

been already discussed. EDWARDS and SINGH<sup>1</sup> have just described a conversion of isoatisine hydrochloride with acetic anhydride into a "triacetate hydrochloride" which on mild hydrolysis with sodium carbonate gives atisine. The change of an iso-atisine derivative which is completely fixed in the quarternary form (b) into an atisine derivative (also fixed in this form) is to be expected as in this case the stabilities will be reversed, the derivative with the trigonal carbon in the more hindered position being more stable. However the triacetate hydrochloride obviously must have been a diacetate hydrochloride with a mole of acetic acid.

**Acknowledgements.** We wish to thank the John Simon Guggenheim Foundation (K. W.) and the National Research Council of Canada (J. A. E.) for the award of fellowships, as well as the University of New Brunswick for a leave of absence to one of us (K. W.). We further express our appreciation to Professor CARL DJERASSI for communicating his work to us prior to publication. Finally it is a pleasant duty to thank Professor R. B. WOODWARD for the hospitality extended to one of us in his laboratory and for a discussion concerning the isomerisation of veatchine and its epimer by acid.

K. WIESNER and J. A. EDWARDS

Converse Memorial Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass. USA, and University of Brunswick, Fredericton, New Brunswick, Canada, February 2, 1955.

#### Zusammenfassung

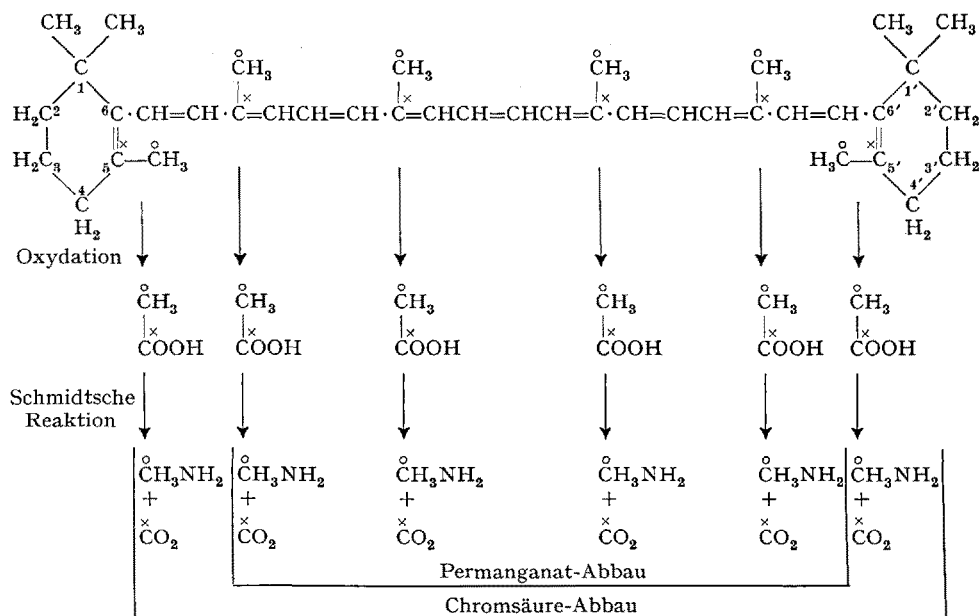
Die Basizität und das verschiedene chemische Verhalten der Isomerenpaare Veatchin-Garryin und Atisin-Isoatisin werden mit der sterischen Konfiguration dieser Verbindungen in Zusammenhang gebracht.

<sup>1</sup> O. E. EDWARDS and TARA SINGH, Can. J. Chem. 33, 448 (1955).

