

The production of fusaric acid by the parent and mutant strains was studied by the agar-cup technique with *Escherichia coli* (Davis strain 113-3) as the test organism. It has been shown that the doubly virulent partial requirer of nicotinic acid produced approximately twice the amount of fusaric acid as the normal parent strain. On the other hand, only traces of fusaric acid could be detected by chromatography on paper<sup>2</sup> with butanolacetic acid-water as solvent in PABA requirer.

The biochemical variations of the mutant strains from the parent strain and the chemical nature of the blue pigment are being worked out in detail<sup>3</sup>.

**Zusammenfassung.** Von *Fusarium vasinfectum* Atk. wurden nach Behandlung mit salpetriger Säure zwei auxotrophe Mutanten isoliert. Die eine ist Niacin-hetero-

troph und erweist sich als doppelt virulent, verglichen mit der Wildform. Die andere Mutante benötigt *p*-Aminobenzoessäure und ist nicht pathogen. Die Pathogenität der Mutanten scheint mit der Produktion von Fusarsäure parallel zu laufen.

K. RAMAKRISHNA RAO and  
E. R. B. SHANMUGASUNDARAM

University Biochemical Laboratories, Madras (India),  
October 6, 1965.

<sup>3</sup> Acknowledgment: The authors wish to thank Dr. RADHA SHANMUGASUNDARAM for critical discussions.

### Nucleotidsynthese und Kohlenhydratstoffwechsel in Hämolysaten

In früheren Arbeiten<sup>1-3</sup> wurde über Herstellung und Eigenschaften eines Hämolysats aus menschlichen Erythrocyten berichtet, in welchem die Fähigkeit der intakten Erythrocyten, Purinnucleosid-triphosphate aus Nucleosiden (bzw. aus R5P und Purin) zu synthetisieren, unvermindert erhalten geblieben ist. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass auch die glykolytische Wirksamkeit der Erythrocyten dem Eingriff einer vorsichtigen Hämolyse standhält. Jedoch wird die Aktivität beider Reaktionssysteme wesentlich beeinflusst durch die Zusammensetzung der Reaktionsmischung. Mitbestimmend sind vor allem die Natur der zugesetzten Substrate, Versuchs-pH und individuelle Zusammensetzung der verwendeten Blutprobe. Variiert einer dieser Faktoren, so gehen ATP- und Laktatgehalt durchaus nicht immer parallel; unter bestimmten Bedingungen bewegen sie sich sogar in entgegengesetzter Richtung. Dieser überraschende Befund bildet den Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Die Tabelle zeigt, wie sich ATP- und Laktatgehalt unter der Einwirkung verschiedener Substrate ändern.

Nach Inkubation mit R5P steigt der ATP-Gehalt der Mischung auf über das Dreifache an (ca. 100  $\mu$ Mol/100 ml Blut). Weniger stark ATP-bildend wirkt FDP; noch schwächer, immerhin eindeutig positiv, freie Hexose. Die HMP führen dagegen zu einer drastischen Verminderung des ATP. Gleichzeitig steigt AMP an. Dieses Ergebnis wurde bisher in allen unseren Versuchen bestätigt. Der AMP-Zuwachs übertrifft noch die Menge des dephosphorylierten ATP. R5P, FDP und Hexosen ändern den AMP-Gehalt wenig. Der Gesamtgehalt an Adeninnucleotiden wird durch R5P wesentlich gesteigert, nicht aber durch die anderen Substrate. Offenbar findet eine Pentosephosphatbildung aus Hexosephosphaten unter den gegebenen Bedingungen nicht in nennenswertem Masse statt.

Das nach <sup>3</sup> bereitete Hämolysat enthält nur wenig Milchsäure. R5P ruft eine kräftige Laktatbildung hervor. Noch mehr Laktat entsteht nach HMP-Zusatz, wobei allerdings zu beachten ist, dass stöchiometrisch die Laktatbildung aus HMP um  $\frac{1}{6}$  grösser sein muss als die aus R5P. Bei FDP ist die Glykolyse nur halb so stark; noch

geringer bei den Hexosen. Das Verhalten der Hexosen ändert sich aber vollständig nach Zugabe von Hexokinase; Laktat steigt an; ATP zeigt den für HMP charakteristischen Abfall bei entsprechendem AMP-

Einfluss verschiedener Metabolite auf die Adeninnucleotid- und Laktatbildung

Nr	Substrat	AMP	ATP	Laktat	ATP/ Laktat
0	Hämolysat, nicht inkub.	4,5	30,0	30	1,000
1	Ribose-5-phosphat	+ 0,5	+ 72,0	+ 330	0,283
2	Glukose	+ 2,2	+ 9,0	+ 130	0,244
3	Fruktose	+ 2,0	+ 5,0	+ 100	0,269
4	Glukose-1-phosphat	+ 27,0	- 18,0	+ 460	0,024
5	Glukose-6-phosphat	+ 37,0	- 20,0	+ 380	0,024
6	Fruktose-6-phosphat	+ 19,5	- 18,4	+ 360	0,029
7	Fruktose-1,6-diphosphat	- 0,5	+ 23,5	+ 200	0,232
8	3-Phosphoglycerat	- 0,2	+ 15,0	+ 70	0,450

