

Über die grünen und gelben Farbstoffe der Florideen.

Von

Harald Kylin.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Juli 1911.)

I. Chlorophyll und dessen Verhältnis zu Phykoerythrin.

Nach Kützing (1843, S. 23) gibt es bei den Florideen zwei verschiedene Farbstoffe, einen in Alkohol löslichen, in Wasser aber unlöslichen, grünen, und einen in Alkohol unlöslichen, in Wasser aber löslichen, roten. Jener wird mit dem Chlorophyll der höheren Pflanzen identifiziert, dieser ist nach Kützing ein den Florideen charakteristischer Farbstoff, den er Phykoerythrin nennt.

Nägeli (1847, S. 187) anerkennt nur das Vorkommen eines Farbstoffes bei den Florideen, welcher mit dem Chlorophyll der höheren Pflanzen nahe verwandt sei, und beim Absterben derselben in dieses übergehen solle. In einer späteren Arbeit (1849, S. 8) nennt er diesen Farbstoff Erythrophyll, findet es aber nicht mehr wahrscheinlich, daß es beim Absterben in Chlorophyll übergehe, sondern behauptet jetzt, daß die grüne Farbe, welche die Florideen oft nach dem Tode annehmen, einer von Alkalien verursachten Veränderung in dem Erythrophyll zuzuschreiben wäre. Chlorophyll käme demnach bei den Florideen nicht vor.

Stokes (1854, S. 264) gibt an, daß man bei spektroskopischer Untersuchung lebender Florideen sowohl das Absorptionsspektrum des Chlorophylls, als das des Phykoerythrins erhält, und er meinte deshalb den Schluß ziehen zu können, daß beide Farbstoffe in den lebenden Florideen in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt vorkommen.

Nach Cohn käme dagegen bei den lebenden Florideen nur ein Farbstoff vor, welchen er Rhodophyll nennt. Hinsichtlich dieses Farbstoffes schreibt er (Cohn, 1867, S. 56): Auch das in den lebenden Florideenzellen unzersetzte Rhodophyll wird nach dem Tode derselben durch endosmotische Wasseraufnahme sofort in seine beiden Bestandteile gespalten, wovon das grüne Chlorophyll in den Zellen zurückbleibt, während das rote Phykoerythrin in wässriger Lösung durch Dialyse austritt.

Hiermit sind die beiden Meinungen ausgesprochen, die in der späteren Literatur miteinander konkurriert haben, nämlich: 1. daß in den lebenden Florideenzellen Chlorophyll und Phykoerythrin zwei nebeneinander vorkommende Farbstoffe seien; 2. daß diese beiden Farbstoffe miteinander chemisch verbunden seien.

Unter den Forschern, die meinen, daß Chlorophyll und Phykoerythrin auch in den lebenden Florideen nebeneinander vorkommen, mögen erwähnt werden: Askenasy (1867, S. 234), Rosanoff (1867, S. 204), Nebelung (1878, S. 401), Hansen (1893, S. 291).

Engelmann (1882, S. 669) findet, daß einige von ihm gemachte Beobachtungen sich nicht aus der herrschenden Meinung erklären lassen, daß man es hier mit einem Gemisch von assimilierendem Chlorophyll und einem nur maskierenden Farbstoff zu tun habe. Zwei Möglichkeiten wären denkbar: Entweder handelt es sich um ein Gemisch von zwei Farbstoffen, von denen einer Chlorophyll ist; dann muß aber auch der andere Farbstoff unter dem Einfluß des Lichtes assimilierend wirken Die andere Möglichkeit ist die, daß hier nicht Gemenge von Chlorophyll mit anderen gleichfalls assimilierenden Farbstoffen vorliegen, sondern chemische Verbindungen». Er findet, daß die letztere Möglichkeit die wahrscheinlichere ist. In einer späteren Arbeit (1883, S. 19) erwähnt er aber einige Tatsachen, die ihm jetzt entschieden dafür zu sprechen scheinen, daß man es mit einem Gemisch zu tun hat. Wie früher behauptet er aber, daß nicht nur Chlorophyll, sondern auch Phykoerythrin assimilierend wirkt.

Reinke (1886, S. 182) ist der Meinung, daß es in lebenden Florideen eine lockere chemische Bindung zwischen dem Phykoerythrin und einer anderen Atomengruppe, möglicherweise mit dem Moleküle einer Proteinsubstanz gibt: er schreibt weiter: «In ähnlicher Weise dürften bei Florideen auch die grünen, in Alkohol löslichen Moleküle im lebenden Zustande mit Proteinmolekülen verbunden sein: vielleicht haftet je ein rotes und ein grünes Molekül an einem Proteinmoleküle, um beim Absterben des Chromatophors abgespalten zu werden». — Schütt (1888, S. 37) schließt sich dieser Ansicht Reinkes am nächsten an. — In der letzten Auflage (1910) von Strasburger «Lehrbuch der Botanik» lesen wir S. 318: die Chromatophoren «enthalten außer grünem Farbstoff auch einen roten, das Phykoerythrin, und zwar, wie es scheint, beide in chemischer Verbindung».

