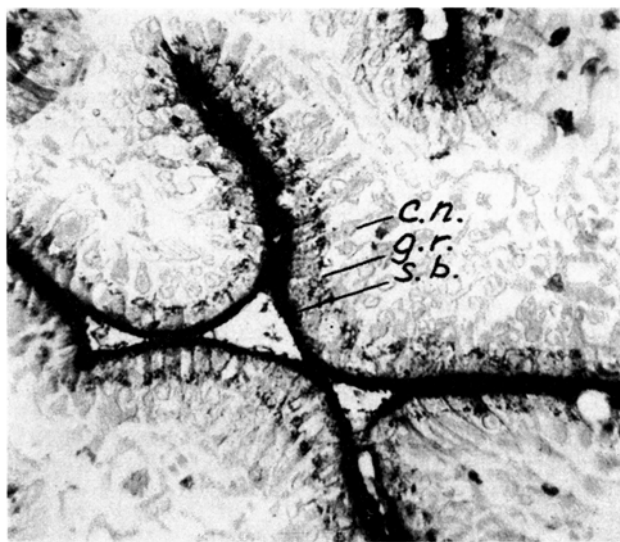


with the probable formula TiY^- and TiY , which are reduced reversibly and independantly of pH at the dropping Hg-electrode. Temporary values are given for the dissociation constants. At higher pH values, the electrode processes are irreversible and dependant on pH. From this fact, and from the decrease in wave height, the presence of complexes containing oxygen and numerous nuclei is concluded.

A Modification of the Histochemical Method for Demonstration of Alkaline Phosphatase in which the Diffusion Phenomenon is Reduced

The method for histochemical demonstration of alkaline phosphatase presented by GOMORI¹ and TAKAMATSU² has been the object of a number of critical studies upon which modifications have been based.

The diffusion phenomena, first demonstrated by MARTIN and JACOBY³, are now generally considered to represent a serious objection to the method, inasmuch as the diffusion is thought to effect principally the cell nuclei which could thereby simulate phosphatase activity. Any possible original enzyme activity is thereby masked. For this reason, the question as to whether alkaline phosphatase exists at all in cell nuclei must remain unanswered. Cytochemical phosphatase determinations indicate that there is only minor activity in cell nuclei in liver, kidney, and intestine⁴.



Rat intestine (duodenum). Fixation: acetone. Stained for alkaline phosphatase. Personal modification. Incubated for 1 hour. Cobalt nitrate. Note that cell nuclei (c.n.) are not stained. g.r. = Golgi region. s.b. = striated border. 280:1.

A number of methods for the extraction of phosphatase make use of acetone in various concentrations. The major part of the enzyme is contained in the protein fraction which precipitates in the presence of 38 to 50 % acetone⁵.

Therefore, the effect of acetone in the incubation mixture has been studied with regard to diffusion, following MARTIN and JACOBY¹, using superimposed sections.

The diffusion observed by MARTIN and JACOBY¹ and others has been verified. This diffusion decreases with rising concentration of acetone in the incubation mixture, ceasing entirely at a concentration of 50 %. However, at that concentration, the enzyme activity has diminished considerably, in part, because of lowered solvent effect upon the substrate. The optimal results, from this point of view, were obtained with an incubation mixture containing 40 % acetone concentration. Quantitative chemical controls show that this lowers the phosphatase activity by approximately 20 %. Histochemical controls show that no new nonspecific reactions arise.

Preparations made in this manner differ from those described earlier, in that phosphatase activity could not be shown in cell nuclei in liver, kidney, or intestine. No other deviations from the current conception concerning the localization of alkaline phosphatase in these tissues could be demonstrated.

On the basis of the aforementioned observations, a modification of the histochemical method for determining alkaline phosphatase is recommended. This involves incubation in the presence of 40 % acetone after deparaffination. Continuous controls must always be made.

The introduction of this modification lowers not only the solubility of the enzyme, but also that of calcium phosphate. In addition, the milieu in which the diffusion takes place is changed in that the protein of the tissue is further coagulated. The lack of the phosphatase reaction in the cell nuclei in the organs studied must not be interpreted as meaning that the enzyme is entirely absent there. It is possible that the nuclei contain enzyme in such low concentrations that the phosphate concentration there never becomes high enough for precipitation to occur unless phosphate or possibly enzyme diffuse from other places with higher enzyme concentration². A precipitation is then obtained through additive effect, but when the diffusion has been reduced, the necessary phosphate concentration is never attained.

