

Table III
Purified diamine oxidase of hog kidney cortex

Activity of diamine oxidase preparation: liberation of 84 mM of NH₃ per hour and per gram of nitrogen from 0.01 M cadaverine. In a total volume of 2 ml 0.079 mg of diamine oxidase-N was present, together with 2 µg of purified catalase (Armour). Incubation in phosphate buffer at pH 7.1 for 1 h.

Substrate	Inhibitor	Q	Inhibition
10 ⁻² M cadaverine	—	3.5 µAtoms O ₂	—
M cadaverine	5·10 ⁻⁴ M INH	1.7	51%
M cadaverine	5·10 ⁻⁴ M IIH	2.9	17%
M cadaverine	—	4.0 µMoles NH ₃	—
M cadaverine	5·10 ⁻⁴ M INH	3.3	18%
M cadaverine	5·10 ⁻⁴ M IIH	4.0	0%

Table IV
Monoamine oxidase of rat liver mitochondria

Mitochondria prepared by differential centrifugation in 0.88 M sucrose (see references¹ and ²). Mitochondria from 0.2 g liver (male Sprague-Dawley rats) are suspended in a total volume of 2 ml of phosphate buffer at pH 7.1. Incubation: 2 h.

Substrate	Inhibitor	Q Oxygen uptake	Inhibition
5·10 ⁻² M tyramine	—	4.2 µAtoms	—
M tyramine	1·10 ⁻³ M INH	4.4	0%
M tyramine	4·10 ⁻⁵ M IIH	1.0	77%

¹ G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER, and G. E. PALLADE, J. Biol. Chem. 172, 619 (1948).

² G. C. COTZIAS and V. P. DOLE, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 157 (1951).

bacteria¹, the two new drugs have a considerable action on mammalian diamine oxidase. The effective concentration (69 µg of INH per milliliter), however, is higher than the ordinary therapeutical concentration.

The deamination is obviously less reduced than the oxidation. In case of INH, only 0.51 atoms of oxygen are required for the liberation of one atom mole of ammonia. Thus, for the first time, it has been shown that the process of oxidative deamination occurs in two steps: (1) deamination and (2) oxidation. A partial separation of the two steps (enzymes) was also achieved in the course of the purification of diamine oxidase¹. (See Table IV.)

The marked inhibition of monoamine oxidase is complete with 10⁻⁴ M INH, and is still 49% with 2·10⁻³ (5 µg per milliliter). Since monoamine oxidase is considered to be an important agent in the inactivation of adrenaline and noradrenaline, this strong inhibition of the enzyme may be connected with some side reactions produced by this drug, indicating a sympathetic stimulation².

E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER, and L. S. VAN ORDEN

Departements of Biochemistry and Bacteriology of the Northwestern University Medical School, Chicago, Ill., June 5, 1952.

Zusammenfassung

Isonikotinsäure-hydrazid (INH) und 1-Isonikotinyl-2-isopropyl-hydrazin (IIH) hemmen Diaminoxidase und

Guanidineamidinase von *Mycobacterium smegmatis* und verhalten sich in dieser Hinsicht gleich wie basische Antibiotika und basische tuberkulostatische Chemotherapeutika. Die beiden neuen Tuberkuloseheilmittel wirken auch auf eine gereinigte Diaminoxidase aus Schweinenierenrinde. Hierbei wird die Oxydation viel stärker als die Desaminierung beeinflusst, was zu einer teilweisen Aufspaltung des Prozesses der oxydativen Desaminierung führt. Auffallend stark ist die Hemmung der Monoaminooxidase der Mitochondria aus Rattenleber durch IIH, eine Reaktion, die möglicherweise im Zusammenhang mit unerwünschten Nebenreaktionen bei der therapeutischen Anwendung dieses Heilmittels steht, die unter dem Bild einer Sympathikuserregung verlaufen können.

Nitrogen Metabolism of
Penicillium Chrysogenum – Q 176

In the course of our studies on the mechanism of the biosynthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum*-Q 176, it became desirable to ascertain the day-to-day changes in the nature of the free amino acids present in the medium and the mycelium during the growth of the organism. The methods previously described were not considered very convenient in view of the very large number of estimations involved but an opportunity was provided by the recent development of the simple circular paper chromatographic technique in this department by GIRI and his co-workers¹ for rapid detection and estimation of amino acids.

