- (2) Abderhalden: Z. physiol. Chem., 42—83 (1904—1913).
- (3) U. Suzuki, Y. Matsuyama and N. Hashimoto: Sc. Papers Inst. Physic. and Chem. Research., 4 (1926), 1.
- (4) Mitchell: J. biol. Chem., 26 (1916), 231.
- (5) McClendon: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 28 (1930—1931), 915.
- (6) W. C. Rose: J. biol. Chem., 92 (1931), ixvi.
- (7) W. C. Rose: J. biol. Chem., 94 (1931), 155.
- (8) Brazier: Biochem. J., 24 (1930), 1188.
- (9) Schryver and Buston: Proc. Roy. Soc. B. London, 99 (1926), 476.

Untersuchungen über die Enzyme von *Bombyx mori*, L.

III. Mitteilung. Über die Tyrosinase und Katalase des Blutes der Seidenraupen.

Von

KAZUO YAMAFUJI.

(Aus dem Biochem. Institut der Landw. Abteilung der Kaiserl. Kyushu-Univ. zu Fukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 24. Juli 1933.)

Eingehende Angaben über die Tyrosinase und Katalase bei Insekten sind sehr selten. In Fortsetzung der Untersuchungen über die Enzyme bei den Seidenraupen,⁽¹⁾⁽²⁾ teilt nun der Verfasser die Ergebnisse seiner Forschungen über diese beiden Enzyme des Blutes derselben mit.

1. Über die Tyrosinase.

(A) *Einrichtung der Versuche*:— Die für meine Versuche verwendeten Seidenraupen wurden im Frühling 1933 unter gleichen Bedingungen aufgezogen. Die quantitative Bestimmung der Tyrosinase geschah der zahlreichen, vergleichenden Untersuchungen wegen durch die einfache, etwas modifizierte BACHSche Methode. Zu diesem Zweck wurden 15 ccm 0.03 proz. l-Tyrosinlösung, 3 ccm M/3 Phosphatpufferlösung von pH 6.64 (mit Ausnahme von Versuch 1.), 1.5 ccm Wasser und 0.5 ccm mit 0.85 proz. NaCl-Lösung dreifach verdünntes Blut vermischt und 30 Minuten lang bei 30° (mit Ausnahme von Versuch 2.) gehalten. Dann wurde die Reaktion durch 2 ccm 10 proz. Schwefelsäure sistiert und mit 0.01 N KMnO₄-Lösung bis zur Entfärbung titriert.

(B) *Optimale pH*:- Versuch 1. China-7-B, 2. Tag im V. Lebensalter der Raupe.

pH	6.47	6.64	6.81	7.17	7.38	7.73	8.04
0.01 N KMnO ₄ . ccm	3.8	4.4	4.0	3.8	3.4	3.2	2.8

(C) *Optimaltemperatur*:- Versuch 2. China-7-B, 4. Tag im V. Lebensalter der Raupe.

Temp.°	23	30	37	45	55	65
0.01 N KMnO ₄ . ccm	1.2	4.1	5.4	4.8	2.8	0.6

(D) *Geschlechtsunterschied*:- Versuch 3. China-7-D, 4. Tag im V. Lebensalter der Raupen.

	♀				♂			
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel
0.01 N KMnO ₄ . ccm	2.8	2.8	3.2	2.9	4.4	3.8	4.0	4.1

(E) *Unterschied zwischen gut gewachsenen und schlecht gewachsenen Raupen*:- Versuch 4. Japan-110-E, 4. Tag im V. Lebensalter.

	Gut gewachsene Raupen.				Schlecht gewachsene Raupen.			
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel
0.01 N KMnO ₄ . ccm	3.8	3.8	4.4	4.0	3.8	4.4	3.6	3.9

(F) *Änderungen durch Hungerzustand bei den Raupen*:- Versuch 5. Europa-7-A, 4. Tag im V. Lebensalter.

Hungerstunden	1	6	24	50
0.01 N KMnO ₄ . ccm	1.2	2.4	1.6	0.8

(G) *Unterschied zwischen den verschiedenen Rassen der Seidenraupen*:- Versuch 6. V. Lebensalter. 0.01 N KMnO₄ ccm.

Rasse Tage	Japan-110-E	Japan-110-G	China-7-B	China-7-D	Europa-7-A	Europa-7-C
2	6.4	6.0	—	3.4	2.8	0.8
4	4.0	3.4	6.2	3.2	1.2	0.8
7	4.4	4.0	10.6	4.8	2.2	2.4

(H) *Veränderungen im Laufe von drei Entwicklungsperioden von Bombyx mori*, L.:— Versuch 7. Europa-7-A.

