

Carotinoid-Garnitur und -Stoffwechsel von *Arctodiaptomus bacillifer* KOEBEL (Crustacea, Copepoda)

Carotenoid Composition and Metabolism of *Arctodiaptomus bacillifer* KOEBEL
(Crustacea, Copepoda)

Hans Seefried und Franz-C. Czygan

Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg

Z. Naturforsch. 33 c, 671–674 (1978); eingegangen 27. April/12. Juni 1978

Arctodiaptomus, Crustacea, Carotenoids, Keto-Carotenoids, Metabolism of Astaxanthin

Composition and metabolism of carotenoids in *Arctodiaptomus bacillifer* taken from a mountain lake in the Alps have been studied. This copepode contains esters of astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dion) mainly. Besides β -carotene (β,β -carotene) and unesterified zeaxanthin (β,β -carotene-3,3'-diol), esters of hydroxyechinenone (3-hydroxy- β,β -caroten-4-one), adonixanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -caroten-4-one), and zeaxanthin were found. The metabolism of carotenoids in *Arctodiaptomus bacillifer* and a possible way of astaxanthin biosynthesis have been discussed.

Blutregen, Blutseen und Blutschnee sind biologische Phänomene, die seit alters her die Phantasien ihrer Beobachter angeregt haben. Inzwischen ist bekannt, daß sowohl Tiere als auch Pflanzen diese Vorgänge auslösen. So konnte vor wenigen Jahren experimentell eindeutig gezeigt werden, daß für Blutregen und für Blutschnee die einzelligen Grünalgen *Haematococcus pluvialis* und *Chlamydomonas nivalis* verantwortlich sind [1]. Beide Arten werden bei Nährsalz-, insbesondere bei Stickstoff-Mangel „blut“-rot. Diese Rotfärbung verursachen vor allem Carotinoide vom Typ des Astaxanthins, sogenannte Sekundär-Carotinoide [2]. Es handelt sich um Oxo-Carotinoide, die synchron zum Abbau der primären Chloroplastenpigmente, möglicherweise aus Abbauprodukten der Chlorophylle biosynthetisiert werden [3, 4].

Andererseits sind gerade in Hochgebirgsseen auch viele tierische Organismen rot gefärbt und bewirken bei massenhaftem Auftreten die Erscheinung der Blutseen [5–7]. Dies gilt insbesondere für einige Copepoden. Bereits erste Untersuchungen solcher Copepoden-Farbstoffe aus *Diaptomus* (= *Arctodiaptomus*) *bacillifer* durch Blanchard 1890 [8] zeigten, daß es sich um carotinartige Pigmente handelt. Zopf konnte dann 1893 [9] in dieser Art ein gelbes Carotinoid mit zwei Absorptionsbanden und ein rotes Carotinoid mit einer Absorptionsbande, das er Diaptomin nannte, nachweisen.

Offen sind auch heute, trotz mancher Deutungsversuche des Phänomens der tierischen Rotfärbung [7], zwei Fragen: Wie werden diese Carotinoide gebildet? Wird nur mit der Nahrung aufgenommenes β -Carotin oxidativ verändert oder werden – ähnlich wie es von uns aufgrund eingehender Fütterungsexperimente mit verschiedenen Entwicklungsphasen des Kartoffelkäfers [10] oder mit *Artemia salina* [11, 12] wahrscheinlich gemacht wurde – diese Carotinoide aus Bruchstücken anderer Kataboliten aufgebaut? Welche Rolle spielen diese roten Farbstoffe für die sie produzierenden Tiere? Um diese sicherlich auch allgemeinbiologisch interessanten Fragen einer Klärung näher zu bringen, bot sich die Untersuchung des zu Zeiten seiner Massenentwicklung intensiv rot gefärbten Copepoden *Arctodiaptomus bacillifer* aus einem kleinen Alpensee an. Hiermit war die Möglichkeit gegeben, in einem streng abgegrenzten und gut überschaubaren Biotop die natürliche Veränderung im Metabolismus und Katabolismus der Carotinoide im Einzelorganismus und im gesamten Ökosystem zu verfolgen. In einer Reihe von Veröffentlichungen soll über den Stoffwechsel der Tetraterpene dieses Krebses berichtet werden.

