

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).

dieser Methode in Laboratoriumsversuchen sowie in halb- und grosstechnischem Massstab auf dem Gebiete der oxydativen Säuregärungen der Schimmelpilze und der mikrobiologischen Eiweiss- und Fettsynthese verweisen wir auf die zusammenfassenden Darstellungen von PRESCOTT und DUNN¹, FOSTER² sowie BERNHAUER und RAUCH³.

Zahlreiche Forscher sind der Ansicht, dass die Vertreter verschiedener ökologischer Gruppen der Bodenpilze (mykorrhizabildende und die Rhizosphäre bewohnende sowie endoparasitische Pilze der Wurzeln der Waldbäume, streuzersetzen Pilze usw.) durch einen sehr hohen Sauerstoffbedarf gekennzeichnet sind. In den Untersuchungen über das Wachstum dieser Pilze erfolgte die Impfung der flüssigen Substrate deshalb bisher mit Agarstückmyzel, das auf der Oberfläche der betreffenden Nährlösung schwimmend verblieb. WIKÉN und Mitarbeiter⁴ konnten nun aber zeigen, dass sich Vertreter der erwähnten Pilzgruppen als submerses Myzel sowohl in Ruhe- als auch in Schüttelkulturen ohne Schwierigkeiten züchten lassen. In diesem Zusammenhang schien es uns von Bedeutung zu sein, die O₂-Aufnahme durch das Myzel eines Wurzelpilzes experimentell festzustellen. Als Versuchsobjekte wählten wir dabei zwei Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens*.

Die Pilze wurden in einem Ammontartrat-Glukose-Medium⁵ submers in Schüttelkulturen nach der Methode von WIKÉN und SOMM⁶ gezüchtet. Die O₂-Aufnahme des Myzels wurde volumetrisch mit Hilfe der Apparatur nach von EULER, MYRBÄCK und NILSSON⁷ gemessen. Als Gefässe dienten dabei Erlenmeyerkolben aus Pyrexglas von 100 cm³ Fassungsvermögen. Diese waren mit einem zylindrischen Einsatz versehen, welcher die zur Absorption des Respirationskohlendioxides verwendete Kalilauge enthielt. Die Versuche wurden in Luft mit 20 cm³ Flüssigkeit pro Gefäss durchgeführt. Die Schüttelfrequenz betrug je 90 Hin- und Herbewegungen pro Minute und die Temperatur 25°C.

In den Tabellen I–III wird die O₂-Aufnahme des Myzels in Kubikzentimeter, umgerechnet auf Normalbedingungen (0°C und 76 cm Hg), pro Milligramm Myzeltrockensubstanz und Stunde angegeben.

In einigen Versuchen wurde die O₂-Aufnahme in der gleichen Nährlösung gemessen, welche als Substrat zur Züchtung des betreffenden Myzels gedient hatte, indem der Inhalt der Kulturkolben unter sterilen Bedingungen in die mit Einsatz versehenen Respirationskolben vorsichtig umgeschüttet wurde. Dadurch gelang es uns, die O₂-Aufnahme des intakten submersen Schüttelmyzels von *Mycelium Radicis atrovirens* für eine bestimmte Wachstumsphase im Ammontartrat-Glukose-Medium festzustellen. Die Ergebnisse eines typischen Versuches mit 7 Tage alten Kulturen sind in Tabelle I wiedergegeben. Aus den Einzelwerten lässt sich eine O₂-Aufnahme

von durchschnittlich $2,10 \cdot 10^{-2}$ ($\delta = 0,05 \cdot 10^{-2}$) cm³/mg Myzeltrockensubstanz und Stunde berechnen.

Tabelle I			
Kolben Nr.	Myzeltrockensubstanz mg	pH	O ₂ -Aufnahme = $n \cdot 10^{-2}$
1	18,4	4,00	$n = 2,070$
2	20,4	3,84	2,166
3	26,8	3,78	2,021
4	27,1	3,52	2,130

Stamm «Melin». Versuchsdauer = 410 Minuten.

Atmungsversuche wurden ferner mit steril gewaschenem Schüttelmyzel durchgeführt. Die von der Kulturflüssigkeit abgeschleuderten Myzelkügelchen wurden dabei durch zweimaliges Aufschwimmen in destilliertem Wasser und Abzentrifugieren von den Resten des alten Substrates befreit. Wie aus Tabelle II hervorgeht, zeigte das so behandelte Myzel in destilliertem Wasser und in einer Lösung von primärem Kaliumphosphat eine Eigenatmung von der gleichen Grösse wie die Atmung in dem zur Züchtung des Myzels verwendeten Ammontartrat-Glukose-Substrat (Tabelle I). Es ist ferner ersichtlich, dass eine Veratmung der Bernsteinsäure durch quantitative Bestimmung der O₂-Aufnahme des gewaschenen Schüttelmyzels in einer Lösung dieser Säure bzw. in destilliertem Wasser oder Phosphatlösung nicht nachgewiesen werden kann. Die pro Milligramm Myzeltrockensubstanz und Stunde aufgenommene O₂-Menge war in allen Fällen gleich gross (vgl. FOSTER¹, S. 70).

