

Beiträge zur Natur der Proteine von Seetieren. Mitteilung III.

Vorläufige Untersuchungen über einen blauvioletten Farbstoff der Meduse *Rhizostoma Pulmo* nebst Bemerkungen über die Einweissnatur der Medusengallerte*, von *Anastasios A. Christomanos*** . Ἀνεκοινώθη ὑπὸ τοῦ κ. Γεωργ. Ἰωακείμογλου.

Die dreikantigen Fortsatzzählliche Gallertige Endkolben welche an einer Zahl von 50-150 an der unteren Körperseite der Meduse *Rhizostoma Pulmo* herabhängen, enthalten in ihrem untersten Ende einen veilchenblauen Farbstoff. Die vorläufigen Ergebnisse der Erforschung der Natur dieses Farbstoffes, sowie diejenigen über die Eissnatur des Gallertigen Hauptkörpers, der sogenannten Mesogloea, sind der Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Experimenteller Teil

A.) Das veilchenblaue Pigment.

An einer grösseren Zahl von Endkolben wird das Farbtragende Ende möglichst kurz abgeschnitten und während einiger Tage bei 4°-5° in Chloroformhaltigen Wasser aufbewahrt. Der Farbstoff löst sich dabei im Wasser mit einer dunkelblauvioletten Farbe auf. Nach Verlauf einer Woche wird die Farbstofflösung vom Niederschlag abfiltriert und die Lösung bei Zimmertemperatur im Vacuumexsiccator zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird wiederholt in destilliertem Wasser aufgenommen und wiederholt getrocknet. Es hinterbleibt ein blauvioletter Rückstand Eiweisshaltiger Natur, der beliebig oft aufgelöst und wieder getrocknet werden kann, ohne irgendwelche augenscheinliche Veränderungen aufzuweisen. Lässt man einige Tropfen der Farbstofflösung auf Filterpapier trocknen, und fügt einige Tropfen Antimontrichloridhaltigen Chloroform dazu, so schlägt die blauviolette Farbe in rein blaue um. Durch H₂O₂ wird die Farbstofflösung entfärbt.

In Chloroform, Aethylalkohol, Aceton, Pyridin, Dioxan, Schwefelkoh-

* (Aus dem Forschungslaboratorium für Biochemie der Meerestiere. Limni, Euboea).

** ΑΝΑΣΤ. Α. ΧΡΗΣΤΟΜΑΝΟΣ: Συμβολαὶ εἰς τὴν μελέτην τῆς φύσεως τῶν θαλασσίων ζώων. Ἀνακοίνωσις III Πρόδρομοὶ ἔρευναὶ ἐπὶ μιᾷ ἰώδους χρωστικῆς τῆς Μεδούσης *Rhizostoma Pulmo* ὡς καὶ παρατηρήσεις τινὲς περὶ τῆς φύσεως τοῦ γελатиνοειδοῦς αὐτῶν σώματος.

Teil aus Protein besteht. Dieses Protein scheint nicht nur adsorptiv an Si gebunden zu sein.

Durch Zusatz von NaOH (pH 12,0) zu dem klarem Filtrat der Medusengallerte, gerinnt das letztere sofort, infolge $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Bildung aus den in der Medusengallerte vorhandenen Ca Salzen. Später erfolgt eine Trennung, indem das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ krystallin ausfällt. In der sich darüber bilden-

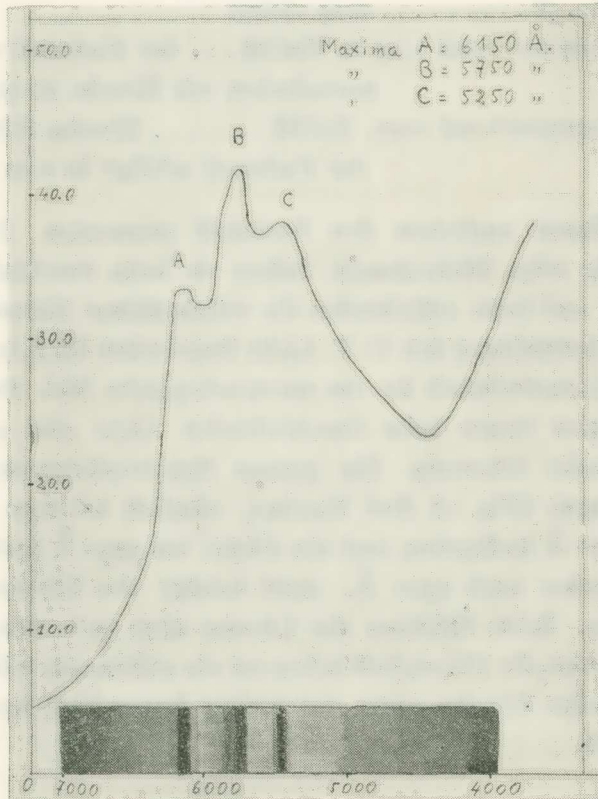


Fig. 1

den Flüssigkeitsschicht, kann die Biuretprobe angestellt werden, die mit rötlich violetter Farbe positiv ausfällt.

