

## Produzione di alcaloidi in coltura sommersa con differenti ceppi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall.

LIDIA BARCELLONA VERO (\*), PIETRO BIANCHI (\*) e ANTONIO TONOLO

*Laboratori di Chimica Biologica, Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*

**Riassunto.** — Viene descritta la produzione di alcaloidi in coltura sommersa con ceppi diversi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall. Viene posta in evidenza la relazione esistente tra origine del ceppo e produzione di alcaloidi in funzione anche della forma della colonia e della struttura del micelio in coltura sommersa. È stata confermata la presenza di un solo alcaloide e precisamente dell' $\alpha$ -idrossietilammide dell'acido lisergico.

**Summary.** (*Alkaloid production in submerged culture by different strains of Claviceps paspali Stev. et Hall.*). — A relationship of alkaloid production with strain origin, form of colonies and structure of mycelium grown in submerged culture was observed.

Only the sclerotial type of colony (Fig. 2) produces sennemetic pellets in submerged culture and forms alkaloids. This type of colony represents the dominant type in strains derived from sclerotia, and a rarer type in strains originated from conidia of ascospores (Table 1). The heterokaryotic nature of the sclerotial cells has been assumed.

The presence of a single alkaloid, namely  $\alpha$ -oxyethylamide of lysergic acid, was confirmed.

---

In recenti lavori è stata descritta la produzione di alcaloidi derivati dall'acido lisergico in coltura sommersa adoperando particolari ceppi selezionati di *Claviceps paspali* Stev. et Hall. (TONOLO, 1959; ARCAMONE *et al.*, 1960; 1961; PACIFICI, KELLEHER & SCHWARTING, 1962).

Queste ricerche sono state ora estese per esaminare la possibilità di produrre alcaloidi con altri ceppi di *C. paspali*, isolati recentemente da co-

---

(\*) Borsista del Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

nidi e sclerozi raccolti su *Paspalum distichum* L. var. *paspalodes* Thell. a Sabaudia, vicino Roma (GRASSO, LENZI & TONOLO, 1962).

#### TECNICHE E METODI

*Terreni di coltura.* — Per l'isolamento ed il mantenimento delle colture è stato adoperato un terreno costituito da: decotto di g 300 di patate; glucosio, g 10; agar, g 15; acqua distillata, 1000 ml; pH 6,8-7,0. Per le colture sommerse invece sono stati adoperati i seguenti terreni:

**Terreno A** — come il terreno precedentemente descritto, ovviamente senza l'aggiunta di agar;

**Terreno B** — mannite, 5 %; acido succinico, 1 %;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 %; farina di ceci, 0,1 %; pH 5,2 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; acqua di fonte;

**Terreno C** — mannite, 5 %; acido succinico, 4 %;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 %; pH 5,2 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; acqua di fonte.

I terreni A e B sono stati adoperati come terreni di semina, mentre il terreno C è stato usato solo come terreno di fermentazione (ARCAMONE *et al.*, 1961).

*Isolamento dei ceppi.* — I vari ceppi sono stati isolati da: conidi, raccolti da una goccia di melata di un fiore infetto; sclerozi, previo accurato lavaggio con acqua ed alcool della superficie e sterilizzazione con una soluzione all'1 ‰ di  $\text{HgCl}_2$ ; ascospore.

*Inoculo delle beute e prove di fermentazione.* — Le beute contenenti il terreno A sono state inoculate con il micelio, sviluppatosi in una provetta a becco di clarino, di 10-15 giorni di età. Dopo circa 10 giorni, il micelio sviluppatosi nel terreno A era omogeneizzato in un *Waring-blendor* per 3-4 min''. Con 10 ml della sospensione miceliale così ottenuta, si inoculavano le beute contenenti il terreno B. Con 10 ml di questa nuova brodocoltura si inoculavano infine, dopo 3-4 giorni, le beute di fermentazione (terreno C). Le fermentazioni in coltura sommersa sono state eseguite in beute da 500 ml di capacità contenenti 100 ml dei vari terreni nutritivi. Le beute erano poste su agitatore rotatorio (220 giri al min' con un eccentrico di 10 cm) a 24°C.

*Analisi.* — Gli alcaloidi sono stati titolati quantitativamente nel brodo variamente diluito eseguendo la reazione di van Urk (ARCAMONE *et al.*, 1961). Le quantità di alcaloidi sono espresse in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , come ergometrina. L'identificazione degli alcaloidi è stata eseguita con metodo cromatografico (ARCAMONE *et al.*, 1961).

## RISULTATI

*Morfologia delle colonie*

Le colonie dei vari ceppi isolati da conidi, sclerozi e ascospore si potevano raggruppare in tre tipi distinti morfologicamente tra di loro (osservazioni dopo 14 giorni di sviluppo a 24°C).

*Colonie di tipo filamentoso* (Fig. 1, a). — Esse erano rotondeggianti, lisce, con un diametro di cm 3,5-4, con bordo continuo, senza pieghe radiali; micelio aereo bianco o bianco-bruno; goccioline assenti o molto rare, in ogni caso bruno pallide, mai verdi; micelio aereo abbondante, fioccoso, leggero; micelio vegetativo bruno scuro o incolore. Non erano presenti pigmenti nel mezzo di coltura. Microscopicamente il micelio era costituito da ife allungate, con rare ramificazioni laterali di 3-5  $\mu$  di spessore, conidi o altre forme di moltiplicazioni assenti. Solo a contatto dell'agar si osservava un leggero strato scleroziale, formato da cellule poligonali (TONOLO, SCOTTI & VERO, 1961), il quale occupava solo 1/20 dello spessore totale della colonia, che variava da 1,5 a 2,5 mm.

