

28. A. BALLIO, C. CASINOVİ e G. SERLUPI-CRESCENZI. — Nucleotidi di microrganismi. — Nota I. I nucleotidi del micelio di *Penicillium chrysogenum* Thom. (*)

Riassunto. — Estratti perclorici o idroalcoolici di *Penicillium chrysogenum* contengono numerosi esteri fosforici di adenosina, guanosina, inosina, citidina, e uridina, sedici dei quali vengono identificati come nucleotidi già noti. E' messa in evidenza la presenza di almeno tre composti di struttura nuova. Vengono descritte le tecniche usate per il frazionamento e la purificazione dei nucleotidi, nonché i metodi speciali da usare per l'identificazione di questi composti allorchè siano soltanto disponibili in quantità di poche micromoli.

Summary. — Perchloric acid or ethanolic extracts of *Penicillium chrysogenum* contain numerous phosphate esters of adenosine, guanosine, inosine, cytidine and uridine, sixteen of which have been identified with previously known nucleotides. Evidence for the occurrence of several new compounds is presented. The techniques used for fractionating and purifying the nucleotides and the special methods for their identification in micromolar amounts are described.

Recentemente gli studi di alcuni coenzimi e degli intermedi della biosintesi degli acidi nucleici hanno mostrato la presenza in natura di numerosi nuovi 5'-fosfati di nucleosidi. Composti di questo tipo contenenti adenina erano noti da tempo (mono-, di-, tri-fosfati dell'adenosina, difosfo- e trifosfo-piridin-nucleotide, flavin-adenin-nucleotide) mentre fino al 1950 non si aveva nessuna indicazione dell'esistenza dei 5'-nucleotidi derivati dalle altre basi che entrano nella costituzione degli acidi nucleici. Nel 1950 LELOIR e collaboratori isolarono dal lievito il coenzima della reazione reversibile di isomerizzazione del glucosio-4-fosfato a galattosio-4-fosfato e dimostrarono che esso è un 5'-nucleotide uridinico, precisamente l'uridindifosfoglucosio ⁽²⁾. Nello stesso anno PARK riportò i primi risultati dello studio chimico di altri 5'-nucleotidi dell'uracile che si accumulano nello *Staphylococcus aureus* trattato con penicillina ⁽³⁾; essi risultarono analoghi all'uridindifosfoglucosio, con la

(*) Una parte di questi risultati è stata presentata al III Congresso Internazionale di Biochimica, (Bruxelles, 1955) e pubblicati in forma preliminare nel 1956 ⁽¹⁾. Il lavoro, completato nel giugno 1958, è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 241 (1959).

differenza che il glucosio era sostituito da un acido acetilaminouronico (recentemente identificato come N-acetil-3-O-carbossietilesosammina o acido muramico) ⁽⁴⁾, il cui carbossile era unito in uno dei composti alla L-alanina ed in un altro ad un peptide formato da acido D-glutammico, L-lisina e 3 molecole di DL-alanina ⁽⁵⁾. A questi primi risultati se ne aggiunsero in breve tempo numerosi altri, e nel giro di pochi anni, principalmente attraverso l'esame dei tessuti animali ⁽⁶⁾, si arrivò a stabilire l'esistenza in natura di tutti gli analoghi uridinici, citidinici e guanosinici dell'adenosinmonofosfato, dell'adenosindifosfato e dell'adenosintrifosfato, nonché di nucleotidi « coniugati » del tipo dell'uridindifosfoglucozio. Questi ultimi risultano dalla unione di sostanze contenenti ossidrili emiacetalici (idrati di carbonio) o alcoolici con i pirofosfati di citidina ⁽⁷⁾ o di uridina ⁽⁸⁾ o di guanosina ⁽⁹⁾. Questi composti svolgono tutti delle importanti funzioni nel metabolismo intermedio. Ad esempio essi fungono da intermedi nella biosintesi degli acidi nucleici ⁽¹⁰⁾ e da coenzimi nell'incorporazione degli amminoacidi nelle proteine ⁽¹¹⁾, della colina e dell'etanolammina nei fosfolipidi ⁽¹²⁾, di carboidrati negli oligosaccaridi ⁽¹³⁾ e nei polisaccaridi ⁽¹⁴⁾ e nell'ossidazione dell' α -chetoglutarato ⁽¹⁵⁾, nella carbossilazione del fosfoenolpiruvato ⁽¹⁶⁾, nella conversione dell'inosin-5'-fosfato in adenosin-5'-fosfato ⁽¹⁷⁾, ecc.

Alcuni nuovi nucleotidi, quali i derivati uridinici, sono stati isolati da batteri o lieviti prima di essere scoperti in tessuti animali; altri sono stati isolati esclusivamente in microrganismi e sarebbero perciò la manifestazione di specifiche attività metaboliche. I nucleotidi acido-solubili dei lieviti sono stati oggetto di numerose ricerche ⁽¹⁸⁾; sui nucleotidi del *Micrococcus lysodeikticus* è stata pubblicata una breve comunicazione ⁽¹⁹⁾.

Le conoscenze attuali dei nucleotidi presenti nei funghi inferiori sono tuttora molto scarse. Per questa ragione, e tenendo conto del particolare interesse da parte di questo Laboratorio verso i differenti aspetti del metabolismo intermedio di questo gruppo di microrganismi, si è deciso di eseguire un accurato studio sui nucleotidi acido-solubili di alcuni funghi.

Tale studio è stato iniziato sul *Penicillium chrysogenum*, la muffa produttrice di penicillina, sulle cui condizioni di crescita molte nozioni sono state accumulate in questo Laboratorio negli ultimi anni.

Prima del presente lavoro, i soli nucleotidi dei quali era stata dimostrata la presenza nel *P. chrysogenum* erano l'adenosin-5'-monofosfato e l'adenosin-5'-trifosfato ⁽²⁰⁾.

MATERIALI E METODI

1. - REATTIVI E PRODOTTI.

Tutti i reattivi ed i solventi erano C. Erba, Milano, puri per analisi, tranne ove diversamente indicato.

Il lattato di ammonio usato per le fermentazioni è stato preparato neutralizzando l'acido lattico all'85% (F.U.) con la quantità stechiometrica di ammoniaca.

Il lattosio ed il glucosio usati per i terreni di fermentazione erano prodotti tecnici, puri almeno al 95%.

Il formiato di ammonio era un prodotto B.D.H. (Inghilterra).

Gli eluenti per la cromatografia di scambio ionico sono stati preparati a partire da acido formico all'85%.

L'acido nicotinico, l'adenina, la guanina, l'ipoxantina, l'uracile, l'adenosina, la citidina, la guanosina, il cloridrato della D-glucosamina, il D-mannosio, il L-arabinosio, il D-ribosio e il D-xilosio sono stati forniti dalla Hoffmann-La Roche (Svizzera), la citosina e l'inosina dalla Light (Inghilterra), il 5'-monofosfato dell'inosina dalla Schwarz (U.S.A.), l'uridina, il 5'-mono-, di- e trifosfato dell'adenosina il 5'-di- e trifosfato della guanosina, il 5'-mono- di- e trifosfato della citidina dalla Pabst (U.S.A.), il difosfo-piridin-nucleotide e il 5'-mono-, di-, e trifosfato dell'uridina dalla Nutritional Biochemical Corporation (U.S.A.), il trifosfo-piridin-nucleotide, l'alcool-deidrogenasi e la glucosio-6-fosfato-deidrogenasi dalla Sigma (U.S.A.), il D-lixosio dalla Mann (U.S.A.), l'orcina ed il sale bisodico dell'acido etilendiammino-tetraacetico dalla Merck (Germania). Il dr. Khorana ci ha gentilmente inviato un campione di guanosin-5'-monofosfato, mentre il prof. Leloir ci ha fatto generosamente dono di campioni di uridin-difosfo-glucosio e di uridin-difosfo-acetilglucosammina. L'acetilglucosammina è stata preparata a partire dal cloridrato della glucosammina (²⁹).

