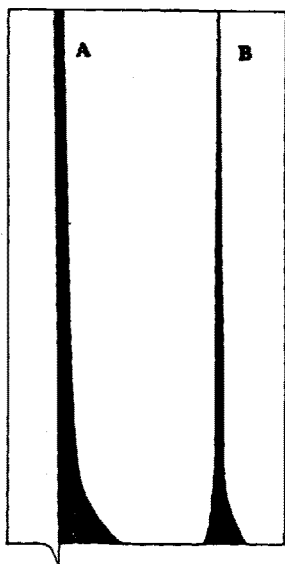


précipitation, par des solutions salines concentrées, on pouvait, à partir d'une solution de myosine opalescente, obtenir des précipités différant entre eux en ceci que leur dissolution donnait lieu à des solutions plus ou moins exemptes de cette opalescence, nous avons cherché à préciser mieux les conditions de séparation des composantes α et β , dans l'espoir de réussir à les préparer à l'état pur.



A. Tracé électrophorétique de myosine α purifiée, après 24 heures d'électrophorèse à 1,59 volts/cm, p_H : 7,10, μ : 0,40 (0,1 μ phosphates mono- et disodiques + 0,3 μ NaCl).

La dissymétrie de la figure est due à la grande viscosité de la solution, à la coexistence d'un phénomène de réflexion partielle et d'un gradient d'indice très élevé (voir communication précédente).

B. Tracé électrophorétique de myosine β purifiée, après 29 heures d'électrophorèse à 1,62 volts/cm, p_H : 7,14, μ : 0,40 (même composition).

Le mode opératoire est le suivant: la concentration de la solution de myosine d'EDSALL de muscles au repos de lapin est amenée aux environs de 0,25 % de protéines par addition de KCl 0,5 m et le p_H ajusté à 6,2-6,4. On ajoute, à 0° C, très lentement et en agitant constamment, une solution saturée de sulfate d'ammonium. Lorsque la saturation atteint 23 à 24 %, un précipité commence à se former. On poursuit l'addition jusqu'à 27 % de saturation. Le précipité est séparé par centrifugation, lavé au moyen de sulfate d'ammonium à 27 % de saturation, puis dissous dans KCl 0,5 m. On obtient une solution épaisse, très visqueuse, très opalescente (fraction I).

Ce qui reste de protéines dans la solution mère est précipité complètement par addition de sulfate d'ammonium à 45 % de saturation. Ce précipité, lavé puis dissous dans KCl 0,5 m, fournit une solution faiblement visqueuse, très limpide, même aux fortes concentrations (fraction II).

À l'électrophorèse (μ : 0,40; p_H : 7,10), la fraction I se montre constituée de myosines α et β , avec une asymétrie cathode-anode très marquée. La fraction II est dépourvue de α , mais contient des traces de γ .

La fraction I, précipitée et lavée deux fois par de l'eau distillée, dissoute dans KCl 0,5 m, reprécipitée par le sulfate d'ammonium à 27 % de saturation, puis redissoute dans KCl 0,5 m, soumise à l'électrophorèse (p_H 7,10; 0,3 μ NaCl + 0,1 μ phosphates mono- et

disodiques) montre de la myosine α électrophorétiquement pure et exceptionnellement homogène¹. Ses solutions sont très turbides, très visqueuses, thixotropes et fortement biréfringentes par agitation.

La fraction II, traitée comme la fraction I, mais précipitée finalement par du sulfate d'ammonium à 37,5 % de saturation et redissoute dans KCl 0,5 m se révèle être de la myosine β électrophorétiquement pure et exceptionnellement homogène. Même après des électrophorèses très prolongées (30 heures, 1,6 volts/cm), le gradient d'indice reste extrêmement élevé, aussi bien à la cathode qu'à l'anode. Ainsi préparée, cette protéine montre plus d'homogénéité que la myosine β obtenue directement à partir de muscles préalablement faradisés et qui, même lorsqu'elle paraît dépourvue complètement des composantes α et γ , manifeste, au cours d'électrophorèses comparables, un étalement plus prononcé, surtout à la cathode.

