

Universität Potsdam
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät –
Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe: Didaktik der Biologie

Bachelorarbeit

Erucasäure in *Brassica napus* L. - Ein phänotypisches Merkmal im Genetikunterricht und ihr Nachweis mit Hilfe von Papierchromatographie

Vorgelegt von:

Christoph Kreibich

Erstgutachterin: Dr. Monika Beschorner
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Lenhard

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung 4.0 International
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-93341
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-93341>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Biologische und chemische Grundlagen.....	3
2.1 Bildung der Erucasäure und ihre Bedeutung in den Samen	3
2.2 Vererbung der Erucasäure und ihre Ausprägung.....	6
2.3. Die Geschichte der Züchtung von <i>Brassica napus</i> L. in Bezug auf den Gehalt an Erucasäure und die Bedeutung dieser für den Menschen.....	8
2.4 Papierchromatographie der Fettsäuren.....	10
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial.....	13
3.2 Arbeitsmaterialien und Chemikalien.....	13
3.3 Papierchromatographische Trennung von Fettsäuren.....	14
3.3.1 Extraktion der Fettsäuren aus Samen und Pflanzenöl.....	15
3.3.2 Vorbereitung des Chromatographiepapiers.....	16
3.3.3 Imprägnierung der Chromatographiepapiere.....	16
3.3.4 Trennung der Fettsäuren.....	17
3.4 Färbung.....	18
3.4.1 Nachbehandlung der Chromatogramme.....	18
3.4.2 Färbung.....	18
3.5 Testreihe zur Optimierung der Form der Chromatographiepapier.....	18
4. Ergebnisse.....	20
4.1 Etablierung der Papierchromatographiemethode von Fettsäuren.....	20
4.1.1 Vorversuche zur Anfärbung von Fettsäuren auf dem Chromatogramm.....	20
4.1.2 Optimierung des Zuschnitts der Chromatographiepapiere.....	21
4.1.3 Variation des Waschvorgangs.....	22
4.1.4 Einfluss des Imprägnierungsgrades des Chromatographiepapiers auf die Laufzeit und die Trennschärfe.....	23
4.2 Identifikation der Fettsäuren	23

5. Diskussion

5.1 Einflussfaktoren auf die Qualität der Chromatogramme.....	27
5.1.1 Bedeutung des Aufbaus der Chromatographiepapiere.....	27
5.1.2 Einfluss der Imprägnierung auf die Trenndauer.....	27
5.1.3 Einfluss des Spülvorgangs auf die Färbung der Fettsäuren sowie des Hintergrunds	28
5.2 Identifikation der Fettsäuren.....	28
5.3 Die Eignung des Merkmals Erucasäuregehalt als Modell für den Genetikunterricht.....	28
6. Fazit und Ausblick.....	30
7. Literaturverzeichnis.....	31
8. Selbstständigkeitserklärung.....	35

1. Einleitung

Eines der wichtigsten Speiseöle unserer Zeit ist Rapsöl. Es ist aus den heutigen Küchen kaum mehr wegzudenken. Auch in vielen Bereichen der Industrie, der Viehzucht und auch als alternativer Kraftstoff spielt Rapsöl eine große Rolle. Diesen hohen Stellenwert hat Raps aber erst seit kurzer Zeit inne. Noch vor 60 Jahren gab es in Deutschland nur einen sehr geringen Bedarf an Raps und seinen Produkten. In der Gesellschaft war Rapsöl sehr unbeliebt, da es einen sehr kratzigen Geschmack hatte. Während der Nachkriegszeit gab es keine Alternative zum Rapsöl, so wurde Rapsöl in den späteren Jahren gemieden um sich von der Notsituation der Nachkriegszeit zu distanzieren (*Röbbelen 1973*). In der Viehzucht spielte Raps ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle, da das Schrot, welches nach dem Auspressen des Öls übrig blieb, ungenießbar für das Vieh war und sogar toxische Wirkungen zeigte (*Röbbelen 1973*). Die Probleme der Lebensmittelindustrie und der Viehzucht mit dem Rapsöl sind jedoch unterschiedlicher Herkunft. Für die ungenügende Eignung des Rapschrots als Viehfutter war der hohe Gehalt an Senfölglycosinolaten verantwortlich. In der Lebensmittelindustrie war der Hauptnachteil des Rapsöls sein hoher Gehalt an langkettigen ungesättigten Fettsäuren. Auf das Problem der Senfölglycosinolate soll hier nicht weiter eingegangen werden. Bei den geschmacksstörenden, langkettigen ungesättigten Fettsäuren handelt es sich hauptsächlich um Eicosensäure und Erucasäure. Diese Hauptverursacher der Untauglichkeit des Rapsöls als Speiseöl sollen im Rahmen dieser Arbeit genauer vorgestellt werden, wobei die Eicosensäure hier nur eine untergeordnete Rolle spielen wird.

Der Hauptnachteil der Erucasäure ist nicht allein ihr kratziger Geschmack, sondern auch ihre Wirkung auf den menschlichen Körper (*siehe Kapitel 2.3*). Jahrelange züchterische Arbeit war nötig, um die unerwünschte Erucasäure aus den Samen des Raps zu entfernen. Erstmals 1963 fand der kanadische Züchter Downey eine erucasäurefreie Rapspflanze und legte somit den Grundstein für die nachfolgenden züchterischen Bemühungen (*Röbbelen 1973*) (*siehe Kapitel 2.3*). Durch die Entfernung der Erucasäure aus dem Rapsöl wurde das komplette Fettsäuremuster des Raps verändert. Die Zusammensetzung des erucasäurefreien Öls war nach Ansicht der Lebensmittelindustrie nach der Züchtung ernährungsphysiologisch sehr wertvoll. Erucasäurefreies Rapsöl enthält von allen herkömmlichen Pflanzenölen den geringsten Anteil an gesättigten Fettsäuren und lässt sich für alle Zubereitungsarten in der Küche verwenden (*Krist et al. 2008*). Innerhalb weniger Jahre verzwanzigfachte sich die Rapsanbaufläche in Deutschland (*Röbbelen 1973*).

Neben der Lebensmittelindustrie benötigen auch andere Zweige der Industrie große Mengen an Rapsöl. Vor allem in der Waschindustrie, Stahlverarbeitung und im Maschinenbau war Rapsöl gefragt.

In diesen Bereichen ist jedoch nicht das erucasäurefreie Öl das gewünschte Produkt, sondern eines aus Samen mit einem höheren Gehalt an Erucasäure als der herkömmliche Rapssamen, sogenannter *high erucic acid rapeseed (HEAR)*. Es ist jedoch nicht leicht, beide Varianten, also den erucasäurefreien Raps und HEAR parallel anzubauen, da eine einzige erucasäurehaltige Rapspflanze ein ganzes Feld erucasäurefreien Raps unbrauchbar machen kann (*siehe Kapitel 2.2*).

Obwohl sich erucasäurefreier Raps und erucasäurehaltiger Raps von der Zusammensetzung ihres Öls stark unterscheiden, so sind sie in ihrem äußeren Erscheinungsbild jedoch identisch. Daher war es neben den züchterischen Bemühungen wichtig, eine schnelle Methode zu entwickeln, um beide Varianten einfach unterscheiden zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Papierchromatographie als eine solche Methode vorgestellt. Da eine einfache Reproduktion der Ergebnisse mit Hilfe der Anleitung in einer Diplomarbeit nicht möglich war, ist es das Ziel dieser Arbeit die Papierchromatographie zur Unterscheidung von erucasäurefreiem und erucasäurehaltigem Raps im Labor wieder zu etablieren (*siehe Kapitel 3*). Die Etablierung der Methode im Labor ist die Grundlage zur Erreichung des eigentlichen Ziels und zwar der Einarbeitung der Papierchromatographie sowie der Erucasäure als phänotypisches Merkmal im Genetikunterricht der Schule. Das Potential dieser Methode in diesem Bereich wird im 5.Kapitel ausführlich beleuchtet und somit die Notwendigkeit der Etablierung der Papierchromatographie in der Schule begründet.

2. Biologische und chemische Grundlagen

2.1 Bildung der Erucasäure und ihre Bedeutung in den Samen

Die Synthese der Fettsäuren ist einer der wichtigsten metabolischen Prozesse der Pflanzen (*Ohlrogge & Browse 1995*). Vor allem für den Aufbau der Lipiddoppelschicht sind Fettsäuren unerlässlich. Pflanzen können organische Verbindungen nicht aktiv aufnehmen, daher müssen sie die Fettsäuren selbst synthetisieren. In allen höheren Pflanzen findet die Lipogenese ausschließlich in Plastiden statt (*Bresinsky et al. 2008*). In den meisten Fällen werden die Fettsäuren in den Chloroplasten photosynthetisch aktiver Pflanzenteile synthetisiert (*Bresinsky et al. 2008*). Sie können aber auch in den Chromoplasten, den Leukoplasten oder in den Proplastiden von Speicherzellgewebe gebildet werden (*Bresinsky et al. 2008*). Grundbaustein für die Synthese der Fettsäuren ist Acetyl-CoA, an das wiederholt C2-Einheiten angehängt werden. Spender dieser C2-Einheiten ist Malonyl-CoA, welches zuvor ebenfalls aus Acetyl-CoA gebildet wurde (*Odenbach 1997*). Diese wiederholte Elongation des Acetyl-CoAs endet sobald Fettsäure mit 16-18 Kohlenstoffatomen entstanden sind (*Odenbach 1997*). Die genauen Abläufe der Fettsäuresynthese sind in *Abbildung 1* gezeigt.

Acetyl-CoA wird entweder aus Acetat oder aus Pyruvat gebildet (*Heldt & Heldt 2008*). Pyruvat stammt aus dem Zellplasma, in dem es als Endprodukt der Glykolyse entsteht. Die Herkunft des Acetats ist indes noch unklar (*Heldt & Heldt 2008*). Innerhalb der Plastiden wird das Acetat von der Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgebaut (*Bresinsky et al. 2008*). Pyruvat hingegen wird durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetat oxidiert (*Heldt & Heldt 2008*). Zum größten Teil ist Acetat das Edukt der Acetyl-CoA-Bildung. Durch die Addition eines Kohlenstoffdioxidmoleküls an ein Acetyl-CoA-Molekül, katalysiert durch die Acetyl-CoA-Carboxylase, entsteht Malonyl-CoA. Alle weiteren Reaktionen zur Bildung der Fettsäuren mit maximal 18 Kohlenstoffatomen werden von Enzymen des Fettsäure-Synthetase-Komplexes katalysiert (*Bresinsky et al. 2008*). Dieser Komplex besteht aus 6 Enzymen und einem leicht sauren Protein, dem sogenannten Acyl-Carrier-Protein (im weiteren ACP genannt) (*Odenbach 1997 und Taiz & Zeiger 2000*). Die unterschiedlich langen Acylreste, welche vor Beginn der Reaktionskette und während dieser auftreten, sind über eine Thioesterbindung mit dem Cystein des ACP verbunden (*Odenbach 1997*). Das ACP gleicht in seinem Aufbau dem des Coenzym A (*Heldt & Heldt 2008*). Das ACP befindet sich im Zentrum des Enzymkomplexes und hat den Acyl-Rest an einer kurzen Aminosäurekette gebunden, dem Pantethein, um ihn so von einem Enzym zum nächsten weiterzugeben (*Heldt & Heldt 2008*). Alle mit dem ACP verbundenen Fettsäurereste werden als Acyl-ACPs bezeichnet (*Taiz & Zeiger 2000*).

In diesem Fettsäure-Synthetase-Komplex findet der Elongationszyklus des Startmoleküls Malonyl-CoA statt.

Im ersten Schritt des Zyklus, katalysiert durch β -Ketoacyl-Synthetase, wird Acetyl-ACP mit dem Malonyl-ACP verbunden, wobei ein Kohlenstoffdioxidmolekül frei wird und Acetoacetyl-ACP entsteht. Acetoacetyl-ACP wird in drei Schritten unter Beteiligung von drei Enzymen zu Butyryl-ACP umgebaut. Dabei wird die Ketogruppe am dritten Kohlenstoffatom reduziert, wobei NADPH als Reduktionsmittel fungiert (Odenbach 1997). Nach dem Abschluss des ersten Zyklus reagiert das Butyryl-ACP mit einem weiteren Molekül Malonyl-ACP. Dieser Kreislauf setzt sich weiter fort, bis Acyl-Ketten mit 16 bis maximal 18 Kohlenstoffatomen also Palmitoyl-ACP oder Stearoyl-ACP entstanden sind (Bresinsky et al. 2008). Durch eine Thioesterase werden die beiden Hauptprodukte des Zyklus zu ihren Salzen hydrolysiert und somit vom ACP getrennt. Größere Mengen an freien Fettsäuren treten hierbei jedoch nicht auf, da die Hydrolyse der Acylreste erst unmittelbar vor dem Durchdringen der Plastidenmembran erfolgt und die freien Fettsäuren direkt nach dem Passieren der Hüllmembran von einer Acyl-CoA-Synthetase erneut mit dem Coenzym A verknüpft werden (Bresinsky et al. 2008 und Odenbach 1997).

