

tests in one experiment are shown in Table I. Immediately after the 48-hour readings had been made, all groups were challenged, in exactly the same way, with virulent human tubercle bacilli injected in part subcutaneously, in part intracutaneously, in the region of the groin. The intracutaneous injections were made in order to facilitate observations of the possible occurrence of KOCH reactions, and these readings are also shown in Table I. It is apparent that at the time of infection, the B.C.G. immunized and the protein-wax treated animals showed very similar levels of tuberculous allergy, as judged by cutaneous reactivity to Old Tuberculin and to living virulent bacilli as well. Eight weeks after infection all the guinea pigs of the three groups were sacrificed for pathological examination. At this point the similarity between the two vaccinated groups ceased. The protein-wax sensitized group which had been in a class with the B.C.G. vaccinated in respect to allergic reactivity, is seen to be, in respect to resistance, in a class with the untreated infection controls. We have concluded from such experiments that the bacillary constituents which engender allergy are not the same as the bacillary factors which induce resistance to tuberculosis, and as a corollary, that tuberculous allergy and tuberculous resistance are not synonymous.

Zusammenfassung

Die drei grundsätzlichen Reaktionsweisen des Wirtes auf den Tuberkelbazillus, nämlich die Tuberkelbildung,

der allergische Zustand und die erworbene Resistenz, werden im Hinblick auf die chemischen Bestandteile des Tuberkelbazillus erörtert.

Die Zellveränderungen, die zur Tuberkelbildung führen, können durch das isolierte Phosphatid des Bazillus hervorgerufen werden. Der aktive Bestandteil dieses Stoffes ist die Phthiolsäure, mit der Formel $C_{26}H_{52}O_2$.

Der «verzögerte», durch den Tuberkelbazillus verursachte Allergietypus kann auch durch andere Infektionserreger erzeugt werden. Bei der Tuberkulose wird diese Wirtsreaktion durch ein bazilläres Antigen, ein Protein, bestimmt, welches zusammen mit einer aus dem Organismus extrahierten Fraktion aus «gereinigtem Wachs» wirkt. Der spezifische, in diesem Sinn aktive Bestandteil des Wachses scheint ein Lipopolysaccharid zu sein. Die Merkmale der «verzögerten» Allergie, die sie von der «anaphylaktischen» Überempfindlichkeit unterscheiden, werden beschrieben. Mit diesen Unterschieden läßt sich beweisen, dass die durch Tuberkelprotein und Wachs hervorgerufene Allergie mit derjenigen der Tuberkuloseinfektion identisch ist. Der Wachbestandteil des Bazillus kann von nicht tuberkulösen bazillären Antigenen dazu benützt werden, um analoge «verzögerte» Überempfindlichkeiten hervorzurufen.

Die erworbene Resistenz gegen den Tuberkelbazillus kann heutzutage keinem der bekannten chemischen Bestandteile des Bakteriums zugeschrieben werden. Es werden jedoch Beweise angeführt, daß die Resistenz nicht gleichbedeutend mit dem allergischen Zustand ist. Dieser kann durch Behandlung von Versuchstieren mit isoliertem Tuberkelprotein und Wachs hervorgerufen werden. Die auf diese Weise sensibilisierten Tiere zeigen aber keine erhöhte Immunität gegenüber virulenten Bazillen.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un Microorganisme

Mise en évidence des précurseurs

Les Champignons filamenteux, et particulièrement certaines Mucorinées contiennent des quantités élevées de caroténoïdes et se prêtent bien à l'étude de la biosynthèse de ces pigments. On ne sait que peu de chose à ce sujet.

En 1935, nous avons étudié les conditions de formation de ces pigments chez *Phycomyces Blakesleeana*¹. Le

β -carotène s'est révélé être le caroténoïde le plus abondant, sinon le seul; l'extrait de thalle manifeste une activité vitaminique A nette chez le rat carencé¹. KARRER et KRAUSE-VOITH confirment que le β -carotène est le caroténoïde essentiel de *Phycomyces*². D'ailleurs celui-ci a été obtenu à l'état cristallisé³. Récemment GARTON, GOODWIN et LIJINSKY⁴ apportent quelques

¹ W. H. SCHOPFER et A. JUNG, *id.* 120, 1093 (1935).

² P. KARRER et E. KRAUSE-VOITH, *Helv. chim. acta* 302, 31 (1947).

³ W. H. SCHOPFER et V. KOCHER, *Actes Soc. helv. sci. nat.* 320 (1936).

⁴ G. A. GARTON, T. W. GOODWIN, and W. LIJINSKY, *Biochem. J.* 46, no. 5, 35 (1950).