Les solutions de myosine β sont très limpides, faiblement visqueuses et faiblement biréfringentes par agitation.

En résumé, par fractionnements au sulfate d'ammonium, nous avons pu isoler dans un état électrophorétiquement pur et exceptionnellement homogène les deux composantes principales de la myosine du muscle strié du lapin: la myosine α précipite entre 23 et 27 % de saturation et la myosine β entre 35 et 39 % de saturation. La myosine β ainsi préparée est beaucoup plus homogène que la myosine d'EDSALL de muscles fatigués, même lorsque celle-ci est entièrement dépourvue des composantes α et γ .

Les solutions de ces myosines α et β diffèrent considérablement par leurs propriétés physiques.

M. DUBUISSON

Laboratoire de Biologie générale, Université de Liège, et Chaire d'Actualités scientifiques, Université d'Alger.

Summary

It is possible to separate in a state of high electrophoretic purity and homogeneity the α and β components of myosin solutions by fractionation with ammonium sulfate.

The solutions of α and β myosins differ considerably by their physical properties.

¹ On obtient un meilleur rendement en myosine α si, au lieu de partir d'une solution de myosine d'EDSALL, on utilise une solution de myosine B, beaucoup plus riche en myosine α (DUBUISSON²).

² M. DUBUISSON, Exper. 2, 258 (1946).

Enzyme Preparations from Cellulose-Decomposing Bacteria

The enzymic decomposition of cellulose is as yet very little studied. So far, only the enzymes of the invertebrates^{1,2,3,4} and fungi^{5,6,7} have been more closely investigated. Concerning bacteria, only two attempts

¹ P. KARRER and collaborators, *Helv. chim. acta* 6, 1923 et sqq.

² B. HELFERICH and J. GOERDELER, *Ber. Verh. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-phys. Kl.* 92, 75 (1940).

³ E. A. PARKIN, *J. exper. Biol.* 17, 364 (1940).

⁴ W. TRAGER, *Biochem. J.* 26, 1762 (1932).

⁵ W. GRASSMANN and collaborators, *Liebigs Ann. Chemie* 502, 20; 503, 167 (1933).

⁶ K. FREUDENBERG and TH. PLOETZ, *Z. physiol. Chem.* 259, 19 (1939); TH. PLOETZ, *ib.* 261, 183 (1939).

⁷ S. R. BOSE and S. N. SARKAR, *Proc. roy. Soc., Ser. B., Biol. Sci.* 123, 193 (1937). — S. R. BOSE, *Erg. Enzymforschung* 3, 267 (1939).

have been made to get information of the enzyme system. PRINGSHEIM¹ studied the enzymes in cultures of various types of anaerobic cellulose-decomposers, and SIMOLA² investigated two aerobic spore-forming strains (*Cellulobacillus*). The important non-spore-forming bacteria of the genera *Cytophaga*, *Cellvibrio*, and *Cellulomonas*, which are widely distributed in the soil, are, however, completely unknown in this respect.

A report of the author's preliminary investigations into *Cytophaga* enzymes was published earlier³. In the present paper some further results with bacteria and enzyme preparations of *Cytophaga* are given.

Since the method of culturing the bacteria on agar plates, as outlined in the previous paper, gave too small amounts of cells, the bacteria were now cultured in aerated Erlenmeyer flasks, or in Kluver flasks. Cotton-wool or cellulose-wadding in a nutrient solution was used as a substrate. After two weeks of incubation at 30° C the cultures were filtered in a Büchner funnel through a thin layer of cotton. From the solution bacteria preparations were obtained by concentrating *in vacuo*, a brief centrifugation for eliminating unsolved salts and dialysis. Finally dry bacteria were obtained after the evaporation of excess water *in vacuo*. Preparations with a good activity have also been obtained by precipitation methods. These methods will be described in a later report.

