

Attività succino-deidrogenasica		Attività aspartico-glutamico transaminasica		Acido citrico accumulato nel mezzo colturale (mg)	
30 h	48 h	30 h	48 h	30 h	48 h
8,0	4,8	33,2	38,5	3,4	130
13,5	6,5	25,1	30,5	6,3	156
7,8	3,0	40,2	29,0	4,8	211
9,4	3,6	46,8	42,8	3,1	204
11,3	3,7	24,3	26,5	3,9	177
media: 10,0	4,4	33,9	33,4	4,3	175

Le condizioni ambientali di coltura (superficiale) del ceppo di *Asp. niger* in terreno di BERNHAUER e la preparazione dell'estratto enzimatico acellulare, sono quelle descritte nella nota precedente¹.

Le determinazioni venivano eseguite negli estratti dei due miceli ottenuti, dopo 30 h e dopo 48 h, dagli inoculi fatti con la stessa sospensione di spore, in modo che i valori ottenuti nei due tempi diversi fossero direttamente confrontabili, e non influenzati dalla diversità delle spore di volta in volta inoculate nella serie di esperienze.

L'attività succino-deidrogenasica veniva determinata misurando manometricamente al WARBURG il consumo di O₂ in presenza di bleu di metilene come trasportatore autossidabile di idrogeno.

L'attività aspartico-glutamico transaminasica veniva determinata col metodo di TONHAZY e coll.², dosando l'acido piruvico derivato per decarbossilazione chimica dall'acido ossalacetico formatosi durante la transaminazione³. Tale dosaggio dell'acido piruvico (o, più precisamente, del suo dinitrofenil-idrazone) nell'estratto toluolico finale veniva eseguito sia direttamente a $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ (previa alcalinizzazione con KOH alcoolica), sia trattando l'estratto toluolico con Na₂CO₃ 15% e NaOH 1,5 N e facendo due letture al Beckman, una a $\lambda = 412 \text{ m}\mu$ e l'altra a 440 m μ , secondo il metodo proposto da GOODWIN e WILLIAMS⁵.

L'acido citrico veniva dosato col metodo di SAFFRAN⁶.

Nella tabella sono esposti i valori dell'attività succino-deidrogenasica (espressa in $\mu\text{l O}_2/\text{mg}$ di N proteico in 20 min) e dell'attività transaminasica (espressa in μM di acido ossalacetico/mg di N proteico in 10 min) determinate nei miceli dopo 30 h e dopo 48 h di coltura in terreno di BERNHAUER.

I risultati ottenuti dimostrano che nell'intervallo di tempo 30–48 h, contemporaneamente ad un maggiore accumulo di acido citrico nel mezzo colturale, l'attività succino-deidrogenasica della muffa diminuiva e l'attività aspartico-glutamico transaminasica rimaneva praticamente costante.

A nostro parere quindi, la maggior formazione di acido ossalacetico necessaria per l'accumulo via via maggiore di acido citrico non può esser spiegata completamente né dall'attività transaminasica, né attraverso un meccanismo ciclico tricarbossilico o bicarbossilico eventualmente presente.

V. MORET e M. LORINI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova,
21 luglio 1958.

³ N. E. TONHAZY, N. G. WHITE e W. W. UMBREIT, Arch. Biochem. 28, 36 (1950).

⁴ Per questa determinazione l'estratto enzimatico veniva preparato in tampone fosfati potassici M/10 pH = 7,4.

⁵ T. W. GOODWIN e G. R. WILLIAMS, Biochem. J. 51, 708 (1952).

⁶ M. SAFFRAN e O. F. DEUSTEDT, J. biol. Chem. 175, 849 (1948).

Summary

In a strain of *Asp. niger* grown in BERNHAUER medium, succinic-dehydrogenase activity decreased and aspartic-glutamic transaminase activity remained practically constant, while citric acid accumulated in the medium.