Material und Methoden

1. Herkunft des Materials

Arctodiaptomus bacillifer fanden wir Mitte August 1975 in großen Mengen im Röthensteiner See. Dieser Gebirgssee liegt im Wallberg-Risserkogel-Gebiet südlich des Tegernsees (Bayerische Alpen)

auf einer Höhe von 1459,5 m ü. d. M. Trotz seiner relativ niedrigen Höhenlage handelt es sich um einen charakteristischen Hochgebirgssee. Seine Lage am Fuß des steilen Ableitenschneldrhanges hat zur Folge, daß er etwa 6 Monate im Jahr vereist und mit den Schneemassen abgehender Lawinen angefüllt ist. Der letzte Schnee verschwindet dort erst im Mai. Während der Sommermonate zeigt der See je nach den Niederschlägen einen stark schwankenden Wasserstand. In regenarmen Zeiten nimmt der Wasserstand durch einen unterirdischen Abfluß schnell ab, wobei sich der See dann in einen tieferen und einen flacheren Teil aufspaltet. Besonders im Stadium der Zweiteilung des Sees kommt es im flacheren Teil (maximale Tiefe 0,5 m) zum massenhaften Auftreten von Copepoden. Unter diesen waren zur Zeit der Probenentnahmen in der Hauptsache *Arctodiaptomus bacillifer*, daneben auch *Heterocope saliens* vertreten. Das mit dem Planktonnetz gesammelte Material wurde an Ort und Stelle durch einen Siebsatz gespült, wobei die wenigen größeren *Heterocope saliens* und die Cladoceren ausgesondert werden konnten. Das Frischmaterial, das nur noch *Arctodiaptomus bacillifer* enthielt, wurde dann bis zur Aufarbeitung bei -18°C aufbewahrt.

2. Analyse der Pigmente

Die Isolierung und Verseifung der Gesamtpigmente, sowie die dünnschichtchromatographische Auftrennung und Identifizierung der Einzelpigmente erfolgte nach Angaben in [2, 13, 14]. Dehydrohydroxyechinenon als Vergleichssubstanz wurde aus

Adonis annua [16] isoliert. Die quantitativen Bestimmungen legten wir für alle Carotinoide bzw. Carotinoidgemische einen einheitlichen Extinktionskoeffizienten von $E_{\text{cm}}^{1\%} = 2500$ bei λ max. (Lösungsmittel: Hexan bzw. Äthanol) zugrunde.

Ergebnisse und Diskussion

Die intensive Rotfärbung der Krebse und das eingipflige Spektrum (max. bei ca. 475 nm; ohne Feinstruktur) des Gesamtextrakts ließ uns eine hohe Konzentration an Carotinoiden, insbesondere an Oxo-Carotinoiden erwarten. Tatsächlich fanden wir in verschiedenen Analysen einen mittleren Gesamtpigmentgehalt von ca. 420 μg Carotinoide je g Frischgewicht bzw. 3850 μg je g Trockengewicht. Dünnschichtchromatographisch war der unverseifte Gesamtextrakt in 7 Fraktionen aufzuteilen (Tab. I und Tab. II). Die weitere Untersuchung dieser Fraktionen nach ihrer Verseifung zeigte, daß die Fraktionen 3, 5 und 6 nur aus Astaxanthinestern bestanden, und daß Fraktion 1 β -Carotin und Zeaxanthinester, Fraktion 2 Hydroxyechinenonester und Adonixanthinester, Fraktion 4 neben Astaxanthinestern noch Hydroxyechinenonester und Fraktion 7 freies Zeaxanthin enthielten. Mit über 80% der Gesamtpigmente waren die Astaxanthinester vorherrschend. Das von Zopf [9] postulierte Diaptomin ist damit mit verestertem Astaxanthin, das gelbe Pigment mit großer Wahrscheinlichkeit mit Zeaxanthin identisch.

Alle gefundenen Pigmente sind Derivate des β -Carotins. Auffallend ist das Fehlen von α -Carotinoi-

Tab. I. Dünnschichtchromatographische Auftrennung des nativen Gesamt-Pigmentextraktes von *Arctodiaptomus bacillifer*.

