

15. J. A. OLSON (*) e E. B. CHAIN. — **Metabolismo di acidi organici da parte del *Penicillium chrysogenum* Q 176 sviluppato su acetato. (**)**

Riassunto. — 1) Si descrivono gli elementi che caratterizzano la fermentazione del *P. chrysogenum* sviluppato in un terreno di acetato e sali.

2) Sospensioni di micelio lavato, sviluppato su acetato, ossidano con velocità apprezzabile l'acetato, ma non altri acidi organici. I tentativi di indurre l'ossidazione degli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici mediante congelamento seguito da sgelamento, o aumentando la concentrazione idrogenionica o usando gli esteri degli acidi, non hanno in genere avuto successo. Nel micelio intatto elevate concentrazioni di malonato dietilico (0,5 M) inibiscono l'ossidazione dell'acetato e del glucosio. E' probabile che questo estere, contrariamente all'acido malonico libero, sia capace di penetrare nella cellula. L'azione inibitrice dell'estere, più che dovuta ad un'azione specifica sul sistema succinossidasico, sembra essere di natura generale.

3) La muffa, sviluppata su vari acidi organici come unica fonte di carbonio, in genere, ossida con facilità l'acido sul quale è avvenuto lo sviluppo e attacca induttivamente il glucosio e l'acetato, ma non ossida in modo apprezzabile gli altri intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici.

4) Vengono discussi questi risultati ed il loro significato in relazione alla natura di fenomeni di permeabilità cellulare.

Summary. — 1) The fermentation characteristics of *Penicillium chrysogenum*-grown on an acetate-salt medium were presented.

2) Washed mycelial suspensions of acetate-grown mycelium oxidized acetate, but no other organic acid, at an appreciable rate. Attempts to induce oxidation of tricarboxylic cycle intermediates by freezing and thawing, by increasing the hydrogen ion concentration, or by employing esters of the acids were generally unsuccessful. Diethyl malonate in high concentrations (0.5 M) inhibited acetate and glucose oxidation in the intact mycelium. It is probable that the ester enters

(*) Membro della National Foundation for Infantile Paralysis. Indirizzo attuale: Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida, U.S.A.

(**) Questo lavoro, è già stato pubblicato nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 155 (1959)

the cell, whereas free malonic acid does not. The inhibitory action of the ester seems to be of a general nature rather than a specific one on the succinoxidase system.

3) Mould grown on various organic acids as sole carbon sources generally oxidized that acid readily, inductively attacked glucose and acetate, and did not appreciably oxidize other tricarboxylic intermediates.

4) A discussion of these results and their relation to cell permeability is presented.

INTRODUZIONE

L'ossidazione di acidi organici da parte della muffa *Penicillium chrysogenum* è stata studiata da diversi gruppi di ricercatori.

HOCKENHULL e altri (¹, ²) hanno trovato che il lattato, il citrato e alcuni acidi del ciclo di Krebs sono ossidati a velocità notevolmente superiori ai valori endogeni da sospensioni (non concentrate) in terreni minimi e lavate di *P. chrysogenum* Q 176 sviluppato su terreni sintetici o di lattosio e corn steep. Durante l'ossidazione di questi acidi si accumulano nel terreno quantità variabili di α -chetoacidi, principalmente di α -chetoglutarato e piruvato. L'ossidazione dell'acetato è inoltre inibita da arsenito, iodoacetato e azoturo, ma non da malonato.

KOFFLER e i suoi collaboratori (³, ⁴) hanno riferito che il *P. chrysogenum* Q 176, sviluppato su acetato, ossida l'acetato rapidamente ma non attacca il succinato o altri acidi organici. D'altronde il succinato dietilico è facilmente ossidato, e il malonato dietilico inibisce l'ossidazione dell'acetato a pH neutro, mentre il malonato non svolge tale azione.

Questi autori hanno avanzato l'ipotesi che gli esteri, essendo neutri, potrebbero penetrare facilmente nella cellula, dove potrebbe verificarsi idrolisi. Gli effetti di questi due esteri sono stati quindi attribuiti ai corrispondenti acidi liberi intracellulari. Nessun altro estere è stato esaminato.

Gli stessi autori trovarono, nel corso di ulteriori studi (⁵), che il carbonio radioattivo dell'acetato ¹⁴C veniva rapidamente incorporato in un certo numero di acidi organici e di amminoacidi, tra cui il citrato era il primo ad essere marcato. Si verificava una marcata assimilazione, e sulla base di studi d'incorporazione e sugli inibitori si giunse alla conclusione che il ciclo degli acidi tricarbossilici è di primaria im-

portanza nella ossidazione dell'acetato da parte di questo organismo. Altri ricercatori (⁶) hanno dimostrato la presenza di diversi enzimi che agiscono nel ciclo dell'acido citrico in estratti di *Penicillium chrysogenum* privi di cellule.

Il presente studio tratta sistematicamente di vari aspetti dello studio del metabolismo ossidativo del *P. chrysogenum* sviluppato su acetato.

PARTE SPERIMENTALE

METODI.

Preparazione dei conidi.

Conidi di *P. chrysogenum* ceppo Q 176 furono sviluppati inizialmente sul terreno di sporulazione di MOYER e COGHILL (⁷) e poi sul terreno di WHIFFEN e SAVAGE (⁸, ⁹).

Terreni di coltura: Furono utilizzati due terreni nella maggior parte degli esperimenti.

1) Terreno A: 4% lattosio, 0,5% acetato ammonico, 0,3% lattato ammonico, 0,3% KH_2PO_4 , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% Na_2SO_4 , 0,005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,00025% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

2) Terreno B: 1% acetato ammonico, 0,02% solidi di corn steep, 0,02% estratto di lievito Difco, 0,45% KH_2PO_4 , e altri sali inorganici come indicato sopra.

Il pH del terreno fu aggiustato a 5,7-6,0. In certi casi si sostituirono all'acetato ammonico altri substrati (0,5-1%) nel terreno 2.

Condizioni di fermentazione e analisi: Si sterilizzarono volumi di 5 litri dei terreni di coltura per 20 minuti a 120°C in fermentatori agitati di acciaio inossidabile da 10 litri [CHAIN, PALADINO, UGOLINI, CALLOW e Van der SLUIS (¹⁰)].

Dopo raffreddamento a 25° si aggiunsero al terreno 20 ml di una sospensione acquosa di conidi, contenente circa 10^8 conidi per ml. Le condizioni di agitazione e di aerazione erano le seguenti: sistema a vortice, diametro della pala d'elica 65 mm, sovrappressione 0,5-1 atmosfere, flusso d'aria 1-2 volumi per volume di terreno di coltura al minuto.

In queste condizioni si realizzarono velocità di aerazione di 120 ml di O_2 per 100 ml di soluzione all'ora.

Ad intervalli di tempo prestabiliti furono prelevati campioni e si effettuarono le seguenti misurazioni: *peso secco*, filtrando 100 ml del terreno di fermentazione, lavando con acqua ed essiccando il materiale miceliale a 110°C per 4-6 ore; *pH*, misurando con un pH metro (elettrodo di vetro); *concentrazione di acetato*, distillando in corrente di vapore una aliquota di 10 ml del terreno acidificato con H_2SO_4 e titolando i 100 ml di distillato mediante NaOH 0,5 N.