¹ W. H. SCHOPFER, *C. r. Soc. Biol. Paris* 118, 3 (1935).

données nouvelles relatives à la production des caroténoïdes chez *Phycomyces* cultivé sur milieu normal, en présence de glucide.

L'affirmation que le β -carotène est le seul caroténoïde de *Phycomyces* doit être corrigée. Nous venons de constater que la composition en caroténoïdes varie selon la souche et le milieu. La souche Z, sexe(-), contient 5 caroténoïdes décelables par adsorption sur Al_2O_3 . Cette question donnera lieu à un travail ultérieur.

Chez les microorganismes étudiés la production de caroténoïdes est parallèle à la croissance. Les facteurs inhibant la production de caroténoïdes affectent également le développement. Dans le but d'étudier de la manière la plus pratique la biosynthèse des caroténoïdes chez *Phycomyces*, nous avons constitué un milieu permettant un développement appréciable, mais empêchant complètement la production de caroténoïdes; le glucose y est remplacé par du lactate d'ammonium (milieu II).

I. Milieu habituel, carotinogène	II. Milieu non carotinogène
Glucose Asparagine KH_2PO_4 $MgSO_4$ Vitamine B_1	Lactate d'ammonium Lactate de magnésium KH_2PO_4 $MnSO_4$ Vitamine B_1

Sur le milieu II, le Champignon se développe, quoique faiblement. Ni le thalle submergé, ni les sporangio-phores et les jeunes sporanges ne contiennent de pigments extractibles par l'éther de pétrole. Il se forme également moins de pigment de membrane vert caractéristique de ce Champignon¹.

Le microorganisme accomplit ses métabolismes glucidique, lipidique et protidique à partir du lactate d'ammonium. L'examen cytologique et cytochimique du contenu des hyphes suggère une modification du métabolisme lipidique; sur milieu glucosé les graisses sont présentes sous forme de nombreux globules jaunes, contenant les caroténoïdes, souvent volumineux et remplissant les hyphes du thalle submergé; sur milieu à base de lactate d'ammonium, les globules sont plus petits, dispersés; on décèle dans les hyphes des grumeaux

amorphes ayant les caractéristiques des matières grasses.

En ajoutant diverses substances au milieu II, non carotinogène, nous pouvons facilement reconnaître celles qui sont favorables à la biosynthèse des caroténoïdes. Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus dans une série d'expériences effectuées avec la souche Z, sexe(-) (voir tableau).

- Les conclusions suivantes peuvent être tirées de ces expériences:
- 1° L'adjonction au milieu à base de lactate, d'acétate de sodium améliore le développement.
 - 2° Elle ne modifie pas notablement la lipogenèse considérée du point de vue quantitatif.
 - 3° L'acétate de sodium déclanche une forte carotino-génèse, comparable à celle produite en présence de glucose.
 - 4° Avant que la culture ait atteint son complet développement il y a destruction des caroténoïdes produits et le taux relatif diminue considérablement. Le taux maximum est atteint plus rapidement en présence de glucose (0,960 au 5^e jour) qu'en présence d'acétate de sodium (0,803 au 7^e jour).
 - 5° L'acétate peut être considéré comme un précur-seur des caroténoïdes de *Phycomyces*.

A part divers hydrates de carbone, les substances sui-vantes sont actives: le pyruvate de sodium, le butyrate de sodium à doses faibles, l'acide palmitique, l'acide tar-trique et l'acide citrique. La glycérine, l'acétone et l'ester de l'acide β -méthyl-crotonique sont inefficaces.

Une relation détaillée de l'activité d'un grand nombre de substances étudiées sera faite ailleurs. L'acétate de sodium est la plus active.

Il est intéressant de relever que l'acétate de sodium est un précurseur de l'isoprène dans les cultures de tissus de *Parthenium argentatum*¹ et que, d'autre part, l'oxydation permanganique en milieu alcalin du caro-tène livre 4 molécules d'acide acétique fournies par la chaîne isoprénique (KARRER).

Ces recherches ont été effectuées avec l'aide de la «Fritz Hoff-mann-La Roche Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» à laquelle nous exprimons notre gratitude.

W. H. SCHOPFER et E. C. GROB

Institut et jardin botaniques de l'Université de Berne, le 25 août 1950.

¹ W. H. SCHOPFER et S. BLUMER, *Protoplasma* 34, 524 (1940).

¹ J. BONNER et B. ARREGUIN, *Arch. Biochem.* 21, 109 (1949).

Age de la culture, en jours	4	5	6	7	8	9
1° Milieu II, lactate d'ammonium, sans adjonction						
Poids de la culture, mg	1,67	2,56	3,5	4,75	5,65	6,86
Lipides totaux, %*	—	—	—	9,25	9,3	6,6
Caroténoïdes	0	0	0	0	0	0
2° Milieu II avec 1% de glucose						
Poids de la culture, mg	42,4	93,4	111	117	120	121
Lipides totaux, %	13,5	20,1	22,9	21,6	22,1	19,8
Caroténoïdes**	0,406	0,960	0,706	0,610	0,228	0,575
3° Milieu II avec 1% d'acétate de sodium						
Poids de la culture, mg	5,9	16,2	19,3	29,9	20,8	22,6
Lipides totaux, %	6,7	5,2	6,8	7,6	6,0	6,0
Caroténoïdes	0	0,086	0,113	0,803	0,420	0,360

* Lipides totaux, extraits par le méthanol et l'éther de pétrole.

** Les chiffres indiquent le coefficient d'extinction fourni par un volume déterminé et constant d'un extrait de thalle sec, pulvérisé et homogénéisé; l'extrait contient les caroténoïdes de 836 mg secs de thalle dans de l'éther de pétrole (cuvette de 1 cm, filtre Ilford 601).

Summary

The biogenesis of the carotenoids in *Phycomyces* is studied as function of the medium. The β -carotene being the essential carotenoid of this fungi. A medium is prepared in which glucose and asparagine are replaced by ammonium lactate. In this medium there is a development but no formation of carotene. The presence of sodium acetate gives a normal carotenoid formation. The acetate reacts like a precursor of the carotene of *Phycomyces*.

Die Aminosäure-Zusammensetzung der Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen und der serologisch identischen spezifischen Substanz des *Bacillus mesentericus*

Schon im Jahre 1937 haben IVÁNOVICS und BRUCKNER^{1,2} gezeigt, daß die immunspezifische Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen und die serologisch identische spezifische Substanz verschiedener, der Mesentericus-Gruppe angehörender Sporenträger in chemisch einheitlicher Form abgetrennt werden kann. Diese Substanz stellt ein aus *d*-(-)-Glutaminsäureresten aufgebautes Polypeptid dar, welches in hoher Ausbeute zu reiner, als Naturprodukt nicht bekannter *d*-(-)-Glutaminsäure hydrolysiert werden konnte³. BRUCKNER und KOVÁCS OSKOLÁS³ haben später aus den Analysenwerten der Kapselsubstanz, sowie dem Ausbleiben der Biuretreaktion und dem Charakter der Strömungsdoppelbrechung der Kapselsubstanzlösung den Schluß gezogen, daß im Polypeptid die *d*-Glutaminsäurereste durch α -Peptidbindungen verkettet sind, stellenweise jedoch (etwa bis zu 13–15%) die γ -ständigen Carboxylgruppen nicht frei, sondern zu Pyrrolidonringen kondensiert vorliegen dürften. Gleichzeitig wurde auch die Vermutung ausgesprochen, daß das Polypeptid außer *d*-Glutaminsäure anscheinend keine anderen Aminosäuren enthält.

HANBY und RYDON⁴ schienen die letzterwähnten Untersuchungen übersehen zu haben, und werfen die Frage der Konstitution des nativen *d*-(-)-Glutaminsäure-Polypeptids erneut auf. Aufgrund ihrer Untersuchungen gelangen sie zu der Feststellung, daß in dem kettenförmigen Polypeptidmolekül γ -Bindungen tatsächlich vorkommen, doch führen sie dies nicht auf das Auftreten von Pyrrolidonringen zurück. Im kettenförmigen Polypeptidmolekül wurde die Gegenwart von γ -Bindungen neuerdings auch von anderer Seite bestätigt⁵.

BRUCKNER und seine Mitarbeiter² konnten bei ihren Untersuchungen auf verhältnismäßig einfachem präparativem Wege eine 86%ige Ausbeute an *d*-(-)-Glutaminsäure erzielen, während HANBY und RYDON⁴ mit Hilfe von analytischen Methoden nachgewiesen haben, daß $99,5 \pm 1,5\%$ des Gesamtstickstoffs der Kapselsubstanz in Form von Glutaminsäure vorliegt. Die bei-

den letzten Autoren untersuchten das acetylierte Hydrolysat der Kapselsubstanz auf fremde Bestandteile durch Verteilungs-Chromatographie an einer Silicagel-Kolonne. Es ließ sich hierbei die Gegenwart einer ganzen Reihe von Aminosäuren ausschließen. Etwaiges Glycin und Asparaginsäure sind jedoch bei dieser Untersuchungsmethode nicht nachweisbar. Ich habe daher zwecks Feststellung der genauen qualitativen Aminosäure-Zusammensetzung der Kapselsubstanz die schonendere zweidimensionale Papierchromatographie¹ verwendet, die den Nachweis sogar von Spuren fremder Aminosäuren ermöglicht. Mein Verfahren war folgendes:

Von im Vakuum getrockneter Kapselsubstanz wurden 63,5 mg mit 1 cm³ 2 *n* HCl in einem Schießrohr 5 Stunden lang auf 120° erhitzt, dann die Salzsäure in der üblichen Weise in Vakuum vertrieben und der Rest auf 2,0 cm³ verdünnt. Ungefähr 0,004 cm³ dieser Lösung wurde auf einem «Schleicher & Schüll Nr. 604»-Papier in der einen Richtung mit Phenol-Wasser System (+ 0,1% NH₃, KCN und Cupron), in der anderen mit Butanol-Wasser-Eisessig System aufsteigend chromatographiert. Die Lösungsmittelfront legte in beiden Richtungen eine Strecke von je 25 cm zurück. Nach dem Trocknen und Färben mit Ninhydrin erschien auf dem Chromatogramm nur ein einziger runder Fleck, der sich mit Glutaminsäure identifizieren ließ. Die Gegenwart von Pyrrolidoncarbonsäure ließ sich nicht nachweisen². Da jedoch während der Säure Hydrolyse eine Zyklisierung der Glutaminsäure, wie auch das Öffnen ursprünglich etwa vorhandener Pyrrolidonringe nicht von vornherein ausgeschlossen bleibt, erlaubt die verwendete Methode keine Aussage bezüglich der Pyrrolidoncarbonsäure im Polypeptid. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann auf Grund des erzielten Ergebnisses, in voller Übereinstimmung mit BRUCKNER und seinen Mitarbeitern³, festgestellt werden, daß die Kapselsubstanz ein vollständig aus Glutaminsäure-Bausteinen bestehendes Polypeptid ist.

Ich möchte Herrn Prof. BRUCKNER für sein Entgegenkommen, sowie Herrn Prof. IVÁNOVICS für die zur Verfügung gestellte Kapselsubstanz auch an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

G. PONGOR

Organisch-chemisches Institut der Universität Budapest, den 16. Mai 1950.

Summary

The capsular substance of *Bac. anthrax* and the serologically identical specific substance produced by *Bac. mesentericus* were investigated by two-dimensional paper-chromatography of the hydrolysate. The earlier statement^{3,4} that this substance is a polypeptide composed exclusively of *d*-glutamic acid units was fully confirmed.

¹ G. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, Naturwissenschaften 25, 250 (1937); Z. Immunitätsforschung 90, 304; 91, 175 (1937); 93, 119 (1938); Z. phys. Chem. 247, 281 (1937). – V. BRUCKNER, G. IVÁNOVICS und M. KOVÁCS OSKOLÁS, Magyar Chem. Folyóirat 45, 131 (1939); vgl. Chem. Zentr. 1, 3280 (1940) und Chem. Abstr. 34, 3766 (1940).

² G. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, Z. phys. Chem. 247, 281 (1937). – V. BRUCKNER, G. IVÁNOVICS und M. KOVÁCS OSKOLÁS, Magyar Chem. Folyóirat 45, 131 (1939); vgl. Chem. Zentr. 1, 3280 (1940) und Chem. Abstr. 34, 3766 (1940).

³ V. BRUCKNER und M. KOVÁCS OSKOLÁS, Acta Univ. Szegediensis (Chem. et Phys.) 1, 144 (1943); Chem. Abstr. 41, 7423f (1947).

⁴ W. E. HANBY und H. N. RYDON, Bioch. J. 40, 297 (1946).

⁵ F. HAUROWITZ und F. BURSA, Bioch. J. 44, 509 (1949).

¹ Vgl. A. J. WOJWOD, J. Gen. Bacteriology 3, 312 (1949).

² Vgl. C. E. DENT, Bioch. J. 43, 178 (1948). – J. AWAPARA, J. Biol. Chem. 178, 113 (1949).

³ G. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, Naturwissenschaften 25, 250 (1937); Z. Immunitätsforschung 90, 304; 91, 175 (1937); 93, 119 (1938); Z. phys. Chem. 247, 281 (1937). – V. BRUCKNER, G. IVÁNOVICS und M. KOVÁCS OSKOLÁS, Magyar Chem. Folyóirat 45, 131 (1939); vgl. Chem. Zentr. 1, 3280 (1940) und Chem. Abstr. 34, 3766 (1940). – V. BRUCKNER und G. KOVÁCS OSKOLÁS, Acta Univ. Szegediensis (Chem. et Phys.) 1, 144 (1943); Chem. Abstr. 41, 7423f (1947).

⁴ W. E. HANBY und H. N. RYDON, Bioch. J. 40, 297 (1946).