

Riassunto

Vengono descritti due metodi, colorimetrico l'uno e spettrofotometrico l'altro, atti alla titolazione quantitativa dell'acido 5-idrossiindolilacetico in soluzioni pure o in eluati, da cromatogrammi su carta, di macchie costituite da acido 5-idrossiindolilacetico.

On the Formation of Coprosterol in the Intestine

Considerable confusion exists in the literature concerning the formation of coprosterol from cholesterol in the intestine.

This is primarily due to three causes:

(1) Failure of attempts to reproduce the process *in vitro* by bacteria (DAM¹).

(2) The belief that cerebroside is necessary for the process to occur (ROSENHEIM and WEBSTER²).

(3) The belief that cholestenone plays a decisive role as an intermediate (cf. ROSENHEIM and WEBSTER²).

The problem has, however, been largely clarified.

In our laboratory it has recently been shown that certain anaerobic bacteria from human feces are able to hydrogenate cholesterol in the form of a colloidal brain suspension to a very high degree (80 to 90%), *in vitro*, whereas several other such bacteria were unable to carry out the hydrogenation under the conditions of our experiments. No hydrogenation occurred with several strains of *Escherichia coli*, several clostridia and bacteroides. A germfree filtrate from human feces was also inactive. The details of this work will be published elsewhere.

Even though our substrate—a brain suspension—contained cerebroside we do not believe that these substances are essential for the observed hydrogenation of cholesterol.

One of us (DAM³) has already shown that, in man, ingested cholesterol was hydrogenated to an extent of more than 80% with diets free from cerebroside, and ROSENFELD *et al.*⁴ have carried out, with feces, the hydrogenation of a colloidal suspension of cholesterol not containing cerebroside.

The last mentioned authors have shown, by isotope studies, that cholestenone is not a necessary intermediate in the hydrogenation process. It must, therefore, be concluded that the intestinal formation of coprosterol from cholesterol occurs by direct bacterial hydrogenation.

The identification of single strains of bacteria, capable of carrying out the process, is now under investigation.

AGNETE SNOG-KJAER,
INGE PRANGE, and H. DAM

Department of Biochemistry and Nutrition, Polytechnic Institute, Copenhagen, May 17, 1955.

Zusammenfassung

Es wurde die Umwandlung von Cholesterin zu Coprosterin *in vitro* durch gewisse anaerobe Bakterien aus Kot durchgeführt.

Stämme von *Escherichia coli*, *Clostridia* und *Bacteroides* erwiesen sich als unwirksam. Die Versuche über die Identifikation der wirksamen Bakterien werden fortgesetzt.

Dosage de la procaïnesterase sérique par spectrophotométrie différentielle

R. HAZARD a montré dans une série de travaux l'intérêt que présente le dosage de la procaïnesterase sérique¹. La méthode de dosage proposée jadis repose sur la diazotation de l'acide paraminobenzoïque (apab.) libéré au cours de la réaction. Cette méthode, quoique facile à exécuter, est peu apte à des études de nature cinétique. De telles études furent néanmoins commencées² et la figure 1 montre la marche de l'hydrolyse d'après les données de HAZARD et RAVASSE (100 γ de procaïne pour 1 ml de sérum).

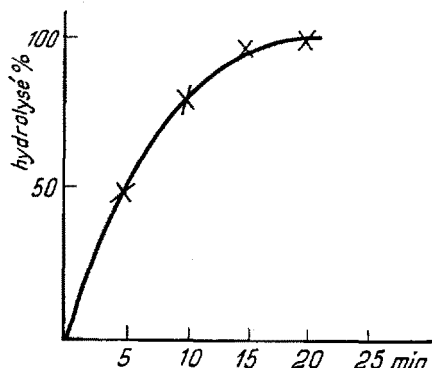


Fig. 1.

