemolekülen aufgebaut ist, die wahrscheinlich in 1:3-Bindung, wie beim Laminarin, das aus 16 Glucoseresten besteht, verknüpft sind. QUILLET (1955) schlug für Leucosin den Namen „Chrysolaminarin“ vor, um das Vorkommen und die chemische Verwandtschaft zum Ausdruck zu bringen. Über physikochemische Ähnlichkeiten der beiden Polysaccharide berichtete VON STOSCH (1958) ausführlich auf dem Seaweed-Symposium Galway. BEATTIE, HIRST und PERCIVAL (1961) klärten die Struktur des Leucosins vollständig auf. Sie fanden 12 Glucoseeinheiten, die β -1:3' und 1:6' verbundene Glucoseeinheiten im Verhältnis 11:1 enthalten.

Untersuchungen von BARASHKOV (1956) an Plankton der Fernostmeere zeigten, daß bei vollständiger Extraktion 7 verschiedene Zuckerkomponenten zu finden sind. Über die Proteinzusammensetzung der Diatomeen existieren einige qualitative Arbeiten. So fand LOW (1955) zum Beispiel in 5 Diatomeen-Arten jeweils 18 bis 19 Aminosäuren im Eiweißhydrolysat. Daß er keine freien Aminosäuren fand, ist möglicherweise auf eine unzureichende Analysenmethode zurückzuführen.

MATERIAL UND METHODEN

Material

Die Untersuchungen an marinen Diatomeen erfolgten an Nordsee-Plankton aus der näheren Umgebung Helgolands. Die Planktonproben bestanden hauptsächlich aus *Coscinodiscus concinnus* (57–61 ‰), *C. grani* (8–12 ‰) und *Biddulphia sinensis* (24 bis 28 ‰) und waren in den Monaten Juli und August 1962 entnommen worden. *Melosira varians* wurde im Herbst 1961 aus Klärbecken in der Hydrologischen Forschungsabteilung der Stadtwerke Dortmund erhalten. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Gefriertrocknung der gleichen Aufarbeitung mit Kalt- und Heißwasser-Extraktion unterworfen wie die Meeresdiatomeen. Außerdem wurden die alkohollöslichen Kohlenhydrate untersucht und papierchromatographiert. Das Material wurde dazu direkt mit einem Methanol-Azeton-Gemisch (3:1) extrahiert. Eine weitere Kohlenhydratextraktion wurde unter Vermeidung von Salzaufnahme mit Pyridin durchgeführt.

Gewinnung des Materials

Das Untersuchungsmaterial wird, nachdem es zunächst durch grobmaschige Siebe von größeren Verunreinigungen gesäubert ist, durch Absetzenlassen aus größeren Gefäßen gewonnen. Dabei ist darauf zu achten, daß die Schichtdicke nicht zu stark wird, da sonst ein sofortiges Absterben der Diatomeen in den unteren Schichten einsetzt. Positiv phototaktisch reagierendes Zooplankton wird wiederholt durch Beleuchtung von oben angereichert und dann abgehoben. Danach werden die Diatomeen durch ein Nylonsieb entsprechender Maschengröße mit viel Wasser abfiltriert, auf einem feinen Sieb aufgefangen und durch Auswaschen auf der Wasseroberfläche von eventuell mitgerissenen Sandteilchen befreit. Das gewonnene Gut muß möglichst schnell und schonend auf einer Saugnutsche mit glattem, schnell laufendem Filterpapier abgesaugt werden. Schließlich werden die so gereinigten Diatomeen gefriergetrocknet und über Phosphorpentoxyd im Exsiccator vor Licht geschützt aufbewahrt.

Chemische Aufarbeitung der gefriergetrockneten Diatomeen

Zur chemischen Aufarbeitung werden 5 g gefriergetrocknete Diatomeen im Kobold-Homogenisator (Braun-Melsungen) mit der 5fachen Menge Glasperlen homogenisiert, dreimal mit je 50 ml kaltem Wasser auf einem Magnetrührer extrahiert und der Rückstand dreimal mit je 50 ml kochendem Wasser jeweils 5 Minuten ausgezogen. Die vereinigten Kalt- und Heißwasser-Extraktionen werden getrennt weiterverarbeitet. Die Lösungen werden dann nach SOMOGYI (1952) enteiweißt. Dazu versetzt man die wäßrigen Extrakte mit 2 Vol. 0,3n Ba(OH)₂ und 2 Vol. 5%iger wäßriger ZnSO₄ × 7 H₂O-Lösung, filtriert das Überstehende ab und dampft es im Vakuum auf etwa 20 ml ein. Nachdem die eingedampfte Flüssigkeit abermals filtriert und mit der 10fachen Menge Alkohol versetzt ist, fällt ein leicht körniger Niederschlag aus, der ab-

filtriert wird. In schwach saurem Wasser gelöst, ergibt er die Fraktion I. Vom Überstehenden wird der Alkohol im Vakuum abdestilliert und der Rest als Fraktion II bezeichnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kohlenhydratuntersuchung an Meeresdiatomeen