B. FREDRICSSON

Histological Department, Karolinska Institutet, Stockholm, January 29, 1952.

Zusammenfassung

Die Diffusionsphänomene bei der histochemischen Phosphatasereaktion im alkalischen Gebiet können reduziert werden, wenn die Inkubationsmischung 40 % Azeton enthält. Dabei treten keine neuen unspezifischen Reaktionen oder eine grössere Inaktivierung des Enzyms auf.

¹ B. F. MARTIN and F. JACOBY, J. Anat. 83, 351 (1949).

² W. L. DOYLE, Am. J. Anat. 87, 79 (1950).

Sur la présence de pigments jaunes non caroténoïdes chez *Mucor hiemalis*

Mucor hiemalis (Phycomycète) est un très fort producteur de caroténoïdes¹. Comme *Phycomyces*², *Mucor hie-*

¹ W. H. SCHOPFER, Bull. Soc. bot. Genève 20, 149 (1928).

² W. H. SCHOPFER et E. C. GROB, Exper. 6, 419 (1950). – E. C. GROB, G. G. PORETTI, A. V. MURALT et W. H. SCHOPFER, Exper. 7, 218 (1951).

¹ G. GOMORI, Proc. Soc. Exp. Biol. 42, 23 (1939).

² H. TAKAMATSU, Trans. Soc. Path. Japan 29, 492 (1939).

³ B. F. MARTIN and F. JACOBY, J. Anat. 83, 351 (1949).

⁴ H. G. HERS, J. BERTHET, L. BERTHET, and CHR. DE DUVE, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 21 (1951).

⁵ M. A. M. ABUL-FADL, E. J. KING, J. ROCHE, and NGUYEN-VAN THOAI, Biochem. J. 44, 428 (1949).

malis peut utiliser l'acétate comme précurseur du carotène. Lors de l'isolement et de l'identification des caroténoïdes de *Mucor* après chromatographie sur $\text{Ca}(\text{OH})_2$, nous relevons au sommet de la colonne une première zone de pigments jaunes, très fortement adsorbée et dont l'élution est très difficile avec le mélange éther de pétrole + 5% de benzol. Après chromatographie répétée sur Al_2O_3 , d'après BROCKMANN, nous avons pu, à l'aide du mélange éther de pétrole + 10% d'éther sulfurique, obtenir trois zones séparées à partir de la zone primitive.

Ces pigments ne doivent pas être des caroténoïdes, la réaction de Carr-Price étant négative. La quantité de substance obtenue étant faible, nous nous sommes limités à l'établissement des spectres d'absorption. Les maxima d'absorption sont les suivants:

zone	couleur	maximum d'absorption μ		
1	jaune	400	350	330
2	orange-jaune	405	325	
3	orange	460	390	

(Spectrophotomètre de quartz, Beckman; substances en solution dans de la benzine optiquement pure.)

GOODWIN¹ vient de signaler un pigment chez *Phycomyces* qui semble voisin (maximum d'absorption 400 et 350 μ). Les recherches destinées à permettre l'identification de ces pigments continuent.

Ces recherches ont été effectuées avec l'appui de la «Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz», que nous remercions vivement.

E. C. GROB et F. VON BEUST

Institut botanique de l'Université de Berne, le 12 février 1952.

Summary

Mucor hiemalis synthesizes orange-yellow pigments which are not carotenoids. Absorption maxima are given.

¹ T. W. GOODWIN, Biochem. J. 50, 550 (1952).

Sur la biosynthèse du β -carotène par *Phycomyces* cultivé sur un milieu contenant de l'acétate de sodium comme unique source de carbone

La participation de l'acétate à la biosynthèse du β -carotène par *Phycomyces*¹ a été démontrée à l'aide d'acétate marqué par du ^{14}C dans le groupe CH_3 et le groupe COOH ². Le milieu nouveau utilisé était à base d'acétate de sodium et de lactate de NH_4 ; 69% des atomes de C du carotène proviennent de l'acétate, le reste devant être attribué au lactate.

