

NING⁶, 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.

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

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

III^o 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 precedente¹, 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 precedente².

L'attività ossalacetico-decarbossilasica dell'estratto enzimatico veniva misurata manometricamente al WARBURG³, misurando la CO₂ liberatasi, a pH = 5,4 in tampone acetato 10⁻¹ M, dalla decarbossilazione enzimatica dell'acido ossalacetico aggiunto⁴.

L'acido citrico veniva dosato col metodo di SAFFRAN *et al.*⁵.

Nella Tabella sono esposti i valori dell'attività ossalacetico-decarbossilasica (espressa in μ l CO₂/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 μ l CO ₂	64,0 μ l CO ₂	3,5 mg	160 mg
22,5 μ l CO ₂	43,5 μ l CO ₂	2,0 mg	184 mg
25,5 μ l CO ₂	54,4 μ l CO ₂	4,1 mg	144 mg
27,0 μ l CO ₂	65,2 μ l CO ₂	3,2 mg	207 mg
26,5 μ l CO ₂	55,0 μ l CO ₂	2,9 mg	180 mg
media:			
26,1 μ l CO ₂	56,4 μ l CO ₂	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 notevolmente¹.

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 carbossilazione⁶⁻⁸. 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

¹ V. MORET e M. LORINI, Exper. 14, 359 (1958).

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

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

⁴ Le 30 μ M di acido ossalacetico aggiunte per ogni prova enzimatica, venivano sciolte e portate a pH = 5,4 con NaOH immediatamente prima dell'uso.

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

⁶ J. W. FOSTER e J. B. DAVIS, J. Bacteriol. 56, 329 (1948).

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

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

ossalacetico, o comunque diversa da quelle classiche conosciute per il metabolismo microbico e animale.

M. LORINI e V. MORET

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Padova, il 3 novembre 1958.

Summary

In a strain of *Aspergillus niger* grown in Bernhauer medium, oxalacetic decarboxylase activity increased, while citric acid accumulated in the medium. The mechanism of citric acid accumulation is discussed.

Protein Turnover in Glycine-C¹⁴-labelled Landschütz Ascites Tumor Cells

Previous investigations in this laboratory¹ showed that the protein of the tetraploid Ehrlich ascites carcinoma exhibits different degrees of metabolic stability depending on the radioactive amino acid used for labelling. Methionine-S³⁵-labelled protein remained 'stable' during the growth of the tumor, whereas glycine-C¹⁴-labelled protein lost about 67% of its activity during this time. Moreover, the behaviour of methionine-labelled protein in the hyperdiploid Ehrlich-Landschütz ascites tumor was of a third type, showing instability only during the first few days of growth. The present experiments were designed to afford a detailed study of the metabolic stability of glycine-labelled protein in Landschütz ascites cells.

Glycine-2-C¹⁴ and generally labelled leucine- and valine-C¹⁴, all having specific activities of 64–69 $\mu\text{C}/\text{mg}$, were administered intraperitoneally in 0.1 ml of isotonic saline. Usually 5 μC were injected per mouse 6–7 days after inoculation with the tumor, and the ascitic fluid was collected 2 days later.

Mice were inoculated with 0.15 ml of undiluted ascitic fluid, labelled as described above, and sacrificed at various times thereafter. The criterion of metabolic stability was that used in earlier studies^{1,2}, namely the relative constancy of the product of free tumor cells/mouse $\times$ specific activity of the tumor cell protein – a valid criterion since the amount of intracellular protein per cell does not change during the experiment^{3,4}. The number of tumor cells in the original inoculum and per mouse on subsequent days was determined by counting in a Buerker haemocytometer⁵ or in a Casella automatic particle counter and sizer, results of the two counting methods agreeing closely. Chemical preparations and measurements of radioactivity were carried out as described previously^{6,7}.

The loss of radioactivity from the glycine-labelled protein was continuous with time and approximately linear (Table I), amounting to 7.8%/day. This value falls between that reported for the early stages of growth of the

Table I

Metabolic Stability of Cell Protein During Tumor Growth
Relative Product:
Cells/mouse $\times$ Protein Specific Activity $\pm$ Standard Error

Days After Inoculation	Glycine-Labelled*	Valine-Labelled**	Leucine-Labelled**
0	100	100	100
4	62 $\pm$ 6	62 $\pm$ 9	64 $\pm$ 9
8	38 $\pm$ 4	36 $\pm$ 19	47 $\pm$ 12

* Four experiments.

** Two experiments.

glycine-labelled TA3 ascites tumor⁸ and that given for the later stages of the glycine-labelled Ehrlich tetraploid line¹. Protein labelled with valine or leucine also showed metabolic instability (Table I), but values were more variable; this instability was at least as great as that exhibited by methionine-labelled protein in Landschütz cells¹.

Table II

Distribution of Radioactivity in Glycine-Labelled Tumor

Cells (89%–99%)*	Protein Nucleic Acid Acid-Soluble	58%–62% 35%–41% 1%–3%
Serum (1%–11%)*	Protein Acid-Soluble	82%–95% 5%–18%

* % of total tumor activity.

The distribution of radioactivity within glycine-labelled tumors is given in Table II. Most of the serum activity was found in the protein fraction, suggesting that some or all of the activity lost by the protein left the cells in the form of intact protein, either by cell rupture or through the cell membrane. The former possibility would bring about a constant apparent instability of all cellular constituents (viz., DNA, RNA, protein), which is not the case¹. The latter possibility was ruled out in the following manner.

Since the mice were inoculated with intact labelled tumor, the inoculum contained a considerable amount of radioactive serum protein. It was first shown that the serum protein activity/mouse 8 days after inoculation was much less than that on day 0. Then an experiment was carried out in which the ascites cells and serum were separated by centrifugation, the cells washed in Krebs-Ringer phosphate buffer, and a suspension of cells in buffer injected. Control mice were injected with a volume of intact ascitic fluid containing the same number of tumor cells. Measurements at several stages of growth showed that the specific, as well as the total activity of the serum protein was much lower in the group which had received cells suspended in buffer. Moreover, it had been shown that the activity lost by the cells of the Landschütz tumor was taken up, but not accumulated, by the tissues of the host, the specific activity of the liver being closer to that of the total carcass than any other organs⁴. Therefore, in the previous experiment, comparison of the specific activities of liver protein and ascites serum protein was made in the groups inoculated with intact tumor

¹ A. FORSSBERG and L. RÉVÉSZ, *Biochim. biophys. Acta* 25, 165 (1957).

² L. RÉVÉSZ, A. FORSSBERG, and G. KLEIN, *J. nat. Cancer Inst.* 17, 37 (1956).

³ L. LEDOUX and S. H. REVELL, *Biochim. biophys. Acta* 18, 416 (1955).

⁴ J. S. FINLAYSON and A. FORSSBERG, Unpublished observations.

⁵ G. KLEIN and L. RÉVÉSZ, *J. nat. Cancer Inst.* 14, 229 (1953).

⁶ A. FORSSBERG and G. KLEIN, *Exp. Cell Res.* 7, 480 (1954).

⁷ A. FORSSBERG, J. S. FINLAYSON, and G. DREYFUS, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

⁸ J. GREENLEES and G. A. LE PAGE, *Cancer Res.* 15, 256 (1955).