

molecular yields. In the experiments with pentoses labelled in C-1, all radioactive atoms were found in the methyl carbon of acetic acid and not in the carbons of lactic acid. This result proves that the methyl- and carboxyl-groups of acetic acid derive respectively from carbons 1 and 2 of arabinose or xylose. According to the authors mentioned above¹, the conversion of carbons 1 and 2 of pentoses into methyl- and carboxyl-groups respectively, suggests that a ketopentose or a similar phosphorylated derivative is formed as an intermediate.

If the fission occurs between carbons 2 and 3, the intermediate products should be glycol- and glyceraldehydes.

From bacterial cell-free preparations, RACKER² has found that triosephosphates are intermediates in the breakdown of pentose-5-phosphate, and this author was able to accomplish the condensation of triosephosphates with glycolaldehyde in the presence of aldolase of rabbit muscle.

The synthesis of ribose-5-phosphate was obtained by MARMUR and SCHLENK³ from glycolaldehydephosphate and fructose 1-6-diphosphate as source of triose.

The problem of the first split of pentoses has been studied by us using phenylhydrazine oxalate (= PO) as trapping agent in fermentations of xylose and arabinose with living cells of *Clostridium acetobutylicum*. In our experiments we were able to fix triosephosphates and pyruvic acid, but we were unable to identify glycolaldehyde as phenylhydrazone⁴ or glyoxal-osazone. We cannot, therefore, definitely assert whether glycolaldehyde is or is not an intermediate product in this fermentation, or whether this product is, in some particular form, hardly recognisable or detectable in the midst of oily products in the ether extracts of the medium.

The fixation of trioses and pyruvic acid as yet not isolated from bacterial fermentations of pentoses by living cells, is in agreement with the hypothesis that the C-3 moiety of pentoses is fermented via the normal way of hexoses. It is also supported by the fixation of the same intermediates from fermentations of glucose⁵ and by the isolation of phosphoglyceric acid from fermentation of arabinose by dried cells of *Propionibacterium pentosaceum*⁶.

Acetaldehyde was not trapped either in fermentations of glucose or in fermentations of pentoses, and therefore it is most probable that this product is not an intermediate in butyl alcohol fermentation.

Experimental Results

The preparation of experiment was the same as in a preceding paper²: *Clostridium acetobutylicum* was grown in 2500 ml of MCDANIEL's medium containing 2% of glucose and 50 ml of growth factors (yeast and liver autolysate). After 12 hours of incubation, the cells were harvested by means of a Sharples centrifuge, washed and immediately suspended in 1000 ml of the same medium at 1% of 1-arabinose or *d*-xylose; arabinose is

shown to be better. The medium was made anaerobic by sweeping out the air with CO₂. The PO salt was added in two hours in three portions of 0.4 g each dissolved in 50 ml of distilled water containing 0.2 g of Na₂HPO₄. After 12–15 hours incubation, the medium was centrifuged and the clear liquid analysed for fixed products according to the preceding papers¹.

Triosephosphates were converted into methylglyoxal-2,4-dinitrophenylhydrazone:

m. p.	Calculated N %	Found
298°	25.93	25.85

Amount produced: 0.1–0.15 g per mille.

Pyruvic acid was isolated as phenylhydrazone by continuous ether extraction of the medium concentrated 1:3:

m. p.	Calculated N %	Found
188°	15.73	15.87

Amount produced: 0.1–0.2 g per mille.

Acetaldehyde: no acetaldehyde was found in the distillate from the medium of pyruvic acid added for freeing acetaldehyde from phenylhydrazine².

The author's thanks are due to S. A. Distillerie Agricole di Tresigallo for their support of this work.

V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and M. A. TISELLI

Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Pavia, August 17, 1951.

Riassunto

Da fermentazioni dello xilosio e dell'arabinosio con cellule vive di *Clostridium acetobutylicum* è stato possibile isolare i triosofosfati e l'acido piruvico. Il risultato depone a favore dell'ipotesi che la metà a C-3 dei pentosi venga demolita secondo lo schema di Meyerhof.

¹ V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. F. BETTINETTI, Arch. Biochem. 29, 291 (1950).—V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. C. BUSSI, Naturwiss. 38, 236 (1951).

² Since this paper has been submitted for publication, a work of R. KAUSHAL, P. JOWETT, and T. K. WALKER, Nature 167, 949 (1951) on the isolation of glycolaldehyde in the fermentation of pentoses by *Acetobacter acetigenum* is appeared.

