32. A. BALLIO, E. BRANDL, E. B. CHAIN, F. DENTICE di ACCADIA, F. NAVAZIO e C. ROSSI — **Il destino del solfato ^{35}S e della metionina ^{35}S in un ceppo di *Penicillium chrysogenum* alto produttore di penicillina e in un ceppo mutante non produttore sviluppati in un semplice terreno di sostituzione.** (*)

Riassunto. — 1) Mediante radiocromatografie qualitative e quantitative, e in qualche caso mediante cromatografia di scambio ionico, è stato seguito il destino del solfato di sodio ^{35}S e della metionina ^{35}S nel micelio e nel filtrato di colture di *Penicillium chrysogenum* sviluppato in un semplice terreno di sostituzione. E' stato esaminato un ceppo alto produttore di penicillina ed un mutante non produttore. Il terreno era costituito da arginina come unica fonte di azoto, da lattosio e da sali inorganici.

2) L'esame dei filtrati di coltura ha dato i seguenti risultati:

a) In presenza di fenilacetato e con solfato di sodio come fonte di zolfo, l'unico composto solforato evidenziabile, oltre al solfato inorganico, era rappresentato dalla benzilpenicillina.

b) In presenza di fenilacetato e con metionina quale fonte di zolfo compariva accanto alla benzilpenicillina un altro metabolita solforato estraibile con acetato di butile; esso è risultato identico all'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico.

c) In assenza di fenilacetato viene prodotta pochissima penicillina sia con solfato di sodio che con metionina quali fonti di zolfo. Compare invece, impiegando quali fonti di zolfo il solfato di sodio o la metionina, un composto biologicamente inattivo, estraibile con acetato di butile e stabile in condizioni di pH nelle quali la benzilpenicillina viene distrutta. La sua struttura è ancora sconosciuta, ma è probabile che esso sia correlato con i processi della biosintesi della penicillina, giacchè è prodotto solamente dal ceppo produttore in assenza di fenilacetato. Sia con solfato di sodio che con metionina quali fonti di zolfo, il filtrato di coltura estratto con acetato di butile contiene un metabolita solforato che è stato identificato come acido 6-amminopenicillanico.

d) Il filtrato di coltura del ceppo non produttore sviluppato con solfato di sodio come fonte di zolfo non contiene quantità apprezzabili di metaboliti solforati. Se la fonte di zolfo è costituita da metionina, si forma l'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico.

(*) Questo lavoro, completato nel febbraio 1959, è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 314 (1959).

3) Gli estratti etanolici dei miceli del ceppo produttore e di quello non produttore, sviluppati tanto in presenza quanto in assenza di fenilacetato e indipendentemente dalla natura della fonte di zolfo, contengono i seguenti metaboliti solforati, elencati in ordine decrescente di quantità: solforilcolina (0,25-0,50 per cento del peso secco miceliale), glutatione (circa 0,15 per cento del peso secco miceliale), cistina e metionina. Gli autolizzati dei miceli, in conseguenza della degradazione autolitica delle proteine, contengono quantità maggiori di metionina e cistina rispetto agli estratti etanolici.

4) Le radiocromatografie quantitative dimostrano che le uniche differenze veramente significative nella distribuzione dei metaboliti solforati presenti nei miceli del ceppo produttore e del ceppo non produttore sono rappresentate da un contenuto maggiore di solforilcolina e minore di metionina nel ceppo produttore.

5) Nel terreno di arginina la solforilcolina può essere utilizzata come unica fonte di zolfo per la produzione di penicillina e dà risultati perfettamente paragonabili a quelli che si ottengono usando il solfato di sodio. Pur variando le condizioni sperimentali non è stato mai possibile mettere in evidenza una sia pur minima attività solfatasica capace di idrolizzare la solforicolina; sembra perciò che la solforilcolina possa essere metabolizzata senza previa idrolisi.

6) Gli estratti miceliali sono capaci di sintetizzare enzimaticamente piccole quantità di solforilcolina da cloruro di colina e solfato inorganico, in presenza di ioni magnesio e di adenosin-5'-trifosfato.

Summary. — 1) The fate of ^{35}S-sulphate and ^{35}S-methionine in the mycelium and in the culture filtrates of *Penicillium chrysogenum* has been followed in a simple replacement medium by means of qualitative and quantitative radiochromatography, and in some cases, by ion exchange chromatography, using a high yielding penicillin producing strain and a non-producing u. v. mutant. The replacement medium consisted of arginine as the sole nitrogen source, lactose and inorganic salts.

2) In the culture filtrates the following results were obtained:

a) In the presence of phenylacetate, with sodium sulphate as sulphur source, the only sulphur containing compound detectable, apart from inorganic sulphate, was benzylpenicillin.

b) In the presence of phenylacetate, and with methionine as sulphur source, a butylacetate extractable sulphur containing metabolite

appeared in addition to benzylpenicillin which was identified as 2-hydroxy-4-methylmercaptobutyric acid.

e) In the absence of phenylacetate very little penicillin was formed, either with sodium sulphate or with methionine as sulphur sources. With either sodium sulphate or methionine as sulphur source, a biologically inactive butylacetate extractable substance, stable towards acid and alkali under conditions where benzylpenicillin is destroyed, was detected. Its structure is as yet unknown, but as the product is only formed by the penicillin producing strain in the absence of the benzyl side chain precursor, it is thought likely to be connected with the processes of the biosynthesis of penicillin. 2-Hydroxy-4-methylmercaptobutyric acid was also formed in the absence of phenylacetate with methionine as sulphur source.

With either sulphate or methionine as sulphur source, the butylacetate extracted culture medium contained a radioactive metabolite which was identified as 6-aminopenicillanic acid.

d) The culture filtrate of the non-producing strain, grown with sodium sulphate as sulphur source, contained no major sulphur metabolites. With methionine as sulphur source, 2-hydroxy-4-methylmercaptobutyric acid was formed.

3) Ethanolic extracts of the mycelia of both the producing and non-producing strains, whether grown in the presence or the absence of phenylacetate and with sodium sulphate or methionine as sulphur source, contained the following sulphur metabolites, in order of decreasing quantities: sulphurylcholine (0.25 to 0.50 per cent of mycelial dry weight), glutathione (about 0.15 per cent of mycelial dry weight), cystine and methionine. Autolysates of the mycelia, owing to autolytic breakdown of proteins, contained more methionine and cystine than were present in the ethanolic extracts.

4) Quantitative radiochromatography showed that the only significant and consistent quantitative difference in the distribution of sulphur metabolites in the mycelia of the producing and non-producing strains were that the former contained more sulphurylcholine and less methionine than the latter.