*Colonie di tipo scleroziale* (Fig. 2, a). — Esse erano piccole, con micelio aereo corto, non fioccoso, con molte goccioline di essudato, di colore verde o bruno-verde, diametro medio cm 1,8-2,5; colonie rilevate al centro, micelio vegetativo bruno o verde, esteso a tutta la superficie della colonia; assenza di pigmento nel mezzo di coltura. Le colonie tipo scleroziale a differenza di quelle di tipo filamentoso, presentano struttura scleroziale in tutto lo spessore, che è circa 1,5 mm. Ife normali si avevano solo sulla superficie della colonia.

*Colonie nane* (Fig. 3, a). — Esse erano molto piccole, circa 1 cm di diametro, a crescita limitata, irregolari, con pigmento diffuso nel mezzo di coltura. Il micelio, a differenza di quello presente negli altri tipi, era costituito da ife che presentavano ingrossamenti clamidosporoidi, diffusi, di 10-14  $\mu$  di diametro.

I diversi tipi di colonie ora descritti si trovavano rappresentati in differenti percentuali, a seconda dell'origine dei ceppi (Tabella 1).

*Produzione di alcaloidi in coltura sommersa.*

L'origine del ceppo ed il tipo della colonia avevano una importanza fondamentale nella produzione di alcaloidi (Tabella 1, ultima riga).

Esisteva cioè una stretta relazione tra origine del ceppo, forma della colonia, struttura del micelio in coltura sommersa e produzione di alcaloidi. Infatti i ceppi, isolati da conidi, sclerozi o ascospore, che presentavano co-

lonie di tipo filamentoso, non producevano alcaloidi. Questo fatto era correlato ad una struttura non scleroziale della colonia che si ripeteva nella forma del micelio in coltura sommersa. Questo era infatti rappresentato da piccole palette, di 2-3 mm di diametro, bruno-scure, senza sinnemi, con micelio sparso ed intensamente ramificato (Fig. 1, b, c, d). Un comportamento analogo era ottenuto con colonie di tipo nano, che avevano la medesima struttura (Fig. 3, b). I ceppi invece che producevano alcaloidi erano quelli che presentavano il tipo di colonia scleroziale, il quale dava origine in coltura sommersa a forme di micelio organizzate in tipici sinnemi (Figura 2, b). In tutti i ceppi produttori è stata notata la produzione di un solo alcaloide e precisamente dell' $\alpha$ -idrossietilammide dell'acido lisergico. In nessun caso è stata notata presenza, anche in tracce, di alcaloidi peptidici o di clavine.

TABELLA 1.

Percentuali dei diversi tipi di colonie di «*Claviceps paspali*», in rapporto all'origine dei ceppi. Produzione relativa di alcaloidi in coltura sommersa.

Origine del ceppo	Colonie di tipo			Totale colonie esaminate (n°)
	filamentoso %	scleroziale %	nano %	
da conidi . . . . .	53,8	46,2	0	150
da sclerozi . . . . .	5,5	94,5	0	85
da ascospore . . . . .	10,0	40	50	200
Alcaloidi prodotti ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,0	34,5	0	

#### CONCLUSIONE

La relazione esistente tra struttura miceliale e produzione di alcaloidi è facilmente interpretabile qualora venga tenuta presente la condizione naturale. Infatti, in natura, la produzione di alcaloidi avviene solo nella fase di sviluppo scleroziale del fungo (TONOLO, SCOTTI & VERO, 1961). Risulta quindi evidente il fatto che, per ottenere la produzione di alcaloidi durante la fase di vita saprofitaria del fungo, occorre almeno determinare condizioni morfologiche analoghe a quelle naturali.

Non era invece facilmente interpretabile la relazione esistente tra origine dei ceppi e relativa produzione di alcaloidi. Infatti circa la metà dei ceppi isolati da conidi e da ascospore presentavano colonie di tipo fila-

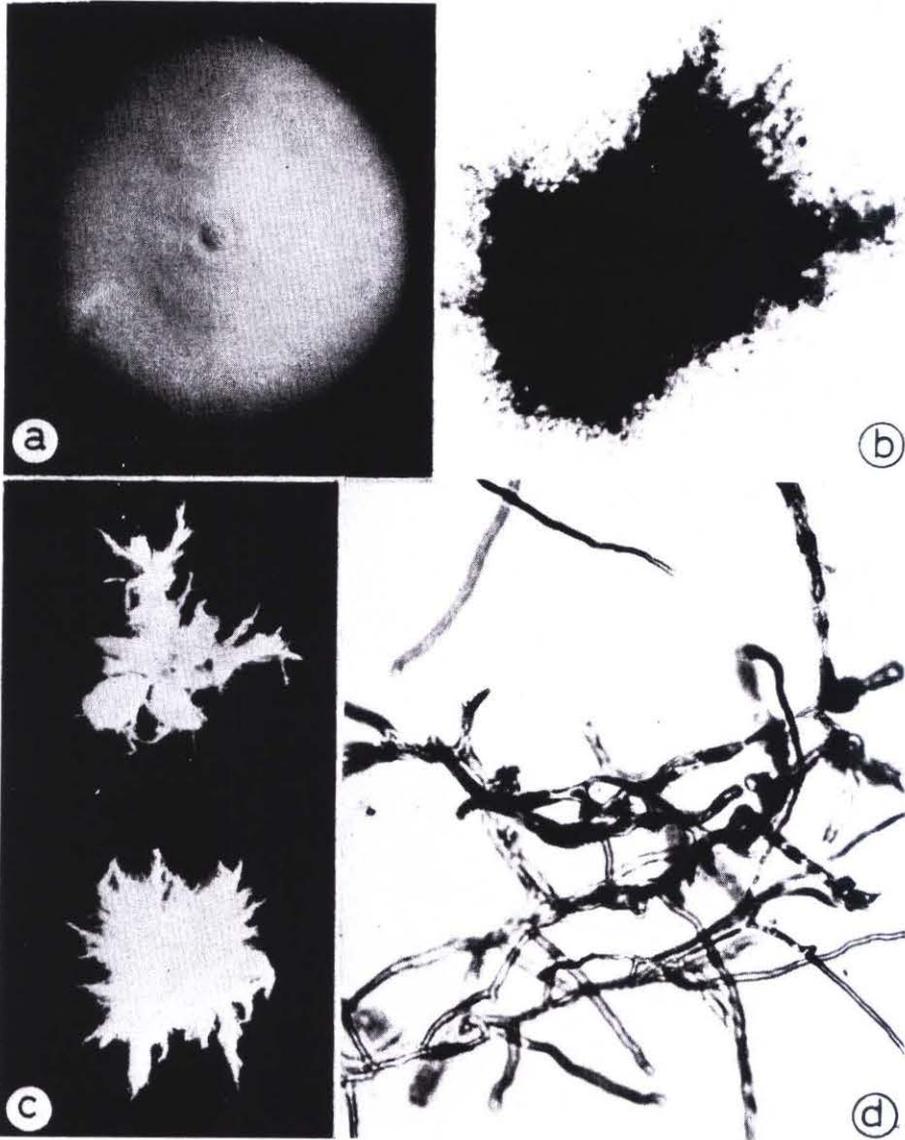


Fig. 1. — Forme pseudoscleroziali di *Claviceps paspali* (tipo filamentoso) su agar e in coltura sommersa: a) colonia di tipo filamentoso, su agar ( $\times 1,5$ ); b) palletta miceliale in coltura sommersa — si noti l'assenza di forme sinnematiche ( $\times 20$ ); c) pallette miceliali in coltura sommersa — illuminazione dall'alto ( $\times 10$ ); d) particolare del micelio in coltura sommersa. Si notino le numerose ramificazioni laterali e la struttura lassa del micelio ( $\times 200$ ).

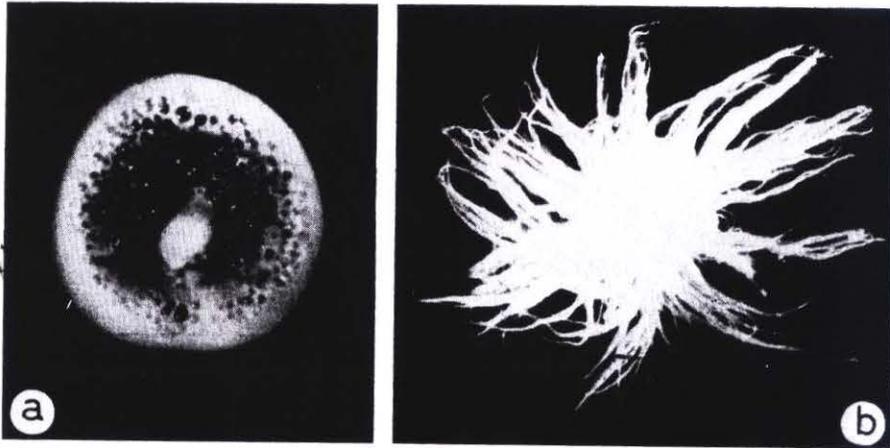


Fig. 2. — Forme scleroziali di *Claviceps paspali* su agar e in coltura sommersa: a) colonia di tipo scleroziale ( $\times 2$ ); b) palletta sinnematica in coltura sommersa — illuminazione dall'alto ( $\times 3$ ).



Fig. 3. — Forme pseudoscleroziali di *Claviceps paspali* (tipo nano) su agar e in coltura sommersa: a) colonia di tipo nano ( $\times 1,5$ ); b) palletta in coltura sommersa — illuminazione dall'alto ( $\times 5$ ).

mentoso che non producevano alcaloidi in coltura sommersa. Poichè non era immaginabile che la perdita di tali capacità produttive fosse dovuta a mutazioni geniche, per le quali si sarebbe dovuta sopporre una frequenza troppo elevata, si doveva pensare che la produttività fosse condizionata da altri fattori. Essa poteva essere pregiudicata dalla segregazione, all'atto della sporogenesi, di nuclei diversi da un micelio eterocariotico produttivo, segregazione che non si determinerebbe se l'isolamento avvenisse direttamente da cellule scleroziali. Infatti in alcuni ceppi di *Claviceps* sp. isolati da *Pennisetum tippoideum* Rich. la formazione di micelio scleroziale in coltura sommersa è correlata a fenomeni di fusione nucleare (Tonolo, osservazioni non pubblicate). È evidente che tutto il processo che porta alla formazione di sclerozi implica un differente quadro citologico e quindi una differente costituzione nucleare e genica. Può quindi risultare chiaro come l'isolamento da sclerozi, nei quali tale costituzione è già presente, possa determinare un aumento considerevole nel numero delle colonie con caratteristiche scleroziali e con la relativa capacità di produrre alcaloidi.

Si ringraziano sentitamente il Prof. E. B. Chain, F. R. S., il Prof. G. Sermonti per l'interessamento, i consigli e le discussioni avute durante il lavoro; il Prof. V. Grasso per la lettura e la correzione del manoscritto; i Signori T. Bartoli, G. Ignazzitto e C. Patrolecco per la loro proficua assistenza tecnica.

24 febbraio 1965.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARCAMONE, F., C. BONINO, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO & L. VERO, 1960. *Nature*, **187**, 238.
- ARCAMONE, P., E. B. CHAIN, A. FERRETTI, A. MINGHETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO & L. VERO, 1961. *Proc. Roy. Soc. B*, **155**, 26.
- GRASSO, V., A. M. LENZI & A. TONOLO, 1962. *Italia Agr.*, **8**, 755.
- PACIFICI, L. R., W. J. KELLEHER & A. E. SCHWARTING, 1962. *Lloydia*, **25**, 37-45.
- TONOLO, A., *Selected Sci. Papers, Ist. Super. Sanità*, **2**, 386.
- TONOLO, A., T. SCOTTI & L. VERO, 1961. *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità*, **1**, 404.