The Free Amino Acid Contents and Growth Rates of Polyploid *Saccharomyces*

Studies by SPIEGELMAN *et al.*¹ have suggested that haploid strains of *Saccharomyces* may possess twice the cellular free amino acid content of diploid strains. Such an indication is particularly provocative in two respects. First, in view of the established relationship between the quantity of the cellular free amino acid pool and the rate of protein synthesis², it suggests the possibility of a ploidy dependent differential growth rate in yeasts. Direct information on this point has been scant and contradictory. BAUCH³, for example, has reported that polyploidization diminishes the growth rate of yeasts while WINGE and ROBERTS⁴ have maintained that the reverse is true. Second, of the numerous biochemical⁵, biophysical⁶ and morphological⁷ parameters defining ploidy in *Saccharomyces*, cellular free amino acid contents would be the first to show an inverse relationship to the level of polyploidy. This has crucial diagnostic significance since the absence of convincing cytogenetic information coupled with the extraordinarily cumbersome techniques of polyploid genetic analysis have recommended such parameters as the most rapid and reliable means for the precise identification of polyploidy in yeasts⁸ and other microorganisms as well⁹. Accordingly, the present study was undertaken to obtain definitive information concern-

¹ S. SPIEGELMAN, H. O. HALVORSON, and R. BEN-ISHAI, *Amino Acid Metabolism* (W. McElroy and B. Glass, Johns Hopkins, Baltimore 1955), p. 124.

² H. O. HALVORSON and S. SPIEGELMAN, J. Bacteriol. 65, 496 (1953).

³ R. BAUCH, Naturw. 29, 503 (1941).

⁴ O. WINGE and C. ROBERTS, *The Chemistry and Biology of Yeasts* (A. H. Cook, Academic Press, New York 1958), p. 93.

⁵ M. OGUR, Arch. Biochem. and Biophys. 53, 484 (1954); J. Bacteriol. 69, 159 (1955). – M. OGUR, S. MINCKLER, G. LINDEGREN and C. LINDEGREN, Arch. Biochem. and Biophys. 40, 175 (1952).

⁶ W. H. LUCKE and A. SARACHEK, Nature 171, 1014 (1953). – A. SARACHEK, Cytologia 19, 77 (1954).

⁷ B. D. MUNDKUR, Exper. 9, 373 (1953). – G. F. TOWNSEND and C. C. LINDEGREN, J. Bacteriol. 67, 480 (1954).

⁸ C. C. LINDEGREN, G. LINDEGREN, R. B. DRYSDALE, J. P. HUGHES, and A. BRENES-POMALES, Genetica 28, 1 (1956).

⁹ J. B. CLARK and R. B. WEBB, J. Bacteriol. 70, 454 (1955). – J. E. OGG and M. R. ZELLE, J. Bacteriol. 74, 477 (1957).

Strains	Free Amino Acid Contents				Dry Weights Per Cell $\times 10^{-5}\mu\text{g}$ (± 1 s. e.; 4 determinations)	Generation Times in min** (± 1 s. e.; 5 determinations)
	in μg per mg dry weight (± 1 s. e.; 4 determinations)		in μg per 10^7 cells*			
	Glutamic Acid	Aspartic Acid	Glutamic Acid	Aspartic Acid		
Haploids						
16	20.7 $\pm$ 0.75	2.56 $\pm$ 0.24	2.73	0.338	1.32 $\pm$ 0.05	117 $\pm$ 2
26	18.6 $\pm$ 0.46	2.62 $\pm$ 0.39	2.31	0.325	1.24 $\pm$ 0.04	115 $\pm$ 2
13778	15.7 $\pm$ 0.68	2.39 $\pm$ 0.25	1.82	0.277	1.16 $\pm$ 0.04	121 $\pm$ 2
Diploids						
16 $\times$ 26	20.4 $\pm$ 0.90	2.81 $\pm$ 0.49	5.37	0.741	2.64 $\pm$ 0.09	118 $\pm$ 2
11294	16.9 $\pm$ 0.99	2.31 $\pm$ 0.16	3.90	0.534	2.31 $\pm$ 0.09	119 $\pm$ 3
11296PI	16.9 $\pm$ 0.46	2.85 $\pm$ 0.26	3.42	0.575	2.22 $\pm$ 0.07	122 $\pm$ 2
13778 $\times$ 26	19.1 $\pm$ 0.68	2.65 $\pm$ 0.48	5.35	0.742	2.80 $\pm$ 0.08	116 $\pm$ 2
Triploids						
16 $\times$ 11294	20.3 $\pm$ 0.77	2.54 $\pm$ 0.28	7.86	0.984	3.87 $\pm$ 0.07	117 $\pm$ 2
26 $\times$ 11296PI	21.8 $\pm$ 0.98	2.88 $\pm$ 0.29	7.22	0.954	3.31 $\pm$ 0.10	117 $\pm$ 1
13778 $\times$ 11294	19.9 $\pm$ 0.72	2.55 $\pm$ 0.11	7.08	0.908	3.56 $\pm$ 0.09	118 $\pm$ 2
Tetraploid						
11294 $\times$ 11296PI	23.0 $\pm$ 1.4	2.58 $\pm$ 0.20	9.89	1.11	4.30 $\pm$ 0.10	116 $\pm$ 2

