

acceptor have so far been negative, suggesting that externally added polyglycerophosphate, unlike the material synthesized "in situ" by the particulate preparation, is not available to the glycosylating enzyme. Work is in progress to determine the structure of the enzymically synthesized polymer and the mechanism of these reactions.

The author wishes to thank Dr. L. GLASER for his continued interest in this work and helpful discussions.

This work was supported by Grant No. G-20027 from the National Science Foundation. The author is the recipient of a postdoctoral fellowship from the U.S. Public Health Service.

Department of Biological Chemistry,
Washington University School of Medicine,
St. Louis, Mo. (U.S.A.)

MAX M. BURGER

¹ M. M. BURGER AND L. GLASER, *Biochim. Biophys. Acta*, 64 (1962) 575.

² L. GLASER, *Biochim. Biophys. Acta*, 71 (1963) 237.

³ J. BADDILEY, *Federation Proc.*, 21 (1962) 1084.

⁴ P. CRITCHLEY, A. R. ARCHIBALD AND J. BADDILEY, *Biochem. J.*, 85 (1962) 420.

⁵ S. G. NATHANSON AND J. L. STROMINGER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) PC 3839.

⁶ M. M. BURGER AND L. GLASER, unpublished observation.

⁷ A. C. PALADINI AND L. F. LELOIR, *Biochem. J.*, 51 (1952) 426.

⁸ C. S. HANES AND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.

⁹ R. L. WHISTLER AND D. F. DURSO, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 677.

¹⁰ D. C. ELLWOOD, M. V. KELEMEN AND J. BADDILEY, *Biochem. J.*, 86 (1963) 213.

Received March 9th, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 495-497

PN 1244

Zur Umbildung der 2-Desoxyhexosen in höheren Pflanzen

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über die Umbildung und Wirkungsweise von 2-Desoxyhexosen im tierischen Gewebe, in Hefepilzen und Mikroben gibt es nur wenige analoge Studien, die sich mit dem Stoffwechsel dieser Zucker im Pflanzen-gewebe befassen¹⁻⁷. In unseren Untersuchungen, die an die interessanten Experimente von BARBER⁸ und Süß⁹ mit 2-deGlc an Tabakpflanzen anknüpfen, wurden als Versuchsobjekte sowohl erwachsene als auch 2-3 Monate alte Tabakpflanzen (12-18 g), erwachsene Sonnenblumen und Keimpflanzen von Erbsen, Weizen, Mais und Sonnenblumen verwendet. Die Verabreichung der 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ M wässrigen Lösungen von 2-deGlc und 2-deGal erfolgte bei intakten Pflanzen durch Absorption durch die Wurzeln, bei den abgeschnittenen Pflanzen durch die Achsen. Nach 24 h wurden die ganzen Pflanzen im 70 % Äthanol homogenisiert und der abgetrennte Gewebsbrei noch zweimal mit Äthanol extrahiert. Die vereinten eingeengten Extrakte wurden papierchromatographisch analysiert.

Bei allen Versuchen, ohne Rücksicht auf die Dauer, Versuchsbedingungen, Alter

Abkürzungen: 2-deGlc, 2-Desoxy-D-glucose; 2-deGal, 2-Desoxy-D-galaktose; 2-deGlcA-lacton, 2-Desoxy-D-gluconolacton; 2-deGalA-lacton, 2-Desoxy-D-galaktonolacton.

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 497-500

oder Art der Pflanzen wurden drei Gruppen von Substanzen gefunden, die eine positive Reaktion d.h. eine violette Färbung mit dem Vanillin-Reagens auf Desoxyzucker⁹ und ebenso eine violette Färbung mit dem Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagens^{9,10} ergaben. Die Zusammensetzung der verabreichten Desoxyzuckerlösungen hat sich während des Versuches nicht geändert. Eine Übersicht der in den Pflanzenextrakten entdeckten Desoxyzucker-Substanzen und ihrer R_F -Werte zeigen die Fig. 1 und Tabelle I.