Aber nicht nur die Frage, ob in den lebenden Chromatophoren der Florideen Chlorophyll und Phykoerythrin miteinander chemisch verbunden sind oder nicht, ist ein Gegenstand großer Meinungsverschiedenheiten gewesen, sondern auch eine andre, und zwar die, ob der grüne Farbstoff, welcher mit Alkohol aus diesen Algen extrahiert werden kann, von Kützing mit Recht mit dem Chlorophyll der höheren Pflanzen identifiziert wurde.

Besonders ist es Pringsheim (1875, S. 753), der auf Grund spektroskopischer Untersuchungen scharf hervorhebt, daß das «Florideen-Grün» mit dem Chlorophyll der höheren Pflanzen nicht identisch sei. Die beiden Farbstoffe der Florideen, das «Florideen-Grün» und das «Florideen-Rot», wären nach Pringsheim als besondere Chlorophyllmodifikationen zu betrachten. Nebelung (1878, S. 418) bemerkt dagegen, daß der grüne Farbstoff einiger von ihm untersuchter Florideen «keine bemerkenswerteren Abweichungen im Spektrum» zeige. Reinke (1886, S. 228) deutet «das alkoholische Florideen-Grün» als «gewöhnliches Alkohol-Chlorophyll». Ebenso ist Hansen (1893, S. 292) der Ansicht, daß die Florideen ganz wie die höheren Pflanzen Chlorophyll enthalten.

Es sind demnach zwei Fragen, zu deren Beantwortung ein kleiner Beitrag zu geben wäre, nämlich:

1. Ist der grüne Farbstoff, der aus den Florideen mit Alkohol extrahiert werden kann, mit dem Chlorophyll der höheren Pflanzen identisch oder nicht?

2. Ist dieser grüne Farbstoff mit dem Phykoerythrin chemisch verbunden oder nicht?

Die behauptete Identität zwischen dem grünen Farbstoff der Florideen und dem der höheren Pflanzen ist bisher auf Übereinstimmungen in der Farbe, in der Fluorescenz und im Absorptionsspektrum gegründet. Erst während der letzten Jahre ist durch die Untersuchungen von Willstätter die Chlorophyllforschung so weit gediehen, daß man vielleicht die Aufmerksamkeit auf einige chemische Ähnlichkeiten zwischen dem grünen Farbstoff der obengenannten Pflanzenabteilungen zu lenken versuchen könnte.

Durch die Untersuchungen von Willstätter (Willstätter und Isler, 1911, S. 155) ist festgestellt worden, daß das Chlorophyll jeglicher Herkunft übereinstimmt:

1. im Gehalt an komplex gebundenem Magnesium;
2. im Gehalt an Phytol;
3. darin, daß der stickstoffhaltige Kern, das Phytochromin, besondere Spaltungsprodukte, die Phytochlorine und die Phytorhodine, liefert.

Um zu erweisen, daß der grüne, alkohollösliche Florideenfarbstoff dem Chlorophyll im Sinne von Willstätter angehört, wäre es demnach meine Aufgabe, nachzuweisen, daß das grüne Florideenpigment die drei obengenannten Bedingungen erfüllt.

Um nachzuweisen, daß das grüne Florideenpigment Magnesium enthält, ist folgende Versuchsserie gemacht worden.

150 g luftgetrocknetes, pulverisiertes Material von *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag.¹⁾, welches vorher während dreier Tage mit Petroläther erschöpft worden war, wurde nach dem Absaugen der Petrolätherlösung während zweier Tage mit 300 ccm 96%igem Alkohol extrahiert. Das Material wurde abgesaugt und mit 100 ccm Alkohol von derselben Stärke nachgewaschen. Auf diese Weise wurden 350 ccm Extrakt erhalten.

¹⁾ Das Material verdanke ich dem Assistenten an der zoologischen Station Kristineberg, Herrn Dr. Hj. Östergren.

Um das Chlorophyll zu verseifen, wurde die Lösung mit 2 g in 20 ccm 50^o/oigem Alkohol gelöstem NaOH versetzt, wobei ein flockiger, grüner Niederschlag entstand. Nach einem Tage wurden 250 ccm Wasser zugesetzt; da aber der Niederschlag nicht völlig gelöst wurde, wurde filtriert. Die filtrierte Lösung wurde zuerst mit Äther, dann mit so viel Wasser versetzt, daß eine Ätherschicht sich abschied. Die Ätherschicht war stark gelblich, die alkoholisch-wässrige Schicht grünlich. Um indifferente Nebenprodukte zu beseitigen, wurde diese Schicht noch zweimal mit Äther ausgeschüttelt.

Die alkoholisch-wässrige Lösung, die ein von dem Chlorophyll abstammendes Salz, von Willstätter als Chlorophyllnatrium bezeichnet, enthält, wurde dann wieder mit Äther überschichtet und mit stark verdünnter Phosphorsäure in kleinen Portionen versetzt, bis die ätherische Schicht schwach grün gefärbt wurde. Um die Säure des Chlorophyllinsalzes, das Chlorophyllin, in Freiheit zu setzen, wurde darauf primäres Alkaliphosphat hinzugefügt, bis sich das Chlorophyllin in die ätherische Schicht hinüberschütteln ließ. Nach diesem Hinüberschütteln war die alkoholisch-wässrige Lösung gelbbraun gefärbt. Die ätherische Lösung war intensiv blaugrün; bei größerer Schichtendicke war die Farbe rot; die Lösung fluorescierte prächtig rot.

