

incubation of polysaccharide with plasma produced no change in the electrophoretic distribution of polysaccharide. There was considerable species variation in the amount of bacterial polysaccharide moving with the different plasma protein fractions. Comparison of the ratios of % bacterial polysaccharide to % protein is given in the Table. *In vitro*, the pooled sera of the guinea pig showed the least binding of polysaccharide to albumin (Table). In contrast to the *in vitro* binding, a greater total as well as relative amount of both polysaccharides was found in the albumin fraction of the guinea pig, three or more hours after intravenous injection. The differences in *in vitro* and *in vivo* binding of polysaccharide to albumin was less marked in sera of mice and rabbits, whereas little difference was noted in that of the rat. In the guinea pig, mouse, and rabbit, the *in vivo* binding polysaccharide was accompanied by decreased binding to  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulins. In the guinea pig, *in vivo*, the polysaccharide bound to albumin increased from an initial 147  $\mu\text{g}/\text{mg}$  to 750  $\mu\text{g}/\text{mg}$  at 3–6 h.

It would appear that, *in vitro*, the serum and plasma of guinea pigs normally lacks some factor or factors present to a progressively greater degree in the rabbit, man, mouse, and rat. Such factors in plasma or in tissue could modify the serum proteins, the bacterial polysaccharides, or the moieties associated with either. The labeled polysaccharide bound to the different protein fractions had not been altered immunochemically since 90% of the label was removed from the plasma by precipitin tests with rabbit and guinea pig anti-*Klebsiella* plasma. Additional studies indicated that the albumin-binding is not due to a) modification of the bacterial polysaccharide by proteolytic factors in plasma, tissue or intact leukocytes, b) heparin-lipemia clearance, c) acidic mucoprotein, or d) plasma or tissue changes induced by prior injection of polysaccharide. Studies by others tend to exclude C-reactive protein<sup>9</sup> and properdin system<sup>4</sup>.

R. S. JONES

University of Utah College of Medicine, Salt Lake City, September 29, 1958.

### Zusammenfassung

Die Bindung zwischen  $\text{C}^{14}$ -markiertem Polysaccharid aus *K. pneumoniae* und Plasmaproteinen von Mensch, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Hase wurde papier-elektrophoretisch untersucht. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen Albumin und  $\text{C}^{14}$ -markiertem Polysaccharid bei der Ratte am ausgeprägtesten, beim Meerschweinchen am geringsten ist. *In vivo*-Versuche ergaben jedoch eine erhebliche Bindung zwischen Albumin und Polysaccharid in beiden Gattungen.

<sup>9</sup> P. HEDLUND, Acta med. Scandinav. 118, 329 (1944).

### Untersuchungen an saponinhaltigen Homogenaten

Durch die Zerstörung des Protoplasten bei der Homogenisation werden schwer überschaubare Verhältnisse geschaffen. Die im Homogenat suspendierten Zellorganellen werden gänzlich anderen Milieubedingungen unterworfen, die zu strukturellen Veränderungen führen und mannigfaltige Reaktionsmöglichkeiten (chemische Reaktionen,

Permeabilitätsänderungen, Adsorption, Extraktion usw.) bieten. Eine offensichtliche Möglichkeit solcher Veränderungen ist bei pflanzlichen Objekten durch das Freiwerden des Vakuoleninhaltes gegeben. Da es schwierig ist, die tatsächlich ablaufenden Reaktionen und Veränderungen in ihrer Art und in ihrem Ausmass zu erfassen, soll hier über Untersuchungen an saponinhaltigen Homogenaten als Beitrag zum Homogenisationsproblem berichtet werden.

Im Rahmen einer Arbeit<sup>1</sup> wurden die Blätter von *Viola tricolor* var. maxima hort. als Objekt für die Isolierung von Chloroplasten geprüft. Diese Pflanze gilt in der Literatur als saponinhaltig. Die Tatsache, dass Saponine infolge ihrer oberflächenaktiven Wirkung die Durchlässigkeit pflanzlicher Zellen für verschiedene Stoffe erhöhen<sup>2</sup>, lässt ähnliche Wirkungen auch an den Grenzflächen der im Homogenat suspendierten Organellen erwarten. Es wurde geprüft, ob die bei der Homogenisation frei werdenden Saponine mit Zellorganellen – besonders mit den Chloroplasten – reagieren.