Die Reaktionsmischung enthält in einem Gesamtvolumen von 12 ml 10 ml Hämolysat<sup>1</sup> aus 5 ml Aderlassblut, sowie folgende Substanzen in  $\mu$ Mol pro 1 ml Hämolysat: 7,2 Merkaptoäthanol; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 4,8 Phosphat pH 7,4; 0,6 Adenin; 6,0 R5P bzw. eines der anderen Substrate. Inkubation 1 h bei 37°C. Trennung der Nucleotide über Dowex 1; ihre spektrophotometrische Bestimmung<sup>2</sup>. Die Zahlen sind Mittelwerte aus Blut vier verschiedener Individuen, ausgedrückt in  $\mu$ Mol/100 ml Blut. In Zeile 1-8 sind die Zunahme bzw. Abnahme von AMP, ATP und Laktat gegenüber dem zugehörigen Anfangswert angegeben. Laktat wurde nach HOHORST<sup>4</sup> bestimmt.

Abkürzungen: AMP, Adenosin-5-monophosphat; ADP, Adenosin-5-diphosphat; ATP, Adenosin-5-triphosphat; Gl-1-P, Glukose-1-phosphat; Gl-6-P, Glukose-6-phosphat; F-6-P, Fruktose-6-phosphat; FDP, Fruktose-1,6-diphosphat; 3-PG, 3-Phosphoglycerat; HMP, Hexosemonophosphat; R5P, Ribose-5-phosphat.

<sup>1</sup> W. KLEIN und E. BERETTA, Boll. Soc. It. Biol. sper. 39, 1722 (1963).

<sup>2</sup> W. KLEIN und E. BERETTA, Abstr. 6. Int. Cong. Biochem., New York 1964.

<sup>3</sup> W. KLEIN, Z. physiol. Chem. 338, 168 (1964).

<sup>4</sup> H. J. HOHORST, Biochem. Z. 328, 509 (1957).

Anstieg. Die ATP Laktatwerte erreichen bei HMP nur rund 10% der Werte bei den übrigen Substraten.

Die hervorragende Bedeutung des ATP für die Glykolyse mag zu der Vorstellung verleiten, dass der qualitativen Abhängigkeit der Glykolyse von der Gegenwart des ATP auch eine quantitative entsprechen müsste im Sinne einer Proportionalität mit der ATP-Konzentration. Dass dies nicht der Fall ist, geht aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervor. Wird dem beschriebenen «aktiven Hämolytat»<sup>3</sup> HMP als Substrat zugesetzt, so folgt eine kräftige Laktatbildung, obwohl sich das anfangs vorhandene ATP schnell auf einen geringen Bruchteil reduziert. Die mit dem ATP-Abfall verbundene AMP-Anhäufung zeigt, dass es sich um die Abspaltung der beiden energiereichen Phosphatreste handelt; die Nucleosidmonophosphatsynthese bleibt ungestört. Wird als Substrat aber FDP verwendet, so erreicht die Laktatkonzentration kaum die Hälfte des «HMP-Laktats», während ATP ansteigt. Variiert anstelle des Substrats das Versuchs-pH, etwa durch Verschiebung von 7,5 auf 8,1, so steigt die Laktatbildung auf ihr Maximum; indessen sinkt der ATP-Gehalt. Auch hier erhöht sich der AMP-Gehalt<sup>3</sup>. Der pH-Effekt beruht in erster Linie auf einer Aktivitätssteigerung der Hexokinase, welche bei den HMP-Versuchen aber keine Rolle spielen kann. Schliesslich lässt der Vergleich der Blutproben verschiedener Individuen gelegentlich starke Abweichungen zwischen ATP-Gehalt und Milchsäurebildung erkennen. In einer unserer Proben war beispielsweise eine sehr aktive Glykolyse von einem geringen ATP-Gehalt begleitet, in

einer anderen eine mittelmässige glykolytische Aktivität von einer überdurchschnittlichen ATP-Ansammlung.

Wir kommen also zu dem Ergebnis, dass im frischen Hämolytat ATP-Gehalt und Milchsäurekonzentration Einflüssen zugänglich sind, die ihr gegenseitiges Verhältnis weitgehend bestimmen, und dass daher die ATP-Konzentration nicht in allen Fällen geschwindigkeitsbestimmend für die Glykolyse ist. Das von Tsuboi<sup>5</sup> auf Grund seiner Versuche mit konserviertem Blut erhobene Postulat, dass die Glykolyse von der ATP-Konzentration abhängig sei, behält daher seine Gültigkeit nur innerhalb gewisser Grenzen.