Weiterhin gibt die verflüssigte sowohl als genuine Medusengallerte folgende Eiweissreactionen: Schwache Trübungen mit Essigsäure + Ferrocyankalium, Sulfosalicylsäure, Bleiacetat + NaOH Schwache Braunfärbung. Die Millons'sche und Adamkewitz'sche Reaction fallen schwach positiv aus, dagegen sind die Xanthoprotein und Molis'sche Reaction stark positiv.

Mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ bei vollkommenen Sättigung in Substanz, Ausfällung. Der Niederschlag löst sich beim wiederverdünnen.

Der Ph. der genuinen Gallerte ist zu 7,6 bis 7,8 gefunden worden. Zusatz von Alkali bei Zimmertemperatur ruft keine Veränderungen hervor, dagegen wird die Gallerte bei Säurezusatz schon in der Kälte gelöst.

Die bei der Siedehitze durch NaOH ausgetriebene NH_3 Menge beträgt

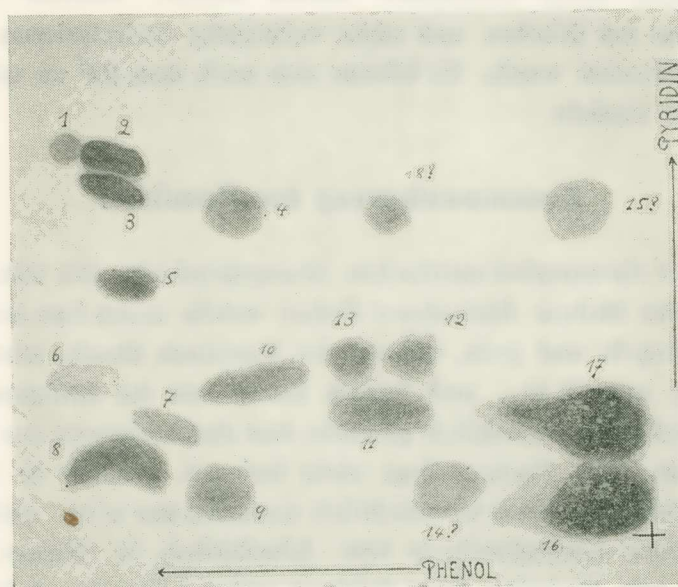


Fig. 2

- | | | |
|-----------------|---------------|-------------------------|
| 1. Phenylalanin | 7. Methionin | 13. Threonin ? |
| 2. Isoleucin | 8. Arginin | 14. Unbekannt |
| 3. Leucin | 9. Lysin ? | 15. NH_4 Salze |
| 4. Tyrosin | 10. Alanin | 16. Asparaginsäure |
| 5. Valin | 11. Glykokoll | 17. Glutaminsäure |
| 6. Prolin | 12. Serin | 18. Glykosamin |

2-3 mg % des frischen Gewebes. Der Gesamt N Gehalt wurde zu 20,0-26,0 mg. % im frischen Gewebe der im Euboesischen Meerbusen aufgefundenene *Rhizostoma Pulmo* bestimmt. Trotz des Wassergehaltes von über 95,9 %, ist das Protein der Medusengallerte als ein sehr Stickstoffarmes zu betrachten, ca. 8-9,8 % N der salzhaltigen Trockensubstanz. Dieser Befund entspricht den Angaben anderer Autoren, die von einem Chitinartigen Protein sprechen. Die Chromatographische Analyse der Gallerte nach Hydro-

lyse ergab¹, (nach abfallender Intensität der Ninhydrinreaction der Reihe nach geordnet) folgende Aminosäuren: Glutaminsäure, Leucin, Isoleucin, Valin, Asparaginsäure, Arginin, wahrscheinlich Lysin, Methionin als dessen Sulfoxyd bestimmt, Alanin, Glykokoll, Serin, Threonin oder eine andere den gleichen RF zeigende Aminosäure, Tyrosin, Cysteinsäure, und zwei andere positive Ninhydrinreaction gebende Substanzen, von denen die eine (No. 14) nicht weiter identifiziert werden konnte, während die andere (No. 18) nur bei frischen und nicht vollständig hydrolysierten Medusengallerten gefunden wurde. Es könnte sich nach dem RF zu urteilen um, Glukosamin handeln.