Utilisation du citrate par *Escherichia coli*

Escherichia coli est généralement considéré comme une bactérie ne pouvant utiliser le citrate comme source d'énergie. Cette propriété sert d'ailleurs de test pour la différenciation des bactéries coliformes.

Tout récemment, VAUGHN¹ et ses collaborateurs ont montré que *Escherichia coli* peut cependant utiliser le citrate pour sa croissance à condition d'ajouter au milieu de culture un autre substrat (glucose, fructose, peptone, etc.).

Il était intéressant de rechercher si *Escherichia coli* cultivé dans ces conditions pouvait acquérir la faculté d'utiliser ensuite le citrate, sans autre source de carbone pour la respiration et la fermentation.

Nos expériences ont été faites avec des bactéries non proliférantes: *Escherichia coli* (souche M) est cultivé en

¹ D. A. RAPPOPORT, H. A. BARKER, and W. Z. ASSID, Arch. Biochem. Biophys. 31, 326 (1951).—J. O. LAMPEN, H. GEST, and J. C. SOWDEN, J. Bact. 61, 97 (1951).

² E. RACKER, Federation Proc. 7, 180 (1948).

³ J. MARMUR and F. SCHLENK, Arch. Biochem. Biophys. 31, 154 (1951).

⁴ H. O. L. FISCHER and C. TAUBE, Ber. Dtsch. chem. Ges. 59, 851 (1926).

⁵ V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. F. BETTINETTI, Arch. Biochem. 29, 291 (1950).

⁶ H. A. BARKER and F. LIPMANN, J. Biol. Chem. 179, 247 (1949).

¹ R. H. VAUGHN, J. T. OSBORN, G. T. WEDDING, J. TABACNIK, C. G. BEISEL et T. BRAXTON, J. Bacteriol. 60, 119 (1950).

Tableau I

Chaque cupule de Warburg contient: 0,5 cm³ de substrat (citrate et α -cétooglutarate M/400, succinate M/60, pyruvate M/30 concentration finale); 1 cm³ de suspension bactérienne et complété à 2,5 cm³ avec du tampon phosphate M/15 à pH 6,8. 0,2 cm³ de NaOH à 20% dans le logement central pour absorber le CO₂. Le substrat est ajouté après 10 min d'équilibration à la température de 37°C. Le QO₂ est calculé pour les dernières 60 min. La consommation d'oxygène endogène est défalquée de ces chiffres. Consommation d'oxygène en mm³. Temps en minutes.

Substrat	10	20	40	60	80	100	Poids sec de bactéries	QO ₂	Inhibition %	Citrate disparu
Bactéries cultivées sur milieu KOSER + glucose + citrate	citrate { ^{a*} ^b	0	9	24	37	53	3,4	13		138 γ
		5	21	38	45	61	2,2	18		168 γ
	M/25 conc. fin.									
	citrate a + malonate									
	α -cétooglutarate									
	succinate									
	pyruvate									
	pyruvate + citrate a . .									
	glucose									
Bactéries cultivées sur milieu KOSER + glucose	glucose + citrate a . . .									
	citrate									
	succinate									
	pyruvate									
	glucose									

* Les expériences marquées a ont été faites en même temps.

aérobiose, d'une part sur milieu KOSER¹ contenant le glucose à 1 % comme seul substrat carboné, d'autre part sur ce même milieu, glucosé à 0,1 % auquel on a ajouté du citrate (0,2 %). La préparation de la suspension bactérienne a été décrite précédemment². La consommation d'oxygène a été mesurée dans l'appareil de Warburg et l'activité déshydrogénasique par la technique de Thunberg. Le dosage du citrate a été fait par la méthode de PERLMAN, LARDY et JOHNSON³.

Les concentrations optima en substrat utilisées dans les expériences ont été préalablement déterminées et sont indiquées dans le tableau.

Les résultats résumés dans le tableau I montrent que le citrate est attaqué en aérobiose, seulement lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de ce substrat.

La consommation d'oxygène en présence de citrate varie entre 50 et 80 % de la quantité d'oxygène théorique nécessaire pour la combustion complète du citrate.

En anaérobiose également, seules les bactéries cultivées en présence de citrate sont capables de le dégrader, mais avec un dégagement gazeux négligeable.

Il ressort du tableau II que seules les bactéries cultivées sur le citrate possèdent une activité déshydrogénasique vis-à-vis de ce substrat. On peut donc penser à première vue que l'iso-citrico-déshydrogénase intervient dans l'oxydation du citrate.

