

16. J. A. OLSON (*) e E. B. CHAIN. — Il destino dell'acetato marcato $2\text{-}^{14}\text{C}$ nel *Penicillium chrysogenum*. (**)

Riassunto. — L'acetato ^{14}C , marcato nel metile, è stato incubato in varie condizioni con sospensioni di micelio e con estratti acellulari di *P. chrysogenum*. I prodotti che si formano sono stati separati in cinque frazioni principali: 1) Estratto etero (acidi organici), 2) Amminoacidi, 3) Composti neutri, 4) Micelio e 5) CO_2 respiratorio. In alcuni casi le singole frazioni sono state ulteriormente analizzate mediante cromatografia su carta.

Nelle incubazioni con micelio fresco, circa il 40% dell'acetato utilizzato compare nell'acido glutammico. La marcatura dei prodotti ottenuti per degradazione progressiva del glutammato è in accordo con un meccanismo di condensazione a citrato. Inoltre, negli estratti è stata dimostrata la presenza di tutti gli enzimi che catalizzano la conversione del citrato a glutammato e di vari altri enzimi correlati. Sembra anche che il micelio non sia permeabile al malonato; ciò giustificherebbe l'inefficienza del composto a fungere da inibitore metabolico.

E' stato studiato anche l'effetto che variazioni nelle condizioni di incubazione e nel trattamento della muffa esercitano sul contenuto in ^{14}C delle diverse frazioni.

Summary. — Methyl labelled ^{14}C -acetate was incubated with mycelial suspensions or cell free extracts of *P. Chrysogenum* under a variety of conditions, and the products formed were separated into five major fractions: 1) Ether extracts (organic acids), 2) Amino acids, 3) Uncharged compounds, 4) Mycelium and, 5) Respiratory CO_2 . In certain cases, further analyses of individual fractions were effected by paper chromatography.

Of the products formed in fresh mycelial incubations, approximately 40% of the utilized acetate appeared in glutamic acid. The labelling pattern found on stepwise degradation of the glutamate was in accord with a citrate condensation mechanism. In addition, all of the enzymes which catalyze the conversion of citrate to glutamate and a number of other related enzymes were demonstrated in cell free extracts. Further-

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

(**) Questo lavoro, è già stato pubblicato nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 173 (1959)

more, malonate does not seem to permeate the mycelium, thus accounting for its ineffectiveness as a metabolic inhibitor.

The effect of varying incubation conditions and mould treatments on the ^{14}C content of the different fractions was also studied.

INTRODUZIONE

E' stato dimostrato in comunicazioni precedenti (¹, ²) che il *Penicillium chrysogenum* Q 176 sviluppato su acetato ossidava l'acetato con elevata velocità, ma non attaccava sensibilmente altri acidi organici, né in ambiente neutro né in ambiente acido. Gli esteri di intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici non erano ossidati, né lo erano gli schemi di ossidazione determinati per il *P. chrysogenum* sviluppato su differenti acidi come uniche sorgenti di carbonio, interpretabili in termini di un qualsiasi meccanismo di ossidazione di acidi organici.

Si trovò inoltre che l'acetato non era ossidato completamente da sospensioni lavate di *P. Chrysogenum* sviluppato su acetato dato che veniva consumata una sola molecola di ossigeno e veniva liberata una molecola di CO_2 per ogni molecola di acetato che scompariva (¹). Per poter seguire il destino dell'acetato utilizzato, venne esaminato l'incorporamento di acetato ^{14}C , marcato nel metile, in varie frazioni di muffe in varie condizioni.

Inoltre fu dimostrata la presenza di sistemi di enzimi in estratti privi di cellule capaci di interconvertire vari metaboliti formati.

Con l'impiego di traccianti radioattivi, KOFFLER e i suoi collaboratori (³) hanno anche studiato recentemente l'assimilazione di acetato nel *P. chrysogenum*. I loro dati concordano essenzialmente con i nostri.

PARTE SPERIMENTALE

ORGANISMI E CONDIZIONI DI SVILUPPO.

Venne impiegato *Penicillium chrysogenum* Q 176. I metodi di coltura, di sporulazione e fermentazione, sono stati descritti precedentemente (¹). In questi esperimenti venne utilizzato terreno B ossia 1% acetato ammonico, soluzione salina standard, 0,02% estratto di lievito Difco, e

0,02% solidi di corn steep. Le fermentazioni furono effettuate a 25° in fermentatori di 10 litri di acciaio inossidabile aerati e agitati (4) e la muffa fu raccolta nella fase di sviluppo attivo, quando la sua capacità di ossidazione era elevata (1).

DILUIZIONE E ANALISI DELL'ACETATO MARCATO 2-¹⁴C.

Fu ottenuto acetato sodico marcato 2-¹⁴C dal Radiochemical Center, Amersham, Inghilterra. Una aliquota venne diluita con acetato sodico non marcato, sciolta in acqua ed essiccata a 110°. Venne preparata una soluzione standard che conteneva 30 µM di acetato sodico (2,46 mg) in 0,3 ml, e che diede 10⁷ c.p.m. in condizioni di conta normali. Mediante degradazione progressiva (6) di una aliquota, si trovò che almeno il 98,5 per cento del ¹⁴C si trovava nel carbonio metilico.

PREPARAZIONE DEL MALONATO DIETILICO 2-¹⁴C E ACIDO MALONICO 2-¹⁴C.

Il malonato dietilico 2-¹⁴C, ottenuto dal Radiochemical Center, Amersham, Inghilterra, venne diluito in modo che 0,001 ml contenesse 810 c.p.m. al contatore di GEIGER-MULLER a finestra terminale, in condizioni di conta standard.

Una aliquota dell'estere marcato, diluita con malonato dietilico non marcato, fu idrolizzata in KOH al 50% bollente per un'ora. La soluzione fu travasata nel palloncino di un estrattore continuo ed estratta con etere per 20 ore. L'estratto eterico fu essiccato su Na₂SO₄ anidro e concentrato a piccolo volume. Fu aggiunto acido malonico non marcato in etere, e quindi una piccola quantità di etere di petrolio (punto di ebollizione 80-100°). Per raffreddamento cristallizzò acido malonico. Un milligrammo di acido libero conteneva 814 c.p.m. in condizioni di conta standard.

TECNICA DI INCUBAZIONE.

Un volume conveniente di liquido di coltura appena prelevato venne filtrato su un imbuto di Buchner con blanda aspirazione. Il micelio fu lavato con fosfato potassico 0,05 M, a pH 6,9 e sospeso in sufficiente fosfato potassico 0,05 M, pH 6,8, perché 1 ml contenesse circa 10 mg di peso secco di muffa. Questa sospensione venne dispersa me-

dante omogenizzazione per 15 secondi in un mescolatore Atomix ed aliquote di essa furono pipettate nei pozzetti centrali di vaschette di Warburg.

In diversi casi, quando si adoperarono quantità maggiori di muffa, vennero filtrati volumi prestabiliti della sospensione e i filtri furono introdotti direttamente nelle vaschette di Warburg.