Die zu einer Erklärung obiger Befunde notwendige Überprüfung weiterer Reaktionsteilnehmer ist im Gange.

**Summary.** A hemolysate of human red cells with intact capacity for ATP-synthesis and glycolysis was incubated with some glycolytic substrates plus adenine. ATP and lactic acid levels did not always vary in the same direction. HMP caused an extensive formation of lactic acid accompanied by a loss of ATP<sup>6</sup>.

W. KLEIN und E. BERETTA

*Laboratorio Enzimi, Soc. Italiana Prodotti Schering. Milano (Italia), 1. November 1965.*

<sup>5</sup> K. K. Tsuboi, J. biol. Chem. 240, 582 (1965).

<sup>6</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der 8. Lateinischen Tagung für Biochemie in Lissabon (19. bis 26.9.1965) vorgetragen.

### Phytochemical Studies. Isolation of 5-Ethyltropolone from *Libocedrus formosana*<sup>1</sup>

The genus *Libocedrus* (Family Cupressaceae, tribe Thujoideae) is a rich source of seven-membered ring compounds<sup>2</sup>. Some years ago an investigation of the heartwood components of *Heyderia formosana* (Florin) Li (= *Libocedrus formosana* Florin) revealed the presence of both shonanin and thujic acids<sup>3</sup>. Later, a screening of the *n*-hexane extract detected  $\beta$ - and  $\gamma$ -thujaplicin,  $\beta$ -thujaplicinol, and two additional but unidentified tropolones<sup>4</sup>. The unknown compound with the lowest polarity value (Rf 0.06; support, phosphoric acid impregnated cellulose powder; eluent, *n*-hexane; developer, dilute ferric chloride solution) formed a copper complex salt that was recrystallized from chloroform to furnish green crystals, m.p. 279–280° (decomposition). Treatment of the copper chelate with dilute sulfuric acid gave the pure tropolone, which was sublimed (60°/30 mm) to afford prisms, m.p. 79–80°. The compound analyzed for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> (found: C, 72.17; H, 6.73; calculated: C, 71.98; H, 6.71). The mass spectrum confirmed the molecular weight of 150 (parent ion) and showed the strongest fragmentation peak at 117 (loss of both carbon monoxide and methyl), with lesser peaks at 135 (loss of methyl), 122 (loss of carbon monoxide or ethylene) and 77 (phenyl ion)<sup>5</sup>. The IR-spectrum in potassium bromide revealed absorptions at 3220 (hydrogen-bonded hydroxyl), 1617 (conjugated carbonyl), and 1605, 1545, and 1280 cm<sup>-1</sup> (conjugated triene). The UV-spectrum in isooctane contained maxima at 224 (4.38), 240 (4.28, inflection), 248 (4.16, inflection),

311 (3.92 shoulder), 323 (3.96), 358 (3.76), and 376 nm (3.66) (log  $\epsilon$ ). The three initial and intense extinction bands occur in the typical tropolone 'region A', while the next four and weaker absorptions are in 'region B'. The UV-data observed here are almost identical to the reported values for  $\gamma$ -thujaplicin, but not for  $\beta$ - or  $\alpha$ -thujaplicin<sup>6,7</sup>. The nuclear magnetic resonance spectrum in deuteriochloroform with tetramethylsilane as an internal standard possessed peaks centered at 8.71 (area one, hydroxyl proton), 7.26 (area four, aromatic protons), 2.64 (area two, quartet, methylene protons), and 1.23 ppm (area three, triplet, methyl protons). The aromatic absorption existed as a single peak, suggestive of a possible symmetrical molecule.

The foregoing information appears to strongly support the formulation of this particular compound as 5-ethyltropolone. Fortunately, all three possible isomeric ethyl-

<sup>1</sup> For the previous paper in this series see: Y.-T. LIN, K.-T. WANG, and B. WEINSTEIN, Chem. Commun., 592 (1965).

<sup>2</sup> R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen* (Birkhäuser Verlag, Basel 1962), vol. 1, p. 347, 365, 366.

<sup>3</sup> Y.-T. LIN, T.-B. LO, and Y.-S. CHENG, J. Chinese chem. Soc., Taiwan 7, 166 (1960).

<sup>4</sup> Y.-T. LIN and K.-T. LIU, J. Chinese chem. Soc., Taiwan 10, 156 (1963).

<sup>5</sup> J. M. WILSON, M. OHASHI, H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI, S. ITO, and T. NOZOE, Tetrahedron 19, 2247 (1963).

<sup>6</sup> W. VON E. DOERING and L. H. KNOX, J. Am. chem. Soc. 74, 297 (1953).

<sup>7</sup> H. ERDTMAN and J. GRIPENBERG, Acta chem. scand. 2, 625 (1948).