Des résultats analogues, mais moins constants, ont été obtenus avec une suspension de bactéries non proliférantes provenant d'une culture sur milieu Koser non citraté mais laissée en contact avec citrate + glucose 16 heures à 37°C.

¹ S. A. KOSER, J. Bacteriol. 8, 493 (1923).

² E. AUBEL, M. GRUNBERG-MANAGO et J. SZULMAJSTER, Biochem. Biophys. Acta 3, 442 (1949).

³ D. PERLMAN, H. A. LARDY et M. J. JOHNSON, Manometric Technique (Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minn., 1900).

Ces expériences montrent que dans le cas de *Escherichia coli*, comme pour *Aerobacter aerogenes*¹, la dégradation du citrate en aérobiose et anaérobiose dépend d'une adaptation. Cette adaptation peut éventuellement, comme pour *Pseudomonas aeruginosa*², consister en un changement de la perméabilité cellulaire ou en la formation d'un enzyme adaptatif. Dans le cas où les bactéries peuvent utiliser le citrate, le problème de la pénétration de ce substrat est éliminé. On peut alors se demander si le glucose ou le citrate lui-même se dégradent suivant le cycle de KREBS.

Tableau II
Activité déshydrogénasique

0,5 cm³ de suspension bactérienne (500 γ de poids sec), 0,5 cm³ de bleu méthylène M/2000 concentration finale et complété à 2,5 cm³ avec du tampon phosphate M/15 à pH 6,8. Temps de décoloration en minutes.

Bactéries cultivées sur glucose + citrate		Bactéries cultivées sur glucose seulement
Bactéries	non décolorées	non décolorées
Bactéries { ^a . . .	13	non décolorées
+ citrate { ^b . . .	15	non décolorées

Or, les résultats du tableau I montrent que la dégradation du glucose par les bactéries même adaptées au citrate ne semble pas se faire par le cycle tricarboxylique. Le QO₂ du glucose, succinate et pyruvate est incomparablement plus élevé que celui du citrate et identique à celui obtenu avec les bactéries non adaptées. Lorsqu'on ajoute du citrate (à faible concentration, M/4000) soit

¹ M. DEFFNER et W. FRANKE, Liebigs Ann. Chem. 541, 85 (1939).

² J. J. R. CAMPBELL et F. N. STOKES, J. Biol. Chem. 190, 853 (1951).

au glucose, soit au pyruvate, on n'observe aucune catalyse. De plus, en comparant les QO_2 d' α -cétylglutarate, succinate et pyruvate à celui du citrate, il est difficile d'admettre ce cycle, même pour la dégradation du citrate. Cette hypothèse est encore appuyée par le fait que le malonate, qui inhibe l'oxydation du succinate par *Escherichia coli*, est sans action sur celle du citrate. Mais la preuve définitive de la non-existence d'un cycle tricarboxylique dans *Escherichia coli* utilisant le citrate ne pourra être apportée que lorsqu'on connaîtra tous les produits intermédiaires formés au cours de la dégradation de ce substrat.

Nous remercions Monsieur le Professeur E. AUBEL pour l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à notre travail.

J. SZULMAJSTER, MARIANNE GRUNBERG-MANAGO
et COLETTE DELAVIER

Institut de biologie physico-chimique, Paris, le 10 octobre 1951.

Summary

The utilisation of citrate by *Escherichia coli* depends on adaptation. Even adapted bacteria do not seem to split glucose by way of the tricarboxylic cycle.

Ersatz von β -Indolyl-Essigsäure im β -Karotin-Test durch Vitamin E (DL- α -Tocopherol) und Vitamin K (Roche 1-6722)

Der β -Karotin-Test als qualitatives Nachweisverfahren für Wuchsstoffe

Eine Reihe bekannter Prüfverfahren, wie zum Beispiel der Avenatest, erlauben es, β -Indolyl-Essigsäure (Heteroauxin) auf biologischem Wege nachzuweisen. Eine neue Methode zur qualitativen Bestimmung von Wuchsstoffen stellt der β -Karotin-Test dar, der bei Untersuchungen über die Wirkung von Karotinoiden auf die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* Mill. aufgefunden wurde¹.