Fraktion Nr.	Farbe auf der Dünnschicht	R_F -Wert *	Pigment bzw. Pigmentgemisch **	λ max. in Äthanol [nm]	Pigmentgehalt [$\mu\text{g/g}$ Frischgew.]	Pigmentanteil [% der Gesamtcarotin]
1	gelb	0,81	β -Carotin Zeaxanthinester	478, 450	21,4	5,1
2	orange	0,76	Hydroxyechinenonester Adonixanthinester	468	26,9	6,4
3	rotorange	0,70	Astaxanthinester	478	235,5	55,8
4	orange	0,46	Astaxanthinester Hydroxyechinenonester	470	14,3	3,4
5	rotorange	0,40	Astaxanthinester	476	53,7	12,7
6	rotorange	0,24	Astaxanthinester	476	60,7	14,4
7	gelb	0,19	Zeaxanthin	478, 450	9,9	2,3

* Dünnschichtchromatographisches System: Adsorbens: DC-Alufolien Kieselgel (Merck 5553); Laufmittel: Petrolbenzin (Kp. 100–140 $^{\circ}\text{C}$) + Propanol-2 (90+10), Laufhöhe: 15 cm; Kammersättigung; im Dunkeln.

** Zur systematischen Bezeichnung der Carotinoide [15] vgl. Summary.

Nr.	Farbe auf der Dünnschicht	R _F -Wert	Pigment *	λ max. in Äthanol [nm]	Pigmentanteil [% der Gesamtcarotinoide]
I	gelb	0,78	β-Carotin	478, 450	0,4
II	orange	0,51	Dehydrohydroxyechinenon	466	1,5
III	rot	0,34	Astacin	480	80,3
IV	rotorange	0,27	Dehydroadonixanthin	466	8,5
V	gelb	0,22	Zeaxanthin	478, 450	9,3

* Systematische Beziehung der Carotinoide [15], soweit nicht in der Summary erwähnt: Dehydrohydroxyechinenon: β,β-Carotin-3,4-dion; Astacin: β,β-Carotin-3,4,3',4'-tetrol; Dehydroadonixanthin: 3'-Hydroxy-β,β-carotin-3,4-dion.

den. Obwohl ohne Frage die Krebse mit dem Phytoplankton als Nahrung u. a. auch Lutein und Chlorophylle aufgenommen haben, konnte von diesen Farbstoffen nichts nachgewiesen werden. Selbst sofort in am Fundort mit Ammoniumsulfat konservierten Proben fehlten jegliche Hinweise auf diese Substanzen. Dies stimmt mit unseren Resultaten an *Artemia salina* [11, 12] überein, es steht jedoch in Gegensatz zu Ergebnissen mit dem Schmetterling *Zygaena* [17] und mit dem Kartoffelkäfer, *Chrysomela decemlineata* [10]. Es muß angenommen werden, daß die Chloroplastenpigmente (vor allem Lutein und die Chlorophylle, aber auch die Epoxide Violaxanthin und Neoxanthin, sowie β-Carotin) im Magen-Darmtrakt dieser Copepoden vollständig katabolisiert werden. Ob und inwieweit Bruchstücke dieses Abbaus erneut zum Aufbau von Tetraterpenen genutzt werden, ist nach wie vor nicht geklärt [2, 10]. Von besonderem Interesse ist es außerdem, daß die aus niederen Krebsen häufig isolierten Oxo-Carotinoide Echinenon und Canthaxanthin [11, 14, 18, 19] bei *Arctodiaptomus bacillifer* fehlen. Auch Crustaxanthin (β,β-Carotin-4,4,3',4'-tetrol), das neben β-Carotin, Hydroxyechinenon und Astaxanthin in der nahe verwandten Art *Arctodiaptomus salinus* aus Salzseen biosynthetisiert wird [20], konnten wir in *Arctodiaptomus bacillifer* nicht nachweisen.

