

Über den Nachweis von Glykogen bei Meeresmollusken (speziell bei Cephalopoden und Aplysien).

Von

E. Starckenstein und M. Henze.

(Aus dem chemisch-physiologischen Laboratorium der zoologischen Station zu Neapel.)
(Der Redaktion zugegangen am 8. November 1912.)

Alle Organismen speichern ihre Kohlenhydrate in kolloider Form. Diese ist mit wenigen Ausnahmen für den pflanzlichen Organismus die Stärke, für den tierischen das Glykogen. Die Verbreitung des Glykogens im Tierreiche ist eine derartig große, daß behauptet wurde, «Glykogen sei in den Muskeln der Tiere aller Klassen und Spezies nachweisbar». ¹⁾ Die allgemeine Gültigkeit dieses Satzes wurde durchbrochen durch die Befunde, die hinsichtlich der Anwesenheit des Glykogens bei einer Reihe von Mollusken erhoben wurden. Bei einem Teile derselben, den Pulmonaten, wurde wohl Glykogen nachgewiesen, doch stellte anderseits Landwehr ²⁾ die Behauptung auf, daß das Glykogen der Weinbergschnecke durch Jod nicht gefärbt werde. In Übereinstimmung mit diesen Befunden stehen Angaben von Frenzel, ³⁾ der sich vergebens bemühte, in den Lebern verschiedener Mollusken (*Limnaeus*, *Paludina*, *Cerithium*, *Aplysia*, *Octopus*, *Sepia*) Glykogen auf mikrochemischem Wege mit Hilfe von Jodtinktur oder Jodkaliumlösung nachzuweisen. Auch die Reindarstellung von Glykogen in den Lebern mehrerer großen Aplysien gelang ihm nicht. Frenzel stellte auf Grund

¹⁾ Vgl. Neumeister, Lehrbuch der physiolog. Chemie.

²⁾ Landwehr, Untersuchungen über das Mucin von *Helix pomatia* und ein neues Kohlehydrat (Achroglykogen) in der Weinbergschnecke. Diese Zeitschrift, Bd. 6, S. 74, 1882.

³⁾ Frenzel, Mikrophographie der Mitteldarmdrüse der Mollusken, zit. nach v. Fürth, Vgl. Chem. Physiolog. der niederen Tiere, S. 221, 1902.

seiner Befunde das Vorhandensein von Glykogen in der Mitteldarmdrüse der Mollusken überhaupt in Frage. Dieser Schluß erscheint aus dem Grunde nicht berechtigt, da, wie erwähnt, in den Organen der Pulmonaten Glykogen bereits nachgewiesen worden war. Picard¹⁾ erwähnt gelegentlich einer Untersuchung die Anwesenheit von Glykogen in der Sepialeber.

Levy²⁾ stellte aus den Lebern von Weinbergschnecken ein Glykogen dar, das bedeutend weniger rechts drehte als das aus Kaninchenlebern dargestellte. Er erklärte dies aus einer Beimengung von Sinistrin, einem gummiähnlichen linksdrehenden Kohlenhydrat (Hammarsten). Die negativen Befunde hinsichtlich des Glykogens bei Mollusken wurden weiterhin ergänzt durch Untersuchung Röhmanns,³⁾ der bei Aplysien in der sogenannten Leber oder Mitteldarmdrüse kein Glykogen nachweisen konnte. Dagegen fand er darin ein links drehendes, nicht reduzierendes Kohlenhydrat, das er mit dem Pentosan der die Nahrung der Aplysien bildenden Alge, *Ulva lactuca*, identifizieren konnte. Botazzi⁴⁾ hatte früher eine solche Identität bezweifelt. Auch er aber betont ausdrücklich das Fehlen des Glykogens. Schließlich sind noch die Versuche zu erwähnen, die der eine von uns, Henze,⁵⁾ ausgeführt hat; auch er konnte bei *Octopus* weder in der Leber noch in den Muskeln Glykogen nachweisen, weder bei Sommer- noch bei Wintertieren und auch nicht nach reichlicher Fütterung. Bestimmungen des Gesamt-Pentosangehalts ergaben dagegen, daß an ein Reservematerial in Gestalt von Pentosanen nicht zu denken war. Aus allen diesen mitgeteilten Befunden ergibt sich, daß wohl auch

¹⁾ Picard, zit. nach v. Fürth, S. 567.