	Raupe	Einspinnen des Kokons		Puppe		
Tage	Reife	2	4	1	3	5
0.01 N KMnO ₄ ccm	4.2	0.6	0.2	0.4	0.6	0.4
	Puppe			Schmetterling		
Tage	8	11	13	1	3	
0.01 N KMnO ₄ ccm	0.3	0.4	0.4	5.6	6.2	

II. Über die Katalase.

(A) *Einrichtung der Versuche*:— Als Substrat benutzte ich der gleich zeitig durchgeführten, zahlreichen Versuche und ferner der kräftigen Katalasewirkung des Bluts wegen etwas konzentrierte, nämlich ca. 0.3 Proz. H₂O₂-Lösung. 25 ccm H₂O₂-Lösung, 3 ccm M/3 Phosphatpufferlösung von pH 6.64 (mit Ausnahme von Versuch 1.), 1.5 ccm Wasser und 0.5 ccm mit 0.85 Proz. NaCl-Lösung dreifach verdünntes Blut wurden gemischt und nach 30 Minuten bei 30° (mit Ausnahme von Versuch 2.) in Kölbchen mit 10 Proz. Schwefelsäure eingelassen. Dann wurde die nicht zersetzte Menge Wasserstoffsuperoxyd durch Titration mit einer 0.01 N KMnO₄-Lösung bestimmt.

(B) *Optimale pH*:— Versuch 1. China-7-B, 3. Tag im V. Lebensalter der Raupe.

pH	6.47	6.64	6.81	7.17	7.38	7.73	8.04
Gespaltene H ₂ O ₂ mg	18.70	20.94	20.20	19.45	17.95	16.64	14.89
Spaltung %	24.21	26.81	26.14	25.18	23.74	21.30	18.88

(C) *Optimaltemperatur*:— Versuch 2. China-7-B, 4. Tag im V. Lebensalter der Raupe.

Temp °	5	15	23	30	37	45
Gespaltene H ₂ O ₂ mg	11.05	14.28	15.13	11.56	8.84	7.17
Spaltung %	14.30	18.49	19.59	14.96	11.44	9.24

(D) *Geschlechtsunterschied*:— Versuch 3. China-7-D, 4. Tag im V. Lebensalter der Raupen.

	♀				♂			
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel
Gespaltene H_2O_2 mg	14.21	13.09	13.46	13.59	17.95	17.58	18.70	18.08
Spaltung %	18.40	16.82	17.43	17.55	23.74	22.75	24.21	23.57

(E) *Unterschied zwischen gut gewachsenen und schlecht gewachsenen Raupen*:— Versuch 4. China-7-D, 7. Tag im V. Lebensalter.

	Gut gewachsene Raupen				Schlecht gewachsene Raupen			
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Mittel
Gespaltene H_2O_2 mg	16.08	15.71	15.33	15.77	13.46	12.72	12.34	12.84
Spaltung %	20.82	20.33	19.75	20.30	17.43	16.46	15.97	16.62

(F) *Änderungen durch Hungerrustand bei den Raupen*:— Versuch 5. Europa-7-C, 4. Tag im V. Lebensalter.

Hungerstunden	1	6	24	50
Gespaltene H_2O_2 mg	7.48	7.85	6.73	8.23
Spaltung %	9.68	10.17	8.71	10.65

(G) *Unterschied zwischen den verschiedenen Rassen der Seidenraupen*:— Versuch 6. V. Lebensalter.

Tage	2		4		7	
Rasse	Gespaltene H_2O_2 mg	Spaltung %	Gespaltene H_2O_2 mg	Spaltung %	Gespaltene H_2O_2 mg	Spaltung %
Japan-110-E	16.08	20.82	14.96	19.30	15.71	20.33
Japan-110-G	24.31	31.47	20.19	26.14	19.82	25.66
China-7-B	—	—	10.71	13.86	15.47	20.03
China-7-D	19.89	25.75	13.47	17.44	14.59	18.89
Europa-7-A	8.16	10.56	6.68	8.65	7.85	10.16
Europa-7-C	6.29	8.14	7.48	9.68	10.10	13.07

(H) *Veränderungen im Laufe von drei Entwicklungsperioden von Bombyx mori, L.*:— Versuch 7. Europa-7-A.