Die bei Fraktion I mitausgefallenen Salze erwiesen sich im Chromatogramm nicht als störend. Eine De-Ionisierung des Abdampfrückstandes nach MALPRESS (1949) brachte keine besseren Ergebnisse. Alle 4 Proben zeigten im Chromatogramm langgestreckte Flecke mit geringen RF-Werten, die sich mit Zuckerreagenzien anfärben ließen. Außerdem war ein geringer Anteil Glucose nachzuweisen. Dieser Umstand legte die Vermutung nahe, daß es sich um Oligo-Saccharide handelt. Heiße und kalte Extraktionen zeigten quantitative Unterschiede, wobei die Zuckeranteile der Heißwasser-Extraktion mengenmäßig viel höher lagen. Die Alkoholfällung erfaßt aber die Kohlenhydrate nicht quantitativ, der größte Teil der Zucker wird jedoch ausgefällt.

Zur Spaltung der Kohlenhydrate wurden die Lösungen 4 % schwefelsauer gemacht und eine halbe Stunde auf offenem Wasserbad erhitzt. Nach beendeter Hydrolyse neutralisiert man mit festem Bariumcarbonat auf Kongorot und filtriert das Bariumsulfat ab. Die Lösungen wurden dann erneut chromatographiert. Als Fließmittel bewährte sich Essigsäureäthylester-Pyridin-Wasser (3,6:1:1,15) (COLOMBO et al. 1960), das gute Trenneffekte bei Zimmertemperatur in einer Laufzeit von 24 bis 48 Stunden aufwies. Kontrollversuche wurden daneben mit Isopropanol-Methyläthylketon-Dimethylformamid-Wasser (50:25:5:20), n-Butanol-Eisessig-Wasser-Methanol (4:1:2:1,4) geführt. Als Chromatographiepapier wurde Schleicher und Schüll 2043b verwendet.

Auf den Chromatogrammen der hydrolysierten Lösung konnten 6 Zucker nachgewiesen werden, und zwar Galactose, Glucose, Mannose, Arabinose, Xylose und Ribose. Es zeigte sich, daß in der alkoholischen Fällung vor allem Glucose, im Überstehenden neben Glucose die Pentosen stärker auftraten.

Kohlenhydratuntersuchung an Süßwasserdiatomeen

Die Pyridin- und Methanol-Azeton-Aufarbeitungen lieferten die gleichen Resultate. Es wurde auf dem Chromatogramm jeweils ein scharf abgegrenzter Glucosefleck und darunter mit einem geringeren RF-Wert ein weiterer, langgezogener Zuckerfleck sichtbar; letzterer stellt vermutlich kurze Glucoseketten dar. Bei den alkoholischen Fällungen des Heißwasser-Extraktes wurde ein sehr langgezogener Glucosefleck gefunden und darüber mit höherem RF-Wert ein schwacher, langgezogener Pentosefleck. In der Kaltwasserextraktion konnten beide Flecke nur ganz schwach nachgewiesen werden. Bei der Hydrolyse dieser alkoholischen Fällung trat dann ganz klar ein starker Glucosefleck und ein schwacher Xylosefleck auf. Weiter wurden mit dem Anilin-Phthalatreagenz zwei gelbliche Flecke sichtbar gemacht, von denen der untere, kräfti-

ger gefärbte unterhalb des halben RF-Wertes der Glucose liegt und der andere einen größeren RF-Wert als Glucose aufweist. Offenbar handelt es sich bei beiden nicht um Kohlenhydrate.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der limnischen Diatomee *Melosira varians* im Heißwasser-Extrakt ein Oligo-Saccharid mit Alkohol gefällt werden konnte, das nach der schwefelsauren Hydrolyse in Glucose aufspaltete und daß außerdem Xylose vorhanden war.

