

6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

66

Vol. V. No. 1.

東京帝國大學  
農科大學紀要  
第五卷第一號

JOURNAL

OF THE

COLLEGE OF AGRICULTURE,

IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

TOKYO.

PUBLISHED BY THE UNIVERSITY.

OCTOBER 24TH, TAISHO I (1912).

大正  
11.22.  
内交

始





PUBLISHING COMMITTEE.

PROF. Y. KOZAI, Nōgaku-hakushi, Director of the College (ex officio).  
PROF. C. ISHIKAWA, Ph. D., Rigaku-hakushi.  
PROF. U. SUZUKI, Nōgaku-hakushi.

CONTENTS.

U. SUZUKI und Mitarbeiter:—Ueber die Extraktivstoff des Fischfleisches und Muscheln ... 1  
Y. OKUDA:—Quantative Determination of Creatine, Creatinine and Monoamino-Acids in certain Fishes, Mollusca and Crustacea ... 25  
U. SUZUKI, C. YONEYAMA und S. ŌDAKE:—Ueber die chemische Zusammensetzung des "Salzbreies" von Bonito ("Shiokara") ... 33  
Y. OKUDA:—Chemical Studies on the Ripening of "Shiokara" ... 43  
T. YABUTA:—On Koji Acid, a new organic Acid from Aspergillus Oryzae ... 51  
U. SUZUKI, und S. MATSUNAGA:—Über das Vorkommen von Nikotinsäure (m-Pyridincarbonsäure) in der Reiskleie ... 59  
Z. MIMUROTO:—Über das Vorkommen von Adenin und Asparaginsäure in Maulbeerblättern ... 63  
R. INOUE:—A Contribution to the study of the Chemical Composition of the Silkworm at different Stages of its Metamorphosis... 67  
S. MURAMATSU:—On the Preparation of Natto ... 81

All communications relating to this Journal should be addressed to the Director of the College of Agriculture.

Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches und der Muscheln.

VON  
U. Suzuki und Mitarbeitern.

Die vorliegende Arbeit ist die Fortsetzung einer Mitteilung, die vor drei Jahren in HORTI-SAYDOR'S Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 62, Heft 1 (1909) erschienen ist.

Die Methoden, die wir zur Isolierung der stickstoffhaltigen Stoffe angewendet, waren im grossen und ganzen dieselben, wie in der früheren Mitteilung. Deshalb haben wir die genaue Beschreibung derselben nicht angegeben.

Untersucht wurden das frische Fleisch von Sardinen, Maguro (*Thyrsites thuyatis*), Tai (*Pagrus major*), Krabben, Hamaguri (*Callinectes muricus* L.) und Austern.

Als Hauptergebnisse dieser Arbeit haben wir aus Krabben- und Taifleisch eine Base "Karrin"  $C_{12}H_{17}N_2O$  isoliert, die mit dem Lysin nicht identisch ist. Ferner wurde die Verheilung von Beton, Tryptophan, Indolacetylamin, Histidin, Karrin, Alanin, Tyrosin, Leucin, Prolin, usw. nachgewiesen.

I. Sardinen.

VON U. SUZUKI und M. MURAMATSU.

2 Kilo frisches, von Haut, Gebein und inneren Organen befreites Fleisch von Sardinen wurden dreimal mit warmem Wasser (50-60°C) trübbert. Die Auszüge betragen im Ganzen 3,4 l.

Die Arbeit ist schon in einem Theil in der Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 62, No. 1 (1909) veröffentlicht worden. Vol. 62, No. 1 (1909) Vol. 62, No. 2 (1909) Vol. 62, No. 3 (1909) Vol. 62, No. 4 (1909) Vol. 62, No. 5 (1909)



Prof. Y. KOBAYASHI,  
Prof. G. ISHIZAWA,  
Prof. U. SUZUKI,

- U. SUZUKI und M. MIHATA:—Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches und der Muscheln.  
Y. OKUDA:—Quantitative Bestimmung der Monosäure- und Diaminmonosäure in der Fischfleisch-Extrakt.  
U. SUZUKI, G. YOSHIZAWA und H. GOTO:—Zur Zusammensetzung des "Kaniirin" aus Krabbenfleisch.  
Y. OKUDA:—Chemical Studies on the Isolation of "Kaniirin" from Crab Meat.  
T. YABUTA:—On Kofu Acid, a new organic acid from *Oryza*.  
U. SUZUKI und S. MATSUNAGA:—Über das Vorkommen von m-Pyridin-carbonsäure (m-Pyridin-carbonsäure) in der Beisäure.  
Z. MIMURO:—Über das Vorkommen von Adenin und Guanin in Maulbeerblättern.  
H. INOUE:—A Contribution to the study of the Chemistry of the Silkworm at different Stages of its Development.  
S. MURAMATSU:—On the Preparation of Nitro-

All communications relating to this Journal should be sent to the  
Director of the College of Agriculture,

## Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches und der Muscheln<sup>1</sup>.

Von

U. Suzuki und Mitarbeitern.

Die vorliegende Arbeit ist die Fortsetzung einer Mitteilung, die vor drei Jahren in HOPPE-SEYLER'S Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 62 Heft 1 (1909) erschienen ist.

Die Methoden, die wir zur Isolierung der stickstoffhaltigen Stoffe anwendeten, waren im grossen und ganzen dieselben, wie in der früheren Mitteilung. Deshalb haben wir die genaue Beschreibung derselben nicht angegeben.

Untersucht wurden das frische Fleisch von Sardinen, Maguro (*Thynnus thynnus*), Tai (*Pagrus major*), Krabben, Hamaguri (*Cytheria meretrix* L.) und Austern.

Als Hauptergebnisse dieser Arbeit haben wir aus Krabben- und Taifisch eine Base "Kaniirin"  $C_8H_{14}N_2O_2$  isoliert, die mit dem Lysin nicht identisch ist. Ferner wurde die Verbreitung von Betain, Tryptophan, Imidazoläthylamin, Histidin, Karnosin, Alanin, Tyrosin, Leucin, Prolin, u. s. w. nachgewiesen.

### I. Sardinen.

Von U. SUZUKI und M. MIHATA.

2 Kilo frisches, von Haut, Gräten und inneren Organen befreites Fleisch von Sardinen wurden dreimal mit warmem Wasser (50–60°) extrahiert. Die Auszüge betragen im Ganzen 3,4 l.

<sup>1</sup> Diese Arbeit ist schon vor einigen Jahren in The Journal of the Tokyo Chemical Society publiziert worden. Vol. 30. No. 9. (1909) Vol. 31. No. 6. u. No. 7. (1910).  
[Jour. Coll. Agric., Vol. V. No. 1, 1912.]



Die quantitative Bestimmung gab folgendes Resultat:

	In 100 Teilen Trockensubstanz des Extraktes.	Gesamtstickstoff als 100 berechnet.
Gesamtstickstoff	4,32	100,00
Eiweisstickstoff	1,32	30,55
Basenstickstoff	2,24	50,18
Stickstoff in anderer Form	0,76	19,27

Der wässrige Extrakt wurde mit Essigsäure schwach angesäuert (bis die Flüssigkeit ca. 2% Essigsäure enthielt) und mit Tannin versetzt. Das Filtrat vom Tannin-Niederschlag wurde durch Baryt von Tannin befreit, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt.

#### A. DER PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Man zerlegte den Niederschlag in bekannter Weise mit Baryt und entfernte den Überschuss von Baryt durch Schwefelsäure. Die so erhaltene alkalische Flüssigkeit wurde mit Kohlensäure gesättigt und mit Quecksilberchlorid gefällt.

(1). Der Quecksilberchlorid-Niederschlag (Histidin). Aus diesem Niederschlag erhielt man das reine Histidin als salzsauren Methylester. Zu diesem Zwecke wurde der Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Quecksilbersulfid abfiltriert und bei vermindertem Druck bis zum Trocknen eingedampft. Der zurückgebliebene Syrup wurde mit wenig Methylalkohol versetzt und wieder eingedampft, um das Wasser vollständig auszutreiben. Man setzte dann wasserfreien Methylalkohol zu und leitete trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein. Nach dem Eindampfen im Vakuum schied sich das Histidin als methylester-salzaures Salz aus. Die Ausbeute betrug 5,8%. Zur Reinigung wurde das Salz in heissem Methylalkohol gelöst und durch Zusatz von Aethylalkohol und Aether ausgeschieden.

0,1040 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0303 <sub>g</sub> Cl			
0,1238 <sub>g</sub> „ „	19,2 <sup>c.c.</sup> N (19° 758 <sup>mm</sup> )			
0,1424 <sub>g</sub> „ „	0,1804 <sub>g</sub> CO <sub>2</sub>	0,0714 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O		
	C	H	N	Cl
C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 2HCl. Ber.	34,67	5,45	17,36	29,34
Gef.	34,48	5,64	17,78	29,13

Es entspricht also dem salzsauren Methylester des Histidins. Das Salz besteht aus farblosen Prismen; zersetzt sich bei 198° (unkorr.) unter Schäumen. Es ist in Wasser und in Methylalkohol leicht, in Aethylalkohol etwas schwerer und in Aether nicht löslich. Die wässrige Lösung gibt eine weisse Fällung mit Millon'schem Reagenz und eine intensive rote Färbung mit alkalischer Diazobenzolsulfonsäure. Sie gibt auch Biuretreaktion beim Erwärmen.

0,589<sub>g</sub> Methylestersalz in 9,9708<sub>g</sub> Wasser gelöst, drehte im 10<sup>mm</sup> Rohr das Natriumlicht 0,73° nach rechts. Das spez. Gew. der Lösung war 1,0163.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D = +14,5^\circ$$

Wird das methylester-salzaure Salz des Histidins in wenig Wasser gelöst und langsam eingedampft, so wird der Ester zum Histidindichlorid verseift, welches aus heisser methylalkoholischer Lösung durch Zusatz von Aether als farblose Prismen sich ausscheidet. Es schmilzt bei 234° (unkorr.) ohne Schäumen. Für die Analyse wurde es im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1485 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0459 <sub>g</sub> Cl
0,1372 <sub>g</sub> „ „	21,4 <sup>c.c.</sup> N (19° 765 <sup>mm</sup> )

	N	Cl
C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 2HCl. Ber.	18,42	31,11
Gef.	18,05	30,95

0,6981<sub>g</sub> Histidindichlorid in 19,869<sub>g</sub> Wasser gelöst, bei einem sp. Gew. von 1,0144, drehte im 20<sup>mm</sup> Rohr das Natriumlicht 1,04° nach rechts.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D = +15,1^\circ$$

(2). Das Filtrat vom Quecksilberchlorid-Niederschlag des Histidins wurde mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Der braune Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, bei vermindertem Druck stark eingedampft und unmittelbar mit Pikrinsäure erwärmt. Nach dem Erkalten schied sich das Kreatininpikrat als hellgelbe Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 1,9%. Für die Analyse wurde es aus heissem Wasser umkristallisiert und im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1582 <sub>g</sub> Subst. gaben	32,7 <sup>c.c.</sup> N (15° 761 <sup>mm</sup> )
0,1324 <sub>g</sub> „ „	0,1708 <sub>g</sub> CO <sub>2</sub> 0,0422 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O



	C	H	N
$C_4H_7N_3O$ . $C_6H_5N_3O_7$ . Ber.	35,08	2,92	23,54
Gef.	35,18	3,58	24,24

Das Pikrat zersetzt sich bei 214° (unkorr.) In kaltem Wasser ist es schwer löslich. Die wässrige Lösung gibt eine rote Färbung durch Zusatz von Alkalien.

Aus dem Pikrate wurde das Platinchloriddoppelsalz des Kreatinins dargestellt.

0,2031 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0637 <sub>g</sub> Pt
	Pt
$(C_4H_7N_3O.HCl)_2.PtCl_4$ Ber.	31,03
Gef.	31,35

Ferner wurde das charakteristische Zinkchloriddoppelsalz des Kreatinins dargestellt.

(3). Das Filtrat vom Silbernitrat und Baryt-Niederschlag wurde in gewöhnlicher Weise wieder mit Phosphowolframsäure gefällt. Nach Zerlegung des Niederschlages erhielt man 3,7<sub>g</sub> Karnosinpikrat, welches aus heissem Wasser umkristallisiert, im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert wurde.

0,5083 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,2582 <sub>g</sub> Pikrinsäure
0,1082 <sub>g</sub> „ „	19,4 <sup>c.c.</sup> N (13°, 764 <sup>mm</sup> )
0,1282 <sub>g</sub> „ „	0,1287 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub> 0,0455 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O

	C	H	N	Pikrinsäure
$C_9H_{14}N_4O_5$ . $C_6H_5N_3O_7$ Ber.	39,56	3,74	21,54	50,33
Gef.	39,75	3,98	21,31	50,81

Im Kapillarrohr erhitzt wird es gegen 200° braun und zersetzt sich bei 218° (unkorr.)

Das Nitrat des Karnosins besteht aus farblosen Prismen, schmilzt bei 211° (unkorr.) Es löst sich in Wasser leicht, etwas schwerer in Alkohol und ist fast unlöslich in Aether.

0,4136<sub>g</sub> Subst. gaben 0,5357<sub>g</sub> Nitronnitrat (nach Nitron-Verfahren)

	H N O <sub>3</sub>
$C_9H_{14}N_4O_5$ . $H N O_3$ Ber.	21,80
Gef.	21,75

#### B. DAS FILTRAT VOM PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Das Filtrat vom Phosphowolframsäure-Niederschlag wurde durch Baryt von Phosphowolframsäure und Schwefelsäure befreit und bei niederem Druck stark eingedampft. Man erhielt dabei 1,7<sub>g</sub> Tyrosin.

0,1524 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,3352 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,0867 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,1785 <sub>g</sub> „ „	11,8 <sup>c.c.</sup> N (18°, 766 <sup>mm</sup> )	

	C	H	N
$C_9H_{11}N O_2$ Ber.	59,67	6,07	7,73
Gef.	59,98	6,38	7,67

Es bildet seidenglänzende Nadeln, ist ziemlich schwer löslich in Wasser, gibt sowohl starke Millon'sche Reaktion, wie auch Pauly'sche Diazoreaktion.

0,5763<sub>g</sub> Tyrosin in 23,630<sub>g</sub> 10%iger Salzsäure gelöst, bei einem sp. Gew. von 1,016, drehte das Natriumlicht 0,63° nach links.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D = -14,8^\circ$$

Es war also l-Tyrosin.

Die Mutterlauge des Tyrosins lieferte, nach der Estermethode verarbeitet, 0,23<sub>g</sub> Leucin. Aus heissem Wasser umkristallisiert, bildete es glänzende schuppenförmige Kristalle von schwach bitterem Geschmack. Zur Analyse reichte das Material nicht aus.

Aus 2 Kilo frischem Sardinenfleisch wurden isoliert:

Histidinmethylester	5,8 <sub>g</sub>
Kreatininpikrat	1,9 <sub>g</sub>
Karnosinpikrat	3,7 <sub>g</sub>
Tyrosin	1,7 <sub>g</sub>
Leucin	0,23 <sub>g</sub>

## II. Maguro (Thynnus thynnus).

VON U. SUZUKI UND S. ŌTSUKI.

Schon vor zwei Jahren hat einer von uns gemeinsam mit M. YAMAKAWA aus frischem Magurofleisch, Kreatin, Histidin und Karnosin isoliert und das Vorhandensein von Alanin nachgewiesen. Bei der Wiederholung dieses



Versuches mit etwas modifizierter Methode ist es uns gelungen, ausser den oben genannten Stoffen noch Kreatinin und Imidazoläthylamin zu isolieren. Zu diesem Zwecke wurden 3 Kilo frisches Magurofleisch (=900<sub>g</sub> Trockensubstanz) wiederholt mit warmem Wasser extrahiert. Der gesamte Extrakt, der ungefähr 12 Liter betrug, wurde mit einer 20%igen Tanninlösung versetzt. Der dabei entstandene dickbraune Niederschlag, der den Hauptanteil des Imidazoläthylamins mitreissst, wurde abgesaugt und mit 5%iger Schwefelsäure verrieben. Ein Teil des Niederschlages wurde dabei gelöst und die letztgenannte Base ging in Lösung über. Man filtrierte nun ab, und versetzte mit überschüssigem Baryt, um Tannin und Schwefelsäure zu entfernen. Die vom entstandenen Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wurde nach dem Entfernen des Baryts mittels Schwefelsäure bei vermindertem Druck bis auf 100° eingedampft, mit wenig Tierkohle entfärbt und mit Pikrinsäure versetzt. Es schied sich dabei das Pikrat des Imidazoläthylamins aus, welches aus heissem Wasser unkristallisiert, gelbbraune, glänzende, rhombische Tafeln bildete. Die Ausbeute betrug ca. 2,5<sub>g</sub>. Es löste sich in kaltem Wasser schwer. Im Kapillarrohr erhitzt, verwandelte sich die Farbe gegen 210° allmählich zu schwarzbraun und zersetzte sich bei 220° (unkorr.) unter Schäumen.

Für die Analyse wurde das Pikrat im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1522 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,2017 <sub>g</sub> $CO_2$	0,0390 <sub>g</sub> $H_2O$
0,1349 <sub>g</sub> „ „	25,6° $N$ (15° 756 <sup>mm</sup> )	
0,4525 <sub>g</sub> „ „	0,3660 <sub>g</sub> Pikrinsäure	

$C_5H_9N_3(C_6H_3O_7)_2$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		35,86	2,63	22,14	80,50
	Gef.	36,14	2,85	22,11	80,88

Aus dem Pikrate wurde das Platinchlorid doppelsalz der Base dargestellt. Es bestand aus gelbbraunen Prismen, die keinen Schmelzpunkt hatten. Im Kapillarrohr erhitzt, verkohlte es gegen 240° ohne Schäumen.

Analyse des Platinchloriddoppelsalzes (im Vakuum bei 100° getrocknet)

0,2070 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0775 <sub>g</sub> $Pt$
0,1644 <sub>g</sub> „ „	12,2° $N$ (18,5° 755 <sup>mm</sup> )

$C_5H_9N_3, H_2PtCl_6$	Ber.	N	Pt
		8,07	37,47
	Gef.	8,49	37,44

Das Nitrat der Base bestand aus farblosen Prismen, welche in Wasser leicht, in Alkohol etwas schwerer und in Aether unlöslich waren. Es schmolz bei 145° zu einem durchsichtigen Öle und zersetzte sich bei 165° (unkorr.) unter Schäumen. Die Bestimmung der Salpetersäure in dem Nitrat wurde nach dem Nitron-Verfahren ausgeführt.

Analyse des Nitrats (im Vakuum bei 100° getrocknet):—

0,1573 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,500 <sub>g</sub> Nitron-nitrat
----------------------------------	----------------------------------

$C_5H_9N_3 \cdot 2HN O_3$	Ber.	$HN O_3$
		53,2
	Gef.	53,0

Die Analyse stimmt also mit der Formel  $C_5H_9N_3$ , dem Imidazoläthylamin überein. Da das Magurofleisch reich an Histidin ist, so ist es wohl möglich, dass es durch  $CO_2$ -Abspaltung in die letztgenannte Base übergeht. Bloss die Frage, ob diese Umwandlung im lebendigen Gewebe, ohne Bakterienwirkung stattfindet, können wir noch nicht entscheiden. Dass es durch Fäulnisprozess aus Histidin entsteht, ist neulich von D. ACKERMANN<sup>1</sup> festgestellt worden. Auch K. YOSHIMURA<sup>2</sup> hat diese Base aus faulenden Sojabohnen nachgewiesen.

Das Filtrat vom Tannin-Niederschlag wurde mit überschüssigem Baryt versetzt, vom entstandenen Niederschlag abfiltriert und nach dem Entfernen des Baryts mittels Schwefelsäure, bei vermindertem Druck, stark eingedampft und mit Alkohol versetzt. Nach einigen Tagen schieden sich 9,56<sub>g</sub> reines Kreatin aus.

Die Mutterlauge des Kreatins wurde mit gesättigter Quecksilberchlorid lösung und Natriumacetat versetzt. Der entstandene weisse Niederschlag wurde abgesaugt, mit verdünnter Salzsäure erwärmt und abfiltriert. Das Filtrat wurde durch Einleiten des Schwefelwasserstoffs vom Quecksilber

<sup>1</sup> D. ACKERMANN: HOPPE-SEYLER'S Zeitschrift f. Physiol. Chem. Bd. 65. Heft 6. (1910). Vergl. auch ACKERMANN und H. KUTSCHER: Z. f. Biologie Bd. 54 pag. 387.

<sup>2</sup> K. YOSHIMURA: Biochem. Zeitsch. 23. 16 (1910).



befreit, und bei verminderten Druck eingedampft. Es schieden sich dabei farblose Kristalle aus, welche zum Teil aus anorganischen Salzen bestanden. Durch Behandlung mit warmem Methylalkohol gelang es die organischen Substanzen von den anorganischen zu trennen. Nach dem Eindampfen der methylalkoholischen Lösung schied sich zuerst das salzsaure Kreatinin aus. Die Mutterlauge desselben lieferte bei weiterem Einengen und Verreiben mit absolutem Alkohol 10,44<sub>g</sub> salzsaures Histidin. Von der Mutterlauge des Histidinchlorids erhielt man noch etwas Kreatinin und ca 1,5<sub>g</sub> Imidazoläthylamin als pikrinsaure Salze. Durch fraktionierte Kristallisation konnte man die beiden Salze von einander trennen.