### Über einen möglichen Weg der Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis*

In einer früheren Arbeit über die Biogenese der Carotinoide bei *Phycomyces blakesleanus*<sup>1</sup> hatten wir berichtet, dass eine Reihe organischer Säuren in der Lage sind,

<sup>1</sup> W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 6, 419 (1950).



die Carotinbildung auf einem nichtcarotinogenen Nährmilieu<sup>1</sup> auszulösen. Als aktive Vertreter der Fettsäuren fanden wir die Essigsäure, die Buttersäure und die Palmitinsäure. Unter den Ketosäuren erwies sich als besonders aktiv die Brenztraubensäure, was auch durch ARNAKI und STARY<sup>2</sup> bei der *Sarcina lutea* bestätigt werden konnte. Unter den Dicarbonsäuren sind Oxalsäure, Malonsäure und Adipinsäure geprüft worden, die alle ausserstande sind, Carotinoide zu bilden. Hingegen ermöglichen die Weinsäure (Oxydicarbonsäure) und Zitronensäure (Oxytricarbonsäure) die Produktion reichlicher Carotinoidmengen.

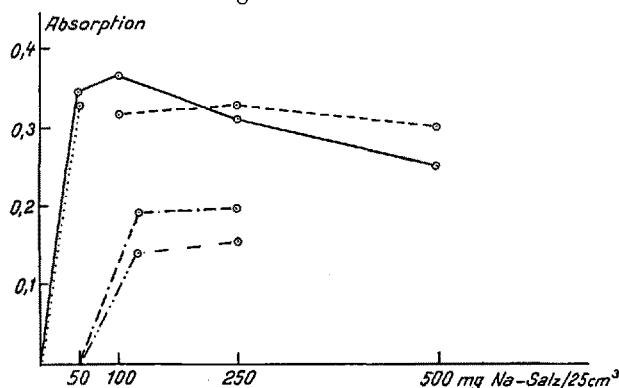


Abb. 1. Die Bildung von Carotinoiden durch verschiedene organische Säuren bei *Phycomyces blakesleanus*.

----- Essigsäure, ..... Buttersäure;  
 ————— Brenztraubensäure; - · - · - · - Weinsäure;  
 - - - - - Zitronensäure.

gemessen im Hilger Colorimeter. Filter Ilford 601.

PAECH<sup>3</sup> machte es uns zum Vorwurf, die Essigsäure als einzige mögliche Vorstufe der Carotinoide in Betracht zu ziehen, was, wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, keineswegs zutrifft.

<sup>1</sup> Wir berichtigen hier, dass auf dem nichtcarotinogenen Laktatmilieu doch sehr kleine Mengen Carotinoide gebildet werden.

<sup>2</sup> M. ARNAKI und Z. STARY, Biochem. Z. 323, 367 (1952).

<sup>3</sup> K. PAECH, VIII<sup>e</sup> Congr. int. Bot. Rapports et communications Sect. 11/12, p. 49 (1954).