Preliminary experiments have been carried out in order to get cellfree solutions of the cellulose-decomposing enzymes. An extraction of the dried bacteria was tried, the best result finally being obtained by extracting at p_H 9 with a borate buffer or ammonia in the presence of toluene. At a higher p_H the enzymes seem to be destroyed, and at a lower value the extraction is probably not so complete. After extraction the suspen-

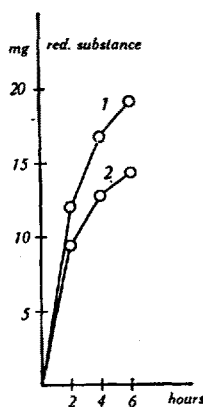


Fig. 1. Formation of reducing substance by preparations of *Cytophaga globulosa*. Substrate: lichenin. The values are calculated as glucose and expressed in mg per sample of 10 ml.

1. 5 mg dry preparation.
2. 1 ml cell-free extract of the same preparation, corresponding to 5 mg.

sion was centrifugated and filtered through a bacterial filter, by which clear and almost colourless solutions with good action against lichenin were obtained. With cellophane as a substrate the action of the solution—as well as that of the dry bacteria—was weaker. The depression of the tensile strength of the cellophane strips used was, however, very conspicuous already after few

hours. It seems as if this breaking up of the material were the first step in the degradation process, since a considerable diminishing of the strength was observed before any glucose formation could be demonstrated.

According to FREUDENBERG and PLOETZ¹, cellulase and lichenase are two specifically distinct enzymes. They

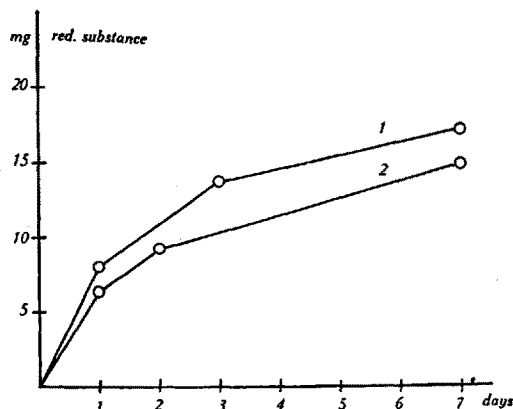


Fig. 2. Formation of reducing substance by preparations of *Cytophaga globulosa*. Substrate: cellophane.

1. 20 mg dry preparation.
2. 8 ml cell-free extract of the same preparation, corresponding to 40 mg.

have found different p_H -optima for the two enzymes, and have also been able to bring about a fractionation by precipitating with alcohol-ether mixtures. As regards the bacterial enzymes here concerned, no difference seems to exist in p_H -optimum, since both lichenin and cellophane are hydrolyzed with the greatest rapidity at p_H 7. Through this optimum the *Cytophaga* enzymes are also distinct from the fungal enzymes investigated by FREUDENBERG and PLOETZ and from SIMOLA's bacterial enzymes as well as from the snail enzymes studied by KARRER and collaborators. The separation of the cellulase, lichenase and cellobiase has not yet been tried.

It was found that the addition of $MgCl_2$ increased the rate of lichenin hydrolysis by the *Cytophaga* preparations markedly. An addition of $CaCl_2$ or $NaCl$ had no such effect.

For the determination of the enzyme action the preparation to be tested was shaken at 36° C with 10 ml of phosphate buffer of p_H 7.0 and with lichenin or cellophane as substrates. Reducing sugar was determined according to WILLSTÄTTER and SCHUDEL, in 2 ml samples taken out.

The figures give an idea of the hydrolysis of lichenin and cellophane in the presence of *Cytophaga* preparations.

GÖSTA FÄHRAEUS

Institute of Microbiology, Agricultural College of Sweden, Uppsala, August 30, 1946.

Zusammenfassung

Zellulosespaltende Bakterien von der Gattung *Cytophaga* wurden in durchlüfteter Nährlösung mit Watte gezüchtet. Nach 2 Wochen Bebrütung wurden aus der Lösung Trockenpräparate der Bakterien mittels verschiedenen Methoden hergestellt. Der enzymatische Ab-

¹ H. PRINGSHEIM, Z. physiol. Chem. 78, 266 (1912).

