

On observe des fibrilles d'un diamètre constant de l'ordre de 200 Å. Celles-ci sont souvent juxtaposées l'une par rapport à l'autre et forment ainsi des rubans qui peuvent être tordus. Les fibrilles ont une longueur indéterminée et ne sont pas anastomosées, elles ne peuvent pas être cylindriques mais sont aplaties (haut de la figure 2). Lorsque la fibre est à plat et que l'axe du filament se trouve dans la direction de l'ombrage, une striation d'une période d'environ 200 Å semble apparaître. Une telle striation a déjà été observée sur les fibrilles de coton¹. Les images qu'on obtient sont dans une certaine mesure semblables à celles fournies par la cellulose de *A. xylinum*.

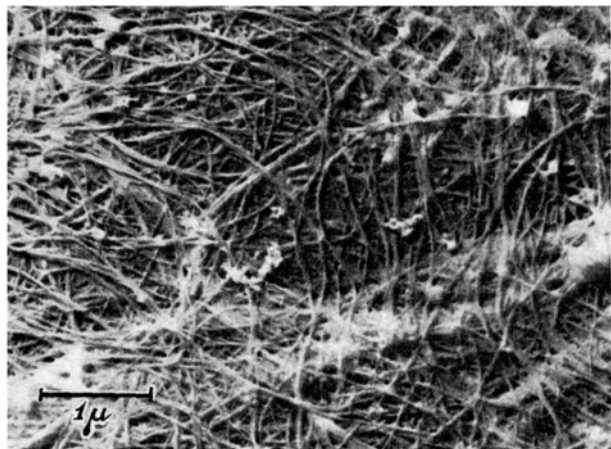


Fig. 1.

La tunicine rappelle d'ailleurs la cellulose bactérienne, soit par son aspect microscopique, soit par sa teneur en eau. Enfin, d'après l'analyse aux rayons X, les fibrilles de ces deux sortes de cellulose s'orientent comme des rubans lorsqu'on les étire en film, les plans 101 se trouvant dans le plan du film².

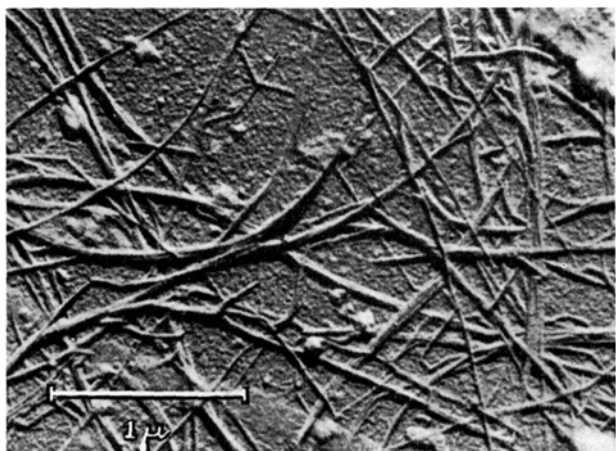


Fig. 2.

Note ajoutée à l'épreuve: Dans une publication qui a paru après l'envoi de ce travail, FREY-WYSSLING et FREY³ obtiennent des résultats identiques aux nôtres,

mais ils ne décrivent pas la forme aplatie des fibrilles alors qu'elle apparaît clairement sur nos micrographies.

KURT H. MEYER, L. HUBER et E. KELLENBERGER

Laboratoires de Chimie organique et inorganique et Institut de Physique, Laboratoire de microscopie électronique, Université de Genève, le 20 mars 1951.

Summary

Electron micrographs of animal cellulose (tunicin of *Phallusia mammillata*) show continuous fibrils of 200 Å width. The fibrils are flattened and seem to exhibit a longitudinal periodicity of 200 Å. Anastomoses have not been observed.

Idrolisi della succinilcolina da colinesterasi: Utilizzazione simultanea della cromatografia su carta e della tecnica di Warburg

È stato dimostrato che la succinilcolina ha una intensa azione curarica di breve durata, che è potenziata, non antagonizzata dall'eserina¹. Questo suggerisce che è distrutta in vivo dalla colinesterasi, così come avviene *in vitro*². È quindi interessante conoscere se l'idrolisi dei due legami esterici avviene contemporaneamente o se si forma prima la succinilmonocolina.

Uno svantaggio del metodo di WARBURG, che viene abitualmente adoperato per lo studio dell'attività colinesterasica, è che i prodotti della reazione possono essere identificati solo indirettamente. Ci è sembrato possibile che l'uso della cromatografia su carta in unione alla tecnica di WARBURG possa identificare direttamente i prodotti dell'idrolisi della succinilcolina.