Zusammenfassung der Resultate

Aus der Spectrophotometrischen Absorptionskurve des veilchenblauen Pigmentes der Meduse *Rhizostoma Pulmo* welche durch ihre drei Maxima, in rot, grüngelb und grün, denen der Karotinen ähnelt, sowie aus der Entfärbung mit H_2O_2 , und letzten Endes aus der Antimontrichloridreaction wird es wahrscheinlich gemacht dass dieses Pigment den Karotinen verwandt ist. Das Pigment liegt nicht frei vor, sondern es ist an ein Protein gebunden. Dieses ist ersichtlich einesteils aus seiner unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln bzw. Löslichkeit in Wasser, anderenteils durch sein Verhalten beim Erhitzen seiner Lösungen, wobei Eiweiss ausfällt².

Die Medusengallerte enthält Si und Ca, von denen das erstere nicht adsorptiv an Eiweiss gebunden zu sein scheint, während das letztere ein charakteristisches festwerden der verflüssigten Gallerte nach NaOH Zusatz hervorruft. Ausser den üblichen Aminosäuren, wurden zwei Ninhydrinreaction gebende Körper Chromatographisch festgestellt, welche infolge ihrer minimaler Konzentration nicht näher untersucht werden konnten.

¹ Die Hydrolyse mit 5n HCl bei 100° im geschmolzenen Rohr ergab grosse Mengen einer Melaninartigen Substanz.

² Die Farbe dieses Pigmentes verändert sich, in Gegensatz zu dem rotviolettem Farbstoff der Actinie *Adamsia*, nicht beim Trocknen seiner Lösungen. *Nature*, Vol. 171. p. 886. 1953.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Ι Σ

Ἡ εἰς τὰς ἡμετέρας θαλάσσας εἰς μεγάλας ποσότητας ἀνευρισκομένη, ἰδίως κατὰ τὸ φθινόπωρον, Μέδουσα — *Rhizostoma Pulmo* — φέρει εἰς τὸ κάτω μέρος τοῦ σώματός της 50-150 γελατινοειδεῖς ἀπολήξεις, ἐν εἶδει ψευδοποδίων, αἵτινες καταλήγουν εἰς ἐντόνωσ ἰώδες κεχρωσμένον ἄκρον. Ἡ ἐν αὐτοῖς χρωστικὴ δύναται νὰ παραληφθῇ δι' ὕδατος χλωροφορίου $3^{\circ}-4^{\circ}$ εἰς διάστημα ἡμερῶν τινων προσδίδουσα εἰς αὐτὸ βαθέως ἰώδη χροιάν. Δι' ἐπανειλημμένων διηθήσεων καὶ ἔξατμίσεως τοῦ ὕδατος ἐν τῷ κενῷ καὶ ἀναδιαλύσεων εἰς ἀπεσταγμένον ὕδωρ λαμβάνεται τελικῶς ἰώδες ὑπόλειμμα ἀδιάλυτον εἰς τὰ συνήθη ὀργανικὰ διαλυτικὰ μέσα, ἀλλ' ἐνκόλως διαλυτὸν ἐν τῷ ὕδατι μὲ λαμπρὸν ἰώδη χροιάν. Τὸ ὑδατικὸν τοῦτο διάλυμα δεικνύει διχρωισμόν — πορφυροῦν εἰς τὸ διερχόμενον φῶς καὶ ἰώδες εἰς τὸ ἐπιπίπτον —, θερμαινόμενον δὲ ἄνω τῶν 50° ἀποσυντίθεται λαμβάνον καστανοκιτρίνην χροιάν, καταστρεφομένης τῆς χρωστικῆς σὺν τῇ συγχρόνῳ κατακρημνίσῃ λευκώματος. Προσθήκη H_2O_2 εἰς διάλυμα χρωστικῆς ἀποχρωματίζει τοῦτο. Ἐὰν σταγόνες ὑδατικοῦ διαλύματος τῆς ἰώδους χρωστικῆς ἀφαιροῦν νὰ ξηρανθοῦν ἐπὶ διηθητικοῦ χάρτου καὶ προστεθῇ εἶτα μία σταγὼν χλωροφορίου ἐνέχουσα ἀντιμωνιοτριχλωρίδιον, ἡ ἰώδης χρωστικὴ μεταβάλλεται πάραυτα εἰς κνανῆν.