² P. E. SIMOLA, Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A 34, No 6 (1911).

³ G. FÄHRAEUS, Ann. agric. Coll. Sweden 12, 1 (1944).

¹ K. FREUDENBERG and TH. PLOETZ, Z. physiol. Chem. 259, 19 (1939); TH. PLOETZ, ib. 261, 183 (1939).

bau von Lichenin und umgefällter Zellulose (Cellophan) wurde unter Verwendung dieser Präparate näher studiert. Es war möglich, aus den Trockenpräparaten zellfreie Enzymlösungen durch Extraktion mit Boratpuffer zu erhalten. Diese Lösungen waren sowohl gegen Lichenin als Cellophan wirksam. Mit beiden Substraten wurde ein Optimum bei p_H 7.0 gefunden, was mit dem Wachstumsoptimum der Bakterien übereinstimmt, jedoch von den Optimalwerten früher bekannter Zellulase- und Lichenasepräparate aus Pilzen und Evertrebraten abweicht. Mg-Ionen wirkten aktivierend bei der Licheninspaltung.

Über die mechanische Klanganalyse des Ohrs

Die Klanganalyse des Ohrs ist eine der Grundeigenschaften des Gehörs, welche trotz zahlreichen Untersuchungen und Hypothesen vieler Forscher noch nicht einwandfrei klargelegt werden konnte. Fest steht nur, daß die mechanischen Schwingungen des Schalls in der Schnecke bzw. im Cortischen Organ in Nervenenergie umgesetzt werden und bereits in der Schnecke eine mechanische Klanganalyse stattfindet. Nach den neueren Untersuchungen von v. BÉKÉSY erfolgt die Klanganalyse nicht allein auf mechanischem Weg, sondern ihre subjektive Feinheit erhält sie erst durch nervös bzw. zentral bedingte Kontrastercheinungen.

Die meisten bisherigen theoretischen Erklärungen der mechanischen Klanganalyse stoßen auf eine grundsätzliche Schwierigkeit¹. Die Physik kennt keine andere Möglichkeit einer mechanischen *phasenunabhängigen* Frequenzanalyse als diejenige durch Resonanz, weshalb sich die alte HENSEN-HELMHOLTZsche Resonanztheorie des Hörens in teilweise modifizierter Form bis heute behaupten konnte. Die Frequenzanalyse durch Resonanz setzt jedoch eine nicht zu starke Dämpfung des schwingenden Systems voraus. Damit geraten die experimentellen Ergebnisse am Schall-Leitungsapparat in Widerspruch, die zeigen, daß der Schall-Leitungsapparat aperiodisch gedämpft ist. An der praktisch aperiodischen Bewegung des Schall-Leitungsapparates ist kaum mehr zu zweifeln, da sie sich durch zwei verschiedene Methoden, eine subjektive² und eine objektive³, nachweisen läßt. Im Gegensatz dazu konnte aber eine Resonanz experimentell nicht gefunden werden.

Mit meinen Ausführungen werde ich darlegen, daß eine mechanische Frequenzanalyse ohne Resonanz möglich ist, wie das bereits REBOUL⁴ nachzuweisen versuchte. Diese Art der Frequenzanalyse ergibt sich aus den folgenden mathematischen Formeln, die die mechanischen Eigenschaften der Schnecke in geeigneter Weise ausdrücken. Das Problem hat einen durchwegs hydrodynamischen Charakter, da die Schnecke mit Flüssigkeit gefüllt ist. Um die Rechnung zu vereinfachen, können alle vorkommenden Größen näherungsweise so reduziert werden, daß der Querschnitt des Schneckenkanals zum Rechteck wird und die Basilarmembran sich auf die ganze Querschnittsbreite ausdehnt. Wenn dazu noch der Kanal abgewickelt wird, erhalten wir den auf der Fig. 1 dargestellten Längsschnitt. Da die Kanaltiefe gegenüber der Wellenlänge klein ist, läßt sich die Dynamik der Schnecke unter Vernachlässigung

der Reibung und der Masse der Basilarmembran durch die zwei folgenden Differentialgleichungen beschreiben

$$\begin{aligned} \frac{\partial p}{\partial x} &= 2q \cdot \frac{\partial u}{\partial t} \\ \frac{\partial u}{\partial x} \cdot h &= \frac{\partial p}{\partial t} \cdot c. \end{aligned} \quad (1)$$