## Nucleotidi di microrganismi. Nota XII. Isolamento e caratterizzazione di un nuovo nucleotide uridinico contenuto in *Fusarium* sp. (\*)

CARLO DELFINI e SERENA RUSSI

Laboratori di Chimica Biologica, Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

**Riassunto.** — Da *Fusarium* sp. è stato isolato un nuovo nucleotide coniugato dell'uridin-5'-difosfato.

Si descrivono l'isolamento, la purificazione e la parziale caratterizzazione di questo composto.

**Summary.** (*Nucleotides of microorganisms. XII-Isolation and characterization of a new uridin-nucleotide contained in Fusarium sp.*). — A new uridin diphosphate derivative (substance X<sub>3</sub>) has been isolated from a *Fusarium* sp. and purified by chromatographic techniques. Microanalyses gave molar ratios between: uracil, total phosphorus and phosphorus hydrolysable by 1N hydrochloric acid, nearly equivalent to 1 : 2 : 1; hydrolysis with Cobra venom pyrophosphatase, which also contained 5'-nucleotidase, gave uridine, phosphoric acid, uridine 5'-monophosphate (UMP) and a phosphoric ester (compound XP), (see Table 4). Hydrolysis of XP with *Escherichia coli* alkaline phosphatase liberated a reductant compound (substance X), which did not absorb in the ultraviolet region, carried a negative charge, but was different from the common hexuronic acids (see Tables 5 and 6).

L'esame dei nucleotidi acido-solubili presenti in estratti idroalcolici o perclorici di *Fusarium* sp. ha rivelato la presenza in questo fungo, come già in precedenza nel caso del *Penicillium chrysogenum* (BALLIO, CASINOVÌ & SERLUPÌ-CRESCENZI, 1959; BALLIO & DI VITTORIO, 1962), di numerosi derivati della citidina, dell'uridina, dell'adenosina e della guanosina e di alcuni nuovi composti (BALLIO & RUSSI, 1960; BALLIO, RUSSI & SERLUPÌ-CRESCENZI, 1964). Tre di questi ultimi sono stati oggetto di indagini particolareggiate che hanno consentito in due casi di giungere a risultati strutturali esaurienti; è stato infatti dimostrato che uno dei prodotti ignoti era il

(\*) Nota XI: A. BALLIO, I. KULAEV, V. MORET & S. RUSSI - *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 489-491 (1966).

ribotide dell'acido nicotinico (BALLIO & RUSSI, 1959) ed un altro il riboside della 2-(carbossietilammino)-6-ossipurina o acido guanosinpropionico (BALLIO, DELFINI & RUSSI, 1960). Il terzo prodotto, indicato in una precedente nota (BALLIO & RUSSI, 1960) con la sigla X<sub>3</sub>, era risultato ad un esame preliminare un nuovo nucleotide coniugato dell'UDP (\*). In questo lavoro vengono riportati l'isolamento, la purificazione, le proprietà generali e la parziale caratterizzazione di questo nuovo composto.

#### MATERIALI E METODI

##### *Reattivi e prodotti.*

Quando non sia indicato diversamente, tutti i reattivi ed i solventi erano della C. Erba puri per analisi.

La resina Dowex 1x8 (200-400 mesh), acquistata dalla Fluka (Svizzera) sotto forma di cloruro, veniva trasformata nella forma formiato con il metodo di HURLBERT *et al.* (1954). Il carbone usato per l'adsorbimento dei nucleotidi era il tipo OL granulare della Pittsburgh Coke & Chemical Co. (U.S.A.) e veniva trattato con il procedimento descritto in una nota precedente (BALLIO & DI VITTORIO, 1962). Il glucuronlattone e l'acido galatturonico erano prodotti Fluka (Svizzera), l'acido mannuronico si preparava per idrolisi dell'acido alginico (SPOEHR, 1947) e l'acido iduronico per idrolisi della beta-eparina (CIFONELLI & DORFMAN, 1958). Le basi, i nucleosidi e i nucleotidi di riferimento usati nelle analisi cromatografiche ed elettroforetiche su carta erano dei Pabst Laboratories (U.S.A.) o della Sigma Chemical Co. (U.S.A.).

Come fonte di pirofosfatasi (dinucleotide nucleotidoidrolasi, 3.6.1.9, secondo la nomenclatura ufficiale) è stato usato veleno di Cobra (*Naja naja*) proveniente dal Haffkine Institute di Bombay (India); il veleno conteneva anche una 5'-nucleotidasi (5'-ribonucleotide fosfoidrolasi, 3.1.3.5, secondo la nomenclatura ufficiale) molto attiva.

La fosfatasi alcalina (fosfoidrolasi di monoesteri ortofosforici, 3.1.3.1, secondo la nomenclatura ufficiale) era di origine batterica, del tipo cromatograficamente puro, prodotto dalla Worthington Biochemical Corp. (U.S.A.), la cui concentrazione in proteine era 5 mg/ml e l'attività era 26 u/mg.

##### *Produzione del micelio ed estrazione dei nucleotidi.*

Per quanto riguarda l'organismo usato, le operazioni relative alla produzione del micelio e l'estrazione dei nucleotidi, si rimanda ai metodi descritti in una nota precedente (BALLIO, RUSSI & SERLUPI-CRESCENZI, 1964).

---

(\*) Nel presente lavoro abbiamo adottato per i composti nucleotidici le comuni abbreviazioni e precisamente: UMP = uridin-5'-monofosfato, UDP = uridin-5'-difosfato, UDPG = uridin-5'-difosfato-glucosio, UDPAG = uridin-5'-difosfato-N-acetil-glucosamina, UDPGA = acido uridin-5'-difosfoglucuronico, ATP = adenosin-5'-trifosfato.

*Frazionamento su resina scambiatrice di anioni.*

Il frazionamento dei nucleotidi estratti dal micelio veniva eseguito modificando come segue il procedimento già descritto per lo stesso organismo (BALLIO, RUSSI & SERLUPPI-CRESCENZI, 1964). L'estratto perclorico neutralizzato veniva percolato su colonna di resina Dowex 1x8 (200-400 mesh) sotto forma di formiato, il rapporto altezza-diametro della colonna era circa 8. Veniva impiegato 1 ml di resina per un valore di unità di densità ottica a 260 m $\mu$  pari a 150. Alla percolazione seguiva il lavaggio con acqua finché la densità ottica a 260 m $\mu$  era nulla. Dopo il lavaggio, si eseguiva una serie di 9 eluizioni a gradiente con acido formico e con acido formico contenente formiato ammonico, secondo il metodo di HURLBERT *et al.* (1954), così modificato: il mescolatore e la riserva avevano dimensioni e forma identiche, erano aperti ed intercomunicanti e pertanto davano luogo ad un gradiente lineare; essi venivano riempiti ciascuno con 5 volumi (rispetto a quello della resina contenuta nella colonna) di liquido; finita la prima fase di eluizione, seguiva subito la seconda, cui seguiva la terza, e così di seguito, secondo lo schema seguente:

MESCOLATORE	RISERVA
1. Acqua	HCOOH 0,8N
2. HCOOH 0,8N	» 1,6
3. » 1,6	» 2,4
4. » 2,4	» 3,2
5. » 3,2	» 4,0
6. » 4,0	HCOONH <sub>4</sub> 0,1M in HCOOH 4N
7. HCOONH <sub>4</sub> 0,1M in HCOOH 4N	» 0,2M » » »
8. » 0,2M » » »	» 0,3M » » »
9. » 0,3M » » »	» 0,4M » » »

Si raccoglievano frazioni di eluato corrispondenti a circa 1/40 del volume della resina. L'andamento dell'eluizione si seguiva spettrofotometricamente determinando la densità ottica di ogni frazione a 260 m $\mu$ .

*Metodi di identificazione dei composti.*

Le frazioni di ciascun picco venivano riunite, concentrate ed esaminate con i metodi precedentemente descritti (BALLIO, RUSSI & SERLUPPI-CRESCENZI, 1964).

*Metodi analitici.*

*Chimici.* — Il fosforo si dosava con il metodo di BEREMBLUM & CHAIN (1938), l'azoto totale con il micrometodo Kjeldahl (COMMITTEE FOR STANDARDIZATION OF MICROCHEMICAL APPARATUS, 1951) e l'azoto ammoniacale con il metodo di CONWAY (1957).

Il potere riducente si determinava con il metodo di PARK & JOHNSON (1949), modificato da SCHIFFMANN, HOWE & KABAT (1958).

La determinazione dei gruppi  $\alpha$ -glicolici si effettuava mediante il metodo spettrofotometrico di DIXON & LIPKIN (1954) parzialmente modificato: ad 1 volume della sostanza in esame sciolta in acqua (0,2  $\mu$ moli/ml) si aggiungeva 1 volume di soluzione acquosa di metaperiodato sodico 0,4 mM; la soluzione si conservava a temperatura ambiente, al buio ed in recipiente chiuso; l'andamento della reazione veniva seguito leggendo periodicamente la densità ottica della soluzione a 230  $m\mu$  contro acqua.

La quantità di formaldeide eventualmente liberata dalla reazione di ossidazione con periodato si determinava con il metodo di ARGANT (1949).

La determinazione quantitativa dei carboidrati (esosi semplici e pentosi) si effettuava con il metodo dell'antrone (NEUKOM & HUI, 1959), quella degli acidi esuronici con il metodo del carbazolo (DISCHE, 1947) e con quello dell'orcina (BROWN, 1946).

*Spettrofotometrici.* — Si usavano lo stesso apparecchio e gli stessi metodi descritti in una nota precedente (BALLIO, RUSSI & SERLUPI-CRESCENZI, 1964). Il coefficiente molare di assorbimento del nuovo derivato uridinico a 262  $m\mu$  ed a pH = 7 è stato considerato uguale a quello dei nucleotidi uridinici, cioè  $10,0 \times 10^3$ .

*Cromatografici.* — Eccetto i casi in cui sia indicato diversamente, si usava sempre carta Whatman 1 lavata con acido acetico 2N e poi con acqua. I fogli si sviluppavano con i seguenti sistemi di solventi:

- N° 1: Ammonio acetato 1M pH 3,8-alcool etilico a 95° (30 : 75);
- N° 2: Ammonio acetato 1M pH 7,5-alcool etilico a 95° (30 : 75);
- N° 3: Acido isobutirrico - ammoniaca 1M (100 : 60);
- N° 4: Isopropanolo - piridina - ac. acetico - acqua (8 : 8 : 1 : 4);
- N° 5: Etile acetato - piridina - ac. acetico - acqua (5 : 5 : 1 : 3);
- N° 6: Isopropanolo - ac. cloridico conc. - acqua (68 : 17,6 : acqua a 100 ml).

I fogli da sviluppare con il sistema N° 4 venivano lavati con una miscela di piridina, acqua, acido acetico (15 : 80 : 5). Eccetto che per il sistema N° 4 e N° 5, è stato usato sempre lo sviluppo discendente. La posizione dei vari prodotti sui cromatogrammi veniva individuata con i metodi ed i rivelatori già descritti in note precedenti (BALLIO, RUSSI & SERLUPI-CRESCENZI, 1964; BALLIO, CASINOVÌ & SERLUPI-CRESCENZI, 1959; BALLIO, CASINOVÌ & SERLUPI-CRESCENZI, 1961). In particolare la sostanza chiamata XP (vedi più avanti) si rivelava con periodato e benzidina (CIFONELLI & SMITH, 1954) o con molibdato e idrogeno solforato (BURROWS, GRYLLS & HARRISON, 1952); la sostanza chiamata X (vedi più avanti) con periodato e benzidina.

*Elettroforetici.* — Si usava un apparecchio simile a quello descritto da MARKHAM & SMITH (1952), con un gradiente di potenziale di 25 Volts/cm applicato per 1 ora a strisce di carta Whatman 1 lunghe 40 cm e con tamponi a base di acetato ammonico 0,05M o di citrato sodico 0,025M.

#### *Idrolisi chimiche.*

Le idrolisi con acido cloridrico venivano eseguite in tubicini chiusi; dopo evaporazione a secchezza in essiccatore sotto vuoto su idrato potassico, il residuo si riprendeva con un volume di acqua eguale a quello di partenza; su questa soluzione si eseguivano i dosaggi e le prove cromatografiche, elettroforetiche e spettrofotometriche.

#### *Idrolisi enzimatiche.*

*Con pirofosfatasi.* — Le idrolisi con pirofosfatasi del veleno di Cobra si eseguivano secondo le indicazioni descritte da JOHNSON *et al.* (1953), parzialmente modificate nel modo seguente: 1 volume di soluzione acquosa 10 mM del composto, 1 volume di soluzione acquosa contenente 5 mg/ml di veleno e 2 volumi di tampone 0,1M di veronal a pH 8,4 si incubavano 1 ora a 30°.

*Con fosfatasi alcalina.* — Le idrolisi con fosfatasi alcalina si eseguivano nelle condizioni seguenti: 1 ml di soluzione acquosa 5-10 mM del composto,  $\mu$ l 20 di fosfatasi,  $\mu$ l 20 di soluzione (satura a freddo) di bicarbonato sodico e  $\mu$ l 10 circa di NaOH al 10 %, a dare un valore di pH 8,4, si incubavano 90' a 37°.

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### *Isolamento del nucleotide.*

Il sistema a gradiente usato in questo lavoro per l'eluizione dei nucleotidi dalla resina scambiatrice di anioni consente di ottenere la sostanza X<sub>3</sub> perfettamente separata dall'UDP, dall'UDPAG e dall'ATP e rappresenta pertanto un sensibile miglioramento delle condizioni sperimentali rispetto a quelle usate in precedenza (BALLIO, RUSSI & SERLUPI-CRESCENZI, 1964).

Le frazioni corrispondenti al picco del prodotto X<sub>3</sub> si riunivano e si adsorbivano su colonna di carbone allo scopo di eliminare il formiato ammonico. Dopo eluizione dal carbone, il prodotto si isolava mediante liofilizzazione: la densità ottica a 260 m $\mu$  di una soluzione contenente 1 mg/ml era 18, da cui si ricavava, tenendo conto del coefficiente molare di assorbimento (vedi sotto metodi spettrofotometrici), un peso molecolare massimo di 555. Da una fermentazione di 50 litri sono state ottenute 0,7 millimoli di sostanza.

*Identificazione della parte nucleotidica.*

Il prodotto, purificato ancora mediante cromatografia su carta « a banda » con il solvente N° 3 e poi con il solvente N° 2, presentava uno spettro U.V. pressochè identico a quello dell'UDP (Tab. 1). Per idrolisi

TABELLA 1.

Spetri di assorbimento nell'U. V. del composto X<sub>3</sub> e dell'UDP.

Composto	$\lambda_{max}$ (in m $\mu$ )			$\lambda_{min}$ (in m $\mu$ )			$\epsilon$ 250 : $\epsilon$ 260			$\epsilon$ 280 : $\epsilon$ 260		
	acido	neu- tro	alca- lino	acido	neu- tro	alca- lino	acido	neu- tro	alca- lino	acido	neu- tro	alca- lino
X <sub>3</sub> . . . . .	262	262	262	231	231	242	0,76	0,75	0,85	0,42	0,42	0,39
UDP . . . . .	262	262	261	230	230	241	0,73	0,73	0,80	0,39	0,39	0,32

con HClO<sub>4</sub> liberava uracile ; per idrolisi blanda (HCl 0,01N per 10' a 100°) la parte nucleotidica si decomponeva in UMP e UDP, mentre per idrolisi più spinta (HCl 0,05N per 180' a 100°) dava luogo solo a UMP (Tab. 2). Dall'analisi del fosforo risultava che 1 mole di X<sub>3</sub> (la concentrazione veniva determinata sulla base dell'assorbimento a 262 m $\mu$ ) conteneva 0,92 moli di fosforo idrolizzabile (10' a 100° con HCl 1N) e 1,82 moli di fosforo totale.

TABELLA 2.

Mobilità cromatografiche su carta dei prodotti nucleotidici provenienti dall'idrolisi acida di X<sub>3</sub>.

COMPOSTO	Solvente N° 1 R <sub>adenosina</sub> *	Solvente N° 2 R <sub>adenosina</sub> *	Solvente N° 5 R <sub>F</sub>	Solvente N° 6 R <sub>F</sub>
X <sub>3</sub> idrolizzato con HClO <sub>4</sub> 70 % . . . . .				0,70
X <sub>3</sub> idrolizzato con HCl 0,01N (10' a 100°) . .	0,56 ; 0,86	0,50 ; 0,72	0,33 ; 0,51	
X <sub>3</sub> idrolizzato con HCl 0,05N (180' a 100°) .	0,84			
Uracile . . . . .				0,70
UDP . . . . .	0,57	0,49	0,33	
UMP . . . . .	0,85	0,72	0,51	

\* Mobilità relative all'adenosina.

Il composto aveva una mobilità elettroforetica verso l'anodo a pH 4,7 maggiore dell'UDPG e dello stesso ordine di quella dell'UDPGA (Tab. 3); questo comportamento bene si accorda con quello osservato nell'eluizione della colonna scambiatrice di anioni.