Sospensioni omogenee di muffa per studi di ossidazione furono preparate di fresco prima di ciascun esperimento. Un volume prestabilito di liquido di coltura, generalmente pari a 200 ml, fu prelevato dal fermentatore e filtrato, con moderata aspirazione, su un imbuto di Buchner. Il micelio fu lavato con acqua, sospeso in un mezzo volume d'acqua, e disperso mediante omogeneizzazione in un mescolatore di Waring per 10-15 secondi. In queste condizioni di preparazione, più dell'80% della capacità di ossidazione del micelio fu conservata.

Aliquote di questa sospensione furono trasferite a mezzo di pipetta in vaschette di Warburg, si aggiunsero tampone di fosfato o tampone universale di OSTLIN ⁽¹¹⁾ e il substrato, e si misurò l'assorbimento di ossigeno ⁽¹²⁾. I valori di ossidazione sono espressi in termini di Q_{O_2} , ossia in μl di O_2 per mg di peso secco del micelio all'ora.

In alcuni casi la velocità di respirazione endogena del *P. chrysogenum* era relativamente alta. Ricorrendo all'invecchiamento dell'organismo in un terreno privo di substrato si limitò il Q_{O_2} endogeno, ma si recò anche danno alla successiva ossidazione dell'acetato. Inoltre la capacità del micelio di ossidare l'acetato fu distrutta congelando in soluzione di glicerina o di destrosio, conservando a 0°C, o essiccando. Si utilizzarono di conseguenza sempre sospensioni di micelio fresche.

Le misurazioni furono in ciascun caso accompagnate dall'esame microscopico. Una goccia del terreno di coltura fu posta su un vetrino insieme ad una goccia di cotton blue-lattofenolo ⁽¹³⁾, la poltiglia fu riscaldata blandamente su fiamma libera, coperta, ed esaminata a modesto ingrandimento.

Reagenti: Si preparò acido glicoleo con il metodo di WITZMANN ⁽¹⁴⁾; punto di fusione osservato 75°, teorico 78°. Gli esteri dietilici dell'acido succinico e dell'acido fumarico, nonché l'estere trietilico dell'acido citrico furono sintetizzati con il metodo di FISHER e SPEIER ⁽¹⁵⁾. Questi esteri furono individuati dai loro punti di ebollizione a pressioni ridotte determinate e dai loro indici di rifrazione. Il malonato dietilico del commercio fu purificato per distillazione frazionata. L'acido iodoacetico fu ricristallizzato da etere di petrolio (punto di ebollizione 80-100°) subito

prima dell'uso. Si prepararono la glutammico-deidrogenasi e la catalasi cristalline mediante il metodo di OLSON e ANFINSEN ⁽¹⁶⁾, e la alcool-deidrogenasi del lievito mediante il metodo di RACKER ⁽¹⁷⁾.

Gli autori sono grati al Dr. P. BUFFA per aver fornito loro un campione di acido fluoroacetico esente da fluoruro. Tutti gli altri reagenti del substrato erano preparati commerciali di tipo per analisi. I composti utilizzati per il terreno di fermentazione erano di grado di purezza tecnico.

RISULTATI

Andamento della fermentazione: La figura 1 dà un quadro caratteristico delle variazioni dei diversi parametri durante una fermentazione media impiegando il terreno B. La « lag » fase variava da 8 a 20 ore

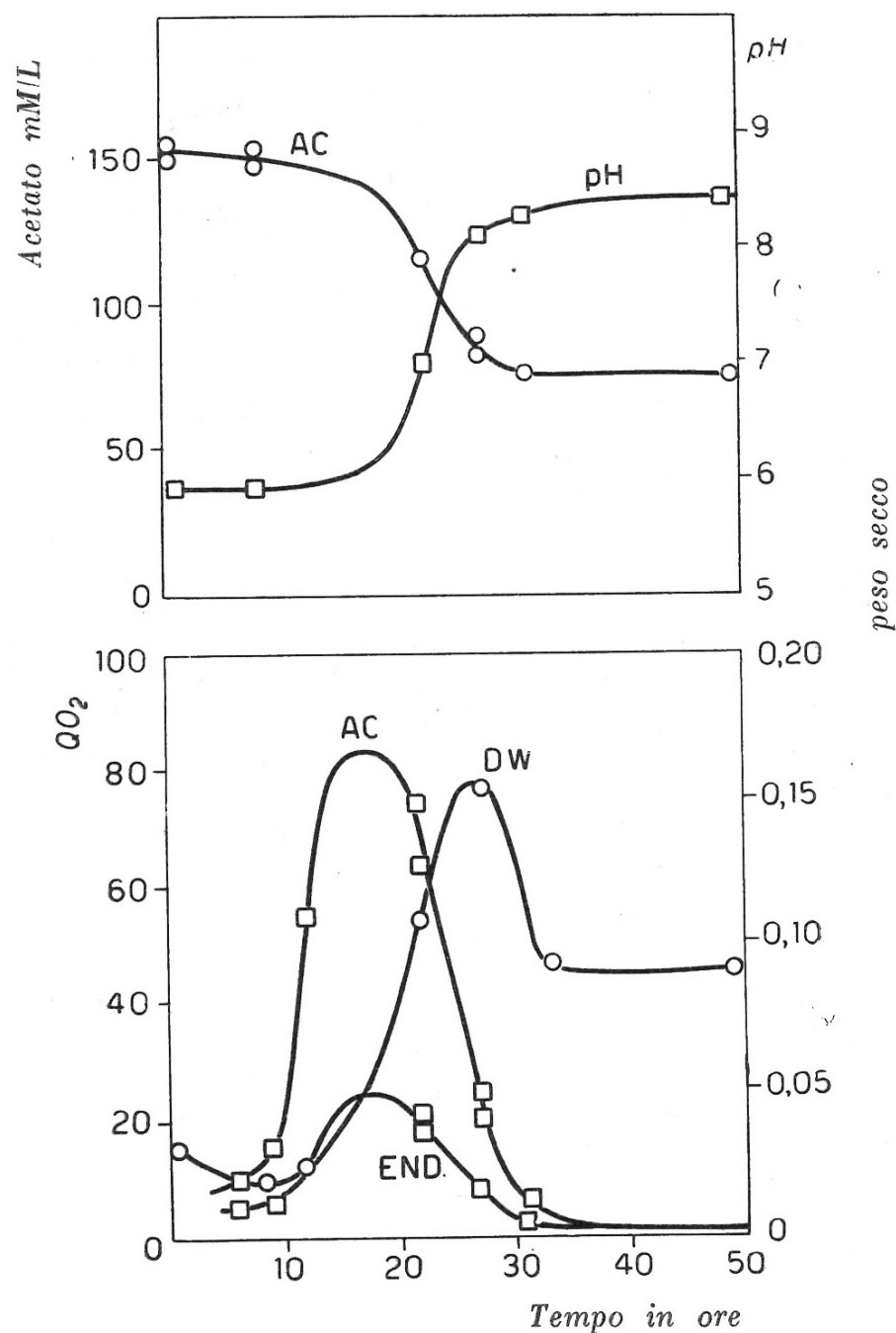


Fig. 1. - Caratteristiche di fermentazione di *P. chrysogenum* Q 176 sviluppato su terreno B.

nelle differenti fermentazioni, ma una volta iniziato lo sviluppo attivo le curve corrispondenti erano sovrapponibili.

In queste condizioni di sviluppo il micelio era sempre nella forma filamentosa corta [DION, CARILLI, SERMONTI e CHAIN (¹⁸)].

La fase di crescita attiva aveva una durata di circa 20 ore, durante le quali l'acetato scompariva, il pH e il peso secco aumentavano e il Q_{O_2}

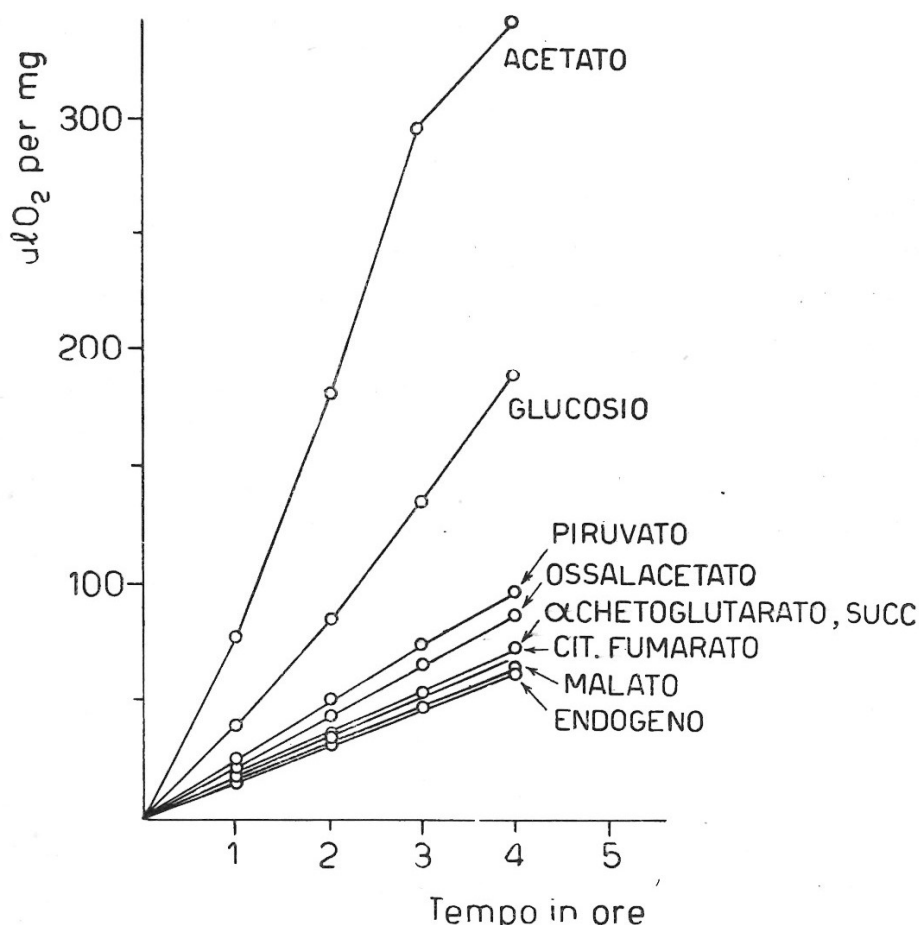


Fig. 2. - Attività respiratoria di sospensioni lavate di micelio. Ciascuna vaschetta manometrica conteneva substrato 0,025 M e 2 mg di peso secco di sospensione di micelio in 3,0 ml di tampone di fosfato sodico 0,1 M a pH 6,8 (il substrato venne aggiunto 10 minuti prima delle prime letture); 0,2 ml di KOH al 30% (p/v) furono introdotti nel pozzetto centrale, e la sospensione fu incubata in aria a 25°. (Il gomito nella curva dell'acetato, dopo tre ore di incubazione, è dovuto ad esaurimento del substrato):

raggiungeva un massimo. La fase di resting del micelio era estremamente breve, essendo seguita da autolisi del micelio, netta perdita di peso secco e perdita quasi completa di capacità ossidativa. La causa di questa autolisi non è chiara. Grandi quantità di un acido distillabile in corrente di vapore, individuato come acido acetico non utilizzato mediante le sue costanti di Duclaux, erano ancora presenti nel terreno alla fine della fermentazione, ad indicare che l'esaurimento del substrato non era il motivo primario. In presenza di lattosio e acido lattico (Terreno A),

tuttavia, non si verificava autolisi prima che l'acetato fosse completamente consumato. Nel terreno A la lag-fase fu anch'essa alquanto più lunga (da 20 a 40 ore), ma per altri aspetti l'andamento della fermentazione e i dati di ossidazione erano molto simili nei due terreni di coltura.

Negli esperimenti descritti in questa comunicazione si utilizzò un micelio che era stato raccolto durante la fase di sviluppo attivo, allorchè il Q_{O_2} (acetato) era massimo. Nelle fermentazioni di routine il pH fungeva da indicatore dello stadio di sviluppo, effettuando il raccolto quando il pH del terreno era a 6,8-7,4.

Ossidazione del substrato: L'azione della muffa in sviluppo su vari acidi del ciclo dell'acido tricarbossilico è illustrata nella figura 2. Benchè l'acetato venisse facilmente ossidato, nessuno degli usuali intermedi fu attaccato in misura apprezzabile, nè fu osservato alcun comportamento induttivo. Il consumo di ossigeno attribuito all'ossalacetato è dovuto probabilmente alla sua demolizione a piruvato, dato che gli estratti di muffa possiedono una forte attività di decarbossilasi dell'acido ossalacetico (¹⁹). L'attività respiratoria della muffa in presenza di altri substrati è riportata nella Tabella 1. Oltre agli acidi relativamente inerti indi-

TABELLA 1

Ossidazione della sospensione lavata di *P. chrysogenum* Q 176.

Substrato	% ossidazione acetato
Acetato	100
DL-alanina	21
Glucosio	19
Glucosio-6-fosfato	16
Glicerofosfato	12
Esoso-difosfato	11
Glicina	9
L-Glutammato	7

Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva substrato 0,025 M, e sospensione di micelio lavata (peso secco 3 mg) in 3,0 ml di tampone di fosfato di K 0,1 M, pH 7, con 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale; le vaschette furono incubate in aria a 25°C. Il micelio utilizzato era stato sviluppato per 48 ore su terreno A, Q_{O_2} (acetato = 70 — 120, Q_{O_2} (endogeno) = 5 — 20.

Tutti i valori sono corretti per la respirazione endogena.

cati nella figura 2, i composti seguenti vengono ossidati ad una velocità (corretta per il valore endogeno) inferiore al 5% di quella dell'acetato: DL-aspartato, DL-lattato, formiato, ossalato, glicol etilenico, gliossal, alcool etilico, fenilacetato, gluconato, glucosio-1-fosfato, e glicolato. Sono stati effettuati studi ossidativi simili con muffa liofilizzata, polvere acetonica di muffa fresca, muffa essiccata in essiccatore su P_2O_5 a $0^{\circ}C$, e micelio congelato e sgelato. I valori del Q_{O_2} del micelio fresco e di questi preparati sono confrontati nella Tabella 2.

TABELLA 2

Effetto di vari trattamenti sulla ossidazione del substrato.

Q_{O_2}

Substrato	A	B	C	D	E
Acetato	57	0,2	0,4	0,3	0,3
Glucosio	22	1,0	0,7	0 6	0,6
Fumarato	22	0,2	0,6	0,4	0,3
Succinato	16	1,1	0,9	1,2	0,8
Citrato	10	1,0	0,6	0,9	0'6
p p p	14	0,3	0,4	0,3	0,3

Trattamento impiegato: A, muffa fresca; B, liofilizzato; C, polvere acetonica; D, essiccata in essiccatore; E, gelata, sgelata.

Nessuna correzione venne portata per valori di respirazione endogena. Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva substrato 0,025 M e sospensione di micelio lavata (A, 2mg/vaschetta, B-E, 20mg/vaschetta) in tampone di fosfato potassico 0,1 M, pH 7,0, con 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale, l'incubazione fu effettuata a $25^{\circ}C$ in aria.

Il succinato e il citrato, che non stimolavano il consumo di ossigeno in micelio fresco, furono ossidati a velocità significativamente superiori ai valori endogeni nei preparati trattati.

Poichè tuttavia la velocità di ossidazione di questi composti da parte di muffa trattata era meno del 2% di quella dell'acetato in micelio fresco, occorre usare prudenza nell'interpretare questi dati come indicazione che le barriere di permeabilità siano state superate nel micelio trattato.

Entità dell'ossidazione dell'acetato: Poichè l'entità dell'ossidazione dell'acetato dipende in una certa misura dalla concentrazione di saturazione dell'acetato per la muffa intatta, venne determinata la concentra-

zione di acetato alla quale il Q_{O_2} calava a 50% del suo valore massimo. Il valore ottenuto corrispondeva a 0,003 M, ossia un valore alquanto superiore a quello di 0,001 M riportato da HOCKENHULL (¹). Inoltre non fu osservata alcuna inibizione dell'assorbimento di ossigeno in presenza di elevate concentrazioni di acetato (0,17 M).

A diverse concentrazioni di acetato venne consumata dalla muffa all'incirca una molecola di ossigeno per ciascuna molecola di acetato utilizzato, come indicato nella figura 3. Si portarono correzioni per tenere conto della respirazione endogena in base alle osservazioni di

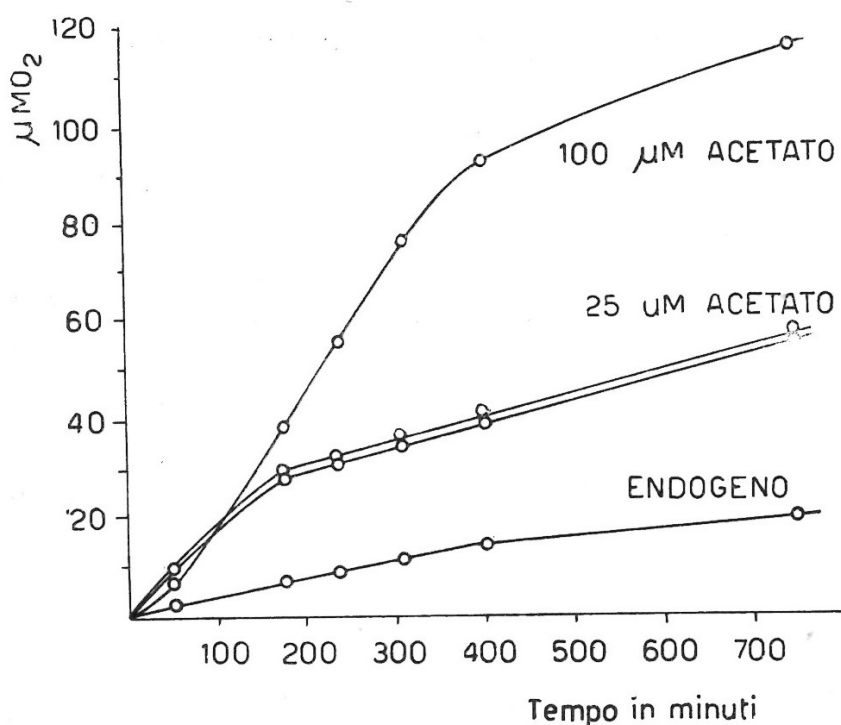
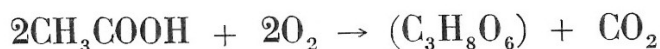


Fig. 3. - Ossidazione di acetato mediante sospensioni lavate di micelio. Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva sospensione di muffa fresca (circa 8 mg di peso secco) in 2,5 ml di fosfato potassico 0,1 M, pH 6,8, substrato (0,5 ml) nel braccio laterale, e 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Dopo equilibrio a 25°, fu aggiunto substrato e venne determinato il consumo di ossigeno.

BLUMENTHAL e altri (²⁰) secondo le quali la velocità endogena non era influenzata dalla ossidazione contemporanea dell'acetato, per lo meno durante il periodo di incubazione iniziale. Comunque, non viene introdotto errore grave da questa correzione, dato che la velocità endogena era relativamente bassa. Il quoziente respiratorio per l'ossidazione dell'acetato, determinato col metodo indiretto (¹²), era di 0,5 circa, dopo correzione per il valore endogeno. Un'equazione generale per l'ossidazione dell'acetato nelle condizioni sperimentali potrebbe quindi essere espressa come segue:



Poichè l'ossidazione dell'acetato risultava incompleta, era da prevedere un accumulo di metaboliti. o una assimilazione dei medesimi, o l'uno e l'altro.

Nella comunicazione successiva verranno presentati dati riguardanti la formazione di vari metaboliti ad opera del *P. chrysogenum*, partendo da acetato 2-¹⁴C (¹⁹).

Effetto della concentrazione idrogenionica sull'ossidazione del substrato. — Nella Tabella 3 sono riportate le velocità a cui gli acidi organici furono ossidati a pH 4 e pH 6.

TABELLA 3

Effetto del pH sulla ossidazione di acidi organici.

Substrato	pH 4	pH 6
Acetato	14	100
Succinato	25	3
Malato	11	3
Fumarato	5	0
Citrato	0	0
Malonato	0	0

Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali di reagenti in 3,0 ml di volume: sospensione di muffa (2 mg di peso secco) substrato 0,05 M, tampone universale di Ostling 0,1 M. Si introdussero 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono incubate a 25°C per 60 minuti.

I dati furono corretti per la respirazione endogena.

Il succinato, e probabilmente il malato, furono leggermente ossidati nel terreno più acido, ma il fumarato, il citrato e il malonato rimasero inerti in tutte le condizioni.

Un valore ampio optimum per l'ossidazione dell'acetato fu riscontrato tra pH 6 e pH 7, con una velocità calante sui due lati di questa curva, come appare dalla figura 4.

Ossidazione e inibizione degli esteri. — Nella Tabella 4 è riportata la velocità di ossidazione degli esteri etilici di vari acidi organici. Tutti gli esteri erano solubili alle concentrazioni utilizzate, eccettuati gli esteri dell'acido fumarico e acido citrico.

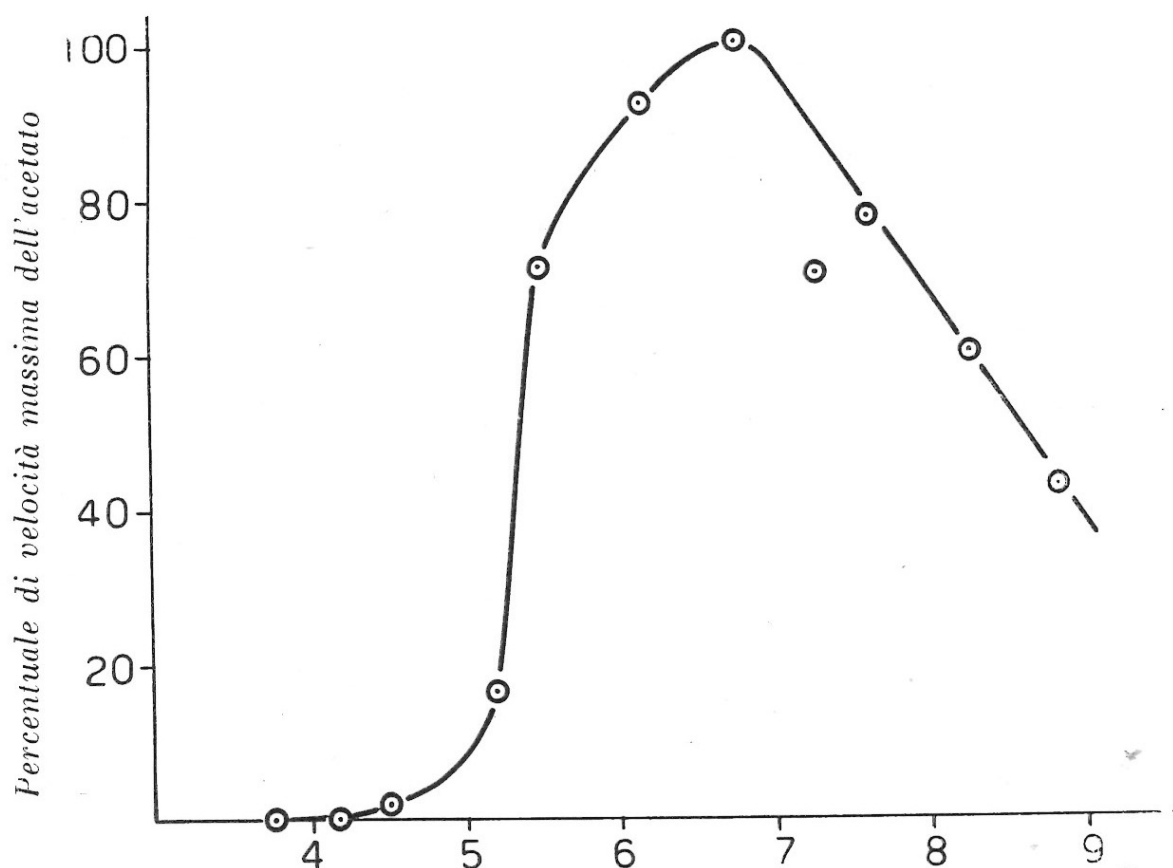


Fig. 4. - Effetto del pH sulla ossidazione dell'acetato. Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva una sospensione di muffa (circa 12 mg) in fosfato potassico 0,05 M, tampone di acetato sodico 0,05 M al pH predeterminato, e si introdussero 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. I recipienti furono incubati a 25° per 60 minuti; fase gassosa, aria. Q_{O_2} massimo (acetato) 41, non corretto per il Q_{O_2} endogeno ⁽¹⁰⁾.

TABELLA 4

Effetto del pH sulla ossidazione di esteri organici.

Substrato	pH 4	pH 6
Acetato	14	100
Acetato etilico	5	10
Succinato dietilico	21	13
Malato dietilico	In*	0
Fumarato dietilico	In	In
Citrato trietilico	In	In
Malonato dietilico	In	In

Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali di reagenti in 3,0 ml di volume totale: sospensione di muffa (2 mg di peso secco), substrato 0,5 M, tampone universale di Ostling 0,1 M, e si introdussero 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono incubate a 25°C per 60 minuti.

I dati furono corretti per valori endogeni.

* In = inibizione della velocità endogena.

TABELLA 5

Effetto dell'alcool etilico sulla ossidazione dell'acetato.

Substrato	Percentuale alcool etilico	Q_{O_2}	Percentuale ossidazione acetato
0.033 M NaAc	0	68	100
idem	1	66	97
idem	5	40	59
idem	10	9	13
idem	20	0	0
idem	40	0	0
Endogeno	0	13	19
idem	0.2	15	22
idem	1	14	20
idem	5	11	16
idem	10	9	13

Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni di reagenti finali in un volume totale di 3,0 ml: sospensione di muffa (3 mg di peso secco), fosfato potassico 0,1 M, pH 6,8, e le concentrazioni di acetato ed etanolo date. Si collocarono 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono incubate a 25°C per 60 minuti.

TABELLA 6

Effetto di inibitori sulla ossidazione dell'acetato.

Inibitore	Concentrazione	Percentuale inibizione
Cianuro	0,033 M	100
Arsenito	$3,3 \times 10^{-4}$ M	50
Fluoroacetato	$3,3 \times 10^{-3}$ M	50
Iodoacetato	0,01 M	50
Malonato	0,05 M	10

Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali di reagenti: sospensione di muffa (2 mg di peso secco), acetato sodico, 0,025 M, fosfato potassico 0,1 M, pH 6.8. Si aggiunsero inibitori al tempo zero e si incubarono le vaschette a 25°C per 40 minuti.

Il succinato dietilico e l'acetato etilico furono ossidati leggermente a pH 4 ed a pH 6, mentre gli altri esteri inibivano la velocità endogena. Il fumarato dietilico e il malonato dietilico abbassarono la respirazione endogena in misura maggiore che gli altri esteri, e inibiscono completamente l'ossidazione dell'acetato, rispettivamente a 0,01 M e 0,05 M.

In contrasto con l'azione inibitrice del malonato dietilico, l'acido malonico aveva scarso effetto sull'ossidazione dell'acetato, benchè concentrazioni elevate di altri inibitori abbassassero la velocità di ossidazione (Tabella 6).

Tenendo presente la ipotesi di BEEVEER (⁴), secondo la quale l'estere inibirebbe l'ossidazione dell'acetato mediante l'azione del malonato libero sulla succinossidasi, dopo idrolisi dell'estere all'interno della cellula, fu confrontato l'effetto di questi due composti su altre reazioni di ossidazione nonchè su diversi enzimi cristallini. Il malonato dietilico inibiva l'ossidazione del succinato dietilico, mentre questo non si verificava con il malonato. In condizioni acide con muffa sviluppata su glucosio, l'estere malonico da solo inibiva l'ossidazione di glucosio (Tabella 7). In questo ultimo caso è particolarmente interessante notare che nè

TABELLA 7

Effetto dell'acido malonico e del suo estere sulla ossidazione di glucosio da parte di muffa sviluppata su glucosio.

Substrato	Inibitore	Q _{O₂}	
		pH 3.5	pH 6
Glucosio 0,025 M	nessuno	31	25
»	Malonato dietilico 0.005 M	33	26
»	Malonato dietilico 0,05 M	11	15
»	Malonic Acid 0,05 M	38	32
Acetato 0,025 M	nessuno	1	8
Succinato dietilico 0,05 M	»	2	3
Endogeno	»	12	12

Le vaschette di Warburg contenevano: sospensione di muffa (3 mg di peso secco), tampone di fosfato potassico 0,1 M, e concentrazioni di substrato e di inibitore come indicato in un volume totale di 3,0 ml. Si introdussero 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono incubate per 60 minuti a 25°C; fase gassosa, I valori Q_{O₂} non furono corretti per la respirazione endogena.

l'acetato nè il succinato dietilico erano ossidati, e che il pH del terreno era sufficientemente acido perchè esistesse nella forma non ionizzata una concentrazione apprezzabile dell'acido malonico aggiunto.

Se l'ossidazione di esteri organici è preceduta da idrolisi, dev'essere dimostrato che l'alcool etilico in concentrazioni basse non è ossidato e non ha azione inibitrice. Questo è stato confermato (Tabella 5). E' stato anche dimostrato che nè il malonato nè il suo estere inibiscono gli enzimi cristallini, la deidrogenasi glutammica del fegato, la alcool-deidrogenasi del lievito e la catalasi del fegato.

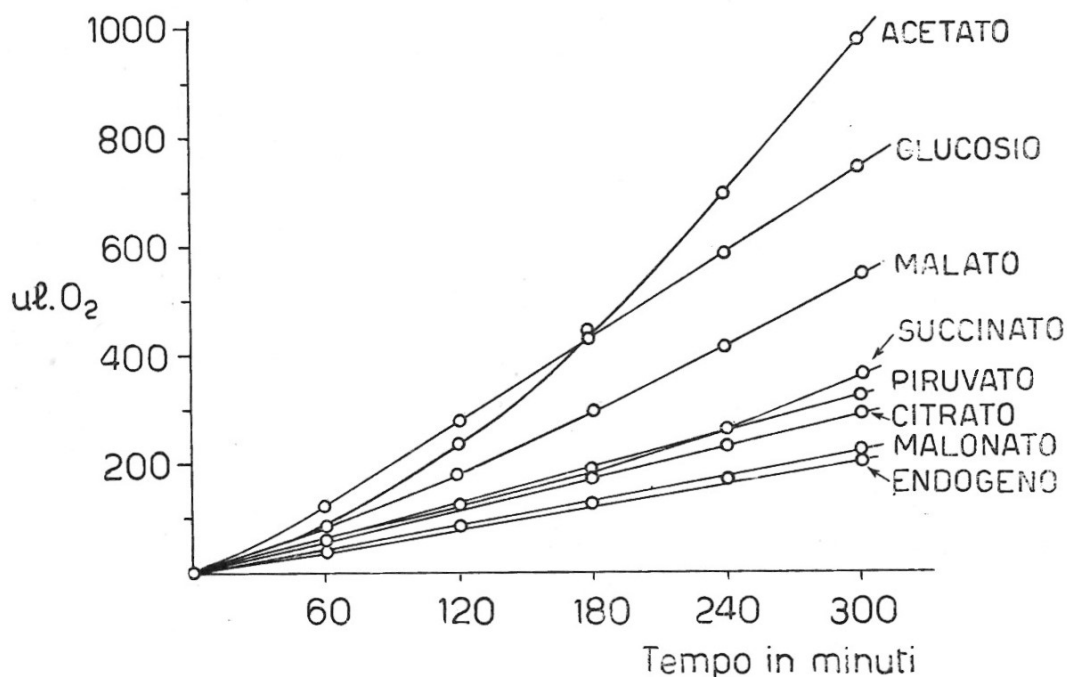


Fig. 5. - Ossidazione del substrato mediante muffa sviluppata su citrato. Ciascuna vaschetta conteneva substrato 0,025 M e 2,5 mg (peso secco) di micelio lavato sospeso in un volume totale di 3,0 ml di tampone di fosfato sodico 0,1 M, pH 6,8. Si introdussero 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Il substrato fu aggiunto 10 minuti prima delle prime letture e le vaschette furono incubate a 25°.

Schemi della respirazione di miceli sviluppati su vari substrati. — In diversi esperimenti di fermentazione si utilizzarono citrato, malato e succinato invece di acetato come unica sorgente di carbonio. Gli schemi delle ossidazioni osservati per sospensioni di miceli sviluppati su vari substrati sono presentati nelle figure 5-7.

Il citrato era facilmente ossidato dalla muffa sviluppata su citrato, e si verificava un rapido adattamento all'ossidazione dell'acetato e del glucosio. Il succinato, il malato, il malonato e il piruvato non furono attaccati sensibilmente. Inoltre la velocità e l'entità dell'induzione dell'acetato rimasero non influenzate dall'aggiunta di malonato 0,05 M e malato 0,001 M. Nemmeno l'ossidazione del citrato fu influenzata da malonato.

La muffa sviluppata su malato presentava una lieve attività succinossidasi e si adattava rapidamente al glucosio e all'acetato, ma non ossidava il citrato, il piruvato o il malonato in misura marcata. La muffa sviluppata su succinato si adattava rapidamente a malato, acetato e glucosio, presentava una certa attività nell'ossidare il piruvato ma non attaccava il citrato. L'ossidazione del succinato non era influenzata dal malonato 0,05 M, e l'induzione dell'acetato non era influenzata da questo inibitore.

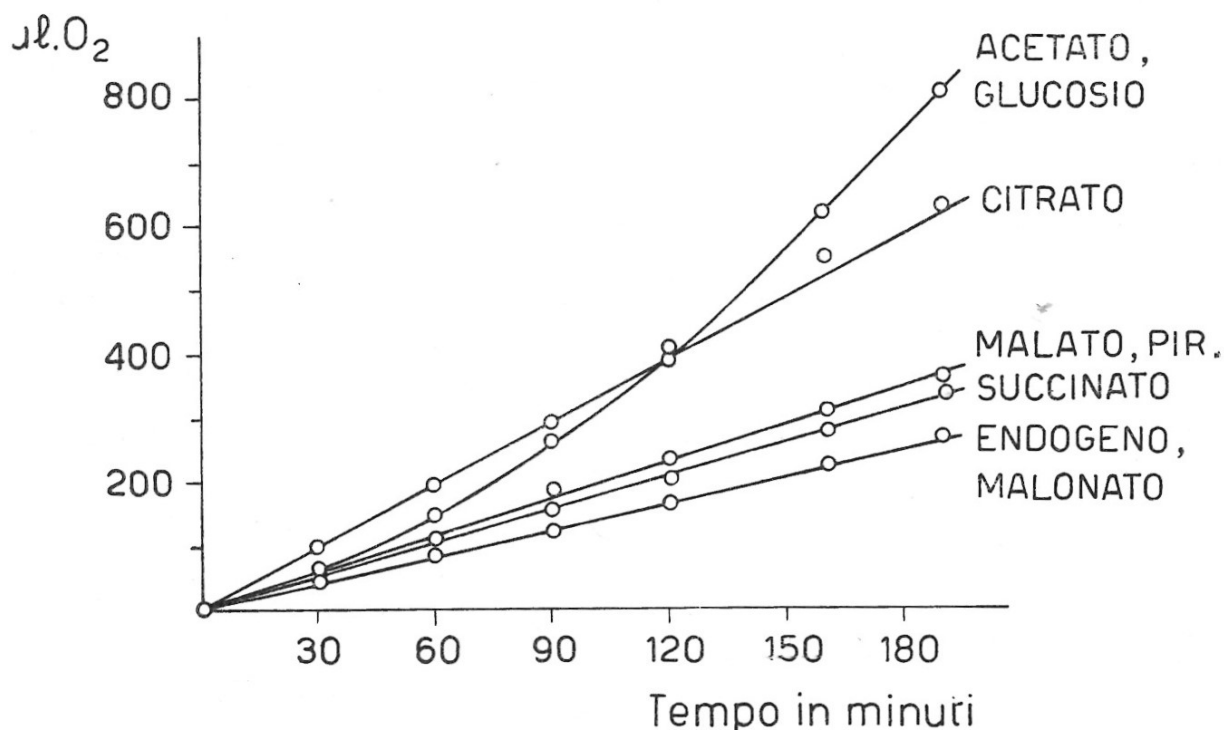


Fig. 6. - Ossidazione del substrato da parte di una muffa sviluppata su malato. Stesse condizioni come per la Figura 5.

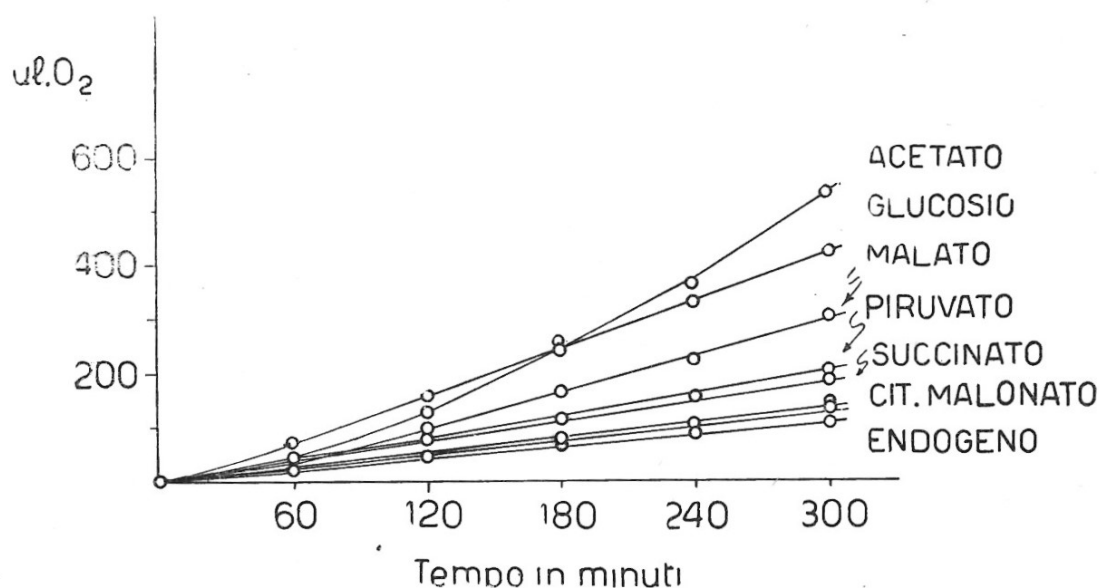


Fig. 7. - Ossidazione del substrato da parte di una muffa sviluppata su succinato. Stesse condizioni come per la Figura 5.

DISCUSSIONE

Una spiegazione degli stadi intermedi della ossidazione dell'acetato da parte del *P. chrysogenum* è resa difficile dal fatto che la muffa ossida bene l'acetato solo se intatta e nella fase di sviluppo attivo. Qualsiasi trattamento, per quanto blando, della muffa porta alla distruzione pressochè completa della sua attività ossidativa, non soltanto nei riguardi dell'acetato, ma anche di tutti gli altri substrati sperimentati.

Nel proporre il ciclo degli acidi tricarbossilici come via principale del metabolismo dell'acetato nei tessuti, KREBS (²¹) citava a conferma le tre seguenti osservazioni: 1) la rapida ossidazione degli acidi organici da parte di fettine di muscolo, 2) l'effetto catalitico degli acidi bicarbossilici sulla ossidazione dell'acetato, e 3) l'effetto inibitore di concentrazioni basse di malonato (0,001 M) sull'ossidazione del succinato e acetato. Nel caso presente nessuno di questi criteri era soddisfatto: l'acetato solo, tra numerosi acidi organici sperimentati, fu ossidato rapidamente dal *P. chrysogenum* sviluppato su acetato, e questa velocità di ossidazione dell'acetato rimaneva non influenzata da quantità catalitiche di succinato o malato, oppure da malonato 0,5 M.

Prove eseguite con acetato radioattivo, presentate nella comunicazione successiva, dimostrano che l'acetato subisce reazioni di condensazione in misura considerevole. E' stato tuttavia impossibile ottenere dimostrazioni dei passaggi intermedi di queste reazioni aumentando la respirazione, dopo aggiunta alla muffa intatta sviluppata su acetato di substrati promettenti, quali gli intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico. Due degli acidi del ciclo tricarbossilico, il malato o il citrato, furono tuttavia ossidati bene quando la muffa era sviluppata su questi substrati quale principale sorgente di carbonio; vale a dire che una muffa sviluppata su citrato era in grado di ossidare citrato, e una muffa sviluppata su malato era in grado di ossidare malato, ma nessun altro substrato in misura apprezzabile; inoltre sia la muffa sviluppata su citrato che quella su malato erano in grado di ossidare acetato ad una elevata velocità dopo induzione.