5) In the arginine replacement medium sulphurylcholine is utilized as sulphur source for penicillin production giving the same production rates and final titers as did sodium sulphate. No trace of a sulphatase, hydrolysing sulphurylcholine into its components, has been detected

under any conditions tested; it would therefore appear that suphurylcholine can be metabolised without prior hydrolysis.

6) Sulphurylcholine has been synthesized enzymically in small amounts by mycelial extracts from choline chloride and inorganic sulphate in the presence of magnesium ions and adenosine-5'-triphosphate.

INTRODUZIONE

In un precedente lavoro ([1]) è stato descritto un terreno di sostituzione semplice, di composizione chimica ben definita e capace di dare elevate rese di penicillina; esso è costituito da arginina come unica fonte di azoto, da solfato inorganico o metionina come fonte di zolfo, da lattosio e da sali inorganici.

Lo scopo di questo lavoro era di seguire qualitativamente e quantitativamente in questo terreno il destino del solfato ^{35}S e della metionina ^{35}S sia nel micelio che nel filtrato di coltura di un ceppo alto produttore di penicillina, tanto in presenza che in assenza di acido fenilacetico, che è il precursore della catena laterale benzilica, e di confrontare il metabolismo di questo ceppo con quello di un mutante non produttore.

MATERIALI E METODI

Reattivi e prodotti.

Quando non venga specificato altrimenti, tutti i prodotti erano puri per analisi della C. Erba, Milano.

La solforilcolina era stata sintetizzata da cloruro di colina e acido solforico con il metodo di Schmidt e Wagner ([2]); dopo varie cristallizzazioni dall'alcool etilico il composto era cromatograficamente puro. Il cloruro di colina, il rodizonato sodico,il cloruro di palladio e il nitroprussiato sodico erano forniti da Merck, Germania, l'adenosin-5'-trifosfato da Sigma, U.S.A., il solfato sodico ^{35}S (carrier-free) e la DL-metionina ^{35}S (26.2 mc/mM) dal Radiochemical Centre, Amersham, Inghilterra, la biotina, la L-cisteina, la L-cistina, la DL-metionina e il glutatione da Hoffmann-La Roche, Svizzera, l'acido DL-2-ossi-4-metilmercaptobutirrico dalla California Corporation for Biochemical Research, U.S.A. L'acido formico usato per la cromatografia su carta era della General Chemical Company, U.S.A. (87-90%, tipo Baker e Adamson) e il butanolo secondario era della British Drug Houses Ltd., Inghilterra. Gli scam-

biatori di ioni Dowex erano forniti dalla Fluka, Svizzera. La resina Dowex-1 × 2 (200-400 mesh) si preparava in forma formiato secondo il procedimento di HURLBERT e collaboratori ([3]); la resina Dowex-50 × 4 (200-400 mesh) si preparava nella forma H^+ secondo il procedimento di MOORE e STEIN ([4]). La Celite 503, fornita da Light & Co. Ltd., Inghilterra, si lavava con un forte volume di acido cloridrico 3 N, poi con acqua distillata fino ad eliminazione degli ioni cloruro ed infine si seccava a 105°. L'ovomucoide si preparava con il metodo di LINEWEAVER e MURRAY ([5]). Il peptone per batteriologia, l'estratto di carne e l'agar erano forniti dalla ditta Costantino, Milano.

CEPPI.

Sono stati usati i seguenti ceppi di *Penicillium chrysogenum* Thom: un sottoisolamento (51-20 c) del ceppo produttore di penicillina 51-20 Wis, e un ceppo mutante non produttore (222) ottenuto in questo laboratorio dal Prof. G. Sermonti con un singolo passo genetico dopo trattamento u. v. del ceppo 51-20 c. Il mutante ha un richiesta assoluta per la biotina.

TERRENI DI COLTURA.

a) *Terreno sporulante.* — Si tratta del terreno descritto da CAMICI, SERMONTI e CHAIN ([6]), nel quale però si è sostituita la farina di mais con orzo.

b) *Terreno di semina.* — E' costituito da corn-steep liquor (50% di solidi) 8% e destrina 6%. Il pH si portava a 5,4 con idrato sodico 4%.

c) *Terreno di sostituzione.* — E' stato usato il terreno di arginina-lattosio descritto da BRANDL, CARILLI e CHAIN ([1]). In esperienze eseguite in presenza di acido fenilacetico, questo veniva aggiunto in quantità del 0,1% (sotto forma di sale sodico) ogni 24 ore, a cominciare dalla 24a ora. In tutte le esperienze eseguite con il ceppo 222, il terreno si addizionava di 7 μg/l di biotina.

Il solfato sodico ^{35}S si aggiungeva al terreno di fermentazione nella concentrazione di 3,5-8,5 millicurie per 100 cm^3 di terreno che già conteneva il 0,1% di solfato sodico. Nel caso di esperienze ove la sola fonte di zolfo era rappresentata dalla metionina, si diluiva la metionina ^{35}S con metionina ^{32}S in modo tale che l'aggiunta di 3 millicurie per 100 cm^3 di terreno corrispondevano ad una concentrazione finale del 0,1% dell'amminoacido.

Allestimento delle colture.

La maggior parte delle esperienze venne condotta in beute da 300 o 500 cm^3 contenenti rispettivamente 36 o 60 cm^3 di terreno. Le colture si incubavano a 25° su shaker rotatorio (7) a 220 r.p.m. Le beute di semina, inoculate con 0,1 cm^3, si incubavano 48 ore; il micelio si raccoglieva su un filtro sterile a setto poroso, si lavava con acqua sterile (tre volte con un volume uguale a quello del filtrato) e si trasferiva poi con una spatola sterile di acciaio inossidabile in una beuta contenente un volume di terreno di sostituzione uguale a quello del terreno di semina da cui proveniva il micelio.

Prelevamento dei campioni.

Ogni 24 ore, a cominciare dalla 24a ora, si prelevava un campione della fermentazione. Con una pipetta sterile si aspiravano 5 cm^3 di brodocultura e si filtravano su un piccolo Buchner. Il filtrato serviva per la determinazione del lattosio, del pH, della penicillina e della radioattività; il micelio, dopo lavaggio con circa 10 cm^3 di cloruro sodico 0,9%, si asciugava sul filtro quanto più possibile e si conservava a —20°.

Estrazioni con solventi.