Die ätherische Lösung wurde dann mit kalt gesättigter Dinatriumphosphatlösung ausgeschüttelt, wobei das Chlorophyllin wieder als Alkalisalz gebunden wurde. Die Phosphatlösung wurde mit etwas Äther geschüttelt, dann von neuem mit Äther überschichtet, worauf das Chlorophyllin mit primärem Phosphat in Freiheit gesetzt und in den Äther hinüberschüttelt wurde. Die ätherische Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und dann eingedampft. Der Rückstand hinterließ nach der Einäscherung eine kleine Menge Asche, in welcher Magnesium sich gut nachweisen ließ.

Die von mir angewandte Methode zur Reinigung des Chlorophyllins ist demnach die von Willstätter (1906, S. 74) beschriebene Phosphatmethode.

Der Versuch, nach den Angaben von Willstätter und

Hocheder (1907, S. 218) aus dem Chlorophyll von *Ceramium rubrum* Phaeophytin herzustellen, gab kein Resultat, weil die dafür nötige Menge von Material mir nicht zur Verfügung stand. Den Phytolgehalt des Florideenchlorophylls habe ich demnach nicht nachweisen können.

Wegen des stark begrenzten Vorrats von Material habe ich gar nicht daran denken können, Phytochlorine und Phytorhodine aus dem Florideenchlorophyll herzustellen.

Mein einziges Ergebnis ist demnach, daß ich habe nachweisen können, daß das Chlorophyll der Florideen wie das der höheren Pflanzen magnesiumhaltig ist.

Wird aber die schon von mehreren Autoren erwiesene Übereinstimmung in der Farbe, in der Fluorescenz und im Absorptionsspektrum hinzugefügt, ferner, daß das Chlorophyll der Florideen, wie das der höheren Pflanzen bei der Reinigung nach dem Entmischungsverfahren von Kraus in den Petroläther übergeht und daß das bei der Verseifung des Florideenchlorophylls entstandene Chlorophyllin auf dieselbe Weise wie Chlorophyllin aus dem Chlorophyll der höheren Pflanzen sich reinigen läßt, ist es wohl als sehr wahrscheinlich zu erachten, daß der grüne Farbstoff der Florideen dem Chlorophylle im Sinne von Willstätter angehört.

Von mehreren Autoren, besonders von Tswett ist längst behauptet worden, daß das grüne Pflanzenpigment ein Gemisch sei aus einer blaugrünen und einer gelbgrünen Komponente. Diese Behauptung ist in einer jüngst erschienenen Arbeit von Willstätter und Hug (1911, S. 182) bestätigt worden. Es wäre demnach von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob auch das grüne Florideenpigment zwei verschiedene Komponenten enthalte. Eine solche Untersuchung zu machen, habe ich aber nicht Gelegenheit gehabt.

Um die zweite Streitfrage, nämlich die, ob das Chlorophyll der Florideen mit dem Phykoerythrin chemisch verbunden ist oder nicht, beantworten zu können, muß man die lebenden Florideen einer spektroskopischen Untersuchung unterwerfen. Ich selbst habe nicht Gelegenheit gehabt, eine solche Untersuchung zu machen, in der Literatur gibt es aber Angaben,

die es möglich machen, auch ohne eigene Untersuchungen die in Rede stehende Frage abzuhandeln.

Wie schon früher erwähnt wurde, hat Stokes bei einer spektroskopischen Untersuchung lebender Florideen sowohl die dem Chlorophyll wie die dem Phykoerythrin angehörigen Absorptionsstreifen beobachten können. Von dieser Tatsache veranlaßt, schreibt Askenasy (1867, S. 234): «Es ist dies ein evidentere Beweis dafür, daß beide Farbstoffe schon in der lebenden Pflanze gesondert vorhanden, und daß sie nicht erst nach dem Tode derselben durch eine Spaltung (im chemischen Sinne) entstehen.»

Die Beobachtung von Stokes ist später auch von Rosanoff (1867, S. 204) gemacht worden, und er ist der Ansicht, daß diese «présente le plus fort argument en faveur de la présence simultanée, dans les Floridées vivantes, de la chlorophylle et de la phycoérythrine.»

Reinke hat eine eingehende, spektroskopische Untersuchung bei *Delesseria sanguinea* gemacht. Er untersuchte spektroskopisch einen Teil des lebenden Thallus dieser Alge und erhielt auf diese Weise das Absorptionsspektrum des «Rhodophylls» (= Chlorophyll + Phykoerythrin). Darauf untersuchte er einen Alkoholextrakt dieser Alge und dann einen Wasserextrakt. Im ersteren Falle erhielt er das Absorptionsspektrum des Chlorophylls, im letzteren Fall das des Phykoerythrins, und es zeigte sich nun, daß das Absorptionsspektrum des «Rhodophylls» sich aus dem des Chlorophylls und dem des Phykoerythrins zusammensetzte; oder um Reinke (1886, S. 231) anzuführen: «Offenbar setzt sich die Absorption des Rhodophylls im Blatte zusammen aus der Wirkung der Chlorophyllgruppe und der Phykoerythringruppe, die man durch Einwirkung von Alkohol und Wasser daraus zu isoliert abzuscheiden vermag.»