Das Kreatininpikrat bestand aus gelben Nadeln, mit dem Schmelzpunkt 211—212° C (unkorr.) Die Analyse desselben gab folgendes Resultat:—

0,1049 <sub>g</sub> Subst. gaben	21,8 <sup>c.c.</sup> N (10° 758 <sup>mm</sup> )
0,1561 <sub>g</sub> „	0,1969 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub> 0,0510 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O

$C_4H_7N_3O, C_6H_3N_3O_7$	Ber.	C	H	N
		35,08	2,92	24,54
	Gef.	35,01	3,69	24,71

Das Imidazoläthylaminpikrat:

0,1550 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,2043 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,0411 <sub>g</sub>
0,1121 <sub>g</sub> „	21,7 <sup>c.c.</sup> N (18° 752 <sup>mm</sup> )	
0,5653 <sub>g</sub> „	0,4590 <sub>g</sub> Pikrinsäure	

$C_5H_9N_3, 2 C_6H_3N_3O_7$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		35,86	2,63	22,14	80,50
	Gef.	35,95	2,96	22,12	81,04

Das Platinchloriddoppelsalz.

0,1978<sub>g</sub> Subst. gaben 9,0742<sub>g</sub> Pt.

$C_5H_9N_3, H_2PtCl_6$	Ber.	Pt
		37,47
	Gef.	37,51

Man sieht also, dass das Imidazoläthylamin teils durch Tannin und teils durch Quecksilberchlorid und Natriumacetat gefällt wird.

Aus 3 kg frischem Fleisch wurden isoliert:

Imidazoläthylaminpikrat	4,0 <sub>g</sub>
Kreatin	9,56
Kreatininpikrat	Vorhanden
Histidin-Salzsaures Salz	10,44

### III. Krabben.

VON U. SUZUKI, R. INOUE UND K. C. BHARATKAR.

Über Krabbenextrakt liegt schon eine ausführliche Mitteilung von D. ACKERMANN und F. KUTSCHER<sup>1</sup> vor. Die beiden Autoren haben nämlich eine ganze Reihe Stickstoffverbindungen aus frischem Krabbenfleisch dargestellt: Tyrosin, Leucin, Arginin, Lysin, Hypoxanthin, Betaïn, Pyrimidinmethylchlorid, Crangitin ( $C_{13}H_{20}N_2O_4$ ) Crangonin ( $C_{13}H_{20}N_2O_3$ ) und Neosin ( $C_6H_{16}N_2O, Cl, Au Cl_3$ ). Die von uns untersuchte sogenannte "Grosse Krabbe" aus *Echizen* gab aber etwas andere Ergebnisse. Wir haben ausser Tyrosin, Alanin, Leucin und Arginin eine neue Base gefunden, die der Formel  $C_5H_{11}N_2O_2$  entspricht. Da diese Base kein Methylester bildet, so kann sie nicht mit dem Lysin identisch sein. Wir haben für sie den Namen "Kanirin" vorgeschlagen. Ferner haben wir das Vorhandensein von Tryptophan nachgewiesen.

4 Grosse Krabben, die in frischem Zustande 3700<sub>g</sub> wogen, lieferten 2087<sub>g</sub> Fleisch, welches gleich mit warmem Wasser (60—70°) extrahiert wurde. Der wässerige Extrakt betrug im ganzen 6350<sup>c.c.</sup>. Mit einem Teile des Extraktes wurde zuerst die quantitative Bestimmung ausgeführt.

	Im ganzen Extrakt (6350 <sup>c.c.</sup> )	In 100 Teilen Trockensubstanz des Extraktes.
Trockensubstanz	163,32 <sub>g</sub>	100,00
Gesamtstickstoff	25,81	15,81
Eiweiss „	3,62	2,22
Basen „	8,11	4,97
Ammoniak „	0,38	0,23
Stickstoff in anderer Form	13,70	8,40

<sup>1</sup> Zeits. f. Unters. v. Nahrungs-u. Genussmitteln, 1907. 13. 180, 610, 913 und 14. 687.



Der andere Teil diente zur Isolierung der einzelnen Stickstoffverbindungen. Zu diesem Zwecke wurde der Extrakt mit Tannin gefällt, vom entstandenen Niederschlag abfiltriert und nach dem Entfernen des Tannins durch Baryt und den Überschuss des Baryts mittels Schwefelsäure, bei niederem Druck stark verdampft. Da das Vorhandensein von Tyrosin und Tryptophan in dieser Flüssigkeit nachgewiesen war, so wurde es versucht nach Hopkin'schem Verfahren Tryptophan zu isolieren, indem die Flüssigkeit mit Schwefelsäure angesäuert, bis sie 5% der Säure enthielt, und mit Hopkin'schem Reagenz (Quecksilbersulfat in 5%iger Schwefelsäure) gefällt wurde. Der weisse, flockige Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5% iger Schwefelsäure gewaschen, in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit hinterliess nach dem Verdampfen im Vakuum einen braunen Sirup, welcher nach einigen Tagen etwas kristallinisches Tryptophan lieferte. Die Hauptmenge des Sirups blieb jedoch amorph, sodass die Menge des gereinigten Tryptophans für die Analyse nicht ausreichte. Die mit Essigsäure schwach angesäuerte Lösung des Tryptophans gab durch Zusatz von einigen Tropfen Bromwasser eine charakteristische rotviolette Färbung. Beim Schütteln mit Amylalkohol ging der Farbstoff in das letztere Reagenz über. Das Filtrat vom Quecksilbersulfat-Niederschlag des Tryptophans wurde durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und nach dem Austreiben des Schwefelwasserstoffes mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde in gewöhnlicher Weise durch Baryt zerlegt. Die in der Weise dargestellte alkalische Flüssigkeit enthielt nur wenig Histidin und Kreatinin und Spuren von Purinbasen, darum wurde die Flüssigkeit unmittelbar mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Aus diesem Niederschlag wurden 2, Argininpikrat erhalten.

0,1066<sub>g</sub> Subst. gaben 22,2° N (26° 760<sup>mm</sup>)

$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_6H_5N_3O_7$	Ber.	N	24,32
	Gef.		24,28

Da es in jeder Beziehung mit reinem Argininpikrat vollständig identisch war, so haben wir es nicht weiter untersucht.

Das Filtrat vom Silbernitrat und Baryt-Niederschlag wurde wieder mit Phosphowolframsäure gefällt. Die freie Basenlösung, die durch Zerlegung des phosphowolframsauren Niederschlages durch Baryt erhalten wurde, lieferte nach dem Zusatz von wenig Pikrinsäure zuerst eine kleine Menge Argininpikrat. Bei weiterem Zusatz von Pikrinsäure schieden sich 3,5, Kanirinpikrat aus, es bestand aus hellgelben Prismen mit dem Schmelzpunkt 188° (unkorr.) Es löste sich ziemlich schwer in Wasser. Aus heissem Alkohol schied es als rhombische Tafeln aus. Für die Analyse wurde das Pikrat im Vakuum bei 100° getrocknet

0,1246 <sub>g</sub> Subst. gaben	19,7° N (13° 760 <sup>mm</sup> )
0,1312 <sub>g</sub> „	21,0° N (15° 766 <sup>mm</sup> )
0,1526 <sub>g</sub> „	0,1983 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub> 0,0583 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,4978 <sub>g</sub> „	0,3762 <sub>g</sub> Pikrinsäure
0,5098 <sub>g</sub> „	0,3838 <sub>g</sub> „ „

$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2C_6H_5N_3O_7$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		35,76	3,31	18,54	75,83
		35,45	4,25	18,57	75,53
	Gef.	—	—	18,89	75,48

Das salzsaure Kanirin bildete farblose, rhombische Prismen, mit dem Schmelzpunkt 204—207° (unkorr.). Es war hygroskopisch. Die wässrige Lösung des salzsauren Kanirins hatte kein Drehungsvermögen. Das Platinchloriddoppelsalz bestand aus tief rotbraunen Prismen, welche in Wasser ziemlich leicht, in Alkohol schwerer löslich waren. Im Kapillarrohr erhitzt, zersetzte es sich bei 227° (unkorr.). Für die Analyse wurde das Salz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1444<sub>g</sub> Subst. gaben 0,0504<sub>g</sub> Pt

$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2PtCl_6$	Ber.	Pt
		35,00
		Gef. 34,90

Ferner wurde versucht, den Methylester des Kanirins darzustellen, indem das salzsaure Salz in absolutem Methylalkohol verteilt und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet wurde.



Nach dem Verdampfen des Methylalkohols schieden sich farblose Kristalle aus, welche einmal aus heissem Alkohol durch Zusatz von Aether umkristallisiert, im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert wurden.

0,1780 <sub>g</sub> Subst. gaben	19,7 <sup>o.c.</sup> N (21° 760 <sup>mm</sup> )
0,1710 <sub>g</sub> „	0,2004 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub> 0,1444 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,2216 <sub>g</sub> „	0,2804 <sub>g</sub> Ag Cl

		C	H	N	Cl
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · 2 HCl	Ber.	32,90	7,30	12,70	32,40
C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) 2 HCl	Ber.	36,08	7,72	12,02	30,47
	Gef.	31,96	9,38	12,60	31,28

Die Analyse weicht erheblich von dem salzsauren Methylester des Kanirins ab. Sie stimmt vielmehr mit dem salzsauren Salz des unveränderten Kanirins. Die kleine Differenz ist den hygroskopischen Eigenschaften des Salzes zuzuschreiben.

Das Salz zersetzte sich bei 207° ohne lebhaftes Schaümen. Die Kristallform war auch mit salzsaurem Kanirin identisch. Aus diesem Salze liess sich auch das ursprüngliche Pikrat gewinnen, welches den Schmelzpunkt 188° (unkorr.) hatte. Aus oben erwähnten Beobachtungen kann man schliessen, dass das Kanirin keinen Methylester bildet. Es kann deshalb nicht eine inaktive Isomerie des Lysins sein, obgleich das letztere auch dieselbe empirische Formel hat. Die Konstitution des Kanirins soll später aufgeklärt werden. Das Filtrat des phosphorwolframsauren Niederschlags lieferte, nach der Estermethode verarbeitet, 0,14<sub>g</sub> Alanin, 0,19<sub>g</sub> Leucin und 0,11<sub>g</sub> Tyrosin.

Der Tannin-Niederschlag, den wir aus wässrigem Krabbenextrakt durch unmittelbaren Zusatz von Tannin erhielten, lieferte nach dem Zerlegen mit Baryt ungefähr 1<sub>g</sub> Argininpikrat. Analyse des Argininpikrats:

0,1134 <sub>g</sub> Subst. gaben	24,7 <sup>o.c.</sup> N (21° 760 <sup>mm</sup> )
----------------------------------	---

		N
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Ber.	24,32
	Gef.	24,79

Aus 2 kg frischem Krabbenfleisch wurden isoliert:

Argininpikrat	3,0 <sub>g</sub>
---------------	------------------

Tryptophan	vorhanden
Kanirinpikrat	3,5
Tyrosin	0,11
Alanin	0,14
Leucin	0,19
Histidin	wenig
Kreatin	„
Purinbasen	nicht vorhanden
Lysin	nicht vorhanden

Wie man sieht, weichen unsere Ergebnisse erheblich von denen ACKERMANN'S und KUTSCHER'S ab, was der Verschiedenheit der untersuchten Krabbenart, deren verschiedenem Alter und anderen Bedingungen zuzuschreiben ist.

Das Tryptophan ist von uns zum ersten Male in frischem Fleisch nachgewiesen worden. Das Kanirin kommt auch im Taifisch vor.

#### IV. Tai (Pagrus major).

Von U. SUZUKI und Y. OKUDA.

63 kleine Taifische lieferten 3200<sub>g</sub> Fleisch (von Kopf, Haut, Knochen und inneren Organen befreit) und daraus 7250<sup>o.c.</sup> wässrigen Extrakt. Die quantitative Bestimmung des Extraktes gab folgendes Resultat:

	In 100 <sup>o.c.</sup> Extrakt	In 100 Teilen Trockensubstanz des Extraktes
Trockensubstanz	2,35	100,00
Gesamtstickstoff	0,27	11,54
Eiweiss „	0,112	4,770
Basen „	0,125	3,324
Ammoniak „	Spur	—

In 100 Teilen frischem Fleisch

Lösliche Substanz	5,324
Löslicher Stickstoff	0,611
Löslicher Eiweisstickstoff	0,253
Basenstickstoff	0,285



Der gesamte Extrakt wurde nun mit 20%iger Tanninlösung versetzt, vom entstandenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde nach dem Entfernen des Tannins durch Baryt und des überschüssigen Baryts durch Schwefelsäure, im Vakuum stark eingedampft und mit Alkohol versetzt. Es schieden sich dabei 5,6<sub>g</sub> Kreatin aus, welches aus heissem Wasser umkristallisiert, bei 100° getrocknet und analysiert wurde.

0,1430<sub>g</sub> Subst. gaben 38,0<sup>o</sup> N (8° 762<sup>mm</sup>)  
 0,1457<sub>g</sub> „ „ 0,1962<sub>g</sub> C O<sub>2</sub> 0,0898<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O

		C	H	N
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ber.	36,64	6,87	32,06
	Gef.	36,72	6,91	32,15

Aus heissem Wasser unkristallisiert, scheidet es sich als grosse farblose glänzende Prismen aus. Bei 100° getrocknet, verliert es Kristallwasser. Die wässrige Lösung reagiert neutral. Mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, wird es in Kreatinin verwandelt. Die Mutterlauge des Kreatins wurde mit Phosphowolframsäure gefällt.

#### A. DER PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Man zerlegte den Niederschlag in gewöhnlicher Weise mit Baryt. Die alkalische Lösung, die freie Basen enthielt, wurde mit Kohlensäure gesättigt und mit Quecksilberchlorid gefällt.

a). Der Quecksilberchloridniederschlag lieferte, nach dem Entfernen des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff, 2,5<sub>g</sub> Kreatinipikrat.

0,1926<sub>g</sub> Subst. gaben 38,9<sup>o</sup> N (75° 769<sup>mm</sup>)  
 0,1720<sub>g</sub> „ „ 0,2239<sub>g</sub> C O<sub>2</sub> 0,0461<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O

		C	H	N
C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	Ber.	35,08	2,92	24,54
C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Gef.	35,50	2,97	24,64

Das Pikrat schmolz bei 214° (unkorr.). Die wässrige Lösung gab eine rote Färbung bei Zusatz von verdünnter Alkali.

Im Filtrate des Kreatinipikrats war noch ein wenig Histidin vorhanden,

was durch Pauly'sche Reaktion nachgewiesen wurde. Isoliert haben wir es nicht.

b). Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag des Kreatinins wurde mittels Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, und mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Dieser Niederschlag lieferte 0,75<sub>g</sub> Kreatinipikrat.

Das Filtrat des Silbernitrat- und Baryt-Niederschlags wurde wieder mit Phosphowolframsäure gefällt. Aus diesem Niederschlag erhielt man 5,1<sub>g</sub> Kaliumpikrat und von der Mutterlauge desselben 1,5<sub>g</sub> Kanirinipikrat.

Analyse des Kaliumpikrats:

0,1698<sub>g</sub> Subst. gaben 22,4<sup>o</sup> N (12° 760<sup>mm</sup>)  
 0,1081<sub>g</sub> „ „ 14,7<sup>o</sup> N (14,5° 758<sup>mm</sup>)  
 0,4969<sub>g</sub> „ „ 0,4260<sub>g</sub> Pikrinsäure und 0,073<sub>g</sub> Kalium

		N	K	Pikrin- säure
K C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Ber.	15,73	14,28	85,72
	Gef.	15,66	14,69	85,74
		15,90		

Analyse des Kanirinipikrats:

0,1331<sub>g</sub> Subst. gaben 0,1680<sub>g</sub> C O<sub>2</sub> 0,0548<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O  
 0,3062<sub>g</sub> „ „ 0,2344<sub>g</sub> Pikrinsäure

		C	H	Pikrin- säure
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Ber.	35,76	3,31	75,83
	Gef.	34,41	4,58	76,55

Das Kanirinipikrat schmolz bei 188° (unkorr.). Es war mit dem Kanirinipikrat aus Krabbenextrakt vollkommen identisch.

Das Platinchloriddoppelsalz des Kanirins.

0,1267<sub>g</sub> Subst verloren bei 100° getrocknet 0,0043<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O  
 0,1142<sub>g</sub> wasserfreie Substanz gaben 0,0400<sub>g</sub> Pt

		H <sub>2</sub> O	Pt als wasser- freies Salz
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> + H <sub>2</sub> O	Ber.	2,90	35,00
	Gef.	3,39	35,02



Das Platinchloriddoppelsalz bestand aus rötlich gelben Prismen mit dem Schmelzpunkt 229° (unkorr.).

#### B. DAS FILTRAT VOM PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Das Filtrat vom Phosphowolframsäure Niederschlag lieferte, nach der Estermethode verarbeitet, 0,14% Alanin und 0,25% Tyrosin. Analysiert haben wir die beiden Aminosäuren nicht.

#### C. TANNIN-NIEDERSCHLAG.

Der wässrige Extrakt des Fleisches gab eine reichliche Fällung mit Tannin. Beim Verreiben dieses Tannin-Niederschlags mit 2%iger Schwefelsäure wurde ein Teil desselben gelöst. Die vom unlöslichen Rückstand abfiltrierte Flüssigkeit wurde nun durch Baryt von Tannin und Schwefelsäure befreit und nach dem Entfernen des überschüssigen Baryts durch Schwefelsäure mit Tierkohle entfärbt und stark eingedampft.

Nach dem Erkalten schieden sich 1,5% Kreatin aus.

Aus 3200<sub>g</sub> frischem Fleisch wurden isoliert:

Kreatin	7,1 <sub>g</sub>
Kreatinipikrat	3,25
Histidin	vorhanden
Kanirin	1,50
Alanin	0,14
Tyrosin	0,25

#### V. Hamaguri (*Cytheria meretrix* L.).

Von U. SUZUKI und S. ŌDAKE.

17806<sub>g</sub> lebende Hamaguri lieferten 3265<sub>g</sub> Fleisch, nebst 8311<sub>g</sub> Schale und 5480<sub>g</sub> Wasser.

Das Fleisch wurde dreimal mit warmem Wasser (50°) extrahiert. Die vereinigten Auszüge betragen 9250<sub>g</sub> und der Rückstand 814<sub>g</sub>.

In 100 Teilen frischem Fleisch:

Trockensubstanz		45,86	
Darunter	Im wässrigen Extrakt	16,21	
	Im unlöslichen Rückstand	29,65	
	In 100 Teilen trockenem Fleisch:	In 100 Teilen Gesamtstickstoff:	
Gesamtstickstoff	1,90	100,00	
Gesamtstickstoff im wässrigen Extrakt	0,58	30,00	
Darunter	Eiweisstickstoff	0,23	12,10
	Basen- „	0,21	11,10
	Stickstoff in anderer Form	0,13	6,80
Gesamtphosphor	0,17		

Aus der Analyse sieht man, dass ungefähr 70% des Gesamtstickstoffes im Fleisch aus wasserunlöslichen Eiweisstoffen besteht. Vom wasserlöslichen Stickstoff bestehen ca. 12% aus Eiweisstoffen.

Zur Isolierung der Basen wurden 8500<sub>g</sub> Extrakt (aus 3007<sub>g</sub> frischem Fleisch = 1380<sub>g</sub> Trockensubstanz) mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert und mit Tannin gefällt. Das Filtrat vom Tanninniederschlag wurde durch Bleiessig von Tannin und anderen Verunreinigungen befreit, und nach dem Entfernen des Bleies durch Schwefelsäure mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt.

#### A. PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Der Niederschlag wurde durch Baryt zerlegt. Während der Verarbeitung entwickelte sich Ammoniak und Trimethylamin, welche wahrscheinlich durch Zersetzung des Betaïns entstanden waren.

Die aus dem phosphowolframsauren Niederschlag dargestellte alkalische Lösung, die freie Basen enthielt, wurde mit Kohlensäure gesättigt und mit Quecksilberchlorid gefällt. Aus diesem Niederschlag erhielt man Histidin in kleiner Menge. Zur Analyse genügte es nicht. Das Filtrat vom Quecksilberchlorid-Niederschlag wurde durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und bei niederem Druck eingedampft, um den Schwefelwasserstoff vollständig auszutreiben, darauf mit Silbernitrat versetzt, um die vorhandene Salzsäure zu entfernen. Das Filtrat des Silberchlorids wurde nun mit überschüssigem Silbernitrat und Baryt versetzt. Aus diesem Niederschlag



wurde 2,1, Arginindipikrat isoliert.

