

10 kg of potatoes ("Bintje"-type, July crop) are peeled, cut into slices, dipped for 30 min into a 5% solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and drained; the slices are then chopped up and the pulp is pressed out at 400 kg/cm². The crude extract obtained is precipitated by SAS¹ (0.66)² at pH 6.8 and the redissolved precipitate is submitted to two fractionations by SAS¹ (0.33–0.62)² and (0.40–0.62)². The solution is then twice fractionated by SAS¹ in the presence of 100 mg/cm³ NaCl ("Mixed Salt Precipitation")³ at pH 6.8 and 7.5, which encreases the purity 35 times⁴. This product is chromatographed⁵ by a 17% solution of ammonium sulphate containing 0.006% of BRIJ⁶ in a column filled with dry, fat-free maize starch. ("Precipitation-Chromatography"). A final precipitation by SAS¹ yields a phosphorylase solution from which a crystallized product can be obtained in the presence of ammonium sulphate at pH 6.0–6.8. The purity of the phosphorylase in this solution is 300 times greater than in the crude extract⁴. 35 mg of pure potato phosphorylase is obtained from 10 kg of potatoes amounting to a total yield of approx. 5%.

The purified phosphorylase reveals only one component in electrophoresis between the pH 6.2 and 8.6. It is totally free of maltase and shows no phosphatase activity with glucose-1-phosphate or with α - or β -glycerophosphate.

It is, however, often contaminated with traces of α -amylase (less than 0.1% by weight). Attempts to destroy the α -amylase selectively by Cu, Ag, Zn, Hg and Mo⁷ did not succeed without simultaneous destruction of the phosphorylase.

Phloridzine does not inhibit the pure enzyme, but inhibits crude phosphorylase. This particular behaviour of impure solutions is due to the presence of a β -glucosidase which splits phloridzine into glucose and phloretine, the latter acting as a powerful inhibitor. The reaction of a series of polyphenols on phosphorylase was studied⁸.

Glucose inhibits phosphorylase. The inhibition is of the competitive type towards glucose-1-phosphate, but of the non-competitive type versus the polysaccharide acting as a "starter". This suggests that the enzyme has at least two distinct active centers reacting independently with either of the substrates. This is confirmed by the fact that the Michaelis-Constant of the enzyme for each of the substrates is independent of the concentration of the remaining substances⁹.

Unlike muscle phosphorylase, potato phosphorylase has practically no affinity towards muscle or oyster glycogene. However, the enzyme may use these glycogens as starters in the presence of traces of starch-type polysaccharides as amylose or amylopectine, waxy-maize, soluble starches as Zulkowsky, Noredux, etc. In its native state, potato phosphorylase seems to be reversibly bound to a polysaccharide, which makes it possible to use glycogene as a starter.

In conclusion, potato phosphorylase differs from muscle phosphorylase mainly because, in its pure state, it is not inhibited by phloridzine and shows practically no affinity towards glycogen. Furthermore it may not require the presence of any prothetic group as AMP¹ or FAD² to display full activity.

ED. H. FISCHER and H. M. HILPERT

Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève, le 10 février 1953.

Résumé

La phosphorylase de pommes de terre a été purifiée par deux fractionnements au sulfate d'ammonium, deux fractionnements au sulfate d'ammonium en présence de NaCl et une chromatographie sur colonne d'amidon. On a obtenu ainsi un enrichissement de 300 fois par rapport à l'extrait brut.

Le produit purifié ne montre qu'une seule composante à l'électrophorèse; il est dépourvu de maltase et de phosphatase, par contre il est souvent contaminé par des traces d' α -amylase. L'inhibition de l'enzyme par le glucose est du type compétitif. La phosphorylase de pommes de terre se distingue de la phosphorylase de muscle principalement par le fait qu'à l'état pur, elle n'est pas inhibée par la phloridzine et qu'elle possède une affinité pratiquement nulle vis-à-vis du glycogène.

¹ G. T. CORI and A. A. GREEN, J. Biol. Chem. 151, 31 (1943).

² J. B. SUMNER, T. C. CHOU, and A. T. BEVER, Arch. Biochem. 26, 1 (1950).

Etude de la chaleur évoluée dans l'extension et la détente du caoutchouc

Lorsqu'on étire rapidement un échantillon de caoutchouc vulcanisé, on constate une élévation de sa température; la détente, en revanche, produit un refroidissement. Cet effet thermique accompagnant la déformation du caoutchouc (appelé quelquefois effet GOUGH-JOULE) a suscité de nombreux travaux¹.

Plusieurs auteurs ont remarqué que si l'on suit cette évolution de température au moyen d'un couple thermo-électrique, on constate que l'élévation de température lors de l'extension est plus petite que l'abaissement de température qui suit la détente. BOISSONNAS², dans une courte note, a montré que ce paradoxe s'explique probablement par le fait que de la chaleur se dégage longtemps après l'extension, alors que la détente s'accompagne d'un phénomène thermique plus rapide.

Nous avons repris ces dernières recherches en appliquant la correction calorimétrique de KING et GROVER³, ce qui permet de suivre le dégagement de la chaleur d'extension pendant une dizaine de minutes. On vérifie alors que le cycle thermodynamique extension-détente est bien un cycle fermé: la somme des chaleurs évoluées égale la somme des travaux d'extension et de détente.

Au delà de 10 min, la correction n'étant pas suffisamment précise, nous avons eu recours au procédé suivant:

¹ Une documentation étendue se trouve dans l'ouvrage de L. R. G. TRELOAR, *The Physics of Rubber Elasticity* (Clarendon Press, Oxford 1949), p. 35-39.

² CHARLES-G. BOISSONNAS, Extrait des Actes de la Soc. Helv. des Sci. nat. 1942, 99, N° 5.

³ A. KING et H. GROVER, J. Appl. Phys. 12, 557 (1951).

¹ SAS = saturated solution of ammonium sulphate.

² The numbers in brackets indicate the degree of saturation in ammonium sulphate of the solutions.

³ Ed. H. FISCHER, to be published.

⁴ The purifications are calculated on the activity/nitrogen basis of the crude extract.

⁵ Ed. H. FISCHER, R. MENZI, and H. M. HILPERT, to be published.

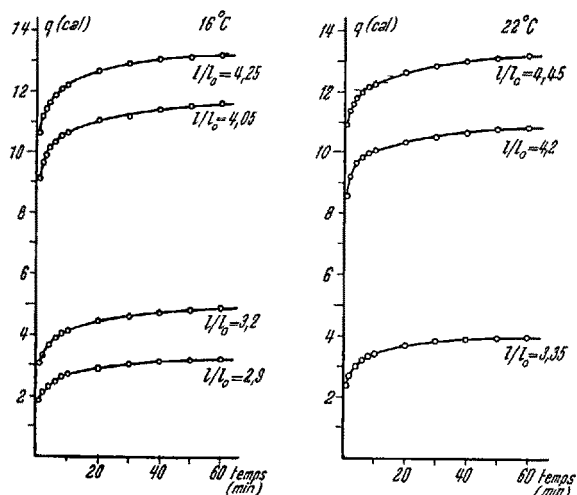
⁶ Brij: polyethylene-glycole-ether (from: Atlas-Powder Co. Willmington, Del. U.S.A.).

⁷ K. BAILY, GWEN J. THOMAS, and W. J. WHEALAN, Biochem. Soc. (Communications).

⁸ Ed. H. FISCHER, H. M. HILPERT, and O. DUPONT, to be published.

⁹ Ed. H. FISCHER and O. DUPONT, to be published.

L'échantillon a été maintenu au même allongement, pendant des durées différentes, puis chaque fois détendu, ce qui permet d'obtenir les valeurs de la chaleur évoluée en détente en fonction de la durée d'extension. Ces valeurs sont déterminées avec précision puisque le phénomène thermique est rapide. Le cycle thermodynamique étant fermé, la chaleur absorbée en détente, corrigée de la différence des travaux d'extension et de détente, donne la chaleur dégagée à l'extension pour une même durée. La figure donne quelques courbes obtenues ainsi. Le dégagement de chaleur se comporte de la même manière que la double réfraction étudiée par THIESSEN et WITTSTADT¹.



Chaleur dégagée à l'extension, en fonction du temps, pour divers rapports d'allongement. Températures de 16° et 22°C.

La quantité de chaleur dégagée lors de l'extension dépend non seulement du rapport d'extension, mais aussi de la température initiale. Elle est d'autant plus grande que la température de départ est plus basse. Ceci pourrait s'interpréter par un nombre de « germes de cristallisation » d'autant plus grand que la température est plus basse.

Nous avons constaté que, mises à part les dix premières minutes consécutives à l'extension, où le dégagement de chaleur est plus rapide, la vitesse de dégagement de la chaleur d'extension, correction faite du travail (c'est-à-dire la vitesse de cristallisation), est exponentielle :

$$\frac{q}{q_0} = 1 - e^{-kt}$$

(q = chaleur dégagée au temps t , q_0 = chaleur dégagée après un temps infini).

Par exemple, pour un allongement de $l/l_0 = 4,25$, à la température de la salle de 16°C, nous obtenons les valeurs suivantes, si $k = 0,017$, en partant de la valeur de q au temps 10 min.

La forme de cette relation est de plus vérifiée par le fait que la constante k est indépendante du rapport d'allongement. On peut ainsi déterminer la période (durée de demi-réaction) de la cristallisation, de l'ordre de $t_{1/2} = 20$ min.

L'examen des résultats de THIESSEN et WITTSTADT conduit à une période de 21 min, pour une température

Temps en minutes	q cal. calculé	q cal. expérimental
10	12,17	12,17
20	12,54	12,62
30	12,86	12,87
40	13,02	13,02
50	13,06	13,07
60	13,14	13,12

de 20°C qui est celle de nos expériences. Trois échantillons de caoutchouc nous ont donnée la même valeur de k , qui semble varier peu avec la température.

J.-P. EHRBAR

Laboratoire de chimie-physique, Institut de Chimie, Université de Neuchâtel (Suisse), le 18 décembre 1952.

Summary

The heat produced by strain on a sample of vulcanized rubber is freed with exponential speed, the constant k of which not depends on strain. A period of crystallization (half-reaction time) amounting to about 20 min may be thus defined at room temperature.

The Biogenesis of Colchicine

Because of the apparent lack of structural relationship between colchicine and the various classes of alkaloids in general, the mechanism of its biogenesis in the plant has remained obscure. In an attempt to unravel such a mechanism ROBINSON¹ favored the view that colchicine may not be related to the phenylethyl amines and proposed a "C₆-C₆-C₃" condensation followed by ring enlargement of the third ring (through the incorporation of formaldehyde) as a possible pathway of biogenesis. On this basis, it was suggested that colchicine may belong to the anthocyanins rather than to the alkaloids in the biogenetical sense. However, that colchicine may be derived from the phenylalanines is not inconceivable, and it is the purpose of this communication to present a plausible biogenetical mechanism involving as intermediates, phenylalanine derivatives exclusively.

As shown in the sequel, the first step in the biogenesis of colchicine would involve oxidation of two molecules of trihydroxyphenylpyruvic acid (I) to the corresponding o-quinones (II) followed by "ortho-para" coupling, as indicated, to yield the key intermediate (III). Such an oxidation and coupling of a pyrogallol type of compound is not without precedent and finds a basis in the elegant work of CRITCHLOW, HAWORTH, and PAUSON² on the structure and mechanism of formation of purpurogallin.

The extreme ease with which pyrogallol or gallic acid undergo oxidation and coupling adduces acceptable evidence for the formation of intermediate (III). However, diverging somewhat from the mechanism of formation of purpurogallin, the subsequent step in the biogenesis of colchicine would involve oxidative cleavage

¹ R. ROBINSON, *Nature* 166, 930 (1950).

² A. CRITCHLOW, R. D. HAWORTH, and P. L. PAUSON, *J. Chem. Soc.* 1951, 1318.

¹ P. A. THIESSEN et W. WITTSTADT, *Z. physik. Chem. [B]* 41, 33 (1938); *Rubber Chem. Technol.* 12, 736 (1939).