Da ogni campione di terreno filtrato si prelevavano esattamente 2 cm^3, si raffreddavano a 3°, si portavano a pH 2 con acido fosforico 5 M e si dibattevano a 3° in un piccolo imbuto separatore con 4 cm^3 di acetato di butile normale freddo. La fase organica si dibatteva poi con 2 cm^3 di tampone di fosfati 0,1 M, pH 7,2. Dopo l'estrazione, il terreno acidificato si neutralizzava con idrato sodico 2,5 N. Di ogni frazione si eseguivano subito le misure della radioattività. Sul tampone inoltre si eseguiva il dosaggio della penicillina e la radiocromatografia, e sul terreno estratto con acetato di butile si effettuava pure la radiocromatografia. La frazione di acetato di butile aveva sempre una radioattività assai bassa dopo l'estrazione con tampone.

Estratti miceliali.

Il micelio raccolto per filtrazione e conservato 24 ore a —20° si divideva rapidamente in due parti circa eguali, ciascuna delle quali si pesava su bilancia analitica.

a) *Estratti alcoolici.* — Una delle due porzioni si sospendeva immediatamente in 10 volte il suo peso di alcool etilico 85% e si bolliva dolcemente per 10 minuti agitando continuamente. Dopo raffreddamento la sospensione si centrifugava ed il residuo insolubile si estraeva nuovamente nelle stesse condizioni, ma usando alcool 80%. I due estratti alcoolici si riunivano, si concentravano sotto una lampada a luce infrarossa o sotto vuoto in evaporatore rotante ([8]), finchè l'alcool era completamente evaporato. Il residuo si portava con acqua ad un volume corrispondente a 10 cm^3 per g (peso umido) di micelio usato per l'estrazione e la soluzione così ottenuta si usava per la misura della radioattività e per i radiocromatogrammi. Questa soluzione verrà indicata come « estratto alcoolico ».

b) *Autolisati.* — La seconda porzione pesata di micelio congelato si sospendeva in 3-5 volte il suo peso di acqua, si aggiungevano poche gocce di toluolo e la sospensione si conservava 72 ore a temperatura ambiente agitando di tanto in tanto. La soluzione ottenuta dopo filtrazione si portava con acqua ad un volume corrispondente a 10 cm^3 per g (peso umido) di micelio usato per l'autolisi e si usava per le misure di radioattività e per i radiocromatogrammi. Questa soluzione verrà indicata come « autolisato ».

Metodi analitici.

a) *Chimici.* — Il lattosio si dosava con il metodo di Somogyi ([9]).

b) *Microbiologici.* — Le penicilline si dosavano biologicamente su piastra con il metodo di Humphrey e Lightbown ([10]), leggermente modificato dalla D.ssa M. Francesca Cancellieri-Mastropietro di questo laboratorio. L'organismo usato era il *Bacillus subtilis*, ceppo B 10 della collezione di questo laboratorio, e il terreno conteneva 5 g di peptone, 1,5 g di estratto di carne, 1 g di glucosio e 20 g di agar per 1000 cm^3 di acqua, con un pH di 7,0. Come standard si usava benzilpenicillina sodica pura.

Le « bioautografie » dei cromatogrammi della penicillina estraibile o dell'acido 6-amminopenicillanico [quest'ultimo dopo trasformazione in benzilpenicillina mediante fenilacetilazione con cloruro di fenilacetile ([11])] si eseguivano incubando le strisce di carta una notte a 30° su piastra di agar (40 × 40 cm) seminata con *Bacillus subtilis*, ceppo B 10 della nostra collezione. Il terreno agarizzato era lo stesso usato per il dosag-

gio biologico. Le « bioautografie » venivano fotografate dalla piastra per contatto diretto.

c) *Cromatografici.* — Sono stati usati i seguenti sistemi di solventi per la cromatografia su carta:

N. 1: alcool butilico secondario - acido formico - acqua (75: 15,5: 14,5).
N. 2: alcool propilico normale - acqua (70:30).
N. 3: alcool butilico normale - alcool etilico - acqua (40: 10: 50, fase superiore).
N. 4: acetato ammonico M, pH 3,8 - alcool etilico (30: 75).
N. 5: acetato ammonico M, pH 7,5 - alcool etilico (30: 75).
N. 6: acido isobutirrico - ammoniaca N (100: 60).
N. 7: alcool butilico normale - alcool etilico - acido cloridrico N (40: 11: 19).
N. 8: alcool butilico normale saturato con acqua - acido propionico (95: 5).

Si è sempre usato lo sviluppo discendente con carta Whatman n. 1, Tranne che per il solvente n. 3, che si usava a 3°, lo sviluppo era sempre eseguito a temperatura ambiente.

I composti solforati di riferimento venivano rivelati sui cromatogrammi con i seguenti reattivi: la solforilcolina con vapori di iodio a temperatura ambiente, l'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico immergendo la carta in un reattivo di iodopalladato ([12]), gli amminoacidi con soluzione di ninidrina in alcool butilico normale ([13]) (nel caso della cistina e del glutatione anche immergendo la carta in un reattivo di nitroprussiato e cianuro ([12])), il solfato inorganico con solfuro di bario seguito da rodizonato sodico ([14]).

La preparazione delle resine scambiatrici di ioni è descritta nel paragrafo « Reattivi e prodotti ». Il frazionamento di un estratto alcoolico ottenuto da micelio del ceppo produttore di penicillina sviluppato in presenza di fenilacetato e con solfato quale fonte di zolfo è stato eseguito nel modo seguente. Si estraevano con alcool etilico 4 g di micelio umido, la soluzione alcoolica veniva evaporata sotto vuoto, poi portata a 4 cm^3 con acqua (la radioattività totale della soluzione corrispondeva a 4.500.000 cpm) e infine percolata su una colonna di Dowex-1 formiato (diametro 5 mm, altezza 85 mm). Dopo aver lavato la colonna con 10 cm^3 di acqua, si iniziava l'eluizione con un gradiente lineare di ione formiato. Il gradiente era dato da 50 cm^3 di acido formico nella riserva e 50 cm^3 di acqua nel mescolatore, seguiti da 50 cm^3 di una miscela in parti uguali di acido formico 8 N e formiato di ammonio 1,6 M nella riserva e 50 cm^3 di acido

formico 4 N nel mescolatore. Il percolato ed il lavaggio con acqua si passavano su una colonna di Dowex-50 H^+ (stesse dimensioni della precedente), che si lavava poi con 10 cm^3 di acqua. Si iniziava quindi l'eluizione con un gradiente lineare di acido cloridrico, ottenuto usando 50 cm^3 di acido cloridrico nella riserva e 50 cm^3 di acqua nel mescolatore, seguiti da 50 cm^3 di acido cloridrico 5 N nella riserva e 50 cm^3 di acido cloridrico N nel mescolatore.