Ciascuna vaschetta conteneva, oltre a 2,7 ml di sospensione di muffa, 0,3 ml di acetato sodico $2\text{-}^{14}\text{C}$ (30 μM) nel braccio laterale, e 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono equilibrate per 10 minuti a 25° , la velocità di ossidazione endogena fu misurata per altri 10 minuti, e si aggiunse substrato. Alla fine del periodo di incubazione si introdussero 0,2 ml di H_2SO_4 9N attraverso il braccio laterale, e la incubazione fu continuata fino a che non si verificò ulteriore scambio di gas. Le vaschette furono tappate e messe in ghiaccio.

TRATTAMENTO DELLE FRAZIONI.

Anidride carbonica di respirazione. Il KOH e la sua carta di diffusione furono tolti dal pozzetto centrale e posti in 6 ml di H_2O priva di CO_2 in un tubo di centrifugazione tappato. La soluzione fu lasciata a temperatura ambiente per 30 minuti, dopo di che le carte furono lavate e tolte e si aggiunsero 0,2 ml di NH_4Cl al 10% e 0,5 ml di BaCl_2 saturo. Dopo 10 minuti il precipitato di BaCO_3 fu allontanato per centrifugazione e lavato due volte con H_2O bollita.

Micelio. — La sospensione nella vaschetta di Warburg fu filtrata, il micelio venne lavato con H_2O , e il filtrato e l'acqua di lavaggio furono raccolti (Terreno). Il micelio lavato fu essiccato in un essiccatore su P_2O_5 sotto vuoto. Dopo pesatura, il feltro secco fu polverizzato in un mortaio di agata.

Una porzione prestabilita fu prelevata per la conta, e il resto fu estratto con etanolo all'80% a caldo. Il residuo fu separato per centrifugazione ed essiccato a 110° (residuo di micelio). Dopo prelevamento di una aliquota, la soluzione restante fu evaporata a secco su bagno di vapore e sciolta in 0,5 ml di isopropanolo al 10% (estratto di micelio).

Terreno. — Il filtrato di micelio acidificato e l'acqua di lavaggio furono distillati in corrente di vapore. Si raccolsero 10 volumi di distillato, e in queste condizioni più del 98% dell'acido acetico fu trovato nel distillato. Si neutralizzò questo ultimo con NaOH 0,043 N e si evaporò a piccolo volume su bagno di vapore.

Estratto etero. — Il residuo distillato in corrente di vapore fu travasato in un estrattore Kutscher-Steudel e fu sottoposto ad estrazione continua con etere per 20-40 ore. Dopo 24 ore rimaneva soltanto una percentuale estremamente piccola di materiale estraibile.

L'estratto fu concentrato a piccolo volume su bagno di vapore e portato a 0,5 ml con isopropanolo al 10% (estratto etero).

FASE ACQUOSA.

La fase acquosa estratta con etere fu dibattuta con circa 1 g di resina Amberlite IR-120 H (resina di acido polistirolsolfonico nella forma acida, priva di cloruro) per 60 minuti e la sospensione fu poi filtrata. Il filtrato di IR-120 H fu trattato analogamente con 1 g di resina Amberlite IR-4B (resina amminica debole nella forma amminica libera). Il filtrato di IR-4B fu evaporato a secco e sciolto in 0,5 ml di isopropanolo al 10% (composti neutri).

Gli amminoacidi furono eluiti dall'IR-120 H con HCl 2N. L'eluato fu evaporato a secco, ripreso più volte in piccoli volumi di acqua e riessiccato. Il residuo venne sciolto in 0,5 ml di isopropanolo al 10 per cento (amminoacidi).

Gli eventuali acidi non allontanati dal trattamento precedente furono eluiti dall'IR-4B con NH_4OH 1N. Fu ritrovata pochissima radioattività in questa frazione che venne di conseguenza scartata.

CROMATOGRAFIA.

Aliquote delle quattro frazioni (estratto di micelio, estratto etero, composti neutri ed amminoacidi) furono messe su carta e cromatografate in n-butanolo-acido propionico-acqua (47:22:31) ⁽⁷⁾ e in fenolo ammoniacale-acqua (4:1) ⁽⁸⁾. Le carte essiccate all'aria furono poste su lastre fotografiche Ferrania per raggi X per una o due settimane, e le radioautografie furono sviluppate.

In alcuni casi si ritagliarono strisce e si determinò la radioattività di ciascun composto di una frazione. In prove su più vasta scala, mediante cromatografia su carta si separarono succinato, glutammato e aspartato, si eluirono con acqua e si cristallizzarono fino ad attività costante dopo l'aggiunta di carrier non marcato.

MISURE DI RADIOATTIVITÀ.

Si neutralizzarono aliquote delle frazioni liquide prima dell'essiccamento e si triturarono in un mortaio di vetro porzioni pesate delle frazioni solide (BaCO_3 e micelio). Si stemperarono uniformemente campioni su lastre di acciaio inossidabile o di alluminio, si essicarono ad una lampada a raggi infrarossi e si eseguì la conta impiegando un contatore a finestra terminale. I dati furono corretti delle perdite da auto-assorbimento, ecc. ⁽⁹⁾.

La degradazione progressiva dell'acido glutammico marcato fu eseguita con il procedimento di MOSBACH, PHARES e CARSON ^(5, 8), e la combustione completa fu effettuata mediante il metodo al persolfato di WEINHOUSE ⁽⁹⁾. Il micelio fu ossidato in diversi casi a CO_2 con la tecnica all'acido cromico di VAN SLYKE-FOLCH ⁽¹⁰⁾ e contato come BaCO_3 . I valori riguardanti la radioattività nel micelio, ottenuti per conta diretta e per combustione a CO_2 erano in accordo.

ESTRATTI DI ENZIMI.

Fra i diversi metodi utilizzati per la preparazione di estratti di micelio la tecnica di triturazione ideata da HUGHES ⁽¹¹⁾ si dimostrò la più soddisfacente. L'esame microscopico indicò che 80% o più delle ife erano frantumate dopo un solo passaggio attraverso la pressa a -10°C . La massa frantumata fu poi sgelata e centrifugata a 2000 g o a 15.000 g per 30 minuti a $0-5^\circ \text{C}$, ed il surnatante fu immediatamente utilizzato per studi sugli enzimi.

Altri metodi di preparazione come l'omogenizzazione con celite 503 in un omogenizzatore Potter-Elvehjem, la macinazione con allumina in un mortaio, e l'eluizione con tampone di fosfato di una polvere acetonica di micelio, o di muffa essiccata per congelamento o essiccata in essiccatore, diedero estratti meno attivi dal punto di vista enzimatico e contenenti meno proteina.

ANALISI DEGLI ACIDI ORGANICI.