La resina Dowex-1 (x8, 50-100 mesh) è stata fornita dalla National Aluminate Corporation (U.S.A.) sotto il nome di Nalcite SBR, la Celite 503 dalla Johns-Manville Co. (U.S.A.) e l'Alkaterge C dalla Commercial Solvent Corp. (U.S.A.).

2. - METODI ANALITICI.

a) *Chimici.*

Le determinazioni dell'azoto sec. Kjeldahl sono state eseguite con il metodo di MARKHAM (²¹).

Gli zuccheri riducenti nei terreni di coltura sono stati misurati secondo SOMOGYI ⁽²²⁾.

L'umidità dei miceli filtrati è stata determinata per essiccazione a 100° per una notte.

Il fosforo inorganico è stato titolato con il metodo di BEREMBLUM e CHAIN ⁽²³⁾. Il fosforo totale ed idrolizzabile sono stati determinati con lo stesso metodo, dopo digestione con acido perclorico o dopo idrolisi di dieci minuti a 100° con acido cloridrico N, rispettivamente. La lettura della colorazione è stata eseguita ad un colorimetro E.E.L. con filtro rosso n. 607. Il ribosio è stato misurato con il metodo di MEJBAUM, modificato da UMBREIT ⁽²⁴⁾, riducendo però a metà il volume finale ed il volume del reattivo (orcina-acido cloridrico). Il colore è stato letto con un colorimetro E.E.L., con filtro rosso n. 608. Come standard si è usato acido adenosin-5'-monofosforico.

b) Spettrofotometrici.

Gli spettri di assorbimento di tutte le sostanze purificate per cromatografia su carta sono stati registrati tra 220 e 360 mμ mediante uno spettrofotometro registratore Cary. Le misure sono state fatte a pH acido (< 2), neutro ed alcalino (> 11), ed in presenza di cianuro di potassio ⁽²⁵⁾ e dopo reazione con alcool-deidrogenasi e glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (v. paragrafo d) nel caso dei nucleotidi piridinici.

Analogamente, gli spettri delle basi ottenute per idrolisi dei nucleotidi con acido perclorico sono stati registrati a pH acido e alcalino, previa purificazione per cromatografia su carta nel solvente n. 8 (v. paragrafo successivo) ed eluizione dalla carta per immersione in acido cloridrico 0,1 N per 18 ore a 37°.

Gli assorbimenti ai rispettivi massimi hanno permesso la determinazione quantitativa delle basi puriniche e pirimidiniche contenute nei nucleotidi. Si è fatto uso dei seguenti valori per le estinzioni molari:

fosfati di adenosina	$14,9 \times 10^3$	a 257 mμ (a pH 2)	⁽²⁶⁾
» » guanosina	$12,3 \times 10^3$	» 256 mμ »	⁽²⁶⁾
» » citidina	$13,0 \times 10^3$	» 280 mμ »	⁽²⁶⁾
» » uridina	$10,0 \times 10^3$	» 262 mμ »	⁽²⁶⁾
» » inosina	$12,2 \times 10^3$	» 248,5 mμ (a pH 6)	⁽²⁷⁾

Le quantità delle sostanze che presentano un assorbimento nell'u.v. sono state espresse in unità di densità; 1 unità rappresenta la quantità di sostanza che, disciolta in 1 cm³, dà una densità ottica di 1,00 allo spettrofotometro, in cella di cm 1 di spessore ⁽²⁸⁾.

c) *Cromatografici.*

Per la cromatografia su carta si sono usati i seguenti sistemi di solventi:

- Solvente n. 1: acetato ammonico M, pH 3,8-alcool etilico (30:75)
Solvente n. 2: acetato ammonico M, pH 7,5-alcool etilico (30:75)
Solvente n. 3: acido isobutirrico-ammoniaca N (100:60)
Solvente n. 4: alcool propilico normale (cm^3 20)-tampone di fosfati 0,1 M pH 6,8 (cm^3 1000)-solfato ammonico (g 600)
Solvente n. 5: alcool isoamilico-fosfato bisodico 5% (bifasico)
Solvente n. 6: alcool propilico normale-acqua (60:40)
Solvente n. 7: alcool propilico normale-ammoniaca ($d=0,88$)-etilen-diammino-tetraacetato bisodico 0,02 M (60:30:10)
Solvente n. 8: alcool isopropilico-acido cloridrico conc.-acqua (68:17,6: q.b. a 100)
Solvente n. 9: alcool butilico normale-piridina-acqua (6:4:3)
Solvente n. 10: alcool butilico normale-acetone-acqua (2:7:1).

I solventi n. 4 e 5 erano usati per sviluppo ascendente, tutti gli altri per sviluppo discendente. La carta usata era Whatman 1, lavata con acido acetico 2 N. Tutti i prodotti isolati sono stati sottoposti a cromatografia su carta con i solventi n. 2, 3, 4, e 5. Per il difosfopiridin-nucleotide e per il trifosfopiridin-nucleotide si è usato anche il solvente n. 6. Le cromatografie erano eseguite contemporaneamente sui composti in esame e su sostanze di riferimento note. Queste erano i mono-, di-, e tri-fosfati della adenosina, guanosina, inosina, citidina e uridina, il difosfopiridin-nucleotide, l'uridindifosfoglicosio, l'uridindifosfoacetilglucosammina. I nucleosidi ottenuti per idrolisi enzimatica (v. paragrafo 3) dai corrispondenti nucleotidi venivano riconosciuti mediante cromatografia con i solventi n. 2 e 7. Come sostanze di riferimento venivano impiegate adenosina, guanosina, inosina, citidina e uridina. Le basi ottenute per idrolisi acida dai corrispondenti nucleotidi venivano riconosciute mediante cromatografia con i solventi n. 5 e 8. Come sostanze di riferimento venivano impiegate adenina, guanina, ipoxantina, citidina e uracile.

Gli idrati di carbonio ottenuti per idrolisi dell'uridindifosfoglicosio, uridindifosfogalattosio, uridindifosfoacetilglucosammina, guanosindifosfomannosio venivano riconosciuti mediante cromatografia con il solvente n. 9. Come composti di riferimento venivano impiegati glucosio, galattosio, mannosio, ribosio, glucosammina e acetilglucosammina.

I solventi venivano sempre allontanati dai cromatogrammi in cor-

rente d'aria a temperatura ambiente e i singoli composti rivelati: con luce ultravioletta (lampada germicida della General Electric Co. filtrata con filtro n. 9863 della Corning Glass Work) nel caso dei nucleotidi, dei nucleosidi e delle basi puriniche o pirimidiniche; con benzidina-acido tricloroacetico (³⁰), o con metaperiodato di potassio seguito da benzidina (³¹), nel caso degli idrati di carbonio; con molibdato di ammonio seguito da idrogeno solforato (³²) nel caso degli esteri fosforici; con ninidrina in alcool butilico normale nel caso della glucosammina (³³); con p-dimetilamminobenzaldeide nel caso dell'acetilglucosammina (³⁴).

d) *Enzimatici.*

L'identità dei nucleotidi piridinici è stata confermata secondo BONNICHSEN (³⁵) incubandoli con alcool etilico in presenza della deidrogenasi alcoolica, che richiede in modo specifico come coenzima il difosfopiridin-nucleotide, e secondo KORNBERG (³⁶) con glucosio-6-fosfato in presenza della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi, che richiede il trifosfopiridin-nucleotide. Misurando gli spettri dopo l'incubazione, si è visto apparire un nuovo massimo a 340 mμ solo se il nucleotide piridinico era stato trattato con il substrato e l'enzima appropriato.

Tutte le determinazioni analitiche sui singoli composti si sono dovute eseguire su scala micro, dato che dopo il frazionamento e la purificazione del materiale preparato a partire da una fermentazione di 50 l, ciascun prodotto era, nel migliore dei casi, disponibile in quantità dell'ordine delle decine di milligrammi. L'elevato coefficiente di estinzione molare delle basi puriniche e pirimidiniche e dei loro derivati ha permesso le misure dei relativi spettri su frazioni di micromole; le stesse quantità sono bastate per le cromatografie su carta e per le determinazioni colorimetriche del ribosio e del fosforo.