In conclusione i risultati ottenuti indicavano chiaramente che il composto è un nucleotide derivato dall'UDP.

TABELLA 3.

Mobilità cromatografiche ed elettroforetiche su carta del nucleotide  $X_3$  e di altri nucleotidi uridinici.

Composti	Mobilità cromatografiche				Mobilità elettroforetiche
	Solvente N° 1 $R_{adenosina}^*$	Solvente N° 2 $R_{adenosina}^*$	Solvente N° 3 $R_F$	Solvente N° 5 $R_F$	Migrazione verso l'anodo (1 ora a 25 V/cm) in acetato ammonico 0,05M, pH 4,7 cm
$X_3$ . . . . .	0,62	0,60	0,16	0,28	24,6
UDPG . . . . .	0,81	0,70	0,13		15,1
UDPGA . . . . .	0,51	0,50	0,105	0,26	24,9
UDP . . . . .	0,74	0,49	0,19 *	0,33	24,4
UMP . . . . .	0,95	0,72	0,29	0,51	15,7

\* Mobilità relative all'adenosina.

#### Caratterizzazione della parte non nucleotidica.

Allo scopo di caratterizzare la natura della parte non nucleotidica, il prodotto si sottoponeva ad una serie di trattamenti, per lo più eseguiti in microscala data l'esigua quantità di sostanza disponibile. Per azione della pirofosfatasi del veleno di serpente (che contiene anche una 5'-nucleotidasi), il prodotto era idrolizzato a dare uridina, acido fosforico, un po' di UMP ed un composto che indicheremo con XP, il quale costituisce l'estere fosforico della parte non nucleotidica di  $X_3$  (Tab. 4). L'idrolisato si cromatografava « a banda » per 48 ore su carta Whatman 3MM usando il solvente N° 3. Alla luce U.V. si rivelavano tre frazioni ben separate (poco prodotto inalterato, UMP e uridina) mentre il fosforo inorganico e la sostanza XP si evidenziavano con il reattivo al molibdato. La sostanza XP appariva chiaramente con questo reattivo, o con quello al periodato-benzidina, soltanto se era presente in quantità non inferiore a 0,25  $\mu$ moli.

La sostanza XP si poteva isolare per eluizione dalla carta seguita da liofilizzazione. Essa veniva idrolizzata sia enzimaticamente, con la fosfatasi

TABELLA 4.

Mobilità cromatografiche dei prodotti di idrolisi di  $X_3$   
con pirofosfatasi del veleno di Cobra.

Composti	Cromatografia nel solvente N° 3 $R_F$ *
$X_3$ . . . . .	0,42
$X_3$ idrolizzato . . . . .	0,72 ; 0,84 ; 1,00 ; 1,46
XP ** . . . . .	0,72
UMP . . . . .	0,83
$H_3PO_4$ ** . . . . .	1,00
Uridina . . . . .	1,47

\* Mobilità relativa all'acido fosforico.

\*\* Rivelato con molibdato -  $H_2S$ .

alcalina, che chimicamente ( $HCl$  0,01N per 60' a  $100^\circ$ ); in entrambi i casi il fosforo si liberava completamente come acido fosforico. Accanto a questo si otteneva una frazione, che chiameremo X, evidenziabile su carta con un reattivo al periodato-benzidina (in quantità non inferiori a  $0,25 \mu\text{moli}$ ) o mediante il reattivo al nitrato d'argento (TREVELYAN, PROCTER & HARRISON, 1950) con sensibilità però assai bassa (Tab. 5). L'idrolisi alcalina ( $NaOH$  0,01N per 2 ore a  $100^\circ$ ) lasciava l'XP inalterato.

La sostanza X ha un potere riducente, misurato col metodo al ferricianuro, corrispondente su base equimolecolare al 60 % di quello del glucosio, mentre la sostanza XP ha un potere riducente nullo. Evidentemente la funzione riducente di X è esterificata, probabilmente in forma enolica o emiacetalica, dal gruppo fosforico e si palesa pertanto solo dopo idrolisi. La sostanza X inoltre mostra nell'elettroforesi la presenza di un gruppo negativo (Tab. 5), prevedibile del resto dal comportamento di  $X_3$  nella cromatografia di scambio ionico. Questo fatto ha portato ad indagare se X fosse un acido esuronico; nella cromatografia su carta esso si è potuto agevolmente distinguere dagli acidi glucuronico, galatturonico, mannuronico e iduronico (Tab. 6); ed anche le reazioni cromatiche, eseguite direttamente su  $X_3$  con il carbazolo e con l'orcina, non hanno dato indicazioni a favore di tali ipotesi. La determinazione di carboidrati, eseguita su  $X_3$  con il metodo dell'antrone, ha dato un valore assai basso (0,07 moli di glucosio per mole di base).

L'ossidabilità con periodato, osservata nei cromatogrammi su carta, si è verificata anche in soluzione, applicando il micrometodo spettrofotometrico.

TABELLA 5.

Mobilità cromatografiche ed elettroforetiche su carta dei prodotti di idrolisi di XP con fosfatasi alcalina di « Escherichia coli ».

