

succinate on Anakrom AB 110/120 at 180 °C. All the lipid methods have been previously described<sup>11</sup>.

The probabilities that differences in the data were due to chance were calculated by the *t* test.

**Results and discussion.** As indicated in Tables I and II, although the long term administration of a 15% safflower oil-containing diet resulted in a 2-3-fold increase in the percentage of linoleic acid in the livers of both the LAF<sub>1</sub>J and the C3H/HeJ strains of mice, the levels of thiobarbituric acid reacting substances (expressed as malonyl dialdehyde) were not increased as compared to the groups on the hydrogenated coconut oil-containing diet or the groups with no added fat. The longevity of the safflower oil fed mice was also not significantly affected as compared to the other 2 groups.

In one previous investigation the addition of oxidized hog fat to the diet of rats resulted in a significant weight loss<sup>12</sup>. The weight curves of the mice in the present experiment and the terminal body weights given in Table I indicate that the safflower oil-containing diet did not result in a lower rate of weight gain or a loss of weight in either of the mouse strains.

The results of this investigation, therefore, do not support the hypothesis that a moderate increase in dietary unsaturated fat has a deleterious effect on the organism. The effects of the administration of high concentrations of fatty acid oxidation products to animals, as has been done in some previous studies<sup>5,7,12</sup> cannot justifiably be extrapolated to implicate unaltered dietary unsaturated fat as producing increased neoplastic and degenerative

disease and decreased longevity. Although the tissue levels of unsaturated fat are increased, they either do not have an increased susceptibility to oxidation in vivo, as has been suggested<sup>13</sup>, or if peroxides and free radicals are formed they are so rapidly metabolized so as not to have an adverse effect<sup>14</sup>.

**Zusammenfassung.** Mäuse, die während des ganzen Lebens Nahrung mit 15% Saffblumenöl aufnahmen, zeigten eine Steigerung des Linolsäuregehaltes der Leber. Dieses Futter blieb ohne Wirkung auf die Höhe der Oxydationsprodukte, Gewichtskurven oder Langlebigkeit der Versuchstiere, dies im Gegensatz zu Mäusen, die im Futter 15% gehärtetes Kokosnussöl oder kein zusätzliches Fett bekamen.

R. J. MORIN

*Departments of Pathology, Los Angeles County Harbor General Hospital, Torrance (California 90509) and the U.C.L.A. School of Medicine, Los Angeles (California, USA), 10 July 1967.*

<sup>11</sup> R. J. MORIN, Cancer Res. 25, 118 (1965).

<sup>12</sup> H. KAUNITZ, Arch. Exp. Path. Pharmak. 220, 116 (1953).

<sup>13</sup> D. HARMAN, Lancet 2, 1116 (1957).

<sup>14</sup> This investigation was supported by Grant No. P-364 from the American Cancer Society.

### Zur Kenntnis der Blattlipide von *Acer platanoides* L. während der herbstlichen Vergilbung

Die herbstliche Vergilbung gewisser Laubbäume ist mit einer chemischen Veränderung der Blattlipide verbunden, welche nach den bisherigen Untersuchungen durch zwei Erscheinungen gekennzeichnet ist. Einerseits werden neue Verbindungen gebildet, die im grünen Blatt nicht vorkommen. Zu diesen gehören eine Reihe von Xanthophyll-estern<sup>1-3</sup>. Anderseits beobachtet man eine deutliche Verminderung gewisser Lipidkomponenten, wie des  $\beta$ -Carotins und der ungesättigten Fettsäuren<sup>4</sup> oder sogar ein vollständiges Verschwinden wie im Falle des Chlorophylls. Verschiedene Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass das Chlorophyll zwar entfärbt, aber nicht vollständig abgebaut wird. FISCHER et al.<sup>5</sup> und HROMATKA et al.<sup>6</sup> haben nämlich seinerzeit gefunden, dass beim Abbau des Chlorophylls der Phytolrest erhalten bleibt, konnten aber über dessen Bindungsform keine weiteren Angaben machen.