Versuch Nr.	O ₂ -Aufnahme = $n \times 10^{-2}$		
	Destilliertes Wasser pH = 5,24 – 5,54	0,067 M KH ₂ PO ₄ pH = 4,86 – 4,94	0,160 M Bernsteinsäure-Natriumsukzinat pH = 4,92 – 5,00
1	$n = 1,98$ ($\delta = 0,02$)	–	1,85 ($\delta = 0,11$)
2	2,37 ($\delta = 0,12$)	1,97 ($\delta = 0,11$)	1,98 ($\delta = 0,08$)

Stamm «Melin». Myzeltrockensubstanz = 10,9 – 27,0 mg pro Gefäss. Versuchsdauer = 266–380 Minuten. Anzahl Parallelen = 2–3.

Angeichts der grossen Eigenatmung des gewaschenen Myzels wurden Versuche durchgeführt, jene Reservestoffe, welche leicht veratmet werden, aus den Hyphen zu entfernen. Die in Schüttelkulturen gewonnenen submersen Myzelkügelchen wurden dabei abgeschleudert und in 0,067 M KH₂PO₄-Lösung (pH = 4,4–4,7) aufgeschwemmt. Die Suspension wurde während 48 Stunden bei 25°C geschüttelt (Frequenz = je 50–60 Hin- und Herbewegungen pro Minute, Amplitude = 15 cm). Nach Abzentrifugieren wurde das Myzel in einer angemessenen Menge 0,067 M KH₂PO₄-Lösung suspendiert und auf die Respirationsgefässe möglichst gleichmässig verteilt. Diese wurden dann über Nacht geschüttelt und unmittelbar vor dem Atmungsversuch mit dem zu untersuchenden Substrat (Bernsteinsäure, Glukose usw.) versetzt. Tabelle III zeigt die Ergebnisse einiger typischer Respirationsexperimente mit «verarmtem» Myzel. Die Kolben enthielten in sämtlichen Fällen 15 cm³ 0,067 M KH₂PO₄.

¹ S. C. PRESCOTT und C. G. DUNN, *Industrial Microbiology* (Mc Graw-Hill Book Co., New York 1940).
² J. W. FOSTER, *Chemical Activities of Fungi* (Academic Press Inc., New York 1949).
³ K. BERNHAUER und J. RAUCH, *Biochem. Z.* 319, 77, 102 (1948).
⁴ T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI, *Exper.* 7, 237 (1951). – T. WIKÉN und H. SOMM, *Exper.* 8, 110 (1952).
⁵ T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI, *Exper.* 7, 237 (1951). – C. L. SCHELLING, *Zur Kenntnis der Physiologie von Mycelium Radicis atrovirens Melin mit besonderer Berücksichtigung der Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen* (Diss. ETH., Zürich 1952).
⁶ T. WIKÉN und H. SOMM, *Exper.* 8, 110 (1952).
⁷ R. NILSSON, *Die Methoden der Fermentforschung* (hg. von BAMANN und MYRBÄCK) 3, 2150 (1941).

¹ J. W. FOSTER, *Chemical Activities of Fungi*, (New York 1949).

Tabelle III

Versuch Nr.	O ₂ -Aufnahme = $n \cdot 10^{-2}$				
	Destilliertes Wasser pH = 4,78–5,38	0,056 M Glukose pH = 4,62–5,10	0,056 M Bernsteinsäure- Natriumsukzinat pH = 4,58–5,30	0,056 M Fumarsäure- Natriumfumarat pH = 4,66–5,20	0,056 M Zitronensäure- Natriumzitat pH = 4,80–5,06
1	$n = 0,16$ ($\delta = 0,01$)	0,97 ($\delta = 0,00$)	—	—	—
2	0,22 ($\delta = 0,02$)	1,09 ($\delta = 0,02$)	0,64 ($\delta = 0,00$)	—	—
3	0,25 ($\delta = 0,02$)	0,89 ($\delta = 0,08$)	—	—	—
4	0,19 ($\delta = 0,02$)	0,87 ($\delta = 0,05$)	—	—	—
5	0,11 ($\delta = 0,06$)	0,94 ($\delta = 0,01$)	1,01 ($\delta = 0,06$)	—	—
6	0,19 ($\delta = 0,02$)	0,94 ($\delta = 0,02$)	—	0,71 ($\delta = 0,03$)	—
7	0,12 ($\delta = 0,01$)	1,04 ($\delta = 0,02$)	1,33 ($\delta = 0,09$)	1,65 ($\delta = 0,02$)	1,00 ($\delta = 0,05$)

Stamm «Melin» in Versuch 1, Stamm «Levisohn» in den Versuchen 2–7. Myzeltrockensubstanz = 9,6–71,2 mg pro Gefäss. Versuchsdauer = 330–520 Minuten. Anzahl Parallelen = 2–6.