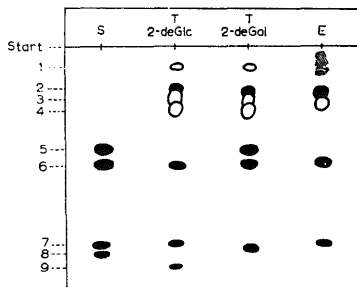


Fig. 1. Papierchromatogramm von äthanolischen Extrakten aus jungen mit 2-deGlc und 2-deGal behandelten Tabakpflanzen. S, Vergleichssubstanzen; T/2-deGlc, Extrakt einer mit der 0.5% wässrigen 2-deGlc-Lösung 24 h behandelten Tabakpflanze; T/2-deGal, Tabakpflanze von 15 g in einer 0.5% 2-deGal-Lösung, die Versuchsbedingungen wie im vorigen Fall; E, Ansatz von 0.1 g Süßmandelemulsin mit 0.1 g Glucose und 0.1 g 2-deGlc in 1 ml Wasser inkubiert 5 Tage bei 37°; 1, Saccharose; 2, die desoxyzuckerhaltigen Oligosaccharide; 3, Glucose; 4, Fructose; 5, 2-deGal; 6, 2-deGlc; 7, 2-deGlcA-lacton; 8, 2-deGalA-lacton; 9, eine nicht identifizierte Substanz. Die schwarz ausgefüllten Flecken bezeichnen die mit dem Vanillin-Reagens⁹ positiv reagierende Substanzen.

Ausser den unveränderten Desoxyhexosen enthielten die Extrakte jeweils neue desoxyzuckerhaltige Substanzen im Bereich der R_F -Werte der Oligosaccharide und eine weitere Gruppe mit höheren R_F -Werten als die ursprünglichen Desoxyzucker.

Die Bildung von Oligosacchariden durch Glykosidierung der 2-deGlc wurde schon von BARBER⁹ beschrieben. Bei Wiederholung seiner Versuche mit erwachsenen Tabakpflanzen haben wir nur einen 2-deGlc enthaltenden Oligosaccharid gefunden, der

TABELLE I

$R_{Glucose}$ -WERTE DER DESOXYZUCKERSUBSTANZEN

System *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (10:1:3)

Substanz	$R_{Glucose}$
Glucose	1.00
2-deGlc	2.60
2-deGal	2.25
2-deGlcA-lacton	4.15
2-deGalA-lacton	4.35
Eine nicht identifizierte Substanz	4.50
2-deGlc und 2-deGal-haltige Oligosaccharide	0.95

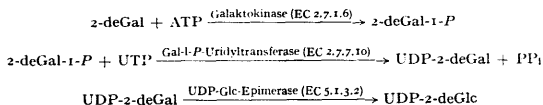
durch saure Hydrolyse und ebenso gut durch Einwirkung von Süssmandelemulsin¹¹ ausser der 2-deGlc noch Glucose als einzige Komponenten lieferte. Zum Unterschied von BARBER's Versuchen wurde ein fructosehaltiges Oligosaccharid nicht einmal in Spuren nachgewiesen. Ein mit dem gefundenen Oligosaccharid identisches Produkt erhielten wir jedoch—neben den üblichen Produkten—durch Einwirkung von Süssmandelemulsin auf eine Lösung, die etwa 10 % D-Glucose und 10 % 2-deGlc enthielt. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um die 6-O- β -D-Glucosyl-2-desoxy-D-glucose. Das nach Zugabe von 2-deGal entstandene Oligosaccharid wurde vorläufig nicht näher identifiziert.

Die freien unveränderten Desoxyhexosen bilden die zweite Gruppe der Desoxyzuckersubstanzen, die in allen Versuchen festgestellt werden konnten. Ausserdem wurde in jungen Tabakpflanzen, welche mit 2-deGal gespeist wurden eindeutig die 2-deGlc nachgewiesen.

Die dritte Substanzgruppe wurde als Lactone der 2-Desoxyaldonosäuren identifiziert. Das aus 2-deGlc entstehende Produkt ist mit dem durch enzymatische Dehydrierung von 2-deGlc durch Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4) resultierende 2-deGlcAlacton¹² identisch. Es ist interessant., dass dieselbe Substanz auch durch Einwirkung von Emulsin auf eine 2-deGlc und glucosehaltige Lösung entsteht¹³ (Fig. 1).

Die Resultate unserer vorläufigen Versuche lassen also auf folgende primäre Umsetzungsreaktionen an 2-deGlc und 2-deGal schliessen: (1) β -D-Glucosidierung (wahrscheinlich vorwiegend am C-6); (2) Oxydation am C-1 unter Entstehung von 2-Desoxyhexonsäurelactonen. (3) Epimerisierung von 2-deGal zu 2-deGlc.