Man erwartet, daß Reinke aus seiner Untersuchung den Schlußsatz ziehen würde, Chlorophyll und Phykoerythrin kämen in der lebenden Alge als zwei selbständige Farbstoffe nebeneinander vor. Dies tut er jedoch nicht. Er behauptet, wie früher erwähnt worden ist, daß die beiden Farbstoffe an ein

Proteinmolekül gebunden sind (möglicherweise jeder Farbstoff an je ein Proteinmolekül). Dies hängt mit der Weise zusammen, auf welche Reinke zu erklären suchte, daß das Phykoerythrin stark fluoresciert, sobald es aus den Chromatophoren extrahiert worden ist, dagegen nicht fluoresciert, solange es noch in denselben bleibt. In den lebenden Chromatophoren sei der Farbstoff an ein Proteinmolekül gebunden, bei der Extraktion aber würde die Phykoerythrin-Komponente von dem hypothetischen Proteinmolekül freigemacht werden und dann beginne die Fluorescenz.

Diese Erklärung erscheint allerdings ganz hübsch, sie fordert aber mit Notwendigkeit, daß die Spaltungsprodukte einer chemischen Verbindung dieselben spektroskopischen Eigenschaften haben können, wie die chemische Verbindung selbst. Das «Rhodophyll» wäre ja nach Reinke eine chemische Verbindung zwischen einer Proteinkomponente, einer Chlorophyllkomponente und einer Phykoerythrin-Komponente und dessen ungeachtet würde sich sein Absorptionsspektrum aus dem des Chlorophylls und dem des Phykoerythrins zusammensetzen, oder mit anderen Worten die summierten Absorptionsspektren der Spaltungsprodukte wären der der Muttersubstanz gleich. Dies finde ich sehr unwahrscheinlich und glaube daher nicht, daß Chlorophyll und Phykoerythrin in den lebenden Chromatophoren miteinander oder mit einer anderen Komponente chemisch verbunden sind.

Es scheint mir, als ob die spektroskopischen Untersuchungen von Reinke auf folgende Weise gedeutet werden müßten: Chlorophyll und Phykoerythrin sind in den lebenden Florideenchromatophoren zwei selbständige nebeneinander vorkommende Farbstoffe, die nicht miteinander chemisch verbunden sind.

Reinkes Erklärungsweise, warum das Phykoerythrin erst nach dem Extrahieren aus den Chromatophoren zu fluorescieren beginnt, wird noch unwahrscheinlicher, nachdem durch meine Untersuchungen (Kylin 1910, S. 188) mit Sicherheit erwiesen worden ist, daß dieser Farbstoff in sich selbst ein eiweißartiger, der Proteidgruppe angehörender Stoff ist. Es ist wohl kaum

wahrscheinlich, daß ein in sich selbst eiweißartiger Farbstoff in den lebenden Chromatophoren an ein Proteinmolekül gebunden wäre und erst beim Extrahieren frei gemacht würde. Die Ursache, daß das Phykoerythrin in den lebenden Florideen nicht fluoresciert, ist wohl die, daß der Farbstoff in diesen in fester Form vorkommt.¹⁾

II. Die gelben Begleiter des Florideenchlorophylls.

Die erste Angabe hinsichtlich gelber Farbstoffe bei Florideen rührt von Sorby (1873, S. 458) her: es gelang ihm, aus *Porphyra calyaris* einen in Alkohol löslichen, gelben Farbstoff zu erhalten, den er Xanthophyll nannte.

Der nächste Versuch, gelbe Farbstoffe bei den Florideen nachzuweisen, ist von Reinke (1876, S. 404) gemacht worden. Er extrahierte *Batrachospermum moniliforme* mit kochendem Alkohol, und die so gewonnene Lösung wurde mit Benzol ausgeschüttelt, wobei der Alkohol wieder vollständig farblos wurde. Reinke behauptet deshalb: «Ein gelber in Alkohol löslicher Farbstoff scheint mit dem Chlorophyll von *Batrachospermum* nicht vergesellschaftet zu sein.»

Nebelung (1878, S. 397) hat Reinkes Versuche wiederholt: er benutzte aber Benzin anstatt Benzol, und es gelang ihm dadurch, bei einigen Süßwasserflorideen, nämlich *Batrachospermum*, *Chaetranthia*, *Lemanea* und *Bangia* einen, alkohol-löslichen, gelben Farbstoff nachzuweisen.

Die Untersuchungen sind von Hansen (1893, S. 292)

¹⁾ Hinsichtlich des Phykoeyans und dessen Verhältnis zu Chlorophyll liegen dieselben Meinungsverschiedenheiten vor, wie hinsichtlich des Phykoerythrins. Auch in diesem Fall finde ich es am wahrscheinlichsten, daß es in den lebenden Chromatophoren zwei nebeneinander vorkommende Farbstoffe gibt, die nicht miteinander chemisch verbunden sind. In diesem Zusammenhang möge an Gaidukovs schöne Untersuchung über den Einfluß farbigen Lichts auf die Färbung lebender Oscillarien erinnert werden. In welcher Weise die Farbe der *Oscillaria*-Arten auch verändert worden war, zeigte die spektroskopische Untersuchung den kräftigen Absorptionsstreifen des Chlorophylls zwischen B und C. So weit es aus den von Gaidukov gegebenen Tabellen hervorgeht, war es das Phykoeyan, welches unter dem Einfluß des farbigen Lichts verändert worden war.

fortgesetzt worden, welcher aus allen Florideen, die er untersuchte, eine grüne Farbstoffmasse gewinnen konnte, welche sich in einen grünen und einen gelben Farbstoff spalten ließ, wie dies beim Chlorophyllfarbstoffe der Phanerogamen der Fall ist.

