

Table I.—Effect of Various Inhibitors on the Respiration of *Polystictus versicolor*

Expt. No.	pH at which inhibitor applied	Inhibitor	% inhibition
L 8	7	95% CO with 5% O ₂ } in the light	10
	7	95% CO with 5% O ₂ } in the dark	65
L 10	7	95% CO with 5% O ₂ } in the light	0
	7	95% CO with 5% O ₂ } in the dark	43
L 9a	7	1 mM KCN	70
L 9b	7	1 mM KCN	80
L 9c	7	1 mM KCN	80
L 11	5	0.2 mM diethyldithiocarbamate Na salt (dieca)	12
	5	saturated solution phenylthiourea	4
	5	saturated solution phenylthiourea	13
L 12a	5	1 mM salicylaldehyde	13
L 12b	5	1 mM salicylaldehyde	4

Spectroscopic evidence of the presence of cytochromes was obtained. Bands corresponding to the alpha absorption bands of the reduced cytochromes *a*, *b* and *c* were observed with a Hilger microspectroscope when light from a 500 W metal filament lamp was passed through a thick suspension of the mycelium to which sodium hydrosulphite had been added¹.

Cell free extracts of the mycelium were prepared by grinding the well washed mycelium with clean sand and ice cold buffer in a chilled mortar (9 parts of 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 to 1 part of moist mycelium). Cell debris and sand were removed by centrifuging at 500 g for 5 min. Extra-cellular laccase preparations were prepared by the method of LINDBERG and HOLM².

Table II.—Activities of Enzyme Extracts from a 7-day Old Culture of *Polystictus versicolor*

Enzyme system	Substrate	pH	Q · O ₂ dry weight (μl O ₂ per mg per h)
Cytochrome oxidase	Hydroquinone	7.0	24
Extra-cellular laccase	Pyrocatechol	5.2	30
Laccase from intact mycelium	Pyrocatechol	5.2	1.0

For measurements of enzyme activities the Warburg flasks contained 1 ml enzyme preparation, 5 mg substrate in the sidearm, 0.15 ml 15% KOH in the centre well. All reagents were dissolved in 0.05 M phosphate buffer to give a total volume of fluid of 3 ml. For the cytochrome oxidase tests 0.3 ml of 4×10^{-4} M cytochrome *c* (Evans) was added. The laccase activity of the medium (extra-cellular laccase) was related to the amount of mycelium from which it had come.

Since the laccase preparation obtained from the intact mycelium had a Q · O₂ of only 1.0 it is unlikely that laccase activity could account for the observed uptake of oxygen by the intact mycelium which had a Q · O₂ (dry weight) varying from 15 to 28. Laccase preparations

having a Q · O₂ of 30 were obtained from the culture medium (cf. FÄHRÆUS¹) but these could play no part in the respiration of the intact mycelium. On the other hand, cytochrome oxidase was present in sufficient quantity to account for the total observed oxygen uptake of the intact mycelium.

These experiments indicate that the electron transference to molecular oxygen is mediated in this fungus mainly, if not completely, by a cytochrome *c*-cytochrome oxidase system. Although small quantities of laccase are present in the mycelium and much larger quantities in the culture medium, it is unlikely that these act as terminal oxidases in the respiration of this fungus.

The writers wish to acknowledge financial assistance from the Nuffield Foundation.

D. BOULTER and A. BURGESS

Department of Botany, University of Liverpool, December 6, 1954.

Zusammenfassung

Obgleich *Polystictus versicolor* reichlich Laccase bildet, zeigen die Ausfälle in respirationshemmenden Versuchen, dass die Cytochromoxydase die entscheidende Oxydase dieses Pilzes ist.

¹ G. FÄHRÆUS, *Physiol. Plant.* 5, 284 (1952).

Über den Umsatz von Anthranilsäure mit Brenztraubensäure

v. EULER¹ hat sich in mehreren Arbeiten mit den Umsetzungsprodukten von Verbindungen, die möglicherweise aus Buttergelb (p-Dimethylamino-azobenzol) in der Leber entstehen und den in der Leber nachgewiesenen Stoffwechselprodukten, wie etwa der Brenztraubensäure, eingehend befasst. Es wurden die Verbindungen, die aus Brenztraubensäure und p-Phenylendiamin², p-Aminophenol², den Aminobenzoesäuren², dem Sulfanilamid³ usw. *in vitro* entstehen, beschrieben und ihr konstitutioneller Aufbau bewiesen.