Risultati analoghi ottenuti con altre muffe ed altri batteri sono stati generalmente attribuiti alla inaccessibilità dei substrati alle posizioni di ossidazione intracellulari. In diversi casi l'ossidazione di un composto normalmente inerte è stata indotta da congelamento (²²) oppure da essiccamento (²³) dell'organismo, da esterificazione del substrato (⁴), oppure da

cambiamento del pH del terreno (²⁴). Tuttavia nessuno di questi metodi è stato soddisfacente per indurre nel *P. chrysogenum* l'ossidazione di acidi organici considerati generalmente come gli intermedi della ossidazione dell'acetato. Un micelio congelato o essiccato non attaccava l'acetato, benchè il succinato e il citrato fossero ossidati a velocità significativamente superiori al valore endogeno. Tuttavia questa velocità di ossidazione corrispondeva soltanto al 2% della velocità massima di ossidazione dell'acetato in una muffa intatta.

L'ossidazione del succinato dietilico a pH 6 con una velocità superiore a quella dell'acido succinico, comunicata da BEEVERS e altri (⁴), è stata confermata. Altri esteri, tuttavia, rimasero senza effetto oppure inibirono la respirazione endogena oltre alla ossidazione dell'acetato. Non è quindi sorprendente che il malonato dietilico inibisse l'ossidazione dell'acetato nel *P. Chrysogenum* in condizioni nelle quali l'acido malonico era inefficace (⁴). Per quanto sia stato suggerito che questo effetto fosse dovuto ad inibizione della succinossidasi da parte dell'acido malonico liberato per idrolisi intracellulare dell'estere, è più probabile che il fenomeno sia di natura generale e finora non definita. Questa ipotesi è confermata dal fatto che l'estere malonico inibiva l'ossidazione del glucosio da parte della muffa sviluppata su glucosio in condizioni nelle quali l'acido malonico era inerte, nelle quali nè l'acetato nè il succinato dietilico erano ossidati, e ad un pH sufficientemente acido per permettere che esistesse malonato non ionizzato nel terreno.

Eseguendo esperimenti a pH 4, si osservò qualche aumento nella velocità di ossidazione del succinato, del malato e del fumarato. In ambiente acido, tuttavia, la velocità di ossidazione dell'acetato corrispondeva soltanto al 14% del suo valore massimo. Così l'attività di succinossidasi della muffa potrebbe rendere conto del 25% della velocità di ossidazione dell'acetato, ma in condizioni estremamente sfavorevoli per l'ossidazione dell'acetato.

L'inefficacia del malonato ad inibire l'ossidazione del succinato e dell'acetato da parte di sospensioni lavate di *P. chrysogenum* non doveva essere inaspettata se si fosse tenuto conto della inerzia generale di questo inibitore nei confronti di diverse muffe (²⁵) e diversi batteri (²⁶). D'altra parte, l'attività succinossidasi di estratti di *P. chrysogenum* privi di cellule era fortemente inibita dal malonato. Sembra probabile che la parete del micelio non sia permeabile al malonato. Questo suggerimento è confermato da esperimenti di diffusione effettuati con malonato radioattivo (¹⁹).

Si deve tuttavia riconoscere che gli esperimenti intesi a modificare la permeabilità della cellula ai substrati mediante congelamento e sgelamento, cambiamenti del pH, ecc. sono basati su concetti alquanto rudimentali circa la natura dei fenomeni di permeabilità come barriere fisico-chimiche; questi concetti stanno subendo considerevoli modifiche e affinamenti in seguito alle osservazioni di MONOD ⁽²⁷⁾ sulle permeasi. Il fatto che la muffa sia capace di ossidare bene citrato e malato quando venga sviluppata in presenza di queste sostanze costituisce una ulteriore prova della pronunciata specificità che caratterizza i fenomeni di permeabilità. Risultati simili sono stati riferiti nei batteri ^(28, 29).

Si deve concludere che nessuna deduzione circa la via principale di ossidazione dell'acetato da parte di *P. chrysogenum* può essere fatta in base ai risultati ottenuti con una qualsiasi delle tecniche utilizzate in questa comunicazione; in particolare, non è stato possibile escludere il ciclo dell'acido tricarbossilico oppure confermarlo come via principale della ossidazione degli acidi organici.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica Biologica e Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HOCKENHULL D. J. D., HERBERT M., WALKER A. D., WILKIN G. D. e WINDER F. G. - Biochem. J., 56: 73 (1954).
- (2) HOCKENHULL D. J. D., WILKIN G. D. e WINDER F. G. - Nature, 168: 1043 (1951).
- (3) BLUMENTHAL H. J., KOFFLER H. e GOLDSCHMIDT E. P., Bact. Proc., 139 (1951).
- (4) BEEVERS H., GOLDSCHMIDT E. P. e KOFFLER H. - Arch. biochem. biophys., 39: 236 (1952).
- (5) KOFFLER H. - Symposium on Microbial Metabolism, VI Intern. Cong. Microbiol. Rome, p. 38 (1953).
- (6) CASIDA L. E. Jr. e KNIGHT S. G. - Bact., 67: 658 (1954).
- (7) MOYER A. J. e COGHILL R. D. - J. Bact., 51: 79 (1946).
- (8) WHIFFEN A. J. e SAVAGE G. M. - J. Bact., 53: 231 (1947).
- (9) CAMICI L., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Bull. World Health Org. 6: 263 (1952).
- (10) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J., - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition), 17: 61 (1954).
- (11) OSTLING S. e VIRTAM3 P. - Acta physiol. scand., 11: 289 (1946).
- (12) UMBREIT W. W., BURRIS R. H. e STAUFFER J. F. - Manometric methods, Burgess Pub. Co. (1945).
- (13) LANGERON M. - Précis de mycologie, Paris, p. 403 (1945).
- (14) WITZMANN E. J. - J. am. chem. Soc., 39: 109 (1917).
- (15) FISCHER E. e SPEIER A. - Ber., 28: 3255 (1895).
- (16) OLSON J. A. e ANFINSEN C. B. - J. biol. Chem., 197: 67 (1952).
- (17) RACKER E. - J. biol. Chem., 184: 313 (1950).

- (18) DION W. M., CARILLI A., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition), 17: 187 (1954).
 - (19) OLSON J. A. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 181 (1961).
 - (20) BLUMENTHAL H. J., KOFFLER H. e GOLDSCHMIDT E. P. - Science, 116: 475 (1952).
 - (21) KREBS H. A. e GREENBERG D. M. - Chemical Pathways of Metabolism, Academic Press., New York, N. Y. (1954).
 - (22) LYNEN F. e NECIULLAH N. - Ann. 541: 203 (1939).
 - (23) CAMPBELL J. J. R. e STOKES F. N. - J. biol. Chem., 190: 853 (1951).
 - (24) BARRON E. S. G., AADAO M. I. e HEARON M. - Arch. Biochem., 29: 130 (1950).
 - (25) BARRDON E. S. G. e GHIRETTI F. - Biochim. biophys. Acta., 12: 239 (1953).
 - (26) AJL S. - Bact. Rev., 15: 241 (1951).
 - (27) COHEN G. N. e MONOD J. - Bact. Rev., 21: 169 (1957).
 - (28) BARRETT J. I., LARSON A. D. e KALLIO R. E. - J. Bact., 65: 187 (1953).
 - (29) KOGUT M. e PODOSKI E. P. - Biochem. J., 53: 800 (1953).
-