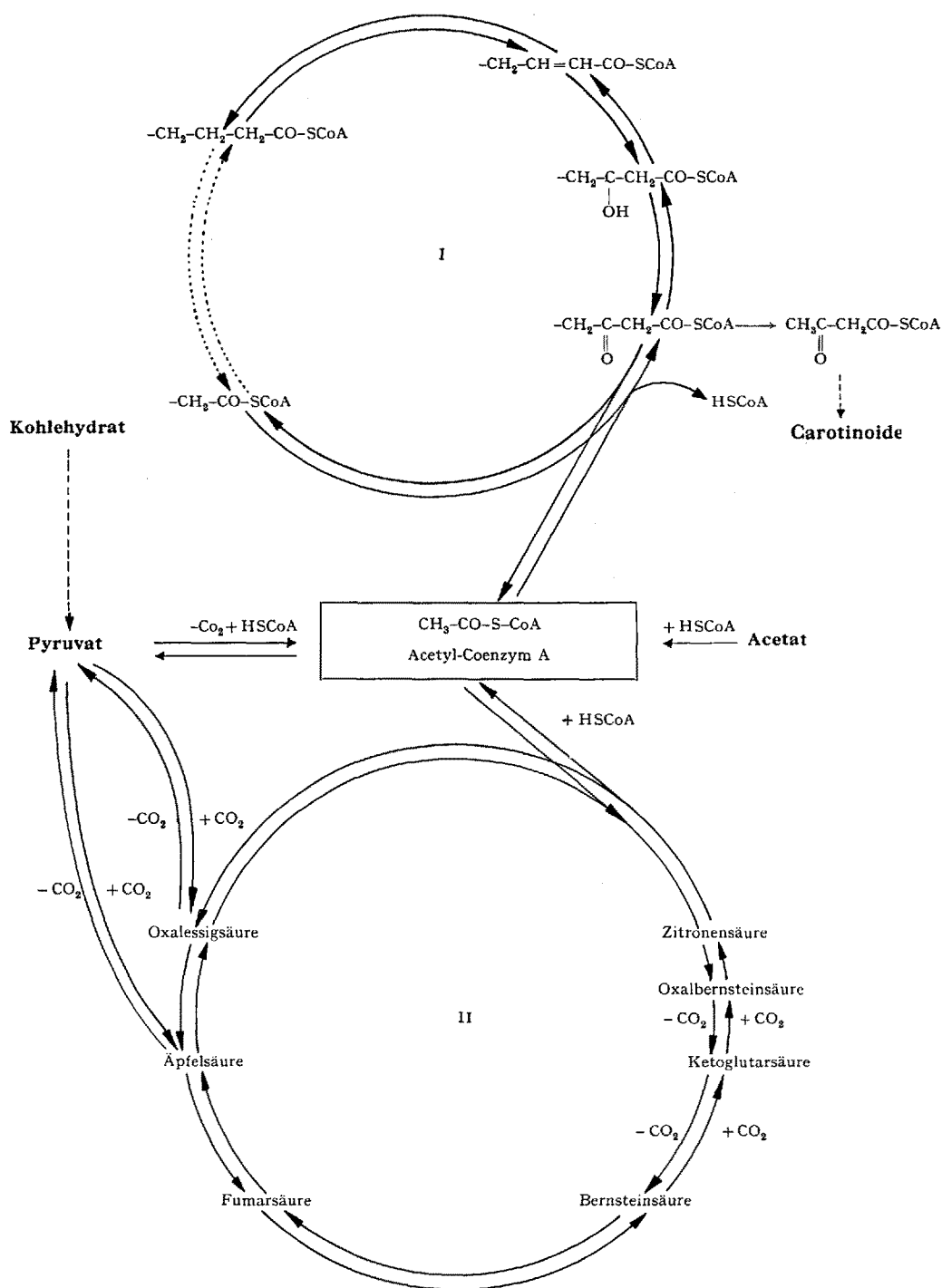


Abb. 2. Die Biosynthese der Carotinoide. Hypothetisches Schema.  
I: Fettsäurezyklus vereinfacht; II: Zitronensäurezyklus nach KREBS vereinfacht.

Vor einiger Zeit gelang es uns, den Nachweis zu erbringen<sup>1</sup>, dass eine Beziehung zwischen Carotin- und Sterinbildung einerseits und der Fettbildung andererseits bestehen müsse, nämlich so, dass in Zeitpunkten, wo in den Kulturen grosse Mengen Carotinoide und Sterine auftreten, nur kleine Mengen Fette gefunden werden und umgekehrt. Es ist heute gut bekannt, dass in der Fettsäurebildung dem Coenzym A bzw. dem Acetyl-

Coenzym A eine wesentliche Rolle zukommt<sup>1</sup>. Es ist somit nicht von der Hand zu weisen, dass bei der Bildung der Carotinoide im lebenden Organismus nicht auch das Coenzym A eingreifen könnte. Unsere Versuche bei *Mucor hiemalis* mit Pantotheinsäure, Pantethin und phosphoryliertem Pantethin<sup>2</sup>, die essentielle Be-

<sup>1</sup> F. LYNEN und S. OCHOA, Biochim. Biophys. Acta 12, 299 (1953).

