

Blättern nicht vorkommen, ist die Bildung dieses Phytillinolenats 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 Phytolsterfraktion aus gelben Blättern von *A. platanoides* L.

	Phytol		Linolensäure	
	μg	μM	μg	μM
Menge/g	1350	4.55	1142	4.12
Trockengewicht				

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 Squalenpräparat⁷ auf Grund dünn- und gaschromatographischer und UV-spektrographischer Daten. Zur quantitativen Bestimmung diente die Vorschrift von ROTHBLAT et al.⁸. 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 Triterpensen- synthese 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 untersuchen¹⁰.

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.*

¹⁰ 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 membrane¹. 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 μmoles of cystein², 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-mercaptoethanol³. After 10 min incubation at 30°C, 30 mg/ml of lyophilized preparation from the digestive juice of the snail *Helix pomatia*⁴ 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-

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

² G. SVIHLA, F. SCHLENK and J. L. DAINKO, J. Bact. 82, 808 (1961).

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

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

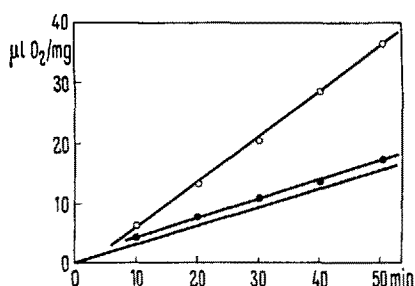


Fig. 1. Oxydation of glucose and hexadecane by protoplasts of *Candida lipolytica*. —○— glucose (0.4 mg/3.0 ml); —●— hexadecane (0.2 ml/3.0 ml); — endo.

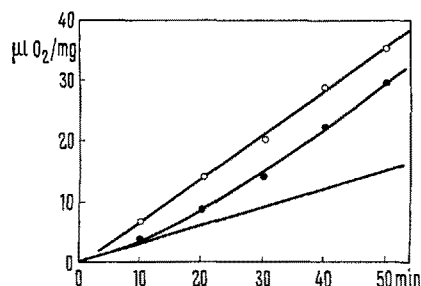


Fig. 2. Oxydation of glucose and hexadecane by intact cells of *C. lipolytica*. —○— glucose (0.4 mg/3.0 ml); —●— hexadecane (0.2 ml/3.0 ml); — endo.

decane was measured in the Warburg apparatus. The results of the experiments with intact cells and protoplasts are shown in Figures 1 and 2.

While the enzymatic glucose oxidation with the protoplasts of *C. lipolytica* towards the intact cells showed no changes, complete loss of oxidation activity on hydrocarbons was observed. This phenomenon was not due to contingent washing out of enzymes into the environment, as even the unwashed suspension of protoplasts in initial digestive environment showed no oxidation activity on hexadecane. Also the other substances such as cystein, 2-mercaptoethanol or digestive juice of *H. pomatia* inactivated by heat, did not inhibit the oxidation of hydrocarbons by intact cells.

We presume that the protoplasts lost their ability to oxidize the hydrocarbons either by change in the surface of the cytoplasmic membrane and destruction of oxidative enzymes bound on it, or by loss of protoplast ability to transport the hydrocarbons into the cell.

Zusammenfassung. Aus den Zellen der Hefe *Candida lipolytica* wurden Protoplasten gewonnen, die die Oxydationsfähigkeit gegenüber Hexadekan verloren haben, während diejenige gegenüber Glukose erhalten geblieben ist. Der Verlust der Fähigkeit, den Kohlenwasserstoff zu oxydieren, wird entweder durch eine Veränderung der Oberfläche der zytoplasmatischen Membran und Destruktion des an sie gebundenen Oxydationsenzym erklärt oder dadurch, dass die Protoplasten die Fähigkeit verloren haben, Kohlenwasserstoffe in die Zelle zu transportieren.

O. VOLFOVÁ, V. MUNK
and M. DOSTÁLEK

Department of Technical Microbiology, Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Science, Praha 4 (Czechoslovakia), 19 May 1967.

Influence of Pyridinolcarbamate on Hepatic Cholesterogenesis in Rats

Pyridinolcarbamate (2,6-bis(hydroxymethyl) pyridine di-N-methylcarbamate) has been reported by SHIMAMOTO to inhibit experimental atherosclerosis in rabbits and to ameliorate various forms of atherosclerotic heart disease in man^{1,2}. There are, currently, no published data concerning the influence of this compound on cholesterol synthesis, absorption or degradation. This communication describes the influence of dietary pyridinolcarbamate (0.3%) upon the synthesis of cholesterol by rat liver slices.

One group of male Wistar rats were maintained for 3 weeks on a diet consisting of mixed cereal 70%, wheat germ 7%, skim milk powder 21% and vitamin mix 2%. Another group was fed this diet augmented with 0.3% pyridinolcarbamate. The diet contained 20% protein, 11% fat and 62% carbohydrate. It is readily accepted by the rats and has proved to be an excellent vehicle for administration of test compounds^{3,4}.

After 3 weeks the rats were decapitated, and the livers excised and washed in chilled phosphate buffer. Liver slices (0.5 g) were incubated for 3 h under 100% oxygen in 5 ml of phosphate buffer (pH 7) containing 0.006M MgCl₂, 0.03M nicotinamide and either 1 μc of sodium

acetate-1-¹⁴C or 0.5 μc of mevalonic acid-2-¹⁴C. The reaction was stopped by the addition of hot 15% alcoholic KOH; the cholesterol was extracted from the saponification mixture and isolated as the digitonide. The radioactivity of the cholesterol digitonide was then assayed by liquid scintillation spectrometry⁵. Another portion of the liver was saponified in 15% alcoholic KOH and the cholesterol then extracted. The total serum and liver cholesterol levels were determined by the method of MANN⁶.

The results of 2 experiments are summarized in the Table. The serum and liver cholesterol levels of the rats that were fed 0.3% of pyridinolcarbamate did not differ

¹ T. SHIMAMOTO, F. NUMANO, T. FUJITA, T. ISHIOKA and T. ATSUMI, *Asian med. J.* 8, 825 (1965).

² T. SHIMAMOTO, F. NUMANO and T. FUJITA, *Am. Heart J.* 71, 216 (1966).

³ D. KRITCHEVSKY, M. W. WHITEHOUSE and E. STAPLE, *J. Lipid Res.* 1, (1960).

⁴ D. KRITCHEVSKY and S. A. TEPPER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 121, 1162 (1966).

⁵ I. L. SHAPIRO and D. KRITCHEVSKY, *Analyt. Biochem.* 5, 88 (1963).

⁶ G. V. MANN, *Clin. Chem.* 7, 275 (1961).