Über die Transglykosidierungsreaktionen mit nicht physiologischen Substraten als Glucose-Acceptoren¹⁴ sowie über die Existenz von nicht spezifischen Zucker-oxydasen in höheren Pflanzen ist schon mehrmals berichtet worden^{15, 16}. Die Epimerisierungsreaktion 2-deGal \rightarrow 2-deGlc wurde jedoch, soweit es uns bekannt ist, bisher nicht beschrieben. Sie lässt die Bindung von 2-deGal an UDP und somit auch den folgenden bekannten Reaktionsablauf der 4-Epimerisierung voraussetzen:



Die Bindung der 2-Desoxyhexosen an UDP würde allerdings bedeuten, dass diese Zucker auf dem Wege der UDP-Derivate eine Reihe von Umbildungen eingehen und somit als Strukturanaloga der Grundzucker an vielen Stellen in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreifen können. Wir sind bestrebt, die Berechtigung dieser Voraussetzungen in der nächsten Zukunft eingehender zu untersuchen.

Biochemisches Institut der Karls-Universität,
Praha (Czechoslovakia)

JAN KOCOUREK
MARIE TICHÁ
VLADIMÍR JIRÁČEK
JOSEF KOŠTÍŘ

¹ G. STENLID, *Physiol. Plantarum*, 7 (1954) 175.

² G. STENLID, *Physiol. Plantarum*, 10 (1957) 922.

³ G. STENLID, *Physiol. Plantarum*, 10 (1957) 1001.

⁴ G. STENLID, *Physiol. Plantarum*, 10 (1957) 867.

- ⁵ G. STENLID, *Physiol. Plantarum*, 12 (1959) 310.
⁶ G. A. BARBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 3722.
⁷ J. SÜSS, *Diplomarbeit, Karls-Universität, Praha*, 1961.
⁸ A. P. McLENNAN, H. M. RANDALL UND D. W. SMITH, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 2020.
⁹ J. L. BUCHAN UND R. J. SAVAGE, *Analyst*, 77 (1952) 401.
¹⁰ V. VÍTEK, *Dissertation, Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften, Praha*, 1959.
¹¹ B. HELFERICH, S. WINKLER, R. GOOTZ, O. PETERS UND E. GÜNTHER, *Z. Physiol. Chem.*, 208 (1932) 91.
¹² R. B. McCOMB, W. D. YUSHOK UND W. G. BATT, *J. Franklin Inst.*, 263 (1957) 161.
¹³ M. TICHÁ, J. KOCOUŘEK, V. JIRÁČEK UND J. KOŠTÍŘ, *Experientia*, im Druck.
¹⁴ Z. SELINGER UND M. SCHRAMM, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2183.
¹⁵ R. C. BEAN, C. C. PORTER UND B. M. STEINBERG, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1235.
¹⁶ K. P. BASU UND J. N. KARKUN, *J. Indian Chem. Soc.*, 20 (1943) 229.

Eingegangen am 14 Januar, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 497–500

PN 1232

Isolation of protoplast-bursting factor from pig pancreas

It has been reported that the protoplasts of Gram-positive bacteria are lysed by RNAase (EC 2.7.7.16)¹, lipase (EC 3.1.1.3)², trypsin (EC 3.4.4.4)³, and some bacterial enzyme-like substances⁴. We found that the heat-treated acetone powder of pig pancreas has a strong bursting activity toward protoplasts of *Bacillus megaterium*. In this communication, the isolation of the protoplast-bursting factor is described.

B. megaterium B-151-3 grown at 37° for 5 h in a nutrient medium was collected by centrifugation, suspended in lysozyme solution (0.75 M sucrose, 0.005 M MgCl₂, 60 µg/ml lysozyme in 0.61 M phosphate buffer (pH 7.0)), and incubated at 30° for 30 min.

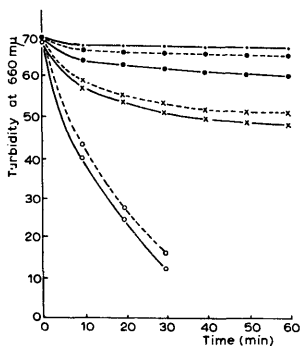


Fig. 1. Effect of enzymes on protoplasts of *B. megaterium*. ○—○, pancreas acetone powder, unheated; ●—●, pancreas acetone powder, heated; ○—○, unheated trypsin; ●—●, heated trypsin; ×—×, unheated RNAase; ×—×, heated RNAase; ———, control. 0.3 ml of sample (300 µg/ml as protein; determined by KALCKAR's method⁶) was added to 6.0 ml of protoplast suspension, and the mixture was incubated at 37°. As a control, each sample was heated for 15 min in a boiling-water bath.