

3 Tage nach Beginn des Versuches waren die Tomatenschalen des Parallelversuches gelb. Dagegen war nach 3 Tagen in den streptomycinbehandelten Tomatenschnitten ein Übergang von Grün in Gelbrot noch kaum zu bemerken.

Bei mikroskopischer Vitalbeobachtung der Schnitte in 10%iger Zuckerlösung zeigte sich:

In den Wasserkontrollen: keine Cytolyse; fast alle Platten sind in gelborangefarbige Chromoplasten verwandelt worden.

Ohne Behandlung: keine Cytolyse; fast alle Platten gut erhalten, alle tragen deutlich den Charakter von Chloroplasten.

M. BRACCO und H. v. EULER

Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 10. Juli 1948.

Summary

(1) By precipitation with ammonium sulfate, streptomycin, or calcium salts, we obtained from the pulp of tomatoes a substance containing carotinoids. The behaviour of this substance was analogous to that of chloroplast-substance and to that of animal cytoplasmatic nucleoproteins. Like these it contains proteins, lipids, and very probably nucleic acids. We regard this substance as a *chromoplastine*.

(2) Experiments with slices of green tomatoes show that the changing over of the chlorophyll content into the carotinoid content is inhibited by the presence of streptomycin.

(3) Streptomycin inhibits the formation of chlorophyll in etiolated separated cabbage leaves, just as this drug inhibits the formation of chlorophyll in growing seeds.

(4) The development of anthocyanides is not influenced by streptomycin.

Purification of Arginase

A survey of the literature on arginase shows considerable divergence between the conclusions of different workers on almost all aspects of the subject. These variations are due mainly to the fact that none (with the exception of three or four of the 40 or 50 different procedures for the preparation and purification of arginase thus far published) gives a product even approximately pure. Most of the preparations used have contained from four to a very much greater number of enzymes, many of which undoubtedly interfered and rendered the conclusions uncertain¹. This is particularly unfortunate in view of the importance of the arginase-arginine relationship in the growth of tissues under normal and pathological conditions on which accurate quantitative data are badly needed. It is in connection with such studies, on which a report is now in preparation by A. VANNOTTI², NEUKOMM³, and the writer, that it was decided to publish in detail a purification procedure which has been developed by the writer over the last two years, fully recognizing of course that many improvements, and perhaps quite different procedures, are possible.

¹ S. EDLBACHER and S. SIMONS, *Z. physiol. Chem.* **167**, 76 (1927). – M. M. RICHARDS and L. HELLERMAN, *J. Biol. Chem.* **134**, 237 (1940). – M. MOHAMED and D. M. GREENBERG, *Arch. Biochem.* **8**, 349 (1945). – S. BACH, *J. Nature* **158**, 376 (1946). – C. B. THOMPSON, *Science* **104**, 576 (1946).

² Director of the Medical Policlinic, Lausanne.

³ Laboratoire du Centre anticancéreux romand, Lausanne.

The methods here described have given, at its best, a product which in the Tiselius apparatus shows two components of which active arginase constitutes about 80% and the other component is an inactive protein. There are also present traces of catalase and of riboflavin. The best yield obtained before drying is 65% of the arginase in the first crude extraction, and the activity of the final dried product when thoroughly reactivated is about 65,000 arginase units (AU) per gram¹. Attempts at crystallization have been abandoned, as a preliminary estimation of the amino acid content of the purified product indicates a composition similar to that of the non-crystallizable gelatin or elastin.

Procedure

A. Extract 1.0 kg fresh young Horse liver in 2.0 l/5% sodium acetate to which 30.8 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ has been added, and p_{H} adjusted to 7.0 with 1N NaOH, for 5 days at 5°–10° temperature. Filter and centrifuge; reject residue.

B. Add 1.0 l 0.12 M lead acetate, adjust p_{H} to 6.7, stand over night in refrigerator. Centrifuge, reject residue.

C. Add pure dry ammonium sulphate to 35% saturation; adjust p_{H} to 6.8; stand over night in refrigerator. Centrifuge; reject residue.

D. Add ammonium sulphate to bring to 75% saturation. Adjust p_{H} to 7.0. Stand over night. Centrifuge; reject supernatant. Dissolve precipitate in 150–200 cc 0.1 M phosphate buffer p_{H} 7.0. Stand over night. Centrifuge; reject precipitate.

E. Dialyse in distilled water adjusted to p_{H} 6.5–6.8 for three days in refrigerator. Centrifuge; reject precipitate. (Solution now contains about 3 g ammonium sulphate per l.)

F. Add ammonium sulphate until definite precipitate is obtained—usually about 22% saturation. Adjust p_{H} to 6.8. Centrifuge; reject precipitate.