Inoltre, poichè le basi puriniche e pirimidiniche, come pure i loro ribosidi e ribotidi, possono essere localizzati sulla carta a mezzo di luce u.v. di lunghezza d'onda opportuna (³⁷), ci è stato possibile eluire le sostanze inalterate in maniera quantitativa, ed usarle successivamente in ulteriori cromatografie o per le determinazioni spettrofotometriche.

3. - IDROLISI.

Per la preparazione delle basi puriniche e pirimidiniche, degli zuccheri legati a difosfati di nucleotidi e dei nucleosidi si è fatto ricorso ad idrolisi chimiche ed enzimatiche.

Nella maggior parte dei casi, esse si eseguivano introducendo in tubicini capillari una frazione di micromole della sostanza in esame insieme agli opportuni reattivi. Le soluzioni da usare venivano misurate facendo uso di micropipette tarate contenenti pochi microlitri.

I nucleotidi sono stati trasformati nelle basi corrispondenti secondo WYATT (³⁸).

Una parte della soluzione acquosa della sostanza, contenente non più di 0,5 μ mol (in base all'assorbimento posseduto alla lunghezza d'onda corrispondente al relativo massimo) si evaporava a secchezza e il residuo si discioglieva accuratamente in 10-20 μ l di acido perclorico al 72%; la soluzione ottenuta si introduceva per capillarità in un tubicino, aperto ad entrambe le estremità, delle dimensioni di 15 cm $\times$ 1 mm ca. Chiuso il tubicino alla fiamma, lo si teneva per 60 minuti a 100°, poi lo si lasciava raffreddare e quindi si centrifugava per 5 minuti a 150 $\times$ g per eliminare la piccola quantità di carbone che sempre si formava. Il contenuto limpido del capillare veniva aspirato con un capillare più sottile, dal quale si trasferiva direttamente sulla carta da cromatografia.

L'uridindifosfoglicosio, l'uridindifosfoacetilglucosammina ed il guanosindifosfomannosio venivano idrolizzati secondo le indicazioni di LELLOIR e collaboratori (^{2, 9, 18}). L'uridindifosfoacetilglucosammina è stata anche sottoposta a idrolisi con acido cloridrico N (30' a 100° in tubicini capillari) e cromatografata direttamente con i solventi n. 1 e 3. In tal modo accanto all'uridin-5'-monofosfato è possibile, per mezzo della ninidrina, di mettere in evidenza la formazione di glucosammina. La natura dell'esosammina è stata ulteriormente confermata eluendo con acqua dal cromatogramma la macchia viola ottenuta con ninidrina e sottoponendo l'eluato concentrato a cromatografia con il solvente n. 9. Si mette in tal modo in evidenza la formazione di una sostanza con R_F 0,37 che corrisponde all'arabinosio (R_F dell'arabinosio di controllo = 0,38), mentre la galattosammina avrebbe dato luogo al lixosio (R_F del lixosio di controllo = 0,46) (³⁹).

Si è fatto ricorso ad una 5'-nucleotidasi specifica preparata dal liquido seminale di toro per la trasformazione dei 5'-mononucleotidi in nucleosidi. L'enzima è stato preparato secondo il metodo semplificato di HEPPEL e HILMOE (⁴⁰) e la sua specificità è stata sempre controllata usando come substrato il 3'-monofosfato di adenosina (che non deve venire idrolizzato) e l'adenosin-5'-monofosfato. Queste defosforilazioni enzimatiche sono state anch'esse eseguite in tubicini capillari, operando come nel caso dell'idrolisi con acido perclorico (v. paragrafo c), tranne che il nucleotide (0,1 μ M) veniva introdotto in soluzione nel capillare

aperto, nel quale si aggiungevano successivamente 5 μ l di cloruro di magnesio 0,1 M, 5 μ l di tampone di glicocola M a pH 8,5 e 10 μ l di enzima; si chiudeva un'estremità del capillare, si centrifugava 5 minuti a $150 \times g$ per mescolarne il contenuto e, dopo incubazione di 60 minuti a 37° , si apriva il capillare e se ne trasferiva il contenuto direttamente sulla carta da cromatografia.

4. - PREPARAZIONE DEL MICELIO.

Per tutte le esperienze è stato usato il *P. chrysogenum* ceppo 49-133 Wis, sviluppato a 25° in fermentatori di acciaio inossidabile da 90 litri ⁽⁴¹⁾ contenenti 50 l del terreno sintetico di JARVIS e JOHNSON ⁽⁴²⁾ con il 2,25% di lattosio e il 0,75% di glucosio, senza aggiunta di precursore. I fermentatori avevano agitazione a vortice. Le condizioni di agitazione erano: elica da 90 mm con 700 giri al minuto, con flusso d'aria di 1 vol/vol liq/min; come antischiuma si impiegava olio di vaselina contenente il 6% di alkaterge (cm³ 50 prima della sterilizzazione, e se necessario aggiunta di altri cm³ 50 durante il corso della fermentazione). L'inoculo dei fermentatori era costituito da 5 l di una coltura di 48 ore sviluppata nello stesso terreno in fermentatori di acciaio inossidabile da 10 l ⁽⁴³⁾, a loro volta inoculati con una sospensione di conidi (10^5 conidi/cm³ di terreno finale).

I terreni venivano sterilizzati per 20' a 100° e per altri 20' a 120° .

Dopo 60-70 ore, quando gli zuccheri riducenti erano pressochè esauriti ed il peso secco del micelio era dell'1-1,5% del liquido di coltura, il micelio si filtrava per tela, dopo filtrazione si sospendeva in 25 litri di acqua distillata, si filtrava nuovamente, eliminando la maggior quantità possibile di liquido, si pesava e si conservava in strato sottile a -20° fino al momento della estrazione. Dal micelio umido si prelevavano tre campioni di g 5 che servivano per la determinazione in triplicato del peso secco, dell'azoto e del fosforo; l'azoto Kjeldahl era circa 6,0 g per 100 g di micelio secco, ed il fosforo totale circa 1 g per 100 g di micelio secco.

5 - ESTRAZIONE DEI NUCLEOTIDI.

L'estrazione del micelio è stata eseguita con alcool etilico ⁽⁴⁴⁾ o con acido perclorico ⁽⁴⁵⁾; con entrambi i metodi si sono ottenuti essenzialmente gli stessi risultati, ma l'estrazione con acido perclorico ha il vantaggio della semplicità e rapidità.

A) *Estrazione con alcool etilico.* Il micelio gelato veniva introdotto rapidamente in alcool etilico 95% bollente, usandone un volume tale da dare con l'acqua contenuta nel micelio (calcolata dal peso secco) una concentrazione finale di alcool pari al 50%; si manteneva all'ebollizione 5', poi a temperatura ambiente 15-20' e infine si centrifugava (International Centrifuge size 2, con testa a paniere). Il micelio si estraeva una seconda volta, impiegando alcool etilico al 50% in quantità pari all'alcool etilico 95% impiegato per la prima estrazione; si centrifugava ed i liquidi della prima e della seconda centrifugazione erano riuniti e filtrati su un leggero strato di celite 503 lavata con acido. Dopo aver portato a 3 il pH del filtrato con acido nitrico 5 N, i nucleotidi si precipitavano con una soluzione di acetato mercurico ⁽²⁾. Tale soluzione si aggiungeva frazionatamente seguendo la densità ottica della fase liquida a 260 mμ. Esperienze preliminari avevano dimostrato che ad un valore di circa 2,0/cm² il fosforo organico era completamente precipitato, e quindi l'aggiunta di acetato mercurico si interrompeva al raggiungimento di tale valore. Dopo riposo di una notte a 5°, la sospensione si centrifugava e il precipitato si filtrava sotto vuoto per eliminare la maggior parte possibile della fase liquida. Il precipitato bianco crema si sospendeva in acqua fredda (in quantità pari a 1/10 del volume delle acque madri idroalcoliche) per mezzo di un Waring blender, e nella sospensione raffreddata esternamente con ghiaccio si faceva gorgogliare idrogeno solforato fino a precipitazione completa del mercurio; il solfuro di mercurio si centrifugava, si lavava con poca acqua (che si univa poi al supernatante della centrifugazione precedente) e la soluzione limpida, raffreddata esternamente con ghiaccio, si liberava dell'idrogeno solforato per mezzo di una corrente di aria e si portava infine a pH 7 circa con ammoniaca concentrata fredda. Tale soluzione si impiegava immediatamente per il frazionamento su resina.

