



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ueber die chemische Beschaffenheit der Eischale von Pollachius brandti
Author(s)	MIYAKE, K. ; TADOKORO, T.
Citation	The journal of the College of Agriculture, Tohoku Imperial University, Sapporo, Japan, 4(6), 269-277
Issue Date	1911-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12506
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(6)_p269-277.pdf



Ueber die chemische Beschaffenheit der Eischale von *Pollachius brandti*.

Von

K. Miyake und T. Tadokoro.

Ueber die chemische Beschaffenheit der Eischalen sind schon eine Reihe von Untersuchungen vorhanden. So berichten Velson¹⁾ und Tichomiroff²⁾ von den Wirbellosen, dass die Eischale von *Bombyx mori* aus einem Keratinstoff besteht; Krukenberg³⁾ untersuchte die Eikapseln einiger mariner Schnecken (*Murex trunculus*, *Buccinum undatum*, *Purpura lapillus*) und stellte durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure, Alkohol, Aether, Pepsin, Tripsin, starker Natronlauge und Wasser ein Albuminoid dar, welches in kalter konzentrierter Mineralsäure nicht, in konzentrierter Kalilauge nur schwer löslich war, und hat gefunden, dass beim Erhitzen mit Wasser auf 170° unter Druck, sich albumoseartige Produkte bilden. Bei den Wirbeltieren sind bedeutend mehr Untersuchungen gemacht worden als bei den Wirbellosen. O. Hammersten und V. Lindwell⁴⁾ stellten fest, dass die Eischalenhaut der Hühner aus einem typischen Keratin besteht, desgleichen W. Krukenberg⁵⁾ von den Eiern von *Scyllium stellare*. Auch bei

-
- 1) Bolletino mensile die Bachicoltura, No. 9, 1884. (Aus Neumeister: Physiologische Chemie, 2. Aufl. 1897.)
 - 2) Hoppe-Seylers Zs. physiol. Chem., Strassburg, 9 (1885), p. 518-.
 - 3) Ber. D. chem. Ges., Berlin, 18 (1885), p. 985-.
 - 4) Jahresber. f. Tierchem., 11 (1881), p. 38-.
 - 5) Vergleich. physiol. Studien, 2. Abt, 1 (1882), p. 66-.

anderen Selachiern sind die Eischalen keratinöser Natur, so bei *Raja quadrimaculata*¹⁾, bei *Miliobatis aquila*²⁾ und bei *Pritis melonostoms*³⁾. Dasselbe ist nach R. Neumeister³⁾ der Fall bei *Calotis jubatus*, *Ptychozoon boncoloccephalus*, sowie bei *Crocodylus biprocatus*. Dagegen weicht nach R. Neumeister⁴⁾ die Eischale eines Kloakentieres, nämlich der *Echidna aculeata*, in ihrem Verhalten insofern von den echten Keratinen ab, als sie vom Magensaft verdaut wird. Auch Krukenberg⁵⁾ fand die Eischalen von *Tropidonatus natrix* und *Musterus laeoes* in kalter Natronlauge unlöslich, dagegen verdauulich durch Pepsin und Tripsin. Deutliche Altersunterschiede haben sich bei der Untersuchung der Eihüllen von *Coluber natrix* geltend gemacht. Hilger⁶⁾ fand dieselben in kalten, konzentrierten Kalilaugen, ebenso in Säuren unlöslich und ausserdem schwefelfrei. Er fand, dass die Zusammensetzung der Substanz echtes Elastin ist. Vor kurzem untersuchten auch Pregel⁷⁾ und Buchtala⁸⁾ die Beschaffenheit, sowie die Hydrolysenprodukte der Eihäute der Selachier und fanden, dass sie gleich dem Keratin aus schwefelarmem Albuminoid bestehen und bei der Hydrolyse merkwürdig hohen Tyrosingehalt aufweisen. Dagegen ergaben die Untersuchungen von Abderhalden und Straus,⁹⁾ dass bei einer Totalhydrolyse der Eihülle von *Testudo giraecca* das Tyrosin fehlt.

Wie schon oben erwähnt wurde, wechselt die Beschaffenheit der Eischale bei den verschiedenen Spezies der Tiere. Doch besteht die Schalenhaut meistens aus Keratin oder schwefelarmem Albuminoid. Einige Eihäute nähern sich in ihren Eigenschaften dem Elastin.

In folgendem veröffentlichen wir die Untersuchungsergebnisse über die Beschaffenheit und die Abbauprodukte der Eischale von *Pollachius brandii*

-
- 1) L. Schenk: -Sitzungsber. d. Wiesner Akad., 681 (1874), p. 363-.
 - 2) W. Krukenberg: -Vergleich. d. Physiol. Studien. 2. Abt., 1 (1882), p. 62-.
 - 3) R. Neumeister: -Jahrbuch. d. Physiol. Chem., Jena, 1897, p. 530-.
 - 4) „ Zs. f. Biol. N. F. 8 (1899), p. 57 u. 13 (1895), p. 413-.
 - 5) Vergleich Physiol. Chem. Studien. 2. Abt., 1 (1882), p. 91-.
 - 6) Ber. D. chem. Ges., Berlin, 6 (1873), p. 165-.
 - 7) Hoppe-Seylers Zs. physiol. Chem., Strassburg, 56 (1908), p. 1-.
 - 8) *ibid.*, 56 (1908), p. 11-.
 - 9) *ibid.*, 48 (1906), p. 525-.

Hilgd., welcher in Japan als Nahrungsmittel viel benützt wird. Wir sind zum Schluss gekommen, dass die Substanz der angegebenen Eischale aus einem schwefelarmen keratinartigen Stoffe besteht, und dass der Gehalt an Monoaminosäuren im Abbauprodukte sehr bedeutend ist.

Vorbereitung des Materials und dessen Bestandteile.

Um die Schalen für die Analyse zu bekommen, wurden die Eier zuerst vom Eiersack genommen, dann in Wasser gewaschen, hierauf von dem anhaftenden Schleim mechanisch gereinigt. Dann wurden die Eier in einem Mörser zerrieben und der Inhalt unter den offenen Wasserhahn gebracht, um die Schalen von den flüssigen Bestandteilen zu trennen. Die so erhaltenen Eierschalen wurden zum Quellen in einprozentige Salzsäure gelegt und mehrere Tage darin gelassen, hierauf noch einmal von den anhaftenden Verunreinigungen befreit und in Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Millon'sche Reaktion mehr gab. Nachdem die Eihäute an der Luft trocken geworden, erfolgte eine Extraktion mit Alkohol und darauf eine mit Aether. Nach völligem Trocknen an der Luft bis zum konstanten Gewicht hatten diese Eihäute noch einem Wassergehalt von 7.59% und einem Aschengehalt von 0.17%.

Es verloren 0.3510 gr beim Trocknen bei 110° im Vakuum 0.0250 gr H₂O und hinterliessen beim Veraschen 0.0006 gr Asche.

Die bei 110° im Vakuum getrockneten Eihäute gaben bei der Elementalanalyse folgende Werte:

0.1 gr Substanz gab bei der Verbrennung 0.1879 gr CO ₂ , 0.0757 gr H ₂ O.	
	C.51.24%
	H.8.41%
0.2 gr Substanz gab nach Kjeldahl	0.02914 gr N.
	N.14.57%
1.0 gr Substanz gab nach dem Schmelzen mit KNO ₂ und Na ₂ CO ₃	
	0.0487 gr BaSO ₄
	S.0.67%

Zum Vergleiche seien hier auch noch die Analysen von der Schalenhaut des Hühnereies, *Scyllium stellare*, *Scyllium canicula*, *Pristiurus melanostomis*, *Scyllium catulus* und *Coluber natrix* beigegeben.

Schalenhaut	C	H	N	S	O	Autor
des Hühnereies	49.78	6.68	16.43	4.25	22.90	Lindwell ¹⁾
des <i>Scyllium stellare</i>	53.92	7.33	15.08	1.44	22.23	Buchtala ¹⁾
des <i>Scyllium canicula</i>	53.64	6.49	14.23	1.33	22.31	„
des <i>Pristiurus melanostomis</i>	51.45	6.61	14.33	1.52	26.09	„
des <i>Scyllium catulus</i>	51.50	6.51	15.34	0.88	25.77	Krukenberg ²⁾
des <i>Coluber natrix</i>	54.68	7.24	16.37	angeblich S. frei	Hilger ³⁾
des <i>Pollachius brandti</i>	51.24	8.41	14.57	0.67	25.11	Miyake Tadokoro

Die obige Tafel zeigt deutlich, dass die Zusammensetzung der Hautsubstanz der Eier von *Pollachius brandti* und der Selachiereier ungefähr gleich ist, speziell der Eier von *Scyllium catulus*.

Löslichkeitsverhältnisse und allgemeine

Eiweisskörperreaktionen.

Die Substanz der Eihäute von *Pollachius brandti* ist in gewöhnlichen Lösungsmitteln, wie Wasser, Alkohol und Aether usw., auch in der Wärme unlöslich. In verdünnten Mineralsäuren lösen sie sich beim Erwärmen. In Pepsinsalzsäure, sowie in alkalischer Pankreatinlösung erleiden die Eihäute keine sichtbare Veränderung. Behandelt man die Eihäute mit Salpetersäure und macht sie dann mit Ammoniak alkalisch, so tritt typische Xanthoproteinreaktion auf. Hingegen nehmen beim Kochen der Eihäute mit konzentrierter Salzsäure weder die Flüssigkeit, noch die Eihäute eine für die Liebermann'sche Reaktion charakteristische Färbung an. Die Millon'sche und die bleischwärende Schwefelreaktion fällt positiv, aber die Molische Reaktion negativ aus. Nach halbstündigem Kochen mit 5% Kalilauge werden die Eihäute zu einer gallertartigen Masse modifiziert. Nach längerer Digestion

1) Buchtala:— l. c.

2) Ber. D. chem. Ges., Berlin, 18 (1885), p. 989—.

3) *ibid.*, 6 (1873), p. 165—.

derselben mit 5% Kalilauge in der Temperatur des Wasserbades, ebenso mit 30% Kalilauge in der Kälte erfolgt vollständige Lösung. Diese Lösung zeigt auch die Biuretreaktion, die Millon'sche-, die Xanthoprotein-, und die bleischwärende Schwefelreaktion.

Aus den obigen Resultaten erfolgt, dass die Substanz der Eihäute von *Pollachius brandti* ein keratinähnlicher Stoff ist, wie die Hautsubstanz der Selachiereier.

Verteilung des Stickstoffes.

Hierbei wurde die Methode von Hausmann¹⁾ unter Berücksichtigung der Erfahrungen Günbels²⁾ angewendet. Es wurden je 4 gr der luftgetrockneten Substanz mit 80 gr konzentrierter Salzsäure am Rückflusskühler sechs Stunden lang gekocht. Nach Entfernung der Salzsäure wurde das Ammoniak durch Magnesiumoxyd in Freiheit gesetzt. a) Der Rückstand wurde in Salzsäure gelöst und in einem Messkolben von 500 ccm Inhalt filtriert. Der auf dem Filter zurückbleibende Niederschlag diente zur Bestimmung des Melaninstickstoffes. b) Von dem mit Wasser auf 500 ccm ergänzten Filtrate dienten zweimal je 25 ccm zur Bestimmung des Stickstoffes der Mono- und Diaminosäuren. c) Zum Zwecke der Bestimmung des Stickstoffes in den getrennten Mono- und Diaminosäuren wurden zweimal je 100 ccm des Filtrats gebraucht. Die Filtrate von den Phosphowolframsäureniederschlägen wurden für die Bestimmung des Stickstoffes in den Monoaminosäuren d), die Niederschläge selbst für die Stickstoffbestimmung in den Diaminosäuren e) verwendet.

Die Resultate waren folgende:

	In der wasserfreien Substanz	Im gesamten Stickstoff
Gesamtgehalt an Stickstoff	14.57 %	100.00 %
Ammoniakstickstoff a)	0.87 %	5.97 %
Melaninstickstoff b)	0.14 %	0.96 %

1) Hoppe-Seyler Zs. physiol. Chem., Strassburg, 27 (1899), p. 95- u. 29 (1900), p. 146-.

2) Hofmeisters Beiträge, 5, p. 297-.

Mono- u. Diaminostickstoff c)	13.56%	93.07%
Monoaminostickstoff d)	11.40%	78.24%
Diaminostickstoff e)	2.16%	14.83%

Zum Vergleiche mit diesen Resultaten seien hier auch noch die Analysen über *Scyllium stellare*, *Pristiurus melanostomis* und *Scyllium canicula* von H. Buchtala (l. c.) beigebracht.

	Ammoniak-N.	Melanin-N.	Monoamino-N.	Diamino-N.
<i>Scyllium stellare</i>	0.7 (5.09)	0.08(0.56)	10.96(79.66)	2.17(15.78)
<i>Pristiurus melanostomis</i>	0.75(5.13)	0.02(0.14)	9.70(66.45)	4.20(28.78)
<i>Scyllium canicula</i>	0.64(4.49)	0.04(0.24)	9.21(64.19)	4.41(30.75)
<i>Pollachius brandti</i>	0.87(5.97)	0.14(0.91)	11.40(78.24)	2.16(14.75)

Die nicht eingeklammerten Zahlen geben die Prozente des Stickstoffs bezogen auf die Substanz, die in Klammern stehenden bedeuten Prozente des Gesamtstickstoffs.

Beim Vergleiche der mitgeteilten Zahlen ergibt sich als hervorstechendste Eigentümlichkeit der Eihäute von *Pollachius brandti* der hohe Gehalt an Monoaminosäurenstickstoff und der niedere Gehalt an Diaminosäurenstickstoff.

Die Abbauprodukte.

(1) Isolierung des Tyrosins, des Leucins und der Glutaminsäure.

25 gr gereinigte Eihäute wurden mit einem Gemisch von 60 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 250 ccm Wasser zuerst so lange auf dem Wasserbade digestiert, bis vollständige Lösung eingetreten war und hierauf 16 Stunden am Rückflusskühler gekocht.

Die mit Wasser verdünnte Lösung wurde mit Calciumcarbonat neutralisiert und von dem entstandenen Calciumsulphatniederschlag abgenutscht. Dieser Niederschlag wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht, bis der letzte Auszug keine Diazoreaktion mehr gab. Das Filtrat und das Waschwasser wurden vereinigt und auf ein kleines Volumen eingeeengt. Aus dieser Lösung schied sich die krystallisierende Masse, welche hauptsächlich aus den Nadelbüschen des Tyrosins und des Leucins besteht, aus. Diese Masse wurde auf einen Filter gestellt und mit Alkohol und Aether gewaschen. Zur Trennung

des Leucins und Tyrosins wurde kochende Essigsäurelösung angewendet.

Beide Gewichte betragen nach dem Trocknen wie folgt:

Tyrosin 0.1315 gr entsprechend 0.53% der trockenen Eihäute.

0.1 gr Tyrosin gab 0.2171 gr CO_2 und 0.0551 gr H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$: Gefunden:

59.66% C 6.07% H: 59.22% C 6.17% H.

Leucin 0.69 gr entsprechend 2.4% der trockenen Eihäute.

0.1 gr Leucin gab 0.2004 gr CO_2 und 0.0870 gr H_2O .

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: Gefunden:

54.96% C 9.92% H: 54.65% C 9.67% H.

Aus dem Filtrat von Tyrosin und Leucin schieden sich, nachdem trockenes Chlorwasserstoffgas eingeleitet worden war, die Krystalle des Glutaminsäurechlorhydrates aus. Nach Auskrystallisation betrug die Ausbeute des getrockneten Glutaminsäurechlorhydrats 0.4375 gr entsprechend 1.75% der trockenen Eihäute.

0.1 gr Glutaminsäurechlorhydrat gab 0.1195 gr CO_2 0.0490 gr H_2O .

„ „ „ „ 0.0194 „ Cl.

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4\text{HCl}$: Gefunden:

32.69% C 5.45% H 19.35 Cl: 32.59% C 5.47% H 19.40% Cl.

(2) Isolierung der Hexonbasen.

20 gr gereinigte Eihäute wurden mit 60 ccm konzentrierter Salzsäure gemischt und hierauf 8 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Die dreimal mit Wasser verdünnte Lösung wurde filtriert und gewaschen. Das Filtrat und das Waschwasser wurden vereinigt, hierauf mit soviel Schwefelsäure versetzt, dass die Konzentration 5% Schwefelsäure betrug. Daraus wurden die Diaminosäuren als Phosphowolframate gefällt. Der Phosphowolframniederschlag wurde nach 24 stündigem Stehen abgenutscht und mit 5% Schwefelsäure gewaschen. Hierauf wurde der Niederschlag mit überschüssigem Baryt völlig zerlegt und 24 Stunden lang sich selbst überlassen. Nach dem Absaugen wurde das überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Die filtrierte, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit wurde zwecks Vertreibung des Ammoniaks auf dem Wasserbade eingedampft. Nun