Die Untersuchungen basierten auf der hämolysierenden Wirkung der meisten Saponine und der Fähigkeit vieler, mit Cholesterin und Phytosterinen nichthämolysierende Additionsverbindungen zu bilden<sup>3</sup>, die durch Behandlung mit Xylol spaltbar sind. Die Voraussetzungen zur Bildung solcher Verbindungen sind durch den Gehalt der Chloroplasten an Phytosterinen<sup>4</sup> gegeben. – Viola-Blätter wurden in 0,3 molarer Glukoselösung (Leitungswasser) homogenisiert. Aus dieser durch Glaswolle gefilterten Suspension wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 475 g im Sediment angereichert. Die Hämolysierung wurde in gepufferter Blutgelatine (Rinderblut) nach FISCHER<sup>5</sup> durchgeführt. Zur Ermittlung des Hämolysioptimums durch Viola-Saponin wurden Filtrierpapierscheibchen (0,5 cm) mit dem überstehenden des Homogenates nach Zentrifugation bei 475 g getränkt, danach getrocknet, auf Objektträgern mit gepufferter Blutgelatine übergossen und mit Deckgläsern abgedeckt. Das Saponin erwies sich als ein Stoff, der bei einem pH-Wert um 6,7 auf Rindererythrozyten seine stärkste hämolysierende Wirkung entfaltet und mit Cholesterin – die Papierscheibchen wurden 1 h in 1%iger Cholesterinlösung (Äther-Äthanol 1:1) gekocht – eine nichthämolysierende Verbindung eingeht, die durch Kochen mit Xylol (2 h am Rückfluss) wieder gespalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass ätherlösliche Stoffe (Phytosterine usw.) aus den plastidenhaltigen Sedimenten in gleicher Weise mit dem Saponin reagieren wie Cholesterin.

Nun wurde geprüft, ob dieses Saponin mit den Chloroplasten im Homogenat reagieren kann. Hierzu wurde ein Homogenat vor der Zentrifugation 30 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurde abzentrifugiert und das Sediment gründlich mit Glukoselösung und zuletzt mit destilliertem Wasser zur völligen Entfernung gelösten Saponins nachgewaschen. Nach Trocknung wurde ein Teil dieses Präparates direkt in Blutgelatine eingebettet, der andere Teil wurde 2 h mit wenig Xylol am Rückfluss gekocht, mit Äther gewaschen, getrocknet und ebenfalls in Blutgelatine übergeführt. Nur im letzten Fall liess sich eine positive Hämolysie beobachten. Dieses Resultat spricht also für eine Reaktion des Saponins mit den Chloroplasten. Untersuchungen von KE und CLENDEN-

<sup>1</sup> H. KERN, Diss. Münster 1956; Protoplasma (im Druck).

<sup>2</sup> O. B. MUTHU, Protoplasma 18, 141 (1953).

<sup>3</sup> A. WINDAUS, Ber. dtsh. chem. Ges. 42, 238 (1909).

<sup>4</sup> E. RABINOWITCH, Photosynthesis and Related Processes (New York 1945).

<sup>5</sup> R. FISCHER, Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, mathem. naturw. Kl. Abt. I 139, 321 (1930).

NING<sup>6</sup>, wonach Saponine bei isolierten Chloroplasten eine starke Hemmung der Hill-Reaktion bewirken, unterstützen dieses Ergebnis. Nach Ansicht dieser Autoren liegt der Wirkort dieser Hemmung in den Granalamellen der Plastiden.

In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde nur eine der vielen Reaktionsmöglichkeiten in Homogenaten näher analysiert und wahrscheinlich gemacht. Bei der Auswahl von Objekten für die Isolierung von Zellorganellen sollte mehr als bisher auf solche Pflanzeninhaltsstoffe geachtet werden, die unnötige Komplikationen mit sich bringen könnten.

H. KERN

Botanisches Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. Westf., 27. Oktober 1958.

### Summary

These investigations are a contribution to the study of problems caused by homogenisation. It is shown that saponines in homogenates of leaves of *Viola tricolor* really react with the suspended chloroplasts.

<sup>6</sup> B. KE und K. A. CLENNING, Biochim. biophys. Acta 19, 74 (1956).

## Sulla biochimica della fermentazione citrica da parte dell'*Aspergillus niger*

### III<sup>o</sup> Attività ossalacetico-decarbossilasica

Il crescente accumulo di acido citrico che si verifica nel mezzo colturale allorché un ceppo selezionato di *Aspergillus niger* viene coltivato in terreno sintetico Bernhauer, come abbiamo esposto in una nota precedente<sup>1</sup>, presuppone una crescente disponibilità endogena di acido ossalacetico. Quest'ultimo infatti, come è stato dimostrato in altri eumiceti, è il precursore immediato dell'aceto citrico a cui dà origine condensandosi coll'acido acetico. Il meccanismo di formazione dell'acido ossalacetico è tuttora discusso. Per questo motivo abbiamo ritenuto opportuno continuare lo studio, nel nostro ceppo di *Aspergillus niger*, delle attività enzimatiche connesse con questo metabolita.

Nella ricerca oggetto di questa nota abbiamo esaminato in particolare la variazione dell'attività ossalacetico-decarbossilasica durante l'accumulo di acido citrico.

Le condizioni culturali del ceppo di *Aspergillus niger* e la preparazione dell'estratto enzimatico acellulare sono quelle descritte in una nota precedente<sup>2</sup>.

L'attività ossalacetico-decarbossilasica dell'estratto enzimatico veniva misurata manometricamente al WARBURG<sup>3</sup>, misurando la CO<sub>2</sub> liberatasi, a pH = 5,4 in tampone acetato 10<sup>-1</sup> M, dalla decarbossilazione enzimatica dell'acido ossalacetico aggiunto<sup>4</sup>.

L'acido citrico veniva dosato col metodo di SAFFRAN *et al.*<sup>5</sup>.

Nella Tabella sono esposti i valori dell'attività ossalacetico-decarbossilasica (espressa in  $\mu$ l CO<sub>2</sub>/mg N proteico, in 20 min) relativi ai due miceli ottenuti dopo 30 h e dopo 48 h di crescita in terreno di Bernhauer.

| Attività ossalacetico-decarbossilasica |                              | Acido citrico nel mezzo colturale |        |
|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------|
| 30 h                                   | 48 h                         | 30 h                              | 48 h   |
| 29,3 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 64,0 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 3,5 mg                            | 160 mg |
| 22,5 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 43,5 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 2,0 mg                            | 184 mg |
| 25,5 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 54,4 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 4,1 mg                            | 144 mg |
| 27,0 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 65,2 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 3,2 mg                            | 207 mg |
| 26,5 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 55,0 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 2,9 mg                            | 180 mg |
| media:                                 |                              |                                   |        |
| 26,1 $\mu$ l CO <sub>2</sub>           | 56,4 $\mu$ l CO <sub>2</sub> | 3,1 mg                            | 175 mg |

I risultati esposti nella Tabella indicano che nell'intervallo di tempo 30 h a 48 h di coltura l'attività ossalacetico-decarbossilasica dell'*Aspergillus niger* aumenta in grado notevole contemporaneamente all'accumulo di acido citrico nel mezzo colturale.

Per spiegare queste osservazioni è utile considerare anche quanto abbiamo già esposto, e cioè che l'accumulo di acido citrico nel mezzo presuppone una maggiore disponibilità di acido ossalacetico. Questa non può, nel nostro ceppo, essere il risultato di una aumentata attività di un meccanismo ciclico tricarbossilico (o bicarbossilico, eventualmente presente), né di un meccanismo transaminasico. Infatti, durante l'accumulo di acido citrico nel mezzo, l'attività aspartico-glutamico transaminasica (fornente acido ossalacetico) rimane praticamente costante, e quella succinico-deidrogenasica (obbligatorio in ambedue i cicli – tricarbossilico e bicarbossilico – per la formazione di acido ossalacetico) diminuisce notevolmente<sup>1</sup>.

Tra le attività studiate e connesse col metabolismo dell'acido ossalacetico, la sola che aumenta contemporaneamente all'accumulo di acido citrico nel mezzo, è l'attività ossalacetico-decarbossilasica.

Ora se tale attività si svolgesse nel nostro ceppo decarbossilando l'acido ossalacetico, lo sottrarrebbe alla biosintesi dell'acido citrico, e quindi non potremmo spiegare come un aumento di tale attività possa accompagnarsi ad un aumento di acido citrico nel mezzo.

A nostro parere, le osservazioni e i dati sperimentali sopraesposti potrebbero invece esser spiegati ammettendo che l'attività ossalacetico-decarbossilasica, da noi dosata, sia indice di una attività enzimatica svolgentesi nel nostro ceppo in senso inverso, cioè in senso carbossilante l'acido piruvico, con conseguente formazione di acido ossalacetico. Altri autori del resto ritengono che nei microrganismi l'ossalacetico-decarbossilasi intervenga nella catalisi di tale carbossilazione<sup>6-8</sup>. Tale ipotesi potrebbe spiegare come una aumentata attività ossalacetico-carbossilasica, determinando una maggiore sintesi di acido ossalacetico, si accompagni ad un crescente accumulo di acido citrico nel mezzo. A meno che l'acido citrico non possa formarsi attraverso qualche via metabolica non implicante l'acido

<sup>1</sup> V. MORET e M. LORINI, Exper. 14, 359 (1958).

<sup>2</sup> V. MORET e M. LORINI, R. C. Accad. Lincei 23, 77 (1957).

<sup>3</sup> D. HERBERT, in: *Methods in Enzymology*, vol. I (Academic Press Inc., Publishers, New York 1955), p. 753.

<sup>4</sup> Le 30  $\mu$ M di acido ossalacetico aggiunte per ogni prova enzimatica, venivano sciolte e portate a pH = 5,4 con NaOH immediatamente prima dell'uso.

<sup>5</sup> M. SAFFRAN e O. F. DEUSTEDT, J. biol. Chem. 175, 849 (1948).

<sup>6</sup> J. W. FOSTER e J. B. DAVIS, J. Bacteriol. 56, 329 (1948).

<sup>7</sup> M. F. UTTER e H. G. WOOD, Adv. Enzymol. 12, 41 (1951).

<sup>8</sup> L. O. KRAMPITZ e C. H. WERKMAN, Biochem. J. 35, 595 (1941).