B) *Estrazione con acido perclorico.* Il micelio gelato veniva trattato per 5' a 5° in Waring blender con una quantità di acido perclorico N tale da dare con l'acqua contenuta nel micelio (calcolata dal peso secco) una soluzione 0,5 N in acido perclorico. La sospensione si centrifugava ed il micelio si estraeva nuovamente, impiegando un volume di acido perclorico 0,5 N pari a quello del primo supernatante. Dopo centrifugazione, il supernatante si riuniva al primo e la soluzione limpida si portava a pH 7 con idrato potassico 5 N. Dopo riposo di mezz'ora a 0° si centrifugava il perclorato di potassio che era precipitato e la soluzione si impiegava immediatamente per il frazionamento su resina.

Il contenuto dell'estratto alcoolico in materiale assorbente a 260 m μ era da due a tre volte maggiore di quello dell'estratto perclorico, ma di esso solo il 30-40% veniva fissato dalla resina, cosicchè questa seconda quantità era sempre la stessa, indipendentemente dal metodo di estrazione usato, e raggiungeva il valore di 100-200 unità di densità ottica per g di micelio secco. La quantità di fosforo totale estratto dal micelio era approssimativamente la stessa con i due metodi (30-40% del fosforo totale del micelio) ed il rapporto tra le unità di densità a 260 m μ ed i mg di fosforo organico fissato dalla resina variava tra 150 e 300.

La composizione qualitativa dei nucleotidi contenuti in estratti preparati con i due metodi era la stessa, con una sola eccezione (v. risultati e discussione).

6. - SEPARAZIONE SU RESINA DI SCAMBIO IONICO.

Le soluzioni dei nucleotidi sono state passate su colonna di resina anionica dalla quale i prodotti venivano eluiti frazionatamente usando acido formico e formiato di ammonio con gradiente di concentrazione in ione formico ⁽⁴⁵⁾.

Si è preparata una colonna di Dowex-4x8 (50-100 mesh) sotto forma di formiato secondo le modalità indicate da HURLBERT e collaboratori ⁽⁴⁵⁾. La colonna aveva un rapporto altezza: diametro pari a circa 10 e la quantità di resina da impiegare veniva stabilita in base alla quantità di materiale che assorbe a 260 m μ presente nella soluzione da frazionare (circa cm³ 1 di resina per un valore di unità di densità a 260 m μ pari a 200). Il flusso dell'eluato era non superiore a 0,6 cm³/minuto per ogni cm² di sezione della colonna e si raccoglievano frazioni corrispondenti a circa 1/20 del volume della colonna per mezzo di un collettore automatico di frazioni ⁽⁴⁶⁾, opportunamente modificato per la raccolta di volumi da 50 a 250 cm³. Terminata la percolazione della soluzione si lavava la colonna con acqua finchè la densità ottica a 260 m μ dell'eluato era inferiore a 0,2/cm³ e si iniziava poi l'eluizione a gradiente con acido formico, secondo le modalità descritte da HURLBERT e collaboratori ⁽⁴⁵⁾. Veniva usato un mescolatore con 25 volumi di acqua, rispetto al volume della colonna, e una riserva con 37 volumi di acido formico 4 N; terminato l'acido formico 4 N, si aggiungevano nella riserva 20 volumi di una miscela 4 N in acido formico e 0,2 M in formiato ammonico, seguito poi da 25 volumi di una miscela 4 N in acido formico e 0,4 M in formiato ammonico e infine da 25 volumi di una miscela 4 N in acido formico e 0,8 M in formiato ammonico.

L'andamento della densità ottica dell'eluato a 260 m μ veniva registrato in modo continuo per mezzo di un semplice dispositivo a doppio raggio applicato allo spettrofotometro Hilger « Uvispek » (⁴⁷). Frazioni appartenenti ad uno stesso picco venivano riunite e liofilizzate. Esse venivano spesso, e sempre nel caso delle frazioni contenenti formato ammonico, concentrate per adsorbimento su carbone attivato (British Drug Houses, Ltd., Poole, Inghilterra) seguito da eluizione con alcool-ammoniaca (⁴⁴), neutralizzazione dell'eluato con acido acetico e rimozione dell'alcool sotto vuoto a 25-30°.

7. - PURIFICAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU CARTA IN GRANDE SCALA.

Con il procedimento descritto nel paragrafo precedente si sono ottenute dieci frazioni principali. La maggior parte di esse erano ancora eterogenee, e si sono dovute ulteriormente purificare per cromatografia su carta.

Le frazioni ottenute per eluizione dei cromatogrammi erano generalmente pure a sufficienza per la identificazione e per le analisi successive. A tale scopo ciascuna frazione ottenuta dalla resina, si liofilizzava, si riprendeva con pochi cm³ di acqua, veniva centrifugata, se necessario, e deposta in forma di sottile banda su carta Whatman 3MM lavata con acido acetico 2 N. I cromatogrammi si sviluppavano con il solvente n. 1; in caso di risoluzione insufficiente, si asciugava la carta e si ripeteva la percolazione. Le singole bande che assorbivano nell'u.v. venivano tagliate dal foglio, lavate con alcool etilico 95% per allontanare l'acetato ammonico e poi eluite con il minimo volume di acqua. Se necessario si ripeteva la purificazione su carta usando il solvente n. 2. Le soluzioni acquose ottenute venivano evaporate sotto vuoto in essiccatore a 5° o conservate gelate a -20°.

8. - METODI DI IDENTIFICAZIONE DEI SINGOLI PRODOTTI.

All'identificazione dei singoli composti si giungeva attraverso i seguenti elementi:

- a) tipo di spettro u.v. a pH acido, neutro ed alcalino;
- b) mobilità su carta con quattro sistemi di solventi, determinate in parallelo a nucleotidi di riferimento;

c) tipo di spettro u.v. a pH acido e alcalino delle basi ottenute mediante idrolisi con acido perclorico;

d) mobilità su carta con due sistemi di solventi delle basi ottenute per idrolisi dei nucleotidi, determinate in parallelo a basi pirimidiniche e puriniche di riferimento;

e) contenuto in ribosio [per i soli nucleotidi purinici (*)] e in fosforo totale e idrolizzabile di soluzioni nelle quali la concentrazione delle basi pirimidiniche o puriniche era in precedenza stabilita spettrofotometricamente;

f) mobilità su carta dei nucleosidi ottenuti mediante idrolisi enzimatica con una nucleotidasi specifica per i 5'-monofosfati;

g) mobilità su carta degli zuccheri liberati dai nucleotidi « coniugati » mediante idrolisi acida blanda;

h) tipo di spettro u.v. dopo aggiunta di cianuro di potassio, o dopo aggiunta di alcool etilico e alcool-deidrogenasi o di glucosio-6-fosfato e glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (per i piridin-nucleotidi).

9. - IDENTIFICAZIONE DEI MONOSI COMPONENTI I POLISACCARIDI MICELIALI.

Per estrazione alcalina del micelio, seguita da precipitazione con alcool etilico, si può isolare un polisaccaride allo stato grezzo.