²⁾ M. Levy, Zoochemische Untersuchungen der Mitteldarmdrüse (Leber) von *Helix pomatia*. Zeitschrift für Biologie, Bd. 27, S. 398, 1890.

³⁾ Röhmann, Einige Beobachtungen über die Verdauung der Kohlenhydrate bei *Aplysia*. Zentralbl. f. Phys. Bd. 13, S. 455, 1899 und Festschrift für Salkowski, S. 323, 1904.

⁴⁾ Botazzi, Contributions à la Physiologie comparée de la digestion. Arch. ital. de Biolog., Bd. 35, S. 317, 1901.

⁵⁾ M. Henze, Beiträge zur Muskelchemie der Octopoden, Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 477, 1904/05 und Chemische Untersuchungen an Octopoden. Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 437, 1909.

Mollusken Glykogen speichern, daß dieses jedoch bei Cephalopoden und Aplysien trotz mehrfacher Untersuchung nicht nachgewiesen werden konnte. Wir haben daher neuerdings diese Untersuchungen aufgenommen, um festzustellen, ob tatsächlich Glykogen bei den letztgenannten Tieren vermißt wird, und um eventl. jenes Kohlenhydrat zu finden, das hier notwendigerweise die Stelle des Glykogens als Reservestoff vertreten sollte.

Für die neuerliche Aufnahme der erstgenannten Frage waren folgende Momente maßgebend. Es hat der eine von uns¹⁾ seinerzeit gefunden, daß die üblichen Methoden der Glykogenbestimmung mitunter zu bedeutenden Fehlresultaten führen können. Diese beruhen darauf, daß beim Kochen der zu untersuchenden Organe mit Kalilauge das vorhandene Eisen, Calcium, Magnesium usw. als Hydroxyde gefällt werden und als solche einen großen Teil des vorhandenen Glykogens adsorbieren kann. Wenn dann der Niederschlag nicht direkt hydrolysiert, sondern bloß mit heißem Wasser extrahiert wird, so können durch Glykogenverluste Fehler unterlaufen, die, wie dies zum Beispiel bei den damals untersuchten Tunicaten der Fall war, bis zu 50% betragen können. Diese Beobachtung muß, wie sich leicht zeigen läßt, besonders bei Glykogenbestimmungen an Seetieren Berücksichtigung finden. Setzt man einer Glykogenlösung etwas Seewasser zu, macht dann mit Kalilauge alkalisch und filtriert vom entstandenen Niederschlag ab, so ist das Filtrat entweder überhaupt glykogenfrei, oder der Glykogengehalt doch bedeutend vermindert. Mit der Gegenwart relativ großer Mengen von Seewasser ist nun bei Untersuchungen niederer Seetiere stets zu rechnen. Außerdem sind gerade die Lebern der Cephalopoden eisen- und besonders sehr kupferreich, wie analytische Untersuchungen des einen von uns²⁾ ergeben hatten. Auch in den Lebern der Aplysien wurde viel Eisen gefunden.

¹⁾ Starkenstein, Über den Glykogengehalt der Tunicaten nebst Versuchen über die Bedeutung des Eisens für die quantitative Glykogenbestimmung, *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 27, S. 53, 1910.

²⁾ Henze, Über den Kupfergehalt der Cephalopodenleber, *Diese Zeitschrift*, Bd. 33, S. 417, 1901.

Wenn auch nicht anzunehmen war, daß die hierdurch möglichen Fehler so groß sein könnten, daß von dem vorhandenen Glykogen alles der Bestimmung entginge, so war doch die Möglichkeit der Fehlergröße eine derartige, daß sie weitgehendste Berücksichtigung finden mußte. Weiterhin haben gleichzeitige Untersuchungen des einen von uns¹⁾ ergeben, daß die genannten Tiere eine derart hochwertige Diastase besitzen, daß in kurzer Zeit das vorhandene Glykogen dem fermentativen Prozesse auch bei Zimmertemperatur zum Opfer fallen kann. Die momentane Ausschaltung jeder Fermentwirkung war somit ebenfalls eine Vorbedingung für weitere Untersuchungen,

Während Nichtbeachtung ebengenannter Momente zu einer starken Verminderung der Glykogenausbeute führen kann, kann umgekehrt bei den in Frage kommenden Mollusken die einfache Anwendung der quantitativen Glykogenbestimmungsmethode, die ja mit der Hydrolyse des Rohglykogens und Bestimmung des resultierenden Zuckers endet, auch zu zu hohen Werten führen, ja es kann sogar Glykogen vorgetäuscht werden, wo es gar nicht vorhanden ist. Bei der Alkoholfällung des Glykogens werden nämlich nicht nur unverändert gebliebene Pentosane (*Aplysia*), sondern auch sogenanntes «Tierisches Gummi» (Landwehr), oder besser gesagt, komplexe Glykosamininderivate (Müller, Steudel) mit niedrigerissen, die aus den Mucinen und Glukoproteiden stammen, welche zweifellos die Hauptmenge der Eiweißkörper dieser Tiere ausmachen. Bei der Säurehydrolyse liefern beide natürlich ebenfalls reduzierende, rechtsdrehende Zucker, die mit auf Glykogen umgerechnet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Momente haben wir nun neuerdings Glykogenuntersuchungen in der genannten Tiergruppe vorgenommen. Untersucht wurden: *Eledone*, *Octopus*, *Aplysia punctata* und *Aplysia limacina*. In einem Versuche haben wir zunächst eine mittelgroße *Eledone* nach dem Pflügerschen Verfahren auf Glykogen verarbeitet, indem wir dabei auch den in Kalilauge unlöslichen Rückstand beachteten. Bei strenger Befolgung der Pflügerschen Regeln wurde 1 g

¹⁾ Starkenstein, Über Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. II. Biochem. Zeitschrift, 1912.

«Glykogen» gefunden. «Glykogen» bedeutet hier die sich aus der Zuckerbestimmung nach Hydrolyse des Rohglykogens berechnende Menge Glykogen. Der in Kalilauge unlösliche Rückstand enthielt 1,5 g «Glykogen». Es zeigte sich also zunächst, daß tatsächlich auch bei den Cephalopoden ein Körper gefunden werden kann, der nach dem üblichen Verfahren in die Glykogenfraktion übergeht, daß aber der größere Teil bei der gewöhnlichen Bestimmung durch Adsorption verloren geht. Von der Identifizierung dieses Körpers als Glykogen wird später die Rede sein.

Wir haben ferner in der Leber einer Eledone 0,28 g «Glykogen» gefunden, in den Muskeln desselben Tieres 0,76 g, in toto also 1,04 g. (Die Organe dieses Tieres blieben längere Zeit liegen, ehe sie verarbeitet wurden.)

Weiter konnte aus der Mitteldarmdrüse und dem Darm einer großen *Aplysia limacina* 1,25 g «Glykogen», aus den Muskeln 0,75 g dargestellt werden.

Mit Rücksicht auf die früher erhobenen negativen Befunde war es jedoch nicht gestattet, einfach daraus auf die Gegenwart von Glykogen zu schließen, daß ein mit Alkohol fällbarer Körper erhalten wurde, der nach der Hydrolyse reduziert. Wir haben daher versucht, das Glykogen rein darzustellen, besonders aber auf Verunreinigungen wie Pentosane, tierisches Gummi usw. Rücksicht zu nehmen.

Zu diesem Zwecke wurden die Organe der genannten Tiere in 60%iger Kalilauge bis zur Lösung gekocht. (Eine vollständige Lösung tritt hier nicht ein; es bleibt ein reichlicher, feinflockiger Niederschlag, der aus den oben erwähnten Hydroxyden besteht und eben an der genannten Adsorption schuld ist.) Hierauf wurde mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in heißem Wasser, nach Zusatz einer Spur Essigsäure (bis zur schwach sauern Reaktion) gelöst. Das Filtrat opaleszierte, gab eine zweifelhafte Jodreaktion und auf Zusatz von Alkohol einen grauweißen flockigen Niederschlag. Dieser wurde neuerdings gelöst und die Lösung auf ihr Verhalten geprüft. Die mit Alkohol erzielte Flockung unterschied sich von der des reinen Glykogens dadurch, daß sie schmierig war und der Niederschlag sich zu

Klumpen zusammenballte und fest am Glasstabe haftete. Auch die opaleszierende Lösung hatte einen Stich ins Graue. Setzt man der Lösung Jod-Jodkalilösung zu, so beobachtet man, daß die ersten Tropfen Jod gebunden werden, weiterer Zusatz bedingt jedoch die für Glykogen charakteristische Jodfärbung. Die wässrige Lösung des mit Alkohol gefällten Körpers reduziert nicht, wohl aber äußerst stark nach der Hydrolyse mit HCl. Desgleichen führt Behandlung mit Speicheldiastase bei neutraler Reaktion zum Auftreten eines reduzierenden Körpers. Orcin und Phloroglucin geben nach Hydrolyse mit HCl speziell bei Aplysienlebern die für Pentosen charakteristischen Farbenreaktionen; aber auch in den übrigen Fällen schien die Pentosenreaktion nicht ganz zu fehlen. Wird ein Teil der mit HCl hydrolysierten Lösung bei neutraler Reaktion mit Hefe vergoren, so geht die früher starke Reduktion bis auf einen Rest verloren; vollständig verschwindet sie jedoch nicht. Wird statt mit HCl die Hydrolyse mit Speicheldiastase vorgenommen, so wird nur ein Zucker erhalten, der von Hefe vollkommen vergoren wird. Aus allen diesen Versuchen geht hervor, daß mit dem Alkohol zwei Körper gefällt wurden. Freier Traubenzucker und freie Pentose ist nicht vorhanden, da die Lösung nicht direkt reduziert. Das Verhalten zur Hefe besagt ferner, daß die Hauptmasse des gebildeten Zuckers Traubenzucker ist, daß jedoch kleine Mengen nicht vergärbaren Zucker beigemischt sind. Die Muttersubstanzen derselben sind bei Aplysia zum größten Teil Pentosane, im übrigen aber komplexe aus den Glukoproteiden stammende Glukosamin-derivate. Beide werden nicht durch Diastase, wohl aber durch Mineralsäuren gespalten.

Diese Befunde besagen also, daß die oben als Glykogenwerte angegebenen Zahlen zu hoch sind, da sie die Gesamtsumme der reduzierenden Körper anzeigen. Daß die Befragungen an Pentosen speziell bei Untersuchung der Cephalopoden nur sehr geringe sein können, das bewiesen die Schmelzwerte des Osazons, das wir aus dem Hydrolysat des «Glykogens» gewonnen haben, und die dem des Glukosazons recht nahe standen.