0,1546 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,1934 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,0536 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,1500 <sub>g</sub> „	29,9 <sup>o</sup> N (24° 761 <sup>mm</sup> )	
0,3998 <sub>g</sub> „	0,2840 <sub>g</sub> Pikrinsäure	

	C	H	N	Pikrin- säure
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 2 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> Ber.	34,18	3,17	22,15	72,47
Gef.	34,12	3,85	22,38	71,04

Aus heissem Wasser umkrystallisiert scheidet sich das Pikrat zuerst als ein Öl aus, nach dem Erkalten verwandelt es sich zu kleinen gelben Nadeln. Es löst sich leicht in warmem Wasser und Alkohol. In Aether und Petroläther ist es unlöslich. Im Kapillarrohr erhitzt sintert es bei ca. 160° und zersetzt sich bei 180—185° (unkorr.) unter Schäumen.

Da das aus Eiweissstoffen durch Spaltung mit Säuren erhaltene Arginin nur Monopikrat bildet, kann es nicht mit unserem Präparat identisch sein. Es handelt sich vielleicht um eine Isomerie desselben.

Aus dem Pikrate wurde das salzsaure Methylester des Arginins dargestellt. Es hat auch ein etwas anderes Verhalten als das Methylestersalz des Arginins aus Eiweiss zeigt. Die aus heissem Methylalkohol durch Zusatz von Aethylalkohol und Aether langsam ausgeschiedenen Krystalle bestanden aus scharf zugespitzten Nadeln, welche in Wasser und Methylalkohol sehr leicht, in Aethylalkohol etwas weniger, und in Aether und Petroläther fast unlöslich waren. Es schmolz bei 184° (unkorr.) unter lebhaftem Schäumen, während das Methylestersalz des Eiweiss-Arginins in demselben Bade bei 194° (unkorr.) schmolz.

Das Filtrat vom Silbernitrat und Baryt-Niederschlag bestand hauptsächlich aus Betaïn. Wurde das Filtrat durch Salzsäure vom Silber und durch Schwefelsäure vom Baryt befreit, und mit Phosphowalframsäure gefällt so entstand ein weisser flockiger Niederschlag, welcher nach Zerlegung mit Baryt farblose glänzende Krystalle von Betaïn in reichlicher Menge lieferte. Sie wurden abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute betrug 4,4<sub>g</sub>. Zur Reinigung löst man die Krystalle in heissem Methylalkohol und setzt etwas Aether zu. Nach einiger Zeit scheidet sich das Betaïn als farblose

glänzende Tafeln aus, welche mit Aethylalkohol und Aether gewaschen werden.

Analyse des Betaïns (im Vakuum bei 100° C getrocknet)

0,1526 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,2913 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,1386 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,1319 <sub>g</sub> „	13,8 <sup>o</sup> N (22° 758 <sup>mm</sup> )	

	C	H	N
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub> · Ber.	51,19	9,40	11,97
Gef.	50,86	9,86	11,82

Das freie Betaïn bestand aus sehr hygroskopischen zerfliessenden Krystallen von einem angenehmen süssen Geschmack. Es löste sich in Wasser und Methylalkohol leicht, in Aethylalkohol etwas schwerer. In Aether und Petroläther war es fast unlöslich. Die wässrige Lösung reagierte schwach alkalisch, gab keine Biuret- oder Diazo-reaktion, keine rote Färbung mit Pikrinsäure und Alkali, und keine Fällung mit Nessler'schem Reagenz; mit Kupferhydroxyd erwärmt, gab es kein Kupfersalz. Im Kapillarrohr über 250° erhitzt, verkohlte es ohne zu Schmelzen. Es bildete zwei Nitrate, d.h. B<sub>2</sub>H N O<sub>3</sub> und B, H N O<sub>3</sub>.

a). (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · H N O<sub>3</sub>. Um dieses Salz darzustellen, wurde die freie Base mit einer berechneten Menge Salpetersäure versetzt (auf 1<sub>g</sub> Betaïn ungefähr 10<sup>cc</sup> normale Salpetersäure) und langsam fast bis zum Trocknen eingedampft. Beim Verreiben mit absolutem Alkohol schied sich das Salz vollständig aus, welches abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen wurde. Es wurde nochmals aus heissem absolutem Alkohol umkrystallisiert, im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert.

0,1445 <sub>g</sub> Subst. gaben	18,0 <sup>o</sup> N (24° 762 <sup>mm</sup> )	
9,1405 <sub>g</sub> „	17,7 <sup>o</sup> N (21° 753 <sup>mm</sup> )	
0,1517 <sub>g</sub> „	0,2233 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,1120 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,2240 <sub>g</sub> „	0,2835 <sub>g</sub> Nitronnitrat = 0,04765 <sub>g</sub> H N O <sub>3</sub>	

	C	H	N	H N O <sub>3</sub>
(C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> · H N O <sub>3</sub> Ber.	40,40	7,74	14,14	21,21
Gef.	40,15	8,20	14,01 14,17	21,26

Aus heissem Alkohol scheidet sich das Nitrat durch Zusatz von Aether



als farblose Prismen aus, die meistens sternförmig sich zusammen gruppieren. Es ist etwas hygroskopisch. In Wasser und Methylalkohol ist es leicht, in Aethylalkohol etwas schwerer und in Aether fast unlöslich. Im Kapillarrohr erhitzt, schrumpft es allmählich bei 215° und zersetzt sich bei 220—221° (unkorr.) unter Gasentwicklung.

b).  $C_5H_{11}NO_2 \cdot HN O_3$ . Will man dieses Salz darstellen, muss man etwas mehr als die berechnete Menge Salpetersäure zugeben. Bei langsamem Eindampfen und Versetzen mit absolutem Alkohol krystallisiert das Nitrat aus. Zur Reinigung wird das Salz in heissem absolutem Alkohol gelöst und durch Zusatz von Aether ausgeschieden.

Für die Analyse wurde das Salz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1372<sub>g</sub> Subst. gaben 18,7<sup>cc</sup> N (22,5° 756<sup>mm</sup>)  
 0,1320<sub>g</sub> „ 0,274<sub>g</sub> Nitronnitrat = 0,04603<sub>g</sub>  $HNO_3$

$(C_5H_{11}NO_2)HN O_3$	Ber.	N	$HNO_3$
		15,55	35,00
	Gef.	15,32	34,87

Aus heissem Alkohol scheidet sich das Salz durch Zusatz von Aether als grosse farblose Tafeln aus. Es ist etwas hygroskopisch. Es schmilzt bei 120° zu einem Oel.

c). Das Pikrat. Sowohl aus  $B_2HN O_3$  als auch aus  $BHN O_3$  erhält man ein und dasselbe Pikrat. Man löst das Nitrat ( $B_2HN O_3$ ) in wenig Wasser und gibt soviel Natronlauge zu, bis die Salpetersäure genau neutralisiert wird und versetzt mit Pikrinsäure in kleinem Überschuss. Das dabei ausgeschiedene Pikrat wurde einmal aus heissem Wasser umkrystallisiert, im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert.

0,1546<sub>g</sub> Subst. gaben 0,2160<sub>g</sub>  $CO_2$  0,0596<sub>g</sub>  $H_2O$   
 0,1574<sub>g</sub> „ 22,4<sup>cc</sup> N (20° 760<sup>mm</sup>)  
 0,4208<sub>g</sub> „ 0,2810<sub>g</sub> Pikrinsäure

$C_5H_{11}NO_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		38,15	4,05	16,19	66,19
	Gef.	38,10	4,28	16,28	66,78

Das Pikrat besteht aus hellgelben Prismen und schmilzt bei 180—181° (unkorr.) zu einem Oel.

Aus  $BHN O_3$  erhielt man auch dasselbe Pikrat mit dem Schmelzpunkt 180—181°. Die Analyse gab folgendes Resultat:—

0,1515<sub>g</sub> Subst. gaben 22,3<sup>cc</sup> N (25° 746<sup>mm</sup>)

$C_5H_{11}NO_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$	Ber.	N
		16,19
	Gef.	16,11

Aus oben erwähnten Beobachtungen kann man schliessen, dass die Base Betaïn war. Ferner haben wir unser Präparat mit reinem Betaïn (Merck) verglichen. In süssem Geschmack, Schmelzpunkt, Krystallformen etc waren die beiden vollständig identisch.

Aus 17806<sub>g</sub> frischen Cythereamuscheln = 1380<sub>g</sub> trockenem Fleisch wurden isoliert:—

Argininpikrat	2,10 <sub>g</sub>
Histidin	Vorhanden
Betaïn	4,40
Trimethylamin und Ammoniak	Vorhanden

## VI. Austern.

Von U. SUZUKI, K. YOSHIMURA und Y. TANAKA.

Die lebenden Austern wurden von den Schalen getrennt und das Fleisch dreimal mit warmem Wasser extrahiert.

Die quantitative Analyse gab folgendes Resultat:—

	In 100 Teilen frischem Fleisch:	In 100 Teilen Trockensubstanz:
Wasser	92,16	
Trockensubstanz	7,87	100,00
Asche	3,29	41,96
Gesamtstickstoff	0,523	6,68
Eiweiss „	0,374	4,77



Wasserlöslicher Stickstoff	0,224	2,86	
Darunter	Eiweiss „	0,075	0,96
	Basen „	0,074	0,35
	Ammonia „	0,028	0,36
	Stickstoff in anderer Form	0,094	1,20
Gesamtstickstoff als 100.			
Eiweisstickstoff		71,48	
Wasserlöslicher Stickstoff		42,86	
Darunter	Eiweiss „	14,34	
	Basen „	5,24	
	Ammoniak „	5,39	
	Stickstoff in anderer Form	17,89	

Wie die Analyse zeigt, ist das Austernfleisch auffallend reich an Asche und Ammoniak. Das letztere ist ohne Zweifel schon zum Teil im lebendigen Fleisch vorhanden, teils wird es vielleicht aus Betaïn während der Extraktion gespalten. Ausser Ammoniak haben wir etwas Trimethylamin nachgewiesen.

Zur Isolierung der stickstoffhaltigen Substanzen wurde der wässrige Extrakt mit Tannin gefällt. Das Filtrat davon wurde durch Bleiessig von Tannin befreit; nachdem das überschüssige Blei durch Schwefelsäure entfernt war, wurde es mit Phosphowolframsäure gefällt.

#### A. DER PHOSPHOWOLFRAMSÄURE NIEDERSCHLAG.

Die aus diesem Niederschlag in bekannter Weise dargestellte Lösung, die freie Basen enthielt, wurde

- 1) mit Quecksilberchlorid gefällt, und das Filtrat
- 2) mit Silbernitrat und Baryt gefällt.
- 3) Das Filtrat vom Silbernitrat und Baryt-Niederschlag wurde nochmals mit Phosphowolframsäure gefällt.

Aus Fraktion (1) und (2) wurde keine Base in genügender Menge erhalten. Aus Fraktion (3) wurde 18° fast reines Betaïn gewonnen. Die Analyse des freien Betaïns gab folgendes Resultat:—

0,4160<sub>g</sub> Subst. gaben 0,05097<sub>g</sub> N (nach Kjeldahl)

		N
$C_5H_{11}NO_2$	Ber.	11,97
	Gef.	12,25

Das Platinchloriddoppelsalz des Betaïns zersetzt sich bei 237—238° (unkorr.) unter Schäumen und Verkohlen.

0,2980<sub>g</sub> Subst. gaben 0,0810<sub>g</sub> Pt = 27,18% Pt

0,1800<sub>g</sub> „ „ 0,0490<sub>g</sub> „ = 27,22%

0,1195<sub>g</sub> „ „ 0,0328<sub>g</sub> „ = 27,03%

Diese Zahlen stimmen mit der Formel  $(C_5H_{11}NO_2)_2H_2PtCl_6 + 4H_2O$ . Als wasserfreies Salz berechnet, muss es 30,29% sein. Das aus reinem Betaïn (Merck) dargestellte Platindoppelsalz gab auch unter derselben Bedingung 27,02% Pt. Es wurden ferner das Pikrat und die Nitrate dargestellt. In jeder Beziehung waren sie mit denen des reinen Betaïns identisch.

#### B. DAS FILTRAT VOM PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Das Filtrat wurde nach dem Entfernen der Phosphowolframsäure und Schwefelsäure durch Baryt bei vermindertem Druck stark eingedampft und mit Alkohol versetzt. Nach einiger Zeit schieden sich glänzende farblose Prismen in reichlicher Menge aus. Die Ausbeute derselben betrug 15,5%. Nach der Umkrystallisation aus wenig Wasser zeigten sie die charakteristischen Krystallformen des Taurins.

Die Stickstoffbestimmung gab folgendes Resultat:—

0,3664<sub>g</sub> Subst. gaben 0,0412<sub>g</sub> N (nach Kjeldahl)

		N
$C_2H_7NSO_3$	Ber.	11,20
	Gef.	11,24

Beim Glühen mit Glühgemisch hinterliess das Taurin eine Asche, die in verdünnter Salzsäure gelöst und mit Chlorbarium versetzt, einen weissen Niederschlag von Bariumsulfat gab.

Ferner war unser Präparat mit reinem Taurin (Merck) vollständig identisch.



Aus ca. 30 Kg. frischen Austern (mit Schalen) wurden isoliert:—

Betaïn	18,0 <sub>g</sub>
Taurin	15,5 <sub>g</sub>
Kreatin	?
Trimethylamin } Ammoniak }	Vorhanden

Tabelle der Extraktivstoffe.

	Auf 2 Kilo frisches Material berechnet.					Austern*
	Sardinen.	Maguro (Thynnus Thunnus).	Tai (Pagrus Major).	Krabben	Hamaguri (Cytherea Meretrix).	
Arginin .. .. .				1,22	0,34	
Histidin .. .. .	3,77	4,88	Vorhanden	Vorhanden	Vorhanden	
Imidazoläthylamin.. .		0,52				
Carnosin .. .. .	1,85					
Kanirin (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .			0,94	0,88		
Tryptophan .. .. .				Vorhanden		
Leucin .. .. .	0,23			0,19		
Alanin .. .. .			0,09	0,14		
Tyrosin .. .. .	1,70		0,16	0,11		
Kreatin .. .. .		6,40	4,44	Vorhanden		?
Kreatinin.. .. .	0,63	Vorhanden	0,68			
Betaïn .. .. .					2,86	18,0
Taurin .. .. .						15,0
Trimethylamin u. Ammoniak.					Vorhanden.	Vorhanden.

\* Aus ca. 30 Kg. frischen Austern (mit Schalen).

## Quantitative Determination of Creatine, Creatinine and Monoamino-acids in certain Fishes, Mollusca and Crustacea.

BY

Y. Okuda.

### I. Creatine and Creatinine.

For the determination of creatine and creatinine, the flesh freed from bones, heads, fins, scales, and internal organs<sup>1</sup> was chopped and extracted with water at 50—55° for one hour. The residue was treated twice more in the same way. The whole extract was now boiled for a short time to remove most of the proteins by coagulation and filtered. The filtrate was evaporated under diminished pressure to a small volume, and was divided into two portions. One portion of it served directly for the determination of creatinine after FOLIN's colorimetric method, while the other portion was previously boiled for two hours with nearly 4 per cent. sulphuric acid, to convert the creatine present into creatinine, and after removing the sulphuric acid by means of barium hydroxide, it was subjected to the determination after FOLIN. From the difference of these two determinations we can calculate the quantity of creatine originally present in the flesh, 1 mg creatinine being equivalent to 1.16 mg creatine. The results obtained were as follows:—

1. Of clams the whole body was used.

[Jour. Coll. Agric., Vol. V. No. 1, 1912.]



Name.	In 100 parts of fresh substance.			In 100 parts of dry matter.	
	Water g	Creatine g	Creatinine g	Creatine g	Creatinine g
Bonito ( <i>Gymnosarda affinis</i> Cantor)	72,165	0,649	0,134	2,011	0,481
Tunny fish ( <i>Thunnus Schlegeli</i> Steind)	72,402	0,497	0,064	1,800	0,232
"Katsubushi" (Steamed dried bonito)	14,808	0,453	0,660	0,531	0,775
Salmon ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> Walbaum)... ..	63,300	0,560	0,067	1,525	0,182
Snapper ( <i>Pagrus major</i> ) .. .. .	77,340	0,754	0,070	3,327	0,308
Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> L.).. .. .	79,160	0,421	0,077	2,020	0,369
Shark .. .. .	79,800	0,655	0,134	3,242	0,663
Lobster ( <i>Palinurus japonicus</i> Gmy) ..	79,920	Trace?	Trace?		
Crab ( <i>Neptunus pelagicus</i> M-Edw) ..	84,500	Trace?	Trace?		
Cuttle-fish ( <i>Sepia esculenta</i> Hoyle) ..	81,699	Trace	Trace		
"Kakisurumae" (chopped and dried cuttle-fish)... ..	27,570	Trace	Trace		
Clam ( <i>Cytherea meretrix</i> L.) .. .. .	90,490	Trace	Trace		

The materials used for the determination were very fresh, except the salted flesh of salmon.

We see from the above result that all of the examined fishes contained comparatively much creatine and creatinine,<sup>2</sup> on the contrary, in mollusca and crustacea the existence of these two compounds was doubtful, at least, they must be present only in traces. In fresh fish we found generally more creatine than creatinine, while in dried bonito the reverse was observed. It is therefore possible that a part of creatine is transformed into creatinine during the preparation of the food.

It may be mentioned here that the water extract of clam flesh gives only a slight yellowish red coloration instantly after addition of picric acid and soda after FOLIN, thus showing that only a trace of creatinine is present in it, but after standing for many hours at room temperature, it

2. VAN HOOGENHUYZE and H. HERFLÖGGE found per kilogramm flesh of ox, sheep, pig and horse 4.4, 5.1, 4.5 and 3.8, creatine respectively. (Zeitschr. f. physiol. Chemie., 1905, 46, 432.)

assumes a dark red color. After some tests we found that the glycogen, originally present in the extract is gradually acted upon by diastatic ferments of the clam itself, and the sugar thus formed imparts this red coloration. The presence of diastatic ferment in the clam is easily shown in the usual way.

## II. Monoamino-acids.

For the determination of monoamino-acids SÖRENSEN'S formol titration method was adopted. Of course, this method does not hold good for some monoamino-acids, but in the case of fish flesh, the quantity of the aminoacids being very little, the method of VAN SLYKE can not conveniently be applied.

I have made also some preliminary tests and found that the presence of organic bases, like arginine, lysine, histidine etc. more or less affects the result of the formol method, so it is better to remove these bases previously. But the presence of creatine has apparently no effect upon this determination.

150, minced fresh flesh, free from bones, heads, fins, scales and internal organs was extracted in a similar way as mentioned above and the aqueous extract was boiled and slightly acidified with acetic acid to remove coagulable proteins, filtered, neutralized and evaporated at low pressure into a small volume, acidified with sulphuric acid and precipitated with phosphotungstic acid in the usual way. The filtrate of the phosphotungstic precipitate, after the removal of the phosphotungstic and sulphuric acid by means of barium hydroxide, was evaporated, in neutral reaction, again to a small volume and titrated according to the usual formol method. Thus the following result was obtained :

Substance.	Water.	N of monoamino-acids in g.	
		In 100, fresh flesh.	In 100, dried flesh.
Carp I. .. .. .	76,609	0,022	0,094
Carp II. .. .. .	76,789	0,024	0,103
Tunny .. .. .	73,516	0,011	0,041
Bonito .. .. .	69,371	0,022	0,072
Porgy .. .. .	76,787	0,016	0,069
Crussian carp .. .. .	81,998	0,035	0,194
Spiny lobster .. .. .	75,975	0,146	0,608
Cuttle fish .. .. .	81,671	0,089	0,485



*Remarks.*—Tunny, bonito, porgy and cuttle fish applied to the above determination were fresh. Sping lobster, crussian carp and carp I were analysed immediately after having been killed. Carp II was analysed after standing for 50 hours after death at room temperature (12° C). The increase of amino-acids after that time was very insignificant.

We see from the above results that the contents of monoamino-acids are generally very little in fish, while mollusca and crustacea contain a little more.

### III. On different Forms of Proteins in the Flesh of Fish.

For this purpose, the flesh was extracted<sup>3</sup> with water, alcohol, *NaCl*, and *KOH*, respectively and the quantity of total and albuminoid nitrogen in each extract was determined according to KJELDAHL's method.

Flesh	Solvent.	In 100 <sub>g</sub> fresh flesh.		In 100 <sub>g</sub> dry flesh.		Sum of each N as 100.	
		Total N	Prot. N	Total N	Prot. N	Total N	Prot. N
1. Crussian carp. ( <i>Carassius auratus</i> L).	<i>H<sub>2</sub>O</i>	0,746	0,476	4,144	2,644	17,171	13,583
	0,2% <i>KOH</i>	2,003	1,793	11,127	9,960	46,077	51,125
	70% Alcohol	0,386	0,174	2,144	0,966	8,809	4,961
	10% <i>NaCl</i>	1,212	1,064	6,732	5,910	27,881	30,339
2. Carp. ( <i>Cyprinus carpio</i> L).	<i>H<sub>2</sub>O</i>	0,479	0,326	2,182	1,485	11,129	10,326
	0,2% <i>KOH</i>	1,715	1,341	7,812	6,108	39,809	43,477
	70% Alcohol	0,492	0,240	2,241	1,093	11,420	7,602
	10% <i>NaCl</i>	1,622	1,250	7,388	5,694	37,649	39,605

3. 10<sub>g</sub> fresh flesh was extracted with 100% of solvent for 24 hours at 10°C.

Flesh	Solvent	In 100 <sub>g</sub> fresh flesh		In 100 <sub>g</sub> dry flesh		Sum of each N as 100.	
		Total N	Prot. N	Total N	Prot. N	Total N	Prot. N
3. Spiny lobster ( <i>Palinurus japonicus</i> Gray).	<i>H<sub>2</sub>O</i>	1,600	0,736	6,659	3,063	23,808	22,816
	0,2% <i>KOH</i>	2,138	1,212	8,898	5,044	31,813	37,572
	70% Alcohol	0,934	0,119	3,887	0,495	13,898	3,689
	10% <i>NaCl</i>	2,048	1,158	8,544	4,819	30,474	35,898
4. Cuttlefish ( <i>Sepia esculenta</i> Hoyle)	<i>H<sub>2</sub>O</i>	0,932	0,351	5,085	1,915	19,984	—
	0,2% <i>KOH</i>	1,775	1,223	9,684	6,673	38,059	—
	70% Alcohol	0,602	—	3,285	—	12,908	—
	10% <i>NaCl</i>	1,354	—	7,387	—	29,032	—

The amount of proteins extracted by alkali was generally much greater than that extracted by other solvents. The proteins soluble in 10% *NaCl* as globulins were also much, water soluble proteins as proteose and albumine not much and the proteins as prolamins very little.

### IV. Form of Nitrogen in some Marine Animals.

The analytical results are shown in the following table:—



	Carp. I. <i>Cyprinus carpio</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Carp. II. <i>Cyprinus carpio</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Ikanito. <i>Gymnoconarus affinis</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Pomoy. <i>Pogonias major</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Crusian Carp. <i>Carassius auratus</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Tunny. <i>Thunnus Schlegelii</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Spiny lobster. <i>Palinurus japonicus</i> , In 100 <sub>g</sub> of flesh.		Cuttle fish. <i>Sepia esculenta</i> , In 100 <sub>g</sub> of dry flesh.	
	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.	fresh.	dry flesh.
Water <sup>4</sup> .....	76,609	—	76,789	—	69,371	—	76,787	—	81,998	—	73,516	—	75,975	—	81,671	—
Dry matter .....	23,391	100,000/25,311	100,000/25,311	100,000/30,629	100,000/30,629	23,213	100,000/23,213	100,000/23,213	100,000/18,002	100,000/26,484	100,000/24,025	100,000/24,025	100,000/24,025	100,000/18,329	100,000/18,329	100,000/100,000
Total N .....	2,608	11,149	2,590	11,057	4,479	14,621	3,121	13,445	2,655	14,746	3,549	13,397	3,558	2,496	13,619	13,619
Alb. N .....	2,107	9,007	1,972	8,495	3,749	12,401	2,685	11,584	2,285	12,691	—	—	2,637	2,209	12,051	12,051
Non-alk. N .....	0,501	2,142	0,618	2,562	0,680	2,220	0,432	1,861	0,370	2,055	—	—	0,921	3,833	0,287	1,568
Warm water soluble N .....	0,884	3,779	—	—	1,628	5,314	1,025	4,419	1,039	5,771	1,530	5,776	1,586	6,601	0,919	5,013
Of which Protein N .....	0,431	1,843	—	—	0,948	3,094	0,593	2,555	0,456	2,533	0,812	3,065	0,621	2,585	0,479	2,613
Organic base N .....	0,226	0,966	0,262	1,129	0,189	0,617	0,088	1,379	0,177	0,983	0,285	1,076	0,610	2,539	0,201	1,096
Monocamino N .....	0,022	0,094	0,024	0,103	0,022	0,072	0,016	0,069	0,035	0,194	0,011	0,041	0,146	0,608	0,089	0,495
Ammonium N .....	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Reaction of flesh .....	Amphi- chromatic	Amphi- chromatic	Very faintly acidic	Acidic	Acidic	Acidic	Faintly acidic	Faintly acidic	Amphi- chromatic	Amphi- chromatic	Acidic	Acidic	Amphi- chromatic	Amphi- chromatic	Amphi- chromatic	Amphi- chromatic
Water <sup>5</sup> .....	79,160	—	—	—	72,165	—	77,340	—	—	—	72,492	—	79,920	—	81,639	—
Creatine .....	0,421	2,020	—	—	0,649	2,011	0,754	3,327	—	—	0,467	1,800	Trace?	Trace?	Trace	Trace
Creatinine .....	0,077	0,369	—	—	0,134	0,481	0,670	0,308	—	—	0,064	0,232	Trace?	Trace?	Trace	Trace
Creatine N .....	0,135	0,648	—	—	0,208	0,645	0,242	0,707	—	—	0,159	0,577	—	—	—	—
Creatinine N .....	0,029	0,137	—	—	0,050	0,179	0,026	0,115	—	—	0,024	0,086	—	—	—	—

4. Determined in September, 1910.

5. Determined in February, 1911.

Summary.

1. All of the examined kinds of fish contained comparatively much creatine and creatinine, but the flesh of mollusca only a trace, in the flesh of crustacea the existence of these compounds was doubtful. The quantity of creatine was generally much more than that of creatinine in all fresh fishes.

2. In all marine animals examined the quantity of organic base nitrogen is much more than that of monoamino-acid nitrogen, and the amount of the latter is generally very little in fish, but somewhat much in lobster and cuttle fish.

3. Most of the proteins are soluble in dilute alkali solution, the proteins soluble in 10% NaCl were also much, this fact must be taken in consideration in the preservation of fish.

The experiments have been made by the writer under the direction of Professor Dr. U. SUZUKI, and it is my pleasant duty to thank him for his kind advice given during the progress of the work.



**Über die chemische Zusammensetzung des  
"Salzbreies" von Bonito ("Shiokara").**

VON

**U. Suzuki, C. Yoneyama und S. Ōdake.**

Zur Bereitung des "Salzbreies" wird der Magen und Darmkanal des Bonitos vom innern Inhalt befreit, gut gewaschen, fein zerhackt und mit viel Kochsalz vermischt, so dass ein dicker Brei entsteht. Die Leber wird auch manchmal dazu gemengt. Man lässt nun den Brei wochenlang bei Zimmertemperatur stehen und rührt öfters um. Es tritt dabei allmählich die Reifung ein, ein eigentümlicher Geruch und Geschmack entwickelt sich, und von vielen Leuten, besonders von Sakékennern wird der Artikel als Delikatesse mit Vorliebe genossen. Die an der Reifung des Breies teilnehmenden Mikroben sind bis jetzt nicht untersucht, und die chemischen Vorgänge, die während des Reifeprozesses vor sich gehen, sind auch nicht näher erforscht. Nur vermutet man, dass sie den bei der "Shoyu"-bereitung auftretenden ziemlich ähnlich sind. Durch Einwirkung von Mikroben und Enzymen werden verschiedene Stoffe, besonders Eiweissstoffe, allmählich gelöst und abgebaut, unter Bildung von Peptonen und Aminosäuren, die zum Teil weiter desamidiert, oxidiert oder reduziert werden. Es entstehen dabei verschiedene Säuren, Alkohole, Amine u. s. w. Die Zusammensetzung des Breies ist deshalb sehr kompliziert. Es kommen bei verschiedenen Reifestadien verschiedene Stoffe zum Vorschein. Wir beschränken uns vorläufig mit der Untersuchung der stickstoffhaltigen Bestandteile des käuflichen, gereiften Breies.

Das von uns untersuchte Material war aus Odawara bezogen. Es war graurötlich braun gefärbt und reagierte ziemlich stark sauer.

Die quantitative Bestimmung gab folgendes Resultat:

[Jour. Coll. Agric., Vol. V. No. 1, 1912.]



In 100 Teilen frischem Brei	
Wasser	65,13
Trockensubstanz	34,87

In 100 Teilen Trocken- substanz	
Organische Stoffe	30,06
Asche	69,94
Chlor	29,80
(als NaCl berechnet)	49,18

	In 100, frischem Brei.	Gesamt-N. als 100.
Gesamtstickstoff	1,735	100,0
Eiweiss- ..	0,472	27,2
Basen- ..	0,447	25,7
Ammoniak- ..	0,131	7,6
Stickstoff in anderer Form	0,685	39,5

Zur Isolierung der stickstoffhaltigen Stoffe wurden 4 Kilo Brei ausgepresst. Der Rückstand wurde dreimal mit warmem Wasser (40–50°) extrahiert. Die vereinigten Auszüge, die schwach sauer reagierten, betragen rund 9 Liter. Sie wurden mit 20%iger Tanninlösung gefällt. Der Tannin-Niederschlag (B) wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat vom Tannin-Niederschlag wurde mit verdünnter Natronlauge versetzt, bis es schwach alkalisch reagierte. Es entstand dabei eine flockige Fällung (C) in reichlicher Menge. Man saugte davon ab, und setzte dem Filtrat viel Baryt zu, um das Tannin zu entfernen, saugte wieder ab, und nach dem Entfernen des Baryts mittels Schwefelsäure dampfte man bei niederem Druck stark ein. Es schieden sich dabei Tyrosin, Leucin und anorganische Salze aus.

Aus heissem Wasser umkrystallisiert erhielt man zuerst 3% Tyrosin und von der Mutterlauge desselben 2,1% Leucin. Die beiden Aminosäuren wurden nochmals für sich umkrystallisiert und analysiert.

Tyrosin :

0,1604<sub>g</sub> Subst. gaben 10,7<sup>c</sup> N (16°. 760.<sup>mm</sup>)

$C_9 H_{11} N O_2$	Ber.	N
		7,70
		Gef. 7,78

Leucin :

0,1719<sub>g</sub> Subst. gaben 15,7<sup>c</sup> N (14°. 758.<sup>mm</sup>)

$C_6 H_{13} N O_2$	Ber.	N
		10,07
		Gef. 10,71

Die Mutterlauge von Leucin und Tyrosin wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt.

#### H. DER PHOSPHOWOLFRAMSÄURE-NIEDERSCHLAG.

Die aus diesem Niederschlag dargestellte alkalische Flüssigkeit, die freie Basen enthielt, lieferte nach starkem Einengen im Vakuum keine Krystalle; sie wurde mit Kohlensäure gesättigt und mit Quecksilberchlorid gefällt.

a) Der Quecksilberchlorid-Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, im Vakuum eingedampft und mit Pikrinsäure erwärmt. Nach dem Erkalten schied sich 8,5% fast reines Lysinpikrat aus, welches aus heissem Wasser umkrystallisiert und analysiert wurde.

0,1414<sub>g</sub> Subst. gaben 22,0<sup>c</sup> N (13°. 766.<sup>mm</sup>)  
 0,1491<sub>g</sub> „ „ 0,2094<sub>g</sub> C O<sub>2</sub> 0,0612<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O.  
 0,4149<sub>g</sub> „ „ 0,2533<sub>g</sub> Pikrinsäure.

$C_6 H_{11} N_2 O_2$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		38,40	4,53	18,67	61,07
		Gef. 38,34	4,56	18,53	61,05

Im Kapillarrohr erhitzt zersetzte sich das Pikrat gegen 247° (unkorr.). Das Platinchloriddoppelsalz des Lysins bestand aus hygroskopischen, goldgelben, langen Prismen. Es schmolz bei 205° (unkorr.). Für die Analyse wurde es im Vakuum bei 100° getrocknet.



0,3014<sub>g</sub> Subst. gaben 0,1055<sub>g</sub> Pt.

			Pt.
$C_6 H_{11} N_2 O_2$	$H_2 PtCl_6$	Ber.	35,00
		Gef.	35,00

b) Das Filtrat vom Quecksilberchlorid-Niederschlag wurde nach dem Entfernen des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff und der Salzsäure durch Silbernitrat mit einem Überschuss von Silbernitrat und Baryt versetzt. Der braune Niederschlag lieferte 1,3<sub>g</sub> Lysinipikrat.

Die Analyse des vereinigten Salzes gab folgendes Resultat:—

0,1319<sub>g</sub> Subst. gaben 21,3<sup>cc</sup> N (20°. 760<sup>mm</sup>)

			N
$C_6 H_{11} N_2 O_2$	$C_6 H_3 N_3 O_7$	Ber.	18,67
		Gef.	18,56

c) Das Filtrat vom Silbernitrat- und Baryt-Niederschlag wurde in bekannter Weise mit Phosphowolframsäure gefällt. Aus diesem Niederschlag erhielt man wieder 6<sub>g</sub> Lysinipikrat.

0,1374<sub>g</sub> Subst. gaben 22,3<sup>cc</sup> N. (21°. 763<sup>mm</sup>)  
0,1526<sub>g</sub> „ „ 0,2160<sub>g</sub> C O<sub>2</sub> 0,0672<sub>g</sub> H<sub>2</sub> O.

			C	H	N
$C_6 H_{11} N_2 O_2$	$C_6 H_3 N_3 O_7$	Ber.	38,40	4,53	18,67
		Gef.	38,60	4,89	18,55

#### B. DER TANNIN-NIEDERSCHLAG (TRYPTOPHAN).

Der vom wässerigen Extrakt des Salzbreies durch Zusatz von Tannin erhaltene Niederschlag wurde mit 3%iger Schwefelsäure wiederholt verrieben. Ein Teil ging dabei in Lösung. Man filtrierte nun vom unlöslichen Rückstand ab, und setzte dem Filtrate viel Baryt zu, um damit Tannin und Schwefelsäure wegzuschaffen. Das vom dabei entstandenen Niederschlag abgesaugte Filtrat wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt.

a) Durch Zerlegung des phosphowolframsauren Niederschlags wurde eine Flüssigkeit erhalten, welche schöne Tryptophanreaktion gab. Wird diese Flüssigkeit mit Essigsäure angesäuert und mit einigen Tropfen Bromwasser versetzt, so entsteht eine rot violette Färbung. Beim Schütteln mit Amylalkohol geht der Farbstoff in das letztere Reagenz über. Um das Tryptophan zu isolieren, wurde die Flüssigkeit mit so viel Schwefelsäure versetzt, bis sie 5% der Säure enthielt, und mit Hopkin'schem Reagenz gefällt. Es entstand dabei eine weisse flockige Fällung, die abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Beim Eindampfen des Filtrats im Vakuum schied sich ein Teil des Tryptophans krystallinisch aus. Die Hauptmasse blieb jedoch amorph, so dass das gereinigte Tryptophan nicht zur Analyse ausreichte. Aus dem Filtrate vom Quecksilbersulfat-Niederschlag des Tryptophans wurde eine Base als pikrinsaures Salz isoliert. Dies genügte auch zur weiteren Untersuchung nicht.

b) Das Filtrat des phosphowolframsauren Niederschlags lieferte, nach der Estermethode verarbeitet, eine kleine Menge Leucin.

#### C. DER TANNIN- UND NATRONLAUGE-NIEDERSCHLAG.

Wie oben erwähnt, liefert das Filtrat vom Tannin-Niederschlag (B) durch Zusatz von verdünnter Natronlauge, wieder eine reichliche Fällung, die eine nicht unbedeutliche Menge Basen enthielt. Um die Basen zu isolieren, wurde der Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure verrieben, wobei ein grosser Teil in Lösung ging. Die braune Flüssigkeit wurde nun mit einem Überschuss von Baryt versetzt, vom dabei entstandenen Niederschlag abgesaugt, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt. Nach Zerlegung des phosphowolframsauren Niederschlags in bekannter Weise erhielt man eine alkalische Flüssigkeit, die freie Basen enthielt.

Diese Flüssigkeit wurde nun mit Kohlensäure gesättigt und mit Quecksilberchlorid gefällt.

a) Der Quecksilberchlorid-Niederschlag (Histidin).

Aus diesem Niederschlag erhielt man eine alkalische Flüssigkeit, die



sowohl starke Pauly'sche Reaktion, wie auch Biuretreaktion beim Erwärmen gab. Bei Zusatz von Pikrinsäure wurde 0,5<sub>y</sub> Histidinpikrat gewonnen, welches aus heissem Wasser umkrystallisiert, im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert wurde.

0,1430<sub>y</sub> Subst. gaben 27,8<sup>o</sup> N (24° 759<sup>mm</sup>)  
 0,1517<sub>y</sub> Subst. gaben 0,2034<sub>y</sub> C O<sub>2</sub> 0,0457<sub>y</sub> H<sub>2</sub> O.

$C_6H_9N_3O_2$	$C_6H_5N_3O_7$	Ber.	C	H	N
		Gef.	37,50	3,13	21,91
			37,56	3,35	21,77

Die Analyse stimmt also mit dem Histidinpikrat überein. Der Schmelzpunkt war jedoch viel höher als bei gewöhnlichem Histidinpikrat, welches aus Eiweiss durch Spaltung mit Säuren dargestellt wird. Im Kapillarrohr erhitzt, wurde es gegen 200° braun und zersetzte sich gegen 210° (unkorr.) unter Schäumen. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Isomerie des Histidins. Wegen Mangel an Material konnten wir das optische Verhalten nicht untersuchen.

b) Das Filtrat vom Quecksilberchlorid Niederschlag des Histidins wurde mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Aus diesem Niederschlag isolierte man eine Base als pikrinsaures Salz, welches 1,5<sub>y</sub> betrug. Das Pikrat bestand aus rotbraunen blättrigen Krystallen mit dem Schmelzpunkt 225° (unkorr.). Die Analyse gab folgendes Resultat:

0,1171<sub>y</sub> Subst. gaben 24,2<sup>o</sup> N (20° 700<sup>mm</sup>)  
 0,1372<sub>y</sub> „ „ 0,1715<sub>y</sub> C O<sub>2</sub> 0,0496<sub>y</sub> H<sub>2</sub> O.  
 0,2504<sub>y</sub> „ „ 0,1919<sub>y</sub> Pikrinsäure

$C_6H_{14}N_4O_2$	$(C_6H_5N_3O_7)_2$	Ber.	C	H	N	Pikrin- säure
		Gef.	34,18	3,16	22,15	72,47
			34,09	4,02	23,64	76,63

Die Analyse stimmt also mit dem Arginindipikrat; nur ist der Gehalt an Stickstoff und Pikrinsäure etwas höher.

c) Das Filtrat vom Silbernitrat- und Baryt-Niederschlag (b) wurde wieder mit Phosphowolframsäure gefällt. Der Niederschlag lieferte 2,34<sub>y</sub> Lysinpikrat mit dem Zersetzungspunkt 245° (unkorr.)

#### D. DAS FILTRAT DES PHOSPHOWOLFRAMSAUREN NIEDERSCHLAGES.

Das Filtrat vom Phosphowolframsäure-Niederschlag wurde nach der Estermethode verarbeitet, indem die Phosphowolframsäure und Schwefelsäure durch Baryt entfernt und der Überschuss vom Baryt mittels Schwefelsäure beseitigt und im Vakuum stark eingedampft wurde. Der zurückgebliebene Syrup wurde nun mit absolutem Alkohol versetzt, mit trockenem Salzsäuregas gesättigt und in bekannter Weise in die freien Estern der Aminosäuren verwandelt. Nach fraktionierter Destillation der Estern wurden die folgenden drei Fraktionen erhalten:—

	Temperatur	Estermenge.	Aminosäuren nach der Verseifung.
I.	bis 75° (20 <sup>mm</sup> )	9,0 <sub>y</sub>	3,0 <sub>y</sub>
II.	75—100° („ „)	10,5 <sub>y</sub>	7,8 <sub>y</sub>
III.	über 100° („ „)	7,0 <sub>y</sub>	6,0 <sub>y</sub>

Fraktion I. bestand aus Alanin. Aus heissem Wasser umkrystallisiert, bildete es farblose Nadeln mit süßem Geschmack und zersetzte sich gegen 270°. Für die Analyse wurde es im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1553<sub>y</sub> Subst. gaben 21,3<sup>o</sup> N (17° 760<sup>mm</sup>)  
 0,1530<sub>y</sub> „ „ 0,2248<sub>y</sub> C O<sub>2</sub> 0,1040<sub>y</sub> H<sub>2</sub> O.

$C_3H_7NO_2$	Ber.	C	H	N
	Gef.	40,45	7,87	15,88
		40,07	7,55	16,03

Fraktion II. bestand auch hauptsächlich aus Alanin, nebst einer kleinen Menge Prolin.

Analyse des Alanins:—

0,1476<sub>y</sub> Subst. gaben 20,4<sup>o</sup> N (21° 751<sup>mm</sup>)

$C_3H_7NO_2$	Ber.	N
	Gef.	15,88
		15,62

Kupfersalz des Alanins:

0,2114<sub>y</sub> Subst. gaben 0,0703<sub>y</sub> CuO.



$(C_3 H_6 N O_2)_2 Cu$	Ber.	Cu
		26,22
	Gef.	26,57

Fraktion III. bestand zum grössten Teil aus Leucin, nebst Alanin und Prolin. Zweimal aus heissem Wasser umkrystallisiert, wurde das Leucin in ziemlich reinem Zustande erhalten. Es schmeckte schwach bitter und zersetzte sich gegen 280°.