* These values were computed from those given in the second, third, and sixth columns.

** Generation times were computed according to the formula: $G = \frac{\text{time}_2 - \text{time}_1}{3.32 \log \left(\frac{\text{cell number at time}_2}{\text{cell number at time}_1} \right)}$.

ing the relationship between free amino acid pool levels, growth rates and ploidy in a genetically established family of haploid, diploid, triploid and tetraploid *Saccharomyces*.

The strains employed were members, or were derived directly from members, of Lindegren's original family of polyploid *Saccharomyces*¹⁰; all were prototrophic and possessed comparable respiratory activities. Growth rates were determined from haemocytometer counts of cells growing during log phase in shake cultures at 28° C upon a synthetic medium¹¹. The magnitudes of the free amino acid pools of log phase cells were estimated by their glutamic and aspartic acid contents. The pools were collected according to the method of HALVORSON and SPIEGELMAN¹² and their glutamic and aspartic acid components were individually isolated by one dimensional ascending paper chromatography on Whatman no. 1 paper, using water saturated phenol containing 40 mg per cent of 8-hydroxyquinoline as the developing solvent. The amino acids were identified and quantitatively estimated according to the method of NAFTALIN¹³. For dry weight measurements, cells were washed three times with cold distilled water and dried for 20 to 24 hours at 85° C; dry weights per cell were computed from haemocytometer counts of

aliquots removed from washed cell suspensions prior to drying.

The findings are summarized in the table. When comparisons were made upon an equivalent dry weight basis, only slight variations in the quantities of free amino acids were detected between strains and no strain differences specifically dependent upon ploidy were apparent. However, since dry weights per cell were found to increase integrally with increasing polyploidy, upon converting from a dry weight to a cellular basis for comparison, the free amino acid values assumed a corresponding integral increase with increasing polyploidy. Though these findings disagree with the indications obtained by SPIEGELMAN *et al.*, they are consistent with other reported biochemical characteristics of polyploid *Saccharomyces*.

Measurements of growth rates showed that generation times are independent of ploidy. This is compatible with the pool and cell weight data to the extent that the integral relationship between cell mass and ploidy would necessitate the proportionate relationship between amino acid protein precursors and ploidy in order for cells of different levels of polyploidy to maintain equivalent division rates.

Thus, these studies offer the extent of the cellular free amino acid content as one more criterion for identification of polyploidy in *Saccharomyces* in the absence of convenient genetic procedures. In addition they show that the polyploid state exerts neither a debilitating nor an invigorating effect upon the division rate of the individual yeast cell. In terms of population dynamics, however, the demonstrated ploidy dependence of cell mass coupled with the ploidy independence of generation time does imply a selective advantage favoring highly polyploid individuals when competing in mixed culture with cells of lower degrees of ploidy.

¹⁰ C. C. LINDEGREN and G. LINDEGREN, J. gen. Microbiol. 5, 885 (1951).

¹¹ The culture medium was of the following composition: ammonium tartrate, 4 g; KH_2PO_4 , 1.5 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; CaCl_2 , 0.33 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.8 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.9 mg; inositol, 10 mg; thiamin, pyridoxine, nicotinic acid, p-aminobenzoic acid, calcium pantothenate, 600 μg each; biotin, 10 μg and distilled water, 1000 ml.