Composti	Mobilità cromatografiche			Mobilità elettroforetiche		
	Solvente N° 1 R <sub>F</sub>	Solvente N° 3 R <sub>F</sub>	Solvente N° 4 R <sub>F</sub>	Migrazione verso l'anodo (1 ora a 25 V/cm) in		
				acetato ammonico 0,05M, pH 4,7 cm	citrato sodico 0,025M pH 3,45 cm	citrato sodico 0,025M pH 3,0 cm
XP . . . . .	0,52	0,27	0,24	24,7	24,8	0,0
XP idrolizzato	0,65 ; 0,75 *	0,38 ; 0,46 *	0,45 ; 0,51	15,8	14,8 *	0,0
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . . .	0,65	0,38	0,51	24,7		

\* Sostanza rivelabile con periodato-benzidina.

metrico di DIXON & LIPKIN (1954); la cinetica dell'ossidazione è risultata assai lenta ed il consumo di periodato prossimo ad una mole per mole di sostanza X. Dopo ossidazione con periodato, una mole di sostanza X ha liberato 0,36 moli di formaldeide, rivelata mediante il metodo di Argent. Anche alcune reazioni tipiche degli  $\alpha$ -cheto-acidi sono risultate negative. L'identificazione di X<sub>3</sub> richiederebbe quantità notevolmente maggiori di

TABELLA 6.

Confronto della mobilità cromatografica su carta della sostanza X con quella di acidi uronici e rispettivi lattoni.

Composto	Solvente N° 1 R <sub>F</sub>	Solvente N° 2 R <sub>F</sub>	Solvente N° 5 R <sub>F</sub>
Ac. mannuronico . . . . .	0,49	0,52	0,43
Mannuronlattone . . . . .	0,68	0,70	0,73
Ac. glucuronico . . . . .	0,46	0,49	0,37
Glucuronlattone . . . . .	0,71	0,72	0,80
Ac. galatturonico . . . . .	0,50	0,49	0,35
Ac. iduronico + iduronlattone *	0,67 - 0,80	0,55 - 0,66	0,35 - 0,53
Sostanza X . . . . .	0,60	0,61	0,49

\* Miscela ottenuta per idrolisi acida della  $\beta$ -eparina.

quelle finora ottenute. D'altronde l'estrazione e la purificazione del nucleotide, a partire da quantitativi di *Fusarium* sp. maggiori di quelli finora usati, comporterebbero difficoltà di natura sia tecnica che economica. Tali considerazioni ci hanno convinto ad abbandonare, almeno per ora, ulteriori tentativi di completare lo studio del composto X<sub>3</sub>.

Resta comunque stabilito che a questo nucleotide uridinico coniugato deve corrispondere una struttura differente da quella nota per altri composti del genere. I derivati dell'UDP ritrovati in natura ed identificati ammontano ad una ventina circa; senza eccezione finora, essi hanno la parte non nucleotidica riconducibile ad un carboidrato (diossiacetone, pentosi, esosi, oligosaccaridi, acidi uronici, N-acetilamminozuccheri) o ad un oligopeptide, o ad entrambi contemporaneamente (nucleotidi precursori della parete cellulare batterica, SALTON, 1964) e per le loro proprietà sono certamente differenti dal composto X<sub>3</sub> isolato dal *Fusarium* sp.

Ringraziamo il Prof. A. Ballio per i preziosi consigli e suggerimenti, il Dr. J. A. Cifonelli per un campione di beta-eparina ed i signori G. Amici, G. Lanzi e F. Pieroni per l'assistenza tecnica.

31 dicembre 1965

#### BIBLIOGRAFIA

- ARGANT, N., 1949. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31** 485-491.
- BALLIO, A., C. G. CASINOVI & G. SERLUPI-CRESCENZI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 241-262.
- BALLIO, A., C. G. CASINOVI & G. SERLUPI-CRESCENZI, 1961. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **24**, 299-320.
- BALLIO, A., C. DELFINI & S. RUSSI, 1960. *Nature*, **186**, 968-969.
- BALLIO, A. & V. DI VITTORIO, 1962. *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità*, **2**, 232-246.
- BALLIO, A. & S. RUSSI, 1959. *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 567-569.
- BALLIO, A. & S. RUSSI, 1960. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **36**, 2008-2010.
- BALLIO, A., S. RUSSI & G. SERLUPI-CRESCENZI, 1964. *Gazz. Chim. Ital.*, **94**, 156-175.
- BEREMBLUM, J. & E. B. CHAIN, 1938. *Biochem. J.*, **32**, 295-298.
- BROWN, A. H., 1946. *Arch. Biochem.*, **11**, 269-278.
- BURROWS, S., F. S. M. GRYLLES & J. S. HARRISON, 1952. *Nature*, **170**, 800-801.
- CIFONELLI, C. A. & A. DORFMAN, 1958. *J. Biol. Chem.*, **231**, 11-18.
- CIFONELLI, C. A. & F. SMITH, 1954. *Anal. Chem.*, **26**, 1132-1134.
- COMMITTEE FOR STANDARDIZATION OF MICROCHEMICAL APPARATUS, 1951. *Anal. Chem.*, **23**, 523-528.
- CONWAY, E. G., 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*, Crosby Lockwood and Son, London, p. 9 e p. 38.
- DISCHE, Z., 1947. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189-198.
- DIXON, J. S. & D. LIPKIN, 1954. *Anal. Chem.*, **26**, 1092-1093.
- HURLBERT, R. B., H. SCHMITZ, A. F. BRUMM & V. R. POTTER, 1954. *J. Biol. Chem.*, **209**, 23-54.

- JOHNSON, M., M. A. G. KAYE, R. HEMS & H. A. KREBS, 1953. *Biochem. J.*, **54**, 625-629.
- MARKHAM, R. & J. D. SMITH, 1952. *Biochem. J.*, **52**, 552-557.
- NEUKOM, H. & P. HUI, 1959. *Chimia*, **13**, 330.
- PARK, J. T. & M. J. JOHNSON, 1949. *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151.
- SALTON, M. R. J., 1964. *The bacterial cell wall*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, pp. 284-285.
- SCHIFFMANN, G., C. HOWE & E. A. KABAT, 1958. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6662-6670.
- SPOEHR, H. A., 1947. *Arch. Biochem.*, **14**, 153-155.
- TREVELYAN, W. E., D. P. PROCTER & J. S. HARRISON, 1950. *Nature*, **166**, 444-445.