<sup>2</sup> E. C. GROB, V. GRUNDBACHER und W. H. SCHOPFER, Exper. 10, 378 (1954).

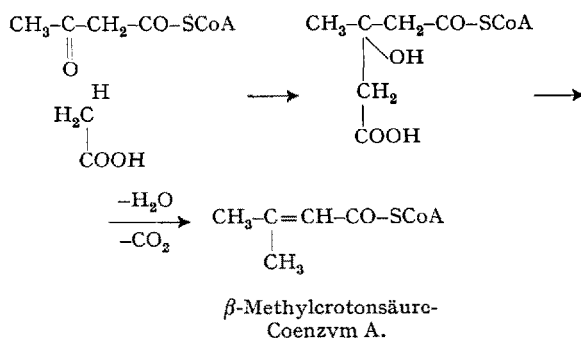
<sup>1</sup> E. C. GROB und M. BEIN, Bull. Soc. chim. Biol. 33, 1236 (1951).

standteile des Coenzym A darstellen, haben diese Vermutung bestätigt. Aus diesen Ergebnissen dürfen wir somit auf eine besondere Bedeutung der Essigsäure bzw. des Acetyl-Coenzym A bei der Biosynthese der Carotinoide schliessen.

In diesem Zusammenhang ist es auch von Interesse, in welcher Weise die C-Atome der vom Mikroorganismus zur Verfügung gestellten Essigsäure in das Molekül des  $\beta$ -Carotins eingebaut werden. Zu diesem Zwecke haben wir das in der Nährlösung befindliche Acetat mit  $^{14}\text{CH}_3\cdot\text{COONa}$  bzw. mit  $\text{CH}_3\cdot^{14}\text{COONa}$  markiert und aus dem ausgewachsenen *Mucor hiemalis* das radioaktive Carotin isoliert. Das gereinigte, kristallisierte  $\beta$ -Carotin ist oxydativ zu Essigsäure abgebaut worden. Die erhaltene Essigsäure ist sodann mit der Schmidtschen Reaktion zu den entsprechenden  $\text{C}_1$ -Komponenten decarboxyliert worden, die auf ihre Radioaktivität hin geprüft worden sind<sup>1</sup>.

Die Anordnung der C-Atome der Essigsäure im  $\beta$ -Carotin ist, soweit sie heute experimentell bestimmt worden ist, so, dass offenbar das Essigsäuremolekül als solches eingebaut wird. Zur Zeit sind wir damit beschäftigt, auch die Herkunft der übrigen C-Atome des  $\beta$ -Carotins zu bestimmen.

Alle bis anhin erzielten experimentellen Ergebnisse, die hier kurz zusammengefasst worden sind, führen uns zu der Hypothese, dass die Biosynthese der Carotinoide aller Wahrscheinlichkeit nach über Acetyl-Coenzym A führt und aus dem Fettsäurezyklus nach Lynen abzweigen muss, wie dies das Schema in Abbildung 2 zur Darstellung bringt. Wir betrachten als mögliche Abzweigungsstelle die Stufe des Acetoacetyl-Coenzym A. Man kann sich aus dem Acetoacetyl-Coenzym A die Bildung der  $\beta$ -Methylcrotonsäure, die schon mehrmals als eine niedere Vorstufe der natürlichen Isoprenederivate angesehen worden ist, leicht vorstellen, indem sich ein weiteres Essigsäuremolekül an das Acetoacetat anlagert und das entstandene Zwischenprodukt durch Dehydratisierung und Decarboxylierung in  $\beta$ -Methylcrotonsäure-Coenzym A übergeht.