¹² H. O. HALVORSON and S. SPIEGELMAN, J. Bacteriol. 64, 207 (1952).

¹³ L. NAFTALIN, Nature 161, 763 (1948).

This work was performed during the tenure of a Postdoctoral Fellowship at the Institute of Microbiology supported by a grant from the Rockefeller Institute to Prof. WALTER J. NICKERSON.

A. SARACHEK*

Institute of Microbiology, Rutgers – the State University, New Jersey, July 23, 1958.

Zusammenfassung

In einer genetisch nachweisbar polyploiden Familie von *Saccharomyces* wurden der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren und die Geschwindigkeit der Zellteilungen in Abhängigkeit der Ploidie bestimmt. Es liess sich zeigen, dass die Geschwindigkeit der Zellteilungen von der Ploidie nicht beeinflusst wird, während der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren sich direkt proportional mit der Zunahme der Ploidie vergrössert (Verhältnis 1:1).

* Present address: Department of Biology, University of Wichita, Wichita, Kansas.

Verteilungskoeffizient und bakterizide Wirkung von Phenolen und aromatischen Alkoholen

Die Bedeutung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Zellipoiden (Cytoplasmamembran) und wässriger Phase für die Wirksamkeit eines Arzneimittels wurde vielfach dargelegt und findet in neuerer Zeit wieder vermehrte Beachtung¹. Nur von wenigen Autoren ist diese Denkweise konsequent auch bei der Einwirkung von Desinfektionsmitteln auf Bakterien angewandt worden^{2,3,4,5}, obgleich in homologen Serien (bei Phenolen, Alkoholen u. a.) den bakteriziden Wirkungen gewisse Stoffeigenschaften in auffälliger Weise parallel laufen: Wasserlöslichkeit, Erniedrigung der Oberflächenspannung, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient (Konzentration in lipophiler Phase/Konzentration in Wasser)².

Bei Abtötungsversuchen an Bakterien stellten wir ganz allgemein fest⁶, dass von den geprüften Phenolen und aromatischen Alkoholen um so geringere Konzentrationen zur Erreichung eines bestimmten Mortalitätsgrades nötig waren, je geringer die Wasserlöslichkeit einer Verbindung war. Damit kamen wir vorerst zum gleichen Resultat wie FERGUSON². Dieser bezeichnete den Quotienten

$$\frac{\text{geprüfte, molare Konzentration}}{\text{Wasserlöslichkeit in mol}}$$

als (thermodynamische) Aktivität und zeigte am Beispiel der Alkohole (Methyl- bis Octyl-), dass trotz sehr verschiedenen geprüften Konzentrationen die Aktivitäten ungefähr gleich waren. ALLAWALA und RIEGELMAN³ kamen bei der Untersuchung einer grösseren Reihe von Phenolen zum gleichen Schluss.

Besonders aufschlussreich zeigten sich bei der Prüfung die aromatischen Alkohole. Erwartungsgemäss stellten wir folgende Wirkungssteigerung fest:

¹ B. B. BRODIE und C. A. M. HOGGEN, *J. Pharm. Pharmacol.* **9**, 345 (1957).

² J. FERGUSON, *Proc. Roy. Soc. London, B* **127**, 387 (1939).

³ N. A. ALLAWALA und S. RIEGELMAN, *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. ed.* **43**, 93 (1954).

⁴ E. M. RICHARDSON und E. E. REID, *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 413 (1940).

⁵ A. J. SHUKIS und R. C. TALLMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **65**, 2365 (1943).

⁶ Wir bedienten uns der Membranfilter-Methode und arbeiteten meist im Mortalitätsbereich 99,9–99,999%, vgl. Diss. H. HESS, Basel 1958, in der sich die ausführlichen Resultate finden.