In seiner Untersuchung über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreich erwähnt Tammes (1900, S. 241), daß er durch die Anwendung von Molischs Kalimethode Carotin bei einigen Florideen, nämlich *Porphyra laciniata*, *Ceramium rubrum* und *Polysiphonia* sp. nachweisen konnte.

Erst durch die Untersuchungen von Willstätter und Mieg (1907) sind wir über die gelben Begleiter des Chlorophylls der höheren Pflanzen besser unterrichtet worden. Diese gelben Begleiter sind Carotin und Xanthophyll, die durch ihre Löslichkeitsverhältnisse in Petroläther und Alkohol von einander deutlich verschieden sind. Carotin ist in Alkohol schwer, in Petroläther aber leicht löslich. Aus einer Petrolätherlösung kann es nicht in 80%igen Alkohol hinübergeschüttelt werden. Xanthophyll ist in Alkohol leicht löslich, in Petroläther aber unlöslich. Bei der Reinigung von einer alkoholischen Chlorophylllösung nach dem Entmischungsverfahren von Kraus geht demnach das Carotin in die petrolätherische Schicht über, während das Xanthophyll in der alkoholischen Schicht bleibt.

Werden die Literaturangaben über das Vorkommen von gelben Farbstoffen bei Florideen mit den oben erwähnten Ergebnissen von Willstätters und Miegs Untersuchungen zusammengestellt, würden wir erwarten, daß bei diesen Algen zwei gelbe Farbstoffe vorkämen.

Um Carotin bei den Florideen nachzuweisen, wurden Thallusteile einiger Arten in 40%igen Alkohol, in welchem 20% Ätzkali aufgelöst war, eingelegt und darin zwei Tage liegen gelassen (Molischs Kalimethode, s. Molisch 1896, S. 19). Das Carotin krystallisierte dabei in mikroskopischen, orange-gelben Nadeln oder in aus solchen Nadeln bestehenden Aggregaten. Auf diese Weise ist von mir Carotin bei folgenden Florideen nachgewiesen worden: *Callithamnion hiemale* Kjellm., *Ceramium diaphanum* Harv. et Ag., *C. rubrum* (Huds.) Ag., *Chondrus crispus* (L.), Lyngb., *Corallina officinalis* L., *Cystoclo-*

nium purpurascens (Huds.), Kütz., *Delesseria sanguinea* (L.) Lam., *Dumontia filiformis* (Fl. Dan.) Grev., *Furcellaria fastigiata* (Huds.) Lam., *Laurencia pinnatifida* (Gmel.) Lam., *Phyllophora Brodiaei* (Turn.) J. Ag., *Ph. membranifolia* (Good. et Woodw.) J. Ag., *Polyides rotundus* (Gmel.) Grev., *Polysiphonia nigrescens* (Dillw.) Grev., *Porphyra hiemalis* Kylin, *Rhodomela subfusca* (Woodw.) Ag., *Rh. virgata* Kjellm. und *Spermothamnion roseolum* (Ag.) Pringsh.

Dies sind alle Florideen, die ich hinsichtlich des Vorkommens von Carotin untersucht habe. Bei *Chondrus crispus* kamen Krystalle nur spärlich vor, aber anstatt ihrer gelbe Tröpfchen in großer Menge; bei den übrigen Arten gab es in den Zellen reichlich Carotinkrystalle.

Um auch makrochemisch Carotin bei den Florideen nachzuweisen, wurden 150 g luftgetrocknetes, gepulvertes Material von *Ceramium rubrum* mit 250 ccm Petroläther während dreier Tage extrahiert. Das Material wurde abgesaugt und mit 100 ccm Petroläther nachgespült. Auf diese Weise wurden 200 ccm Lösung erhalten. Um diese von Chlorophyll zu befreien, wurde sie mit alkoholischem Kali behandelt und dann mit etwas Wasser gemischt, bis sich eine petrolätherische Schicht abschied. Die so erhaltene, stark gelbfarbige, petrolätherische Lösung wurde einmal mit Alkohol, dann mit Wasser ausgeschüttelt. Es war meine Absicht, diese petrolätherische Lösung nach den Angaben von Willstätter und Mieg (1907, S. 12) weiter zu behandeln, um krystallisiertes Carotin zu erhalten, ich fand aber bald, daß die erhaltene Carotinlösung viel zu klein war, um die Reinigung weiter treiben zu können. Und da der Vorrat von *Ceramium* sehr begrenzt war, war es mir nicht möglich, den Versuch in größerem Maßstabe zu wiederholen.

Wie schon früher erwähnt worden ist, wurde ein alkoholischer Extrakt auf *Ceramium rubrum*, nachdem das Chlorophyll mit NaOH verseift worden war, mit Äther ausgeschüttelt (s. S. 109). Die ätherische Schicht wurde stark gelb gefärbt. Diese ätherische Lösung wurde zuerst mit alkoholischer Natronlauge, dann mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat ge-

trocknet und im Vakuum eingeengt. Die so erhaltene Lösung wurde mit dem doppelten Volumen Petroläther vermischt, wobei ein rötlich orangefarbiger Niederschlag entstand. Dieser in Petroläther unlösliche Niederschlag löste sich leicht in Alkohol mit gelber Farbe. — Die Reinigung nach den Angaben von Willstätter und Mieg (1907, S. 14) weiter fortzusetzen, war wegen der geringen Menge von Lösung nicht möglich.