Il citrato fu determinato con il metodo di TAYLOR ⁽¹²⁾, la deidrogenasi isocitrica per riduzione del TPN ⁽¹³⁾, l'acido glutammico con un preparato di decarbossilasi di carota ⁽¹⁴⁾, l'acido succinico con il sistema succinossidasico di KREBS ⁽¹⁵⁾, e l' α -chetoglutarato, il piruvato ed il

gliossilato con il procedimento di FRIEDMANN e HAUGEN ⁽¹⁶⁾ e mediante la cromatografia degli idrazoni di chetoacidi ⁽¹⁷⁾.

RISULTATI

ESPERIMENTI PRELIMINARI DI INCORPORAZIONE DEL ¹⁴C.

Nei primi esperimenti si impiegò acetato sodico 2-¹⁴C di bassa attività (925 c.p.m.-mg), e non si tentò di realizzare una ampia separazione dei vari metaboliti. I dati relativi ad uno di questi esperimenti sono riportati nella Tabella I. Il CO₂ respiratorio conteneva circa 10

TABELLA 1

Assorbimento di ossigeno e incorporamento di acetato marcato nel metile nel *P. Chrysogenum*

Esperimento N.	1	2
Tempo di incubazione	70 min.	70 min.
μM O ₂ consumato	40,6	39,7
μM O ₂ (endogeno)	12,7	17,5
μM acetato aggiunto	145	150
C.P.M. originale nell'acetato	11.000	11.400
C.P.M. finale: Terreno (incluso acetato non utilizzato)	9.450 (86%)	9.380 (82%)
Micelio	660 (6%)	260 (2%)
CO ₂	1.180 (11%)	1.110 (10%)
C.P.M., ricupero totale	11.290 (102%)	10.750 (94%)

Le vaschette di Warburg contenevano 1,5 ml di sospensione di muffa (20 mg di peso secco in acqua) e 1,4 ml di tampone di fosfato potassico 0,05 M, pH 6,0; 0,1 ml di tampone di fosfato contenente acetato sodico ¹⁴C nel braccio laterale e 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Si incubarono le vaschette per 30 minuti a 25°C e si aggiunse il substrato. Dopo 100 minuti la reazione fu arrestata congelando a -25°C, il micelio fu filtrato e lavato completamente. Si misero su piastre aliquote del micelio e del terreno direttamente e si essicarono, dopo di che il CO₂ respiratorio fu contato come BaCO₃. Il Q_{O₂} (acetato) per il micelio era di circa 30; il Q_{O₂} (endogeno) = 8.

per cento della radioattività totale, mentre il micelio era pressoché non marcato. In esperimenti successivi si impiegò acetato maggiormente marcato e si abbreviò il periodo di incubazione.

EFFETTO DEL TEMPO DI INCUBAZIONE SULL'INCORPORAZIONE DEL ^{14}C .

Si incubarono sospensioni di muffa per circa 2, 10 e 30 minuti in presenza di acetato $2\text{-}^{14}\text{C}$. I risultati sono riportati nella Tabella II. La utilizzazione dell'acetato aumentò in maniera più o meno lineare con il tempo in presenza di un forte eccesso di substrato marcato. Inoltre la percentuale di incorporazione nelle varie frazioni non variò con la du-

TABELLA 2

Effetto del tempo di incubazione sull'incorporazione di $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ in frazioni di muffa.

Esperimento N. Tempo di incubazione	3 2 min.	4 10 min.	5 30 min.
$\mu\text{M O}_2$ consumato	—	4,4	11.8
$\mu\text{M O}_2$ endogeno	—	2,2	5,9
μM acetato aggiunto	30	30	30
C.P.M. originale in acetato	2×10^6	2×10^6	2×10^6
Acetato utilizzato (C.P.M.)	68.000 (100%)	193.000 (100%)	556.000 (100%)
Residuo distillato in corrente di vapore	61.000	183.000	495.000
	40.000 (59%)	105.000 (55%)	295.000 (53%)
Fase acquosa			
Estratto etereo	3.000 (4%)	7.000 (4%)	20.000 (4%)
Residuo di micelio	1.300 (2%)	2.000 (1%)	22.000 (4%)
CO_2 respiratorio	6.700 (10%)	10.000 (5%)	61.000 (11%)
Ricupero totale	51.000 (75%)	124.000 (65%)	398.000 (72%)

Le vaschette di Warburg contenevano 2,7 ml di sospensione di muffa (10 mg di peso secco) in fosfato potassico 0,08 M, pH 6,0, con 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale e 0,4 ml di H_2SO_4 9N nel braccio laterale.

Si aggiunsero 0,3 ml di $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ al tempo zero, e le vaschette furono incubate a 25°C .

Al tempo prescritto si aggiunse H_2SO_4 per arrestare la reazione. Il KOH fu allontanato e la sospensione venne distillata in corrente di vapore per allontanare acetato non utilizzato. Il micelio fu allontanato per filtrazione e il filtrato fu estratto con etere.

rata della incubazione. E' interessante notare che l'estratto etero e il residuo di micelio contenevano solamente una quantità piccolissima di radioattività, mentre la fase acquosa era fortemente marcata. In seguito a cromatografia degli estratti eteri in butanolo-acido propionico-acqua (47:22:31) su fogli di carta da filtro Whatman No. 1, essiccamento e radioautografia, si riscontrarono tre macchie con valori R_F corrispondenti a quelli del citrato, del malato e del succinato. Estratti acquosi contenevano, dopo cromatografia in fenolo ammoniacale-acqua (4:1), tre composti marcati con valori R_F equivalenti a quelli dell'aspartato, del glutammato e della alanina. Non si notò nessuna differenza netta nelle quantità relative di ^{14}C nei vari composti per i tre periodi di incubazione.

EFFETTO DEL CONGELAMENTO-SGELAMENTO SULLA UTILIZZAZIONE DI ACETATO.

L'ossidazione dell'acetato da parte di sospensioni di micelio risultava essere fortemente lesa dal congelamento e sgelamento preliminare delle sospensioni (¹). Di conseguenza per determinare se una muffa congelata potesse ancora metabolizzare in qualche maniera l'acetato, si incubò acetato 2- ^{14}C con sospensioni fresche e sospensioni congelate una volta, rispettivamente per 20 e per 45 minuti, e i campioni furono frazionati come descritto nella Parte Sperimentale. Durante il periodo di incubazione pochissimo ossigeno fu consumato nell'Esperimento 9, un poco di più nell'Esperimento 8 e quantità maggiori nei due Esperimenti 6 e 7 con muffa fresca (Tabella 3). L'analisi delle frazioni separate indicava tuttavia che esistevano solo lievi differenze di marcatura tra gli esperimenti con muffa fresca e muffa congelata (Tabella 3). In primo luogo l'utilizzazione totale dell'acetato era alquanto più bassa per l'incubato di muffa congelata; e, secondo la percentuale di acetato utilizzato che compariva nella fase acquosa era più bassa nei campioni di muffa congelata che nei controlli. Questa diminuzione era dovuta principalmente ad una forte diminuzione della frazione degli amminoacidi.