Les autres méthodes habituelles de dosage des estérases, comme la méthode manométrique d'AMMON³ et la méthode titrimétrique ne sont pas applicables⁴ à la procaïnesterase, car le pH du milieu augmente au début de l'hydrolyse. Notamment l'acide pab. est un acide faible, tandis que le diéthylaminoéthanol est une base relativement forte. La figure 2 donne les résultats d'une expérience, où le pH du milieu fut enregistré pendant 24 h à 37° (avec un pH-mètre «Radiometer», type 22, muni d'un enregistreur, électrode de verre-pont, agar-électrode de calomel saturée). Le mélange de réaction comportait 1 ml du sérum humain normal, 1 ml d'une

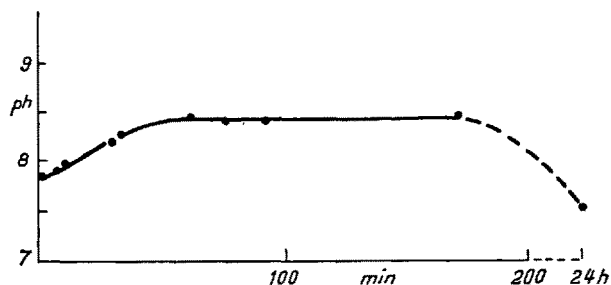


Fig. 2.

¹ H. DAM, Biochem. J. 28, 820 (1934).

² O. ROSENHEIM and T. A. WEBSTER, Biochem. J. 35, 920 (1941).

³ H. DAM, Biochem. J. 28, 815 (1934).

⁴ R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, L. HELLMAN, and T. F. GALLAGHER, Federation Proc. 13, 284 (1954). — R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, L. HELLMAN, and T. F. GALLAGHER, J. Biol. Chem. 211, 301 (1954).

¹ R. HAZARD, Presse méd. 56, 529 (1948). — R. HAZARD, P. NICAUD et A. LAFITTE, Presse méd. 57, 113 (1949). — R. HAZARD, C. BONAMY et A. CORNEC, Presse méd. 57, 1133 (1949).

² R. HAZARD et J. RAVASSE, C. r. Soc. Biol. 139, 13 (1945).

³ R. AMMON, Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1933).

⁴ L. ROBERT, B. ROBERT et M. ROBERT, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1859 (1951).

solution de procaïne à 0,02 M et 8 ml d'eau distillée. Dans 1 h le pH monte de 7,85 à 8,45, et descend après un palier long à 7,5 en 24 h. Le pH d'une même quantité de sérum dans le même volume final descend de 8 à 6,35 en ajoutant 1 ml d'une solution d'acide pab. 0,02 M.

La figure 3 montre le spectre d'absorption UV de la procaïne et de l'apab. (1 ml d'une solution aqueuse de 0,02 M, 1 ml de phosphate disodique 0,1 M, 1 ml d'eau distillée). Le tableau I donne les valeurs pour la variation du coefficient d'absorption molaire à différentes longueurs d'onde. On a admis pour ces calculs que la base libérée au cours de l'hydrolyse n'influe pas sur la variation de la densité optique.

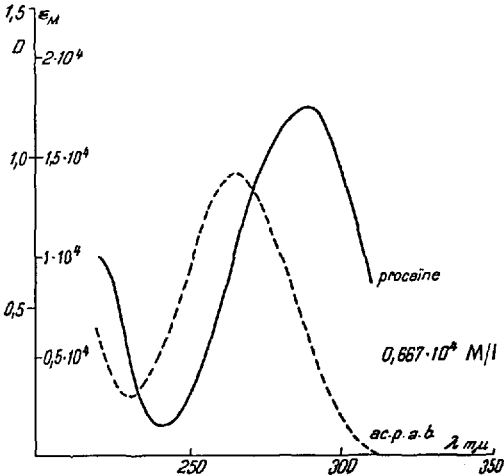


Fig. 3.

L'inspection de la figure 3 montre que la densité optique du milieu doit fortement baisser au cours de l'hydrolyse de la procaïne, si l'on se place entre 290 et 310 mμ. Pour les dosages nous avons choisi la longueur

Tableau I. Variation du coefficient d'absorption molaire au cours de l'hydrolyse de la procaïne

Longueur d'onde mμ	$\Delta \epsilon_M$
310	$0,82 \cdot 10^4$
300	$1,22 \cdot 10^4$
295	$1,28 \cdot 10^4$
290	$1,20 \cdot 10^4$
280	$0,64 \cdot 10^4$

d'onde de 295 mμ. Le tableau II donne les résultats d'une expérience effectuée sur un mélange de 1 ml d'un sérum humain, 1 ml d'une solution de procaïne à 0,02 M ainsi que sur 3 mélanges témoins contenant le sérum seul, la procaïne seule et le sérum (1 ml) avec 1 ml d'une solution d'acide pab. 0,02 M.