Lo stesso procedimento si applicava al frazionamento di 5 cm^3 di terreno di coltura del ceppo produttore di penicillina sviluppato in assenza di fenilacetato, con solfato quale fonte di zolfo (la radioattività totale corrispondeva a 7.500.000 cpm).

d) *Elettroforetici.* — Le elettroforesi su carta sono state eseguite con un'apparecchiatura simile a quella descritta da Markham e Smith ([15]) usando carta Whatman n. 1, tampone di citrato 0,1 M a pH 5,5 e un grediente di potenziale di 25 V/cm.

e) *Radioattivi.* — Le misure quantitative della radioattività sono state eseguite ogni 24 ore:

1. Sul filtrato del terreno di coltura.
2. Sull'autolisato e sull'estratto alcoolico miceliale.
3. Sul tampone proveniente dall'estratto in acetato di butile.
4. Sul terreno di coltura dopo estrazione con acetato di butile.
5. Sulle singole frazioni raccolte dagli scambiatori di ioni.

La radioattività delle soluzioni da 1 a 4 si misurava ponendo una appropriata quantità (da 10 a 50 µl) esattamente misurata con una siringa Agla su strisce di carta Whatman n. 1; dopo aver seccato con aria fredda si misurava la radioattività con un contatore a finestra. Il diametro della macchia applicata alla carta era sempre inferiore a 5 mm. In alcuni casi la soluzione doveva essere diluita 10 volte. La radioattività delle frazioni raccolte dagli scambiatori di ioni si misurava su scodellini, dopo essiccamento sotto la lampada a luce infrarossa. Per il confronto tra i valori della radioattività misurati su carta e quelli misurati su scodellini si applicavano appropriati fattori di conversione.

I radiocromatogrammi venivano misurati quantitativamente con la tecnica descritta da Frank, Chain, Pocchiari e Rossi ([16]).

Tutti i dati rappresentano percentuali della radioattività totale aggiunta al terreno di coltura all'inizio della fermentazione; essi sono corretti per il decadimento che ha luogo durante le singole esperienze.

Metodi enzimatici.

Gli estratti di *P. chrysogenum* 51-20 c si preparavano triturando il micelio lavato con Celite, secondo il procedimento descritto in un precedente lavoro ([17]). Per ridurre l'elevata attività proteolitica dell'estratto ([18]) si aggiungevano, prima del trattamento con Celite, 50 mg di ovomucoide per ogni grammo di micelio umido e le cellule rotte si risospendevano in acqua o in adatti tamponi (10 ml per g di micelio secco).

Le esperienze tendenti a mettere in evidenza l'idrolisi enzimatica della solforilcolina si eseguivano nel modo seguente. Le cellule trattate con Celite si sospendevano in tampone di veronal 0,1 M a pH 7 o in acqua distillata. 0,5 cm^3 di estratto (sia prima che dopo dialisi contro lo stesso tampone o contro acqua) si incubavano a 25° e a 37° con 0,25 cm^3 di una soluzione di solforilcolina al 15% in presenza di cloroformio (0,02 cm^3). Per svelare la liberazione del solfato inorganico si sono impiegati due metodi: cioè si aggiungeva cloruro di bario al filtrato tricloroacetico e si osservava l'eventuale formazione di precipitato, oppure si seguiva il viraggio di colore del bleu di bromofenolo aggiunto alla miscela di incubazione.

La sintesi enzimatica della solforilcolina veniva studiata incubando cloruro di colina (40 μM), solfato sodico (20 μM, 10 μcurie), adenosin-5'-trifosfato (10 μM), cloruro di magnesio (10 μM), estratto di *P. chrysogenum* (1,5 cm^3) e tampone di fosfati pH 7,4 (200 μM) in un volume finale di 2,5 cm^3 a 30° per 90 minuti. I filtrati tricloroacetici si esaminavano poi mediante elettroforesi e mediante cromatografia con il solvente n. 1 in parallelo a composti di riferimento.

RISULTATI

1) Produzione di penicillina nel terreno di sostituzione arginina-lattosio.

I titoli di penicillina ottenuti con il ceppo produttore nel terreno di sostituzione, contenente solfato inorganico come fonte di zolfo e fenilacetato, erano in ottimo accordo con quelli dati da Brandl, Carilli e Chain nel caso del 'micelio lavato' ([1]). L'effetto della concentrazione del solfato inorganico sulla produzione di penicillina nelle condizioni suddette è mostrato nella fig. 1. La concentrazione di solfato sodico prescelta per le fermentazioni era di 1 mg per cm^3, quindi ben superiore

alla concentrazione minima capace di dare l'optimum di produzione di penicillina. L'utilizzazione del lattosio e la produzione di penicillina sono pure stati determinati in esperienze eseguite con lo stesso ceppo sviluppato invece con metionina come fonte di zolfo, sia in presenza che in assenza di fenilacetato. Sono stati anche determinati gli stessi dati nel

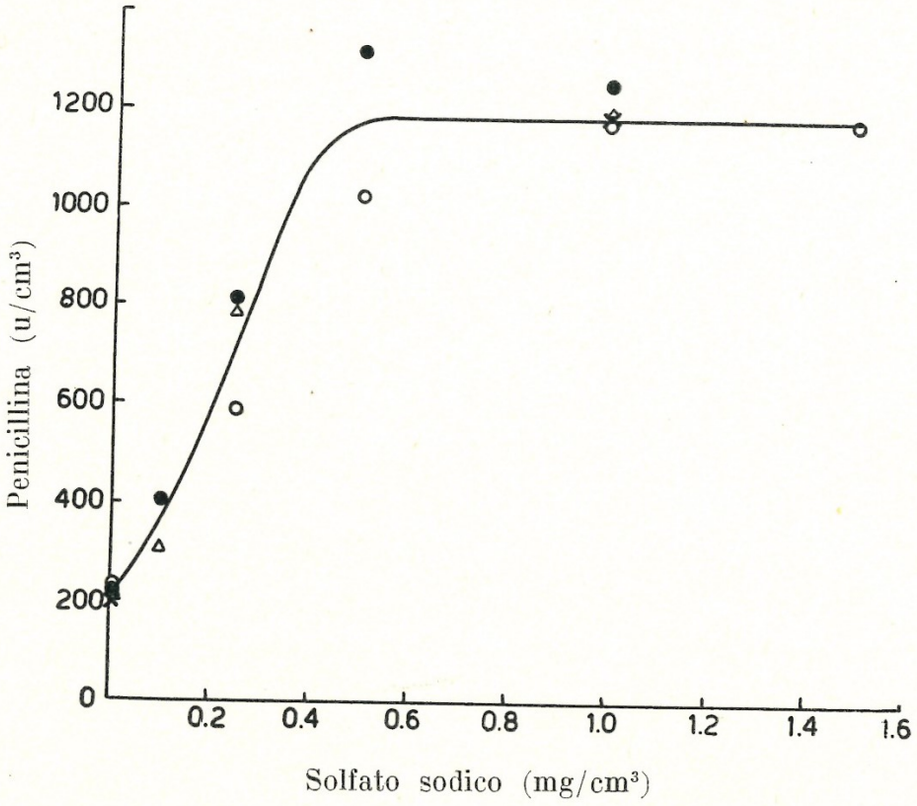


Fig. 1. - Effetto della concentrazione del solfato sodico sulla produzione di penicillina nel terreno di sostituzione di arginina. •, o, x, Δ, si riferiscono a risultati di esperienze diverse.

caso del ceppo non produttore di penicillina, sia con solfato inorganico che con metionina come fonti di zolfo.