Dans le but de généraliser nos premiers résultats, nous avons constitué un milieu nouveau dont l'acétate est l'unique source de C.

En 1934³, nous avions établi qu'en présence de glucose, le NH_4NO_3 donnait lieu à un développement moyen du thalle, mais déterminait une intense carotinogénèse; les pigments étaient localisés surtout à l'extrémité des hyphes submergées, bourrées de globules gras colorés en jaune vif par les caroténoïdes. Répétant l'expérience avec de l'acétate remplaçant la glucose et du NH_4NO_3 , nous retrouvons les mêmes résultats.

L'analyse chromatographique et spectrographique atteste que le β -carotène, à nouveau, domine nettement.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

Milieu*	Poids thalle mg	Carotène**
1° lactate NH_4	20,6	0
2° lactate NH_4 + acétate	45,7	0,787
3° lactate NH_4 + acétate + NH_4NO_3	51,3	0,854
4° acétate + NH_4NO_3 (avec MgSO_4) seul.	11,1	1,995
5° acétate + NH_4NO_3 (avec MgSO_4 et MnSO_4)	8,9	2,323

* Tous les milieux contiennent en outre les sels minéraux (MgSO_4 et KH_2PO_4), ainsi que la vitamine B_1 .

** Coefficients d'extinction rapportés au carotène de 1 g/s de thalle dans 25 cm^3 d'éther de pétrole.

On constate que le taux relatif en carotène est particulièrement élevé dans les thalles provenant des milieux acétate- NH_4NO_3 . Une expérience en damier, exécutée avec des taux variables de nitrate d'ammonium et d'acétate de sodium, atteste qu'avec 1% d'acétate, la dose de 0,12% de NH_4NO_3 suffit à assurer le développement maximum compatible avec nos conditions d'expérience.

Le milieu acétate- NH_4NO_3 a un pH initial de 6; au cours de la culture il s'alcalinise jusqu'à 8. Des expériences effectuées en milieux tamponnés (tampons KH_2PO_4 et NaOH) attestent que la production de carotène est plus forte sur les milieux neutres et alcalins (pH 7 et 8) que sur milieu acide (pH 6).

Il est donc bien démontré que, dans notre cas, l'acétate est le précurseur essentiel et unique du carotène de *Phycomyces*. La fixation de CO_2 de l'air peut être évoquée, mais n'est pas démontrée.

Ces recherches ont été effectuées avec l'appui de la «Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz», que nous remercions vivement.

W. H. SCHOPFER et E. C. GROB

Institut botanique de l'Université de Berne, le 12 février 1952.

Summary

On a medium containing sodium acetate and NH_4NO_3 , *Phycomyces* synthesizes carotene abundantly. Acetate, as the only source of carbon, acts as precursor of carotene.

Atmungsversuche mit submersem Schüttelmyzel des Wurzelpilzes *Mycelium Radicis atrovirens* in der Apparatur nach von Euler, Myrbäck und Nilsson

Untersuchungen über den Stoffwechsel der Schimmelpilze mit Hilfe homogener Suspensionen von submersem Schüttelmyzel wurden zum erstenmal durch KLUYVER und PERQUIN¹ ausgeführt. Sie studierten die Kojisäurebildung durch *Aspergillus flavus* sowie die Produktion von Zitronensäure und Glukonsäure in Kulturen von *Aspergillus niger*. Bezüglich der weiteren Verwendung

¹ W. H. SCHOPFER et E. C. GROB, Exper. 6, 419 (1950).

² E. C. GROB, G. G. PORETTI, A. VON MURALT et W. H. SCHOPFER, Exper. 7, 218 (1951).

³ W. H. SCHOPFER, Arch. Mikrobiol. 5, 511 (1934).

¹ A. J. KLUYVER und L. H. C. PERQUIN, Biochem. Z. 266, 68, 82 (1933). -- L. H. C. PERQUIN, Bijdrage tot de kennis der oxydatieve dissimilatie van *Aspergillus niger* van Tieghem (Diss. Delft 1938).