¹ J. R. FOUTS and E. A. ZELLER, unpublished results.

² I. J. SELIKOFF, E. H. ROBITZEK, and G. G. ORNSTEIN, Quart. Bull. Sea View Hosp. 13, 17 (1952).

¹ K. V. GIRI, Current Science 20, 295 (1951). – K. V. GIRI and N. A. N. RAO, Nature 169, 923 (1952); J. Ind. Inst. Sci. 34 [2], 95 (1952).

Although many nutritional aspects of the growth of *P. notatum* and *P. chrysogenum*, particularly in relation to the production of penicillin have been described by numerous investigators¹, our knowledge of their nitro-

¹ J. W. FOSTER, H. B. WOODRUFF, D. PERLMAN, L. F. MACDANIEL, B. L. WILKER, and D. HENDLIN, *J. Bact.* 51, 465, 695 (1946). – P. E. HALPERN, D. SIMINOVITCH, and W. D. MACFARLANE, *Science* 102, 230 (1945). – A. G. C. WHITE, L. O. KRAMPITZ, and C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.* 8, 303 (1945). – R. P. COOK and M. B. BROWN, *Nature* 159, 376 (1946). – S. G. KNIGHT and W. C. FRAZIER, *Science* 102, 617 (1945).

gen metabolism is still inadequate to formulate any clear-cut mechanism of biosynthesis of penicillin. That penicillin is not necessarily closely correlated with the growth of the mould has been shown by the observations that on certain media these fungi grow well yet produce negligible amounts of penicillin, but there can be no doubt that it is intimately connected with nitrogen metabolism in view of the various observations, e.g., the increased production of antibiotic by supplementation with some amino acids, viz., histidine, arginine, glutamic acid. In this connection a clear understanding of the

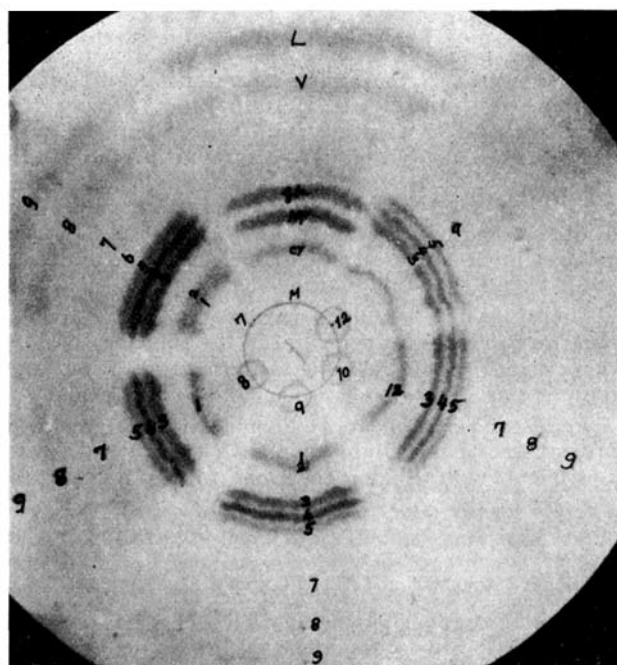
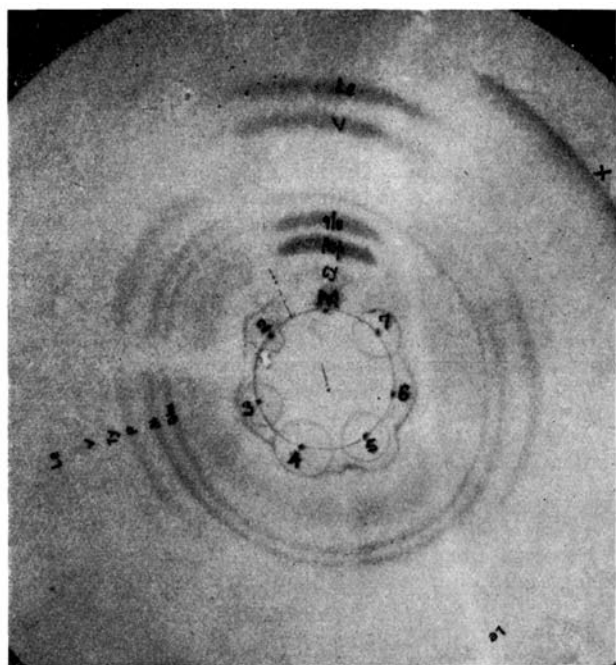


Fig. 1.