Dabei bedeuten: p die Druckdifferenz an den beiden Seiten der Basilarmembran, u die Bewegungsgeschwindigkeit in der x -Richtung, q die Flüssigkeitsdichte und

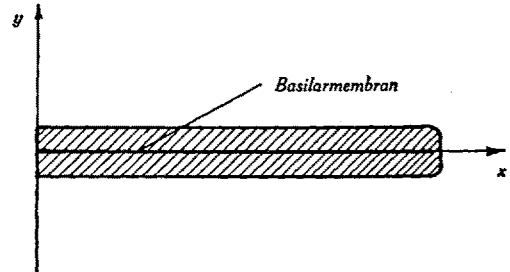


Fig. 1. Schematisierter Längsschnitt durch die vereinfachte Schnecke.

h die Kanaltiefe. c ist ein Maß für die Nachgiebigkeit der Basilarmembran und läßt sich nach den Messungen von G. v. BÉKÉSY¹ durch die Funktion

$$c = c_0 \cdot e^{\beta x}$$

darstellen.

Durch die Kombination der beiden Gleichungen (1) und die Einführung einer einfachen harmonischen Funktion mit der Kreisfrequenz ω ergibt sich

$$\frac{\partial^2 p}{\partial x^2} + \omega^2 \frac{2q \cdot c_0}{h} \cdot e^{\beta x} \cdot p = 0. \quad (2)$$

Die Lösung hiervon lautet

$$p = a Z_0 \left(\frac{2}{\beta} \sqrt{\frac{2q \cdot c_0}{h}} \cdot \omega \cdot e^{\frac{\beta}{2} x} \right) \cdot e^{j\omega t}. \quad (3)$$

Z_0 bedeutet dabei die Zylinderfunktion nullter Ordnung. Die örtliche Ausbuchtung der Basilarmembran wird in diesem Fall durch die Funktion

$$\xi = a c_0 \cdot e^{\beta x} \cdot Z_0 \left(\frac{2}{\beta} \sqrt{\frac{2q \cdot c_0}{h}} \cdot \omega \cdot e^{\frac{\beta}{2} x} \right) \cdot e^{j\omega t} \quad (4)$$

wiedergegeben. Ihren grundsätzlichen Verlauf für höhere Frequenzen zeigt Fig. 2. Die näherungsweise Be-

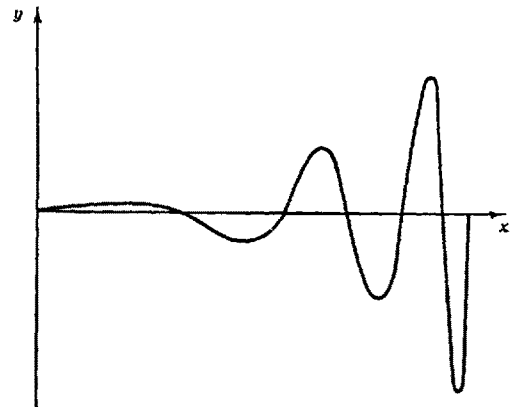


Fig. 2. Wellenbewegung der Basilarmembran ohne Berücksichtigung der Dämpfung.

¹ A. TURMARKIN, J. Laryng. u. Otol. 60, 337 (1945).

² W. TÜRK, Acust. Z. 5, 129 (1940).

³ S. STEVENS and H. DAVIS, Hearing, New York 1938.

⁴ J. A. REBOUL, J. Phys., 9. Ser. 7 (1938).

¹ G. von BÉKÉSY: Acta oto-laryng. 32, 60 (1944).