Aus *Ceramium rubrum* habe ich demnach einen gelben Farbstoff extrahieren können, welcher, da er in Alkohol löslich, in Petroläther unlöslich ist, am nächsten mit dem Xanthophyll im Sinne von Willstätter und Mieg verwandt zu erachten ist. Nun zeigte es sich aber, daß bei Zusatz von ein wenig Säure, auch Essigsäure, bis zu saurer Reaktion die Farbe zugleich von Gelb in Grün verändert wurde. Dies kann nur so gedeutet werden, daß der gelbe Farbstoff auf irgend eine Weise, wahrscheinlich durch zu starke Alkalieinwirkung, verändert worden war (vgl. S. 118).

Die Arbeit mußte demnach nach einem anderen Plan fortgesetzt werden, und nach einigen vorbereitenden Versuchen wurde dann in folgender Weise fortgeföhren.

50 g luftgetrocknetes, pulverisiertes Material von *Ceramium rubrum* wurde mit 75 ccm Benzol übergossen. Nach drei Tagen wurde abgesaugt, mit 50 ccm Benzol nachgespült, und die so erhaltene Lösung, 85 ccm, mit 75 ccm 96%igem Alkohol vermischt. Durch Zusatz von etwas Wasser wurde eine Benzolschicht abgeschieden.

Diese Benzolschicht wurde dann mit 80%igem Alkohol ausgeschüttelt, wobei die alkoholische Schicht recht stark gelblich wurde. Im Benzol blieben Chlorophyll und Carotin zurück. Der letztere Farbstoff wurde dadurch nachgewiesen, daß der Rückstand nach dem Eindampfen des Benzols in Petroläther gelöst und die petrolätherische Lösung mit alkoholischem Kali ausgeschüttelt wurde, wobei der Petroläther einen gelben Farbstoff, das Carotin, zurückhielt.

Die alkoholische Schicht nach der zweiten Ausschüttelung wurde bei gewöhnlicher Temperatur bis zur Trockenheit eingedampft, und der Rückstand mit Petroläther behandelt, welcher

einen Teil davon mit gelber Farbe löste. Wurde diese petrolätherische Lösung mit 80%igem Alkohol geschüttelt, nahm die alkoholische Schicht so gut wie vollständig den gelben Farbstoff auf. Diese alkoholische Lösung wurde noch einmal eingedampft, der Rückstand mit Petroläther behandelt und der dabei gelöste, gelbe Farbstoff wieder in 80%igen Alkohol hinübergeschüttelt. Der Rückstand nach der Behandlung mit Petroläther löste sich leicht in Alkohol mit gelber Farbe.

In der alkoholischen Schicht nach der zweiten Ausschüttelung gab es demnach zwei gelbe Farbstoffe, welche sich hinsichtlich ihrer Löslichkeitsverhältnisse in Alkohol und Petroläther unterscheiden. Der eine ist in Petroläther unlöslich, in Alkohol aber löslich, der andere ist sowohl in Petroläther wie in Alkohol löslich. Da dieser Farbstoff aber aus einer petrolätherischen Lösung in 80%igen Alkohol so gut wie vollständig hinübergeschüttelt werden kann, ist er mit Carotin nicht identisch, welches bei einer solchen Behandlung in der petrolätherischen Schicht geblieben wäre.

Die alkoholische Schicht nach der ersten Ausschüttelung enthielt außer gelben Farbstoffen eine geringe Menge Chlorophyll. Nach Eindampfen bis zur Trockenheit bei gewöhnlicher Temperatur wurde der Rückstand mit Petroläther behandelt, welcher einen Teil davon löste. Bei Ausschüttelung dieser petrolätherischen Lösung mit 80%igem Alkohol färbte sich die alkoholische Schicht gelb. Der Rückstand nach der Behandlung mit Petroläther wurde in Alkohol gelöst und die so erhaltene Lösung ein paarimal mit Petroläther geschüttelt, um einige Chlorophyllreste wegzuschaffen. Darnach wurde die alkoholische Lösung bis zur Trockenheit eingedampft und der erhaltene Rückstand mit Petroläther behandelt, wobei jedoch nur wenig gelöst wurde. Der Rückstand nach der Behandlung mit Petroläther wurde in ganz wenig Äther gelöst, die ätherische Lösung mit Petroläther versetzt, wobei ein rötlich orange-farbiger Niederschlag entstand. — Krystalle sind nicht erhalten worden.