Lösung und 5 cm³ Substratlösung bzw. destilliertes Wasser. Es ist ersichtlich, dass die oxydative Dissimilation der Glukose, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Zitronensäure durch Messungen der O₂-Aufnahme des «verarmten» Myzels verfolgt werden kann, indem die O₂-Mengen, welche der Pilz auf diesen Substraten pro Zeiteinheit verbraucht, 3–10mal grösser sind als die bei der Eigenatmung aufgenommenen Mengen.

Die von uns für intaktes Myzel von *Mycelium Radicis atrovirens* so festgestellte O₂-Aufnahme ist von der gleichen Grössenordnung wie die Respiration, welche von GOULD und TYTELL¹ für ein auf mechanischem Wege zerteiltes Myzel eines *Fusarium*-Stammes bestimmt wurde. Der O₂-Verbrauch dieses Myzels betrug 0,57 bis $3,95 \cdot 10^{-2}$ cm³/mg Trockensubstanz und Stunde.

Professor Dr. E. MELIN, Institut für physiologische Botanik, Uppsala, stellte uns wohlwollend einen der untersuchten Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* zur Verfügung. Den von LEVISOHN isolierten Stamm bezogen wir vom «Centraalbureau voor Schimmelcultures», Baarn.

Die Untersuchungen werden aus dem Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung sowie vom Eidg. Institut für das forstliche Versuchswesen unterstützt.

T. WIKÉN und H. SOMM

Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, den 26. November 1951.

Summary

The oxygen uptake of two strains of *Mycelium Radicis atrovirens* was measured volumetrically in the respirometer apparatus of von EULER, MYRBÄCK and NILSSON. The vessels employed were 100 cm³ Erlenmeyer flasks with center cup containing the solution of potassium hydroxide used for absorption of carbon dioxide. The mycelium was grown in a submerged state in shaking cultures according to the method of WIKÉN and SOMM. The oxygen consumption of the growing young mycelium in a glucose-ammonium tartrate medium amounted to about 2×10^{-2} cm³ per milligram of dry weight per hour. The respiratory activity of the washed mycelium in distilled water or phosphate buffer was equal to that shown by the intact mycelium in its actual culture medium. The high autorespiration (endogenous respiration) thus observed was reduced appreciably by starvation for 48 hours in phosphate buffer under aerated conditions. The autorespiration of the starved mycelium amounted to $0.1-0.3 \times 10^{-2}$ cm³ per milligram of dry

weight per hour, whereas its oxygen uptake in solutions of glucose, succinate, fumarate, and citrate was equal to $0.6-1.7 \times 10^{-2}$ cm³.

Die Wirkung des Adrenalins über den Wassertransport durch die Haut von *Rana esculenta*

Das Adrenalin bewirkt, wenn es im inneren Medium zugegen ist, eine Inversion der Richtung des Wassertransportes, so dass dieser von innen nach aussen stattfindet, wenn das äussere Medium isotonisch ist, während es jeglichen Transport behindert, wenn das äussere Medium hypotonisch ist (Wasser)¹.

Dieses Verhalten findet eine befriedigende Erklärung in der Annahme, dass in beiden Fällen das Adrenalin den aktiven Wassertransport von aussen nach innen unterbricht und einen aktiven Transport von innen nach aussen auslöst; dieser Transport von innen nach aussen wird durch den passiven entgegengesetzten Transport unsichtbar, wenn das äussere Medium hypotonisch ist. Die obige Hypothese findet ihre Bestätigung in den folgenden Tatsachen.

Die absolute Wasserdiffusion durch die isolierte Rückenfroschhaut ändert sich nicht in wahrnehmbarer Weise, wenn im inneren Medium Adrenalin zugegen ist; das heisst, dass die durch das obengenannte Hormon verursachte Veränderung im Nettowassertransport durch die Froschhaut wahrscheinlich nicht die Folge einer veränderten passiven Permeabilität dem Wasser gegenüber ist, sondern die Folge einer Veränderung des aktiven Wassertransportes in einer bestimmten Richtung.

Zur Bestimmung der absoluten Wasserdiffusion von aussen nach innen benutzten wir als Indikator das Deuteriumoxyd. Die Schwerwasserkonzentration wurde mit der Sapirsteinschen Methode² bestimmt; die molarprozentige Schwerwasserkonzentration (x%) wurde folgendermassen berechnet:

$$x \% = \frac{1 - \frac{d_0}{c d'_1 [1 + 3\beta(t - t_0)]}}{\left(\frac{M_2}{M_1} \cdot \frac{d_1}{d_2} - 1\right) \frac{d_0}{c d'_1 [1 + 3\beta(t - t_0)]} - \left(\frac{M_2}{1} - 1\right)} \cdot 100$$

¹ V. CAPRARO und M. TIENGO, Rend. Acc. naz. Lincei, Cl. Sci. fis. mat. nat. 10, 416 (1951).

² L. SAPIRSTEIN, J. Lab. Clin. Med. 357, 93 (1950).

¹ B. S. GOULD und A. A. TYTELL, J. Gen. Physiol. 24, 655 (1941).