Bei den von mir in der alkoholischen Heißwasserfällung der limnischen Diatomeen gefundenen KH, die nach Hydrolyse in Glucosemoleküle aufspalten, handelt es sich vermutlich um das von v. STOSCH (1951) beschriebene Kristall-Leucosin, das er aus einer wäßrigen alkoholischen Extraktion von Süßwasserdiatomeen erhalten hatte. v. STOSCH sah im chemischen und physikalischen Verhalten dieses Stoffes eine weitgehende Parallelität mit dem Laminarin der Phaeophyceen. Diese Kohlenhydrate kommen in der Vacuole gelöst vor. Aus dem Brechungsindex der Vacuolenflüssigkeit schließt v. STOSCH auf einen Leucosin Gehalt bis maximal 20% vom Frischgewicht. Das frei im Meer flottierende Material scheint jedoch wesentlich leucosinärmer und seine Bildung von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein. So soll z. B. durch hohe Lichtintensität die Fettbildung bei Diatomeen gehemmt sein, und statt dessen sollen Assimilate von der Zusammensetzung der Kohlenhydrate gebildet werden (FOGG 1956). Nach v. STOSCH erscheint es möglich, daß durch Mineralstoffmangel eine Erhöhung des Kohlenhydratspiegels einsetzt. QUILLET (1955) untersuchte Leucosin aus *Hydrurus foetidus*. Bei der Hydrolyse erhielt er nur Glucose und vermutete, daß das Leucosin eine ähnliche Konfiguration wie das Laminarin besäße und aus 8 β -Glucose-Molekülen in 1,3-Bindung aufgebaut sei. QUILLET schlägt vor, das Leucosin in Chrysolaminarin umzubenennen, um das Vorkommen und die chemische Verwandtschaft auszudrücken. BEATTIE, HIRST und PERCIVAL (1961) konnten Kristall-Chrysolaminarin, das aus verschiedenen Diatomeen gewonnen war, vollständig aufklären. Sie fanden einen Schmelzpunkt von 273°, eine Drehung $[\alpha]_D^{18-60}$ in Wasser und einen Glucosegehalt von 99,5%. Es wurde festgestellt, daß β -1:3'- und 1:6'-gebundene Glucoseeinheiten im Verhältnis 11:1 mit je 1 C₆-Abzweigungspunkt pro Molekül vorhanden sind. Aus dem Verhältnis der anwesenden Tetra-oxy-methyl-glucose im methylierten Hydrolysat schloß man auf 12 Glucoseeinheiten im Chrysolaminarin.

Die Kohlenhydrate der Meeresdiatomeen sind bisher weniger genau untersucht. VON STOSCH vermutet hier zwei verschieden lösliche Leucosine, ein in Wasser „lösliches“ Amorph-Leucosin, und ein „unlösliches“ Kristall-Leucosin, die nebeneinander oder auch einzeln anzutreffen sind. BARASHKOV (1956) untersuchte Plankton der Fernostmeere, das hauptsächlich aus *Thalassiosira gravida* und *Biddulphia aurita* bestand. Er fand nach Hydrolyse der Kohlenhydrate Galactose, Glucose, Mannose, Arabinose, Xylose, Ribose und Rhamnose. Mit Ausnahme der Rhamnose handelt es sich hier um die gleiche Kohlenhydratzusammensetzung, wie ich sie im Nordseep plankton bei *Coscinodiscus concinnus*, *C. grani* und *Biddulphia sinensis* gefunden habe.

Bei einer Gegenüberstellung von Süßwasser- und Meeresdiatomeen sind die ungleichen Kohlenhydratzusammensetzungen, die nach der Hydrolyse auftraten, auffallend. Während bei der limnischen Diatomee *Melosira varians* vor allem Glucose und wenig Xylose gefunden wurde, treten bei den Meeresdiatomeen eine ganze Reihe

von Hexosen und Pentosen auf. Es besteht die Möglichkeit, daß an dieser Zusammensetzung verschiedene Wandsubstanzen beteiligt sind und daß die Ribose vielleicht aus der RNS stammt.

Freie Aminosäuren und Proteinzusammensetzung

Im weiteren werden die freien Aminosäuren und die Aminosäurezusammensetzung der Proteine und Peptide der marinen Diatomeen untersucht und mit den bei *Melosira varians* angetroffenen Verhältnissen verglichen. Während die quantitative Zusammensetzung der Proteinhydrolysate der verschiedenen Diatomeenarten ähnlich ist, variiert die quantitative Zusammensetzung der Aminosäuren von marinen und limnischen Diatomeen auffallend.

Interessant sind auch Vergleiche der Aminosäuremengen des jeweiligen Proteins.

Tabelle 1

Qualitative Analyse der Aminosäuren

Die Aminosäureanalysen wurden im *Beckmann Amino-Acid-Analyser* durchgeführt. Bei 50° C findet keine Trennung der Säureamide statt, so daß neben Serin auch Glutamin und Asparagin vorhanden sein können. Zur Gewinnung der freien Aminosäuren wurden 10 g Diatomeen-Trockenmasse mit 25 ml Wasser 15 Min. bei 100° C extrahiert. Der Rückstand wurde zur Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung der Peptide und Proteine mit 25 ml 6n HCl bei 110° C 24 Std. hydrolysiert. Die Analysenwerte sind in γ pro ml angegeben

Bezeichnung der untersuchten Proben	Freie Aminosäuren		Proteinhydrolysat				Verhältnis der Analysen- werte S 2 : M 2 (%)
	<i>Meeres- diatomeen 1</i>	<i>Süßwasser- diatomeen 1</i>	<i>Meeresdiatomeen 2</i> Analysen- wert	Gesamt- Eiweiß (%)	<i>Süßwasserdiatomeen 2</i> Analysen- wert	Gesamt- Eiweiß (%)	
	Temperatur des Austauschers	30° C	50° C	50° C	50° C	50° C	
Lysin	8,0	0,8	80	5,5	53	5,6	66,5
Histidin	Spuren	Spuren	31	2,0	16	1,7	51,5
Arginin	1,7	1,6	99	6,2	57	6,0	57,5
Asparaginsäure	1,9	2,8	175	11,0	115	12,1	66
Threonin	0,9	0,8	77	4,9	55	5,7	71,5
Serin	0,8	0,6	82	5,2	55	5,7	67
Glutaminsäure	7,5	7,6	201	12,5	135	14,2	67
Prolin	2,9	0,6	79	5,0	46	4,8	58
Glycin	1,7	0,5	97	6,1	60	6,3	62
Alanin	7,8	6,7	113	7,1	74	7,8	65,5
Valin	0,8	Spuren	76	4,8	53	5,6	69,5
Methionin	Spuren	Spuren	32	2,0	18	1,9	56
Isoleucin	Spuren	0,1	75	4,7	49	5,1	65
Leucin	1,3	0,2	157	9,9	86	9,0	54,5
Tyrosin	Spuren	Spuren	59	3,7	30	3,1	51
Phenylalanin	Spuren	Spuren	130	8,2	52	5,4	40
Gesamt-Aminosäuren			1583		95,4		60

Erhebliche Unterschiede bestehen zwischen den beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Phenylalanin dominiert sowohl bei den marinen als auch bei den limnischen Diatomeen über Tyrosin. Auffallend ist der große Unterschied in den Proteinhydrolysaten zwischen marinen und limnischen Diatomeen beim Phenylalanin. Aus dem Verhältnis Süßwasserdiatomeen zu Meeresdiatomeen, bezogen auf das Gesamteiweiß, ergibt sich hier eine Differenz von 34%. LEWIS (1962) findet bei einer Reihe untersuchter Rot- und Grünalgen, daß auch hier stets Phenylalanin im Überschuß auftritt. Beim Histidin und Prolin wechseln in den untersuchten Algen die Verhältnisse. So ist z. B. bei *Ulva lactuca* var. *latissima* mehr Prolin, bei *Hypnea musciformis* mehr Histidin vorhanden. Von 12 untersuchten Algen enthalten nur 3 einen Überschuß an Prolin; in allen anderen Fällen ist es umgekehrt.

Der Gehalt an Gesamteiweiß (bezogen auf das Trockengewicht) macht bei Meeresdiatomeen das 2 $\frac{1}{2}$ -fache des Wertes der Süßwasserdiatomeen aus. Ein solch markanter Unterschied legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um ein konstitutives Merkmal handelt. Diese Frage muß indessen unbeantwortet bleiben, solange nicht sichergestellt ist, daß der Unterschied lediglich physiologisch bedingt ist, d. h. von der Nährstoffversorgung abhängt.

Die stärksten Anteile im Hydrolysat sind bei den Meeres- und Süßwasserdiatomeen Glutaminsäure, Asparaginsäure und Leucosin. Bei den Meeresdiatomeen folgen dann Phenylalanin, Alanin und Arginin, bei den Süßwasserdiatomeen Alanin, Glycin und Arginin. In der schwächsten Konzentration sind in beiden Fällen Histidin, Methionin und Tyrosin vorhanden.