Versuche, aufgrund der hier vorgelegten Befunde eine Biosyntheseweg für Astaxanthin, dem Hauptpigment von *Arctodiaptomus bacillifer* zu formulieren, bleiben sicherlich im Detail noch problematisch. In einer Reihe von Laboratorien sind in den letzten Jahren Experimente zur Aufklärung der Astaxanthinbildung in Tieren unternommen worden [11, 14, 18, 21–24]. Zwei Wege zeichnen sich ab: Eine Biosynthesekette geht von β-Carotin aus und führt über Hydroxy- bzw. über Hydroxy-Oxo-Derivate zu den Oxo-Carotinoiden. Ein zweiter Weg

Tab. II. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der verseiften Fraktionen aus Tab. I. I: eines der Verseifungsprodukte von Fraktion 1; II: eines der Verseifungsprodukte von Fraktion 2 und Fraktion 4; III: eines der Verseifungsprodukte von Fraktion 4 und einziges Verseifungsprodukt der Fraktion 3, 5 und 6; IV: eines der Verseifungsprodukte von Fraktion 2; V: identisch mit Fraktion 7 und Verseifungsprodukt von Fraktion I.

metabolisiert das α-Carotinoid Lutein im Goldfisch über 3'-epi-Lutein bzw. in der Grünalge *Fritschella* über Fritschellaxanthin und in beiden Fällen über die weiteren Intermediärprodukte α- und β-Doradexanthin zum Astaxanthin. Aufgrund der von uns gefundenen Daten postulieren wir folgendes Biosyntheschema: Ausgangssubstanz ist β-Carotin, wobei offen bleibt, ob es von dem primär durch pflanzliche

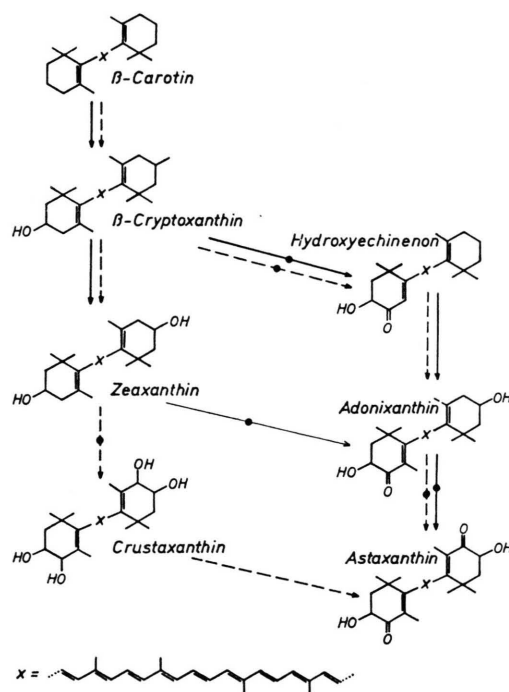


Abb. 1. Möglicher Biosyntheseweg des Astaxanthins in der Crustaceen-Gattung *Arctodiaptomus*. —: in *Arctodiaptomus bacillifer*; ---: in *Arctodiaptomus salinus* nach Bodea et al. [20]; - · - : weitere unbekannte Zwischenprodukte; kräftige Pfeile geben Hauptwege, dünnere Pfeile geben Nebenwege an.

Nahrung aufgenommene β -Carotin oder aus Bruchstücken der katabolisierten Pflanzenpigmente stammt. Hydroxyechinenon und Adonixanthin sind Intermediärprodukte in der vom β -Carotin ausgehenden Oxidationsreihe. Möglicherweise werden beide Verbindungen auch in geringen Mengen als Endprodukte abgelagert. Zweifelsohne muß jedoch für den vollständigen Biosyntheseweg mit weiteren, wahrscheinlich kurzfristig in Form eines Enzym-Carotinoid-Komplexes vorliegenden Zwischenstufen gerechnet werden [14]. So fanden wir in unseren Versuchen Hinweise auf β -Cryptoxanthin. Nach der Verseifung von Fraktion 1 (Tab. I) trat gelegentlich eine zusätzliche äußerst schwache gelbe Bande auf (maximal 5% der Fraktion 1), die sich in ihren analytischen Daten wie β , β -Carotin-3-ol (nicht wie β , β -Carotin-4-ol) verhielt. Inwieweit Zeaxanthin (nicht β , β -Carotin-3,3'-diol) direktes Zwischenprodukt ist, bleibt ebenfalls offen. Die relativ hohe

Konzentration spricht dafür, daß es nur über einen Nebenweg Intermediärprodukt des Adonixanthins ist.