Im Zuge unserer Untersuchungen über die Lipide vergilbender Blätter haben wir uns mit dem weiteren Schicksal des Phytols näher befasst. Bei der Auftrennung von Lipidextrakten aus gelben Blättern von *Acer platanoides* L. auf DC-Platten konnten wir freies Phytol nur nach vorheriger alkalischer Verseifung nachweisen. Dies deutet, dass Phytol in diesen Blättern nur als Ester vorliegt. Zu seiner Identifizierung bedienten wir uns eines natürlichen Präparates<sup>7</sup>, wobei die Alkohole in freier Form und als 3,5-Dinitrobenzoate auf DC-Platten chromatographiert wurden. Durch präparative Trennung des Lipidextraktes auf Dünnschichtplatten gelang es, die

phytolhaltige Verbindung anzureichern. Nach alkalischer Verseifung wurden die Hydrolyseprodukte identifiziert und quantitativ bestimmt. Die Alkoholkomponente, zur Hauptsache aus Phytol bestehend, wurde nach der Methode von WEIGEL<sup>8</sup> bestimmt. Die Säurekomponente wurde als Methylester im Phasenumkehrverfahren auf DC-Platten und gaschromatographisch untersucht, und war identisch mit Linolensäure ( $\Delta^{9,12,15}$ -Octadecatriensäure). Zur quantitativen Bestimmung wurde ein von ROTHBLAT et al.<sup>9</sup> für Squalen verwendetes und nach unseren Erfahrungen auf Polyensäuren übertragbares Verfahren verwendet.

Da die beiden Komponenten fast rein und in nahezu äquimolaren Mengen vorliegen (Tabelle I), schliessen wir, dass dieser Ester aus Phytyllinolaten besteht.

Nachdem in Herbstblättern wiederholt Ester der Linolensäure nachgewiesen wurden<sup>1-3</sup>, die in grünen

<sup>1</sup> W. EICHENBERGER und E. C. GROB, Helv. chim. Acta 46, 2411 (1963).

<sup>2</sup> K. EGGER, Ber. dt. bot. Ges. 77, 145 (1964).

<sup>3</sup> K. EGGER und U. SCHWENKER, Z. Pfl. Physiol. 54, 407 (1966).

<sup>4</sup> W. EICHENBERGER und E. C. GROB, Helv. chim. Acta 48, 1194 (1965).

<sup>5</sup> F. G. FISCHER und H. BOHN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 611, 224 (1957).

<sup>6</sup> O. HROMATKA, W. BROLL und L. STENTZEL, Mh. Chem. 89, 126 (1958).

<sup>7</sup> Der Firma F. Hoffmann-La Roche AG., Basel, danken wir für die freundliche Überlassung von Vergleichspräparaten.

<sup>8</sup> W. WEIGEL, Pharmazie 12, 357 (1957).

<sup>9</sup> G. H. ROTHBLAT, D. S. MARTAKUND und D. KRITCHEVSKY, Analyt. Biochem. 4, 52 (1962).

Blättern nicht vorkommen, ist die Bildung dieses Phytol-linolens ein weiteres Beispiel dafür, dass während der Vergilbung ungesättigte Fettsäuren mit verschiedenen Terpenalkoholen kombiniert werden, die im grünen Blatt nur in freier Form oder mit andern Partnern kombiniert vorkommen. Solche Ester sind für die Herbstblätter vieler Bäume typisch. Da die Bausteine, aus denen sie entstehen, während der Vergilbung nicht zunehmen, werden sie vermutlich nicht neu gebildet, sondern aus dem Bestand der grünen Blätter übernommen.

Dass es auch Verbindungen gibt, die bereits im grünen Blatt vorhanden sind und während der Vergilbung noch zunehmen, konnten wir am Beispiel des Squalens zeigen. Die Identifizierung dieses Kohlenwasserstoffes erfolgte

Tabelle I. Phytol- und Linolensäuregehalt der Phytolesterfraktion aus gelben Blättern von *A. platanoides* L.

	Phytol	Linolensäure		
	$\mu\text{g}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g}$	$\mu\text{M}$
Menge/g Trockengewicht	1350	4.55	1142	4.12

Tabelle II. Squalengehalt grüner und gelber Blätter von *A. platanoides* L.

Datum	Stadium	mg Squalen/g Trockengewicht
5. Mai	grün	0.099
30. Aug.	grün	0.397
14. Sept.	grün	0.570
29. Sept.	grün	0.594
13. Okt.	grün	0.696
13. Okt.	gelblich	0.800
19. Okt.	gelb	0.760
26. Okt.	gelb	0.797
2. Nov.	gelb	0.812

durch Vergleich mit einem natürlichen Squalenpräparat<sup>7</sup> auf Grund dünnenschicht- und gaschromatographischer und UV-spektrographischer Daten. Zur quantitativen Bestimmung diente die Vorschrift von ROTHBLAT et al.<sup>8</sup>. Während des Sommers 1964 wurden an Blättern von *A. platanoides* L. mehrere Bestimmungen durchgeführt, die in Tabelle II wiedergegeben sind. Bezogen auf das Trockengewicht stieg der Squalengehalt dieser Blätter vom Mai bis zum Eintreten der Vergilbung auf etwa das Siebenfache an und nahm während der Gelbfärbung noch weiter zu.

Wir schliessen daraus, dass die Vergilbung dieser Blätter neben Lipidabbau und Esterbildung noch durch ein drittes Merkmal gekennzeichnet ist, nämlich durch die Anhäufung von Intermediärprodukten. Ob die Anhäufung des Squalens, das eine Zwischenstufe in der Triterpensynthese darstellt, durch eine Mehrproduktion, oder aber durch eine Drosselung squalenverbrauchender Synthesewege zustandekommt, kann zur Zeit noch nicht entschieden werden. Wir sind damit beschäftigt, in diesen Blättern die Sterinverbindungen, welche Folgeprodukte des Squalens darstellen, näher zu untersuchen<sup>10</sup>.

**Summary.** The lipids of green and yellow leaves of *Acer platanoides* L. have been investigated. Yellow leaves were found to contain phytol linolenate, a further example of the formation of esters containing terpenoid alcohols and unsaturated fatty acids in yellow autumn leaves. The determination of squalene in leaves of the same tree showed an increase of squalene content during the whole season and the autumn colouration. Regarding the leaf lipids we conclude autumn colouration to be characterized by 3 facts: (1) Lipid degradation, (2) formation of esters and (3) accumulation of lipid intermediates.

E. C. GROB und L. CSUPOR

*Institut für organische Chemie der Universität Bern (Schweiz), 14. Juli 1967.*

<sup>10</sup> Diese Arbeit wurde durch Mittel des Schweiz. Nationalfonds unterstützt, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

### Loss of the Ability to Oxidize Hydrocarbons in Protoplasts of *Candida lipolytica*

When studying the localization of enzymes oxidizing the hydrocarbons of the yeast *Candida lipolytica* by means of electron microscopy, it was found that the hydrocarbons accumulated on the cytoplasmatic cell membrane<sup>1</sup>. This fact supports the hypothesis of enzymatic oxidation occurring either on the cytoplasmatic membrane or inside the cell. This is why we presumed that the enzymatic activity of the protoplasts might be the same as that of the cells of a strain of *C. lipolytica*.

For preparation of protoplasts, cells of the strain *C. lipolytica*, grown on mineral medium with glucose and 15  $\mu\text{moles}$  of cystein<sup>2</sup>, shaken at 30 °C, were used. To ensure removal of the medium, the cells from the logarithmic phase of growth were washed with cold phosphate

buffer pH 6.0 and resuspended in citrate-phosphate buffer pH 6.4 with 0.6M KCl and 0.1M 2-mercaptoethanol<sup>3</sup>. After 10 min incubation at 30 °C, 30 mg/ml of lyophilized preparation from the digestive juice of the snail *Helix pomatia*<sup>4</sup> was added. 95–100% of protoplasts were formed after 15 min. These were washed twice with cold 0.6M KCl in citrate-phosphate buffer and starved for 2 h in KCl buffer at 30 °C, under slight shaking. After centrifuging (5 min at 2000 g) and resuspending in cold isotonic solution oxidation activity on glucose and hexa-

<sup>1</sup> J. LUDVÍK, V. MUNK and M. DOSTÁLEK, Proc. int. Symp. on Yeast, Bratislava, in press.

<sup>2</sup> G. SVÍHLA, F. SCHLENK and J. L. DAINKO, J. Bact. 82, 808 (1961).

<sup>3</sup> R. DAVIES and P. A. ELVIN, Biochem. J. 93, 8P (1964).

<sup>4</sup> F. C. BAWDEN and N. W. PIRIE, Br. J. exp. Path. 27, 81 (1946).