Aus *Ceramium rubrum* ist es mir demnach gelungen, einen in Alkohol löslichen, in Petroläther unlöslichen, gelben

Farbstoff zu extrahieren. Eine verdünnte Lösung dieses Farbstoffes ist gelb; in größerer Konzentration vertieft sich die Farbe bis zu orangerot. Zusatz von etwas Eisessig verändert die Farbe nicht bei gewöhnlicher Temperatur, bei Kochen geht sie aber in Grün über. In getrocknetem Zustand wird der Farbstoff in Eisessig mit gelber Farbe gelöst. Wird eine alkoholische Lösung mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure versetzt, geht die Farbe auch bei Zimmertemperatur nach einigen Minuten in Grün über, um nach einigen Stunden mehr blaugrün zu werden. Bei Behandlung mit Alkali wird der Farbstoff beim Kochen schnell, bei Zimmertemperatur langsam in irgendeiner Weise verändert, sodaß die Farbe nach Zusatz von einer Säure bis zu saurer Reaktion augenblicklich grün wird. Bei Alkalisieren wird die Farbe wieder gelb. (Vgl. den Versuch, diesen Farbstoff aus einem mit Alkali behandelten, alkoholischen Extrakt herzustellen, S. 116.)

Der Farbstoff wird von konzentrierter Schwefelsäure mit schmutzig blauer Farbe gelöst (der schmutzige Farbenton ist ganz sicher von einer Menge farbloser Verunreinigungen bedingt, die bei der Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure zerstört werden); bei Zusatz von Wasser werden grüne Flocken ausgefällt.

Der in Rede stehende Farbstoff ist in Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Methylalkohol, Äthylalkohol, Amylalkohol, Äther, Aceton, Benzol und Toluol löslich, nicht aber in Petroläther, Benzin und Ligroin.

Werden diese Angaben mit denjenigen verglichen, die von Willstätter und Mieg hinsichtlich des Xanthophylls der höheren Pflanzen gemacht sind, zeigt es sich, daß der in Rede stehende gelbe Farbstoff aus *Ceranium rubrum* mit dem Xanthophyll der höheren Pflanzen sehr nahe verwandt sein muß. Ob er mit demselben identisch ist, kann ich gegenwärtig nicht entscheiden, ich habe aber keinen Charakter nachweisen können, wodurch die beiden Farbstoffe mit Sicherheit zu unterscheiden wären.¹⁾

¹⁾ Es ist möglich, daß Alkali leichter auf das Xanthophyll aus *Ceranium* als auf das der höheren Pflanzen schädlich einwirkt. Will-

Wie schon früher erwähnt ist, ist auch ein sowohl in Petroläther wie in Alkohol löslicher, gelber Farbstoff aus meinem Material erhalten worden, welcher sich aber von Carotin dadurch unterscheidet, daß er sich aus einer petrolätherischen Lösung in 80%igen Alkohol so gut wie vollständig hinüberschütteln läßt. Eine verdünnte Lösung dieses Farbstoffes ist gelb; in größerer Konzentration vertieft sich die Farbe bis zu rotbraunem Orange. Bei Zusatz von verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure wird die Farbe auch bei Zimmertemperatur grün; nach einer Stunde wird sie blaugrün. Beim Kochen nach Zusatz von Essigsäure wird die Farbe ebenfalls grün. Bei Behandlung mit Alkali wird der Farbstoff beim Kochen schnell, bei Zimmertemperatur langsam in irgend einer Weise verändert, so daß die Farbe nach Zusatz von einer Säure bis zu saurer Reaktion augenblicklich grün wird. Bei Alkalisieren wird die Farbe wieder gelb.

Dieser Farbstoff zeigt demnach in mehreren Hinsichten Übereinstimmungen mit Xanthophyll, unterscheidet sich aber von diesem durch seine Löslichkeit in Petroläther.

Das früher mit Benzol behandelte Material (S. 116) wurde während dreier Tage mit 75 ccm 96%igem Alkohol extrahiert, dann abgesaugt und mit 50 ccm Alkohol nachgespült. Auf diese Weise wurden 85 ccm Lösung erhalten. Um das Chlorophyll auszufällen, wurde gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung zugesetzt, und ferner etwas Alkohol, um die gelben Farbstoffe in Lösung zu halten. Nach dem Abfiltrieren des Niederschlages wurde mit Petroläther ausgeschüttelt, um die letzten Reste von Chlorophyll abzuscheiden. Die alkoholisch-wässrige Lösung wurde dann mit Äther ausgeschüttelt, welcher dabei die gelben Farbstoffe aufnahm. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und bei Zimmertemperatur bis zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand

stätter und Mieg erhielten das Xanthophyll, indem sie eine alkoholische Chlorophylllösung mit Alkali verseiften und dann mit Äther ausschüttelten. Der Äther nahm dabei das Xanthophyll auf. Auf diese Weise gelang es mir aber nicht, das Xanthophyll aus *Ceramium* unverändert zu erhalten (vgl. S. 116).

wurde mit Petroläther behandelt, wobei ein gelber Farbstoff gelöst wurde, welcher in 80%igen Alkohol hinübergeschüttelt werden konnte. Nach wiederholter Behandlung mit Petroläther gab es noch einen Rückstand, der nicht in Petroläther, in Alkohol aber mit gelber Farbe leicht gelöst wurde. — Wir finden demnach die schon beschriebenen Farbstoffe wieder.

Aus meinem Material habe ich demnach drei gelbe Farbstoffe extrahieren können, nämlich:

1. Carotin:
2. Xanthophyll, wahrscheinlich mit dem Xanthophyll der höheren Pflanzen identisch;
3. einen Farbstoff, der mit Xanthophyll verwandt zu sein scheint, der sich aber von diesem durch seine Löslichkeit in Petroläther unterscheidet.