Analyse des Leucins:

0,1467<sub>g</sub> Subst. gaben 13,4<sup>c.c.</sup> N (19°. 762<sup>mm</sup>)

$C_6 H_{13} N O_2$	Ber.	N
		10,07
	Gef.	10,56

Das Prolin wurde isoliert, indem die nach der Verseifung der Estern erhaltenen Aminosäuren mit heissem absoluten Alkohol extrahiert wurden. Der vereinigte alkoholische Extrakt wurde eingedampft und der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol extrahiert. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde das Prolin in bekannter Weise in das charakteristische Kupfersalz verwandelt, welches in heissem absoluten Alkohol löslich war. Die Ausbeute an Kupfersalz betrug 1,03<sub>g</sub>. Für die Analyse wurde das gereinigte Salz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1613<sub>g</sub> Subst. gaben 13,8<sup>c.c.</sup> N (22°. 752<sup>mm</sup>)

$(C_5 H_9 N O_2)_2 Cu$	Ber.	N
		9,60
	Gef.	9,59

Ferner wurde das Vorhandensein von Glutaminsäure im Filtrat des phosphowolframsauren Niederschlages durch ihren charakteristischen faden Geschmack ausser Zweifel gestellt. Wegen Mangel an Zeit haben wir diese Säure nicht isoliert.

Aus 4 Kilo Salzbrei vom Bonito wurden isoliert:—

1. Lysin-pikrat. . . . . 18,14<sub>g</sub>.

2.	Histidin-pikrat. . . . .	0,50 <sub>g</sub> .
3.	Tyrosin. . . . .	3,00 <sub>g</sub> .
4.	Leucin. . . . .	4,06 <sub>g</sub> .
5.	Alanin. . . . .	10,80 <sub>g</sub> .
6.	Leucin und Alanin. . . . .	4,00 <sub>g</sub> .
7.	Prolin-kupfer. . . . .	1,03 <sub>g</sub> .
8.	Tryptophan, . . . . .	Vorhanden.
9.	Arginin-dipikrat. (?) . . . . .	1,50 <sub>g</sub> .
10.	Glutaminsäure. . . . .	Vorhanden.



## Chemical Studies on the Ripening of "Shiokara."

BY

**Y. Okuda.**

---

Although the isolation and identification of some nitrogenous compounds in "Shiokara" has been undertaken about two years ago by Prof. U. SUZUKI, YONEYAMA, and ŌDAKE in this laboratory, no chemical investigation about the ripening process of this interesting food material has yet been reported. So I have tried to contribute something on this line. I have observed that the autolysis and the action of microbes are two indispensable factors for the preparation of "Shiokara."<sup>1</sup> Some trials have also been made to isolate the enzymes which play an important rôle in this process, and finally, I have carried out some quantitative determinations to see the chemical changes at different stages of ripening.

### I. Autolysis and the Action of Microbes.

1). To see whether autolysis is going on during the ripening process of "Shiokara," very fresh organs<sup>2</sup> of a bonito fish were minced with a meat-chopping machine, and rubbed with some quartz sand in a mortar. 40g of the paste thus prepared was divided into two equal parts and put in the flasks A and B. After adding 100 c.c. of water to each flask, A was boiled for a few minutes to destroy the enzymatic action. Both flasks were then shaken with enough toluol and a little chloroform, and kept for 4 days at ordinary temperature. No bacterial growth was observed during that

1. "Shiokara" made from the organs of bonito was used.
2. The stomach, intestines and pyloric caecum.

[Jour. Coll. Agric., Vol. V. No. 1, 1912.]



time. The flask B was now boiled, and the contents of both flasks were then filtered and analysed with the following results:—

	A (boiled)	B (not boiled)
Total soluble nitrogen	1.697 %	1.895 %
Soluble albuminoid nitrogen	0.184 „	0.141 „
Non-albuminoid nitrogen	1.513 „	1.754 „

2). The fresh "Shiokara" two days after preparation was chopped and crushed in a mortar, 200g of the paste were divided into two equal parts, put in two flasks of 1 litre capacity and stoppered with cotton plugs. After adding 500 c.c. of water, one flask was boiled. To each flask was now added enough toluol and chloroform, and after keeping for 4 days at room temperature, the contents of both flasks were filtered and analysed.

	A. (boiled)	B. (not boiled)
Total soluble nitrogen	1.848 %	2.052 %
Soluble albuminoid nitrogen	0.056 „	0.038 „
Non-albuminoid „	1.792 „	2.014 „
Amino nitrogen (after formol method)	0.604 „	1.023 „

We see from the above two experiments that autolysis is going on in the fresh organs of bonito fish, and also in the freshly prepared "Shiokara."

3). The microbes predominating in "Shiokara" seem to be quite different at different stages of its ripening. In three preparations, made in April and two months old, we found immense numbers of yeasts, bacilli and cocci, but only few moulds, while in a sample prepared early in October and about one and a half months old, were found numerous yeasts, the other microbes being relatively very few.

The isolation and identification of these microbes will be reported afterwards.

4). 120g of the "Shiokara", which was two months old, were well crushed and equally divided into three Erlenmeyer's flasks containing each 100 c.c. of saturated sodium chloride solution and treated in the following way.

A. Control:—Not boiled, no antiseptics added.

B. Not boiled, toluol and chloroform added to prevent the bacterial growth, but not the enzymatic action.

C. Boiled and antiseptics added to prevent both bacterial and enzymatic action.

After keeping for ten days at 34-38°, they were boiled and filtered, and the filtrates were analysed with the following results:—

	A. (Control)	B. (not boiled but antiseptic added)	C. (boiled and antiseptic added)
Total soluble nitrogen	2.404 %	2.305 %	2.305 %
Soluble alb. nitrogen	0.049 „	0.090 „	0.184 „
Non-alb. nitrogen	2.355 „	2.215 „	2.121 „

The above experiment shows that both autolysis and the action of microbes are going on very slowly in the old preparations compared to fresh ones. The investigation of WEHMER<sup>3</sup> on salted herring has shown that the action of microbes upon proteins is somewhat retarded in 5 per cent. common salt solution, but it does not entirely stop even in 30% solution. As the concentration of the salt in "Shiokara" usually is 15%, there is no doubt that the microbes can still play an important rôle on the ripening process, especially at the early stage of its preparation.

## II. Enzymes in "Shiokara."

Trypsin, diastase and lipase were identified in the fresh organs of a bonito fish and also in the fresh preparations of "Shiokara." In the old preparation however, their action seems to be much retarded. This observation agrees well with the experiments mentioned above.

1). Fresh organs. The stomach, intestines and pyloric caecum of a fresh bonito were freed from their contents and rubbed with some quartz sand in a mortar, and filtered through the cloth filter. The faintly acid extract thus obtained has shown its peptonifying power upon milk and fibrin, either in the faintly acid reaction or after addition of 0.2% sodium carbonate. But

3. WEHMER. Abhandlungen des deutschen Seefischer-Vereins, III, 1898, 1.



no action was observed in presence of 0.2% hydrochloric acid in the medium, thus the absence of pepsin is most probable.

The existence of diastase was shown by the saccharification of starch paste and glycogen in the neutral reaction.

For the detection of lipase, the minced and ground organ was extracted with a mixture of 90 parts of pure glycerine and 10 parts of 1% sodium carbonate, 10 c.c. of the mixture being used for 1g of the sample. The liquid was filtered through a piece of cloth and exactly neutralized. By the addition of some milk or olive oil to this extract, the increase of acidity due to the formation of fatty acids by the action of lipase upon neutral fats was observed. Of course some toluol and chloroform being added to prevent the bacterial growth.

2). "Shiokara" at different stages of ripening. The following observation was made with the samples collected at different stages of ripening:—

(a). "Shiokara," two days old.

Trypsin.	Present, active.
Diastase.	Do.
Lipase.	Present, but the action was very weak.

(b). "Shiokara," 40-50 days old.

Trypsin.	Present, but very weak.
Diastase.	No reaction.
Pepsin.	Do.

(c). "Shiokara," 50-60 days old.

Trypsin.	Very weak.
Lipase.	Do.
Diastase.	No reaction.

3). Isolation of enzymes. For this purpose, about 200g of the fresh sample, 3 days old, were finely minced and ground with some quartz sand in a mortar and macerated with a little distilled water. The liquid was strained through linen cloth, and after dialysing for about two hours to get rid of the greater part of the common salt, it was poured into a mixture of absolute alcohol and ether, the grayish white voluminous precipitate thus produced was then collected on a filter, washed with absolute alcohol and ether, and dried over sulphuric acid. The crude enzyme preparation obtained in

this way, when dissolved in a little water, has shown strong diastatic and tryptic action while that of lipase was very weak. When the solution of these crude enzymes was added to a solution of various amino-acids, no liberation of ammonia was observed, showing the absence of amidase.

The proteolytic enzyme, which acts in weak alkaline as well as in neutral or in faintly acid reaction, but not in a 0.2% hydrochloric acid solution, was also found by BLANCHARD<sup>4</sup> in several fish and by ROAF<sup>5</sup> in two crustacea.

### III. Chemical Changes during the ripening Process.

1). The sample<sup>6</sup> used for this determination was prepared on the 17th of June, 1911, and after 3, 6, 12, 25, and 40 days respectively a portion was taken for analysis. Thus the following results were obtained:—

IN 100 PARTS OF FRESH SAMPLES.

Date of analysis	3	6	12	25	40	days after preparation.
Water .. .. .	64.95	64.78	64.58	64.25	63.99	
Dry matter .. .. .	35.05	35.22	35.42	35.75	36.01	
Total N .. .. .	1.98	2.04	2.05	—	2.07	
Alb. N.. .. .	0.35	0.35	0.28	0.26	0.14	
Ether extract .. .. .	1.83	1.81	1.81	1.71	1.74	
Soluble matter .. .. .	27.25	28.45	29.24	31.10	31.14	
Non-alk. N.. .. .	1.63	1.69	1.83	1.98	2.01	
Ammonium N .. .. .	0.15	0.15	0.25	0.18	0.13	
Organic base N .. .. .	0.84	0.72	0.69	0.63	0.64	
Other N .. .. .	0.74	0.80	1.09	1.17	1.43	
Total acid (as lactic) .. .. .	1.43	1.42	0.97	0.96	0.98	
NaCl (calculated from total chlorine) ..	17.31	—	17.34	—	17.71	

4. BLANCHARD, Jahresbericht für Tierchemie, 13, 1883-orig. Compt. rend. 96, 1241.

5. ROAF, Jahresber. f. Tierchemie, 36, 1906-orig. Biochem. Journal, 1, 390-97.

6. This sample contained the stomach, intestines, pyloric caecum and very little liver.



## IN 100 PARTS OF DRY MATTER.

Total N .. .. .	5.64	5.79	5.79	—	5.76
Alb. N.. .. .	1.00	1.00	0.80	0.71	0.38
Ether extract .. .. .	5.21	5.13	5.10	4.77	4.84
Soluble matter .. .. .	77.74	80.76	82.53	86.99	86.49
Non-alb. N .. .. .	4.64	4.79	5.18	5.54	5.57
Ammonium N .. .. .	0.43	0.43	0.70	0.51	0.36
Organic base N .. .. .	2.39	2.04	1.97	1.77	1.79
Other N .. .. .	2.12	2.26	3.09	3.26	3.98
Total acid .. .. .	4.07	4.02	2.73	2.67	2.72
Common salt .. .. .	49.37	—	48.95	—	49.17

2). The second sample<sup>7</sup> was prepared on the 3rd of Oct. 1911, and after 1, 14, and 53 days respectively, a portion was taken for analysis:—

	In 100 parts of fresh sample.			In 100 parts of dry matter.			days after preparation.
	1	14	53	1	14	53	
Date of analysis .. .. .							
Water.. .. .	64.39	63.00	60.33	0.0	0.0	0.0	
Dry matter .. .. .	35.61	36.99	39.67	100.0	100.0	100.0	
Total N .. .. .	2.29	—	—	6.42	—	—	
Total acid .. .. .	0.95	1.05	1.14	2.65	2.85	2.88	
Ether extract .. .. .	6.84	6.80	—	19.19	18.61	—	
Soluble matter .. .. .	25.61	27.14	28.90	71.92	73.27	72.86	
Non-alb. N .. .. .	1.59	1.85	2.07	4.45	4.99	5.21	
Ammonium N .. .. .	0.10	0.12	0.14	0.28	0.32	0.35	
Organic base N .. .. .	0.81	0.73	0.71	0.27	1.96	1.79	
Creatinine N .. .. .	0.01	trace	trace	2.02	trace	trace	
Creatine N .. .. .	0.02	trace	trace	0.04	trace	trace	
Xanthine base N .. .. .	—	0.06	0.03	—	0.16	0.08	
Other N .. .. .	0.66	1.00	1.21	1.86	2.71	3.05	
Sodium chloride .. .. .	13.51	13.94	—	37.94	37.62	—	

7. This sample contained more liver than the former one.

The results of the above two analyses may be summarized as follows:—

	(1)	(2)
Soluble organic matter.	Gradually increased.	Do.
Alb. N	" decreased	—
Non-alb. N	" increased	Do.
Ammonium N	Increased at first and decreased henceforward.	Gradually increased
Monoamino N	Gradually increased	Do.
Organic base N	" decreased	Do.
Creatine N	—	Gradually decreased
Creatinine N	—	Do.
Xanthine base N	—	Do.
Ether extract	Somewhat decreased	Do.
Total acid	Decreased	Somewhat increased

Thus the results of two analyses resemble each other in general respects, only the contradictory results were observed with ammonia and with total acid. This may be due to the differences of materials and temperature during the experiments.

3). I will add here some qualitative tests made about the distillates obtained by the steam distillation of two Shiokara preparations.

	10 days after preparation.	61 days after preparation.
In the distillate.		
Alcohol	(+) <sup>8</sup> (very little)	(-)
Aldehyde	(-)	(-)
Acetone	(-)	(-)
Indol	(-)	(-)
Phenol	(-)	(-)
Formic acid	(+) (trace)	(+) (distinct)
In the residue.		
Lactic acid	(+) (distinct)	
Succinic acid	(-)	
In the water extract of the natural sample.		
Tryptophan	(+)	(+)

8. (+) indicates presence; (-) absence.



### Summary of the Results.

1. Various samples, examined at different stages of ripening, gave all acid reaction chiefly due to lactic acid.
  2. Autolysis is going on in the freshly prepared "Shiokara," and decreases gradually as the ripening process proceeds.
  3. The enzymes found in "Shiokara" are diastase, lipase and trypsin. The last one acts not only in weak alkaline solution but even in neutral or in faintly acid reaction.
  4. Microorganisms play also some important rôle during the ripening process.
  5. Temperature has also great influence upon the action of enzymes and microbes.
  6. During the ripening process, the increase of soluble matter, non-albuminous nitrogen, especially monoamino-nitrogen, and the decrease of protein, organic bases, creatinine, creatine, and purin bases were observed.
- In conclusion I express my thanks to Profs. U. SUZUKI and S. MACHIDA for their kind advice given during the progress of this work.

### On Koji Acid, a new organic Acid formed by *Aspergillus Oryzae*.

BY

T. Yabuta.

Dr. K. SAITO has recently isolated a new organic acid from *Aspergillus Oryzae*, which was grown on steamed rice. For this purpose he has extracted the finely powdered fungus mass with hot water, evaporated the extract into a syrup, which was repeatedly shaken with ether. On evaporating the ethereal solution he has obtained the crude acid, which was purified by recrystallization from hot water. It forms colourless needles, giving a strong red coloration with ferric chloride. The qualitative tests have shown that this acid is not identical with oxalic, succinic, citric, malic, tartaric or benzoic acid, which usually occur in the lower fungi. Judging from the melting point and from the characteristic reaction with ferric chloride, he supposed it to be identical with  $\beta$ -resoreyl-carbonic acid. But owing to the difficulty of obtaining the pure acid in large quantities, he did not investigate it any further, so I have tried to clear up the chemical nature of this acid. For this purpose I have prepared fairly large quantities of it as pure as possible, and confirmed the empirical formula to be  $C_{12}H_{14}O_8$ . From the copper salt, as well as from the acetyl derivative and benzoyl derivative, the presence of two carboxyl and four hydroxyl groups in the molecule has also been ascertained, so that the formula may be written as  $C_{10}H_8(OH)_4(COOH)_2$ . It is therefore quite different from  $\beta$ -resoreyl carbonic acid and so far as I know, the occurrence of such an acid in fungi has never been mentioned before. I have given the name "Koji acid" to this acid.



### Isolation of Koji Acid.

For the isolation of koji acid in large quantities I have modified Dr. SAITO's method in the following way :

1). 150<sub>g</sub> steamed rice are put in an Erlenmeyer flask of 500<sub>cc.</sub> capacity, which is provided with cotton air filter, and after repeated sterilization in Koch's steam sterilizer, it is inoculated with the spores of *Aspergillus oryzae* and kept at 30—35° for 2—3 weeks, being shaken from time to time. When the rice is fully covered with the myceliums and brown spores of the fungus, it is dried at low temperature, finely powdered, and extracted with ether in a large Soxhlet's extraction apparatus. During the extraction a part of koji acid crystallizes out as colourless needles from the ethereal solution, while a part remains in the solution. The ethereal solution is now evaporated to dryness, and treated with petroleum ether to remove the fatty matter. The crude acid thus obtained is dissolved in a little hot water, decolorized with animal charcoal (which should be free from trace of iron) and evaporated. About 50<sub>g</sub> koji acid can be thus obtained from 15 kilo rice.

2). Finely powdered koji is extracted with boiling alcohol. The alcoholic extract is evaporated by reduced pressure nearly to dryness. The residue is dissolved in water and precipitated with basic lead acetate, avoiding an excess. The precipitate thus produced is filtered off and the filtrate therefrom is treated with sulphuretted hydrogen to remove the excess of lead and evaporated in vacuum to expel the sulphuretted hydrogen. The acid solution thus obtained is neutralized with caustic soda. By adding a copper sulphate solution to it, the light green copper salt of koji acid is precipitated at once, which is washed with water and decomposed with sulphuretted hydrogen. The filtrate of the copper sulphide which contains the free koji acid is evaporated to a small volume. After cooling the acid separates as colourless needles which may be purified by recrystallization.

The free acid crystallizes in colourless needles or prisms with no water of crystallization. It melts at 152° (not corr.) to a brownish liquid. The crystals have a bitter taste, while the aqueous solution is somewhat sour.

The purified acid is rather stable in the air. It is readily soluble in ethyl alcohol, methyl alcohol, water and acetone, less easily in pyridin, slightly in ether and chloroform, and quite insoluble in petroleum ether, ligroin, benzene and carbon tetrachloride. The aqueous solution has an acid reaction to congo red, phenol phthalein, rosolic acid, litmus and methyl orange. It expels carbonic acid gas from an alkaline carbonate or bicarbonate solution. The aqueous solution gives a strong wine-red coloration with ferric chloride, which may be recognized even in the dilution of 1/200,000. No reaction is, however, obtained with ferrous salts. The red coloration disappears on addition of diluted mineral acids and reappears by neutralization. As already mentioned, koji acid is precipitated from its aqueous solution by copper acetate or sulphate, the precipitation being complete, when the solution is previously neutralized with dilute alkali. The acid is not precipitated from its aqueous solution by aqueous or ammoniacal silver nitrate, neutral, basic or ammoniacal lead acetate, tannin, mercuric chloride, phosphotungstic and phosphomolybdic acid. It has no reaction upon alkaline diazo-benzolsulphonic acid, NESSLER's reagent, MILLON's reagent, FEHLING's solution. The aqueous solution of the acid absorbs much bromine. Neither a methoxyl nor ethoxyl group is recognized by ZEISSER's method. When potassium permanganate is added to the alkaline or alkali carbonate solution of koji-acid, the latter is oxidized, oxalic acid being one of the oxidation products.

Koji acid leaves no ash after ignition, it contains no nitrogen, sulphur, phosphorus or halogen in its molecule.

Different samples of the acid, purified from various solvents, such as water, alcohol, acetone and ether, were dried in vacuum at 100°, and analysed with the following results :—

1.	0.1770 <sub>g</sub> subst. gave	0.3264 <sub>g</sub> CO <sub>2</sub>	0.0776 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
2.	0.1810 <sub>g</sub> " "	0.3340 <sub>g</sub> " "	0.0840 <sub>g</sub> " "
3.	0.1374 <sub>g</sub> " "	0.2542 <sub>g</sub> " "	0.0626 <sub>g</sub> " "
4.	0.2240 <sub>g</sub> " "	0.4132 <sub>g</sub> " "	0.1000 <sub>g</sub> " "



$C_{12}H_{14}O_5$		% C.	% H	% O
calc.		50.35	4.90	44.75
found	1.	50.29	4.87	44.84
	2.	50.33	5.15	44.52
	3.	50.49	5.06	44.45
	4.	50.31	4.96	44.73

### The Copper Salt.

The copper salt is easily obtained by adding copper acetate or copper sulphate to the aqueous solution of the acid, which is previously neutralized with caustic soda. The precipitate is collected on a filter and washed with hot water, until the filtrate gives no reaction for sulphuric acid.

The copper salt forms light green rhombic crystals, containing no water of crystallization. It is insoluble in water, alcohol, ether, benzene, petroleum ether and ligroin, but soluble in dilute mineral acids as well as in acetic acid. It dissolves also in dilute ammonia with blue coloration.