La fig. 2 mostra il decorso dell'utilizzazione del lattosio e della produzione di penicillina nel caso del ceppo produttore in assenza di fenilacetato e del ceppo non produttore in presenza di fenilacetato, entrambi sviluppati con solfato come fonte di zolfo.

La fig. 3 mostra il decorso dell'utilizzazione del lattosio e della produzione di penicillina nel caso del ceppo produttore in presenza di fenilacetato e con metionina quale fonte di zolfo. L'utilizzazione del lattosio è invariata nel caso del ceppo produttore sviluppato con metionina quale fonte di zolfo, ma in assenza di fenilacetato. Non si è notata differenza nell'utilizzazione del lattosio tra ceppo produttore e non produttore.

In assenza di fenilacetato con solfato o con metionina quali fonti di zolfo si producono quantità di penicillina non superiori a 100 unità

dopo 72 ore e spesso anche inferiori; ciò significa che l'arginina non fornisce precursori per la catena laterale.

Considerando la quantità elevata di solforilcolina presente nel micelio di *P. chrysogenum* è stata studiata l'utilizzazione di questo composto quale fonte di zolfo per la produzione di penicillina nel terreno di

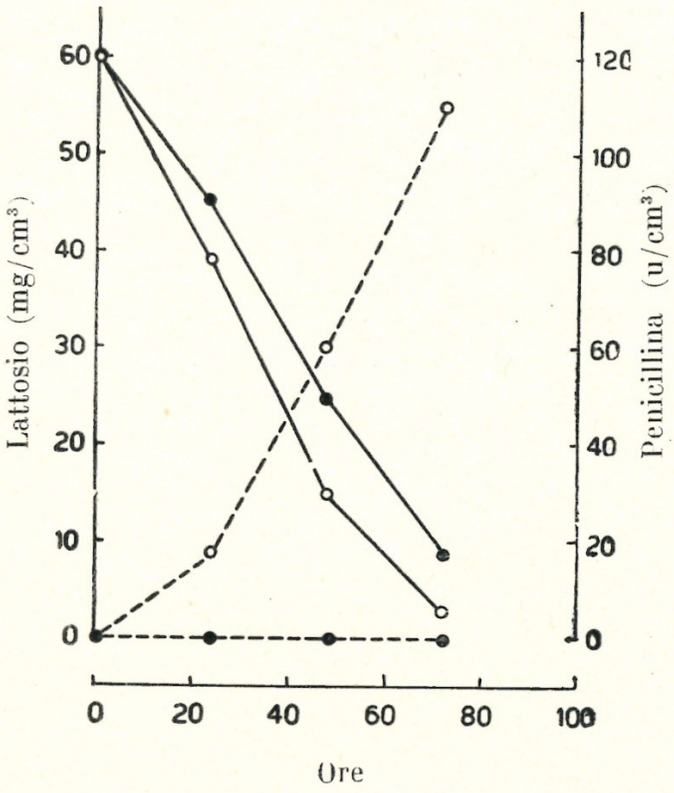


Fig. 2. - Utilizzazione del lattosio e produzione di penicillina nel terreno di sostituzione di arginina, con solfato sodico quale fonte di zolfo.
Linee intere: lattosio. Linee tratteggiate: penicillina; •, ceppo non produttore di penicillina; o, ceppo produttore di penicillina in assenza di fenilacetato.

sostituzione. I risultati sono riportati nella fig. 4. L'andamento della produzione di penicillina ed i titoli finali non sono apprezzabilmente differenti nei due casi.

2) Quadro qualitativo del metabolismo solforato.

Sono stati eseguiti radiocromatogrammi degli estratti alcoolici e degli autolisati dei miceli, dei terreni di coltura (prima e dopo estrazione con acetato di butile), dei tamponi provenienti dagli estratti in acetato di butile, usando sia un ceppo produttore di penicillina sviluppato in presenza e in assenza di fenilacetato, sia un mutante non produttore sviluppato in presenza di fenilacetato. Le fonti di zolfo erano solfato inorganico o metionina, entrambi marcati con ^{35}S.

Inoltre sono state eseguite cromatografie con scambiatori di ioni di un estratto alcoolico del ceppo produttore sviluppato in presenza di fenilacetato e con solfato inorganico quale fonte di zolfo, e di un terreno

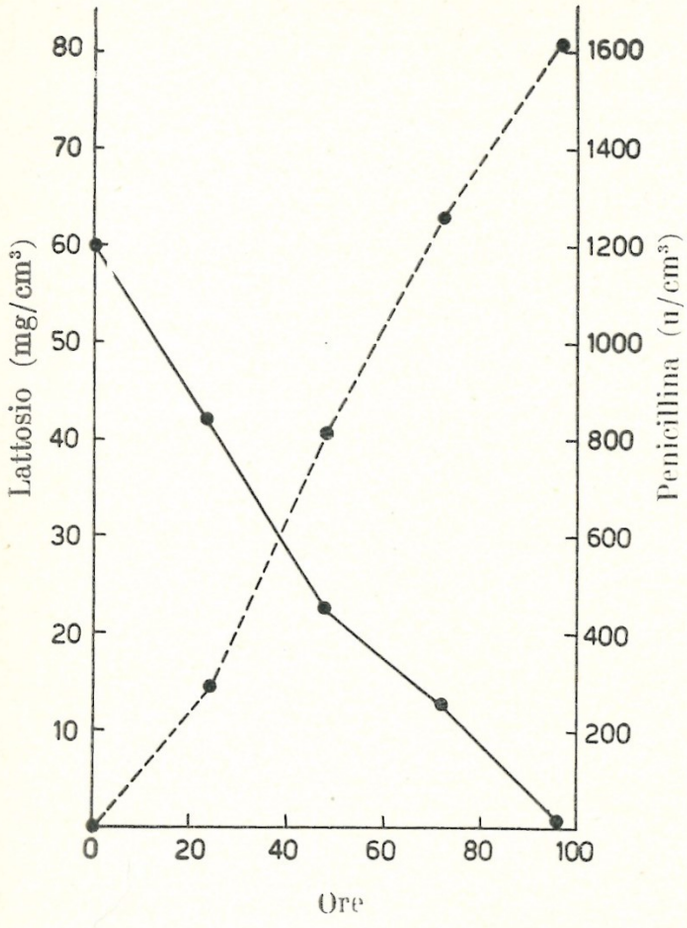


Fig. 3. - Utilizzazione del lattosio e produzione di penicillina con il ceppo produttore di penicillina nel terreno di sostituzione di arginina, con metionina quale fonte di zolfo ed in presenza di fenilacetato.
Linea intera: lattosio. Linea tratteggiata: penicillina.