Benzylalkohol < β -Phenyläthylalkohol < γ -Phenylpropylalkohol. Neben dieser Verlängerung der Seitenkette suchten wir auch mit Hilfe von Kernsubstitution zu wirksameren Verbindungen zu kommen und stellten p-Chlorbenzylalkohol und p-Chlor- β -phenyläthylalkohol dar. Die beiden chlorierten Alkohole und γ -Phenylpropylalkohol sind unseres Wissens noch nicht auf ihre bakterizide Wirkung geprüft worden. Bei diesen chlorierten Alkoholen fanden wir nun, dass die Wirksamkeit sich nicht, wie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, umgekehrt proportional zur Wasserlöslichkeit verhielt. So erzielten wir zum Beispiel mit einer 0,3% (0,021 mol) -Lösung von p-Chlorbenzylalkohol (Wasserlöslichkeit bei + 3°C = 0,021 mol) einen gleichen Mortalitätsgrad wie mit einer 0,2% -Lösung (0,013 mol) von p-Chlor- β -phenyläthylalkohol (Wasserlöslichkeit = 0,0294 mol). Die nach FERGUSON berechneten Aktivitäten stimmen somit nicht überein: p-Chlorbenzylalkohol = 1,0, p-Chlor- β -phenyläthylalkohol = 0,44. Mit Hilfe der Verteilung zwischen Wasser und Hexan als lipoider Phase konnte das Problem jedoch gelöst werden. Die erwähnten, gleich stark bakterizid wirkenden Konzentrationen ergaben nach der Verteilung folgendes Bild (s. Tabelle).

Die bei der Verteilung zwischen Wasser und Hexan vom letzteren aufgenommenen Mengen sind also annähernd gleich. Ähnliche Zusammenhänge ergaben die Prüfungen von Phenolen: Von substituierten Monophenolen und Monoäthern von Diphenolen, die gleiche Wasserlöslichkeit besitzen, sind die Monophenole dank besserem Verteilungskoeffizienten wirksamer. RICHARDSON und REID⁴ kamen bei α - ω -Di-p-hydroxyphenylalkanen und SHUKIS und TALLMAN⁵ bei aliphatischen Hg-Verbindungen ebenfalls zur Ansicht, dass der Verteilungskoeffizient von ausschlaggebendem Einfluss auf die bakterizide Wirksamkeit ist.

Auf Grund dieser Resultate lässt sich die Regel aufstellen, dass verschiedene, in wässriger Lösung vorhandene Konzentrationen von Phenolen und aromatischen Alkoholen eine gleiche bakterizide Wirkung ausüben, wenn bei der Verteilung zwischen Wasser und einer lipophilen Phase in der Lipoidphase gleiche molare Konzentrationen erhalten werden. Diese Regel kann in erster Annäherung für die Bewertung von phenolischen und alkoholischen Desinfektionsmitteln gebraucht werden, indem wie folgt verfahren wird:

c_w sei die in wässriger Lösung vorgegebene Konzentration (in mol), c_L die Konzentration in der Lipoidphase nach der Verteilung. Den Quotienten c_w/c_L bezeichnen wir vorläufig als «Aktivitätsindex». Bei der Festlegung der lipoiden Phase ist die erhaltene Zahl für einen bestimmten Stoff immer gleich. Mit den «Aktivitätsindizes» als Stoffkonstanten werden nun die in wässriger Lösung vorgegebenen Konzentrationen c_w der zu vergleichenden Substanzen so lange geändert, bis gleiche Konzentrationen in der Lipoidphase erhalten werden. Die auf diese Weise errechneten, verschiedenen Konzentrationen der zum Vergleich stehenden Phenole oder aromatischen Alkohole werden eine ungefähr gleiche bakterizide Wirkung ausüben. Da das phenolische Hydroxyl auch gegenüber Bakterien reaktionsfähiger ist, können die Phenole und aromatischen Alkohole nicht in der gleichen Reihe behandelt werden. Da ferner Phenolat-Ionen nicht bakterizid wirken (dies wird durch unsere Versuche erneut bestätigt), müssen Phenole in undissoziierter Form vorliegen, bzw. es darf nur der undissoziierte Anteil berücksichtigt werden.

Bei den in Frage stehenden Verbindungen sind zwei Gesichtspunkte für die bakterizide Wirksamkeit massgebend: