

Beitrag zur Biochemie der Protozoen.

II. Mitteilung.

Von

Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 27. Mai 1913.)

Vor einiger Zeit¹⁾ habe ich über die chemische Untersuchung eines parasitisch lebenden Protozoons, der *Goussia gadi* (*Eimeria gadi*) berichtet, welches in der Schwimmblase von gewissen Seefischen (Gadiden) gefunden wird und als gelbe, klebrige, crêmeartige Masse oft die ganze Schwimmblase dieser Fische ausfüllt.

Als sich mir im letzten Winter durch gütige Vermittlung des Herrn Prof. Dr. J. Fiebiger wieder ein solches Material bot, habe ich daran zur Vervollständigung und weiteren Vertiefung der ersten Resultate weitere Untersuchungen vorgenommen.

In erster Linie erschien eine zusammenhängende Untersuchung des Fettes dieser Protozoen wünschenswert, um es mit dem Fette des Wirttieres vergleichen zu können. In der ersten Untersuchung war ferner nichts Kohlenhydratähnliches gefunden worden, es wurde damals das Vorkommen von Mannit vermutet. Die vorliegende Untersuchung war daher speziell auf die genannten Stoffe gerichtet. Endlich sollte die Untersuchung nähere Aufschlüsse über den schwefel- und phosphorfreen Eiweißstoff liefern, aus welchem die Kapseln der Sporen dieser Tiere bestehen.

Das Material, welches verarbeitet wurde, stammte aus den Schwimmblasen von zwei Köhlern (*Gadus virens*) und drei Schellfischen (*Gadus aeglefinus*), welche in frischem (nicht gefrorenem) Zustande nach Wien gelangt waren. Das Gewicht der sorgfältig aus den Schwimmblasen ausgekratzten Masse betrug zusammen 129,4 g. Diese Masse wurde zuerst auf dem Wasserbade getrocknet. Das Gewicht der Trockensubstanz betrug 20,9 g, entsprechend 16,1 %.

Der möglichst fein zerriebene trockene Rückstand wurde im Atherextraktionsapparate drei Tage lang

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 109.

1. mit Äther extrahiert. Das mit Äther extrahierte Pulver wurde darauf nacheinander mit folgenden Lösungsmitteln ausgezogen und zwar mit jedem Lösungsmittel möglichst erschöpfend,
2. mit 95%igem Alkohol,
3. » Wasser,
4. » $\frac{1}{10}$ %iger Salzsäure,
5. » $\frac{1}{10}$ %iger Sodalösung,
6. » $\frac{1}{10}$ %iger Kalilauge,
7. » sehr verdünnter Essigsäure,
8. » heißem Wasser,
9. » 2%iger Kalilauge.

I. Untersuchung des Fettes.

Die Ätherlösung aus dem Ätherextraktionsapparate wurde destilliert, der Destillationsrückstand in einem tarierten Wägeschälchen im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure und Kautschukstückchen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Menge des trockenen Abdampfrückstandes betrug 4,5924 g, entsprechend 3,55% der Coccidienmasse = 21,97% der Trockensubstanz.

Quantitative Bestimmung des Cholesterins. 2,4398 g dieses Fettes wurden in Alkohol gelöst und mit Digitonin (Merck) gefällt. Die Menge des gesammelten, gewaschenen und getrockneten Niederschlages betrug 0,2881 g, entsprechend 0,07003 g freiem Cholesterin. Diese Menge macht 2,87% des Fettes aus.

Das derart vom Cholesterin und weiters in üblicher Weise vom Digitonin befreite Fett wurde in Benzol gelöst, mit Natrium und absolutem Alkohol zuerst bei Zimmertemperatur, nach vollständiger Lösung des Natriums auf dem Wasserbade verseift und, wie schon wiederholt beschrieben worden ist, in Fettsäuren und «unverseifbaren Rückstand» getrennt. Das Gewicht des unverseifbaren Rückstandes betrug 0,8026 g = 32,90%.

Aus diesem unverseifbaren Rückstande wurde wiederum mit Digitonin das Cholesterin abgeschieden. Das Gewicht des Digitonincholesterids betrug 2,6399 g, entsprechend 0,64176 g = 26,30% zu Estern gebundenem Cholesterin.

Das aus beiden Fällungen regenerierte Cholesterin war nach dem Umkrystallisieren farblos, zeigte nun die für Cholesterin charakteristischen Krystallformen und den Schmelzpunkt 145° (korr.). Rechnet man zu dem gewogenen unverseifbaren Rückstände die quantitative bestimmte Menge des freien Cholesterins, so erhält man als gesamten unverseifbaren Rückstand 0,8726 g, entsprechend 35,77%.

Zieht man von dem unverseifbaren Rückstand die Menge des Cholesterins ab, so bleibt ein Rest von 0,1608 g = 6,60%, welcher als die Menge der anderen höheren Alkohole betrachtet werden muß.

Dieser Rest des unverseifbaren Rückstandes von dem Lösungsmittel und dem Digitoninüberschusse getrennt bildete eine gelbe ölige Flüssigkeit, welche nach dem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol unter Anwendung von Tierkohle zu festen, farblosen Schollen wurde, die keine Andeutung einer krystallinischen Struktur zeigten. Bei der Cholestolreaktion lieferten sie zunächst eine rotbraune Farbe, welche erst nach etwa einer Stunde über olivgrün (nicht blau) in smaragdgrün überging. Ein Oxydationsversuch mit Chromsäure in Eisessig führte zu keinem greifbaren Resultate. Dieses Verhalten legt den Gedanken nahe, ob dieser Rest des unverseifbaren Rückstandes nicht vielleicht wenigstens zum Teile aus Stoffen besteht, welche dem Cholesterin nahestehen.

Untersuchung der Fettsäuren. Die Fettsäuren, welche bei der Cholesterinbestimmung abgeschieden worden waren, wurden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure und Kautschukstückchen bis zum konstanten Gewichte getrocknet, ihr Gewicht betrug 1,1862 g. Es scheint mir nicht passend, aus dieser Zahl durch Hinzurechnen des unverseifbaren Rückstandes die Hehnersche Zahl zu berechnen, weil die bei den mannigfaltigen Operationen, welchen diese Fettsäuren unterworfen waren, die Summe der kleinen, unvermeidlichen Verluste, welche jede einzelne Operation mit sich bringt, schon zu sehr ins Gewicht fällt.

Diese Fettsäuren wurden zur Bestimmung ihres durchschnittlichen Molekulargewichtes und ihrer Jodzahl verwendet.

Titration mit Lauge: 0,8815 g Fettsäuren, in Alkohol gelöst, verbrauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein unter Anwendung von Zehntelnormallauge 3,760 ccm Normallauge, entsprechend einem Molekulargewichte von 234,4.

Jodzahl: 0,3047 g Fettsäuren, banden 0,3541 g Jod, entsprechend der Jodzahl 116,2.

Verseifungszahl und Jodzahl des Fettes. 1,9057 g Fett, in Alkohol gelöst, brauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein unter Anwendung von Zehntelnormallauge 1,219 ccm Normallauge, entsprechend der Säurezahl 35,89, und weiter, nachdem sie in üblicher Weise mit alkoholischer Kalilauge verseift worden waren, 3,726 ccm Normallauge, entsprechend der Esterzahl 109,71. Die Verseifungszahl beträgt demnach 145,60.

0,2504 g Fett banden 0,2517 g Jod, entsprechend der Jodzahl 100,5.

Untersuchung auf Seifen. Die getrocknete und mit Äther extrahierte Coccidienmasse wurde, wie schon erwähnt, mit Alkohol ausgezogen. Dieser Alkohol (2) hinterließ beim Verdampfen auf dem Wasserbade einen Rückstand, welcher, mit Wasser behandelt, eine trübe seifige Flüssigkeit lieferte. Diese wurde mit Essigsäure angesäuert und wiederholt mit immer neuen Mengen Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten und filtrierten Petroläther hinterließen beim Abdestillieren einen Rückstand, der nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure und Kautschukstückchen 0,4566 g, entsprechend 0,39% der Coccidienmasse = 2,18% der Trockensubstanz, wog und die für höhere Fettsäuren charakteristischen Reaktionen zeigte.

0,1695 g dieses Rückstandes banden bei der Bestimmung der Jodzahl 0,0815 g Jod; die Jodzahl ist demnach 48,1.

Untersuchung des Muskelfettes von Schellfischen. Die weitere Aufgabe, welche ich mir für das Fett der Coccidien gestellt habe, bestand in der Vergleichung dieses Fettes mit dem Fette des Wirttieres. In dieser Beziehung stehen mir die Angaben aus der Literatur über den Lebertran zur Verfügung. Da aber bekanntlich bei Säugetieren die Zusammensetzung des Fettes verschiedener Organe ein und desselben

Tieres recht verschieden ist, so waren solche Verhältnisse auch bei den Fischen zu erwarten. Ich habe daher als Gegenstück zum Lebertran das Muskelfett des Schellfisches herangezogen. Die Untersuchung dieses Fettes bot insofern wenig Aussicht, als der Fischmuskel recht arm an Fett ist. Immerhin konnte ich aus dem von Haut, Flossen und Gräten befreiten Fleische von zwei Schellfischen durch Extraktion mit Äther soviel Fett gewinnen, daß damit die Verseifungszahl und die Jodzahl bestimmt werden konnten.

Aus 780 g Schellfischfleisch, entsprechend 155 g Trockensubstanz wurden gewonnen 1,7602 g im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknetes Fett, entsprechend 0,226% Fett.

Verseifungszahl: 1,6066 g Fett in Alkohol gelöst brauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein unter Anwendung von Zehntelnormallauge 2,021 ccm Normallauge, entsprechend der Säurezahl 70,59, und weiter, nachdem sie in üblicher Weise mit alkoholischer Kalilauge verseift worden waren, 3,423 ccm Normallauge, entsprechend der Esterzahl 119,54. Die Verseifungszahl beträgt demnach 190,13.

Jodzahl: 0,2102 g Fett banden 0,2160 g Jod, entsprechend der Jodzahl 102,8.

Zusammenstellung der Resultate.

a) Coccidienfett.

Fettmenge	3,55% der Coccidienmasse
Unverseifbarer Rückstand	35,77% des Fettes
Cholesterin, frei	2,87% » »
» zu Estern gebunden	26,30% » »
Andere höhere Alkohole	6,60% » »
Säurezahl des Fettes	35,89
Verseifungszahl des Fettes	145,60
Jodzahl des Fettes	100,5
Durchschnittl. Molekulargew. der Fettsäuren .	234,4
Jodzahl der Fettsäuren	116,2
Fettsäuren zu Seifen gebunden	0,39% der Coccidienmasse
Jodzahl der zu Seifen gebundenen Fettsäuren	48,1

b) Muskelfett vom Schellfisch.

Fettmenge	0,226%
Säurezahl	70,59
Verseifungszahl	190,13
Jodzahl	102,8

Aus dieser Zusammenstellung ist unmittelbar ersichtlich der Reichtum des Coccidienfettes an Cholesterinestern, neben welchen eine verhältnismäßig kleine Menge von freiem Cholesterin erscheint, ferner auch der Reichtum an freien Fettsäuren (Säurezahl).

Wegen der Anwesenheit so großer Mengen von Cholesterinestern ist ein direkter Vergleich dieses Coccidienfettes mit dem Fette des Fisches nicht durchführbar. Um einen Vergleich zu ermöglichen, sind in der folgenden Tabelle die Zahlen für Coccidienfett auf cholesterinfreies Fett umgerechnet worden. Diese Umrechnung darf nur als approximative aufgefaßt werden, indem angenommen wurde, daß die anderen höheren Alkohole dem Cholesterin ähnlich und nicht zu Estern verbunden sind. Der dadurch bedingte Fehler dürfte wohl nicht sehr groß sein. Es wurde demnach von der gesamten Fettmenge (100) die Menge des unverseifbaren Rückstandes (35,77) abgezogen und zu dieser Differenz (64,23) die dem veresterten Cholesterin (26,30) äquivalente Glycerinmenge minus Wasser (0,86) hinzugezählt; auf die so erhaltene Zahl (65,09) wurde Säurezahl, Verseifungszahl und Jodzahl umgerechnet. Von dieser Jodzahl mußte vorher noch die auf den unverseifbaren Rückstand, als Cholesterin betrachtet, entfallende Jodmenge (23,50) abgezogen werden. Diesen berechneten Zahlen werden in der folgenden Tabelle die Zahlen für das Muskelfett des Schellfisches und die Zahlen für Lebertran¹⁾ gegenübergestellt.