	Raupe	Einspinnen des Kokons		Puppe		
Tage	Reife	2	4	1	3	5
Gespaltene H_2O_2 mg	11.22	21.32	20.94	19.82	40.02	31.56
Spaltung %	14.52	27.60	27.09	25.66	51.81	40.85

	Puppe			Schmetterling	
Tage	8	11	13	1	3
Gespaltene H_2O_2 mg	35.36	14.11	11.97	18.50	25.57
Spaltung %	45.77	18.27	15.50	23.95	33.10

Zusammenfassung.

(1) Die Tyrosinase des Bluts von *Bombyx mori* wirkt am besten bei pH 6.6. Die Optimaltemperatur liegt bei 37°.

(2) Die Tyrosinasewirkung des Bluts ist bei den Männchen etwas stärker als bei den Weibchen, aber es besteht kein Unterschied zwischen den gut gewachsenen und den schlecht gewachsenen Raupen. Durch Hunger wird die Wirkung der Tyrosinase erst etwas stärker und dann allmählich schwächer.

(3) Der Tyrosinasegehalt des Bluts der japanischen und der chinesischen Rassen ist recht viel höher als derjenige der europäischen. Bei den reifen Larven ist die Tyrosinase sehr aktiv, aber mit dem Beginn des Spinnens der Kokons tritt eine rapide Abnahme auf und während der Puppenperioden bleibt sie bedeutend zurück. Dann wieder vermehrt sich die Tyrosinase in den Tagen des Schmetterlingslebens rasch bis zu einem Maximum.

(4) Die Blutkatalase von *Bombyx mori* zeigt die optimale Aktivität bei pH 6.6; ihr Temperaturoptimum liegt bei 23°.

(5) Die Katalasewirkung des Bluts ist bei den Männchen etwas stärker als bei den Weibchen und auch bei gut gewachsenen Raupen etwas höher als bei schlecht gewachsenen. Es wurde aber innerhalb der zwei Hungertage keine Änderung beobachtet.

(6) Der Katalasegehalt des Bluts der japanischen und der chinesischen Rassen ist recht viel höher als derjenige der europäischen. Beim Beginn des Kokonspinnens der reifen Larve findet eine rapide Zunahme der Katalaseaktivität statt, die ihr Maximum meist am dritten Tage der Puppenperiode erreicht. Dann sinkt die Katalase allmählich und wird in der Periode des Schmetterlingslebens wieder bedeutend stärker.

Literatur.

- (1), (2) K. Yamafuji: I u. II. Mitteilung, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **8**, 156, (1932); **9**, 19, (1933).

On the Two Kinds of Saponin of Soya Bean.

By

Koji OKANO and Iwao OHARA.

(Received Oct. 21, 1933)

We have isolated easily and in large quantity the two kinds of saponin, crystal and amorphous, from the alcoholic extraction of soya bean as the by-product in the process of the alcoholic extraction method of the soya bean oil.⁽¹⁾ The crystalline saponin had been investigated by Y. Sumiki⁽²⁾ already and he reported that it formed squama, melting at $222\sim 4^\circ$, the molecular formula was $C_{49\sim 52}H_{70\sim 84}O_{21}$, by the hydrolysis sapogenin ($C_{32\sim 35}H_{48\sim 50}O_3$), glucose, rhamnose, arabinose and other unknown acidic substance were obtained, and its haemolytic and toxic power were very weak. E. Walz⁽³⁾ had reported that there were three kinds of saponin in soya bean, but those details remained unexplained. We have compared the two saponins and further investigated them closely as the first step toward the utilization of alcoholic extract.

Experimental.

1) Isolation:— Alcoholic extract of soya bean, from which the bean oil was separated and alcohol was evaporated, is mixed with NaCl-solution and from separated precipitate the ether soluble matter is removed, then the residue is recrystallized from 80% alcohol repeatedly and crystal and amorphous ones are separated by fractional crystallization.

2) Molecular formulas and properties:—

(A) Crystalline saponin. mel. pt. $225\sim 227^\circ$. Its properties are identical with those of Sumiki and sodium-salt is hexagonal plate, decomposing at 259° , both have not haemolytic power.

analysis; $C_{48\sim 50}H_{77\sim 81}O_{18}$,	cal. H 8.25~8.43%,	C 61.21~61.92%
obs. H% 8.66 8.58 9.00 9.43,	C% 61.03 61.04 61.07 61.86	
mol. wt. cal. 941~969,	obs. 960 964 992	

(B) Amorphous saponin. mel. pt. $216\sim 218^\circ$. White powder is recrystallized.