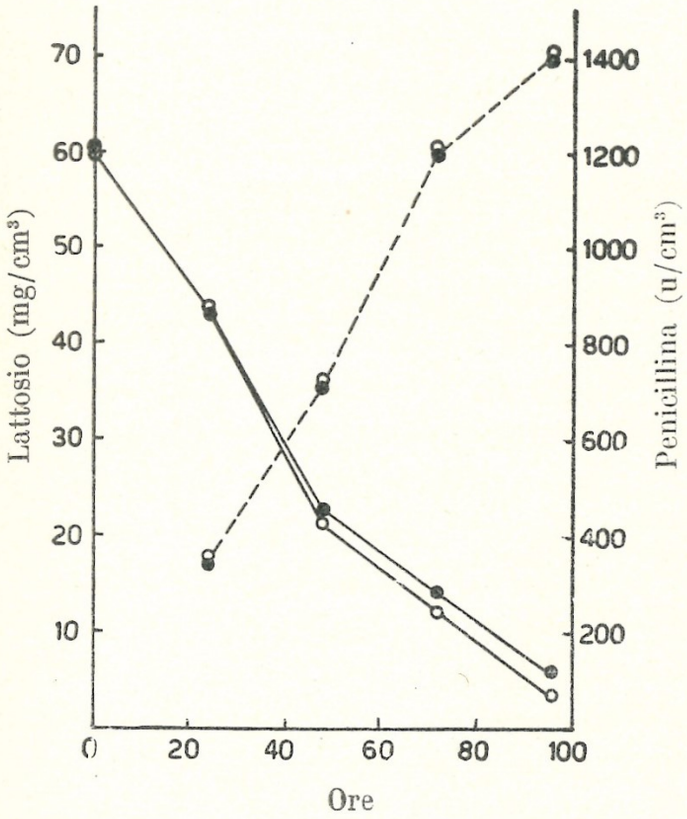


Fig. 4. - Confronto fra solforilcolina e solfato sodico quali fonti di zolfo per la produzione di penicillina nel terreno di sostituzione di arginina con il ceppo produttore di penicillina.
Linee intere: lattosio. Linee tratteggiate: penicillina •, solforilcolina (1 mg/cm³); o, solfato sodico (1 mg/cm³)

di coltura del ceppo produttore sviluppato in assenza di fenilacetato e con solfato inorganico quale fonte di zolfo.

A.) *Estratti alcoolici e autolisati.* — Non si sono osservate differenze qualitative nel quadro dei metaboliti solforati presenti negli estratti alcoolici e negli autolisati dei miceli del ceppo produttore e del ceppo non produttore, indipendentemente se lo sviluppo avveniva in presenza o in assenza di fenilacetato e con solfato o con metionina quali fonti di zolfo. I radiocromatogrammi sviluppati con il solvente n. 1 mostravano sempre tre macchie principali (fig. 5): una molto forte quasi immobile, dovuta ad una miscela di solfato inorganico, cistina e glutatione (che talvolta si risolveva in due macchie e che si poteva meglio separare mediante cromatografia di scambio ionico), una seconda forte con R_F 0,22 che veniva identificata come solforilcolina, ed una terza con R_F 0,60, che veniva identificata come metionina. Rispetto agli estratti alcoolici gli autolisati contenevano quantità maggiori di cistina e metionina, dovute evidentemente alla degradazione autolitica delle proteine.

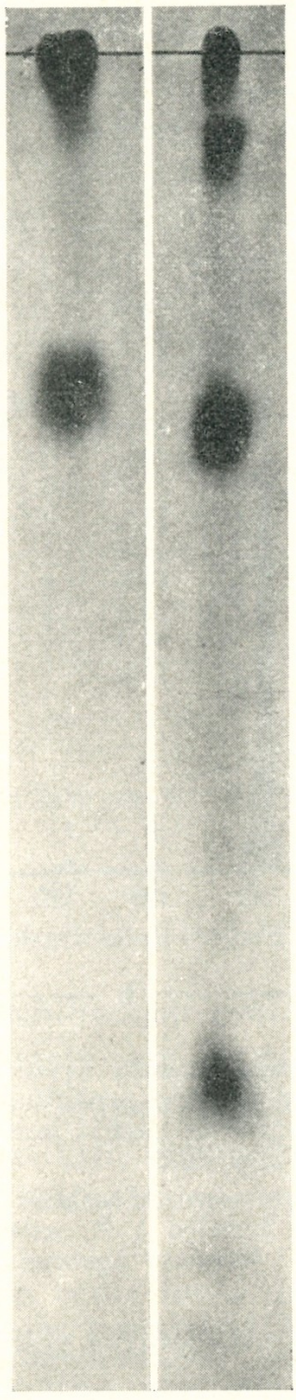


Fig. 5. - Radiocromatogramma di un estratto alcoolico e di un autolisato di micelio (in presenza di fenilacetato e con $Na_2\ ^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo) sviluppato con il solvente 1. Sinistra, estratto alcoolico; destra, autolisato.

Le cromatografie di scambio ionico, eseguite su estratti alcoolici di micelio sviluppato in presenza di fenilacetato e con solfato inorganico quale fonte di zolfo, hanno dato quattro picchi principali di radioattività dalla resina Dowex-1 formiato (fig. 6). Il primo conteneva composti non trattenuti dalla resina, il secon-

do glutatione, il terzo una miscela di prodotti non identificati, ma presumibilmente provenienti da degradazione della benzilpenicillina (*), il quarto solfato inorganico.