Fig. 2.

Circular paper chromatograms showing the changes in the amino acids present in the broth filtrate (Fig. 1) and the mycelium (Fig. 2) during the growth of *P. chrysogenum*-Q 176. The numericals in the centre circle indicate the day after inoculation. The mixture of known amino acids is spotted at M. Cy = cystine; Asp = asparagine; Glu = glutamic acid; L = leucine.

formation and utilisation of the amino acids by the mould appears desirable in order to arrive at a correlation of the synthesis of penicillin with nitrogen-metabolism. Earlier workers¹ have shown that many amino acids are synthesised by the mould but their study was based on the hydrolysis of the proteinous material present in the mycelium and no data is available on the continuous formation and utilization of amino acids *in situ* by the organism.

In a preliminary communication MACKENZIE and COOK² have reported the formation of glutamic acid followed by valine by *P. notatum*-1249B21 grown in surface cultures for 20 days.

Experimental: *P. chrysogenum*-Q 176 was grown in shake cultures (R.P.M. 90 ± 5) on chemically defined medium of JOHNSON and JARVIS³ for 12 days. The mycelium and the culture fluid were separated every day and the distribution of free amino acids in both the fractions was determined chromatographically. The day-to-day changes in the amino acid pattern are shown in the chromatograms (Fig. 1 and 2). Table I shows the changes in the mycelial weight, pH and penicillin titre. Table II gives the amino acids identified.

There is a prominent band marked X in Figure 1 which appears to be due to penicillin in the solution. Besides, those mentioned in the table above there is evidence for the presence of two more unidentified amino acids.

Results: There appears to be mainly free amino acids present in the mycelium and broth filtrates in general agreement with the observations of MACKENZIE and

Cook¹ on the nitrogen metabolism of *P. notatum*. Both the fractions contained considerable amounts of free amino acids even after 24 h. The early stages of growth (1-4 days) is marked by rapid accumulation of glutamic acid, alanine, proline, followed by leucine, valine, tyrosine and other amino acids. One of the striking observation made during this study is the rapid disappearance of virtually all amino acids at the peak period of formation of penicillin (5-8th day) in the broth filtrate while there does not appear to be correspondingly any marked variation in the mycelium. The changes in the proline content of the culture medium appears to be specially noteworthy. These facts lend support to the view that the formation of penicillin is intimately connected with the utilization of amino acids which have accumulated during the early stages of growth, thus confirming the findings of WOLF², on the rapid oxidation of many amino acids by 6½ days' old mycelial suspensions. The third stage, viz., 9th-12th day, is marked with the re-elaboration of the amino acids into the broth filtrate probably due to the breakdown of cellular material. The quantitative aspects are still under investigation. A full discussion of the significance of these findings will be published shortly.

Our sincere thanks are due to Prof. K. V. GIRI for his keen interest in the progress of these investigations.

P. L. NARASIMHA RAO and R. VENKATARAMAN

Antibiotics Laboratory, Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore-3, March 20, 1952.

Zusammenfassung

Es wird über die täglichen Veränderungen in den freien Aminosäuren des Kulturfiltrats und des Myzels,

¹ Y. YOKOYAMA, J. Antibiotics (Japan) 4, 95 (1951); C. A. 45, 9130 (1951).
² R. M. MACKENZIE and R. P. COOK, J. Biochem. 50 [2], III (1951).
³ M. J. JOHNSON and E. G. JARVIS, J. Amer. chem. Soc. 69, 3010 (1946).

¹ L. c.
² F. T. WOLF, Arch. Biochem. 16, 143 (1948).