G. Add ammonium sulphate to about 68% saturation, adjust p_{H} to 6.8. Stand over night. Centrifuge; reject supernatant. Dissolve precipitate in 275–300 cc phosphate buffer p_{H} 7. Stand over night. Centrifuge; reject residue.

H. Dialyse in distilled water adjusted to p_{H} 6.8 for three days in refrigerator. Centrifuge; reject precipitate. Adjust p_{H} to 6.8.

J. Add cobaltous chloride to give 4 mg Co^{++} per cc. Stand three hours at room temperature. In constant temperature bath at 63°, heat with constant stirring to 60°, maintain at that temperature for 5 minutes, cool rapidly. Centrifuge; reject precipitate. Adjust solution to p_{H} 6.8.

K. To remove the catalase, which is now the chief remaining impurity, add 0.2 M MnSO_4 (p_{H} 5.4) and 2% K_2HPO_4 adjusted with NaOH to p_{H} 9, in the following proportions:

Arginase solution	3 parts
MnSO_4	1 part
K_2HPO_4	3 parts

It is essential that (1) the p_{H} 's be rigorously as indicated; (2) that the MnSO_4 be added first with rapid stirring for not more than 15–20 seconds; (3) that the K_2HPO_4 be added at once and rapidly and the solution vigorously stirred for 5 minutes. Keep at 5°–10° until the suspension begins definitely to precipitate out; then centrifuge and reject precipitate. The solution should now be colourless, but will sometimes show a pink tinge from excess of cobalt, which should be removed by adjusting the p_{H} to 7.2 with 1.0 M NaOH added dropwise with constant stirring, followed by a final centrifugation.

If the clarified solution is slightly yellowish, it still contains traces of catalase and riboflavin, practically negligible. Should the colour be definitely yellow or tinged on brown, the excess impurities must be removed by repeating operations G, H and K.

Finally the solution may be reduced to a dry powder by lyophilizing after thorough dialysing out all salts. Unfortunately this thorough dialysis also removes an essential as yet unidentified coenzyme, and activity is restored only about 20% by the addition of manganese or cobalt.

The coenzyme may be obtained as follows: 500 cc of the product from operation B above is dialysed for 10 days in 1 l of distilled water without change of water. The dialysis water is then reduced by slow evaporation to 150–200 cc. One cc of this solution is sufficient to reactivate a solution of 1 g of the dried product a further 50%. The powder if kept thoroughly dry keeps its activity for at least a

¹ Laboratoire du Centre anticancéreux romand, Lausanne.

year at ordinary temperatures; but if allowed to get damp begins to deteriorate after 8 months¹.

The following Table is fairly representative of the results obtained from the above procedure (this extraction started with 1.5 kg fresh young Horse liver, passed through a moderately fine grinder):

Operation	Quantity cc	AU/cc	Total AU	% Yield
A	2,144	108	231,600	100
B	3,580	64	229,100	99
C	3,420	64	218,900	94.5
D	874	245	214,100	92.4
E	1,025	209	214,200	92.4
F	1,058	202	213,700	92.3
G	460	267	123,100	53.1
H	490	250	122,500	52.9
I	505	417	210,600	91
K*	1,960	76.6	150,100	64.8

* Including precipitation of excess cobalt.

Acknowledgements. The writer is indebted to Dr. D. M. GREENBERG, Department of Biochemistry, Medical School, University of California, for helpful suggestions, and to Dr. A. VANNOTTI, Polyclinique médicale universitaire, Lausanne, for the use of his laboratory and facilities without which this work could not have been completed.

C. B. THOMPSON²

Medical School, University of California, June 26, 1948.

Résumé

Nombreux sont les travaux qui traitent de la séparation et de la purification de l'arginase. Le présent travail décrit une méthode de purification qui permet d'obtenir une arginase active contenant des traces d'impuretés (80 % d'arginase active).

¹ Activity determined as by MOHAMED and GREENBERG, *supra*.

² Formerly Research Assistant at the Medical School, University of California.

Sur des pigments rouges des Levures

Les pigments rouges des Levures (en particulier ceux des *Torula* et espèces voisines) dont les propriétés chimiques ont été établies, appartiennent au groupe des caroténoïdes¹.

L'objet de la présente note est de décrire un groupe de pigments rouges très différent. La race de Levure qui forme ces pigments dérive d'un mutant isolé d'une lignée haploïde de *Saccharomyces cerevisiae*. En dehors de la pigmentation, elle est caractérisée par l'incapacité de proliférer en absence d'adénine ou d'hypoxanthine² dans le milieu de culture. En outre, les pigments ne se forment, dans nos conditions de culture, qu'en aérobiose et sont sujets à des variations quantitatives et qualitatives correspondant à des variations de couleur allant du rose pâle au brun foncé en passant par des teintes rouges intermédiaires.