	Cholesterinfreies Coccidienfett	Muskelfett vom Schellfisch	Lebertran
a) für das Fett:			
Säurezahl	55,14	70,59	—
Verseifungszahl	223,68	190,13	175,0—189,0
Jodzahl	118,3	102,8	139,6—168,4
b) für die Fettsäuren:			
Molekulargewicht	234,4	—	287,8—292,5
Jodzahl	116,2	—	164,9—170,1

¹⁾ Zitiert nach Benedikt-Ulzer, Analyse der Fette, 4. Auflage, Berlin 1903, S. 723.

Daß die Umrechnung auf cholesterinfreies Coccidienfett ziemlich richtig ist, geht daraus hervor, daß sich aus der so erhaltenen Verseifungszahl unter Berücksichtigung der Säurezahl (die gebundenen Fettsäuren nunmehr durchwegs als zu Glyceriden gebunden betrachtet) für die Fettsäuren ein Molekulargewicht von 241,3 berechnet, welches mit dem direkt bestimmten von 234,4 in Anbetracht der Verhältnisse gut übereinstimmt und daß die berechnete Jodzahl zur Jodzahl der Fettsäuren ungefähr paßt, zumal da nur 3,81 % des Fettes auf den Glycerinrest ($\frac{1}{3}$ Glycerin minus Wasser) kämen. Die für cholesterinfreies Coccidienfett berechneten Zahlen mögen vielleicht in dem eben angedeuteten geringen Maße zu hoch ausgefallen sein.

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich nun, daß die Zusammensetzung der Fettsäuren und Glyceride des Coccidienfettes wesentlich abweicht von der Zusammensetzung des Fettes des Wirttieres. Zwar mag die Jodzahl des Coccidienfettes noch in die Grenzen jener Schwankungen fallen, welche die Zusammensetzung des Fischfettes nach Art, Individualität und Körperregion zeigt. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Fettsäuren ist aber beim Coccidienfette erheblich niedriger als beim Fischfette und dementsprechend die Verseifungszahl erheblich höher.

II. Untersuchung auf Kohlenhydrate.

Bei der Untersuchung auf Kohlehydrate war das Hauptaugenmerk auf den Nachweis von Zuckern und diesen nahestehenden Stoffen (insbesondere Mannit) gerichtet. Diese Stoffe wurden in dem alkoholischen Auszug (2) und dem wässerigen Auszuge (3) gesucht.

Der Abdampfrückstand des alkoholischen Auszuges (2) war, nachdem er in Wasser gelöst worden war, wie schon beschrieben worden ist, mit Petroläther ausgeschüttelt worden. Die vom Petroläther abgezogene Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade eingeengt und nach Zusatz von Toluol anhaltend gegen wiederholt gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert.

Der wässerige Auszug (3) wurde nach dem Einengen auf dem Wasserbade und dem Ansäuern mit Essigsäure gleichfalls

wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt, welcher, wie sich zeigte, kaum Nennenswertes aufnahm. Die vom Petroläther abgelassene wässrige Flüssigkeit wurde zur Entfernung eines darin enthaltenen Eiweißstoffes mit dem doppelten Volumen Alkohol ausgefällt, die filtrierte Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingeeengt und in einen mit Chlorcalcium beschickten Vakuumexsikkator bis zur vollständigen Entfernung des Alkohols gebracht. Dann wurde nach Zusatz von Toluol anhaltend gegenwiederholt gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert.

Die zusammengehörigen Dialysate wurden vereinigt, auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingeeengt und, nachdem sich bei der Prüfung mit der Biuretreaktion gezeigt hatte, daß sie eiweißfrei waren, zunächst auf folgende Reaktionen geprüft:

1. Reduktion von Fehlingscher Lösung.
2. Reduktion von Fehlingscher Lösung, nachdem die zu prüfende Flüssigkeit längere Zeit mit verdünnter Salzsäure gekocht worden war.
3. Reduktion von Fehlingscher Lösung, nachdem die zu prüfende Flüssigkeit mit Schwefelsäure und etwas Kaliumbichromat gekocht worden war (Probe auf Mannit).
4. Molischsche Reaktion mit α -Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure.

Sowohl bei der Prüfung des Dialysates aus dem wässrigen Auszuge (3) als auch bei der Prüfung des Dialysates aus dem alkoholischen Auszuge (2) fielen alle 4 genannten Reaktionen negativ aus.