Bei den freien Aminosäuren liegen hauptsächlich Alanin und Glutaminsäure vor. Der hohe Lysinwert im pool der freien Aminosäuren mariner Diatomeen konnte aus Materialmangel nicht nachgeprüft werden und ist daher als fraglich anzusehen. Die zwei Aminosäuren Serin und Threonin mit Hydroxymonoaminomonocarboxyl-Gruppen sind in beiden Fällen in der gleichen Konzentration vorhanden. Bei den Aminosäuren mit Monoaminodicarboxyl-Gruppe, Asparaginsäure und Glutaminsäure, ist Glutaminsäure in wesentlich stärkerem Maße vorhanden. Die weiteren freien Aminosäuren wurden in so geringer Konzentration nachgewiesen, daß ein merklicher Unterschied aus den Analysenwerten nicht ohne weiteres abgeleitet werden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zwischen den untersuchten marinen und limnischen Diatomeen keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung des freien Aminosäurepools und des Proteinhydrolysates bestehen. Auffällige quantitative Unterschiede zeigen sich vor allem hinsichtlich der höheren Anteile der aromatischen Aminosäuren bei den marinen Diatomeen, vor allem des Phenylalanins.

Die Untersuchungen wurden an dem vom Land Niedersachsen gemieteten Arbeitsplatz in der Meeresstation der Biologischen Anstalt Helgoland durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Den Mitarbeitern der Anstalt bin ich für die mir gewährte mannigfache Hilfe, insbesondere bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials, zu Dank verpflichtet. Die limnischen Diatomeen vermittelte mir in dankenswerter Weise Herr Dr. FRANK, Leiter der Hydrologischen Forschungsabteilung der Dortmunder Stadtwerke. Herrn Dr. BREYHAN, Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, der die Aminosäuren-Analysen im Beckmann-Amino-Acid-Analyser durchgeführt hat, möchte ich auch an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In einem Gemisch mariner Diatomeenarten (vor allem *Coscinodiscus concinnus*, *C. grani* und *Biddulphia sinensis*) konnten 6 Zucker identifiziert werden, und zwar 3 Hexosen: Galactose, Glucose und Mannose, und 3 Pentosen: Arabinose, Xylose und Ribose. Bei den limnischen *Melosira varians* hingegen fanden sich nur Glucose und Xylose.
2. Hinsichtlich der Aminosäuren konnten zwischen den untersuchten Meer- und Süßwasserarten weder bei den freien Aminosäuren noch im Protein-Hydrolysat qualitative Unterschiede nachgewiesen werden.
3. Es bestehen aber signifikante quantitative Unterschiede. Auffällig ist vor allem der hohe Anteil der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in den marinen Diatomeen.
4. Den stärksten Anteil im Hydrolysat bilden in jedem Falle die Glutaminsäure und die Asparaginsäure, während bei den freien Aminosäuren neben der Glutaminsäure das Alanin im Vordergrund steht.

ZITIERTE LITERATUR

- BARASHKOV, G. K., 1956. Über die Kohlenhydrate einiger Diatomeen-Gattungen (russisch). Dokl. Akad. Nauk. SSSR **111**, 148–151.
- BEATTIE, A., HIRST, E. L. & PERCIVAL, E., 1961. Studies on the Metabolism of the Chrysophyceae. Biochem. J. **79**, 531–537.
- COLOMBO, P., CORBETTA, D., PIROTTA, A., RUFFINI, G. & SARTORI, A., 1960. A solvent for qualitative and quantitative determination of sugar using paper chromatography. J. Chromatogr. **3**, 343–350.
- FOGG, G. E., 1956. Photosynthesis and formation of fats in a diatom. Ann. Bot. **20**, 265–285.
- MALPRESS, F. R. & MORRISON, A. B., 1949. Use of Pyridine in the De-ionization of Solutions for Paper Chromatography. Nature, Lond. **167**, 963.
- LEWIS, E. J. & GONZALES, E. A., 1962. The Protein, Peptide, and Free Amino-Acid Contents of some Species of Marine Algae from Bombay. Ann. Bot. **26**, 301–316.
- LOW, E. M., 1955. Studies on some chemical constituents of diatoms. J. Mar. Res. **14**, 199–204.
- QUILLET, M., 1950. Sur la nature chimique de la leucosine, polysaccharide de réserol, caractéristique des chrysophycées, extraite d'*Hydrurus foetidus*. C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. **240**, 1001–1003.
- STOSCH, H. A. v., 1951. Über das Leucosin, den Reservestoff der Chrysophyten. Naturwissenschaften **38**, 192.
- 1952 (unveröffentl.). Sea-Weed Symposium Galway.
- SOMOGYI, M., 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. **195**, 19–23.