wurde sie mit Kohlensäure gesättigt und mit einer genügenden Menge von Quecksilbernitrat versetzt und dann 24 Stunden lang stehen gelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Hierauf wurde derselbe in wenig Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die dabei entstandene Schwefelquecksilberfällung wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde beim Eindampfen im Vakuum zu Syrup verdickt und blieb mehrere Stunden lang stehen. Die Krystalle schieden sich ab und wurden dann abfiltriert. Sie gaben keine genügende Menge zur Wägung, zeigten aber Weidels Pyrimidin-reaktion und die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure unter Bildung eines Farbstoffes, der in säurer Lösung rein orange, in alkalischer dunkel kirschrot gefärbt war. Gestützt auf obige Reaktionen will es deutlich erscheinen, dass die ausgeschiedenen Krystalle aus Histidinchlorohydrat bestanden.

Die Mutterlauge der Histidinquecksilberfällung wurde mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs im Vakuum eingedampft und dann mit Silbernitrat von der Salzsäure befreit. Das Filtrat wurde mit einem Ueberschuss von Silbernitrat und Baryt versetzt, wobei ein Niederschlag entstand und dann mit Hilfe der Saugpumpe abgesaugt. Der Niederschlag wurde in schwefelsäurehaltigem Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt und dann abfiltriert. Nach Neutralisation mit Salpetersäure wurde das Filtrat im Vakuum eingeeengt und blieb mehrere Stunden lang stehen. Die Krystalle schieden sich dabei ab, worauf sie abfiltriert wurden.

Die so gewonnenen Krystalle bestanden aus feinen, zu Gruppen vereinigten Nadeln. Deren wässrige Lösung wurde durch Phosphowolframsäure, Phosphomolybdänsäure und Nessler's Reagens gefällt und nach dem Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum gewogen und analysiert. Die Ausbeute betrug 0.5450 gr entsprechend 2.74% der trockenen Eihäute.

0.1 gr Substanz gab 0.0982 gr CO₂, 0.0471 gr H₂O.

Berechnet für C₁₂H₂₆O₃N₈, 3H₂O: Gefunden:

27.74% C 5.58% H: 26.87% C 5.27% H.

Nach den hier angegebenen Daten war es deutlich, dass die isolierten Krystalle Argininnitrat waren.

Das Filtrat vom Argininsilberniederschlag wurde nach dem Entfernen des Silbers durch Salzsäure und des Ueberschusses von Baryt durch Schwefelsäure eingeeengt, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Gehalt davon ungefähr 5% betrug und mit Phosphowolframsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit 5% Schwefelsäure ausgewaschen und mit Baryt zerlegt. Die unlöslichen Baryumsalze wurden abfiltriert und das Filtrat nach dem Entfernen des Ueberschusses von Baryt durch Kohlensäure fast zur Trockene eingedampft, mit Wasser aufgenommen und abfiltriert. Dieses Filtrat wurde mit einer geringen Menge alkoholischer Pikrinsäure unter Zusatz von Alkohol angerührt. Dabei entstand das Pikrat. Das Pikrat wurde auf dem Filter gesammelt und aus heissem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 1.234 gr entsprechend 6.17% der trockenen Eihäute. Für die Analyse wurde das gereinigte Präparat im Vakuum bei 100° getrocknet.

0.1 gr Substanz gab 0.1214 gr CO₂, 0.0316 gr H₂O.

Berechnet für C₁₂H₂₄N₄O₃ (3C₆H₃N₃O₇): Gefunden:

37.46% C, 3.64% H: 37.10% C, 3.53% H.

Aus dem obigen Analysenwert wurde das Pikrat als mit Lysinpikrat vollständig identisch gefunden.

(3) Zusammenfassung des Ergebnisses.

Die Mengeverhältnisse der isolierten Aminosäuren ergeben sich aus der folgenden Zusammenstellung.

Leucin.....	2.40%
Tyrosin.....	1.53%
Glutaminsäure.....	1.40%
Histidin.....	Vorhanden.
Arginin.....	2.30%
Lysin.....	1.75%

Am Schluss möchten wir nicht verfehlen, Herrn Professor K. Oshima unseren herzlichsten Dank für seine stete liebenswürdige Unterstützung auszudrücken.