Table I

Day after inoculation (counting day of inoculation as 1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mycelial weight (Wet) in g.	0.13	0.26	0.54	0.63	0.65	0.80	0.85	0.85	0.82	0.85	0.83
pH.	6.0	6.2	6.4	6.5	6.7	6.9	7.4	7.4	7.3	7.2	—
Penicillin titre in Oxford units/ml. . . .	—	—	32	40	64	160	220	180	160	—	—

Table II

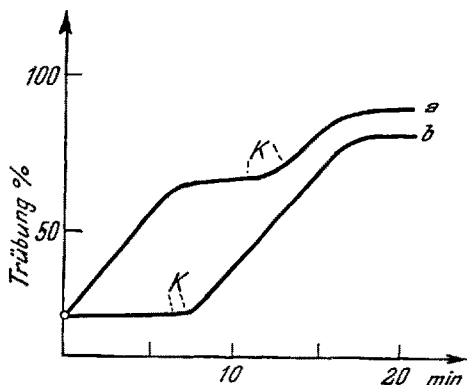
Amino acid detected	Days after inoculation (counting day of inoculation as 1)																					
	2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My	C	My
Cystine	±	+	+	+	+	++	+	+	+	+	—	+	+	+	?	+	+	+	++	..	+	+
Histidine . . .	—	—	—	+	—	++	—	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	..	+	—	—
Asparagine . .	+	—	±	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+	..	+	—
Glutamic acid .	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	+	++	..	++	+
Proline	+	—	+	+	—	+	—	+	±	+	—	+	—	—	—	—	+	—	+	..	+	—
Alanine	+	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	+	++	..	+	+
Leucine	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	++	+	+	..	+	—
Valine	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	..	+	—
Tyrosine	—	—	+	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	..	+	—
Phenylalanine .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	..	+	—	

C = Culture Medium; My = Mycelium; + = present; ++ = Prominent; — = Absent; ± = Faint; ? = Doubtful; .. = not determined.

die durch *Penicillium chrysogenum* – Q 176 erzeugt werden, wenn sie an einem synthetischen Medium wachsen, berichtet. Hierbei wurde unter Verwendung von kreisrundem Filterpapier die chromatographische Methode angewandt. Es wird gezeigt, dass bei der Maximalbildung von Penicillin, das heisst vom 5. bis 8. Tage, fast alle freien Aminosäuren aus dem Kulturfiltrat verschwinden.

Zum Koagulationsverlauf von Blut und Plasma

In der biologischen Forschung und in der klinischen Praxis wird eine Blutprobe häufig hinsichtlich ihrer Koagulationsgeschwindigkeit geprüft. Man bestimmt dann die Koagulationszeit (KZ.) durch direkte Beobachtung der Trübung oder auch mittels photoelektrischer Messung. Die allgemein bekannte Ungenauigkeit all dieser Methoden bestimmte uns, den Koagulationsverlauf näher zu überprüfen, wobei wir uns verbesserter spektro-photometrischer Methoden bedienten. Wir verwendeten rekalkifiziertes Gesamtblut und Plasma.



Koagulationskurve von rekalkifiziertem Oxalatblut (a) und Zitratblut (b) im Bereich von 440 $m\mu$. Die visuelle Beobachtung der KZ. ist einer bestimmten Stelle (k) der Kurve zugeordnet; sie ist genauer feststellbar bei der Untersuchung von Zitratblut. Die Länge und Höhe der einzelnen Phasen hängt von der Natur und verschiedenen biochemischen Faktoren des Blutes ab.

Es erwies sich, dass die üblichen photoelektrischen Absorptionsgeräte – Kolorimeter – nur ungenau den richtigen Koagulationsverlauf zu verfolgen gestatten. Der Grund liegt darin, dass die rekalkifizierte Blut- oder Plasmalösung eine kolloidale Lösung ist und man neben der Lichtabsorption auch die Lichtstreuung auf Grund des Tyndall- und Raleigheffektes berücksichtigen muss. Zu Beginn der Koagulation überwiegt die Absorption, dann – beim Übergang in das Gel (Koagulum) – die Streuung. Wir richteten daher unsere Messapparatur so ein, dass sie sowohl die Absorption als auch die Lichtstreuung zeitlich in einem gewünschten Spektralbereich zu verfolgen gestattete.