L'enzima era la colinesterasi del siero di cavallo parzialmente purificata col metodo di STRELITZ³ (2° grado). Gli esperimenti al WARBURG erano eseguiti a 37°, e a pH 7 con l'uso di 10% CO_2 + 90% N_2 in equilibrio con 0,2% di $NaHCO_3$. I cromatogrammi erano ottenuti su carta da filtro Whatman N° 4 (cromatografia ascendente). Le macchie venivano visualizzate con il metodo allo iodio⁴ e con un nuovo metodo che fa uso di una micro-reazione proposta da FEIGL⁵ per gli esteri carbossilici. Esso consiste nello spruzzare la carta con idrossilammina alcalina (volumi eguali di cloridrato di idrossilammina 14% e NaOH 14%) e successivamente con cloruro ferrico acido ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10% in HCl 3,5 N). Gli esteri acquistano un color rosso porpora non stabile su fondo giallo. Il solvente più soddisfacente fu trovato essere isopropanolo-acqua-acido formico (40:10:1); si è potuto così avere una buona separazione tra la succinildicolina ($R_F = 0,3$), e la succinilmonocolina ($R_F = 0,63$), ma non tra la succinilmonocolina e la colina ($R_F = 0,60$); queste due ultime sostanze possono tuttavia essere differenziate perchè solo la succinilmonocolina reagisce col reattivo carbossilico. In un'esperienza, la succinildicolina (0,02 M), fu incubata per 2 ore con l'enzima con la produzione di 550 μl di CO_2 . Per fermare la reazione fu aggiunta eserina (concentrazione finale: 1/25 000). La soluzione (6 μl) fu aggiunta sulla carta con una micropipetta; come controlli furono utilizzati: una eguale soluzione alla quale

¹ D. BOVET, F. BOVET-NITTI, S. GUARINO, V. G. LONGO e M. MAROTTA, Rend. Ist. Sup. Sanità (Roma) 12, 106 (1949). – F. BOVET-NITTI, Rend. Ist. Sup. Sanità (Roma) 12, 138 (1949).

² D. GLICK, J. Biol. Chem. 137, 357 (1941).

³ F. STRELITZ, Biochem. J. 38, 86 (1944).

⁴ G. BRANTE, Nature 163, 651 (1949). – G. B. MARINI-BETTOLO-MARCONI e S. GUARINO, Exper. 6, 309 (1950).

⁵ F. FEIGL, Spot Tests (3rd Edit. Elsevier, New York, 1947).

¹ W. G. KINSINGER et C. W. HOCK, Ind. Eng. Chem. 40, 1711 (1948).

² H. MARK et G. v. SUSICH, Z. physik. Chem. [B] 4, 431 (1929).

³ A. FREY-WYSSLING et R. FREY, Protoplasma 39, 656 (1950).

però l'eserina era stata aggiunta al tempo zero, ed un'altra senza l'enzima.

La figura mostra i risultati dello sviluppo del cromatogramma. Si vede che una macchia corrispondente all'estere monocolinico appare solo nella soluzione nella quale la succinildicolina è stata incubata con l'enzima per 2 ore (striscia 4); corrispondentemente la macchia dell'estere dicolinico è più piccola. Nell'assenza dell'enzima (striscia 2), non vi è l'estere monocolinico, e la presenza di proteina e di eserina (striscia 3) non interferisce con l'identificazione. La presenza nella macchia più veloce dell'estere monocolinico è stata confermata con la positività della reazione esterica rosso-porpora.

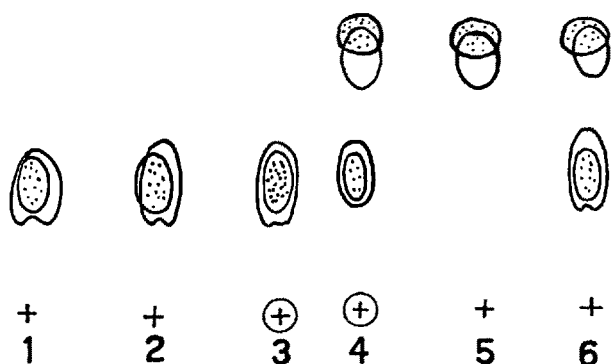


Fig. 1. – Identificazione della succinildicolina e della succinilmonocolina con cromatografia ascendente; apparizione della succinilmonocolina nel corso dell'idrolisi da colinesterasi del siero della succinildicolina; 1. Succinildicolina (60 µg); 2. Succinildicolina (60 µg) dopo 120' di incubazione a 37° senza enzima; 3. Succinildicolina con enzima in presenza di eserina; 4. Succinildicolina con enzima; l'eserina viene aggiunta alla fine dell'incubazione (120' a 37°); 5. Succinilmonocolina (30 µg); 6. Succinilmonocolina e succinildicolina (30 µg). Cerchi semplici, colorazione con I_2 ; cerchi punteggiati, colorazione con NH_2OH e $FeCl_3$.