Il micelio umido (12,6 g, pari a 5,5 g di peso secco) si conservava per una notte a -20° , quindi si sospendeva in idrato potassico acquoso al 10% e si scaldava a 120° per 30 min. Dopo raffreddamento, la sospensione si filtrava su Celite 503, si aggiungevano 3 volumi di alcool etilico e si lasciava per una notte a 5° . Il precipitato che si formava si raccoglieva per centrifugazione per 10 min a $450 \times g$, si discioglieva in acqua e si riprecipitava con 3 volumi di alcool etilico. La sospensione si lasciava una notte a 5° , si raccoglieva il precipitato per centrifugazione per 10 min a $450 \times g$ e si seccava poi sotto vuoto. Una parte di questo precipitato è stata scaldata per 5 ore a 100° con acido solforico N; dopo raffreddamento si è neutralizzato con barite, ed il solfato di bario precipitato si è eliminato per centrifugazione per 10 min a $250 \times g$. Il

(*) E' noto che il legame N-glucosidico dei ribosidi e ribotidi pirimidinici resiste all'idrolisi acida e che quindi in questi composti non si può dosare il ribosio con il metodo convenzionale dell'orcina.

supernatante è stato concentrato ad opportuno volume e cromatografato nei solventi n. 9 e 10.

E' risultata positiva l'analisi qualitativa (spettro di diffrazione ai raggi X) per la chitina, gentilmente eseguita dal prof. A. M. Liquori dell'Università di Bari sullo stesso lotto di micelio usato per l'estrazione dei nucleotidi, il che dimostra la presenza di N-acetilglucosammina nel *Penicillium chrysogenum*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La fig. 1 riporta un diagramma tipico, con dieci picchi, delle sostanze assorbenti a 260 mμ eluite dalla resina. Il recupero, sia del fosforo che della densità ottica è stato praticamente quantitativo.

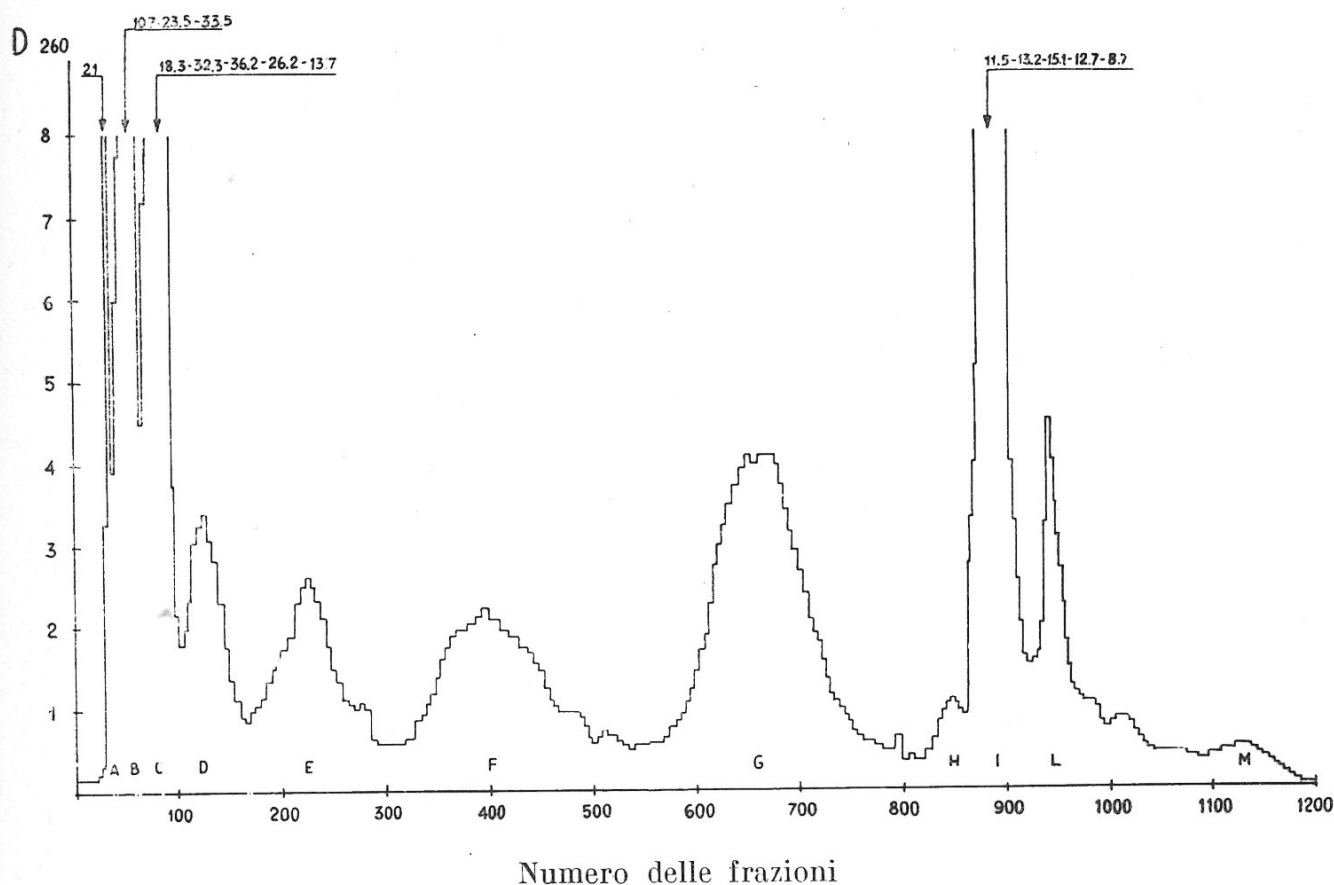


Fig. 1. - Diagramma di eluizione dei nucleotidi di *Penicillium chrysogenum* da resina Dowex-1.

Ad un singolo picco non corrisponde una singola sostanza, e la cromatografia su carta ha messo in evidenza i composti elencati nella Tab. 1.

Con l'eccezione delle sostanze 1, 2, 5, 7, 8, 13, 14, 16, 23, tutti i

Composti contenuti nei picchi ottenuti nella cromatografia di scambio ionico con eluizione a gradiente di un estratto di *Penicillium chrysogenum*.

N.	Picco	Composto
1	A	Uridindifosfogluccosio-X (*)
2	A	Uridindifosfoacetilglucosammina-Y (*)
3	B	Difosfopiridin-nucleotide (DPN)
4	B	Citidin-5'-monofosfato (CMP)
5	B	Acido nicotinico
6	C	Adenosin-5'-monofosfato (AMP)
7	D	Desammido-difosfopiridin-nucleotide (desammido-DPN)
8	D	Riboside della 6-succinoamminopurina
9	E	Trifosfopiridin-nucleotide (TPN)
10	E	Guanosin-5'-monofosfato (GMP)
11	F	Inosin-5'-monofosfato (IMP)
12	F	Uridin-5'-monofosfato (UMP)
13-14	F	Derivati adenosinici non identificati
15	G	Adenosin-5'-difosfato (ADP)
16	G	Ribotide della 6-succinoamminopurina
17	H	Guanosindifosfomannosio (GDPM)
18	I	Uridindifosfoacetilglucosammina (UDPAG)
19	I	Uridindifosfogluccosio (UDPG) (**)
30	I	Uridindifosfogalattosio (UDPG) (**)
21	L	Adenosin-5'-trifosfato (ATP)
22	L	Uridin-5'-difosfato (UDP)
23	L	Derivato adenosinico non identificato
24	M	Guanosin-5'-trifosfato (GTP)
25	M	Uridin-5'-trifosfato (UTP)

(*) Riscontrati solo in una esperienza (v. testo).

(**) I composti 19 e 20 sono entrambi indicati come UDPG in quanto non separabili con i metodi di purificazione usati in questo lavoro. Per la dimostrazione delle relative strutture v. testo.

composti sono nucleotidi noti. La loro identificazione mediante cromatografia su carta ed analisi spettrofotometriche e chimiche, prima e dopo idrolisi acida ed enzimatica, risulta dalle Tabelle 2, 3, 4, 5 e 6.

Nel picco I si è dimostrata la presenza sia di UDP-glucosio che di UDP-galattosio (composti 19 e 20, Tab. 1) in base all'apparizione simultanea di glucosio e di galattosio dopo idrolisi acida. I due nucleotidi « coniugati » hanno la stessa mobilità su carta in tutti i solventi usati.