The analysis of the salt dried in vacuum at 100° gave the following result:—

1.	0.1179 <sub>g</sub> subst. gave	0.1782 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0.0395 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
2.	0.1085 <sub>g</sub> „ „	0.1644 <sub>g</sub> „	0.0365 <sub>g</sub> „
1.	0.5000 <sub>g</sub> subst. gave	0.1160 <sub>g</sub> Cu O	
2.	0.7824 <sub>g</sub> „ „	0.1782 <sub>g</sub> Cu O	

$C_{12}H_{12}O_5Cu$		% C	H	% Cu
calc.		41.42	3.45	18.32
found	1.	41.22	3.73	18.49
	2.	41.32	3.68	18.19

### The Acetyl Derivative.

1). The acetyl derivative is obtained by boiling the acid with five times its weight of acetic anhydride in a flask connected with reverted cooler. After heating for 2 hours, it is evaporated under diminished pressure to remove the excess of acetic anhydride and the acetic acid formed by the reaction. The residue is recrystallized several times from hot alcohol.

2). In the previous method acetic anhydride may be mixed with half of its weight of anhydrous sodium acetate. The acetylated product can be easily separated from sodium acetate by means of ethyl acetate, owing to their different solubilities.

3). One part of the acid and two parts of acetyl chloride are put into a flask, provided with reverted cooler, and gently warmed on the water bath. The reaction takes place very violently with the evolution of hydrochloric acid gas. When the reaction is over, it is evaporated in vacuum to remove the excess of acetyl chloride and hydrochloric acid, and the residue is purified as mentioned above.

The acetyl compound crystallizes from the hot alcoholic solution as colourless needles, which melt at 102° to a brownish liquid. It is easily soluble in ethyl acetate, somewhat less in alcohol, and only sparingly in cold water. It dissolves, however, readily in hot water. The acetyl compound has a slightly acid reaction. It gives no precipitate with copper acetate, nor does it show any reaction with ferric chloride, but the above reactions are obtained when it is previously saponified with caustic alkali and neutralized with hydrochloric acid.

Analysis of the acetyl compound, dried in vacuum at 80° gave the following result:—

1.	0.1051 <sub>g</sub> subst. gave	0.2030 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0.0465 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
2.	0.1234 <sub>g</sub> subst. „	0.2386 <sub>g</sub> „	0.0552 <sub>g</sub> „

$C_{12}H_{10}O_4(O.CH_3CO)_4$		% C	% H	% O
calc.		52.86	4.84	42.30
found	1.	52.67	4.92	42.41
	2.	52.77	4.97	42.26

To give further proof that the acetyl compound has four acetyl radicals in one molecule, I have determined the acetyl value in the following way:

Into 2 Erlenmeyer flasks (A and B) were put 1<sub>g</sub> each of the sample and after dissolving in 50<sup>cc</sup> water, one flask (A) was directly titrated with standard caustic soda solution, while the other flask (B) was previously saponified by adding 100<sup>cc</sup> of standard caustic soda solution. After keeping



for 48 hours at room temperature, just so much standard sulphuric acid was added as to neutralize 100% caustic soda and then titrated with standard soda solution. The difference between the two titrations (A and B) expresses the quantity of standard soda solution, which was used to neutralize the acetic acid produced by the saponification of the acetyl compound. Thus I found :

		NaOH used			
		sample used	before saponification (A)	after saponification (B)	Difference (B-A)
$C_{12}H_{10}O_4(OCH_3CO)_4$	calc.	1.000	22.04	66.18	44.14
	found 1.	1.000	22.00	66.50	44.50
	2.	1.000	22.00	67.00	45.00

From these observations, it is very probable that the original acid has four hydroxyl groups in one molecule.

### The Benzoyl Derivatives.

Two benzoyl derivatives, namely di- and tetra-benzoate corresponding to the formula  $C_{12}H_{10}O_4(OH)_2(O_2C_6H_5CO)_2$ , respectively  $C_{12}H_{10}O_4(O_2C_6H_5CO)_4$ , were obtained in the following way.

#### 1). Dibenzoyl derivative.

1g. finely powdered koji acid is suspended in 40% absolute ether, 10% benzoyl chloride is added to it and heated in a flask, connected with reverted cooler, for 2—3 hours. After cooling, the reaction product is collected on a filter and washed with petroleum ether to remove the adhering benzoyl chloride. The residue is then dissolved in a little alcohol. On addition of large quantities of cold water, the benzoyl compound separates at once as colourless needles, which may be further purified by repeating the same process.

The benzoyl compound melts at 137° to a brownish liquid. It dissolves only sparingly in cold water, but more easily in hot water. The solubility in alcohol is greater than in water. In ether it is slightly soluble. The benzoyl compound has scarcely any acid reaction. It gives no reaction with

copper acetate or with ferric chloride. After saponifying, however, it gives the above reaction.

Analysis of the benzoyl compound, dried in vacuum at 100° gave the following result :

1.	0.1256g. subst. gave	0.2874g. $CO_2$	0.0530g. $H_2O$
2.	0.0862g. " "	0.1994g. " "	0.0370g. " "

		% C	% H	% O
$C_{12}H_{10}O_4(OH)_2(O_2C_6H_5CO)_2$	calc.	63.15	4.45	32.40
	found 1.	63.13	4.69	32.18
	2.	63.08	4.76	32.16

#### 2). Tetra-benzoyl derivative.

1g. koji acid dissolved in 50% water is shaken with 10% benzoyl chloride and 50% caustic soda solution (15%), cooling with cold water, until the odour of benzoyl chloride vanishes. The benzoyl derivative separating from the solution is collected on a filter, washed with water and recrystallized from hot alcohol which was slightly acidified with hydrochloric acid. The crystals thus obtained are treated with water until the filtrate gives no reaction for chlorine. For further purification they are repeatedly recrystallized from hot alcohol.

The benzoyl derivative forms colorless plates which melt at 135°. It is hardly soluble in water but readily in alcohol or glacial acetic acid.

Analysis of the benzoyl derivative, dried in vacuum at 100° gave the following result :

0.1412g. subst. gave	0.3530g. $CO_2$	0.0526g. $H_2O$
----------------------	-----------------	-----------------

		% C	% H	% O
$C_{12}H_{10}O_4(O_2C_6H_5CO)_4$	calc.	68.37	4.28	27.35
	found	68.23	4.14	27.63

Different varieties of *Aspergillus oryzae* seem to produce different amounts of koji acid under same conditions. According to my observation, the varieties isolated from "Tamari-koji" produce more acid than those isolated from "Shoyu-" or "Sake-koji." Generally those varieties which liquefy gelatine more powerfully seem to produce more acid.



The acid is also produced by some other *Aspergillus* species, but not by *Penicillium* or *Mucor*, as the following table shows:—

<i>Asp. oryzae</i> .. .. +	<i>Penicillium glaucum</i> .. -
„ <i>albus</i> .. .. +	„ <i>glaurosuum</i> .. -
„ <i>candidus</i> .. .. +	„ <i>olivaceum</i> .. -
„ <i>Okazaki</i> .. .. -	<i>Mucor amylomyces</i> .. -
„ <i>melleus</i> .. .. -	„ <i>racemosus</i> .. .. -
„ <i>minimus</i> .. .. -	„ <i>circinoides</i> .. .. -
„ <i>fumigatus</i> .. .. -	„ <i>spinosus</i> .. .. -
„ <i>Wenti</i> .. .. -	„ <i>mucedo</i> .. .. -
„ <i>niger</i> .. .. -	„ <i>stolonifer</i> .. .. -
„ <i>ochraceus</i> .. .. -	<i>Oidium lactis</i> .. .. -
„ <i>glaucus</i> .. .. -	<i>Botrytis cineria</i> .. .. -
„ <i>tuckermansii</i> .. .. -	<i>Dematiium pullulans</i> .. -
„ <i>nidulans</i> .. .. +	<i>Monilia candida</i> .. .. -
„ <i>flavus</i> .. .. -	„ <i>javanica</i> .. .. -
„ <i>clavatus</i> .. .. -	„ <i>variabilis</i> .. .. -
„ <i>giganteus</i> .. .. -	<i>Chalara mycoclerma</i> .. -
„ <i>varians</i> .. .. -	

As the acid is also produced by the aspergillus when cultured in "koji extract," it is easily detected by previously adding a few drops of ferric chloride to the culture medium.

Different culture media behave also differently upon the production of this acid. Thus, the latter is produced when the aspergillus has grown on certain cereals, such as maize, wheat, barley, rye, oats and Italian millet, but not on leguminous seeds, as peas, beans, horse beans, broad beans, soja beans, Indian beans, black beans, quail beans, etc. Among many root crops examined, sweet potato was the only one which produces this acid.

The antiseptic power of koji acid upon mould fungi and yeasts seems to be very weak, as Dr. SAITO has already reported. Certain fungi can even assimilate it as a nutrient. But the bacterial growth is generally stopped, when the nutritive medium contains more than 0.5% of this acid.

## Über das Vorkommen von Nikotinsäure (m-Pyridin-carbonsäure) in der Reiskleie.

VON

U. Suzuki und S. Matsunaga.

Während wir uns mit der Untersuchung des Oryzanins in der Reiskleie beschäftigten, haben wir als ein Nebenprodukt Nikotinsäure gefunden. Da diese Säure unseres Wissens zum ersten Male im Pflanzenreich gefunden worden ist, so machen wir eine kurze Mitteilung darüber.

Zur Isolierung dieser Säure wurde die entfettete Reiskleie wiederholt mit 80-85%igem heissem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde stark eingedampft, um den grössten Teil des Alkohols auszutreiben. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, abfiltriert und mit Aether geschüttelt, um die Fette und andere Verunreinigungen zu entfernen. Nach dem Austreiben des Aethers wurde die Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis diese ungefähr 3% erreichte, und mit Phosphowolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig 3%iger Schwefelsäure gewaschen und in bekannter Weise mit Baryt zerlegt. Die vom Bariumphosphowolframat abfiltrierte und bei niederem Druck stark eingedampfte Flüssigkeit reagierte nach dem Entfernen des überschüssigen Baryts mittels Schwefelsäure gegen unsere Erwartung ziemlich stark sauer, und bei Zusatz von Pikrinsäure in kleinem Überschuss schied sich ein Pikrat aus, das in Wasser und in Alkohol ziemlich schwer löslich war. Es liess sich daher beim Erwärmen mit wenig Alkohol leicht von der Verunreinigung trennen. Aus heissem Wasser umkrystallisiert schied sich das Pikrat als hellgelblichweisse sandige Krystalle aus. Im Kapillarrohr erhitzt schmilzt es bei 214° (unkorr.) unter Zersetzung. Für die Analyse wurde das Salz im Vakuum bei 100° getrocknet.



## Analyse des Pikrats.

1) 0.1602 <sub>g</sub> Subst.	0.2376 <sub>g</sub> $C O_2$	0.0348 <sub>g</sub> $H_2 O$		
0.1291 <sub>g</sub> „	19.0 <sup>c.c.</sup> $N$ (21.25 757 <sup>mm</sup> )			
0.1076 <sub>g</sub> „	0.0705 <sub>g</sub> Pikrinsäure			
2) 0.1511 <sub>g</sub> „	0.2254 <sub>g</sub> $C O_2$	0.0350 $H_2 O$		
0.1342 <sub>g</sub> „	18.2 <sup>c.c.</sup> $N$ (12° 763.5 <sup>mm</sup> )			
	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>N</i>	Pikrinsäure
$C_6 H_5 N O_2, C_6 H_3 N_3 O_7$ Ber.	40.91	2.27	15.91	65.06
Gef.	40.45	2.41	16.51	65.50
	40.68	2.57	16.19	—

Die Analyse stimmt also mit dem Nikotinsäurepikrat ziemlich gut.

Die Ausbeute an Pikrat betrug ca. 1 gr. aus 1 Kilo Kleie, was aber bei verschiedenen Kleiearten sehr schwankend sein kann.

Die freie Nikotinsäure wurde dargestellt, indem das Pikrat in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, und wiederholt ausgeäthert wurde, um die Pikrinsäure vollständig zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde dann mittels Baryt von der Schwefelsäure befreit, und bei gelinder Wärme langsam eingedunstet. Es schieden sich dabei farblose, lange Nadeln aus, welche abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser, Alkohol und Aether gewaschen wurden. Für die Analyse wurde die freie Säure nochmals aus Wasser umkrystallisiert, und im Vakuum bei 100° getrocknet.

## Analyse der freien Säure.

0.1394 <sub>g</sub> Subst.	0.2983 <sub>g</sub> $C O_2$	0.0542 <sub>g</sub> $H_2 O$	
0.0707 <sub>g</sub> „	7.05 <sup>c.c.</sup> $N$ (14° 764.5 <sup>mm</sup> )		
	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>N</i>
$C_6 H_5 N O_2$ Ber.	58.54	4.07	11.38
Gef.	58.36	4.32	11.80

Die freie Säure schmilzt bei 228°-229°. Sie ist in kaltem Wasser und Alkohol etwas schwer, in heissem Wasser aber leichter löslich. In Aether und Petrolaether ist sie fast unlöslich. Die wässrige Lösung reagiert stark sauer. Aus verdünnter saurer Lösung wird sie durch Phosphowolframsäure gefällt.

Das Kupfersalz. Wird die wässrige Nikotinsäurelösung mit einer Kupferacetatlösung in kleinem Überschuss versetzt, so entsteht sofort ein hell

blau-grüner Niederschlag des Kupfersalzes, welches in Wasser, Alkohol und Aether schwer löslich ist. Unter dem Mikroskop beobachtet bildet das Kupfersalz rundliche Kugeln oder Sphaerokristalle. Im Kapillarrohr erhitzt zersetzt es sich bis 300° nicht. Für die Analyse wurde es bei 100° getrocknet.

## Analyse des Kupfersalzes.

0.1108 <sub>g</sub> Subst.	0.0291 <sub>g</sub> $Cu O$		
0.2231 <sub>g</sub> „	17.7 <sup>c.c.</sup> $N$ (20.25 760 <sup>mm</sup> )		
	<i>N</i>	<i>Cu</i>	
$(C_6 H_5 N O_2)_2 Cu$ Ber.	9.13	20.68	
Gef.	9.06	20.94	

Das Platinchloriddoppelsalz. Es bestand aus weisslich gelben Krystallen. 0.1653<sub>g</sub> Subst. gaben 0.0497<sub>g</sub> Pt.

	<i>Pt</i>	
$(C_6 H_5 N O_2 H Cl)_2 Pt Cl_4$ Ber.	29.72	
Gef.	30.00	

Aus den oben erwähnten Beobachtungen kann man schliessen, dass die von uns isolierte Säure Nikotinsäure war.

Wir haben ferner unsere Säure mit der reinen Nikotinsäure, die wir von Prof. K. Ikeda im Chemischen Institut der hiesigen Universität bekommen haben, verglichen. Die beiden Präparate waren in jeder Beziehung vollkommen identisch.

Es sei hier erwähnt, dass eine Homolge der Nikotinsäure d. h. Picolin-carbonsäure vor einigen Jahren von O. SCHREINER<sup>(1)</sup> aus humusreichem Boden isoliert worden ist.

(1) O. SCHREINER u. E. C. STONEY: U. S. Department of Agriculture, Bureau of Soils, Bulletin No. 53.



## Über das Vorkommen von Adenin und Asparaginsäure in Maulbeerblättern.

Von

**Z. Mimuroto.**

Bekanntlich sind Maulbeerblätter ziemlich reich an Nicht-Eiweiss-Stickstoff, besonders in jungen Blättern. Nach der Analyse von O. Kellner macht er manchmal 25% des Gesamtstickstoffs aus, so ist zu vermuten, dass verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen darin vorhanden sind. Vorläufig habe ich kleine Versuche angestellt, um diese Stoffe zu isolieren und ist es mir gelungen, das Vorhandensein von Adenin und Asparaginsäure festzustellen. Zu diesem Zwecke wurden 500<sub>g</sub> lufttrockene und fein gepulverte Blätter mit 4 l Wasser bei 50-55° zwei Stunden digeriert, stark abgepresst. Der Rückstand wurde noch zweimal in derselben Weise behandelt. Die vereinigten Auszüge wurden mit Bleiessiglösung so lange versetzt, bis keine Fällung mehr entstand. Nach einiger Zeit wurde abfiltriert und das Filtrat mit 30%igem Quecksilbernitrat versetzt. Als der grösste Teil der Acidität durch Natronlauge neutralisiert war, entstand eine weisse flockige Fällung in reichlicher Menge, die mit kaltem Wasser gewaschen, in wenig Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit wurde bei niederem Druck stark eingedampft und unmittelbar mit Pikrinsäure erwärmt. Es schieden sich dabei feine gelbe Nadeln aus, welche abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wurden. Die Ausbeute betrug 1,2<sub>g</sub>.

Aus heissem Wasser umkrystallisiert, bildet das Pikrat lange, sich zusammen gruppierende Nadeln. Es löst sich in kaltem Wasser ziemlich schwer. Im Kapillarrohr erhitzt, zersetzt es sich bei ca. 289°.

Für die Analyse wurde es im Vakuum bei 100° getrocknet.



Analyse des Pikrats:

0,0456 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0594 <sub>g</sub> C O <sub>2</sub>	0,0124 <sub>g</sub> H <sub>2</sub> O
0,0446 <sub>g</sub> „ „	12,2 <sup>c.c.</sup> N (19° 752 <sup>mm</sup> )	
0,5000 <sub>g</sub> „ „	0,3090 <sub>g</sub> Pikrinsäure	

		C	H	N	Pikrin- säure
C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> , C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Ber.	36.25	2.21	30.78	62.80
	Gef.	35.53	3.02	31.23	61.80

Um die freie Base darzustellen wurde das Pikrat in wenig Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und wiederholt mit Aether geschüttelt, um die Pikrinsäure vollständig zu entfernen. Nach dem Entfernen der Schwefelsäure mittels Baryt, wurde die wässrige Lösung der Base bei gelinder Wärme fast bis zum Trocknen eingedampft. Es schieden sich dabei fast farblose kleine Krystalle aus, welche in kaltem Wasser ziemlich schwer, in heissem Wasser leichter löslich waren. In Mineralsäuren, Alkalien und Ammoniak lösten sie sich sehr leicht. Im Kapillarrohr erhitzt sublimierten sie ohne zu schmelzen. Sie gaben die WEIDEL'sche sowie die STRECKER'sche Reaktion nur schwach. Wird die wässrige Lösung mit einem Stückchen Zink und Salzsäure im Wasserbade erwärmt, so tritt eine vorübergehende, schöne Rosafärbung ein, welche durch Zusatz von Natronlauge rotbraun wird.

Alle diese Eigenschaften stimmten mit reinem Adenin überein. Zur Analyse genügte das Material nicht, daher beabsichtige ich diese Versuche nochmals mit grösseren Mengen zu wiederholen.

Die Mutterlauge des Adeninpikrats wurde nach der Entfernung der Pikrinsäure mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphowolframsäure gefällt. Aus dem phosphowolframsauren Niederschlag habe ich eine peptonartige Substanz in kleiner Menge erhalten.

Das Filtrat vom phosphowolframsauren Niederschlag wurde in bekannter Weise nach der FISCHER'schen Estermethode verarbeitet. Nach Verseifung des freien Esters wurden 0,3<sub>g</sub> Aspaarginsäure isoliert. Da die Menge derselben nicht zur Analyse ausreichte, habe ich unmittelbar das Kupfersalz dargestellt. Es bestand aus hellblauen Nadeln, mit dem Schmelzpunkt 224°

(unkorr.) Die Krystallformen, Schmelzpunkt und Löslichkeit u. s. w. stimmten mit reiner Asparaginsäure vollständig überein.

Analyse des Kupfersalzes:—

0,100 <sub>g</sub> Subst. gaben	0,0268 <sub>g</sub> Cu O
---------------------------------	--------------------------

		Cu O
C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>1</sub> Cu + 4½ H <sub>2</sub> O	Ber.	26.8
	Gef.	26.2

Während der Verarbeitung des freien Esters habe ich die Entwicklung des Ammoniaks beobachtet. Daraus erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das Asparagin, während der Behandlung mit Salzsäuregas in Asparaginsäure und Ammoniak gespalten war.

Im wässrigen Extrakt von Maulbeerblättern habe ich ferner ziemlich viel Glukose als Osazon isoliert.



**A Contribution to the Study of the Chemical Composition of the Silkworm at different Stages of its Metamorphosis.**

BY

**R. Inouye.**

---

The experiments have been carried out at the suggestion of Prof. U. SUZUKI, first with Mr. T. TAKENOCHI and then with Mr. K. C. BHARATKAR. In the course of analysis great assistance has been kindly given by S. ŌDAKE and S. IWAOKA.

During the metamorphosis of the silkworm, a great chemical change is supposed to take place in its body. Dr. O. KELLNER<sup>1</sup> investigated the feeding of the silkworm and found neither ammonia nor hippuric acid in the excrement of the silkworm, but uric acid was a chief constituent of it; the silkworm was not able to digest fibre, but non-albuminoid nitrogenous compounds could be digested in a small quantity; and the silkworm developed no nitrogen gas while living and also no volatile nitrogenous compounds. F. ANDERLINI<sup>2</sup> investigated the content of glycogen during metamorphosis and concluded that the pupa and the female moth contained it in the largest quantity.