Um einwandfrei zu zeigen, daß tatsächlich reines Gly-

kogen in den untersuchten Tieren vorhanden ist, haben wir das Darstellungsverfahren derart zu modifizieren versucht, daß alle störenden Beimengungen, wie die Pentosane, tierisches Gummi usw., der Alkoholfällung entzogen werden. Was die Pentosen anlangt, so konnten wir uns überzeugen, daß die Pentosenreaktion sehr stark zurückgeht, wenn das bereits gefällte verunreinigte Glykogen längere Zeit in starker Kalilauge gekocht wird. Das von Pflüger angegebene Verfahren bei der Glykogenbestimmung, das lange Kochen in starker Kalilauge, das gar keinen Verlust an Glykogen bedingt, kommt hier besonders zur Geltung. Wir haben daher gleich beim Lösen der Organe in Kalilauge diese durch längere Zeit im Sieden erhalten, als dies sonst im allgemeinen nötig ist. Die Hauptfaktoren, die, wie bereits erwähnt, die quantitative Glykogenbestimmung hier unmöglich machen, liegen in der Bildung der erwähnten komplexen Glukosaminderivate, zu denen sich unter Umständen noch große Mengen eines Pentosans (Rhamnosan) gesellen, das, wie bereits erwähnt, bei den Aplysien reichlich in der Mitteldarmdrüse vorhanden ist. Um alle jene Stoffe, welche bei der Kalilaugebehandlung zum Teil der Zerstörung entgehen, nicht in den Alkoholniederschlag zu bekommen, empfiehlt sich als einfachstes Mittel, die Alkoholfällung nicht, wie gewöhnlich angegeben wird, mit zwei Volumen 96%igen Alkohols vorzunehmen, sondern höchstens mit einem Volumen, zumal nach Gautier¹⁾ Glykogen schon quantitativ gefällt wird, sobald die Lösung 36% Alkohol enthält. Bei einer derartigen Konzentration an Alkohol wird die Mitfällung der genannten Verunreinigungen fast vollkommen vermieden, besonders wenn man außerdem vom Alkoholniederschlag möglichst rasch dekantiert und abfiltriert.

Wenn wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen nochmals überblicken, so ergibt sich zunächst, daß für die Glykogenbestimmung bei Cephalopoden und Aplysien folgende Momente Berücksichtigung finden müssen: Sofortiges Verarbeiten der Tiere; töten und sofort in siedender Kalilauge lange kochen (um die erwähnten Beimengungen des Glykogens möglichst zu

¹⁾ Gautier, Compt. rend. 129, p, 705.

zerstören: dann Fällern mit einem Volumen Alkohol, vom Niederschlag rasch abfiltrieren. Der Niederschlag wird in der üblichen Weise gewaschen und dann in toto mit HCl hydrolysiert und der gebildete Zucker bestimmt. Zur Darstellung von reinem Glykogen muß der Niederschlag natürlich in verdünnter Säure gelöst und mehrfach umgefällt werden. Auch durch bloße wässerige Extraktion der Organe kommt man eventuell zu reinem Glykogen; doch muß Fällung und Lösung sehr oft wiederholt werden, schon wegen der hartnäckig anhaftenden Farbstoffe, und es kommt sehr leicht vor, daß die Ausbeute gleich Null wird. Mitunter gelangt man aber auch auf diesem Wege schließlich doch zu einem vollkommen reinen Glykogen.

Das aus Octopus und Aplysia (Muskel und Leber getrennt) dargestellte Glykogen stellte ein reines weißes Pulver dar, war vollkommen stickstofffrei, löste sich opaleszierend in Wasser, die wässerige Lösung gab auf Jodzusatz die charakteristische Rotfärbung, die beim Erhitzen verschwand, beim Abkühlen wiederkehrte. Diastase bildete bei neutraler Reaktion einen reduzierenden Zucker, ebenso entstand bei der Hydrolyse ein Zucker, der mit Hefe vergor, rechts drehte, keine Pentosenreaktion gab und ein Osazon vom Schmelzpunkt 207° lieferte.

In seiner «Vergleichenden chemischen Physiologie der niederen Tiere» (S. 189) hält v. Fürth die Frage noch unbeantwortet, ob das Molluskenglykogen mit dem Wirbeltierglykogen identisch sei oder nicht.

Wir können unsere Untersuchungen dahin zusammenfassen, daß auch die Cephalopoden und die Aplysien, die bisher als glykogenfrei galten, reichlich Glykogen besitzen. Dieses läßt sich bei Berücksichtigung gewisser methodischer Momente rein darstellen.

Die Frage nach der Identität von Mollusken- und Wirbeltierglykogen kann auf Grund unserer analytischen Befunde dahin beantwortet werden, daß zwischen dem Glykogen der einzelnen Tierarten kein Unterschied besteht.