Tableau II. Variation de la densité optique au cours de l'hydrolyse de la procaïne par le sérum à 37°

Composition du mélange	Densité optique après		
	0 min	60 min	24 h
sérum + procaïne	0,72	0,66	0,21
sérum + acide pab.	0,21	—	0,22
sérum + eau 1 ml	0,05	0,05	0,06
procaïne + 1 ml eau	0,66	0,65	—

Pour déterminer la densité optique du mélange on prélève 0,1 ml qu'on dilue avec 5 ml de PO_4HNa_2 0,1 M et de l'eau q.s. pour 25 ml. La variation de la densité optique déterminée à 295 mμ, divisée avec $1,28 \cdot 10^4$ donne le nombre de molécules de procaïne hydrolysées. Le tableau montre que la quantité relativement importante de procaïne mise en contact avec 1 ml de sérum est complètement hydrolysée en 24 h.

L. ROBERT

Service de chimie, Faculté de Médecine, Université de Paris, le 28 avril 1955.

Summary

A method is proposed for dosage of serum procaine-sterase by differential spectrophotometry, based on the decrease of the optical density at 295 mμ in the course of the hydrolysis.

Agglutininbildung durch verschiedene Proteinfraktionen von *Salmonella ballerup*

Nukleoproteide aus verschiedenen Bakterienarten sind als antigene Substanzen mehrmals beschrieben worden¹. Es bestehen jedoch wenig quantitative Angaben über deren Antikörperbildungsvermögen, besonders bei gramnegativen Bakterien. Um ein Bild über die antigene Wirkung des sogenannten H- oder Eiweissantigens bei Salmonellen zu gewinnen, isolierten wir aus den lebenden Zellen des nicht pathogenen Stammes *S. ballerup* das Nukleoprotein auf möglichst schonende Weise. In unseren Versuchen arbeiteten wir nicht nur mit dem Nukleoprotein, sondern auch mit dessen Spaltprodukten, der Nukleinsäure und dem Nukleohiston.

Das Nukleoprotein wurde aus den frischen, 18 h alten und mit Glaspulver desintegrierten Bakterien mit alkalisiertem Wasser bei pH 8,4 extrahiert und mit Essigsäure bei pH 4,6 ausgefällt. Die Substanz wurde durch mehrmaliges Umfällen mit Essigsäure gereinigt und enthielt dann 14,4 % N, 1,04 % P und 5,1 % Asche. Die Spaltung in Nukleinsäure und die Eiweisskomponente wurde durch zweistündiges Erwärmen in 0,5prozentiger Natriumkarbonatlösung bei 55° vollzogen. Den Proteinanteil entfernte man nach SEVAG, LACKMAN und SMOLENS² durch Ausschütteln mit Chloroform. Dieses Ausschütteln wurde so lange wiederholt, bis die Nukleinsäurelösung keine Spuren von Eiweiss mehr enthielt. Durch Zerlegen des entstandenen Chloroform-Proteingels mit Alkohol erhielt man den Proteinanteil, der durch mehrmaliges Auflösen bei pH 7 mittels Natronlauge, und Fällen mit Essigsäure bei pH 5,5 von der anhaftenden Nukleinsäure gereinigt wurde. Diese Substanz enthielt 15,3 % N und 0,05 % P. Sie gab eine negative Reaktion auf Pentosen, enthielt aber auch andere Kohlenhydrate. Die positive Reaktion auf Tyrosin sowie die negative Reaktion auf Tryptophan bedeutet, dass es sich um ein Histon handeln muss.

¹ O. T. AVERY und M. HEIDELBERGER, J. Exper. Med. 38, 81 (1923). – R. C. LANCEFIELD, J. Exper. Med. 42, 377 (1925). – A. K. BOOR und C. P. MILLER, J. Exper. Med. 59, 63 (1934). – M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938). E. MIKULASZEK, L. RZUCIDTO und H. WALECKI, Med. Doświadczenia Mikrobiol. 2, 323 (1950).

² M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).