E. BATAILLON<sup>3</sup> studied the quantity of carbon dioxide gas exhaled on pupating and attributed the decrease of the gas production in the pupal stage to its condensing in the body.

LUCIANI and LO MONACO<sup>4</sup> also studied the respiration of the silkworm. E. CONOBEUR<sup>5</sup> found the increase of glycogen when the silkworm changed

- 1). O. KELLNER: Landw. Versuchsstat. Bd. XXX, 1882, P. 59 and Bd. XXXIII, 1886, P. 35.
- 2). F. ANDERLINI: Atti del R. Institute Veneto di Scienze 5, 1291-1294.
- 3). E. BATAILLON: Compt. rend. 115, 61-64.
- 4). LUCIANI and LO MONACO: Arch. ital. de Biologie 23, 424.
- 5). E. CONOBEUR: T. Chemie 1895, 25, 402.



into the pupa even without taking any nutrient, the content of fat being nearly constant; the latter, however, greatly decreases when the pupa becomes moth.

C. VANEY and F. MAIGNON<sup>1</sup> investigated the relative quantity of glucose, glycogen, fat and carbohydrate. Lately EMIL ARDERHALDEN and WOLFGANG WEICHARDT<sup>2</sup> studied the monoaminoacids which were formed by the total hydrolysis of silkworms and moths, and concluded that the moth is to be considered as silkworm minus cocoon, in other words, the silkworm, when changing into the pupa, produced on hydrolysis large quantities of glycocoll, alanine, and tyrosine while the moth produced them only in small quantity. The above is a general sketch concerning the chemistry of the silkworm. How the chemical composition of the silkworm is changed at each phase of its metamorphosis has not yet been minutely studied, as far as I know, and that investigation is the aim of the present analysis. Some preliminary notes, however, must first be made.

#### A. Preparation of the Sample.

Some 1000 silkworms of a spring-race, *Koishimaru*, which had been reared at the Tokyo Sericultural Institute, were collected at their maturity (on the 6th June, 1910), and some 200 of them, weighing 475g, were at once killed by sulphuretted hydrogen gas, dried up on a water bath and ground into fine powder for analysis. The rest were put one by one into a roll of paper which was made of a sheet of filter paper (13.4<sup>cm</sup> × 10.4<sup>cm</sup>) for spinning cocoons, and thus any possible loss, which might otherwise happen, was prevented by this. On the 9th day after finishing to spin cocoons, some were taken out from the roll of paper and the excrements left in it were collected for analysis. The cocoons thus gathered were cut, and the pupae were taken out, some of which were dried up and analysed, and the rest were again put into another roll of filter paper to avoid any loss, which might happen when the moths appeared. On their appearing, they were collected and instantly killed by sulphuretted hydrogen gas, ground in a mortar into fine powder.

1. C. VANEY and F. MAIGNON: *Compt. rend.*, 140, 1192-95.

2. E. ARDERHALDEN and WOLFGANG WEICHARDT: *Zeitsche. f. physiol. Chemie* 1909, 59 174.

The larval and pupal skins cast off on metamorphosing were collected and analyzed.

### B. Analytical part.

#### I. GENERAL ANALYSIS.

##### (1) Total nitrogen.

The total nitrogen of silkworms, pupae, moths, skins and excrements were determined with the following results:—

GRAMS IN 100 INDIVIDUALS.

	The results of the analysis conducted in 1909. (Koishimaru.)	The results of the analysis conducted in 1910. (not the same sample, but the variety is the same.)
The mature silkworms .. .. .	4.79	4.76
Pupae .. .. .	1.76	1.78
Moths .. .. .	1.39	1.36
Cocoons .. .. .	2.96	3.03
Larval skins cast away on pupating .. ..	0.07	0.19
Pupal skins cast on moths appearing .. ..	0.14	0.11
Urine of moths .. .. .	0.26	0.48
Excrements of mature silkworms until becoming pupae .. .. .	—	0.26

From the results of the above experiment we may conclude that the silkworm never lost its nitrogen in gaseous form while metamorphosing, as Dr. O. KELLNER and other authorities had confirmed; because the sum of the total nitrogen in the pupae, the cocoons, and the larval skins cast on pupating, or the sum of the total nitrogen contained in the moths, the cocoons, the pupal skins and the urine of moths is nearly equal to the total nitrogen in the mature silkworms; and the silkworms which belong to the same variety, also have nearly the same quantity of nitrogen.

##### (2) Albuminoid nitrogen.

To ensure obtaining results as exactly as possible, the fat contained in the sample was at first removed and then it was analyzed by Stutzer's method with the following results:—



	Grams in 100 individuals.	Percentage in dry matter.
Silkworms .. .. .	3.66	8.64
Pupae .. .. .	1.21	6.03
Moths .. .. .	0.996	7.68

The albuminoid nitrogen was greatly reduced while metamorphosing and the consumption must have been in great part due to the production of the cocoons.

(3) Nitrogen in phosphotungstic precipitate and its filtrate.

The filtrate of the copper hydrate precipitate was made to contain sulphuric acid as much as five per cent, and then phosphotungstic acid was added to precipitate basic nitrogen. The precipitate thus formed, was filtered after 24 hours standing and its nitrogen was determined by KJELDAHL'S method. The filtrate was evaporated to a small volume, decomposed by conc.  $H_2SO_4$  and the nitrogen was also determined by Kjeldahl's method, with the following results:—

	Nitrogen in the phosphotungstic ppt.		Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic ppt.	
	Grams in 100 individuals.	Percents in dry matter	Grams in 100 individuals.	Percents in dry matter.
Silkworms .. .. .	0.47	1.11	0.64	1.49
Pupae .. .. .	0.17	0.85	0.38	1.89
Moths .. .. .	0.13	0.96	0.24	1.84

(4) Nitrogen soluble in water.

4 grams of the sample, the fat of which had been removed, were warmed with 100<sup>cc</sup> of water, filtered, well washed with water and filled up to 200<sup>cc</sup>, 50<sup>cc</sup> of which were taken and the total nitrogen was determined with the following results:—

	Grams in 100 individuals.	Percent in dry matter.
Silkworms .. .. .	1.32	3.12
Pupae .. .. .	0.55	2.74
Moths .. .. .	0.40	3.11

(5) Carbohydrate.

The sample was mixed with hydrochloric acid, which was prepared by diluting *HCl* (Sp. gr=1.125) so as to contain 20<sup>cc</sup> of it in 200<sup>cc</sup> of water, and boiled for two hours under a reverted cooler; then phosphotungstic acid was gradually added to remove organic bases which would otherwise prevent the obtaining of a red precipitate of cuprous oxide when FEHLING'S solution was added. The precipitate was removed after standing for 24 hours, and the filtrate was nearly neutralized with caustic soda. Then the carbohydrate was determined by the ordinary gravimetric method with the following results.

	Grams in 100 individuals.	Percent in dry matter.
Silkworms .. .. .	2.11	4.98
Pupae .. .. .	0.88	4.37
Moths .. .. .	0.74	5.71

(6) Ether-extract (Fat).

Fat was determined by Soxhlet's method with the following results:—

	Grams in 100 individuals.	Percent in dry matter.
Silkworms .. .. .	7.11	16.78
Pupae .. .. .	8.72	43.45
Moths .. .. .	3.14	24.21
Cocoons .. .. .	0.07	0.42
Excrements .. .. .	0.08	2.36

From the above results, we can say, the silkworm accumulated fat on changing into the pupa, and the quantity reached its maximum when changed into the pupa, but afterwards it was suddenly reduced to a small quantity, as E. CONOREUR confirmed.

## II. SPECIAL ANALYSIS.

The sample was mixed with three times of conc. hydrochloric acid, boiled for 12 hours under a reverted cooler, then filtered from insoluble parts and diluted to 200<sup>cc</sup>. The filtrate was analysed with the following results:—



The following figures are given in grams for 100 individuals.

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Insoluble part .. .. .	2.39	1.07	0.80	0.08
Soluble part .. .. .	39.97	18.99	12.17	16.22
Total nitrogen .. .. .	4.82	1.37	1.34	2.89
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. ..	1.03*	0.33*	0.33*	0.18*
Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. .. .	3.41	0.89	0.83	2.60
Ammonia nitrogen .. .. .	0.38	0.15	0.17	0.11

\* Ammonia-nitrogen is excluded.

In 100 parts of dry matter :—

	Silkworm.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Insoluble part .. .. .	5.94	5.33	6.17	0.50
Soluble part .. .. .	94.06	94.67	93.83	99.50
Total nitrogen .. .. .	11.38	6.83	10.33	17.73
Nitrogen in the phosphotungstic ppt. .. .	2.43	1.64	2.54	1.10
Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic ppt. .. .	8.05	4.43	6.39	15.95
Ammonia nitrogen .. .. .	0.897	0.75	1.31	0.80

The above shows, when the silkworm changed into the pupa the greater part of its nitrogen was transformed into the cocoon, and the nitrogen thus transformed existed chiefly in the form of monoamino acids. The fact is clearly seen below :—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Total nitrogen .. .. .	100.00	100.00	100.00	100.00
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. (Diamino-nitrogen) .. .	21.37	24.09	24.62	6.23
Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. (Monoamino-nitrogen) ..	70.54	64.96	61.94	89.97
Ammonia nitrogen .. .. .	7.88	10.95	13.71	3.81

The pupa and moth were nearly the same in their constitution, but the content of the amino acids in the latter was reduced, and that of ammonia was, on the contrary, increased. The fact is thought to be that the protein of the silkworm was first split into amino acids, which were then used up to maintain the energy of the cells as carbohydrate or fat does, and as the pupa was not supplied with nitrogen, its content had to be reduced. The amino acid nitrogen not used up for growth being split off from its combination in the form of ammonia, its content in the moth was to be increased.

### C. Summary of the Results.

#### 1. General analysis.

The following figures count as grams for 100 individuals.

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.	Larval skins cast on pupation.	Pupal skins cast on moths appearing.	Excrements of silkworms.	Juice of excrements of silkworms.	Urine of Moths.
Fresh weight .. .. .	237.50	102.50	53.14	—	—	—	—	—	—
Air dry weight .. .. .	46.43	22.56	13.77	18.47	0.76	1.03	4.31	—	—
Dry matter .. .. .	42.36	20.07	12.97	16.30	0.63	0.72	3.39	—	—
Water .. .. .	195.14	82.43	40.17	2.17	0.13	0.32	0.92	—	—
Ash .. .. .	2.44	0.92	0.63	—	—	—	0.87	—	—
Fat .. .. .	7.11	8.72	3.14	0.07	—	—	0.08	—	—
Carbohydrate .. .. .	2.11	0.88	0.74	—	—	—	—	—	—
Total nitrogen .. .. .	4.76	1.78	1.36	3.03	0.19	0.11	0.26	0.17	0.49
Water-soluble nitrogen .. .. .	1.32	0.55	0.40	—	—	—	—	—	—
Albuminoid nitrogen .. .. .	3.66	1.21	0.996	—	—	—	—	—	—
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. .. .	0.47	0.17	0.13	—	—	—	—	—	—
Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. ..	0.63	0.38	0.24	—	—	—	—	—	—



In 100 parts of dry matter :—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Ash .. .. .	5.76	4.09	4.86	—
Fat .. .. .	16.78	43.45	24.21	0.42
Carbohydrate .. .. .	4.98	4.37	5.71	—
Total nitrogen .. .. .	11.23	8.87	10.49	18.58
Water-soluble nitrogen .. .. .	3.12	2.74	3.11	—
Albuminoid nitrogen .. .. .	8.64	6.03	7.68	—
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. . . . .	1.11	0.85	0.96	—
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic acid ppt. . . . .	1.19	1.89	1.84	—

In 100 parts of Nitrogen :—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.
Total nitrogen .. .. .	100.00	100.00	100.00
Albuminoid nitrogen .. .. .	76.19	67.99	73.12
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. . . . .	9.87	9.58	9.15
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic acid ppt. . . . .	13.24	21.38	17.55

## 2. Hydrolyzed part.

Grams for 100 individuals .—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Insoluble part .. .. .	2.34	1.07	0.80	0.80
Soluble part .. .. .	39.97	18.99	12.17	16.22
Total nitrogen .. .. .	4.82	1.37	1.34	2.89
Nitrogen in the phosphotungstic ppt. . . . .	1.03	0.33	0.33	0.18
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic ppt. . . . .	3.41	0.89	0.83	2.60
Ammonia Nitrogen .. .. .	0.38	0.15	0.17	0.11

In 100 parts of dry matter :—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Insoluble part .. .. .	5.64	5.33	6.17	0.50
Soluble part .. .. .	94.36	94.67	93.83	99.50
Total nitrogen .. .. .	11.38	6.83	10.33	17.73
Nitrogen in the phosphotungstic ppt. . . . .	2.43	1.64	2.54	1.10
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic ppt. . . . .	8.05	4.43	6.39	15.95
Ammonia Nitrogen .. .. .	0.90	0.75	1.31	0.80

In 100 parts of nitrogen :—

	Silkworms.	Pupae.	Moths.	Cocoons.
Total nitrogen .. .. .	100.00	100.00	100.00	100.00
Nitrogen in the phosphotungstic ppt. . . . .	21.37	24.09	24.62	6.23
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic ppt. . . . .	70.54	64.96	61.94	89.97
Ammonia nitrogen .. .. .	7.88	10.95	13.71	3.81

## D. Investigation on proteolytic Enzyme in the Silkworm.

Concerning the enzymes existing in the silkworm, several have been reported, and we have also written about the occurrence of some desamidizing enzyme<sup>1</sup> in the mature silkworm, pupa and moth. As shown in the foregoing experiments, the silkworm undergoes a great change in its constitution while metamorphosing, and these changes were supposed to be due to the action of some powerful proteolytic enzymes which existed in its body. To confirm this, the following experiments have been carried out.

(1) The autolysis of the silkworm.<sup>2</sup>

Thirty ripe silkworms (*a*), weighing 56.18, when living and 12.55, in the dry state, were all crushed in a mortar, dried up and then analyzed. This

1). T. TAKENOCHI and R. INOUE in The Journal of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University, 1909, Vol. I, No. 1, 15.  
2). The experiment was conducted in 1909.



served as control. Other thirty mature silkworms (*b*) were also well ground in a mortar, boiled for about one hour with some water and kept at room temperature for 12 days in an ERLÉNMEYER'S flask with a cotton stopper, and with enough toluole as an antiseptic. Occasionally stirred. Then the toluole was separated by decantation and the residue was gradually dried up. After complete desiccation at 105° C, the mass was pulverized and analyzed. The third thirty silkworms (*c*) were treated just as (*b*) but without boiling. After 12 days standing, dried up at 105° C, and analyzed.

The results of the analysis were as follows:—

	Control ( <i>a</i> )		Boiled ( <i>b</i> )		Unboiled ( <i>c</i> )	
	Grams for 100 silkworms	Percentage.	Grams for 100 silkworms	Percentage.	Grams for 100 silkworms	Percentage.
Total weight .. .. .	187.26	100.00	197.7	100.00	195.101	100.00
Dry matter.. .. .	41.836	22.34	37.61	19.02	39.161	20.07
Water .. .. .	145.424	77.66	160.09	80.98	155.94	79.93

  

	Grams for 100 silkworms	In 100 parts of dry matter.	Grams for 100 silkworms	In 100 parts of dry matter.	Grams for 100 silkworms	In 100 parts of dry matter.
	Total nitrogen .. .. .	4.78	11.42	4.81	12.99	4.72
Albuminoid nitrogen .. .. .	4.22	10.08	4.14	11.37	4.29	11.57
N in the phosphotungstic acid ppt. .. .	0.27	0.64	0.29	0.81	0.15	0.39
N in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. .. .	0.29	0.69	0.35	0.81	0.25	0.63
Ammonia nitrogen .. .. .	0	0	0	0	0.05	0.12
Chitin nitrogen.. .. .	0.67	1.69	0.78	2.08	0.64	1.63

In 100 parts of nitrogen.

	Control ( <i>a</i> )	Boiled ( <i>b</i> )	Unboiled ( <i>c</i> )
Total Nitrogen .. .. .	100.00	100.00	100.00
Albuminoid nitrogen .. .. .	87.68	86.62	90.55
N in the phosphotungstic acid ppt. .. .	5.63	6.13	3.22
N in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. .. .	6.09	7.86	5.26
Ammonia nitrogen .. .. .	0	0	1.02
Chitin nitrogen.. .. .	13.94	16.24	13.52

(2) The autolysis of the pupa.<sup>1</sup>

Each thirty pupae, (*a*),<sup>2</sup> (*b*) and (*c*), were respectively treated just as in the foregoing case, but after one month's standing they were analyzed with the following results:—

	Control ( <i>a</i> )		Boiled ( <i>b</i> )		Unboiled ( <i>c</i> )	
	Grams of 100 pupae.	Percentage.	Grams of 100 pupae.	Percentage.	Grams of 100 pupae.	Percentage.
Total weight .. .. .	102.50	100.00	101.00	100.00	101.42	100.00
Dry matter.. .. .	20.07	19.58	18.21	18.03	16.37	16.14
Water .. .. .	82.43	80.42	82.79	81.97	85.05	83.86

  

	Grams of 100 pupae.	In 100 parts of dry matter.	Grams of 100 pupae.	In 100 parts of dry matter.	Grams of 100 pupae.	In 100 parts of dry matter.
	Total nitrogen .. .. .	1.78	8.87	1.77	9.74	1.64
Albuminoid nitrogen .. .. .	1.21	6.03	1.25	6.87	1.25	7.61
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. .. .	0.17	0.85	0.10	0.55	0.07	0.44
Nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic acid ppt. .. .	0.38	1.89	0.42	2.31	0.32	1.95

1. The experiment was conducted in 1910.

2. The results of the general analysis of the pupae on page 8 must be referred to here, because the sample was the same



In 100 parts of nitrogen :—

	Control (a)	Boiled (b)	Unboiled (c)
Total nitrogen . . . . .	100.00	100.00	100.00
Albuminoid nitrogen . . . . .	67.94	76.21	76.22
Nitrogen in the phosphotungstic acid ppt. . .	9.55	5.65	4.27
Nitrogen in the filtrate of the phospho- tungstic acid ppt. . . . .	21.35	24.18	19.51

On account of the sample being scanty ammonia and chitin nitrogen was not determined in the latter case.

In the above two cases nitrogen in the phosphotungstic precipitate and that in its filtrate in the unboiled parts were much reduced in quantity, and especially in the former case ammonia was produced. The fact shows that the protein in the unboiled silkworm and pupa was gradually split off into amino acids which were transformed into ammonia, and the action may be attributed to the presence of some proteolytic enzyme, but concerning the enzyme further observations are necessary.

### E. Conclusions.

1. The chemical composition of the silkworm is greatly changed in producing the cocoon, while the difference between the pupa and moth is not so striking.
2. The silkworm never loses its nitrogen in gaseous form while metamorphosing.
3. Fat is accumulated when the silkworm pupates, but during the pupal and moth stage, the greater part of it is consumed.
4. The nitrogen in the filtrate of the phosphotungstic acid precipitate is more in quantity in every stage of the metamorphosis than the nitrogen in its precipitate, especially nitrogen in the cocoon consists chiefly of the former.
5. In the pupal and moth stage, the waste of body protein is repaired

with amino acids, and a part of the latter is further transformed into ammonia.

6. Splitting of the protein in the silkworm is caused by the action of some proteolytic enzyme.

In conclusion I heartily thank Mr. C. TSUJI, the expert of the Tokyo Sericultural Institute, for kindly giving me abundant quantities of silkworms reared by himself.



## On the Preparation of Natto.

BY

**S. Muramatsu.**

---

There are several kinds of *natto* prepared in Japan, but here I mean common *natto*, which is a kind of vegetable cheese made by fermenting boiled soya beans wrapped in rice straw and set in a warm cellar for one or two days. Thus the product becomes white and mucilaceous by the development of bacteria. *Natto* is consumed as a by-food after having been mixed with table salt and several stimulants, of which amongst others powdered mustard is preferred. It is chiefly consumed in Tokyo and the north-east districts of Japan, and for the production of it Aizu is the noted place. It is consumed in Tokyo in the summer time, but in the north-east districts during the winter time, as these are rather poor in vegetables at that season.

There exist several studies on *natto* so far, as to its constituents and the micro-organisms growing on it, but no exact investigation is known about its preparation. So, its manufacturers suffer under many difficulties in preparing *natto* of good quality; for this reason, I was induced to make a study of the method of preparing it and on several other points. Besides, I think it is very useful to prepare *natto* of good quality and increase its consumption by the people, as it is a very good and economical food stuff, being cheap and containing much protein; especially in our country, where rice is the principal food.

### I. Soya Beans.

Soya beans are the principal raw material of *natto*. There are numerous varieties of soya beans cultivated in Japan, which, for instance, we can distinguish by their colour as yellowish white, green, black, spotted, etc. I



prepared *natto* with these different kinds and could not find a more suitable kind than the small yellowish white bean.

The beans which serve for the preparation of *natto* are first sorted, and all that are broken or imperfectly developed are picked out; besides, it is better to sift them through sieves with proper meshes to separate too small or too large ones. They are then washed and allowed to steep in clean water for several hours, after that they are boiled in a large iron kettle with sufficient water for *ca.* 5 hours. Thus the beans become moderately soft and their colour darker.