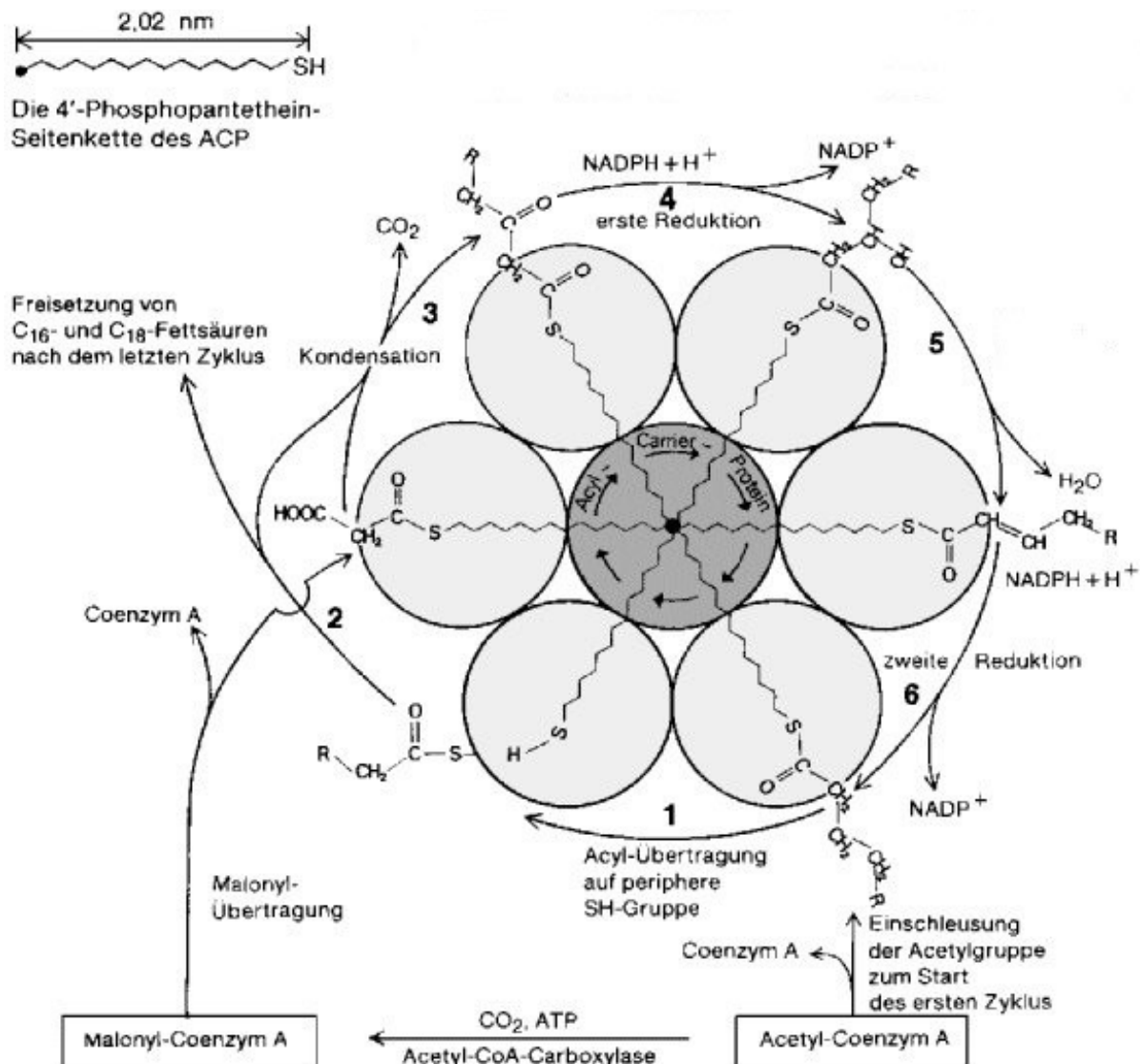


Abbildung 1: Fettsäuresynthese (verändert nach Sauermost 1994)

Da es während des gesamten Zyklus zu keiner Desaturierung kommt, entstehen in diesem Kreislauf ausschließlich gesättigte Fettsäuren. Für die Pflanzen sind ungesättigte Fettsäuren jedoch von großer Wichtigkeit, da sie beispielsweise häufig zum Aufbau der Membranlipide verwendet werden (Odenbach 1997). Das heißt, dass einige der in der plastidären Lipogenese entstandenen Fettsäuren nachträglich desaturiert werden müssen, um den Bedarf an ungesättigten Fettsäuren abzudecken. Die Mehrzahl der Desaturasen liegen als Membranproteine vor, so sind sie beispielsweise in der Membran des endoplasmatischen Reticulums zu finden (Heldt & Heldt 2008). Daraus folgt, dass der Großteil der ungesättigten Fettsäuren erst außerhalb der Plastiden gebildet wird. Eine Ausnahme bildet die Ölsäure, welche durch Desaturierung von Stearoyl-ACP bereits im Plastidenstroma gebildet wird (Odenbach 1997). Mit Hilfe der im Stroma befindlichen $\Delta 9$ -Stearoyl-ACP-Desaturase wird dem Stearoyl-Rest am neunten Kohlenstoffatom, durch Reduzierung von Sauerstoff eine Doppelbindung eingefügt (Lindqvist et al. 1996 und Heldt & Heldt 2008). Durch die hohe Aktivität der $\Delta 9$ -Stearoyl-ACP-Desaturase wird nahezu das gesamte gebildete Stearoyl-ACP zu Oleoyl-ACP umgesetzt (Heldt & Heldt 2008). Die Hauptprodukte der Fettsäuresynthese sind demnach Oleoyl-ACP und Palmitoyl-ACP und nur in geringem Maße Stearoyl-ACP.

Fettsäuren, welche mehr als 18 Kohlenstoffatome besitzen, werden nicht mehr in den Plastiden gebildet, sondern auf der cytosolischen Seite der Membran des Endoplasmatischen Retikulum sowie des Golgi-Apparats synthetisiert (Ohlrogge & Browse 1997). Die Edukte dieser Synthese sind die bei der Neusynthese der Fettsäuren entstandenen Hauptprodukte Oleoyl-CoA, Palmitoyl-CoA und Stearoyl-CoA. Die Kettenverlängerung der C18-

beziehungsweise C16-Fettsäuren werden von Elongasen katalysiert. Diese sind kettenlängenspezifisch. So gibt es also für jedes Lipogenese-Endprodukt eine eigene Elongase (Odenbach 1997). Alle diese Elongasen sind β -Ketoacyl-CoA-Synthetasen (Fehling & Mukherjee 1991). Die Elongation erfolgt, wie auch bei der Neusynthese der Fettsäure, über C2-Stufen (Heldt & Heldt 2008). Die im Raps befindliche Erucasäure wird durch die Elongation der einfach ungesättigten Ölsäure gebildet. Im ersten Schritt wird das Oleoyl-CoA durch die Oleoyl-CoA-Elongase zu Eicosoyl-CoA verlängert (siehe Abbildung 2).

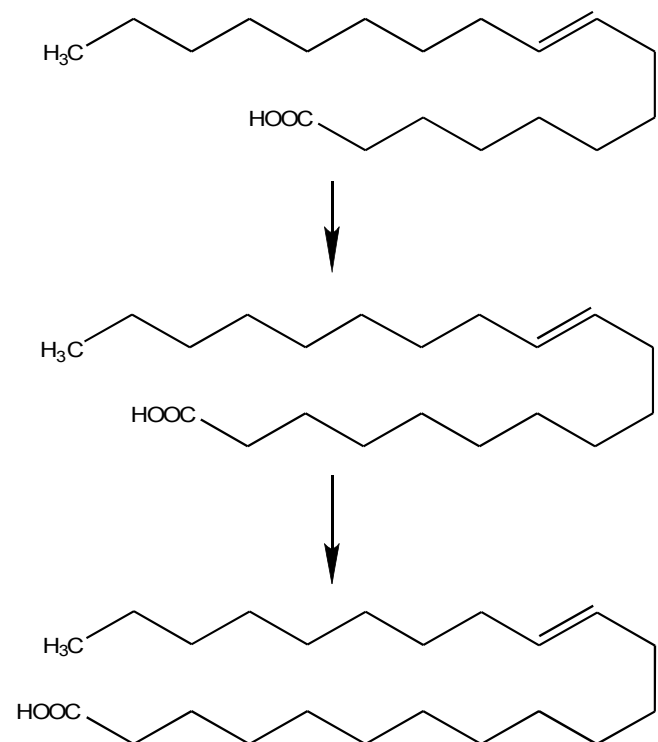


Abbildung 2: Kettenverlängerung der Ölsäure über Eicosensäure zu Erucasäure

Anschließend folgt der zweite Elongationsschritt, katalysiert durch die Eicosoyl-CoA-Elongase, zur Erucoyl-CoA (Odenbach 1997). Beide Verlängerungen ähneln sich in ihrer Reaktion der Fettsäuresynthese der Fettsäuren bis 18 Kohlenstoffatomen in den Plastiden (Fehling & Mukherjee 1991). Jedoch wird bei der Elongation des Oleoyl-CoA nicht Malonyl-ACP, sondern Malonyl-CoA als C2-Spender verwendet (Odenbach 1997).

Erucasäure dient der Pflanze im Allgemeinen zum Aufbau der Lipiddoppelschicht der Zellmembran sowie der Hüllmembranen der Zellorganellen (Bresinsky et al. 2008). Des Weiteren spielen die Fettsäuren als Speicherstoff eine große Rolle. Im Samen von *Brassica napus* L. tritt beispielsweise Erucasäure hauptsächlich als Speicherlipid auf (Schopfer et al. 1999). In den ursprünglichen Formen des Rapses stellt sie mit bis zu 50% den größten Anteil der Fettsäuren in den Triglyceriden der Samen dar (Röbbelen 1973).

Die Bildung der Triglyceride kann auf vier verschiedene Wege stattfinden, wobei hier ausschließlich der Weg der Acylierung des stetigen Ausgangssubstrat Glycerin-3-phosphat angesprochen wird (Heldt & Heldt 2008). Hierbei wird das Glycerin-3-Phosphat durch Acyltransferasen mit beliebigen Acyl-CoAs acyliert (Lühs & Friedt 1994). Dabei können auf den äußeren Positionen des Glycerin-3-Phosphat alle vorhandenen Acyl-CoAs aus dem cytosolischen Pool angehängt werden, während auf der mittleren Position meist ein C18-Rest eingebaut wird (Lühs & Friedt 1994).

In ihrer Funktion als Speicherlipide, dienen die Triglyceride nicht nur der Energiegewinnung. Für die Keimung von Samen werden vor allem Kohlenhydrate benötigt, um die anfänglich noch heterotrophe Ernährung des Keimlings zu ermöglichen und somit das Wachstum zu gewährleisten (Bresinsky et al. 2008). In fettspeichernden Samen reicht die Konzentration an Kohlenhydraten aber nicht aus, um die für den Aufbau nötige Energie bereitzustellen. Deshalb müssen die Lipide schrittweise in Kohlenhydrate umgewandelt werden. Dazu werden die vorhandenen Speicherproteine in ihre Aminosäuren zerlegt um mit Hilfe dieser Aminosäuren fettspaltende Enzyme zu synthetisieren (Heldt & Heldt 2008). Aus den Fetten werden durch verschiedenen Reaktionen Acetyl-CoA-Moleküle gebildet, mit Hilfe derer über den Glyoxalatcyclus Hexosen gebildet werden können (Heldt & Heldt 2008).

2.2 Vererbung der Erucasäure und ihre Ausprägung

Ein Großteil von Merkmalen in der Natur, wie beispielsweise die menschliche Hautfarbe, wird nicht nur durch ein Gen vererbt. Die Ausprägung dieser Merkmale wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Gene ermöglicht. Die Erucasäure in *Brassica napus* L. stellt eines dieser polygenetischen Merkmale dar. Der Gehalt der Erucasäure in den Samen des Raps wird über zwei additiv wirkende Gene bestimmt, welche keine Dominanz zeigen (Harvey & Downey 1964).

Diese liegen auf den Loci E1 und E2 (*Han et al. 2001*). Nach *Kryzanski und Downey (1969)* sind insgesamt 5 verschiedene Allele mit den Bezeichnungen e, E^a, E^b, E^c und E^d für den Gehalt an Erucasäure verantwortlich. Die Allele bewirken jeweils einen unterschiedlichen Erucasäuregehalt, nämlich <1%(e), 3,5% (E^d), 10% (E^a), 15% (E^b) und 30% (E^c). Je nach der Konstellation dieser Allele beträgt der Gehalt an Erucasäure zwischen ~1% bis maximal 60 % (*Anand & Downey 1981*).