Andererseits aber haben wir festgestellt, dass auch Säuren des Krebschen Zitronensäurezyklus Anlass zur Carotinbildung geben, wie zum Beispiel die Zitronensäure. Ferner sei auch noch erwähnt, dass wir bei den ersten Versuchen mit markierter Essigsäure<sup>2</sup> gefunden hatten, dass das  $\beta$ -Carotin aus Kulturen, die auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen sind, nur rund 70 % seines Kohlenstoffbestandes aus dem Acetat ( $\text{CH}_3$ - und  $\text{COOH}$ -Gruppe) bezogen hat. Die restlichen

30 % hatten wir, da keine andere Kohlenstoffquelle vorhanden ist, einer Beteiligung des  $\text{CO}_2$  der Luft zugeschrieben. Auch diese beiden Erscheinungen stehen nicht im Gegensatz zu der vorerwähnten Hypothese. Durch die Arbeiten von STERN, SHAPIRO, STADTMAN und OCHOA<sup>1</sup> ist gezeigt worden, dass die Zitronensäure in Gegenwart von Coenzym A in Acetyl-Coenzym A und Oxalessigsäure gespalten werden kann. Die Beteiligung des  $\text{CO}_2$  der Luft an der Biosynthese der Carotinoide dürfte auch im Zusammenhang mit dem Krebschen Zyklus stehen, indem dort zweimal eine Carboxylierung stattfindet. Da ferner anzunehmen ist, dass ein Teil des in der Nährlösung vorhandenen Acetates in Pyruvat umgewandelt wird, findet auch durch das Pyruvat eine Aufnahme von  $\text{CO}_2$  statt, woraus sich dann Oxalessigsäure bzw. Äpfelsäure bildet. Auf dem Wege des Krebschen Zyklus erhalten wir somit Acetyl-Coenzym A, welches seinen Kohlenstoff zum Teil aus  $\text{CO}_2$  der Luft bezogen hat.

Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, experimentell die hier entwickelten Vorstellungen über den Gang der Biosynthese der Carotinoide, soweit sie noch nicht gesichert sind, zu bearbeiten<sup>2</sup>.

E. C. GROB und R. BÜTLER

Botanisches Institut der Universität Bern, den 8. Februar 1955.

### Summary

Our experiments up to now lead us to the hypothesis, that the biosynthesis of carotenoids may be started on acetyl-coenzyme A. The condensation of two molecules of acetyl-coenzyme A leads to acetoacetyl-coenzyme A which can be regarded as the precursor of  $\beta$ -methylcrotonic acid. For a long time the latter compound was postulated as the precursor of the natural isoprene derivatives. The participation of the citric acid cycle in the biosynthesis of carotenoids is discussed.

<sup>1</sup> J. R. STERN, B. SHAPIRO, E. R. STADTMAN und S. OCHOA, J. biol. chem. 193, 703 (1951).

<sup>2</sup> Diese Arbeiten sind mit der Unterstützung der «Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

### A Micromethod for Measuring Photosynthesis

The method elaborated by the author has a sensitivity of the order  $10^{-3} \mu\text{l}$  which permits the measurement of the gaseous metabolism in such small objects as single moss leaves a few square millimeters in area or alga filaments a few millimeters long. During the experiment, the plant material can be illuminated with light of known and changeable intensity and can be observed with at least  $150 \times$  magnification.

The technique is based on the principle of the capillary tube differential respirometer. The reaction and control chambers (the function of the latter consists in controlling temperature changes), both of the same capacity of about  $50 \mu\text{l}$ , are made as holes in a 2 mm thick brass plate. The holes are closed from below with a piece of glass fixed with "Araldite" and from above with a glass slide set on a vaseline ring. Two capillaries (with an elliptical bore) with a lumen of about  $0.02 \text{ mm}^2$  and length of about 20 cm are fixed with their bend and funnel shaped ends in the immediate vicinity of the holes (Fig. 1).

<sup>1</sup> E. C. GROB und R. BÜTLER, Exper. 10, 250 (1954); Helv. chim. Acta 37, 1908 (1954).

<sup>2</sup> E. C. GROB, W. H. SCHOPFER und G. G. PORETTI, Int. Z. Vitaminforsch. 23, 484 (1952); W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 8, 140 (1952).