Sotto altri aspetti, tuttavia, la distribuzione della radioattività nelle varie frazioni era simile per i due esperimenti. Per esempio, dopo cromatografia nel sistema n-butanolo-acido propionico-acqua e nel sistema fenolo-acqua-ammoniaca, nei due casi gli estratti eteri contenevano quattro spots di intensità circa uguale, i cui valori R_F corrispondevano a quelli del citrato, malato, succinato e piruvato. In fenolo alcalino, uno di questi composti si spostava rapidamente.

TABELLA 3
Effetto del congelamento-sgelamento sulla capacità delle sospensioni di muffa da assimilare $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$

Esperimento N. Trattamento muffa Tempo incubazione	6 Fresco 20 min.	7 Fresco 20 min.	8 Congelato 45 m n.	9 Congelato 45 min.
$\mu\text{M NaAc}$	30 μM	30 μM	30 μM	30 μM
C.P.M. originale nell'acetato	650.000	650.000	650.000	650.000
Acetato utilizzato	125.000 (100%)	130.000 (100%)	110 000 (100%)	70.000 (100%)
Residuo distillato in corrente di vapore	88.000	96.000	80.000	49.000
Estratto etereo	11.000 (9%)	13.000 (10%)	11.000 (10%)	10.000 (14%)
Fase acquosa	66.000 (53%)	86.000 (66%)	66.000 (60%)	26.000 (37%)
Aminoacidi	31.000	26.000	14.000*	8.400
Composti neutri	11.000	15.000	11.000	13..00
Micelio	30.000 (24%)	25.000 (19%)	18.000 (16%)	15.000 (21%)
Estratto	6.000*	16.000	15.000	10.000
Residuo	9.000	9.000	9.000	5.000
BaCO_3	7.000 (6%)	9.000 (7%)	12.000 (11%)	8.000 (11%)
Ricupero lordo	114.000 (92%)	133.000 (102%)	107.000 (97%)	59.000 (84%)

* Circa metà dei campioni andò perduta.

Le vaschette di Warburg contenevano 2,7 ml di una densa sospensione di muffa (circa 100 mg di peso secco), 0,3 ml di $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ (30 μM) nel braccio laterale e 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le sospensioni di muffa per gli esperimenti 8 e 9 furono congelate in ghiaccio secco-acetone

prima dell'incubazione. Dopo equilibramento a 25°C si aggiunse substrato e si incubarono le vaschette come indicato sopra. La reazione fu arrestata aggiungendo 0,2 ml di H_2SO_4 9N attraverso il braccio laterale. Le sospensioni furono trattate come indicato nella Parte Sperimentale.

Più del 95% dell'attività delle due frazioni degli ammino acidi era nell'acido glutammico, con tracce nell'alanina e acido aspartico. Di conseguenza venne incorporato nell'acido glutammico circa 40% del carbonio metilico dell'acetato utilizzato. La maggior parte (ossia 80%) delle frazioni contenenti composti neutri rimase all'origine del foglio cromatografico nei due solventi. Delle sostanze in movimento nella cromatografia una riduceva fortemente AgNO_3 alcalino.

Gli estratti di micelio contenevano da 10 a 15 composti marcati, di cui la maggior parte erano positivi alla ninidrina. Tra questi il glutammato e l'alanina erano i più fortemente radioattivi. Inoltre una sostanza acida non identificata che si muoveva rapidamente sia in fenolo ($R_F = 0,85$) sia in butanolo ($R_F = 0,92$) conteneva una quantità apprezzabile di ^{14}C .

Si eseguirono altri studi con sospensioni di muffa fresche, congelate una volta sola e congelate due volte, nonché con estratti privi di cellule preparati mediante una pressa di HUGHES ⁽¹¹⁾, facendo seguire da centrifugazione a 2000 giri per 30 minuti. Gli schemi di distribuzione per questi esperimenti sono riportati nella Tabella IV.

L'utilizzazione dell'acetato era grosso modo la stessa per gli incubati di muffa congelata e per il controllo. Tuttavia, in accordo con esperimenti antecedenti, la percentuale di ^{14}C nella frazione di fase acquosa del micelio congelato era molto più bassa che nella stessa frazione di controllo. Oltre a ciò il consumo di ossigeno diminuiva fortemente durante l'incubazione della muffa congelata e dell'estratto. L'analogia della marcatura nell'esperimento con muffa congelata una sola volta e con muffa congelata due volte indicava che il congelamento e lo sgelamento supplementari avevano poco effetto ulteriore sul micelio.

E' interessante notare che gli estratti che erano rafforzati con ATP, cisteina e Mg, utilizzavano anche acetato. Per quanto la fase acquosa contenesse grandi quantità di ^{14}C in questi esperimenti, soltanto una piccola percentuale (circa 10% di ^{14}C nella fase acquosa) compariva nella frazione degli amminoacidi. Il resto si trovava nel filtrato attraverso Amberlite IR-120. Questi composti non sono stati ancora identificati.

DEGRADAZIONE DELL'ACIDO GLUTAMMICO METABOLICO.

Tenendo presente l'esteso incorporamento di acetato $2\text{-}^{14}\text{C}$ nell'acido glutammico in esperimenti con muffa fresca, fu interessante determinare l'attività relativa di ciascuno dei suoi atomi di carbonio.

Di conseguenza, l'acido glutammico metabolico fu isolato mediante

Assimilazione di $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ da parte di micelio fresco e congelato e da parte di estratti di *P. Chrisogenum* privi di cellule.

Esperimento N.	10	11	12	13	14
Trattamento muffa	Fresco	Congelato 1x	Congelato 2x	Estratto	Estratto
Tempo incubazione	20 min	20 min	20 min	60 min	60 min
μM acetato	30 μM	30 μM	30 μM	10 μM	10 μM
Acetato originale, C.P.M.	600.000	600.000	600.000	200.000	200.000
Acetato recuperato	388.000	378.000	395.000	147.000	133.000
Acetato utilizzato	212.000 (100%)	222.000 (100%)	235.000 (100%)	53.000 (100%)	67.000 (100%)
Residuo distillato in corrente di vapore	92.000 (44%)	64.000 (29%)	68.000 (28%)	32.000 (61%)	24.000 (35%)
Estratto eterico	19.000	14.000	16.000	5.000	5.000
Fase acquosa	65.000	29.000	39.000	20.000	14.000
Micelio o proteina	25.000 (12%)	22.000 (10%)	35.000 (15%)	14.000 (26%)	12.000 (17%)
Ba CO_3	73.000 (34%)	90.000 (40%)	75.000 (32%)	13.000 (24%)	11.000 (16%)
Ricupero lordo	190.000 (90%)	176.000 (79%)	178.000 (76%)	59.000 (111%)	47.000 (69%)

cromatografia, eluito dalla carta con acqua e cristallizzato sotto forma del suo cloridrato dopo aggiunta di glutammato carrier. Vennero degradate aliquote in maniera progressiva (⁵, ⁸).

Come mostrato nella Tabella 5, il carbonio 4 era il più fortemente marcato, i carboni 2 e 3 erano marcati in misura quasi eguale, il carbonio 1 era meno radioattivo e il carbonio 5 era pressochè privo di attività. E' chiaro che avveniva una riciclizzazione in misura considerevole durante l'esperimento.

TABELLA 5

Incorporazione di $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ in acido glutammico metabolico

Atomo di Carbonio	C. P. M.	% attività totale
Acido glutammico (I)	43,9	
(combustione completa) (II)	45,6	
media	44,7	100
Carbossile C — 1	12,1	5
Ammino C — 2	40,0	18
Metilene C — 3	36,1	16
Metilene C — 4	124,3	56
Carbossile C — 5	2,0	1
Ricupero totale		96

L'acido glutammico metabolico fu isolato dalle fasi acquose degli esperimenti 4 e 5 mediante cromatografia in fenolo ammoniacale-acqua (4:1), eluizione con acqua, e cristallizzazione come cloridrato dopo l'aggiunta di 200 mg di glutammato inerte. Dopo ricristallizzazione l'attività specifica dei cristalli e del filtrato era identica.

La combustione completa dell'acido glutammico e la sua degradazione progressiva furono eseguite come descritto nella Parte Sperimentale.

Ciascun campione di BaCO_3 fu triturato in un mortaio di vetro in H_2O , messo su piastra in uno strato di « spessore infinito » e contato fino a 2.000 colpi (circa 40 minuti) oltre il fondo (Errore 5%).

OSSIDAZIONE DELL'ACETATO IN PRESENZA DI MALATO E MALONATO.

L'acido malonico non viene ossidato da *P. chrysogenum* in varie condizione di sviluppo (¹), e non inibisce neanche l'ossidazione dell'acetato o del succinato nell'organismo intatto (¹, ¹⁸, ¹⁹). Per esaminare ulteriormente questa apparente resistenza alla inibizione, l'acetato ^{14}C marcato nel metile fu incubato con muffa sviluppata sul succinato e adat-

tata all'acetato, da sola e in presenza di malato, o di malato e malonato. Il malato fu facilmente ossidato da questo preparato di muffa.

I risultati sperimentali sono riportati nelle Tabelle 6 e 7. Lo schema complessivo della marcatura riscontrato con una muffa sviluppata su succinato (Tabella 6) era simile a quello ottenuto con muffa sviluppata su acetato. Con il solo acetato come substrato, si verificò una utilizzazione di acetato e una formazione di CO_2 leggermente maggiori, e in un micelio inibito da malonato si osservò un aumento di radioattività nell'estratto etereo.

L'analisi cromatografica dell'estratto etereo (Tabella 7) indicò tuttavia che l'accumulo di succinato marcato aumentava solo leggermente, e che il malato era marcato in misura uguale sia in presenza sia in

TABELLA 6

Effetto del malato e malonato sull'incorporazione di $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ in micelio sviluppato su succinato e adattato ad acetato.

Esperimento N.	1	2	3
μM Acetato	30 μM	30 μM	30 μM
μM Malato	—	50 μM	50 μM
μM Malonato	—	—	150 μM
Acetato originale C.P.M.	10^6	10^6	10^6
Acetato utilizzato	289.000 (100%)	245.000 (100%)	220.000 (100%)
Residuo distillato in corrente di vapore	192.000	158.000	144.000
Fase acquosa	159.000 (55%)	121.000 (50%)	96.000 (44%)
Estratto etereo	36.000 (12%)	35.000 (14%)	46.000 (21%)
Micelio	41.000 (14%)	53.000 (22%)	43.000 (20%)
CO_2 respiratorio	56.000 (19%)	34.000 (14%)	33.000 (15%)
Ricupero lordo	292.000 (101%)	243.000 (99%)	218.000 (99%)

La muffa sviluppata su succinato fu filtrata, lavata ed aerata per 1 ora in 100 ml. di fosfato potassico 0,04 M, pH 6,8, contenente acetato sodico 0,02 M e malato sodico 0,02 M. Il micelio fu filtrato, lavato e sospeso in 10 ml di H_2O . Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva sospensioni di muffa (12 mg di peso secco) e le concentrazioni sopra prescritte di malato e malonato in un volume finale di 2,9 ml di fosfato potassico 8,0 M, pH 6,8. Il pozzetto centrale conteneva 0,2 ml di KOH al 30%, e il braccio laterale conteneva 0,1 ml di H_2SO_4 9 M. Si aggiunse acetato $2\text{-}^{14}\text{C}$ e le vaschette furono immediatamente chiuse ed incubate per 50 minuti a 25°C . La reazione fu arrestata mediante acido solforico e le frazioni di muffa furono trattate come indicato sopra.

Attività relativa negli acidi organici in presenza di malato e di malonato.

Esperimento N. Substrati	1 Acetato	2 Acetato + Malato	3 Acetato + Malato + Malonato
C.P.M., Estratto etero	36.000 (100%)	35.000 (100%)	46.000 (100%)
Succinato	40%	50%	48%
Malato	0	14%	12%
Malonato	0	0	5%
Altri	60%	36%	35%

Gli estratti eteri furono concentrati a piccolo volume misurato (2-3 ml); aliquote di 0,2 ml furono messe su carta da filtro Whatman No. 1 e cromatografate con n-butanolo-acido propionico- H_2O . Il cromatogramma essiccato fu posto su una lastra fotografica per 10 giorni, e la radioautografia fu sviluppata. Strisce furono ritagliate e contate ad intervalli di 1 cm. La percentuale per ciascun composto fu espressa in percentuale della conta totale riscontrata sulla carta. Dopo correzione per l'assorbimento della carta e lievi perdite dovute ad acido acetico residuo si trovò che le conte totali su carta erano in buon accordo con le conte totali dell'estratto etero.

assenza di malonato. E' quindi evidente che l'effetto di concentrazioni elevate di malato e malonato inerti sul metabolismo di acetato era minimo.

STUDI DI INIBIZIONE CON MALONATO E MALONATO-ETILICO RADIOATTIVI.

Si incubarono malonato e malonato dietilico radioattivi con sospensioni di micelio sviluppato su acetato a varie concentrazioni idrogenioniche, in presenza o in assenza di acetato non marcato. I risultati di un esperimento tipico sono riportati nella Tabella 8.

E' evidente che il micelio essiccato, ottenuto partendo da sospensioni incubate con malonato, era praticamente privo di attività, mentre la muffa trattata con estere malonico conteneva una quantità significativa di ^{14}C . La concentrazione, espressa in c.p.m./ml di malonato o del suo estere nel liquido intracellulare e nel terreno, fu calcolata approssimativamente in base al rapporto ponderale tra campioni di muffa essiccati per filtrazione alla pompa ed essiccati in stufa. Queste concentrazioni

TABELLA 8
Presenza di malonato e malonato dietilico marcati in varie frazioni di muffa dopo incubazione.

Esperimento N.	Substrato	Inibitore	pH	C. P. M. filtrato incubazione	Micelio C. P. M.	BaCO ₃ * C.P.M.	Filtrato** C.P.M. per ml	Micelio** C.P.M. per ml
1	assente	0,05M malonato etilico	6	10.300	300	230	3400	2900
2	assente	»	5	8.700	300	230	1630	3600
3	0,025M Acetato	»	6	9.300	190	240	3100	2500
4	»	»	5	12.700	300	230	2200	3900
5	assente	0,05M Malonato	5	16.600	30	0	5500	370
6	assente	»	3	12.200	40	0	4100	620
7	0,025M Acetato	»	7	15.500	5	30	5200	70
8	»	»	4	14.200	60	12	4700	850

+ L'attività riscontrata nell'esperimento con malonato dietilico probabilmente non è significativa. Studi di controllo hanno dimostrato che si ha una certa attività nel BaCO₃ in seguito ad incubazione dell'estere, anche in assenza di micelio.

++ Questi calcoli approssimativi sono basati su dati i quali indicano che il rapporto tra acqua intracellulare e peso secco è di 4,4 ad 1.

Ciascuna vaschetta di Warburg conteneva sospensione di muffa fresca (circa 20 mg. di peso secco) e gli inibitori indicati sopra (braccio laterale) e i substrati in tampone di fosfato potassico 0,05 M, volume finale 3,0 ml con 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Dopo aver equilibrato a 25°C e dopo un periodo di controllo di 30 minuti, si aggiunse inibitore e si incubarono le vaschette per 60 minuti. La reazione fu arrestata congelando le soluzioni. La KOH e la carta da filtro furono cautamente trasferiti in 6 ml di H₂O contenente 5 mg di K₂CO₃. Si aggiunsero soluzioni di BaCl₂ e di NH₄Cl, e il BaCO₃ precipi-

tato venne centrifugato e messo su piastrelle pesate. La soluzione di reazione fu rapidamente filtrata e il micelio fu lavato completamente con H₂O. Il micelio fu essiccato per una nottata in un essiccatore, pesato, macinato in polvere fine in un mortaio di agata e stemperato uniformemente su una piastrina tarata in poche gocce di H₂O. Il surnatante e le acque di lavaggio furono raccolti, e una aliquota venne essiccata su una piastrina tarata.

Tutti i valori furono corretti delle perdite da auto-assorbimento, ecc.

differivano sensibilmente negli esperimenti con malonato, mentre erano dello stesso ordine di grandezza nelle incubazioni con l'estere, facendo quindi ritenere che il malonato non entrava nel micelio, ma che invece l'estere entrava nella muffa o era assorbito su di essa. Apparentemente la presenza di acetato non aveva alcun effetto sulla distribuzione dell' ^{14}C in entrambi i casi.

Si ritenne improbabile che il malonato fosse rimosso preferenzialmente dalle cellule durante il lavaggio a fondo del micelio, dato che quantità considerevoli di acido organico e di amminoacidi erano tratteneute entro la cellula dopo un processo di lavaggio analogo effettuato in esperimenti di controllo.

IDENTIFICAZIONE DEI SISTEMI ENZIMATICI DEL *P. CHRYSOGENUM*.

Per quanto la muffa sviluppata su acetato non fosse in grado di ossidare citrato o succinato a pH neutro ⁽¹⁾, l'acetato $2\text{-}^{14}\text{C}$ era incorporato in questi acidi e nell'acido glutammico. Si iniziò quindi una ricerca sugli enzimi presenti negli estratti liberi di muffa sviluppata su acetato, che potessero agire nel metabolismo dell'acetato.

Furono preparati estratti grezzi mediante la pressa di HUGHES ⁽¹¹⁾ come descritto nella Parte Sperimentale. Si incontrarono inizialmente alcune difficoltà in quanto si verificavano nette perdite di attività enzimatica durante l'invecchiamento o la dialisi con soluzioni diluite di sale o di fosfato a 0-3° per periodi prolungati. Dopo 48 ore era scomparso circa il 50% della proteina, come determinato dalla reazione al biureto ⁽²⁰⁾, e dopo 96 ore era andato perduto il 60-80%. Esperimenti preliminari indicavano che gli estratti contenevano un complesso di proteinasi molto attivo, con attività massima a pH 6-7.

Ricerche ulteriori su queste proteinasi vengono effettuate dal dottor Serlupi di questo laboratorio.

ACONITASI.

Si formò citrato durante l'incubazione di estratti freschi o invecchiati con cis-aconitato o Ls-isocitrato. I risultati sono riportati nella Tabella 9. L'acido etilendiammino-tetracetico (EDTA) aumentò probabilmente la formazione di citrato da cis-aconitato inibendo reazioni secondarie. Si aggiunse semicarbazide per trattenere le sostanze chetoniche.

TABELLA 9

Formazione di citrato da Cis-Aconitato e Ls-Isocitrato in estratti di *P. Chrysogenum* privi di cellule.

Esperimento N.	Substrato e aggiunte	Citrato formato
1a	12 μ M cis-Aconitato	+ 6,3 μ M
2a	»	+ 5,2 μ M
1b	» + 5 μ M EDTA	+ 8,4 μ M
2b	» + 5 μ M EDTA	+ 6,7 μ M
1c	8 μ M Ls-isocitrato	+ 2,3 μ M
2c	»	+ 1,1 μ M
1d	» + 5 μ M EDTA	+ 3,8 μ M
2d	» + 5 μ M EDTA	+ 0,5 μ M

Provette contenenti 0,2 ml di estratto di enzima invecchiato (6,6 mg di proteina) 75 μ M di semicarbazide neutralizzata, e substrato in 1,0 ml di volume totale a pH 7 furono incubate per 60 minuti a 25°C. La reazione fu arrestata con 5 ml di reattivo tungstico al 2%.

DEIDROGENASI ISOCITRICA.

Si osservò un rapido aumento di assorbimento a 340 m μ (spettrofotometro di Hilger) e la formazione di α -chetoglutarato in seguito all'aggiunta di TPN a soluzioni diluite di enzimi invecchiati contenenti Ls-isocitrato e semicarbazide. Non si notò alcun aumento di densità ottica in seguito all'aggiunta di TPN o di Ls-isocitrato da solo.

FORMAZIONE DI ACIDO GLUTAMMICO DA CITRATO.

Incubando estratti freschi privi di cellule in presenza di citrato, arsenito, Mg⁺⁺, e di una quantità catalitica di TPN (non DPN) si verificò una rapida conversione di citrato in glutammato, α -chetoglutarato e CO₂. I risultati sono riportati nella Tabella 10.

FORMAZIONE DI GLIOSILATO E SUCCINATO A PARTIRE DA LS-ISOCITRATO.

Una conversione quantitativa di citrato o Ls-isocitrato in gliossilato e succinato si verificò in estratti invecchiati o dializzati di *P. chryso-*

Formazione di acido glutammico da citrato.

Esper N.	Substrato	Originale	Finale	—Δ μM	μM O ₂	+μM CO ₂	μM idrazoni totali	μM glutammato			Ricupero
								Orig.	Finale	+Δ μM	
1	Citrato	60 μM	3	— 57	— 1,34	—	8,4	8,6	24,1	15,7	42°/o
2	»	»	1	— 59	»	—	10	5,3	22,5	16,4	45°/o
3	»	30 μM	1	-- 29	0	+ 25,2	—	—	—	—	87°/o
4	assente controllo	—	1,3	+ 1,3	— 0,4	+ 0,2	0,5	—	84,6	—	—

Vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali di reagenti in 30 ml: 0,3 ml di estratto di enzima invecchiato (3,4 mg di N proteinico) arsenito sodico 0,01 M, fosfato potassico 0,01 M, TPN 6 x 10⁻⁴ M, pH finale 6,8, come substrato nel braccio laterale; e 0,2 mole di KOH al 30% op-pure 0,2 ml di H₂SO₄ 9N nella vaschetta centrale.

Lasciato equilibrare a 23°C si fecero letture endogene per 20 minuti e si aggiunse il substrato. Lo svolgimento di anidride carbonica cessò dopo 30 minuti. Si introdusse agitando

H₂SO₄ dal pozzetto centrale e si misurò da la CO₂ messa in libertà. Si trasferirono mediante pipetta aliquote da 1 ml in a) 5 ml di acido tricloroacetico al 10% freddo, e in b) 5 ml di etanolo al 95%. Questo ultimo fu riscaldato a 70°C per 5 minuti.

Le proteine nei due campioni furono allontanate per centrifugazione e i surnatanti furono trattati come descritto nella Parte Sperimentale.

genum in presenza di semicarbazide. Il sistema enzimatico catalizzante questa reazione è stato chiamato sistema di *liasi isocitrica* ⁽²¹⁾. Verranno pubblicati separatamente studi particolareggiati su questo enzima ⁽²⁴⁾.

OSSIDAZIONE DEL SUCCINATO E DEL CITRATO.

E' stata osservata l'ossidazione di succinato e citrato ad una velocità apprezzabile in estratti freschi. I risultati sono presentati nella figura 1. Il sistema era tuttavia estremamente labile, come mostrato dalla

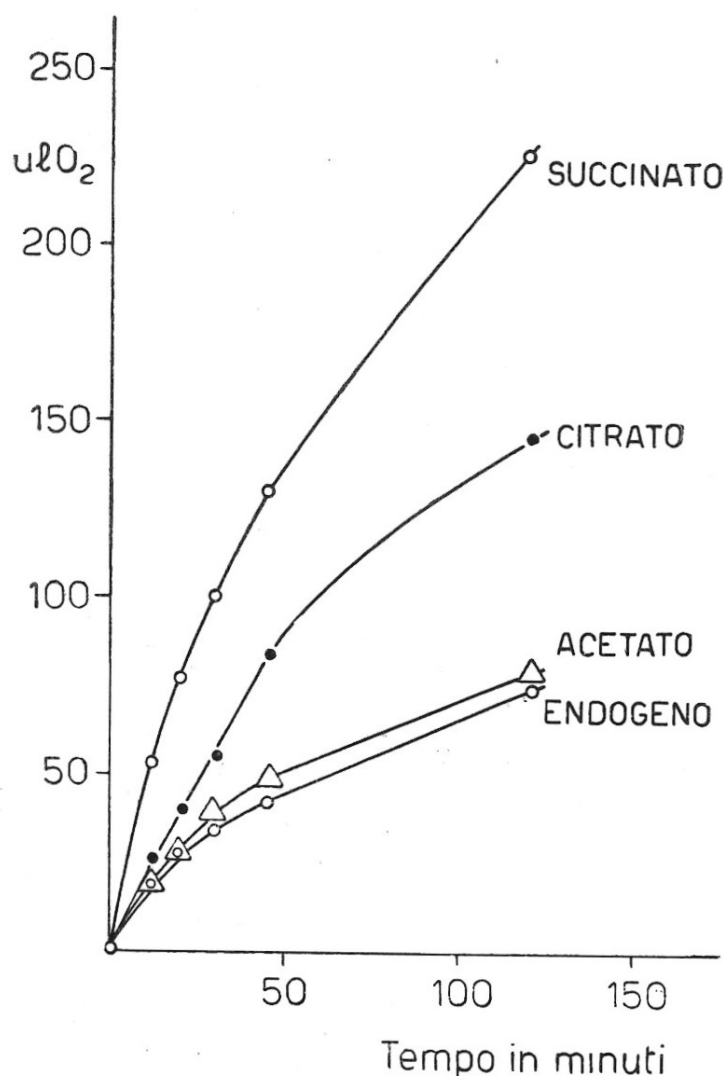


Fig. 1. - Ossidazione di acidi organici da parte di estratti privi di cellule. Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali in 3,0 ml: 0,5 ml di estratto (3,8 mg di N proteico), substrato 0,017 M, fosfato sodico 0,07 M, pH 6,8: 0,2 ml di KOH al 30% nel pozzetto centrale. Le vaschette furono incubate a 25° per due ore.

sua rapida inattivazione. Il Q_{O_2} iniziale (succinato) era uguale al 10-15% della velocità massima di ossidazione dell'acetato nel micelio intatto. L'ossidazione citrica può procedere attraverso succinato e gliossilato dopo scissione mediante liasi isocitrica.

FUMARASI.

La presenza di fumarasi era indicata dalla formazione di un miscuglio in equilibrio di fumarato e malato, quando si incubarono estratti in

Attività della decarbossilasi ossalacetica in estratti di muffa.

N.	Contenuto	$\mu\text{M CO}_2$
1	Enzima da solo	0,2
2	Ossalacetato da solo	0,7
3	Enzima + ossalacetato	5,8

Le vaschette di Warburg contenevano le seguenti concentrazioni finali di reagenti in 3,0 ml: 0,5 ml di estratto di enzima dializzato (2,5 mg di N proteinico), arsenito sodico 0,01 M, fosfato potassico 0,003 M, pH 7,2, e ossalacetato 0,013 M come prescritto.

Le vaschette furono incubate a 37°C per 90 minuti.

presenza dell'uno o dell'altro substrato. Gli acidi organici furono individuati cromatograficamente ⁽⁶⁾.

OSSALACETATO-DECARBOSSILASI.

In presenza di ossalacetato, gli estratti enzimatici catalizzarono lo svolgimento di anidride carbonica, come indicato nella Tabella 11. Il piruvato venne individuato come prodotto preponderante mediante cromatografia degli idrazoni con il metodo di CAVALLINI ⁽¹⁷⁾.

DISCUSSIONE

L'inefficacia dell'acido malonico come inibitore dell'ossidazione di acetato nel *Penicillium chrysogenum* è stata attribuita alla sua incapacità di penetrare nel micelio ^(18, 19). In questa comunicazione sono state portate prove dirette a sostegno di questa interpretazione: non si riscontra malonato radioattivo all'interno del micelio in condizioni nelle quali avviene permeazione da parte del malonato etilico, ed la rapida incorporazione di acetato radioattivo entro il succinato e il malato è influenzata in misura minima dalla presenza di malonato. E' quindi chiaro che

reazioni ossidative entro il micelio possono benissimo svolgersi in presenza di elevate concentrazioni di malonato nell'ambiente esterno, e che l'assenza di inibizione non può essere attribuita ad una parte di importanza secondaria sostenuta dalla succinossidasi nella ossidazione dell'acetato.