In Abb. 1 sind diese Überlegungen zur Biosynthese von Astaxanthin (-Ester) in *Arctodiaptomus bacillifer* skizziert. Weitere Experimente, vor allem zur Enzymologie dieser Prozesse müssen zeigen, inwieweit Gemeinsamkeiten zwischen den unterschiedlichen, für die Astaxanthinbildung in Crustaceen (aber auch allgemein in Pflanzen und Tieren) postulierten Biosynthesewege bestehen.

Zu besonderem Dank sind wir Herrn Christian Kleiner (Ansbach) verpflichtet, der uns auf den Rößensteiner See aufmerksam gemacht hat. Wir danken außerdem Frau Almuth Krüger (Würzburg) für ihre sorgfältige Mitarbeit bei den Pigmentanalysen und der Deutschen Forschungsgesellschaft für Sachbeihilfen.

- [1] F.-C. Czygan, Arch. Mikrobiol. **74**, 69 [1970].
- [2] F.-C. Czygan, Arch. Mikrobiol. **61**, 81 [1968].
- [3] F.-C. Czygan, Arch. Mikrobiol. **62**, 209 [1968].
- [4] F.-C. Czygan, Flora, Abt. A **159**, 339 [1968].
- [5] F. Zschokke, Die Tierwelt der Hochgebirgsseen. N. Denkschr. schweiz. Ges. f. Naturwissensch. **37**, 1 [1900].
- [6] O. Pesta, Die Binnengewässer. Vol. **8**, Schweizerbart, Stuttgart 1929.
- [7] V. Brehm, Biol. Rev. **13**, 307 [1938].
- [8] R. Blanchard, Compt. Rend. **110**, 292 [1890]. R. Blanchard, Mem. Soc. zool. France **3**, 113 [1890].
- [9] W. Zopf, Beitr. Physiol. Morphol. nied. Organismen **3**, 26 [1893].
- [10] F.-C. Czygan, Z. Pflanzenphysiol. **67**, 33 [1972].
- [11] F.-C. Czygan, Z. Naturforsch. **21b**, 801 [1966].
- [12] F.-C. Czygan, Z. Naturforsch. **23b**, 1367 [1968].
- [13] A. Weber u. F.-C. Czygan, Arch. Mikrobiol. **84**, 243 [1972].
- [14] B. H. Davies, Wan-Jean Hsu, u. C. O. Chichester, Comp. Biochem. Physiol. **33**, 601 [1970].
- [15] O. Straub, Key to Carotenoids. Birkhäuser-Basel/Stuttgart 1976.
- [16] K. Egger, Phytochem. **4**, 609 [1965]; K. Egger u. H. Kleinig, Phytochemistry **6**, 903 [1967].
- [17] T. Bornefeld u. F.-C. Czygan, Z. Naturforsch. **30c**, 298 [1975].
- [18] Y. Tanaka, H. Matsuguchi, H. Katayama, K. L. Simpson u. C. O. Chichester, Comp. Biochem. Physiol. **B 54**, 391 [1976].
- [19] B. M. Gilchrist, Comp. Biochem. Physiol. **24**, 123 [1968].
- [20] C. Bodea, E. Nicoară, G. Illyes u. M. Şerban, Rev. roum. Biochim. **2**, 205 [1965].
- [21] Y. Tanaka, H. Matsuguchi, T. Katayama, K. L. Simpson u. C. O. Chichester, Bull. Jap. Soc. Sc. Fish. **42**, 197 [1976].
- [22] R. Buchecker, A. Weber u. L. H. Eugster, Stereochemistry of α -doradoxanthin and related compounds. Biochemical implications. 5th Intern. Symp. Carotenoids- Madison, Wisconsin, USA. 23.-28. 7. 1978.
- [23] M. Wetter u. A. Weber, (T. Levring, Y. Tanaka, H. A. Hoppe, eds.): Marine Algae in Pharmaceutical Science, De Gruyter, Berlin, im Druck.
- [24] H. Thommen, Carotenoids, (O. Isler ed.), pp. 637-668, Birkhäuser, Basel/Stuttgart 1971.