Their constitution was as follows :

In 100 pts. air-dry beans :—

Moisture	7.14
Dry matter	92.86

In 100 pts. dry matter :—

Crude protein	50,156
Crude fat	22,453
Crude fibre	6,420
N-free extract	11,871
{ Soluble in water	4,329
	Insoluble in water
Ash	3,600
Total N	8,025
Albuminoid N	7,953
{ Soluble in water	trace.
	Insoluble in water
Non-albuminoid N	0,072

## II. Rice Straw.

Rice straw is used for the wrapper of the boiled soya beans. Fresh straw is preferable to old, as its smell is better than that of the latter. The

straw is cleaned by taking the muddy leaf away from the under part of the stem and then washed with clean water; afterwards, it is well tied at its two ends, leaving several inches apart, and bundled after filling the bag with the beans. As to the reason of using straw for the preparation of *natto*, it was considered that the straw supplies the proper bacteria to the beans; but I do not think this the sole reason, for we can prepare it another way, as, for instance, by setting it in a sterilized Petri-dish or in a basket. When it is made in a basket, which after filling it with beans is put in a warm cellar covered with a straw mat, it is called *basket-natto*. From this and other facts it is reasonable to consider the principal objects of using straw for the preparation of *natto* to be :—

1. The supply of the good aroma of straw to *natto*.
2. To take away ammonia from *natto*.
3. To offer good ventilation of air to the loosely packed beans.

The bacteria which produce *natto* from soya beans are always present on the surface of the beans, and their spores being very hardy against high temperature, they are not easily killed by boiling, as we can see from the following experiment: The grains which were boiled for several hours are taken in sterilized Petri-dishes after each hour and placed in the incubator at 42°C. By this means, I found that the beans which were boiled for 8 hours become *natto* rich in mucilage and with good aroma. The fact that the *basket-natto*, which does not come in touch with straw, does not sell as well as common *natto*, tells us that its quality is inferior to the latter. The main reason is that its flavour is not so good as that of common *natto*, for, when we prepare it in the straw bundle its flavour is always superior to made in a Petri-dish, as it contains an aroma somewhat like that of straw. So, I think that the straw which is used as a bag for the beans gives its good aroma to *natto*.

When the bacteria grow on the beans they produce so much ammonia that we can perceive it by its peculiar smell. As the straw absorbs ammonia, the smell of it is more feeble when we use straw bundle than in the case of a glass dish. We can understand this fact when we see that the straw which has been used as a bag always contains much more ammonia than fresh material, and *natto* made in the dish is richer in it than that from the bundle.



	Amount of Ammonia.
In the fresh straw	0,035%
In the straw used as wrapper	0,065 „
In <i>natto</i> made in a glass dish	0,235 „
In <i>natto</i> made in straw bundle	0,188 „

For these reasons, *natto* prepared in straw bundles must have a better flavour than any other, by taking its flavour from straw and giving off the disagreeable smell of ammonia to straw.

The bacteria producing *natto* want much oxygen for their proper growth, as it is an obligate aerobe. So, when we prepare it by heaping up many bundles, the interior ones become inferior in quality and also, the interior beans of a large bundle become less viscous than the outer parts.

For this reason, it is recommendable to use small bundles for the preparation of superior *natto*.

### III. Cellar.

The cellar for the preparation of *natto* is made with bricks or with wooden piles surrounded with thick layers of straw and the walls plastered with mud; the entrance is furnished with a thick door preventing the air to enter. Along the inside of the wall a long shelf two feet wide is set up at the height of about two feet and one or two large hearths are made on the floor for the purpose of warming the room.

### IV. The Preparation of Natto.

For the preparation of *natto* the soya beans are sorted first and all beans that are broken or imperfectly developed are picked out.

After washing with clean water, they are soaked for several hours and boiled in an iron kettle until they become moderately soft. (ca. 5 hours.) The boiled beans are put into the straw bundle while they are still hot, and the bundles are placed, standing obliquely, on the shelf in the cellar, which is previously warmed by charcoal to about 40°C. The cellar is then shut up carefully, to avoid the circulation of air; thus, the beans become *natto* after one or two days and are ready for consumption.

### V. The Microbes of Natto.

As to the micro-organisms of *natto* several authors have made investigations.

Dr. YABE isolated three species of micrococci which formed yellow, orange, and white colonies respectively, and a bacillus which is not motile, liquefying gelatine and producing a greenish fluorescence. He attributed the production of the characteristic aroma of *natto* to the development of the micrococcus which produces yellow colonies; but no explanation was given about the formation of the viscous substance.

Dr. SAWAMURA isolated various kinds of bacilli and micrococci from *natto* and regarded the following two bacilli as the chief microbes for the production of *natto*.

Bacillus No. 1 is a motile and facultative aerobe. *Natto* produced by this bacillus had a good taste and aroma, but its viscosity was not so great as that produced by the other. The author gave the name of *Bacillus natto* to this bacillus, considering it as the chief microbe in the fermentation.

Bacillus No. 2 is a rarely motile and facultative aerobe. *Natto* produced by this bacillus showed a stronger viscosity but a less nice taste and aroma than that produced by the *B. natto*; he recognised it as a variety of *Bac. mes. vulgatus*. Thus, he concluded that for the formation of good *natto* both bacilli must be present.

Mr. MONZEN isolated several kinds of bacteria, among them one bacillus to which Dr. OMORI gave the name of *Bacillus viscosus natto* and which, he said, is the principal microbe that produces strong viscosity. The two kinds of bacilli which he named *Bacillus odorans natto 1.* and *Bacillus odorans natto 2.* produce good aroma in *natto*; and another one which he named *Pseudomonas odorans natto*, produces also good aroma. The latter three did not produce good *natto*, unless the material is inoculated also with *B. viscosus natto*. Thus the author concluded that there are necessary for the preparation of *natto* at least two kinds of bacteria, one producing the peculiar aroma and the other strong viscosity.

Mr. MUTO isolated several bacteria and concludes that only one bacillus belonging to the *B. subtilis* group is necessary for the production of *natto*.



I investigated also several kinds of *natto*, prepared in Tokyo, Aizu, and Morioka, and found that they all contain the same micro-organisms, amongst which the following three bacilli are the principal ones. Several other bacilli are not suitable for the preparation of *natto*, as they produce bad colour or smell, and make the *natto* unfit for eating.

Two micrococci were found, one of which was analogous to *Mic. flavus*, and the other producing a translucent colony on agar plate-culture: but, both these micrococci having no relation to the preparation of *natto*, I gave up their further investigation.

#### BACILLUS No. 1.

This bacillus develops most energetically at high temperature (40-50° C.) and produces the best quality of *natto*, providing much mucilage and good aroma.

##### Form :

The cells grown in bouillon at 40° C. are 1  $\mu$  thick and 5-8  $\mu$  long.

##### Motility :

It moves energetically, providing long cilia around its body.

##### Spore :

An oval spore is formed principally in one end of the cell, which is 0.8  $\mu$  thick and 1.6  $\mu$  long; the formation of the spore requires 4 hours at 42° C. and germination of it begins equatorial after 2½ hours at the same temperature.

##### Oxygen :

Obligate aroto.

##### Colouring :

It is coloured readily with aniline colours and also after GRAM'S method.

##### Bouillon culture :

Bouillon remains almost clear after its development, and a strongly folded film, coloured slightly grayish brown, is formed after 10 hours at 38° C.

Sugar bouillon becomes slightly turbid changing its reaction to acidic at the beginning, which turns alkaline gradually; gas is not formed.

##### Peptone-water culture :

It produces a grayish white film on its surface and the liquid becomes slightly turbid.

##### Gelatine plate-culture :

Small white colonies are formed which liquefy it quickly.

##### Gelatine stab-culture :

It develops vigorously at the surface and liquefies gelatine in the shape of a funnel; the liquefied part remains transparent and a film is formed.

##### Agar plate-culture :

White and mealy-looking colony, that has a rough wristle at its centre but delicate at its edge, spreading very rapidly at 40° C.

##### Agar slope-culture :

Colony develops along the line and spreads rapidly all over the surface with mealy appearance; the condensed water remains transparent with a film on its surface, but no sediment.

##### Potato culture :

Elevated colony is formed in the beginning, which spreads soon over the whole surface of the medium; the colour of the colony is yellowish brown and it is folded with mealy appearance, the medium becoming brown.

##### Milk culture :

It is coagulated at first and is dissolved again.

##### H<sub>2</sub>S :

Is formed.

##### Indol reaction :

Is not obtained from old bouillon culture.

##### Reducing property :

It reduces methylene blue in bouillon but does not develop in the glucose nitrate medium.

##### Ammonia :

Is formed in the culture of bouillon and soya beans.

##### Enzyme :

Diastase and proteolytic enzyme of tryptic nature are recognised.



## Behaviour to temperature :

It develops very vigorously at  $50^{\circ}C.$ , but not at  $60^{\circ}C.$  It is killed at  $60^{\circ}C.$  after two hours, and after one hour at  $80^{\circ}C.$

The resistance of the spores against heat is very strong, for it takes one hour to kill them in Kocu's steam-steriliser.

## Behaviour to several compounds :

## Table salt :

In bouillon containing 15% *NaCl* it develops slowly, but not in 20% solution.

## Alcohol :

It develops in bouillon containing 4% alcohol, but not in 5% alcohol.

The spore is not killed readily with alcohol, as it is still alive after ten days and more, when put either in 50% or absolute alcohol at  $20^{\circ}C.$

*HCl* :

It develops in bouillon containing 0.025% *HCl*, but not in 0.05%.

The spore which is put in 3% *HCl* is alive after one day, but not after two days. In 4% *HCl* it is alive after one hour, but not after two hours.

## Acetic acid :

It develops in bouillon with same concentration as hydrochloric acid.

The spore is not killed by glacial acetic acid after 10 days and more.

*NaOH* :

It develops in bouillon containing 0.2% *NaOH*, but not in 0.3%.

The spore is killed when it is put in 35% solution after one day.

## Phenol :

It develops in bouillon containing 0.1% phenol, but not in 0.2%.

The spore is not killed after ten days when put in 5% solution.

## Corrosive sublimate :

It develops in bouillon containing 0.0025% *HgCl<sub>2</sub>*, but not in 0.005%.

The spore is killed after 50 minutes when it is put in 0.1% solution, but it was alive after 40 minutes in the same solution.

This bacillus may be the same as those which Dr. SAWAMURA represented as *Bacillus No. 2* and *Bacillus viscosus Omori*, and also that which Mr. Muto

thought was the only bacterium which produces *natto*, though there are several differences in its behaviour investigated by these authors.

## BACILLUS No. 2.

This bacillus develops most energetically at high temperature and produces *natto* of the best quality, forming much mucilage and a rather higher aroma than *Bacillus No. 1*.

## Form :

The cells grown in bouillon at  $40^{\circ}C.$  are  $0.8-1\mu$  thick and  $4-10\mu$  long.

## Motility :

It moves vigorously providing long cilia around its body.

## Spore :

An oval spore is formed in one end of the cell, and it is  $0.8\mu$  thick and  $2\mu$  long.

The spore wants 4 hours at  $42^{\circ}C.$  for its formation and it germinates equatorial after  $2\frac{1}{2}$  hours at the same temperature.

## Oxygen :

Obligate aërobe.

## Colouring :

The cell is coloured easily by aniline colouring matters and also after GRAM'S method.

## Bouillon culture :

Bouillon remains almost clear after its development, and a strongly folded film of slightly grayish brown is formed after twelve hours at  $38^{\circ}C.$

Sugar bouillon becomes slightly turbid, changing acidic at the beginning, which turns alkaline gradually; gas is not formed.

## Peptone-water culture :

It produces a grayish white film on its surface and the liquid becomes slightly turbid.

## Gelatine plate-culture :

Small white colonies are formed which liquefy it quickly.



## Gelatine stab-culture :

It develops quickly on the surface and liquefies gelatine in the shape of a funnel; the liquefied part remains transparent and a film is formed.

## Agar plate-culture :

There is formed a white and mealy-looking colony with rough wristle at its centre but delicate at its edge, spreads very quickly at 40°C.

## Agar streak-culture :

Colony develops along the line and spreads rapidly all over the surface with mealy appearance.

The condensed water remains transparent with a folded film on its surface but no sediment.

## Potato culture :

Elevated colony is formed in the beginning, which soon spreads over the whole surface of the medium; the colony is folded and has brownish yellow colour and mealy appearance; the medium becomes brownish gray.

## Milk culture :

It is coagulated at the beginning and is dissolved again.

 $H_2S$  :

Is not formed.

## Indol reaction :

Is not obtained from old bouillon culture.

## Reducing property :

It reduces methylene blue in bouillon and produces ammonia by reduction of nitric acid in the glucose nitrate medium.

## Ammonia :

It is formed in the culture of bouillon and soya beans.

## Enzyme :

Diatase and proteolytic enzyme of tryptic nature are recognised.

Concerning the behaviour against heat and several compounds as formerly mentioned, there is not much difference with *Bacillus No. 1*.

This bacillus may be the same as that which Dr. SAWAMURA named *Bacillus natto*, though there are several differences in its behaviour. As this bacillus does not produce any mucilage at low temperature (say 35°C) he

thought it, perhaps, to be one which produces aroma peculiar to *natto*; but, as I mentioned already, this bacillus produces much mucilage at higher temperature and makes good *natto* with high aroma.

## BACILLUS No. 3.

This bacillus develops most energetically at 40°C, and when it is developed on boiled soya beans at this temperature, it produces good *natto* with strong viscosity and good aroma; but its mucilage is somewhat less than *Bacillus No. 1* and *Bacillus No. 2*.

## Form :

The cells grown in bouillon at 40°C, are 1.2  $\mu$  thick and 6-10  $\mu$  thick

## Motility :

It moves providing long cilia around its body.

## Spore :

An oval spore is formed in one end of the cell, which is 1  $\mu$  thick and 1.5  $\mu$  long.

The spore is formed after 4 hours at 42°C, and germinates equatorial after 2½ hours at the same temperature.

## Oxygen :

Obligate aërobe.

## Colouring :

It is coloured readily with aniline colours and also after GRAM'S method.

## Bouillon culture :

Bouillon becomes slightly turbid, a brittle film of slightly grayish brown colour is formed after ten hours at 38°C, and produces a small amount of sediment. The film is broken easily by shaking and sinks to the bottom.

Sugar bouillon changes to slightly acidic at the beginning and turns slightly alkaline afterwards.

## Peptone-water culture :

It becomes slightly turbid and forms a yellowish white film on its surface. Gas is not formed.



## Gelatine plate-culture :

Small white colonies are formed which liquefy it quickly.

## Gelatine stab culture :

It develops on the surface at the beginning and liquefies gelatine in the shape of a funnel, afterwards thoroughly.

## Agar plate-culture :

White colony with rough wristle at its centre but delicate at its edge, spreads very rapidly at 40°C.

## Agar slope-culture :

The colony develops along the line and spreads rapidly in the shape of a feather; the condensed water is transparent with a film on its surface, but no sediment.

## Potato culture :

A yellowish gray colony is formed, somewhat elevated in the beginning; it spreads soon over the whole surface of the medium. The colony has strong viscosity and it is folded shallower than *Bacillus No. 1* and *Bacillus No. 2*, the medium becoming gray.

## Milk culture :

It is coagulated and dissolved again.

 $H_2S$  :

Is produced.

## Indol reaction :

Is not obtained from old bouillon culture.

## Reducing property :

It reduces methylene blue in bouillon, and ammonia is formed by the reduction of nitric acid in the glucose nitrate medium.

## Ammonia :

Is formed in the culture of bouillon and soya beans.

## Enzyme :

Diastase and proteolytic enzyme of tryptic nature are recognised.

The behaviour to heat and several compounds is almost the same as with *Bacillus No. 1*, although there are some differences.

This may be the same bacillus as *Bacillus grossus*, but as there is no detailed description of it, I cannot make a precise comparison.

## VI. The Application of cultured Bacteria for the Preparation of Natto.

As mentioned already, when we prepare *natto* in a glass dish at ca. 38°C. inoculated with *Bacillus No. 1* it has some viscosity, while others have not, but the aroma was inferior to that made in straw bundles, for it does not touch with straw. At 45°C. all bacilli produce *natto* of fine quality, providing strong viscosity and good aroma; the aroma produced by *Bacillus No. 1* was the best, while *Bacillus No. 2* produces a rather strong smell of ammonia, and that of *Bacillus No. 3* was the worst. Moreover, I prepared *natto* according to the common way differing only on the point of inoculating these bacilli separately and also mixing them with one another. The result was that *natto* which was produced by the inoculation of *Bacillus No. 1* was the best, as it has much mucilage and fine aroma, while *Bacillus No. 2* produced an inferior and *Bacillus No. 3* the worst quality. *Natto* produced by the inoculation of mixed bacilli was not so good as that produced by each bacillus; so, there is no necessity that two or more bacilli be present for the formation of good *natto*. By the inoculation of cultured bacteria we can entirely avoid failures and can prepare good *natto* by selecting the bacteria. Otherwise, it is sufficient to put it in the cellar for only one day, after which the *natto* will be ready for consumption. I recommend, therefore, the use of the pure culture of proper bacteria in the following way:

The bacteria developed on the slope culture medium of agar are mixed with juice produced by the boiling of beans. This is poured over the surface of boiled beans while they are still in the kettle, the further processes being the same as usual. There is no necessity of mixing several bacilli.

## VII. Natto as a By-food.

As *natto* is prepared from soya beans which are rich in protein and carbohydrates, it contains yet much protein and carbohydrates; the nutritive value of it is greater than that of boiled soya beans, for it is rich in soluble matters produced by the micro-organisms.



The composition of *natto* differs exceedingly with age, but its mean composition is as follows: (Compare with the composition of boiled soya beans.)

In 100 pts. of fresh *natto*:

Moisture	53,480
Dry matter	46,520

In 100 pts. of dry matter:

Crude protein	46,088
Crude fat	20,216
Crude fibre	6,140
N-free extract	3,348
{ Soluble in water	2,495
{ Insoluble in water	0,853
Ash	5,010
Total N	7,374
Albuminoid N	5,458
{ Soluble in water	1,141
{ Insoluble in water	4,317
Non-albuminoid N	1,916

The micro-organisms which grow on the soya beans secrete trypsin and diastase; so, when we take it together with several foods rich in protein or starch, they may be digested more rapidly than when they are taken alone.

I express many thanks to Dr. SATO, Director of our College<sup>1</sup>, who helped me in determining the quality of *natto* that I prepared, and also to Mr. N. NETTA and Mr. Y. TANAKA, who assisted me in these investigations.

1. College of Agriculture and Dendrology, Morioka.

昭和十一年十一月二十四日發行

東京帝國大學



The composition of *soyabé* differs exceedingly with age, but its mean composition is as follows: (Compare with the composition of toiled soya beans.)

In 100 pts. of fresh *soyabé*:

Moisture	53.480
Dry matter	46.520

In 100 pts. of dry matter:

Crude protein	46.088
Crude fat	20.216
Crude fibre	6.140
N free extract	3.348

+ Soluble in water	2.495
+ Insoluble in water	0.853

Ash	5.010
Total N	7.374
Albuminoid N	5.458

+ Soluble in water	4.141
+ Insoluble in water	4.315

Non-albuminoid N	1.916
------------------	-------

Experiments were made which show on the one hand, a marked trypsin and diastase action when we take it together with several foods rich in protein or starch. They are further broken more rapidly than when they are taken alone.

I express my thanks to Dr. S. S. Hunter of our college who helped me in carrying out the practical work that I prepared, and also to Mr. N. N. and Dr. A. T. who assisted me in these investigations.

Received at the University of Tokyo

Vol. V. No. 1, PUBLISHED OCTOBER 24th, 1912.

Price in Tokyo . . . . Yen 0.45

THIS JOURNAL IS ON SALE AT

**Z. P. Maruya & Co., L'td.**

Tori Sanchoe, Nihonbashi, Tokyo.

**Geiser & Gilbert**

Kaji-cho 23, Tokyo; Main Street 77, Yokohama.

Josephinenstr. 6. Leipzig.—R., Germany.

大正元年十月二十一日印刷  
大正元年十月二十四日發行

編纂兼發行者 東京帝國大學

印刷者 島連太郎

印刷所 三秀舍

賣捌所 丸善株式會社書店

同 東京市神田區美土代町二丁目一番地  
東京市日本橋區通三丁目十四番地  
橫濱市本町七十七番地  
ガイセル、ギルバルト書店



特 279

175

NOTICE.

---

VOL. I.

- No. 1, published June 6th, 1909.
- No. 2, published June 29th, 1909.
- No. 3, published March 28th, 1911.
- No. 4, in press.

VOL. II.

- No. 1—7 (complete).

VOL. III.

- No. 1, published August 30th, 1910.
- No. 2, published September 20th, 1912.
- No. 3, under preparation.

VOL. IV.

- No. 1, published December 26th, 1911.
- No. 2, published June 25th, 1912.
- No. 3, published June 29th, 1912.
- No. 4, under preparation.

VOL. V.

- No. 1, published October 24th, 1912.
  - No. 2, in press.
- 

終