Les pigments rouges extraits de cette Levure sont plus ou moins solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques. La plupart de ces pigments se trouvent dans la

Levure sous forme de sels; les pigments précipitent après acidification et se présentent généralement sous forme de flocons amorphes rouge foncé, très solubles dans les liquides alcalines aqueuses; les sels d'Ag et Pb de ces pigments acides sont très peu solubles dans l'eau.

L'hydrolyse acide (HCl 6N pendant 24 h à 100°) détruit la couleur rouge et libère plusieurs acides aminés. La chromatographie de partage sur papier, selon CONSDEN, GORDON et MARTIN¹, nous a permis d'identifier les acides aminés suivants (les proportions relatives étant indiquées approximativement par le nombre de +): acide glutamique + + + +, glycolle + + +, sérine + +, valine + +, leucine + +, acide aspartique +, alanine +, proline +². Ils s'agit donc de toute évidence de molécules composées d'un groupement prosthétique rouge attaché à une ou plusieurs chaînes polypeptidiques plus ou moins longues. La réduction rapide de ces pigments, à température ordinaire, par SO₂ ou H₂S, ainsi que l'allure de la courbe d'absorption semble indiquer la nature quinoïde du groupement prosthétique.

L'analyse élémentaire de ces pigments qui, malgré une purification poussée, sont restés amorphes, a donné les chiffres suivants: C 33,1 à 38,7 %, H 6,1 à 7,6 %, N 8,4 à 9,1 %, P 1,4 à 3,4 %; cendres 0,39 à 0,71 %.

Les spectres d'absorption de ces pigments, qui peuvent être différenciés d'après leurs solubilité dans l'alcool aqueux, présentent une bande située aux environs de 525 mμ (détermination au spectrophotomètre de BECKMAN).

Certains des caractères chimiques et physiques indiqués ci-dessus rapprochent ces substances des pigments rouges extraits du foie et se montrant actifs contre l'anémie pernicieuse (vitamine B₁₂ et substances apparentées) que RICKES et coll., ainsi que LESTER-SMITH ont récemment décrit³.

Des essais bactériologiques sur *Lactobacillus lactis*⁴ DORNER et des tests physiologiques sont en cours⁵.

B. EPHRUSSI et E. LEDERER

Institut de génétique du C. N. R. S. et Service de biochimie, Institut de biologie physico-chimique, Paris le 26 juillet 1948.

Note ajoutée le 30 juillet 1948. – LESTER SMITH (Nature 162, 144, du 24 juillet 1948) a rapporté récemment que la vitamine B₁₂ cristallisée contient, pour un poids moléculaire de 1500, un atome de cobalt et trois atomes de phosphore. Cette découverte a été faite simultanément par les chercheurs de Merck (RAHWAY). Nous avons trouvé que nos différentes fractions de pigments de Levure contiennent également du phosphore, mais pas de cobalt. Calculé pour un poids moléculaire moyen de 2000, nos pigments contiennent un ou deux atomes de phosphore, suivant le cas⁶.

B. EPHRUSSI et E. LEDERER

¹ R. CONSDEN, A. H. GORDON et A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944).

² Analyse de M. JUSTISZ.

³ E. L. RICKES, N. G. BRINK, F. R. KONIUSZY, T. R. WOOD et K. FOLKERS, Science 107, 396 (1948). – E. LESTER SMITH, Nature 161, 638 (1948).

⁴ M. S. SHORR, J. Biol. Chem. 169, 455 (1947); Science 107, 397 (1948).

⁵ Nous remercions le Professeur T. REICHSTEIN, Bâle, qui a bien voulu comparer quelques-unes de nos fractions avec des pigments extraits du foie.

⁶ Etant donné l'état amorphe de nos pigments, il n'est pas encore certain que les acides aminés décelés après hydrolyse fassent partie de ces pigments. La présence d'impuretés protéiques ou peptidiques n'est pas exclue.

¹ E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 197, 1694 (1933); Bull. Soc. Chim. biol. 20, 611 (1938). – H. FINK et E. ZENGER, Wschr. Brauerei 1934, N° 12. – CL. FROMAGEOT et J. L. TCHANG, Arch. Mikrobiol. 9, 424 et 434 (1938). – P. KARRER et J. RUTSCHMANN, Helv. chim. acta 26, 2109 (1943); 28, 795 (1945); 29, 355 (1946).

² E. TAVLITZKI, communication verbale.