

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.

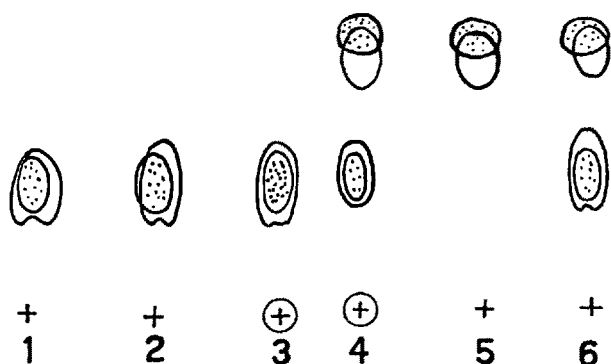


Fig. 1. – Identificazione della succinildicolina e della succinilmonocolina con cromatografia ascendente; apparizione della succinilmonocolina nel corso dell'idrolisi da colinesterasi del siero della succinildicolina; 1. Succinildicolina (60 µg); 2. Succinildicolina (60 µg) dopo 120' di incubazione a 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  $\beta$ , comme nous l'avons montré dès 1935<sup>1</sup>. GARTON, GOODWIN et LIJINSKY (1951)<sup>2</sup>, 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*<sup>3</sup>.

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.

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

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

<sup>3</sup> 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  $\beta$ -méthyl-crotonique, l'organisme pourrait synthétiser ses caroténoïdes.

Dans une première série d'expériences, le milieu contient, à part l'acétate normal, 0,1 mC correspondant à 8,2 mg d'acétate marqué ( $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ ) pour 3750 cm<sup>3</sup> de milieu au lactate répartis en 150 culture de 25 cm<sup>3</sup> chacune. Les thalles sont récoltés au moment de la plus forte production de caroténoïdes. Nous obtenons 5,2843 g de matière sèche; les thalles sont placés dans du méthanol, séchés dans le vide et pulvérisés. La poudre de thalle est épuisée par l'éther de pétrole. Les caroténoïdes sont précipités par l'iode selon la méthode de KARRER et WALKER<sup>1</sup>. Le précipité est lavé avec de l'acétone, et les caroténoïdes sont régénérés par le thiosulfate de sodium selon P. KARRER, K. SCHÖPP et R. MORF<sup>2</sup>. Un volume d'éther de pétrole est ajouté à la solution acétonique; l'acétone est éliminé par agitation avec de l'eau. La solution dans l'éther de pétrole est agitée plusieurs fois avec du méthanol à 90%. Une chromatographie sur  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nous permet de séparer le déhydro- $\beta$ -carotène (iso-carotène) formé par la décomposition du produit d'addition avec l'iode<sup>3</sup>. La solution du caroténoïde est concentrée dans le vide; nous obtenons 3,4 mg du produit qui est immédiatement soumis à l'examen.

L'activité des noyaux du  $^{14}\text{C}$  contribuant à la genèse du caroténoïde est mesurée à l'aide d'un compteur de Geiger-Müller de grand diamètre et à fenêtre de mica très mince. Le caroténoïde est placé sur une petite plaque de laiton sans bord (diamètre 2,2 cm) absolument plane et polie, en couche très mince et homogène (0,5 mg par cm<sup>2</sup>) de manière à réduire le plus possible la self-absorption des rayons  $\beta$  très mous du  $^{14}\text{C}$ .

La détermination de l'activité absolue se fait en tenant compte, entre autre, du facteur de «backscattering» que nous avons déterminé pour le système laiton- $^{14}\text{C}$ ; elle nous a permis de calculer la proportion dans laquelle les atomes de carbone de l'acétate participent à la biosynthèse du caroténoïde. Nous trouvons que 25%, assez exactement, des atomes de carbone du caroténoïde proviennent du groupe méthyle; la répétition de l'expérience, effectuée avec une dose différente d'acétate de sodium, fournit des résultats concordants; l'expérience effectuée avec  $\text{CH}_3^{14}\text{COONa}$  atteste que 50% des atomes de carbone du caroténoïde proviennent du groupe carboxyle; le reste des atomes marqués est réparti entre les lipides et le milieu restant.

Ainsi se trouve confirmée la voie nouvelle de biosynthèse du  $\beta$ -carotène par *Phycomyces* que nous avons indiqué sur la base de nos premières expériences. La méthode à l'acétate est susceptible d'être généralisée et nous permettra d'étudier plus exactement le métabolisme et la biosynthèse des caroténoïdes chez les microorganismes et les plantes supérieures. Les recherches continuent à ce sujet.

La méthode de préparation utilisée nous fournit du déhydro- $\beta$ -carotène dont la constitution a été établie par P. KARRER et G. SCHWAB<sup>4</sup>. En remplaçant la précipitation par l'iode par une autre méthode nous pourrions obtenir, marqué, le  $\beta$ -carotène si abondant chez *Phycomyces*.