Il primo picco è stato frazionato su Dowex-50 H^+. Un picco radioattivo eluito con acqua conteneva un solo composto, identificato come

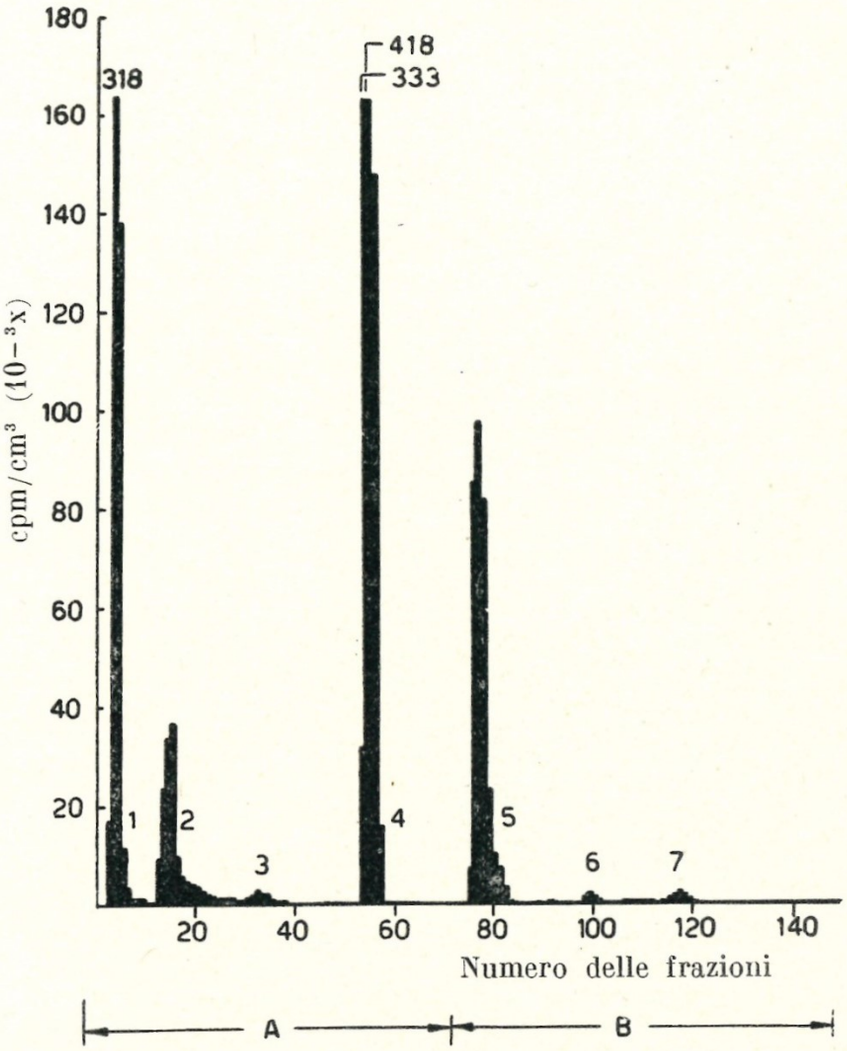


Fig. 6. - Cromatografia di scambio ionico di un estratto alcoolico preparato da micelio del ceppo produttore di penicillina incubato 72 ore nel terreno di sostituzione di arginina contenente $Na_2\ ^{35}SO_4$ e fenilacetato.

A. *Cromatografia su Dowex-1 formiato*: Frazioni 1-6, percolato e lavaggi; 7-39, acido formico 4 N nella riserva; 40-78, acido formico 8 N + formiato ammonico 1.6 M (1:1) nella riserva.

B. *Cromatografia su Dowex-50 H^+ del picco 1*: Frazioni 79-84, percolato e lavaggi; 85-116, acido cloridrico N nella riserva; 117-150, acido cloridrico 5 N nella riserva.

(*) Sottoponendo a cromatografia di scambio ionico un campione di benzilpenicillina ^{35}S in condizioni uguali a quelle usate per l'estratto alcoolico, si sono ottenuti composti nella stessa porzione del diagramma di eluizione caratterizzati da mobilità su carta simili a quelle dei composti provenienti dall'estratto alcoolico.

solforilcolina. Usando poi per l'eluizione un gradiente lineare di acido cloridrico comparivano altri due picchi, dei quali il primo conteneva metionina ed il secondo cistina (Tabella 1).

TABELLA 1

Cromatografia su carta dei picchi ottenuti nella cromatografia di scambio ionico di un estratto alcoolico preparato da micelio del ceppo produttore di penicillina sviluppato nel terreno di sostituzione di arginina contenente solfato sodico-^{35}S e fenilacetato.

	Solvente n. 1 R_F	Solvente n. 2 R_F	Solvente n. 4 R_F	Solvente n. 5 R_F	Solvente n. 7 R_F	Elettroforesi cm (*)
Picco n. 2	0 03	0.03	0.22	0.08		
Glutatione	0.03	0 03	0.22	0.08		
Picco n. 3	0.07, 0 84, 0.90	0 2, 0.42, 0.65				
Prodotti di degradazione della benzilpenicillina	0.14, 0 85, 0.92	0 48, 0 62				
Picco n. 4					0 55	14.2
Solfato sodico					0 55	14 0
Picco n. 5	0.23	0 55	0 81			
Solforilcolina	0.24	0.55	0 81			
Picco n. 6	0 03	0 10	0 34			
Cistina	0.05	0.11	0 37			
Picco n. 7	0 50	0.62		0.73		
Metionina	0.47	0.60		0.76		

(*) Distanza dall'origine in direzione dell'anodo.

B.) *Estratti in acetato di butile.*

a) *Ceppo produttore di penicillina sviluppato in presenza di fenilacetato.* — Sono stati eseguiti radiocromatogrammi, sviluppati con il solvente n. 3, con le soluzioni tampone provenienti dagli estratti in acetato di butile dei terreni che erano serviti per lo sviluppo del ceppo produttore in presenza di fenilacetato e con solfato sodico o con metionina come fonti di zolfo.

Con solfato ^{35}S come fonte di zolfo i cromatogrammi mostravano un'unica macchia ben definita dovuta a benzilpenicillina (fig. 7).

Con metionina ^{35}S i cromatogrammi mostravano, oltre alla benzilpenicillina, varie sostanze radioattive prive di attività biologica (fig. 8). La macchia più forte aveva una mobilità inferiore a quella della benzilpenicillina e compariva già dopo 24 ore di fermentazione diminuendo successivamente di intensità. Il composto è molto probabilmente uguale

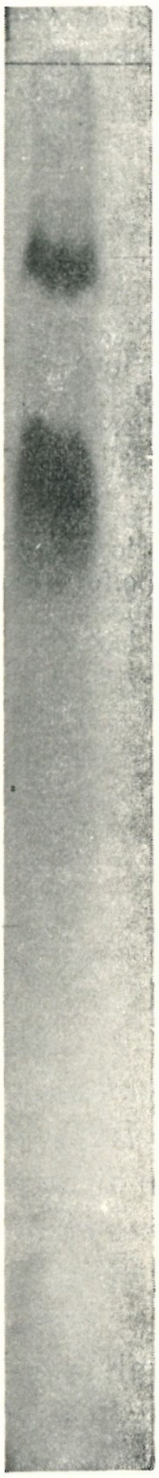
all'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico isolato dai terreni di coltura del ceppo non produttore (v. oltre).

b) *Ceppo produttore di penicillina sviluppato in assenza di fenilacetato.* — Come si è detto in precedenza il ceppo produttore sviluppato in as-



Benzilpenicillina

Fig. 7. - Radiocromatogramma del tampone dall'estratto in acetato di butile del terreno (in presenza di fenilacetato, $Na_2{}^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo) sviluppato con il solvente 3.