Il GDPM presente nel picco H (composto 17, Tab. 1) era l'unico composto per il quale non si aveva a disposizione un campione autentico di riferimento. La sua identità con il GDPM di CABIB e LELOIR ⁽⁹⁾ è stata comunque ampiamente dimostrata; non solo in base alla natura dei prodotti ottenuti nella sua idrolisi parziale (Tab. 6), ma anche in base alla posizione occupata da esso nel diagramma di eluizione dalla colonna di resina, corrispondente a quella descritta dai citati Autori, ed intermedia fra l'ADP e l'UDPAG.

Oltre a questi nucleotidi già noti, si sono ritrovati altri nove composti, la cui struttura non corrispondeva ad alcun derivato conosciuto dell'adenina, guanina, ipoxantina, citosina, uracile. Uno di questi (picco B, composto 5, Tab. 1) è stato identificato con l'acido nicotinico, in base al suo spettro di assorbimento ed alla sua mobilità su carta, e tre degli altri composti con il riboside della 6-succinoamminopurina, con il corrispondente ribotide e con il desammido-difosfo-piridin-nucleotide rispettivamente (picco D, composto 8; picco G, composto 16; picco D, composto 7; Tab. 1). Il lavoro relativo all'identificazione di questi tre composti è stato riportato in comunicazioni preliminari ^(48, 49) ed è descritto dettagliatamente nei due lavori seguenti ^(50, 51).

I composti 13 e 14 (picco F, Tab. 1) ed il composto 23 (picco L, Tab. 1) sono stati identificati con derivati dell'adenosina in base alla perfetta corrispondenza dei loro spettri di assorbimento a pH acido, neutro ed alcalino con quelli dell'adenosina. La loro struttura non è stata stabilita, ma è probabile che due di essi possano corrispondere a prodotti di degradazione acida del DPN e del TPN ridotti.

Si sono incontrati anche due derivati uridinici (picco A, composti 1 e 2, Tab. 1); poichè si eluiscono dalla resina nel primo picco, essi devono essere solo debolmente acidi. Contro l'aspettativa, sono risultati invece identici all'uridindifosfoglucosio e all'uridindifosfoacetilglucosamina, i quali però vengono eluiti dalla stessa colonna solo ad alte concentrazioni di formiato ⁽⁴⁵⁾. Cromatografando nuovamente su resina anionica i due derivati uridinici isolati dal picco A, essi sono stati eluiti con una soluzione di acido formico 4 N contenente formiato ammonico 0,2 M, in accordo con la struttura loro assegnata. E' perciò probabile

Confronto delle mobilità cromatografiche dei nucleotidi isolati dal *Penicillium chrysogenum* e delle basi corrispondenti con quelle di composti di riferimento.

Composto (*)	Prima di idrolisi					Composto	Dopo idrolisi	
	Solvente 2 R Adenosina (**)	Solvente 3 R _F	Solvente 4 R _F	Solvente 5 R _F	Solvente 6 R _F		Solvente 5 R _F	Solvente 8 R _F
N. 3	0.22	0.46	0.30	0.61	0.41	N. 3	0.43	0.39
DPN	0.23	0.47	0.31	0.69	0.40	Adenina	0.41	0.40
N. 4	0.38	0.50	0.68	0.80		N. 4	0.71	0.42
CMP	0.37	0.50	0.69	0.86		Citosina	0.72	0.42
N. 6	0.42	0.33	0.26	0.68		N. 6	0.41	0.38
AMP	0.42	0.33	0.27	0.68		Adenina	0.41	0.38
N. 9	0.05	0.32	0.45	0.78	0.35	N. 9	0.44	0.36
TPN	0.06	0.31	0.45	0.83	0.35	Adenina	0.41	0.40
N. 10	0.38	0.31	0.40	0.87		N. 10	0.46	0.21
GMP	0.40	0.32	0.39	0.86		Guanina	0.47	0.21
N. 11	0.38	0.28	0.59	0.79		N. 11	0.63	0.27
IMP	0.40	0.30	0.58	0.80		Ipoxantina	0.6	0.29
N. 12	0.50	0.30	0.70	0.85		N. 12	0.72	0.65
UMP	0.48	0.31	0.71	0.87		Uracile	0.74	0.64
N. 15	0.26	0.40	0.31	0.76		N. 15	0.42	0.37
ADP	0.27	0.41	0.32	0.76		Adenina	0.41	0.40
N. 17 (***)	0.38	0.14	0.50	0.89		N. 17	0.48	0.22
						Guanina	0.47	0.21
N. 18	0.77	0.20	0.65	0.94		N. 18	0.74	0.66
UDPAG	0.77	0.20	0.65	0.95		Uracile	0.74	0.64
N. 19-20	0.66	0.18	0.70	0.92		N. 19-20	0.74	0.64
UDPG	0.67	0.17	0.71	0.93		Uracile	0.74	0.64
N. 21	0.13	0.30	0.30	0.86		N. 21	0.39	0.39
ATP	0.14	0.32	0.31	0.89		Adenina	0.41	0.40
N. 22	0.33	0.19	0.73	0.89		N. 22	0.74	0.67
UDP	0.37	0.20	0.77	0.91		Uracile	0.74	0.65
N. 24	0.28	0.16	0.53	0.92		N. 24	0.47	0.21
GTP	0.29	0.16	0.53	0.93		Guanina	0.47	0.20
N. 25	0.33	0.14	0.83	0.92		N. 25	0.73	0.66
UTP	0.32	0.15	0.83	0.93		Uracile	0.74	0.64

(*) I numeri si riferiscono ai composti elencati nella Tabella 1, le abbreviazioni ai composti di riferimento.

(**) Mobilità relative all'adenosina.

(***) Di questo composto, che corrisponde al GDPM, non si aveva un campione autentico per il confronto.

SPETTRI U.V. (*)

TABELLA 3

Composto (**)	Prima di idrolisi						Composto	Dopo idrolisi			
	λ max.			λ min.				λ max.		λ min.	
	Acido	Neutro	Alcalino	Acido	Neutro	Alcalino		Acido	Alcalino	Acido	Alcalino
N. 3 DPN	258 258	260 259	260 259	237 232	239 232	239 232	N. 3 Adenina	260 260	270 270	230 230	240 235
N. 4 CMP	280 280	271 271	271 271	242 241	250 249	251 249	N. 4 Citosina	276 275	282 280	240 240	250 250
N. 6 AMP	257 257	259 259	259 259	233 230	231 227	231 227	N. 6 Adenina	262 260	270 270	230 : 30	238 235
N. 9 TPN	258 258	259 259	259 259	232 232	232 232	232 231	N. 9 Adenina	264 260	270 270	230 230	238 235
N. 10 GMP	256 256	253 252	260 258	229 228	227 224	233 230	N. 10 Guanina	250 250	273 275	225 225	242 245
N. 11 IMP	250 251	251 251	254 253	226 225	225 225	228 227	N. 11 Ipoxantina	247 250	262 265	< 220 < 220	235 240
N. 12 UMP	262 262	262 262	261 261	231 230	231 230	242 241	N. 12 Uracile	258 260	285 285	228 230	243 240
N. 15 ADP	257 257	259 259	259 259	231 230	228 227	229 227	N. 15 Adenina	262 260	270 270	230 230	238 235
N. 17 GDPM	255 256	253 252	260 258	228 228	226 224	234 230	N. 17 Guanina	250 250	274 275	225 225	242 245
N. 18 UDPAG	262 262	262 262	261 261	230 230	230 230	242 239	N. 18 Uracile	257 260	283 285	231 230	242 240
N. 19-20 UDPG	262 262	262 262	262 261	232 230	232 230	242 239	N. 19-20 Uracile	258 260	283 285	230 230	242 240
N. 21 ATP	257 257	259 259	260 259	230 230	227 227	230 227	N. 21 Adenina	262 260	270 270	230 230	237 235
N. 22 UDP	262 262	262 262	262 261	232 230	232 230	243 239	N. 22 Uracile	257 260	282 285	230 230	242 240
N. 24 GTP	257 256	254 252	258 258	229 228	226 223	232 230	N. 24 Guanina	250 250	274 275	226 225	242 245
N. 25 UTP	261 262	261 262	261 261	231 230	231 230	241 241	N. 25 Uracile	257 260	283 285	230 230	241 240

(*) I dati relativi ai nucleotidi di riferimento sono tratti da Pabst Laboratories, Circular OR-10, (1956), eccezion fatta per quelli dell'IMP che sono stati ottenuti da noi su un campione del commercio, cromatograficamente puro. Per UDPG e UDPAG sono stati scelti gli stessi valori dell'UDP, e per GDPM quelli del GDP. I dati relativi alle basi di riferimento sono tratti da HORCHIKISS ⁽⁵⁴⁾.