Die Allele kontrollieren den Erucasäuregehalt, indem sie maßgeblich an der Ausprägung der β -Ketoacyl-CoA-Synthetase beteiligt sind, welche für die Elongation zu Erucasäure verantwortlich ist (*Han et al. 2001*). Nach *Downey und Harvey (1963)* wird der Gehalt an Erucasäure direkt vom Embryo bestimmt. Das heißt eine Pflanze, die aus einem erucasäurefreien Samen wuchs, kann erucasäurehaltige Samen bilden, wenn sie von einer aus einem erucasäurehaltigen Samen gezogenen Pflanze bestäubt und befruchtet wurde. Hierbei kann aufgrund der vorliegenden Allele jedoch kein stark erucasäurehaltiger Samen entstehen, denn die erucasäurefreie Pflanze muss nach *Kryzanski und Downey (1969)* ein Genotyp mit den Allelen eeee haben, um einen Erucasäuregehalt <1% zu enthalten. Sie ist demnach für beide Gene homozygot.

Wird eine solches Individuum durch einer stark erucasäurehaltige Pflanze befruchtet können demnach nur mäßig erucasäurehaltige Samen gebildet werden. Hierbei müssen die entstehenden Samen aber nicht homogen in ihrem Erucasäuregehalt sein, da der Genotyp der erucasäurehaltige Pflanze nicht klar festlegbar ist. Werden jedoch zwei doppelt homozygote Pflanzen gekreuzt, kommt es nach der 1. Mendelschen Regeln zu einem homogen oder auch uniformen Gehalt an Erucasäure.

Trotz der variablen Anordnung der Allele gibt es keine Rapspflanze in der Natur, die einen Erucasäuregehalt von mehr als 65% aufweist (*Lühs & Friedt 1994*). Es sind aber durchaus Allelkonstellationen möglich, die einen Erucasäuregehalt von mehr als 65 % bewirken würden. Jedoch besteht diese natürliche Grenze des Erucasäuregehalts auf der Grundlage ihrer Verwendung in den Samen. Bei der Triglyceridbildung werden die Fettsäuren durch Acyltransferasen auf das Glycerin-3-Phosphat übertragen (*Lühs & Friedt 1994*). Da in der mittleren Position über diesen Triglyceridsyntheseweg fast ausschließlich C18-Reste eingebaut werden, können lediglich die äußeren Positionen von Erucasäure besetzt sein, was in etwa einem Gehalt von 60% entspricht (*Lühs & Friedt 1994 und Heldt & Heldt 2008*). Zu den von *Lühs & Friedt (1994)* beschrieben 65% kommen weitere 5%, die durch andere Bildungswege der Triglyceride zustande kommen.

2.3. Die Geschichte der Züchtung von *Brassica napus* L. in Bezug auf den Gehalt an Erucasäure und die Bedeutung dieser für den Menschen

Bis vor 50 Jahren spielte Raps in der europäischen Lebensmittelindustrie nur eine untergeordnete Rolle (*Röbbelen 1973*). Der hohe Gehalt an Erucasäure und Glycosinolaten machte ihn für die Lebensmittelindustrie sowie für die Viehzucht nahezu uninteressant (*Röbbelen 1973*). Während der Kriegs- und Nachkriegsjahre war Rapsöl das einzig verfügbare Pflanzenöl (*Röbbelen 1973*). Aufgrund seines hohen Erucasäuregehalts schmeckte es aber sehr bitter und kratzig, weshalb es in der Bevölkerung sehr unbeliebt war (*Röbbelen 1973*). Darüber hinaus gilt Erucasäure als gesundheitsschädlich, da bei Experimenten mit Ratten deutliche histopathologische Veränderungen am Herzmuskel sowie an der Leber, an der Niere und an der Skelettmuskulatur festgestellt wurden (*Abdellatif & Vles 1973*). Bei diesen Experimenten bekamen drei Gruppen von Ratten entweder erucasäurehaltiges Rapsöl, erucasäurefreies Rapsöl oder Sonnenblumenöl verabreicht. Nur bei den Ratten, welche das erucasäurehaltige Rapsöl einnahmen, traten histopathologische Veränderungen auf (*Abdellatif & Vles 1973*).

Nach dem *Downey 1963* in der deutschen Sommerrapssorte 'Liho' eine Pflanze ohne Erucasäure in den Samen fand (*Stefansson et al. 1961*) veränderte sich die Anbausituation in Europa deutlich (*Röbbelen 1973*). Mit Hilfe dieser erucasäurefreien Pflanze wurde eine neue und erstmals erucasäurefreie Sorte gezüchtet. Diese hatte aber noch viele Nachteile. Die Ertragszahlen der neuen Sorte waren deutlich geringer als die der alten Sorten (*Röbbelen 1973*). Darüber hinaus war der Anbau der neuen Sorte schwierig, da im Umkreis der Felder auf denen die erucasäurefreie Sorte wächst, keine erucasäurehaltige Pflanze wachsen darf, da der Gehalt des Samens an Erucasäure nur durch den Genotyp des Samens selbst bestimmt wird (*Downey & Craig 1964*). Würde es auf einem Feld mit erucasäurefreien Sorten zur Fremdbefruchtung durch eine erucasäurehaltige Sorte kommen, so würden die Samen dieser Pflanzen erucasäurehaltig werden. Das wohl größte Problem bei der gefundenen erucasäurefreien Pflanze war, dass sie aus einer Sommerrapssorte stammte, in Deutschland aber überwiegend Winterraps angebaut wird. Deshalb mussten die Erbanlagen für Erucasäurefreiheit in deutschen Winterraps eingekreuzt werden (*Röbbelen 1973*).

Bei ersten Versuchen ergaben sich weitere Probleme. Der Ertrag dieser neuen Winterrapssorten war nochmals geringer ausgefallen als bei der herkömmlichen erucasäurehaltigen Sorte. Die Winterfestigkeit der neuen Sorten war ebenfalls geringer als die der ursprünglichen Sorte (*Röbbelen 1973*). Diese Probleme konnten jedoch in den nachfolgenden Jahren durch intensive Züchtungsarbeit behoben werden. Der Ertrag stieg sogar auf ein höheres Niveau als bei vergleichbaren erucasäurehaltigen Sorten (*Röbbelen 1973*).

Um dem Problem der Fremdbefruchtung und der einhergehenden Verunreinigung erucasäurefreier Pflanzen aus dem Weg zu gehen erfolgte 1974 eine totale Sortenumstellung zum erucasäurefreien Raps.

Durch die Eliminierung der Erucasäure aus dem Öl des Raps wird Rapsöl aus ernährungsphysiologischer Sicht als ein sehr hochwertiges Speiseöl angesehen (Odenbach 1997). Diesen Ruf verdankt es hauptsächlich seinem hohen Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure, sowie seinem niedrigen Gehalt an gesättigten Fettsäuren und dem hohen Anteil an essentiellen Fettsäure, wie zum Beispiel Linolensäure (Odenbach 1997) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Fettsäurezusammensetzung des Samenöls ausgewählter Pflanzen(Massenprozent bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt, nach den Angaben der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaften e.V.; absolute Zahlen der alten Rapsorte nach Röbbelen 1993)

	C 16:0 Palmitinsäure	C 18:0 Stearinsäure	C18:1 Ölsäure	C 18:2 Linolsäure	C 18:3 Linolensäure	C 20:1 Eicosensäure	C 22:1 Erucasäure
Leinöl	4-6	2-3	10-22	12-18	56-71	NN-0,6	NN
Olivenöl	7,5-20	0,5-5	55-83	3,5-21	NN-1	NN-0,4	NN-0,2
Sonnen- blumenöl	5-7,6	2,7-6,5	14-39,4	48,3-74	NN-0,3	NN-0,3	NN-0,3
Weizen- keimöl	13-20	NN-2	13-21	55-60	4-10	NN-0,2	NN-0,2
Rapsöl (neu)	2,5-7	0,8-3	51-70	15-30	5-14	0,1-4,3	NN-2
Rapsöl (alt)	3,8	1,1	11,2	13,7	8,1	9,6	52,3

Neben der ernährungsphysiologischen Bedeutung spielt Rapsöl auch in anderen technischen und wirtschaftlichen Bereichen eine wichtige Rolle. Allerdings ist in der Industrie aktuell jenes Rapsöl besonders gewünscht, welches den höchsten Erucasäuregehalt aufweist. Den für Erucasäure und ihre Derivate gab es allein in den Jahren 1987-1990 über 200 patentierte Anwendungen in den verschiedensten industriellen Bereichen (Lühs & Friedt 1994). Rapsöl wird vor allem als Schmieröl verwendet, wobei es allerdings als Motorenöl ungeeignet ist (Krist et al. 2008).

Des Weiteren wird es, bei der Stahlerzeugung, als Gleit- und Antiblockiermittel, als Rohstoff für Farben und in der Erzaufbereitung verwendet (Lühs & Friedt 1994 und Odenbach 1997).

Darüber hinaus gewinnt Rapsölmethylester als Biokraftstoff immer mehr an Bedeutung (Odenbach 1997), wobei hier auch auf 00-Sorten, also erucasäurefreie und glucosinolatarme Sorten, zurückgegriffen wird. Einer der größten Vorteile des Rapsöls als industrielles Allzweckmittel ist die vollständige biologische Abbaubarkeit, sodass das Ökosystem nicht belastet wird (Krist et al. 2008).

Aufgrund des erhöhten Bedarfs an erucasäurehaltigem Raps, welcher in direkter Konkurrenz zu vergangenen Züchtungsbemühungen steht, wird nun vermehrt auf einen hohen Erucasäuregehalt gezüchtet. Sogenannte HEAR (*high erucic acid rapeseed*)-Sorten sind allerdings bisher auf einen Anteil von maximal 60-65% Erucasäure beschränkt (Odenbach 1997). Der Grund ist, dass die für die Veresterung der Erucasäure mit dem Glycerin-3-Phosphat verantwortliche Acyltransferase Erucasäure nie in die mittlere Position einbaut (Odenbach 1997). An der C2 Position des Glycerin-3-Phosphats werden je nach Syntheseweg entweder Palmitinsäure oder ein C18-Acylrest unterschiedlichen Desaturierungsgrads eingebaut (Heldt & Heldt 2008). Genau dieses Problem versuchen die Züchter zu lösen, um Trierucin, ein Fett mit drei Erucasäureketten, zu bilden, damit der hohen Nachfrage der Industrie auch ein Angebot folgen kann (Lühs & Friedt 1994).

2.4 Papierchromatographie der Fettsäuren

Eine einheitliche Definition zur Chromatographie gibt es nicht. Vielfach wird Chromatographie als ein Begriff definiert, welcher verschiedene Methoden zusammenfasst, bei denen eine Stofftrennung erfolgt. Die Separierung erfolgt durch die Verteilung eines Stoffgemisches zwischen einer ruhenden (stationären) Phase und einer beweglichen (mobilen) Phase (Schwedt 1994 und Kaltenböck 2008). Allgemein werden die Chromatographiemethoden nach ihren Trennmechanismen in fünf Hauptgruppen unterschieden, von denen hier nur auf die Verteilungschromatographie eingegangen wird (Kaltenböck 2008). Bei dieser ist entscheidend, dass sich die beiden Phasen in ihrer Polarität deutlich unterscheiden, sodass sie kaum miteinander mischbar sind (Wollrab 1991). Die Trennung des zu untersuchenden Stoffes erfolgt durch die unterschiedliche Löslichkeit in den beiden vorliegenden Phasen (Schwedt 1994). Durch die Chromatographie lassen sich nur Stoffe trennen, welche sowohl in polaren als auch apolaren Lösungsmitteln begrenzt löslich sind. Löst man einen solchen Stoff in einem polaren Lösungsmittel und gibt apolare Flüssigkeit hinzu, in welcher der Stoff noch nicht enthalten ist, so gehen Moleküle des gelösten Stoffes in die apolare Phase über (Hais & Macek 1958 und Wollrab 1991). Je mehr Moleküle in die apolare Phase gelangen, desto stärker ist die gegenteilige Wanderung der Moleküle aus der apolaren Phase zurück in die polare Phase (Wollrab 1991).

In jenem Zeitpunkt, in dem sich das Verhältnis der Konzentrationen des gelösten Stoffes in beiden Phasen nicht mehr ändert hat sich ein Verteilungsgleichgewicht eingestellt (*Hais & Macek 1958*).

Dieses konstante Verhältnis wird als Verteilungskoeffizient des betrachteten Stoffes bezeichnet (*Schwedt 1994, Wollrab 1991 und Hais & Macek 1958*). Sind die Verteilungskoeffizienten für die Stoffe eines Stoffgemisches verschieden, so lässt sich dieses Stoffgemisch mit Hilfe der Verteilungschromatographie sicher trennen (*Wollrab 1991*).

Die Papierchromatographie stellt eine Unterart der Verteilungschromatographie dar. Die zwei typischen Phasen sind hierbei nicht auf den ersten Blick zu erkennen. Nach *Wollrab (1991)* befindet sich nämlich in scheinbar trockenem Papier stets ein wenig Wasser. Mit dieser Annahme wird klar, dass bei der Papierchromatographie nicht das Papier selbst, sondern viel mehr der Papier-Wasser-Komplex die stationäre Phase darstellt (*Schwedt 1994*). Die mobile Phase unterscheidet sich je nach zu trennendem Stoffgemisch. Sie ist dabei stets eine apolare Lösung beziehungsweise ein Lösungsgemisch, so dass bei der Papierchromatographie beide Phasen flüssig sind (*Schwedt 1994*).

Das Papier dient im Wesentlichen dazu, die mobile Phase mit dem zu untersuchenden Stoffgemisch mit Hilfe der Kapillarkräfte aufsteigen zu lassen, sodass eine Verteilung der Inhaltsstoffe entlang des Papiers stattfindet. Während dieser Wanderung der mobilen Phase kommt es zum oben beschriebenen Phasenübergang der Stoffmoleküle zwischen dem Wasser und der mobilen Phase (*Wollrab 1991*). Die Stoffe des Stoffgemisches halten sich je nach Polarität unterschiedlich lang in einer der beiden Phasen auf, wobei sie nie vollständig nur in einer der beiden Phasen vorhanden sind. Befinden sie sich in der stationären Phase so können sie nicht mit der mobilen Phase aufsteigen. Daraus ergibt sich, dass die Stoffe nur dann entlang des Papiers transportiert werden, wenn sie sich in der mobilen Phase befinden (*Wollrab 1991*). Mit zunehmender Steighöhe verringert sich die Masse der mobilen Phase (*Cramer 1958*). Polare Stoffe wandern aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in der stationären Phase deutlich langsamer als apolare Stoffe, so dass ein Gemisch aus Stoffen mit verschiedener Polarität auf dem Papier getrennt werden kann (*Wollrab 1991*).

Bei der Trennung von langkettigen Fettsäuren funktioniert das System, in dem Wasser die polare Phase repräsentiert, nicht mehr, da die höheren Fettsäuren fast unlöslich in Wasser sind (*Hais & Macek 1958*). Deshalb muss bei der Trennung von Gemischen langkettiger Fettsäuren auf die Methode der Umkehrphasen-Chromatographie zurückgegriffen werden. Bei dieser Methode wird das Chromatographiepapier mit Hilfe eines stark apolaren Imprägnierungsmittels hydrophobiert (*Wollrab 1991*). Hierfür eignen sich besonders Undecan, Dodecan (*Kaufmann & Nitsch 1954*) und Paraffinöl (*Schwedt 1994*). Für die Imprägnierung des Papiers muss das Imprägnierungsmittel mit Hilfe eines stark flüchtigen Lösungsmittels gelöst und das Papier in dieser Lösung getränkt werden (*Wollrab 1991*).

Nach dem Abdampfen des flüchtigen Lösungsmittels befindet sich das Imprägnierungsmittel im Papier. Der Imprägnierungsgrad, also die Menge an Imprägnierflüssigkeit in Gramm pro 1 g Papier, hat großen Einfluss auf die Trennung der Fettsäuren (*Kaufmann & Mohr 1958*).

Durch die Umkehrung der Phasen kommt es zum Wechsel der Laufstrecken polarer Stoffe. Polare Stoffe wandern beim Umkehrphasensystem anders als bei der üblichen Verteilungschromatographie, deutlich weiter als apolare Stoffe.

Die Polarität bei Fettsäuren wird im Wesentlichen durch die Anzahl ihrer Kohlenstoffatome sowie durch die Höhe ihres Desaturierungsgrads bestimmt. Je größer die Anzahl der Kohlenstoffatome desto geringer ist der Einfluss der polaren Säuregruppe (Carboxygruppe) und desto apolarer ist die gesamte Fettsäure (*Vollhardt & Shore 2012*). Für den Desaturierungsgrad gilt die gegenteilige Beziehung, das heißt je höher der Desaturierungsgrad, desto polarer ist die Fettsäure (*Vollhardt & Shore 2012*).

Die in Pflanzensamen üblicherweise anzutreffenden Fettsäuren sind in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 2: Samentypische Fettsäuren und die Anzahl ihrer Kohlenstoffatome und Doppelbindungen nach den Angaben der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaften e.V.

Trivialname der Fettsäuren	Anzahl Doppelbindungen	Anzahl Kohlenstoffatome
Palmitinsäure	0	16
Stearinsäure	0	18
Ölsäure	1	18
Linolsäure	2	18
Linolensäure	3	18
Eicosensäure	1	20
Erucasäure	1	21

Für die Extraktion der Fettsäuren aus den Samen ist es nötig, die Samen aufzubrechen und die Fette mit Hilfe eines apolaren Lösungsmittels zu extrahieren, um dieses anschließend durch Hydrolyse zu trennen, sodass die Fettsäuren frei vom Glycerin vorliegen.

3. Material und Methoden

3.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial

Alle verwendeten Samen (siehe *Tabelle 3*) von *Brassica napus* L. wurden freundlicherweise von der *Norddeutschen Pflanzenzucht (Hohenlieth)* zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Leinsamen (siehe *Tabelle 3*) stammen aus dem DM-Drogeriemarkt.

Tabelle 3: Verwendete Pflanzensamen

Art		Sorte/ Zuchtstamm	Bemerkung
Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name		
<i>Brassica napus</i> L.	Winterraps	Avatar	erucasäurefrei (00)
<i>Brassica napus</i> L.	Winterraps	SLM 1207	erucasäurehaltig (0+)
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Lein / Flachs	-	erucasäurefrei

Die verwendeten Öle stammen aus dem Supermarkt und sind in *Tabelle 4* zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Pflanzenöle

Öl	Art		Bemerkung
	Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name	
<i>Rapsöl</i>	<i>Brassica napus</i> L.	Winterraps	erucasäurefrei
<i>Leinöl</i>	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Lein	erucasäurefrei

3.2 Arbeitsmaterialien und Chemikalien

Da in der Arbeit immer wieder mit stark flüchtigen Chemikalien wie zum Beispiel Aceton oder Eisessig gearbeitet wird, sollten alle Arbeiten unter einem Abzug durchgeführt werden. Darüber hinaus sind keine weiteren Geräte notwendig. Das für die Chromatographie nötige Papier bekamen wir von der Firma Hahnemühle Fineart GmbH freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um das Chromatographiepapier 2043b. Für die Imprägnierung der Chromatographiepapiere werden zwei Glasplatten (25x20 cm) benutzt. Des Weiteren wird für die Entwicklung der Chromatogramme je Papier ein mindestens 29 cm hoher Standzylinder benötigt. Darüber hinaus werden einige im Labor übliche Glasgeräte verwendet. Für die Befestigung der Chromatographiepapiere werden Nadel, Faden sowie Klebestreifen benutzt.

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sowie ihre Herkunft sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herkunft / Firma
Aceton	Hellweg
Eisessig (Essigsäure)	Roth
Ethanol (96%)	Roth
Isooctan (2,2,4-Triphenylpentan)	Sigma Aldrich
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma Aldrich
Kaliumhydroxid	Merck
Kupferacetat	Roth
Methanol	Baker
Natriumacetat	Roth
Paraffinöl	OTC Pharma
Propanol	Roth
Rubeanwasserstoff	Roth
Waschbenzin	dm-Drogerie

3.3 Papierchromatographische Trennung von Fettsäuren

Für die Trennung, Unterscheidung und Sichtbarmachung der Fettsäuren in den Samen sind insgesamt fünf Teilschritte nötig. Diese sind angelehnt an die Vorgaben von *Thies (1971)* teilweise modifiziert. Im ersten Schritt werden die Fette aus den Samen extrahiert. Danach werden die Fette mit Hilfe der verwendeten Kalilauge verseift, um die Fettsäuren vom Glycerin zu trennen. Die basische Hydrolyse hat hierbei gegenüber der sauren Hydrolyse den Vorteil, das sie irreversibel ist. Die Proben werden anschließend auf zuvor mit Paraffinöl imprägniertes Chromatographiepapier aufgetragen und in Standzylinder gehängt. In den Standzylindern erfolgt die Entwicklung der Papiere mit Hilfe des essigsäuren Aceton-Wasser-Gemischs (*siehe Tabelle 6 Lösung 2*). Danach werden die Papiere getrocknet und in eine Kupferacetat-Lösung (*siehe Tabelle 6 Lösung 4*) gelegt. Die enthaltenen Kupferionen verdrängen die Kaliumionen, sodass die Kupferseifen der enthaltenen Fettsäuren entstehen. Vor der endgültigen Sichtbarmachung werden die Chromatogramme unter warmem Wasser gewaschen und im Anschluss erneut getrocknet. Erst nachdem all diese Schritte durchgeführt wurden, werden die Chromatogramme mit dem Färbereagenz besprüht, welches mit den Kupferionen einen grünen Komplex bildet. Die so sichtbar gemachten Flecken werden den in den Samen enthaltenen Fettsäuren zugeordnet, indem die einzelnen Proben miteinander verglichen werden.

Die in der Arbeit verwendeten Lösungen für die einzelnen Schritte der Extraktion, der Trennung sowie der Färbung sind in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen

Lösungen	Inhaltsstoffe
1 Extraktionslösung	9 mL Isooctan 1 mL Isopropanol
2 Extraktionslösung	300 µg Kaliumhydroxid gelöst in: 1,5 mL Aqua dest. 3 mL Methanol 7,5 mL Propanol
3 Laufmittelgemisch	Aceton : Aqua dest. : Eisessig 70 : 30 : 1
4 Färbelösung	40 µg Kupferacetat und 100 µg Natriumacetat gelöst in 300 mL Aqua dest.
5 Färbereagenz	1,2 g Rubeanwasserstoff 8,8 g Ethanol (96%)
6 Imprägnierlösung	15 mL Paraffinöl 85 mL Waschbenzin

3.3.1 Extraktion der Fettsäuren aus Samen und Pflanzenöl

Der erste Schritt ist die Extraktion der Fettsäuren aus den Samen des Raps und des Öls. Dazu wird ein einzelner Samen in ein 1 mL- Reaktionsgefäß überführt und mittels eines kleinen Pistills zerstoßen. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 100 µL eines Isooctan-Isopropanol-Gemischs (*Tabelle 6 Lösung 1*) mit einer Mikropipette. Nachdem die Lösung vollständig verdampft ist, werden 50 µL eines alkalischen Methanol-Propanol-Gemischs hinzugegeben (*Tabelle 6 Lösung 2*). Für die Extraktion aus dem Öl wird je 1 µL des jeweiligen Öls in ein Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Mikropipette übertragen. Den Ölproben wird keine Isooctan-Isopropanol-Lösung hinzugegeben, jedoch ebenso wie den Samenproben 50 µL des Methanol-Propanol-Gemischs. Die weitere Schritte erfolgen bei den Samen und dem Öl in gleicher Weise. Nach 60 min können die Proben auf die Chromatographiepapiere aufgetragen werden.

3.3.2 Vorbereitung des Chromatographiepapiers

Die optimale Form der Chromatographiepapiere wurde in einer Testreihe in Anlehnung an *Matthias (1954)* ermittelt (siehe Kapitel 3.5). *Abbildung 3* zeigt den optimalen Zuschnitt der Papiere. Aus einem A4 Bogen werden 20 cm lange und 4 cm breite Streifen ausgeschnitten. Aus den Streifen werden 1 cm breite Zungen ausgeschnitten, welche 2,5 cm lang sind. Die Zunge wird anschließend bis zu einer Höhe des Papiers von 4 cm auf die Breite des Papiers verbreitert. Die zwei entstehenden Zungen sind 1 cm voneinander entfernt.

Während der gesamten Behandlung der Chromatographiepapiere ist es wichtig, die Papiere nicht mit fremden Fett in Kontakt zu bringen. Um dies zu gewährleisten, sollten die Papiere ausschließlich mit einer Pinzette transportiert und bei Wartezeiten auf einer mit Ethanol gereinigten Glasplatte abgelegt werden.

Nach dem Zuschneiden werden die Papiere auf 2 Stellen nach dem Komma genau gewogen und das Gewicht wird notiert. In Vorbereitung auf die anschließende Imprägnierung werden zwei große Glasplatten (circa 25 cm x 20 cm) gereinigt und eine davon mit Filterpapier belegt.

3.3.3 Imprägnierung der Chromatographiepapiere

Für die Imprägnierung werden die Chromatographiepapiere für 5 Sekunden in die Imprägnierflüssigkeit (*Tabelle 6 Lösung 6*) gelegt. Direkt nach der Entnahme aus der Imprägnierlösung werden die Chromatographiepapiere mit Filterpapier zwischen den Händen kräftig abgepresst. Anschließend werden sie auf die vorbereitete Glasplatte gelegt und mit einer weiteren Schicht Filterpapier sowie der übrigen Glasplatte abgedeckt und mit circa 4 kg belastet. Nach 30 Minuten werden die Papiere aus der Abpressvorrichtung entnommen und erneut gewogen. Aus den Gewichten der Papiere, vor und nach der Imprägnierung, lässt sich der Imprägnierungsgrad ermitteln. Die Menge des aufgenommenen Imprägnierungsmittels wird aus der Differenz der Gewichte vor und nach der Imprägnierung berechnet.

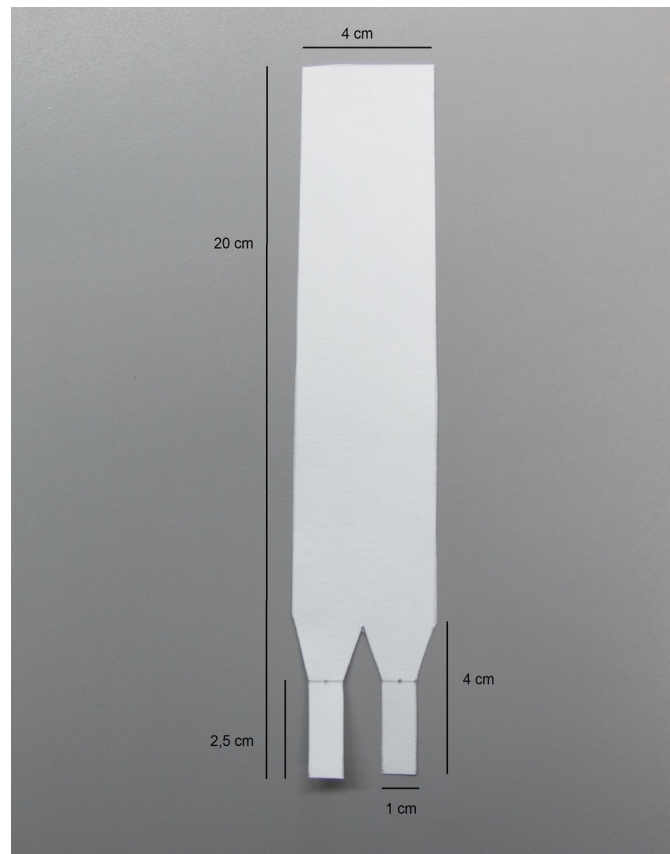


Abbildung 3: Zugeschnittenes Chromatographiepapier mit Maßangaben

Aus dem Quotienten des Gewichts des aufgenommenen Imprägnierungsmittels und des Gewichts des nicht imprägnierten Papiers ergibt sich der Imprägnierungsgrad in Gramm Imprägnierungsmittel je Gramm Papier (*Kaufmann & Mohr 1958*).

3.3.4 Trennung der Fettsäuren

Vor der Entwicklung der Papiere sollte der Standzylinder bereits mit ca. 20 mL des Laufmittels befüllt und mit einer Petrischale verschlossen werden, damit sich das Innere des Standzylinder mit dem Laufmitteldampf sättigt.

Für die Auftragung der Proben auf die Chromatographiepapiere werden aus den Probenbehältern je 4 μL mit Hilfe einer Mikropipette entnommen und auf den durch einen Bleistiftpunkt markierten Startpunkt (siehe *Abbildung 3*) aufpipettiert. Da jedes der Chromatographiepapiere zwei Startpunkte besitzt, können gleichzeitig eine erucasäurehaltige und eine erucasäurefreie Probe aufgetragen werden. Dadurch ist nach der Färbung der Unterschied zwischen beiden Proben direkt auf einem Papier sichtbar. Das Lösungsmittel der Fettsäure, die alkalische Methanol-Propanol-Lösung (siehe Tabelle 6 Lösung 1), muss verdampfen, bevor mit der Entwicklung des Chromatogramms begonnen werden kann.

Für die Entwicklung der Chromatographiepapiere werden diese in einen 29 cm hohen Standzylinder gehängt. Dazu muss nach der Auftragung der Probe ein jeweils einzelner 30 cm langer dünner Faden in die beiden oberen Ecken der Papiere gefädelt werden, welcher als Aufhängung im Standzylinder dient (siehe *Abbildung 4*).



Abbildung 4:
Chromatographie-
papier mit
Fadenaufhängung

Nach 10 Minuten kann mit der Entwicklung der Chromatogramme begonnen werden. Dafür werden sie an den Fäden in die Standzylinder gehängt sodass die Fäden jeweils rechts und links über den Rand der Standzylinder hängen und die Papiere nicht tiefer als 2 cm ins Laufmittel eintauchen. Die Fäden werden mit Hilfe von Klebestreifen an der äußeren Standzylinderwand befestigt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Chromatographiepapiere senkrecht im Standzylinder hängen, da es sonst zum seitlichen Auslaufen der Proben kommt. Sobald die Laufmittelfront einen halben Zentimeter von der oberen Papierkante entfernt ist, muss das Chromatogramm aus dem Standzylinder entnommen werden. Danach muss es entweder über Nacht im Abzug trocknen oder bei 80°C für eine halbe Stunde im Trockenschrank getrocknet werden.

3.4 Färbung

3.4.1 Nachbehandlung der Chromatogramme

Nachdem die Papiere getrocknet sind und die Essigsäure verdampft ist, werden die Chromatographiepapiere für 45 Minuten in eine Wanne, gefüllt mit einer leicht sauren Kupferacetat-Lösung (*siehe Tabelle 6 Lösung 4*), gelegt. Nach dem Bad im Kupferacetat werden die Papiere für 60 Minuten mit warmem Leitungswasser gewaschen. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Papiere intensiv umspült werden.

Hierfür können die Papiere in eine große Glasvase oder einen breiten Standzylinder gehängt und mit Hilfe eines dünnen Schlauchs mit Leitungswasser von unten über die Papiere gespült werden. Die Papiere dürfen sich dabei nicht berühren. Zum anschließenden Trocknen der Papiere können diese entweder über Nacht in den Abzug gehängt oder in einen Trockenschrank beziehungsweise Ofen bei 80°C für 45 Minuten getrocknet werden. Wichtig ist in jedem Fall, dass die Papiere vollständig getrocknet sind.

3.4.2 Färbung

Für die Färbung sollte im Abzug ein kleiner Bereich mit Zeitungspapier ausgelegt werden. Mit einer Pinzette wird jedes Chromatographiepapier einzeln gefasst, um es anschließend mit der Rubeanwasserstofflösung (*siehe Tabelle 6 Lösung 5*) zu besprühen. Wichtig ist hierbei, eine möglichst feine Verteilung des Rubeanwasserstoffs zu erlangen. Nach wenigen Minuten sollten grüne Flecken sichtbar sein. Ist dies nicht der Fall, sollte die Behandlung mit dem Sprühreagenz wiederholt werden.

3.5 Testreihe zur Optimierung der Form der Chromatographiepapier

Während der gesamten Untersuchung wurde das Chromatographiepapier der Firma Hahnemühle verwendet. Dieses liegt in großen DIN A4 Bögen vor und wird je nach Aufbauvariante unterschiedlich zugeschnitten. Zu Beginn der Untersuchungen wurde das Chromatographiepapier nach der in *Abbildung 5 ganz links* dargestellten Form verwendet (im Folgenden Variante 1 genannt).

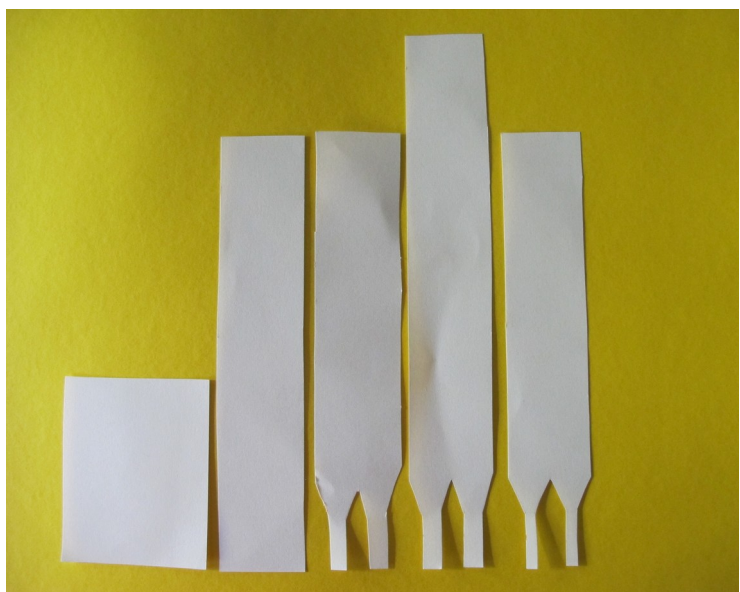


Abbildung 5: Verwendete Papiervarianten

Später wurden die Papiere auf 20 cm verlängert und auf eine Breite von 4 cm gekürzt (im Folgenden Variante 2 genannt) (*siehe Abbildung 5 zweites Papier von links*). Diese Form stellt die ungeschnittene Variante des im Methodenteil beschriebenen Chromatographiepapiers dar. Die nach *Matthias (1954)* veränderten Papiere, welche in der Methode beschrieben wurden, werden im Folgenden Variante 3 genannt (*siehe Abbildung 5 Mitte*). Einmalig wurden die Papiere auf 25 cm verlängert. Diese werden im Folgenden Variante 4 genannt (*siehe Abbildung 5 zweites Papier von rechts*). Zusätzlich wurden die Zungen nochmals stark verschmälert. Die Papiere dieser Art werden im folgenden Variante 5 genannt. Die Zungen weisen eine Breite von 0,5 cm je Zunge auf (*siehe Abbildung 5 ganz links*).

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der Papierchromatographiemethode von Fettsäuren

4.1.1 Vorversuche zur Anfärbung von Fettsäuren auf dem Chromatogramm

Im Verlauf von 3 Monaten wurden wiederholt Papierchromatogramme angefertigt, um zwei verschiedene Rapsorten mit gleichen morphologischen Merkmalen, aber unterschiedlichen Fettsäuregehalten zu unterscheiden.

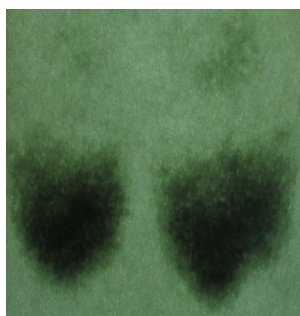


Abbildung 6: Flecken auf gefärbtem Grund

Nach dem Besprühen der entwickelten Chromatogramme traten bei allen Papieren grüne bis grüngraue Flecken auf (siehe Abbildung 6).

Zu Beginn der Untersuchungen war der Hintergrund stets stark grün verfärbt und unterschied sich nur wenig von den auftretenden Flecken (siehe Abbildung 6 oben). Diese Hintergrundfärbung trat allerdings durch die Veränderung des Waschvorgangs nicht mehr auf (siehe Kapitel

4.1.3). Vor der Optimierung der Chromatographiepapiere waren keine oder nur wenige Fettsäureflecken sichtbar (siehe Kapitel 4.1.2). Je genauer die Methode verfeinert wurde, desto deutlicher zeigten sich regelmäßig auftretende Flecken. In einem Abstand von 2,5 bis 4,5 cm von der Startlinie entfernt trat bei der erucasäurehaltigen Probe regelmäßig ein großer Fleck auf, der etwa einen Durchmesser von 1 cm hat (siehe Abbildung 7). Darüber hinaus war bei beiden Proben ein Fettsäurefleck mit einem mittleren Abstand von 8 cm zu sehen. Abbildung 7 zeigt ein Chromatogramm auf dem erstmals 4 verschiedene Flecken unterscheidbar waren, von denen drei Flecken bei beiden Proben in etwa gleicher Höhe lagen. Neben dem bereits vorher sichtbaren Flecken bei 3 und 8 cm, waren darüber hinaus Flecken bei einem Abstand von 10 bis 11 cm und 12 bis 12,5 cm zu sehen, welche mit zunehmender Steighöhe kleinere Durchmesser aufweisen.

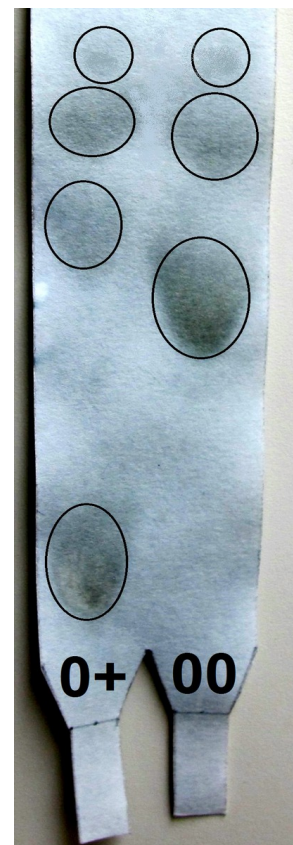


Abbildung 7: Chromatogramm mit 4 unterscheidbaren Fettsäureflecken

4.1.2 Optimierung des Zuschnitts der Chromatographiepapiere

Zur Optimierung des Chromatographiepapiers diente eine Testreihe mit verschiedenen Papierzuschnitten (siehe Kapitel 3.5). *Abbildung 8* zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Papiervarianten.

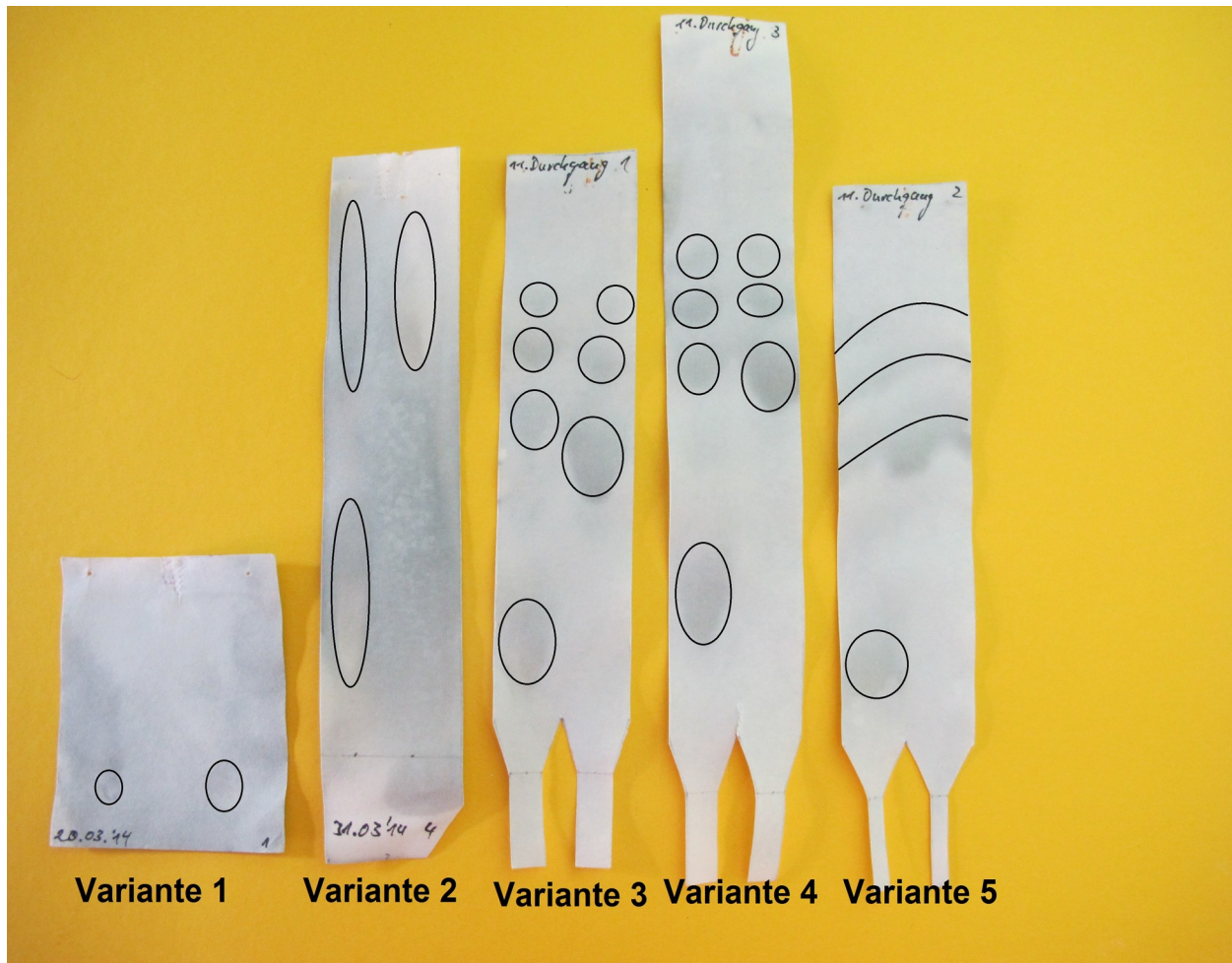


Abbildung 8: Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Papiervariante. Jeweils links ist die erucasäurehaltigen Probe und rechts jeweils die erucasäurefreie Probe aufgetragen

Während die kurze rechteckige Form, mit Ausnahme der Auftragungsflecken, keine sichtbaren Flecken zeigte, waren bei Variante 2 sehr lange und schmale Flecken zu sehen. Sie waren gelb bis gelb-weiß gefärbt. Gegenüber dem dunkelgrünen Hintergrund waren sie nur schwer zu erkennen. Außerdem wiesen die Flecken der Variante 2 lange Schweife auf. Eine differenziertere Trennung, vor allem der C18-Fettsäuren, war allerdings nicht möglich.

Nach Einführung der Zungenform (Variante 3) konnten erstmals mehrere, gut abgegrenzte Fettsäureflecken unterschieden werden. Die Schweife dieser Flecken waren deutlich verkürzt.

Eine über 20 cm hinausgehende Verlängerung der Papiere (*Variante 4*) zeigte keine Veränderung der Fleckenzahl oder der Qualität. Lediglich der Abstand des ersten Flecks von der Startlinie hat sich erhöht, wohingegen der Abstand zwischen den anderen Flecken identisch war. Die Verlängerung der Papiere hatte vielmehr den Nachteil, dass durch die längere Laufstrecke auch eine längere Laufzeit nötig war, die sich aufgrund der identischen Ergebnisse als unnötig erweist.

Die weitere Verengung der Zungen bewirkte massive Änderungen. Bei *Variante 5* war eine kreisbogenförmigen Verteilung der Fettsäure beobachtbar. Die parallele Auftragung von zwei oder mehr Proben erwies sich als nachteilig, da die Kreisbögen ineinander übergehen. Dadurch ist eine quantitative Abschätzung der Fettsäuren in den einzelnen Proben schwierig.

Die *Variante 3* stellt den besten hier beschriebenen Aufbau des Chromatographiepapiers dar, denn sie brachte die für die Trennung günstigsten Ergebnisse hervor

4.1.3 Variation des Waschvorgangs

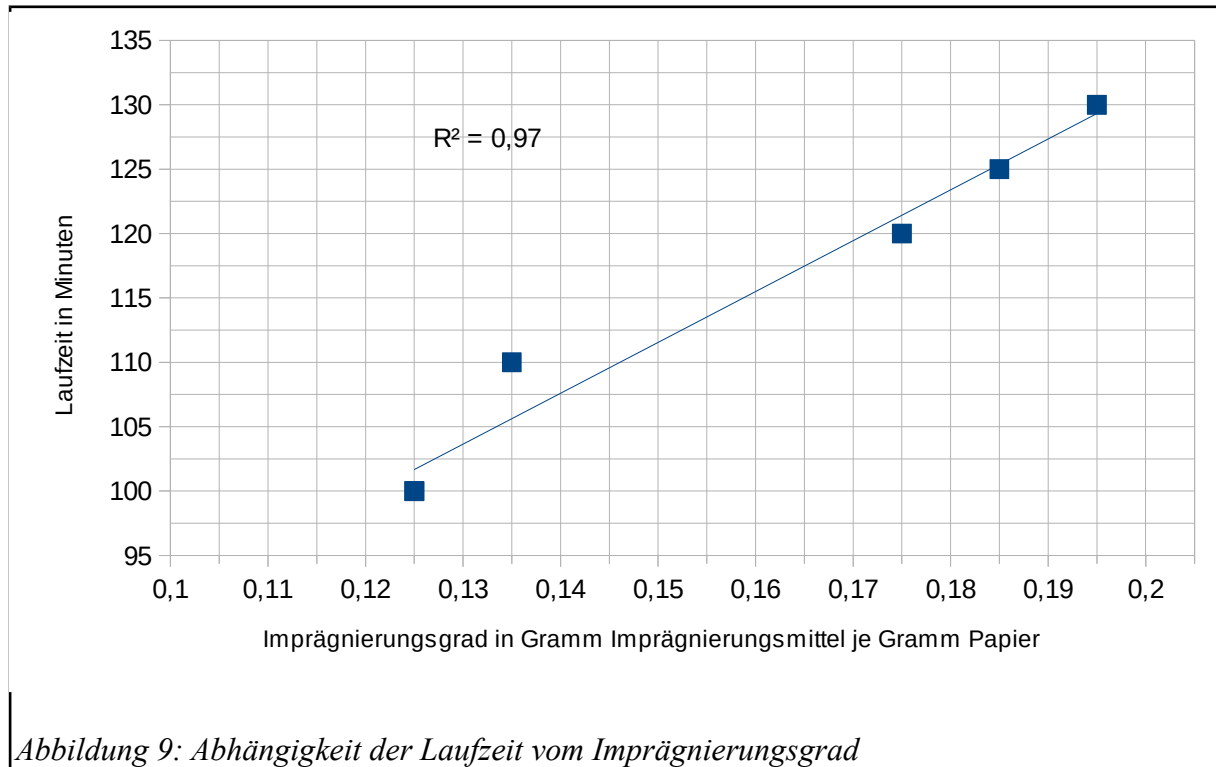
Nach der Behandlung der Chromatogramme mit Kupferacetat-Lösung werden diese gewaschen. Um das dafür günstigste Wasser zu finden wurden die Papiere in verschiedenen Durchläufen mit unterschiedlichem Wasser gewaschen. Vor der Verwendung von warmem Leitungswasser war der Hintergrund stets grün gefärbt, sodass die Auswertung der Fettsäureflecken stark erschwert wurde. Zwischen kaltem destilliertem Wasser und kaltem Leitungswasser bestand kein Unterschied in der Hintergrundfärbung. Dadurch ist die Verwendung von destilliertem Wasser nicht notwendig und es kann mit Leitungswasser gearbeitet werden. Durch die zusätzliche Erhitzung des Wassers konnte der grüne Hintergrund allerdings entfärbt werden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Waschungen (*siehe Tabelle 7*) zeigen deutlich, dass nur bei Verwendung warmen Leitungswassers der Hintergrund der Chromatogramme nicht dunkelgrün gefärbt war, sondern nur schwach grün bis weiß.

Tabelle 7: Ergebnisse der Durchläufe mit verschiedenen Wascharten

Art des Wassers	Ergebnis
kaltes destilliertes Wasser	stark dunkelgrün gefärbter Hintergrund
kaltes Leitungswasser	stark dunkelgrün gefärbter Hintergrund
warmes Leitungswasser (60°C)	schwach grüner bis weißer Hintergrund

4.1.4 Einfluss des Imprägnierungsgrades des Chromatographiepapiers auf die Laufzeit und die Trennschärfe

Je nach Dauer der Imprägnierung und des Abpressens der Chromatographiepapiere verändert sich der Imprägnierungsgrad. In *Abbildung 9* sind die Laufstrecken und Laufzeiten von Papieren mit unterschiedlichen Imprägnierungsgraden bei sonst gleichen Bedingungen (Papierzuschnitt nach Variante 3 und Laufstrecke von 17 cm) gegenübergestellt.



Es konnte kein Einfluss des Imprägnierungsmittels auf die Trennschärfe der Fettsäureflecken festgestellt werden.

4.2 Identifikation der Fettsäuren

Die *Abbildung 10* zeigt nochmals die zuvor beobachteten Ergebnisse. Darüber hinaus ist in *Abbildung 10* der Vergleich zwischen erucasäurehaltigem Raps und Leinsamen sowie zwischen erucasäurefreiem Raps und Leinöl aufgeführt. In *Abbildung 10* sind bei der erucasäurehaltigen Probe erstmals 5 unterscheidbare Flecken zu erkennen. Allerdings waren nicht bei allen erucasäurefreien Probe die drei bisher entdeckten Flecken abgegrenzt erkennbar.

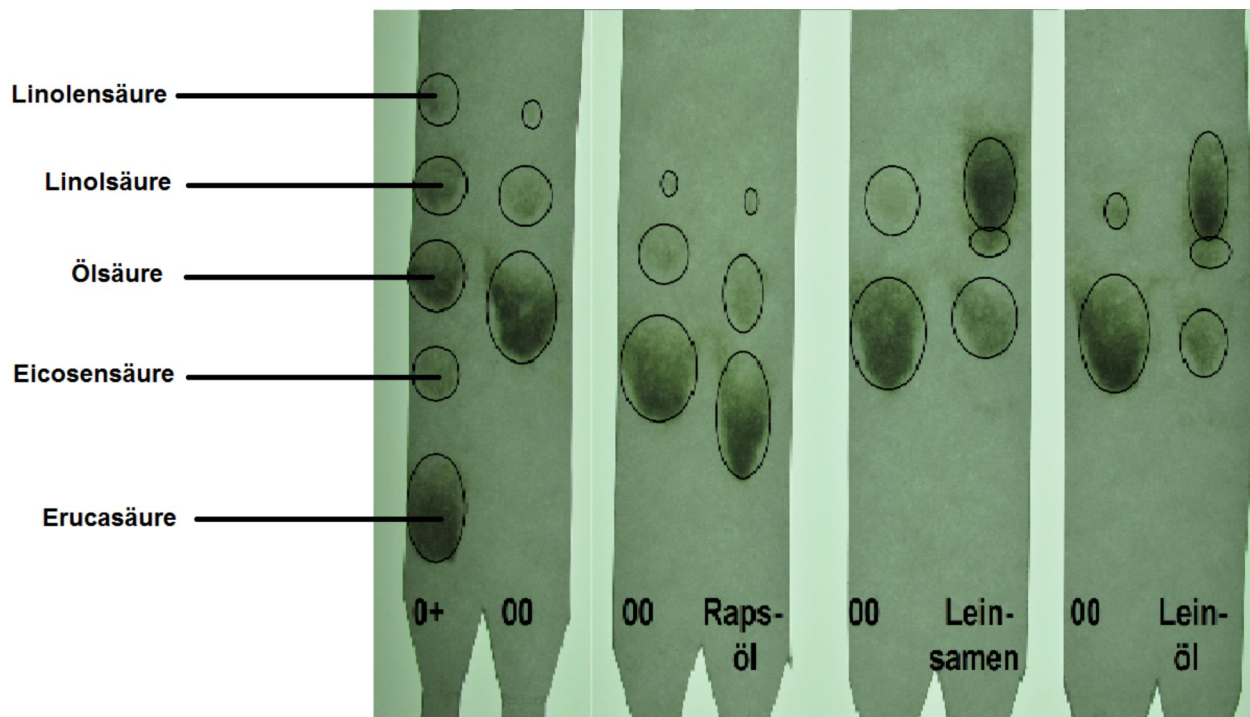


Abbildung 10: Chromatogramme von Raps und Lein aus Öl und Samenproben

Da die erucasäurehaltige Probe stets einen Fleck in der untersten Position zeigte, welcher bei der erucasäurefreien Probe nie auftrat, konnte dieser Fleck eindeutig der Erucasäure zugeordnet werden. Neben der Erucasäure weist der 0+-Raps gegenüber dem 00-Raps einen höheren Gehalt an Eicosensäure auf (siehe Tabelle 1). Da der zweite Fleck, oberhalb der Erucasäure, ebenfalls bei keiner erucasäurefreien Probe auftrat, stellt dieser Fleck die Eicosensäure dar. Der dritte auftretende Fleck repräsentiert die Ölsäure. Die Ausprägung dieses Flecks war bei der erucasäurefreien Probe stets kräftiger als bei der erucasäurehaltigen Probe. Darüber hinaus ist dieser Fleck auch der am deutlichsten ausgeprägte Fleck überhaupt bei der erucasäurefreien Rapsprobe. Der erucasäurefreie Samen beinhaltet sehr viel Ölsäure, während der erucasäurehaltige Samen durch die Elongation der Ölsäure zu Erucasäure nur sehr wenig Ölsäure enthält. Der Fleck in der dritten Position von unten bei der 0+-Probe und der erste Fleck der 00-Probe ist somit die Ölsäure.

Durch den Vergleich zwischen Leinsamen und Rapssamen konnte die Linolsäure identifiziert werden. Leinsaat hat einen hohen Gehalt an Linolensäuren (siehe Tabelle 1) und ihr am stärksten ausgeprägter Fleck in der obersten Position, also die Linolensäure, liegt auf gleicher Höhe wie der oberste Fleck bei den Rapssamen. Der verbleibende Fleck kann durch keinen Vergleich sicher identifiziert werden, es liegt allerdings nahe, dass es sich hierbei um die Linolsäure handelt. Wie in Kapitel 2 besprochen, hängt die Laufstrecke der Fettsäuren von ihrer Polarität ab und alle bisherigen Ergebnisse unterstützen diese Aussage.

Erucasäure als die langkettigste Fettsäure ist trotz ihrer Doppelbindung die am stärksten apolare Fettsäure, die hier betrachtet wird. Daher wandert sie von allen Fettsäuren die kürzeste Strecke mit der mobilen Phase. Die am weitesten wandernde Fettsäure ist durch ihre im Vergleich geringe Anzahl an Kohlenstoffatomen und dafür hohe Anzahl an Doppelbindungen die Linolensäure. Da die übrigen Flecken identifiziert sind und demnach nur noch die Linolsäure übrig bleibt, kann diese anhand ihrer Polarität identifiziert werden. Sie besitzt mit 18 Kohlenstoffatomen genau so viel Kohlenstoffatome wie die Ölsäure und die Linolensäure. Da sie aber mit zwei Doppelbindungen eine Doppelbindung mehr besitzt als die Ölsäure und eine Doppelbindung weniger besitzt als die Linolensäure, kann sie zwischen diesen beiden Säuren auf dem Papier herausgestellt werden.

4.3 Vergleich von Samenproben und Ölproben gleicher Pflanzen

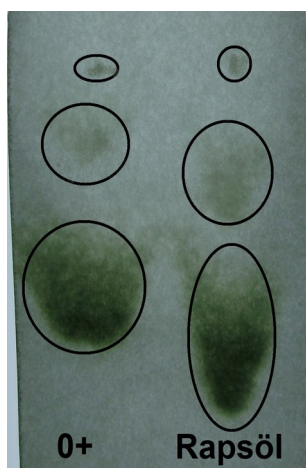


Abbildung 11:
erucasäurefreie
Rapssamen und Rapsöl
auf einem Papier

In *Abbildung 11* ist zu sehen, dass die Rapsölprobe ähnliche Flecken wie die erucasäurefreie Rapssamenprobe zeigt, einen großen Fleck bei 5 bis 5,5 cm, einen Fleck bei 7,5 bis 8 cm und einen nur schwach sichtbaren und deutlich schmalen Fleck bei 8,5 cm. Bei der Leinsamenprobe sind stets drei Flecken zu sehen. Der erste Fleck ist in 6 cm Höhe zu sehen und zwei weitere Flecken mit einem Abstand von 8 bis 9 cm. Die beiden oberen

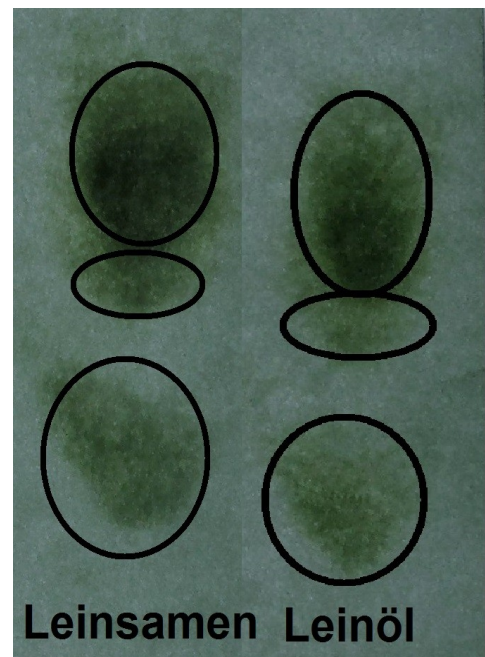


Abbildung 12: Chromatogramme
mit Leinsamen und Leinöl im
Vergleich

Flecken der Leinsamenprobe liegen sehr eng zusammen (siehe *Abbildung 12*). Die Leinölprobe zeigt ebenso wie die Rapsölprobe ähnliche Flecken wie ihre Samenprobe.

Bei der Leinölprobe sind drei unterschiedliche Flecken erkennbar, einer befindet sich bei 6,5 cm, ein sehr eng liegendes Fleckenpaar liegt darüber (siehe *Abbildung 12*). Die Ölproben der beiden Pflanzen unterscheiden sich nicht von ihren Samenproben. In einigen Fällen ist die Form der Fettsäureflecken bei den Ölproben weniger rund als bei den Samenproben (siehe *Abbildung 11*), aber von der Anzahl der unterscheidbaren Fettsäureflecken unterscheiden sich Samen- und Ölproben nicht. Daher kann anstatt der Samen auch eine Ölprobe verwendet werden, welche erstens leichter in der Handhabung ist und darüber hinaus einfacher zu erwerben ist.

5. Diskussion

5.1 Einflussfaktoren auf die Qualität der Chromatogramme

5.1.1 Bedeutung des Aufbaus der Chromatographiepapiere

Die verschiedenen Papiervarianten haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Trennung der Fettsäuren. Warum es in Variante 1 zu keiner Trennung der Fettsäuren kam ist nicht eindeutig zu beantworten, jedoch ist klar, dass derart kurze Chromatographiepapiere eine unzureichende Auftrennung ermöglichen.

Die nach *Matthias* veränderten Papiere bewirkten erstmals eine Trennung aller C18 Fettsäuren sowie die Abtrennung der Erucasäure. Bei Variante 2 besteht das Problem, dass nur Teile der mobilen Phase Probensubstanz lösen und mit sich tragen konnten, während andere Teile nur an der Probe vorbeiwanderten (*Matthias 1954*). Dadurch entstehen unregelmäßige oder streifenförmige Flecken. Durch die bei Variante 3 herausgeschnittene Zunge laufen fast alle Teile der mobilen Phase direkt durch die Probenmitte, wodurch es zu runderen Flecken kommt.

Auf 0,5 cm breiten Zungen wandert das gesamte Laufmittel durch die Probe und trägt somit die Probensubstanz komplett mit sich. Durch die starke Verbreiterung von der Zunge zur Gesamtbreite von 4 cm kommt es zur kreisbogenförmigen Verteilung der Fettsäuren (*Matthias 1954*).

5.1.2 Einfluss der Imprägnierung auf die Trenndauer

Die Ergebnisse von *Kapitel 4.1.4* zeigen deutlich, dass die Geschwindigkeit der mobilen Phase umso geringer ist je größer der Imprägnierungsgrad ist, das heißt je mehr Imprägnierungsmittel sich auf dem Papier befindet. Da nur ein kleiner Teil des aufgetragenen Imprägnierungsmittels an der multiplikativen Verteilung teilnimmt und der Rest vor der Front der mobilen Phase hergeschoben wird, lastet demnach bei zunehmender Steighöhe eine größer werdende Menge an Imprägnierungsmittel auf der mobilen Phase.

Somit verringert sich die Steiggeschwindigkeit dieser stark, so dass bei höherer Imprägnierung geringere Steighöhen erreicht werden können beziehungsweise konstante Steighöhen später erreicht werden (*Kaufmann & Mohr 1958*).

Große Steighöhen sind für eine optimale Trennung der höheren Fettsäuren allerdings nötig. Demnach bietet es sich an, geringe Imprägnierungsgrade zu erzeugen, um die Trenndauer nicht unnötig zu verlängern.

5.1.3 Einfluss des Spülvorgangs auf die Färbung der Fettsäure sowie des Hintergrunds

Für die Färbung des Hintergrunds sowie der Flecken selbst ist der Komplex aus Rubeanwasserstoff und Kupferionen verantwortlich (*Kaufmann & Ahmad 1964*). Wenn durch das Waschen die Kupferionen nicht vollständig aus dem Papier entfernt sind, verfärbt sich der Hintergrund nach dem Besprühen mit der Rubeanwasserstofflösung grün. Das ausgerechnet bei jenem Waschvorgang, in dem destilliertes Wasser verwendet wurde, der Hintergrund dunkelgrün gefärbt war, ist nicht zu erklären. Destilliertes Wasser löst die Kupferionen besser als Leitungswasser, da im destillierten Wasser noch keine Kupferionen enthalten sind, sollten diese aufgrund des vorliegenden Konzentrationsgefälles aus dem Papier ins Waschwasser diffundieren. Nach *Kaufmann und Ahmad (1964)* beeinflusst destilliertes Wasser sogar einige der Kupferseifen, sodass die Fettsäureflecken an Größe abnehmen.

Der Unterschied zwischen warmem und kaltem Leitungswasser lässt sich hingegen klären. Im warmen Wasser ist die Löslichkeit der Kupferionen erhöht. Dadurch werden mehr Kupferionen aus dem Papier gelöst als bei kaltem Leitungswasser. Darüber hinaus fanden *Kaufmann und Ahmad (1964)* heraus, dass bei einem hohen Calcium-Gehalt des Wassers mehr Kupferionen gelöst werden als bei einem geringen Gehalt an Calciumionen. Da in warmem Leitungswasser mehr Calcium gelöst ist als in kaltem Wasser, steigt demnach die Kupferionenentfernungseistung des warmen Leitungswassers deutlich an. Welche gegenseitige Beeinflussung zwischen Kupferionen und Calciumionen zu diesen Ergebnissen führt, ist noch nicht geklärt.

5.2 Identifikation der Fettsäuren

Die Identifizierung der Fettsäuren anhand ihrer Positionen auf dem Chromatogramm konnte durch den Vergleich mit geeigneten Vergleichsproben erfolgreich durchgeführt werden. Die durch die dargestellte Methode gefundene Reihenfolge entspricht den Angaben aus der Literatur (*vgl. Kaufmann & Mohr 1958 und Kaufmann & Lüßling 1956*). Um absolute Sicherheit über die Richtigkeit der Zuordnung der Fettsäuren zu den Flecken zu erhalten müsste weitere Versuchsreihen durchgeführt werden. So könnten beispielsweise noch andere Pflanzenöle verwendet werden. Weizenkeimöl enthält sehr viel Linolsäure, nämlich 55-60 Gewichtsprozent im Bezug zu den Gesamtfettsäuren (*siehe Tabelle 1*). Mit Hilfe des Weizenkeimöls ließe sich die Linolsäure mit ebenso hoher Sicherheit bestimmen wie die übrigen Fettsäuren. Um alle Fettsäuren zweifelsfrei identifizieren zu können, könnten die reinen Fettsäuren parallel zur Rapsprobe auf einem Papier getrennt werden.

Raps enthält neben den bereits identifizierten Fettsäuren auch Palmitinsäure und Stearinsäure (*Tabelle 1*). Diese konnten aber in den Untersuchungen nicht identifiziert werden. Die Ursache dafür ist, dass Palmitinsäure und Ölsäure aufgrund ihrer ähnlichen Polarität ein sogenanntes kritisches Paar bilden, welches auf dem Papier schwer zu trennen ist (*Kaufmann & Makus 1960*). Stearinsäure bildet zusammen mit Eicosensäure ebenfalls solch ein kritisches Paar, deshalb ist sie in der erucasäurehaltigen Probe nicht zu identifizieren (*Kaufmann & Makus 1960*). In der erucasäurefreien Rapsprobe ist jedoch keine Eicosensäure enthalten, somit hätte in dieser Probe Stearinsäure sichtbar sein müssen. Durch den sehr niedrigen Gehalt an Stearinsäure in Raps konnte diese mit Hilfe dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden.

Neben den hier untersuchten Fettsäuren ist es laut *Kaufmann & Deshpande (1958)* auch möglich kurzkettige Fettsäuren mit weniger als 16 Kohlenstoffatomen zu trennen. Zu prüfen wäre, ob dies mit der hier vorgestellten Methode ebenfalls möglich ist.

5.3 Die Eignung des Merkmals Erucasäuregehalt als Modell für den Genetikunterricht

Wie in dieser Arbeit gezeigt kann Erucasäure in Rapssamen mit Hilfe der Papierchromatographie nachgewiesen werden. Erucasäure ist als ein phänotypisches Merkmal nicht so leicht sichtbar wie die Fellfarbe eines Hamsters oder die Blütenfarbe einer Narzisse. Jedoch ist ihre Ausprägung sehr viel schneller bestimmbar als bei allen diesen Merkmalen, da der Gehalt an Erucasäure direkt vom Embryo bestimmt wird (*Harvey & Downey 1964*), kann bereits nach wenigen Tagen eine handbestäubte Pflanze auf ihren Erucasäuregehalt untersucht werden.

Die digenische Vererbung der Erucasäure, bei der sich zwischen den einzelnen Allelen keine Dominanz zeigt, ist jedoch gerade zu Beginn des Genetikunterrichts nicht trivial. Somit kann sie nicht ohne Vorbereitung im Unterricht eingesetzt werden. Allerdings können mit Hilfe des phänotypischen Merkmals Erucasäuregehalt, bei doppelt homozygoten Eltern (zum Beispiel $eeee$ und E^aE^aee), gut die Mendelschen Regeln dargestellt werden. Der Vorteil hierbei ist, dass den Kindern diese Regeln nicht vorgegeben werden müssen, sondern dass sie sie selbst an einer einzigen Blüte des Raps nachweisen können. Nachteil hierbei ist, dass zumindest die ersten beiden Mendelschen Regeln für monogene Erbgänge angelegt sind, sodass sie im Normalfall auch mit Hilfe solcher Beispiele erklärt werden. Verwendet man aber die im Beispiel genannten Genotypen, können die Kinder unter Zuhilfenahme der Papierchromatographie die erste Mendelsche Regel beweisen. Indem sie zeigen, dass es keinen Samen gibt der keine Erucasäure enthält, obwohl ein Elternteil keine enthielt, können sie, durch geschickte Lenkung des Lehrers darauf schließen, dass sich alle Samen in Bezug auf Erucasäuregehalt uniform verhalten.

Die zweite Mendelsche Regel lässt sich abermals wiederum durch geschicktes Lenken des Lehrers herleiten. Die Schülerinnen und Schüler beweisen, dass es in der F2 wieder erucasäurefreie Samen gibt und dass sich Unterschiede in der Ausprägung des Erucasäureflecks zeigen.

Anhand der Erucasäure kann den Schülerinnen und Schülern eine gewisse Kontinuität im Genetikunterricht gegeben werden, da Erucasäure verschiedene Themen des Genetikunterrichts inhaltlich greifbarer miteinander verknüpfen kann. So kann sie wie bereits beschrieben, zur Erläuterung der Vererbungsgesetze dienen und gleichzeitig den Bogen zur Pflanzenzüchtung schlagen und über ihre Elongase kann Erucasäure auch im Themenbereich der Genexpression als Beispiel dienen.

Somit könnte den Schülerinnen und Schülern ein roter Faden an die Hand gegeben werden, welcher sie durch den gesamten Genetikunterricht begleitet. Geeignet ist für derartige Untersuchungen eine Projektwoche zum Thema 'Mendelsche Regeln'. Um die Experimente auch mit der benötigten Ruhe einzuleiten, durchzuführen und auszuwerten ist eine einzelne Unterrichtsstunde nicht ausreichend. Für die Untersuchungen der Mendelschen Regeln ist es von Vorteil, dass die gesamte Klasse sich ausschließlich mit den Samen einer Blüte beschäftigt. Um die stochastische Abweichung der Ergebnisse zu minimieren, könnten mehrere Klassen an einer Projektwoche teilnehmen.

6. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnte die Papierchromatographie als Methode zur Unterscheidung von erucasäurehaltigem und erucasäurefreiem Rapssamen im Labor etabliert werden. Über die Zielsetzung hinaus konnten auch die weiteren Fettsäuren im Rapssamen auf dem Papier getrennt werden und identifiziert werden. Durch die angegebenen Variationen der Methode, die ausführliche Darstellung der Ergebnisse und deren Diskussion, erscheint eine Übertragung auf schulische Verhältnisse mit geringem Aufwand möglich. Erucasäure als roter Faden im Unterricht oder als genetischer Marker zum Beispiel als ein Maß für Fremdbefruchtung und auch die papierchromatographische Nachweismethode der Erucasäure zeigen, wie bereits in *Kapitel 5.3* beschrieben, großes Potenzial für den Einsatz im Biologieunterricht.

Der Einsatz der hier beschriebenen Methode im Schulunterricht gestaltet sich momentan noch schwierig. Der zeitliche Aufwand der Papierchromatographie ist hoch, vor allem da nach einigen Arbeitsschritten längere Pausen von bis zu einem Tag notwendig sind. Schwierig ist darüber hinaus auch die zeitliche Eintaktung des Versuch in den Unterricht, da für das Verständnis der Ergebnisse und deren fachliche Auswertung in Hinblick auf die genetischen Hintergründe fundiertes Vorwissen notwendig ist. Ist dies nicht der Fall ist eine umfangreiche Leitung der Lehrkraft gefragt. Es bieten sich also vor allem Projektwochen zur Erarbeitung an.

Wie genau die Methode und auch das Thema Erucasäuregehalt im Unterricht eingebaut werden sollte und wie die Lenkung der Lehrkraft ausgerichtet sein sollte wäre die Aufgabe weiterführender Arbeiten. Thematisch bietet sich die Einordnung in den Themenschwerpunkt „Tier- und Pflanzenzüchtung - früher und heute “ an. Bezüge zu den Themenbereichen „Grundlagen und Anwendungsfelder der Genetik“, sowie „Grundlagen der Vererbung und ihre Anwendung“ können hier hergestellt werden (*Rahmenlehrpläne Berlin und Brandenburgs*).

7. Literaturverzeichnis

Abdellatif, A. M.M.; Vles, R. O. (1973): Short-term and long-term pathological effects of glyceryl trierucate and of increasing levels of dietary rapeseed oil in rats. In: *Annals of Nutrition and Metabolism* 15 (4-5), S. 219–231.

Anand, I. J.; Downey, R. K. (1981): A study of erucic acid alleles in digenomic rapeseed (*Brassica napus* L.). In: *Canadian Journal of Plant Science* 61 (2), S. 198–202.

Bresinsky, A.; Körner, Ch; Kadereit, J. W.; Neuhaus, G.; Sonnewald, U. (2008): Strasburger, Lehrbuch der Botanik. 36.Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akademischer Verlag. S. 339-345

Cramer, F. (1958): Papierchromatographie, 4., stark erweiterte Auflage; Weinheim: Wiley-VCH. S. 18-23

Downey, R. K.; Craig, B. M. (1964): Genetic control of fatty acid biosynthesis in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 41 (7), S. 475–478.

Downey, R. K.; Harvey, B. L. (1963): Methods of breeding for oil quality in rape. In: *Canadian Journal of Plant Science* 43 (3), S. 271–275.

Fehling, E.; Mukherjee, K. D. (1991): Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1082 (3), S. 239–246.

Hais, I. M.; Macek, K. (1958): Handbuch der Papierchromatographie, Jena: Gustav Fischer Verlag. S. 10-52; 237-243

Han, J.; Lühs, W.; Sonntag, K.; Zähringer, U.; Borchardt, D. S.; Wolter, F. P. et al. (2001): Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. In: *Plant molecular biology* 46 (2), S. 229–239.

Harvey, B. L.; Downey, R. K. (1964): The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: *Canadian Journal of Plant Science* 44 (1), S. 104–111.

Heldt, H.; Heldt, F. (2008): Pflanzenbiochemie. 4. Aufl. Heidelberg [u.a.] : Spektrum Akademischer Verlag S. 345- 382

Kaltenböck, Karl (2008): Chromatographie für Einsteiger. Weinheim: Wiley-VCH. S. 1-8

Kaufmann, H. P.; Ahmad, A. K. S. (1964): Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet LII: Über Fehlerquellen der quantitativen Auswertung von pc-Chromatogrammen. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 66 (10), S. 757–762.

Kaufmann, C. H.P.; Deshpande, M. M. (1958): Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet XXVI: Die quantitative papierchromato-polarographische Analyse der Fettsäuren. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 60 (7), S. 537–541.

Kaufmann, H. P.; Lüßling, Th; Karabatur, A. (1956): Über den Nachweis von Rüböl in Olivenöl und die quantitative Papier-Chromatographie des Rüböls. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 58 (11), S. 985–991.

Kaufmann, H. P.; Makus, Z. (1960): Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet XL: Zur Systematik der Trennung von Fettsäure-Gemischen. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 62 (3), S. 153–160.

Kaufmann, H. P.; Mohr, E. (1958): Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet XXIV: Weitere Untersuchungen über die Papier-Chromatographie der Fettsäuren. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 60 (3), S. 165–177.

Kaufmann, H. P.; Nitsch, W. H. (1954): Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet XVI: Weitere Versuche zur Trennung von Fettsäuren. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 56 (3), S. 154–158.

Krist, S.; Buchbauer, G.; Klausberger, C. (2008): Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle, Wien: Springer Verlag, S. 380–386.

Krzymanski, J.; Downey, R. K. (1969): Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed, *Brassica napus* L.. In: *Canadian Journal of Plant Science* 49 (3), S. 313–319.

Lindqvist, Y.; Huang, W. Schneider, G. Shanklin, J. (1996): Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. In: *The EMBO journal* 15 (16), S. 4081.

Lühs, W.; Friedt, W. (1994): Stand und Perspektiven der Züchtung von Raps (*Brassica napus* L.) mit hohem Erucasäure-Gehalt im Öl für industrielle Nutzungszwecke. In: *Lipid/Fett* 96 (4), S. 137–146.

Matthias, W. (1954): Über ein papierchromatographisches Verfahren für Serienuntersuchungen in der Pflanzenzüchtung. In: *TAG Theoretical and Applied Genetics* 24 (11), S. 313–316.

Odenbach, W. (Hrsg.) (1997): Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung: ein Leitfadens für Studierende der Agrarwissenschaften, des Gartenbaus und der Biowissenschaften, Hamburg [u.a.]: Paul Parey Verlag. S. 72-80

Ohlrogge, J.; Browse, J. (1995): Lipid biosynthesis. In: *The Plant Cell* 7 (7), S. 957.

Ohlrogge, J.; Jaworski, J. G. (1997): Regulation of fatty acid synthesis. In: *Annual review of plant biology* 48 (1), S. 109–136.

Röbbelen, G. (1973): Der gegenwärtige Stand der Züchtung von Erucasäure-, Linolensäure- und Glucosinolat-Arten Rapssorten. In: *Qualitas Plantarum* 23 (1-3), S. 221–238.

Sauermost, R. (Hrsg.) (1994): Lexikon der Biologie 3. Diterpene bis Gehirnzentren, Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akademischer Verlag. S.229; Abbildung Fettsäuresynthese

Schopfer, P.; Brennicke, A. Mohr, H. (1999): Pflanzenphysiologie. 5., grundlegend überarb. und aktualisierte Aufl., Berlin [u.a.]: Springer Verlag. S. 357-359

Schwedt, G. (1994): Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen ; 35 Tabellen. 3., erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme. S. 9-17; 68-70; 94-105

Stefansson, B. R.; Hougen, F. Wo; Downey, R. K. (1961): Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. In: *Canadian Journal of Plant Science* 41 (1), S. 218–219.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2000): Physiologie der Pflanzen. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akademischer Verlag. S. 311-316

Thies, W. (1971): Der Einfluß der Chloroplasten auf die Bildung von ungesättigten Fettsäuren in reifenden Rapssamen. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 73 (12), S. 710–715.

Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. (2012): Organische Chemie. Lehrbuch und Arbeitsbuch. 5., Auflage. Weinheim: Wiley-VCH. S. 933-970

Wollrab, A. (1991): Chromatographie. Adsorption, Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie, Papierchromatographie, Gaschromatographie. Köln: Aulis-Verlag Deubner. S. 1-15; 23; 103 -109

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Christoph Kreibich, an Eides statt, dass ich diese Bachelorarbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen der Arbeit, die ich aus diesen Quellen und Hilfsmitteln dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Weiterhin versichere ich, dass weder ich noch andere diese Arbeit weder in der vorliegenden noch in einer mehr oder weniger abgewandelten Form als Leistungsnachweis bereits verwendet haben oder noch verwenden.

Ort, Datum

Unterschrift