D'accordo con l'osservazione secondo la quale l'acetato non era ossidato in modo completo da sospensioni fresche di *P. chrysogenum* sviluppato su acetato, si constatò che l'acetato 2-¹⁴C era incorporato in un grande numero di metaboliti, e che solo una quantità relativamente piccola era convertita in CO₂. Tra i composti marcati formati in incubazioni di muffa fresca, l'acido glutammico era di gran lunga il più radioattivo, rappresentando quasi il 40% del ¹⁴C dell'acetato utilizzato. La distribuzione della marcatura risultante dalla degradazione progressiva del prodotto metabolico era molto simile a quella che potrebbe risultare qualora l'acido glutammico venisse formato a partire da acetato passando per il ciclo degli acidi tricarbossilici, ma soltanto dopo due o tre corsi del ciclo.

Tali analogie nella distribuzione della marcatura non possono tuttavia essere prese come prova sufficiente di un qualsiasi meccanismo dato che varie reazioni di condensazione dell'acetato fornirebbero risultati identici. E' tuttavia chiaro che è implicata qualche reazione ciclica e che l'acetato si condensa con il suo carbonio metilico. Il citrato (³), tuttavia, è uno dei primi metaboliti che diventi marcato nel corso di incubazioni molto brevi di acetato 1-¹⁴C. Benchè sia stata dimostrata in questa comunicazione la presenza di diversi enzimi del ciclo dell'acido citrico in estratti di *P. chrysogenum*, i tentativi di dimostrare che il citrato proveniente da acetato e ossalacetato si accumula in estratti rinforzati privi di cellule sono rimasti senza successo. CASIDA e KNIGHT (²², ²³) hanno tuttavia constatato un certo grado di formazione di citrato da acetato e ossalacetato in estratti di *P. chrysogenum* privi di cellule, ma solo con una resa bassissima di citrato. Non è ancora chiaro se questa difficoltà di dimostrare l'attività citrogenasica sia dovuta ad inattivazione dell'enzima durante la preparazione dell'estratto, o alla rapida dissimilazione del citrato formato, oppure ad una parte meno importante sostenuta dalla citrogenasi nel metabolismo dell'acetato di questo organismo. La presenza di tutti gli enzimi necessari per la conversione di acetato in glutammato via ciclo degli acidi tricarbossilici, e l'accumularsi di una quantità così forte di glutammato con una distribuzione definita della marcatura, appoggiano fortemente la tesi che il ciclo degli acidi tricarbossilici sia la via principale per questa conversione.

La produzione netta di glutammato a partire da acetato richiede

tuttavia anche qualche altro meccanismo di condensazione per la formazione di acidi a quattro atomi di carbonio. Il ciclo del gliossilato, che comporta gli enzimi malato-sintetasi e isocitrico-liasi, sembra fornire questi acidi, ed è probabile che questo ciclo agisca anche esso nella muffa sviluppata su acetato. L'attività specifica del carbonio C_3 dell'acido glutammico isolato in questi esperimenti era leggermente superiore a quella del carbonio C_2 ; relazione questa che potrebbe verificarsi se il malato formato per azione della malato-sintetasi non fosse in equilibrio con succinato, ma che non potrebbe verificarsi per azione del solo ciclo degli acidi tricarbossilici.

E' anche di grande interesse notare che sospensioni di micelio congelate e sgelate, incapaci di consumare ossigeno, sono ancora in grado di incorporare in misura netta acetato ^{14}C . La distribuzione della radioattività in varie frazioni è grosso modo uguale a quella nella muffa fresca, benchè sia stato indicato da analisi più particolareggiate delle frazioni degli amminoacidi che esistevano notevoli differenze di composizione. In assenza di consumo di ossigeno, l'incorporazione di acetato può procedere attraverso una riduzione di substrati endogeni all'interno della cellula (come avviene in una certa misura con citrato in estratti privi di cellule), oppure forse mediante una modifica del suo cammino metabolico. Comunque questi esperimenti indicano che si deve essere cauti nel definire vie ossidative in base a dati di incorporazione o in base ad enzimi che possono essere trovati in estratti privi di cellule.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) OLSON J. A. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 162 (1961).
- (²) OLSON J. A. e CHAIN E. B. - Proc. VI Intern. Congress Microbiol., Rome, 1: 152 (1954).
- (³) KOFFLER H. - Symp. on Microbial Metabolism VI Intern. Congress Microbiol., Rome, 1954.
- (⁴) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 61 (1954).
- (⁵) PHARES E. F. - Arch. biochem. biophys., 33: 173 (1951).
- (⁶) BENSON A. A., BASSHAM J. A., CALVIN M., GOODALE T. G., HAAS V. A. e STEPKA W. - J. am. chem. Soc., 72: 1710 (1950).
- (⁷) DENT C. E. - Biochem. J., 43: 169 (1948).
- (⁸) MOSBACH E. H., PHARES E. F. e CARSON S. F. - Arch. biochem. biophys., 33: 179 (1951).
- (⁹) CALVIN M., HEIDELBERGER C., REID J. C., TOLBERT B. M. e YANKWICH P. F. - Isotopic Carbon, John Wiley and Sons (1949).

- (10) VAN SLYKE D. D. e FOLCH J. - J. biol. Chem., 136: 509 (1940).
 - (11) HUGHES D. E. - Brit. J. exp. Path., 32: 97 (1952).
 - (12) TAYLOR T. G. - Biochem. J., 54: 48 (1953).
 - (13) OCHOA S. - J. biol. Chem., 174: 133 (1948).
 - (14) SCHALES O. e SCHALES S. S. - Arch. Biochem., 41: 445 (1946).
 - (15) KREBS H. A. - Biochem. J., 34: 2095 (1937).
 - (16) FRIEDMANN T. E. e HAUGEN G. E. - J. biol. Chem., 147: 415 (1942).
 - (17) CAVALLINI D., FRONTALI N. e TOSCHI G. - Nature, 163: 568 (1949).
 - (18) HOCKENHULL D. J. D., HERBERT M., WALKER A. D., WILKEN G. D. e WINDER F. G. - Biochem. J., 56: 73 (1954).
 - (19) BEE ERS H., GOLDSCHMIDT E. P. e KOFFLER H. - Arch. biochim. biophys., 39: 236 (1952).
 - (20) MEHL J. W. - J. biol. Chem., 157: 173 (1945).
 - (21) OLSON J. A. - Nature, 174: 695 (1954).
 - (22) CASIDA Jr. L. E. e KNIGHT S. G. - J. Bact., 67: 171 (1954).
 - (23) CASIDA Jr. L. E. e KNIGHT S. G. - J. Bact., 67: 658 (1954).
 - (24) OLSON J. A. - J. biol. Chem., 234: 5 (1959).
-