β -Karotin hemmt bis zu Verdünnungen von 10^{-6} Gewichtsteilen die Keimung von Zykamenblütenstaub. Der hemmende Einfluß des β -Karotins kann durch die Zugabe von Heteroauxin aufgehoben und in eine Förderung umgewandelt werden. Dieser Effekt der β -Indolyl-Essigsäure ist um so auffälliger, als diese Substanz für sich allein im geprüften Konzentrationsbereich von 0,001 mg/l bis 1000 mg/l keine Wirkung auf die Keimung von Zykamenpollen ausübt, was im Widerspruch zu Feststellungen früherer Autoren steht, die bei Untersuchungen an Pollen anderer Pflanzenarten einen stimulierenden Einfluß des Heteroauxins nachweisen konnten².

Die Versuchstechnik soll in einer späteren Arbeit beschrieben werden; es sei nur darauf hingewiesen, daß zur Prüfung von fett- und wasserlöslichen Stoffen verschiedene Verfahren entwickelt wurden.

Die Prüfung von Vitamin E und Vitamin K im β -Karotin-Test

Vitamin E wurde viermal, Vitamin K zweimal im β -Karotin-Test untersucht. Im folgenden sind die Re-

sultate je eines Versuches wiedergegeben; außerdem wird zum Vergleich ein Versuch mit Heteroauxin angeführt.

Der β -Karotin-Test umfaßt drei Kontroll- und eine Versuchsserie. In der ersten Kontrollserie (als Kontrolle I bezeichnet) wird die Keimfähigkeit des verwendeten Pollens unter den gewählten Versuchsbedingungen bestimmt; in Kontrolle II untersucht man die Testsubstanz für sich allein auf ihre Wirkung in der Pollenkeimung; Kontrolle III prüft die angewendete Lösung von β -Karotin auf ihre hemmende Wirkung. In der Versuchsserie werden die Lösungen der Testsubstanz und des β -Karotins im gewünschten Mischungsverhältnis kombiniert.

Die Versuchsergebnisse wurden nach dem t -Test von R. A. FISHER statistisch bearbeitet¹.

Bei dem Versuch mit β -Indol-Essigsäure handelt es sich um die Modellreaktion für den β -Karotin-Test; unter dem Einfluß von Heteroauxin wird die Hemmwirkung des β -Karotins aufgehoben und in einen fördernden Einfluß umgewandelt, wobei β -Indolyl-Essigsäure allein die Keimung von Zykamenpollen nicht beeinflusst.

DL- α -Tocopherol wirkt als Hemmstoff auf die Keimung von Zykamenpollen. Aus Vorversuchen ergab sich, daß bei Verdünnung von $1:10^6$ die Wirkungsschwelle noch nicht erreicht war. Bringt man Vitamin E mit β -Karotin zusammen, so liegt die Keimrate beträchtlich über den Werten der entsprechenden Kontrollen; die partielle Aufhebung der Hemmung des β -Karotins durch Vitamin E ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $P \ll 0,001$ gesichert.

Vitamin K wirkt in der untersuchten Konzentration von $1:200$ für sich allein indifferent auf die Keimung von Zykamenpollen, vermag jedoch wie das Heteroauxin den hemmenden Einfluß des β -Karotins in eine Förderwirkung umzuwandeln. Um eine Zerstörung des Vitamins K durch Licht zu verhindern, wurden die Versuche in verdunkelten Thermostaten durchgeführt.

β -Karotin wurde mir vom Chemischen Institut der Universität Zürich, Vitamin E und Vitamin K von der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Beiden Stellen spreche ich meinen verbindlichen Dank aus.

F. H. SCHWARZENBACH

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich, den 28. Oktober 1951.

Résumé

Le carotène β empêche la germination des grains de pollen de *Cyclamen persicum* Mill. Il est possible de transformer cet effet en une stimulation en ajoutant β -indole-acétique-acide (concentration 50 mg/l). La substance elle-même n'a aucune influence sur la germination du pollen.

Cet effet nous permet de déterminer des auxines qualitativement (test du carotène β). Par cette méthode on a prouvé que la vitamine E (DL- α -tocophérole) et la vitamine K (Roche 1-6722) peuvent remplacer IAA. La substance DL- α -tocophérole empêche la germination du pollen de *Cyclamen persicum*, la vitamine K n'a aucune influence.

¹ F. H. SCHWARZENBACH, Helv. chim. acta 34, 1064 (1951).

² TSUNG-LE LOO und TSUNG-CHEN HWANG, Amer. J. Botany 31, 356 (1944).

¹ Vgl. A. LINDER, Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure (Verlag Birkhäuser, Basel 1948 und 1951).