(**) I numeri si riferiscono ai composti elencati nella tabella 1, le abbreviazioni ai composti di riferimento.

TABELLA 4

Rapporti molecolari del fosforo totale, del fosforo idrolizzabile e del ribosio, rispetto alla base, dei nucleotidi isolati dal *Penicillium chrysogenum*.

Composto (*)		Mol. P totale Mol. base	Mol. P idrolizzabile Mol. base	Mol. ribosio Mol. base
Numero	Identificato come			
4	CMP	1.15	—	—
12	UMP	1.17	—	—
22	UDP	2.00	0.82	—
25	UTP	2.87	1.56	—
19-20	UDPG	1.86	1.11	—
18	UDPAG	2.23	1.08	—
6	AMP	0.97	—	0.89
15	ADP	1.90	0.95	0.93
21	ATP	2.88	1.65	0.81
11	IMP	0.94	—	0.79
10	GMP	1.02	—	1.05
24	GTP	2.90	1.80	0.97
17	GDPM	1.94	1.01	0.95

(*) I numeri si riferiscono ai composti elencati nella tabella 1, le abbreviazioni ai composti di riferimento.

TABELLA 5

Confronto delle mobilità cromatografiche di nucleosidi di riferimento con quelle dei nucleosidi ottenuti per idrolisi con la 5'-nucleotidasi del liquido seminale di toro dai 5'-monofosfati di nucleotidi isolati dal *Penicillium chrysogenum*.

Composto (*)		Composto di riferimento	Cromatografie dopo incubazione con l'enzima	
Numero	Identificato come		Solvente 2 R _F	Solvente 7 R _F
4	CMP	Citidina	0.64 0.65	0.59 0.59
6	AMP	Adenosina	0.61 0.60	0.66 0.66
10	GMP	Guanosina	0.55 0.55	0.42 0.40
11	IMP	Inosina	0.60 0.60	0.51 0.52
12	UMP	Uridina	0.68 0.68	0.51 0.50

(*) I numeri si riferiscono ai composti elencati nella tabella 1, le abbreviazioni ai composti di riferimento.

TABELLA 6

Confronto delle mobilità cromatografiche di composti di riferimento con quelle dei prodotti ottenuti per idrolisi acida blanda dei nucleotidi coniugati isolati dal *Penicillium chrysogenum*.

Composto (*)	Cromatografie	
	Solvente 9 R _{glucosio} (**)	Solvente 2 R _F
N. 17 (=GDPM)		0.50
Idem, dopo idrolisi	1.11	0.23 0.31 0.63
GDP		0.23
GMP		0.30
Guanina		0.63
Mannosio	1.09	
N. 19-20 (=UDPG)		0.29
Idem, dopo idrolisi	0.91 1.01	0.18 0.30
N. 18 (=UDPAG)		0.44
Idem, dopo idrolisi	1.28	0.18 0.29
UDP		0.19
UMP		0.30
Glucosio	1.00	
Galattosio	0.89	
N-acetilglucosammina	1.29	

(*) I numeri si riferiscono ai composti elencati nella tabella 1, le abbreviazioni ai composti di riferimento.

(**) Mobilità relative al glucosio.

TABELLA 7

Dati cromatografici degli zuccheri ottenuti per idrolisi di polisaccaridi del *Penicillium chrysogenum* e di zuccheri di riferimento.

Composto	Solvente 9 R _F	Solvente 10 R _{glucosio} (*)
Polisaccaridi idrolizzati	0.29 - 0.33 - 0.38	0.87 - 1.02 - 1.25
Galattosio	0.28	0.85
Glucosio	0.33	1.00
Mannosio	0.38	1.25

(*) Mobilità relative al glucosio.

che sia l'uridindifosfoglucosio che l'uridindifosfoacetilglucosammina così identificati, fossero in realtà componenti di complessi labili, degradatisi durante le operazioni di frazionamento sulla prima colonna. Tali prodotti sono stati ritrovati in una sola esperienza, nella quale il micelio era stato estratto con alcool etilico ed è stato impossibile ottenerli in successivi tentativi, condotti sia nelle stesse condizioni, sia dopo vari cambiamenti delle medesime (p. es. l'età del micelio, le temperature di percolazione e di eluizione dalla resina; in questi esperimenti è stato invece trovato un piccolo picco, immediatamente precedente a quello che contiene il DPN ed il CMP, ma contenente un solo composto, caratterizzato da uno spettro di tipo pteridinico).

L'esatta corrispondenza che esiste tra i nucleotidi « coniugati » trovati nel *Penicillium chrysogenum* (guanosindifosfomannosio, uridindifosfogalattosio ed uridindifosfoacetilglucosammina), ed i monosaccaridi costituenti i polisaccaridi di tale muffa [mannosio, glucosio, galattosio ed N-acetilglucosammina (⁵²)] è in accordo con l'ipotesi che i primi siano degli intermedi nella polimerizzazione dei secondi.

Occorre notare il gran numero di derivati uridinici presenti negli estratti di *Penicillium chrysogenum*. Benchè non si abbiano precisi dati quantitativi, risulta chiaramente dai diagrammi di eluizione che, insieme ai derivati dell'adenosina, essi formano un'elevata percentuale dei nucleotidi totali del microrganismo. Una composizione simile è stata trovata per i nucleotidi di tessuti vegetali, che vengono così ad essere distinti dai tessuti animali, in cui predominano i derivati dell'adenosina (⁵³).

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BALLIO A., CASINOVİ C., e SERLUPI-CRESCENZI G. - Biochim. biophys. Acta, 20: 414 (1956); BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - Boll. soc. ital. biol. sper., 33: 1740 (1957).
- (²) CAPUTTO R., LELOIR L. F., CARDINI C. E. e PALADINI A. C. - J. biol. Chem., 184: 333 (1950).
- (³) PARK J. T. - Feder. Proc., 9: 213 (1950).
- (⁴) PARK J. T. e STROMINGER J. L. - Science, 123: 99 (1957).
- (⁵) PARK J. T. - J. biol. Chem., 194: 877, 885, 897 (1952).
- (⁶) BERGKVIST R. e DEUTSCH A. - Acta chem. scand., 7: 1307 (1953); SCHMITZ H., PORTER V. R., HURLBERT R. B. e WHITE D. M. - Cancer Research, 14: 66 (1954); SCHMITZ H., HURLBERT R. B. e POTTER V. R. - J. biol. Chem., 209: 41 (1954).
- (⁷) BADDILEY J. e coll. - J. chem. Soc., 2723 (1954), 4186, 4383 (1956); Biochem. J., 64: 599 (1956); KENNEDY E. P. e WEISS S. B. - J. biol. Chem., 222: 193 (1956); LIEBERMAN I., BERGER L. e GIMENEZ W. T. - Science, 124: 81 (1956).

- (⁸) CABIB E., LELOIR L. F. e CARDINI C. E. - *J. biol. Chem.*, 203: 1055 (1953); DUTTON G. J. e STOREY I. D. E. - *Biochem. J.*, 53: xxxvii (1953), 59: 279 (1953); SMITH E. E. B. e MILLS G. T., *Biochim. biophys. Acta*, 13: 537 (1954); STROMINGER J. L., *Biochim. biophys. Acta*, 17: 283 (1955); PONTIS H. G., *J. biol. Chem.*, 216: 195 (1955); GINSBURG T., STUMPF P. K. e HASSID W. Z., *J. biol. Chem.*, 223: 977 (1956); SMITH E. E. B., MILLS G. T. e HARPER E. M., *Biochim. biophys. Acta*, 23: 662 (1957); *J. gen. Microbiol.*, 16: 426 (1957); CIFONELLI J. A. e DORFMAN A., *J. biol. Chem.*, 228: 547 (1957).
- (⁹) CABIB E. e LELOIR L. F. - *J. biol. Chem.*, 206: 779 (1954); STROMINGER J. L. - *Feder. Proc.*, 13: 307 (1954); DI MARCO A., BORETTI G., MIGLIACCI A., JULITA P. e MINGHETTI A. - *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 33: 1513 (1957).
- (¹⁰) OCHOA S. e coll. - *J. am. chem. Soc.*, 77: 3165 (1955), *Science*, 122: 907 (1955); GRUNBERG-MANAGO M. - *Bull. Soc. Chim. biol.*, 38: 589 (1956); POTTER V. R. e coll. - *Biochim. biophys. Acta*, 20: 439 (1956).
- (¹¹) KAMIN H. e HANDLER P. - *Ann. Rev. Biochem.*, 26: 459 (1957).
- (¹²) KENNEDY E. P. - *Feder. Proc.*, 16: 847 (1957).
- (¹³) CARDINI C. E., LELOIR L. F. e CHIRIBAGA J. - *J. biol. Chem.*, 214: 149 (1955); LELOIR L. F. e CARDINI C. E. - *ibid.*, 214: 157 (1955); BEAN R. C. e HASSID W. Z. - *J. am. chem. Soc.*, 77: 5737 (1955); GANDER J. E., PETERSON W. E. e BOYER P. D. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 60: 259 (1956), 69: 85 (1957); TURNER J. F. - *Biochem. J.*, 67: 450 (1957); CABIB E. e LELOIR L. F. - *J. biol. Chem.*, 231: 259 (1958).
- (¹⁴) GLASER L. e BROWN D. H. - *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 41: 253 (1955); *Biochim. biophys. Acta*, 23: 449 (1957); *J. biol. Chem.*, 228: 729 (1957); LELOIR L. F. e CARDINI C. E. - *J. am. chem. Soc.*, 79: 6340 (1957); ZAMBOTTI V. - *Sci. med. ital. (Ed. Fran.)* V, 611 (1957); GLASER L. - *Biochim. biophys. Acta*, 25: 436 (1957); AMSTRONG J. J., BADDILEY J., BUCHANAN J. G. e CARSS B. - *Nature*, 181: 1693 (1958); MARKOVITZ A., CIFONELLI J. A. e DORFMAN A. - *Biochim. biophys. Acta*, 28: 453 (1958).
- (¹⁵) SANADI D. R., GIBSON D. M., AYENGAR P. e JACOB M. - *J. biol. Chem.*, 218: 505 (1956).
- (¹⁶) KURAHASHI K. e UTTER M. F. - *Feder. Proc.*, 14: 240 (1955); KURAHASHI K., PENNINGTON R. J. e UTTER M. F. - *J. biol. Chem.*, 226: 1059 (1957).
- (¹⁷) LIEBERMAN I. - *J. biol. Chem.*, 223: 327 (1956).
- (¹⁸) CABIB E., LELOIR L. F. e CARDINI C. E. - *J. biol. Chem.*, 203: 1055 (1953); CABIB E. e LELOIR L. F. - *J. biol. Chem.*, 206: 779 (1954); SCHMITZ H. - *Biochem. Z.*, 325: 555 (1954).
- (¹⁹) GREGOIRE J., GREGOIRE J. e LIMOZIN N. - *C. R.*, 244: 140 (1957).
- (²⁰) KITA D. A. e PETERSON W. H. - *J. biol. Chem.*, 203: 816 (1953).
- (²¹) MARKHAM R. - *Biochem. J.*, 36: 790 (1942).
- (²²) SOMOGYI M. - *J. biol. Chem.*, 195: 19 (1952).
- (²³) BERENBLUM I. e CHAIN E. B. - *Biochem. J.*, 32: 295 (1938).
- (²⁴) UMBREIT W. W., BURRIS R. H. e STAUFFER J. F. - *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis p. 191 (1949).
- (²⁵) COLOWICK S., KAPLAN N. O. e CIOTTI M. M. - *J. biol. Chem.*, 191: 447 (1951).
- (²⁶) Pabst Circular OR-40 (1956).
- (²⁷) CHARGAFF E. e DAVIDSON J. N. - *The Nucleic Acids*. Academic Press Inc., New York (1955).
- (²⁸) JOKLIK W. K. - *Biochem. J.*, 66: 333 (1957).
- (²⁹) WHITE T. - *J. chem. Soc.*, 428 (1940).
- (³⁰) BACON J. S. D. e EDELMAN J. - *Biochem. J.*, 48: 114 (1951).
- (³¹) CIFONELLI J. A. e SMITH F. - *Anal. Chem.*, 26: 1132 (1954).
- (³²) HANES C. S. e ISHERWOOD F. A. - *Nature*, 164: 1107 (1949).
- (³³) COSDEN R., GORDON A. H. e MARTIN A. J. P. - *Biochem. J.*, 38: 224 (1944).
- (³⁴) PARTRIDGE S. M. - *Biochem. J.*, 42: 238 (1948).
- (³⁵) BONNICHSEN R. K. - *Acta chem. scand.*, 4: 714 (1950).
- (³⁶) KORNBERG A. - *J. biol. chem.*, 182: 805 (1950).
- (³⁷) MARKHAM R. e SMITH J. D. - *Biochem. J.*, 45: 294 (1949).
- (³⁸) WYATT G. R. - *Biochem. J.*, 48: 584 (1951).
- (³⁹) GARDELL S., HEIKENSJÖLD F. e ROCH-NORLUND A. - *Acta chem. scand.*, 4: 470 (1950); STOFFYN P. J. e JEANLOZ R. W. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 52: 373 (1954).
- (⁴⁰) HEPPEL L. A. e HILMOE R. J. - *J. biol. Chem.*, 188: 665 (1950).

- (⁴¹) PALADINO S., UGOLINI F. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità (edizione inglese), 17: 87 (1954).
 - (⁴²) JARVIS F. G. e JOHNSON M. J. - J. am. chem. Soc., 69: 3010 (1947).
 - (⁴³) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J. - Rend. Ist. sup. Sanità (edizione inglese), 17: 61 (1954).
 - (⁴⁴) CABIB E., LELOIR L. F. e CARDINI C. E. - J. biol. Chem., 203: 1055 (1953).
 - (⁴⁵) HURLBERT R. B., SCHMITZ H., BRUMM A. F. e POTTER V. R. - J. biol. Chem., 209: 23 (1954).
 - (⁴⁶) FRANK M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 17: 835 (1954).
 - (⁴⁷) GUALANDI G. e SERLUPI-CRESCENZI G. - Rend. Ist. sup. Sanità, 20: 105 (1957).
 - (⁴⁸) BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - Nature, 179: 154 (1957).
 - (⁴⁹) SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - Nature, 180: 1203 (1957); BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - Boll. soc. ital. Biol. sper., 33: 1744 (1957).
 - (⁵⁰) BALLIO A. e SERLUPI-CRESCENZI G. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 321 (1961).
 - (⁵¹) SERLUPI-CRESCENZI G. e BALLIO A. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 335 (1961).
 - (⁵²) KAWANO Y. e MASE Y. - J. Fermentation Technol. Japan, 27: 231 (1949); MORITA E. - J. chem. Soc. Japan, 73: 909 (1952); MARTIN S. M. e ADAMS G. A. - Canad. J. Microbiol., 2: 715 (1956).
 - (⁵³) BERGKVIST R. - Acta chem. Scand., 10: 1303 (1956); 11: 1457 (1957).
 - (⁵⁴) HOTCHKISS R. D. - J. biol. Chem., 175: 315 (1948).
-