Nichtsdestoweniger wurden noch mit beiden Flüssigkeiten Fraktionierungsversuche mit Alkohol von verschiedener Konzentration angestellt und die einzelnen Fraktionen, soweit sie nicht aus reinem Kochsalz bestanden, in der beschriebenen Weise geprüft. Alle Proben, ebenso wie Fällungsversuche mit Phenylhydrazin und Bromphenylhydrazin gaben durchwegs negative Resultate, so daß wohl mit einiger Sicherheit gesagt werden kann, daß die Coccidienmasse weder einen Zucker, noch eine den Zuckern nahestehende Substanz enthielt

Es mag nur noch erwähnt werden, daß der Dialysationsrückstand aus dem wässrigen Auszug (3) eine klare Flüssig-

keit bildete, welche beim Verdampfen auf dem Wasserbade eine braune, amorphe Substanz hinterließ. Dieser Abdampfrückstand löste sich in Alkohol nicht, dagegen leicht in Wasser. Die wässerige Lösung zeigte keine Biuretreaktion, sie reduzierte Fehlingsche Lösung nicht. Als sie aber mit verdünnter Salzsäure durch 2 Stunden im Wasserbade erhitzt worden war, wirkte sie auf Fehlingsche Lösung kräftig reduzierend. Man darf danach wohl die Anwesenheit eines im Wasser löslichen Polysaccharids vermuten.

III. Untersuchung des keratinähnlichen Eiweißstoffes der Sporenkapseln.

Der letzte Punkt des aufgestellten Arbeitsprogrammes, welcher sich mit der Ermittlung der Zusammensetzung des schwefel- und phosphorfreen Eiweißstoffes, aus dem die Sporenkapseln bestehen, hätte beschäftigen sollen, konnte leider nicht in der gewünschten Ausdehnung durchgearbeitet werden, weil sich aus der vorliegenden Coccidienmasse diesmal nur recht wenig von diesem Eiweißstoffe abscheiden ließ. Aus dem mit 2%iger Kalilauge bereiteten Auszuge (9) konnten nämlich durch Ausfällung mit Essigsäure, mehrmals wiederholtes Auflösen in 2%iger Kalilauge und Ausfällen mit Essigsäure, schließlich durch Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther nur 1,403 g des gereinigten, trockenen Eiweißstoffes gewonnen werden. Trotz der geringen Menge des Eiweißstoffes wurde dessen Spaltung versucht und zwar wurde zur Spaltung Flußsäure verwendet. Zur Trennung der Spaltungsprodukte voneinander wurden die sonst üblichen Verfahren verwendet, doch mußte die Arbeit bei der fraktionierten Destillation der Aminosäureester abgebrochen werden, weil deren Menge dafür doch allzu gering war.

Mit größerer oder geringerer Wahrscheinlichkeit konnten folgende Spaltungsprodukte nach deren Isolierung nachgewiesen werden:

Lysin, isoliert als Pikrat, daraus übergeführt in das in Nadeln krystallisierende salzsaure Salz.

Histidin, isoliert als Pikrolonat.

Arginin, isoliert als Pikrolonat (Schmelzpunkt 224° C.).

Tyrosin, nach der Isolierung identifiziert durch Krystallform und Millonsche Reaktion.

Glutaminsäure, identifiziert durch Titration des Chlorwasserstoffs nach Volhart in dem salzsauren Salz mit Zwanzigstelnormallösungen:

0,0475 g Salz brauchten 2,59 ccm Zehntelnormalsilberlösung, entsprechend 0,00919 g Chlor.

Gefunden: 19,4% Cl.

Berechnet: 19,32% Cl.

Glykokoll, abgeschieden als salzsaurer Glykokollester.

Die Veröffentlichung der Resultate dieses letzten, gewiß nicht genügend durchgearbeiteten Teiles dieser Untersuchung geschieht nur darum, weil ich nicht weiß, wann ich wieder Zeit und Material für die Wiederaufnahme der Untersuchung dieses Eiweißstoffes finden werde. Doch können diese an sich recht dürftigen Ergebnisse wohl die Vermutung rechtfertigen, daß der keratinähnliche Eiweißstoff der Sporenkapseln in seiner Zusammensetzung doch nicht so einfach ist, wie dies in der ersten Mitteilung vermutet wurde.