Ἡ ἰώδης χρωστικὴ κέκτηται χαρακτηριστικὸν φάσμα ἀπορροφῆσεως μὲ τρία μέγιστα. Τὸ πρῶτον εὑρεθαι εἰς τὸ ἐρυθρὸν εἰς 6150 \AA , τὸ δεύτερον καὶ ἐντονώτερον εἰς τὸ κίτρινοπράσινον εἰς 5750 \AA καὶ τὸ τρίτον εἰς τὸ πράσινον εἰς 5250 \AA . (ἰδὲ σχετ. εἰκ. 1).

Ἐκ τῶν ἀνωτέρω ἐκτεθέντων καθίσταται πιθανὸν ὅτι ἡ χρωστικὴ τῶν *Rhizostoma Pulmo* εἶναι ἀφ' ἐνὸς μὲν συνδεδεμένη πρὸς λεύκωμά τι — διάσπασις κατὰ τὴν θέρμανσιν — ὑπὸ τύπον χρωμοπρωτεΐδης, ἀφ' ἑτέρου ἡ χρωστικὴ δεικνύει πολλὰς ὁμοιότητας πρὸς τὰς καροτίνας μετὰ τῶν ὁποίων ἔχει παρεμφερὲς φάσμα ἀπορροφῆσεως, τὴν αὐτὴν ἀντίδρασιν μετὰ H_2O_2 , ὡς καὶ ἀντιμωνιοτριχλωριδίου.

Ἐξ ἑτέρου ἡ γελατινώδης μᾶζα τοῦ σώματος τῆς Μεδούσης ἀνευρέθη ἐνέχουσα μεγάλην σχετικῶς ποσότητα Si, ὅπερ πιθανῶς δὲν εὑρίσκεται μόνον προσροφητικῶς συνδεδεμένον πρὸς τὸ λεύκωμα. Εἶναι περαιτέρω λίαν χαρακτηριστικὴ ἡ ἀντίδρασις, καθ' ἣν διὰ προσθήκης διαλύματος NaOH εἰς ἐλαφρῶς ὑδρολυθέντα ἱστὸν Μεδούσης, ἐπέρχεται πάραυτα πῆξις ὅλου τοῦ διαλύματος ἐκ σχηματισμοῦ κολλοειδοῦς $Ca(OH)_2$.

Ὁ γελατινώδης ἱστὸς εὑρέθη ἐνέχων $2-3 \text{ mg } \%$ NH_3 καὶ $20-26 \text{ mg } \%$ ὀλικὸν N. Ἡ διὰ 5 καν. HCl εἰς τοὺς 100° ὑδρόλυσις ἐντὸς κλειστοῦ σωλῆνος ἀπέδωκε μεγάλην ποσότητα μελανίνης ἢ σχετικοῦ πρὸς αὐτὴν σώματος. Χρωμα-

τογραφικῶς διεπιστώθη πλὴν τῆς ὑπάρξεως ὠρισμένων κοινῶν εἰς τὰ λευκώματα ἀμινοξέων καὶ δύο ἐτέρων μετὰ τῆς νινυδρίνης ἀντιδρώντων σωμάτων, τῶν ὁποίων ὅμως ἡ χημικὴ σύστασις ἔνεκα τῆς ἐλαχιστοτάτης ποσότητος αὐτῶν δὲν κατέστη δυνατὸν νὰ διευκρινηθῇ. Εἷς τινὰ χρωματογραφήματα ἀνευρέθη γλουκοζαμίνη (ιδὲ ἀριθμ. 18 εἰκ. 2.) σημειουμένη καὶ διὰ ἐρωτηματικοῦ, καθόσον δὲν ἀνευρέθη πάντοτε.

Ἐπιφυλασσόμεθα νὰ ἐπανέλθωμεν ἰδίως ἐπὶ τοῦ ζητήματος τῆς φύσεως τῆς ἰώδους χρωστικῆς, καθ' ὅτι δυσμενεῖς καιρικαὶ συνθήκαι δὲν ἐπέτρεψαν τὴν συλλογὴν ἐπαρκοῦς πρὸς ἐπεξεργασίαν ποσότητος.

(Ἐκ τοῦ ἐρευνητικοῦ ἐργαστηρίου βιοχημείας θαλασσίων ζώων ἐν Λίμνῃ Εὐβοίας)