Hierbei ergab sich, dass die Blutkoagulationskurve aus mehreren Phasen besteht¹. Wird Oxalatblut verwendet, so beobachtet man 4 Phasen, wird hingegen Zitratblut untersucht, so nur deren drei, wobei die erste Phase unterdrückt erscheint. Aus der beiliegenden Abbildung ist das näher ersichtlich. Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate die Trübung in % aufgetragen. Das

Blut wird direkt – unter Vermeidung jeglichen Kontaktes mit Glas – in Quarz- oder Plastikgefässen aufgefangen und untersucht. Beim Oxalatblut verwenden wir eine Lösung von 1% Na-Oxalat und 0,7% NaCl, die 1:10 mit dem aufgefangenen Blut vermischt wird. Beim Zitratblut verwenden wir 3,55% Na-Zitrat, im Verhältnis 1:10 mit dem Blute vermischt. Zur Rekalkifizierung verwenden wir in beiden Fällen eine Lösung, die 800 mg $CaCl_2$ und 6 g NaCl auf 1 l Wasser enthält. Von dieser Lösung werden 4 cm^3 zu 1 cm^3 Oxalat- oder Zitratblut zugefügt, wobei auf möglichst gleichmässige Mischung – unter Vermeidung von Lufteinmischung – in reproduzierbarer Art zu achten ist. Oxalatblut erweist sich als sehr unbeständig und muss daher immer zum selben Zeitpunkt, nach Zentrifugierung, rekalkifiziert werden. Zitratblut ist relativ beständiger, und die Beobachtungsfehler sind daher viel geringer.

Der Zeitpunkt der Koagulation, wie er sich aus der Beobachtung mit blossen Auge ergibt, wurde im Verhältnis zur gesamten Koagulationskurve bestimmt. Hierbei ergab sich, dass die KZ. sich gut aus der Zitratblutkurve ermitteln lässt, hingegen schlecht aus der Oxalatblutkurve. Oder anders ausgesprochen, diejenige charakteristische Trübung und Plastizitätsveränderung, die zur Erkennung der Koagulationszeit dient, ist nur beim Zitratblut (normal oder pathologisch) genau einer bestimmten Stelle des Koagulationsverlaufes zugeordnet und daher klinisch verwertbar.

Die verschiedenen Phasen sind hinsichtlich ihres Verlaufes von der pathologischen Natur des Blutes, den chemischen Beimengungen und anderen biophysikalischen Faktoren abhängig. Sie können daher, besser als die KZ.-Bestimmung allein, die biochemische Analyse ergänzen und zu pharmakodynamischen Studien dienen.

Die Interpretation der einzelnen Phasen stimmt nach unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen gut mit der graduellen Ausbildung der fibrinösen Gelstruktur überein. Insbesondere hängt das Trübungsverhältnis der 4. zur 1. Phase vom Fibrinogengehalt, dasjenige der 2. zur 1. Phase vom Prothrombingehalt ab. Die Eigentümlichkeit, dass die Trübungsmessung der einzelnen Phasen einer koagulierenden Plasmalösung analytisch ausgewertet werden kann, fanden wir auch bei anderen langsam koagulierenden Lösungen vor, wie zum Beispiel bei Zellulosexanthat (Viskose).¹

V. TOMBERG

Physikalisch-medizinisches Laboratorium, Institut für Pharmakodynamik und Therapeutik, Universität Brüssel, den 21. Mai 1952.

Summary

The rate of coagulation of whole blood or recalcified plasma is investigated by a photoelectric method. In the case of oxalated plasma, the speed curve shows 4 characteristic phases, for citrated plasma only 3. The determination of coagulation time by visual observation agrees very well with the beginning of the third phase of the citrated plasma, not so well with that of the oxalated plasma. The rate of coagulation is modified by the pathological state of the blood and by physical or chemical reactions. Cellulose solution shows a similar behaviour.

¹ V. TOMBERG, Koll.-Z. 39, 123 (1951).