Nous remercions le Dr. M. BEIN pour son aide dans l'exécution des expériences.

<sup>1</sup> P. KARRER et O. WALKER, *Helv. chim. acta* 17, 43 (1934).

<sup>2</sup> P. KARRER, K. SCHÖPP et R. MORF, *Helv. chim. acta* 15, 1158 (1932).

<sup>3</sup> R. KUHN et E. LEDERER, *Naturwiss.* 19, 306 (1931); *Ber. dtsch. Chem. Ges.* 65, 639 (1932). – P. KARRER, K. SCHÖPP et R. MORF, *Helv. chim. acta* 15, 1158 (1932).

<sup>4</sup> P. KARRER et G. SCHWAB, *Helv. chim. acta* 23, 578 (1940).

Ces recherches sont effectuées avec l'appui de la «Fritz-Hoffmann-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz», à laquelle nous exprimons notre gratitude.

E. C. GROB, G. G. PORETTI, A. VON MURALT et W. H. SCHÖPPER.

Institut de botanique de l'Université et Institut Th. Kocher, Berne, le 19 avril 1951.

### Zusammenfassung

Unter Verwendung eines speziellen Milieus wurde gezeigt, daß bei *Phycomyces* Na-Azetat die Vorstufe des  $\beta$ -Karotins darstellt. Durch Verwendung von markiertem Azetat ( $^{14}\text{CH}_3\cdot\text{COONa}$  und  $\text{CH}_3\cdot^{14}\text{COONa}$ ) wurde bewiesen, daß 25% des Gesamtkohlenstoffes des Karotins aus der  $\text{CH}_3$ -Gruppe und 50% aus der  $\text{COOH}$ -Gruppe stammen.

### L'isolation de microbes cérolytiques

D'après HAUPT<sup>1</sup> et SCHWARTZ<sup>2</sup>, et contrairement à GLASGOW<sup>3</sup>, l'hydrolyse des cires effectuée par divers homoptères est due à la présence de symbiotes libres ou localisés dans des mycétomes. En cultivant des symbiotes de Tinnéides (*Gall. mellon.*, *Gall. cerean.*, *Gall. soc. alba*, *Achroia gr.*) ainsi que *Dermestes lard.* l'un de nous a déjà pu isoler une cérase *in vitro*<sup>4</sup>. De semblables résultats furent publiés par FLORKIN *et al.*<sup>5</sup>. Dans la présente communication des méthodes d'isolement de microbes cérolytiques sont décrites. Deux milieux solides à base de cire de Chine ont été préparés. La cire de Chine provenant de *Coccus ceriferus* se compose de cérylcérotate ( $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{O}\cdot\text{OC}_{27}\text{H}_{53}$ ) pur<sup>6</sup>. Deux émulseurs différents ont servi à faciliter la préparation de ces milieux dont voici la formule:

1° Cire de Chine . . . . .	15,0 g
Teinture de lacmus . . . . .	8,0
Xylidine . . . . .	30,0
2° $\alpha$ -diéthylamino- $\beta$ -oxypropylamine <sup>7</sup> (émulseur) . . . . .	1,0
3° $\text{CaCl}_2$ . . . . .	0,05
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,06
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,001 (lotion mère)
Ferro-ascorbate . . . . .	0,003
Peptone W . . . . .	2,0
Agar-agar . . . . .	6,0
Eau distillée <i>ad</i> . . . . .	120,0

Après tyndallisation, les milieux chauffés à 80°C passent trois fois dans l'appareil d'émulsification (d'après LIESEGANG<sup>8</sup>) et on remplit enfin les boîtes de Petri et les bouteilles de Roux qu'on laisse refroidir. Le milieu est solide, transparent et de couleur violette.

Le deuxième milieu est en principe identique au premier, sauf qu'il contient un autre émulseur.

En voici la composition II:

1° Cire de Chine . . . . .	10,0 g
Teinture de lacmus . . . . .	5,0
Chloroforme . . . . .	20,0

<sup>1</sup> H. HAUPT, *Z. wiss. Insekten biol.* 12, 327 (1916).

<sup>2</sup> W. SCHWARTZ, *Biol. Zbl.* 44, 265 (1924).

<sup>3</sup> D. GLASGOW, *Biol. Bull.* 26, 811 (1914).

<sup>4</sup> M. MUFTIC, *Zbor Lijec. Hrv. reg.* 32, 496 (1946).

<sup>5</sup> F. LOZET et M. FLORKIN, *Exper.* 5, 403 (1949). – H. SARLET et M. FLORKIN, *Exper.* 5, 404 (1949).

<sup>6</sup> M. GASCARD, *C. r. hebdom. S. Acad. sc.* 170, 78 (1920).

<sup>7</sup> D. R. P. 687 224 (1929), I. G. Farbenindustrie.

<sup>8</sup> R. E. LIESEGANG, *Kolloidchemische Technologie* (1932), p. 619.