Es ist aber durchaus nicht notwendig, daß die drei Farbstoffe aus *Ceramium rubrum* herrühren. Als unvermeidliche Verunreinigungen mögen Diatomaceen und kleine, epiphytische oder endophytische Fukoideen erwähnt werden. Einer der drei Farbstoffe ist möglicherweise diesen Verunreinigungen zu verdanken.

Das Vorkommen des Carotins bei den Florideen ist aber mit Sicherheit festgestellt worden, dadurch, daß es als Krystalle in den Zellen selbst erhalten worden ist. Hinsichtlich der übrigen Farbstoffe finde ich es am wahrscheinlichsten, daß das Xanthophyll bei der von mir untersuchten Floridee, *Ceramium rubrum*, vorkommt, daß aber der als Nr. 3 angeführte gelbe Farbstoff von den Verunreinigungen abstammt.

Die Farbstoffe der Diatomaceen und Fukoideen sind noch wenig untersucht, und die Angaben, die man in der Literatur findet, sind einander so widersprechend, daß sie zu vergleichenden Untersuchungen nicht geeignet sind. Nach Tswett (1906, S. 239) gibt es aber bei den Fukoideen einen sowohl in Petroläther als in Alkohol löslichen, gelben Farbstoff, das Fukoxanthin, welches mit dem von mir als Nr. 3 erwähnten Farbstoff in mehreren Hinsichten übereinzustimmen scheint. Und nach einer Prüfung der Angaben über die Farbstoffe der Diatomaceen finde ich es sehr wahrscheinlich, daß dieser oder

wenigstens ein mit ihm nahe verwandter Farbstoff auch bei diesen Algen vorkommt.

Literaturverzeichnis.

- Askenasy, C., Beiträge zur Kenntnis des Chlorophylls und einige dasselbe begleitender Farbstoffe. *Botan. Zeitung*, 1867.
- Cohn, F., Beiträge zur Physiologie der Phycocromaceen und Florideen. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, herausg. von Max Schultze, Bd. 3, Bonn 1867.
- Engelmann, Th. W., Über Assimilation von Haematococcus. *Botanische Zeitung*, 1882.
- — Farbe und Assimilation. *Ebenda*, 1883.
- Gaidukov, N., Über den Einfluß farbigen Lichts auf die Färbung lebender Oscillarien. *Abhandlungen d. königl. preuß. Akad. d. Wissensch.*, 1902, Berlin 1902.
- Hansen, A., Über Stoffbildung bei den Meeresalgen. *Mitteilungen aus der Zoolog. Station zu Neapel*, Bd. 11, Berlin 1893.
- Kohl, F. G., Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze. Leipzig 1902.
- Kützing, Fr. J., *Phycologia generalis*. Leipzig 1843.
- Kylin, H., Über Phykoerythrin und Phykocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. *Diese Zeitschrift*, Bd. 69, Straßburg 1910.
- Molisch, H., Die Krystallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte. *Berichte der Deutsch. botan. Gesellschaft*, Bd. 14, Berlin 1896.
- Nebelung, H., Spektroskopische Untersuchungen der Farbstoffe einiger Süßwasseralgen. *Botanische Zeitung*, 1878.
- Nägeli, C., *Die neuern Algensysteme*, Zürich 1847.
- — *Gattungen einzelliger Algen*, Zürich 1849.
- Pringsheim, N., Über natürliche Chlorophyllmodifikationen und die Farbstoffe der Florideen. *Monatsberichte d. königl. preuß. Akad. d. Wissenschaften zu Berlin*, 1875.
- Reinke, J., Beitrag zur Kenntnis des Phycoxanthins. *Jahrbücher für wissenschaft. Botanik*, Bd. 10, Leipzig 1876.
- — Photometrische Untersuchungen über die Absorption des Lichtes in den Assimilationsorganen. *Botanische Zeitung*, 1886.
- Rosanoff, S., Observations sur les fonctions et les propriétés des pigments de diverses Algues. *Mémoires de la Soc. imp. sciences nat. de Cherbourg*, T. 13, 1867.
- Schütt, Fr., Über das Phycoerythrin. *Berichte d. Deutsch. bot. Gesellschaft*, Bd. 6, Berlin 1888.

122 H. Kylin, Über die grünen und gelben Farbstoffe der Florideen.

Sorby, H. C., On comparative vegetable Chromatology. Proceed. of the royal soc. London 1873.

— — On the characteristic colouring-matters of the red groups of Algues. The Journal of the Linnean Society, Botany, Vol. 15, London 1877.

Stokes, G. G., Über die Veränderung der Brechbarkeit des Lichts. Annalen der Physik und Chemie, herausgegeben von Poggendorff, Erg.-Bd. 4, Leipzig 1854.

Tammes, T., Über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche. Flora, Bd. 87, Marburg 1900.

Tswett, M., Zur Kenntnis der Phaeophyceenfarbstoffe. Berichte der Deutsch. bot. Gesellschaft, Bd. 24, Berlin 1906.

Willstätter, R., Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Liebigs Annalen der Chemie, Bd. 350, Leipzig 1906.

— — und Hocheder, F., Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ebenda, Bd. 354, 1907.

— — und Mieg, W., Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. Ebenda, Bd. 355, 1907.

— — und Isler, M., Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen, III. Ebenda, Bd. 380, 1911.

— — und Hug, E., Isolierung des Chlorophylls. Ebenda, Bd. 380, 1911.