Für den Umsatz von Anthranilsäure (AS) mit Brenztraubensäure (BTS) haben v. EULER und HASSELQUIST³ einen detaillierten Reaktionsmechanismus angeführt. Der entstehenden Verbindung der Bruttozusammensetzung C₁₃H₁₁O₆N, die antibiotisch und im Kressenwurzeltst wirksam ist, wurde die Konstitution I einer 1,2-Dihydrochinaldin-2,4,8-tricarbonsäure zugeschrieben. Sie ist phototrop (gelb-grün) und gab bei der Chromsäureoxydation die Chinaldin-4,8-dicarbonsäure VI bzw. bei der Destillation mit Eisenpulver Chinaldin. Diese Chinaldin-4,8-dicarbonsäure sollte sich beim Liegen grün färben.

Beim Umsatz der Säure I mit Diazomethan entstand nach den Angaben der schwedischen Autoren die Verbindung C₁₁H₁₀O₆N₂, der die Konstitution II zukommen sollte. Durch Erhitzen dieser Verbindung über ihren

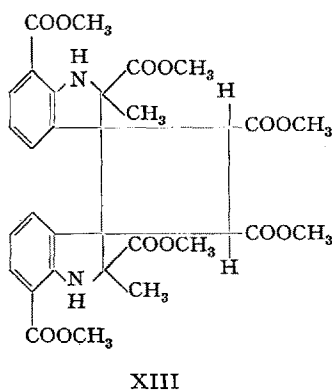
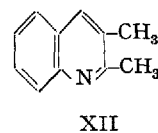
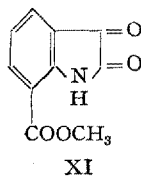
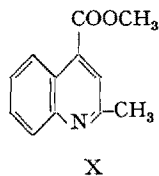
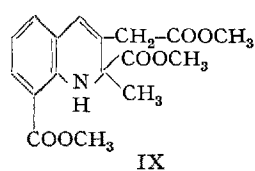
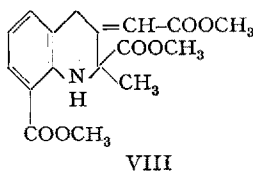
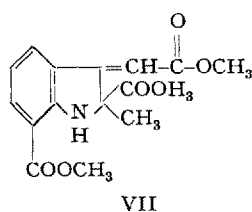
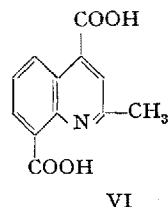
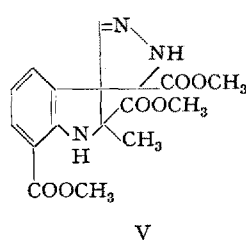
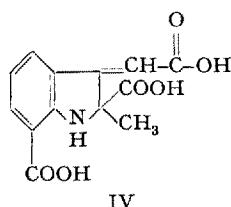
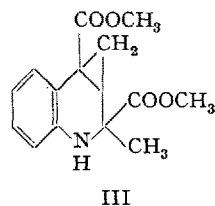
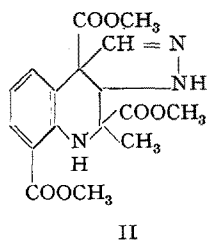
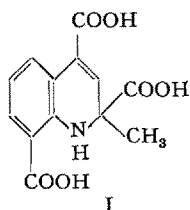
¹ H. v. EULER, *Naturw. Rdsch.* 4, 133 (1953). In dieser Arbeit wurde scheinbar irrtümlich das Reaktionsprodukt aus AS und 2 Molen BTS zum Unterschied von der Originalarbeit als Chinaldin-4,8-dicarbonsäure angeschrieben, während es dort als 1,2-Dihydrochinaldin-2,4,8-tricarbonsäure formuliert worden war.

² H. v. EULER, H. HASSELQUIST und E. ERIKSSON, *Ark. Kemi* 5, 251 (1953).

³ H. v. EULER und H. HASSELQUIST, *Ark. Kemi* 5, 193 (1953).

¹ D. KEILIN and E. F. HARTREE, *Nature* 164, 254 (1949).

² G. LINDBERG and G. HOLM, *Physiol. Plant.* 5, 100 (1952).



Schmelzpunkt wurde Stickstoff abgespalten unter Bildung eines nichtkristallisierenden Öls der Zusammensetzung $C_{17}H_{19}O_6N$, für das die Konstitution III einer Trimethylenverbindung vorgeschlagen worden war.

Schon bei der Nacharbeitung dieser Versuche haben wir Ergebnisse erhalten, die mit der Konstitution I des Kondensationsproduktes aus AS und BTS nicht vereinbar sind. Aus äusseren Gründen veröffentlichen wir jetzt nur die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Kondensation von AS und BTS.

Die hierbei erhaltene Tricarbonsäure ist trotz wiederholter Reinigungsoperationen verunreinigt, wie die durchgeführte Chromatographie an Aluminiumoxyd

zeigte, worauf an anderer Stelle ausführlich eingegangen werden soll. Wir schlagen für dieses Kondensationsprodukt die Formel IV vor, da sie die folgenden experimentellen Befunde weitgehend zu erklären vermag. Unsere analytischen Daten bestätigen die von den schwedischen Autoren gefundenen. Die Säure IV kann mit 2-n-HNO₃ ohne Veränderung gekocht werden, was für ein 1,2-Dihydrochinolinderivat I sehr überraschend wäre. Erst nach Hinzufügen von konz. HNO₃ entsteht Chinaldin-4,8-dicarbonsäure VI; sie ist auch aus IV durch Chromsäureoxydation darstellbar. Die Dicarbonsäure VI stellt nach Reinigung eine farblose Substanz vom Smp. 310–312° (EULER und HASSEQUIST 294°, Grünverfär-

bung^o) ohne jegliche Verfärbung dar. Bei der Bildung dieser Säure handelt es sich um eine Ringerweiterung, wofür in der Literatur¹ schon einige Beispiele vorliegen.

Für die Ringerweiterung sprachen die Zinkstaub- und Natronkalk-Destillation der Säure iv, die immer erhebliche Mengen Indolderivate lieferten, die durch starke Fichtenspan- und positive Ehrlichsche Reaktion erkannt wurden. Daneben entstand auch Chinaldin; weiter können die folgenden Befunde nur aus der Konstitution iv gedeutet werden.

Wird iv mit Diazomethan behandelt, so erhält man die Verbindung $C_{17}H_{19}O_6N_3$, der die Konstitution v eines spiranartig verknüpften Pyrazolins mit einem Indolin zukommen muss. Wird dieser Tricarbonsäureester v im Hochvakuum destilliert, so erhält man nach heftiger Gasentwicklung ein Öl, das wir zur Kristallisation gebracht haben. Diese Verbindung vom Smp. 87° besass die Zusammensetzung $C_{16}H_{17}O_6N$ und stellt den der Tricarbonsäure iv entsprechenden Trimethylester vii dar. Der Beweis hierfür ist die Tatsache, dass die Verbindung vii beim Versetzen mit CH_2N_2 in quantitativer Ausbeute wieder die Substanz v liefert.

Bei der Destillation von v entsteht neben dem Ester vii noch ein Öl, der Zusammensetzung $C_{17}H_{19}O_6N$. Für diesen Körper schlagen wir die Formeln viii bzw. ix mit Vorbehalt vor, weil nur aus ihnen die Tatsache interpretierbar ist, dass das Öl nach Verseifung mit HCl und anschließender Natronkalkdestillation ausschliesslich 2,3-Dimethylchinolin xii liefert. Eine Verbindung, nach iii formuliert, wird einem solchen Reaktionsverhalten nicht gerecht. Die Bildung der Produkte der thermischen Zersetzung von v im Hochvakuum haben eine weitgehende Ähnlichkeit mit den in der Literatur² beschriebenen Reaktionen von α -Methylzimtsäure und Diazomethan.

Für das Vorliegen einer o-Aminozimtsäurestruktur gemäss IV bzw. vii sprachen auch UV.-spektroskopische Beobachtungen, die an anderer Stelle näher erläutert werden.

Die saure Hydrolyse von vii ergab nach Behandlung des Hydrolysats mit CH_2N_2 Chinaldin-4-carbonsäuremethylester x. Überraschenderweise entsteht dieser Körper nicht über die Chinaldin-4,8-dicarbonsäure vi, die bei der Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen völlig unverändert bleibt. Es kann also die dem Ester x entsprechende Säure nicht aus der Chinolinstruktur vi hervorgegangen sein. Einige weitere Nebenfunde wollen wir in der demnächst erscheinenden ausführlichen Arbeit näher behandeln.

Ein wichtiger Befund für das Vorliegen eines Indolderivates in iv und vii konnte weiter durch die Ozonisierung des kristallisierten Trimethylesters vii erbracht werden; man erhielt hierbei Isatin-7-carbonsäuremethylester xi. Wenn über die durchlaufenen Stufen bis zur Isatinbildung nichts Genaues gesagt werden kann, so halten wir die Bildung von xi doch für strukturbeweisend. Eine weitere Stütze für unsere Formulierung stellt die Photodimerisation des Esters vii dar. Bei der Bestrahlung des Esters vii mit UV.-Licht fällt ein kristallisierter Körper der Zusammensetzung $C_{32}H_{34}O_{12}N_2$ (Smp. 232°) an, der im Hochvakuum nicht mehr flüchtig ist. In Analogie zu den Bestrahlungsprodukten der trans-

Zimtsäure ist das Dimerisat voraussichtlich ein Cyclobutanderivat xiii mit α -Truxillsäurestruktur.

Alle aus der Tricarbonsäure iv durch die verschiedensten Reaktionen erhaltenen Chinolinderivate möchten wir nach diesen Befunden als Artefakte ansehen.

Herrn Dr. OTTO SVIERAK möchte ich für seine Mitarbeit bestens danken.

K. EITER

II. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, den 6. Januar 1955¹.

Summary

Using series of different reactions it has been possible to demonstrate that the tricarboxylic acid arising from anthranilic acid and pyruvic acid has not the constitution i but is correctly represented by iv. Several derivatives of this tricarboxylic acid were shown to have formulae that are in sharp contrast to those found in literature.

¹ Eine ausführliche, aber mit vorliegender Mitteilung inhaltlich identische Arbeit ging der Redaktion bereits am 21. Oktober 1954 zu.

Morphogenetic Effects of Centrifugation on the Isolated Ectoderm and Whole Embryo of Some Anurans¹

In certain amphibians, a secondary tail is formed when the embryos are subjected to centrifugation². Recently PASTEELS³ reported that in some species the secondary tail was produced at high frequency only when late blastulae or early gastrulae were centrifuged under proper conditions. The secondary tail thus formed contained spino-caudal structures, such as notochord, myotome and spinal cord, and was often completely separated from the primary axis. Furthermore PASTEELS isolated the ectoderm, which was folded during the centrifugation of whole embryos, and cultured it *in vitro* or transplanted it to another embryo. Results were presented which indicated the differentiation of spino-caudal and other axial structures from this ectodermal piece. From these experiments, he suggested that the centrifugation can directly affect the presumptive ectoderm and initiate the axial differentiation in it³. In order to establish such a possibility, it seems necessary to make an experiment, in which the presumptive ectoderm is previously isolated and then centrifuged. Such experiments, carried out on the embryos of *Bufo vulgaris*, *Rana japonica* and *R. nigromaculata* are reported in this paper with some other related experiments.

¹ Supported by a grant from the Rockefeller Foundation, the Scientific Research Found of the Ministry of Education, and the Asahi Grant for Scientific Research.

² A. M. BENTA and R. A. GORTNER, J. exp. Zool. 18, 433 (1915). – M. BAGINI, Arch. ital. Anat. Embryol. 22, 35 (1925). – P. PASQUINI and G. REVERBERI, Boll. Ist. Zool. R. Univ., Roma. 7, 1 (1929). – H. W. BEAMS, R. L. KING, and P. L. RISLEY, Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 32, 181 (1934). – I. MOTOMURA, Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol. 10, 211 (1935). – A. M. SCHECHTMAN, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 37, 153 (1937). – J. PASTEELS, Arch. Biol. Paris 51, 355 (1940). H. BAN, Zool. Mag. (in Japanese) 62, 112 (1953).

³ J. PASTEELS, Exper. 3, 30 and 73 (1947); Acta Anatomica 4, 219 (1947); J. Cyto-embryol. belgo-neerland. Gand 88 (1949); J. Embryol. exp. Morph. 1, 5 and 125 (1953).

¹ E. WENKERT und Th. L. REID, Exper. 10, 417 (1954). – Th. WIELAND, O. WEIBURG, E. FISCHER und G. HÖRLEIN, Ann. Chem. 587, 149 (1954). – P. L. JULIAN, H. C. PRINTY, R. KETCHAM, R. DOONE, J. Amer. Soc. 73, 5305 (1953). – L. HORNER, Ann. Chem. 548, 117 (1941). – G. JACINI, Gaz. Chim. 73, 85 (1943). – G. R. CLEMO und H. VIPOND, Chem. and Indust. 1949, 856.

² K. V. AUWERS und E. CAUER, Ann. Chem. 470, 2956 (1929).