Altre esperienze in cui si variava la concentrazione dell'enzima e il tempo di incubazione mostrarono una correlazione qualitativa tra la superficie delle macchie e le quantità sviluppate di CO_2 .

Poichè anche l'estere monocolinico è idrolizzato dalla colinesterasi, quantunque più lentamente (30% dell'estere dicolinico), è possibile concludere che alla fine tutti e due i legami della succinildicolina sono idrolizzati.

Da queste esperienze risulta quindi che monosuccinilcolina si forma dall'idrolisi colinesterasica della succinildicolina, e che l'applicazione dei metodi cromatografici in unione agli abituali metodi può essere generalmente utile.

Ringrazio il Professore D. BOVER per avermi suggerito il problema e per l'ospitalità che ha voluto offrirmi nel Laboratorio di Chimica Terapeutica.

V. P. WHITTAKER

Laboratorio di Chimica Terapeutica dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, il 15 ottobre, 1950.

Summary

Succinyl monocholine ester has been identified by paper chromatography as an intermediate in the breakdown of succinylcholine in the presence of horse serum cholinesterase.

Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un microorganisme. Production de caroténoïdes marqués par *Phycomyces blakesleeanus*

Phycomyces blakesleeanus est l'organisme de choix pour l'étude de la biosynthèse des caroténoïdes, et particulièrement de celle du carotène β , comme nous l'avons montré dès 1935¹. GARTON, GOODWIN et LIJINSKY (1951)², dans un travail récent, font une étude détaillée de la biogenèse des caroténoïdes par ce microorganisme.

En modifiant le milieu synthétique (avec vitamine B_1) de telle manière que les sources de carbone (glucose) et d'azote (asparagine) soient remplacées par du lactate de NH_4 , nous obtenons des thalles blancs, privés de caroténoïdes; en ajoutant à ce milieu nouveau de l'acétate de sodium, le développement s'améliore et la biosynthèse des caroténoïdes se produit. Ce fait nous a incités à considérer l'acétate comme un précurseur des caroténoïdes de *Phycomyces*³.

La même observation a été faite avec une souche de *Rhodotorula rubra* et surtout avec *Mucor hiemalis*, qui est un excellent producteur de caroténoïdes (voir tableau suivant):

Milieu minéral avec	Caroténoïdes totaux*
Glucose + asparagine	1,78
Lactate NH_4 + glucose	1,50
Lactate NH_4 + acétate	0,416
Lactate NH_4 seul	0

* Les chiffres expriment les coefficients d'extinction fournis par des solutions de caroténoïdes obtenus dans des conditions déterminées (voir 3).

L'action de l'acétate n'est pas limitée à un organisme. Nous ne savons pas encore jusqu'à quel point elle pourra être généralisée. Surtout, l'action de l'acétate n'exclut pas la possibilité que d'autres précurseurs puissent être mis en évidence chez d'autres organismes. Le fait essentiel est que l'acétate fonctionne comme précurseur primitif d'une biosynthèse complexe au sujet de laquelle nous ne savons que fort peu de chose.

Cependant, l'hypothèse très vraisemblable que nous avons émise ne sera vérifiée que s'il est démontré que le carbone de l'acétate participe directement à la constitution de la molécule de carotène. Ce but peut être atteint en utilisant un acétate marqué. Des expériences ont été effectuées avec *Phycomyces blakesleeanus* (souche Ba^+). L'acétate est marqué grâce au ^{14}C du groupe méthyle ou du groupe carboxyle.

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

² G. A. GARTON, T. W. GOODWIN et W. LIJINSKY, Biochem. J. 48, 154 (1951).

³ W. H. SCHOPFER et E. C. GROB, Exper. 6, 419 (1950).

La composition exacte des milieux est la suivante: a) milieu carotinogène, glucose 30 g, asparagine 1 g, KH_2PO_4 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g, aneurine 20 γ pour 1 l d'eau distillée; b) milieu non carotinogène, lactate de NH_4 2 g, lactate de Mg 2 g, KH_2PO_4 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g, $MnSO_4$ 0,1 g, aneurine 20 γ pour 1 l d'eau distillée. L'adjonction de 10 g par litre d'acétate de sodium rend ce milieu carotinogène. P. KARRER et U. SOLMSEN (Helv. chim. acta, 19, 3 [1936]) ont d'ailleurs montré que des *Rhodovibrio*, cultivés sur asparagine et acide malique, forment leurs caroténoïdes à partir de ces sources de carbone; ils admettent la voie suivante: acide succinique → acide fumarique → acide malique → acide oxalacétique → aldéhyde acétique; à partir de ce dernier, par l'intermédiaire possible de l'aldéhyde β -méthyl-crotonique, l'organisme pourrait synthétiser ses caroténoïdes.