Acido 2-ossi-4-metilmercapto-butirrico

Benzilpenicillina

Fig. 8. - Radiocromatogramma del tampone dall'estratto in acetato di butile del terreno (in presenza di fenilacetato, metionina ^{35}S quale fonte di zolfo) sviluppato con il solvente 3.

senza di fenilacetato forma solo quantità assai esigue di penicillina, circa 100 unità o meno dopo 72 ore, indipendentemente dal tipo di fonte di

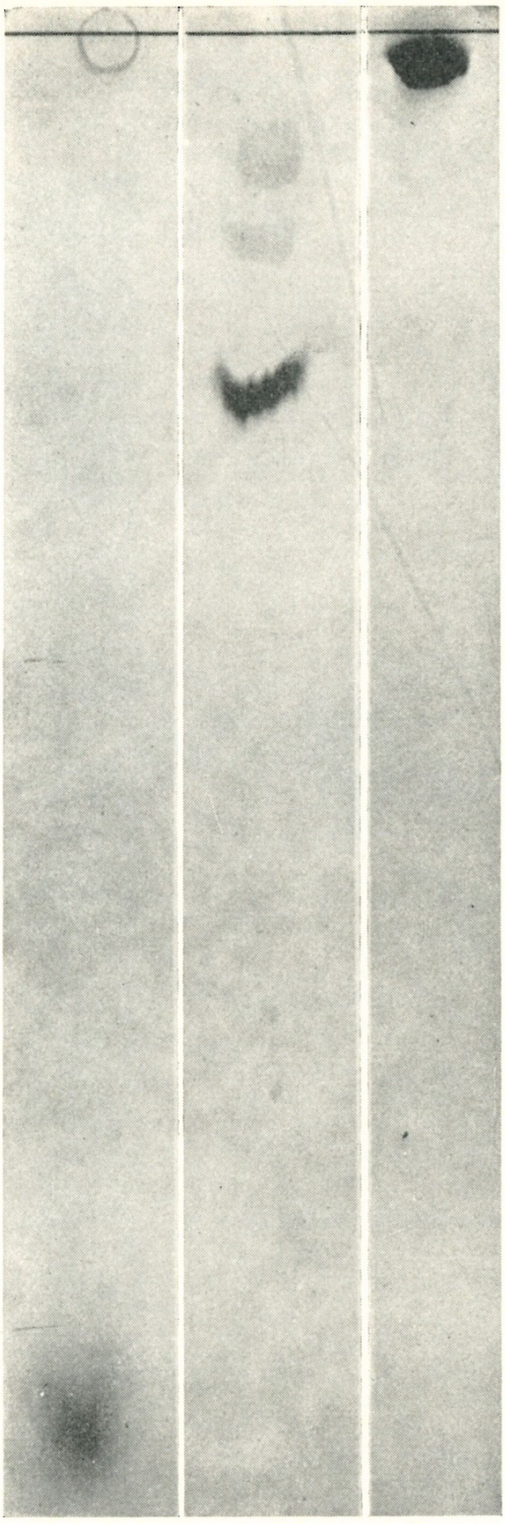


Fig. 9. - Radiocromatogrammi del tampone dall'estratto in acetato di butile del terreno (in assenza di fenilacetato, $Na_2{}^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo).

Sinistra, solvente 1; centro, solvente 2; destra, solvente 3.

zolfo. Quando si usi solfato quale fonte di zolfo il tampone proveniente dagli estratti in acetato di butile conteneva una sostanza che ha mobilità pressochè nulla nel solvente n. 3, considerevole nel solvente n. 2 e ancor maggiore nel solvente n. 1 (fig. 9). La natura di questo prodotto biologicamente inattivo, il quale è stato pure ottenuto mediante cromatografia di scambio ionico dal terreno di coltura, non è stata ancora chiarita; esso è stabile agli acidi e agli alcali in condizioni nelle quali la penicillina è distrutta.

Quando si usi metionina quale fonte di zolfo i radiocromatogrammi dei tamponi provenienti dagli estratti in acetato di butile, sviluppati con il solvente n. 3, mostravano la presenza della stessa sostanza ed inoltre una macchia che corrispondeva all'acido 2-ossi-4-metil-mercaptobutirrico.

c) *Ceppo non produttore sviluppato in presenza di fenilacetato.* — Usando solfato quale fonte di zolfo non si notavano metaboli radioattivi estraibili con acetato di butile. Con metionina, invece, nei radiocromatogrammi dei tamponi provenienti dagli estratti in acetato di butile, sviluppati con il solvente n. 3, compariva un metabolita principale che si poteva identificare, in base alle sue proprietà cromatografiche in sette solventi, con l'acido 2-ossi-4-metil-mercaptobutirrico (Tab. 2).

C) *Terreni di coltura.*

I radiocromatogrammi sviluppati con il solvente n. 1 dei terreni usati per lo

sviluppo del ceppo produttore in presenza di fenilacetato, sia con metionina che con solfato come fonti di zolfo, non indicavano macchie radioat-

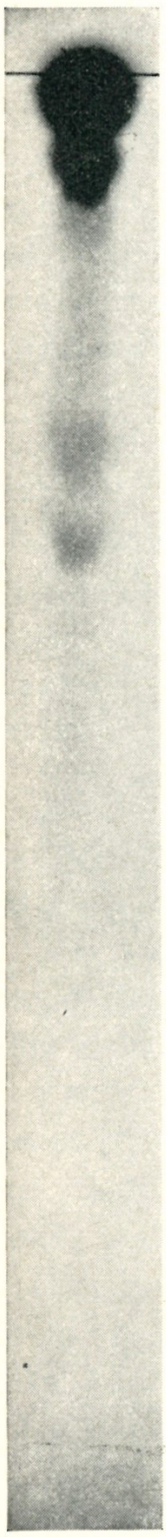


Fig. 10. - Radiocromatogramma del terreno di coltura (in assenza di fenilacetato, $Na\ ^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo) sviluppato 70 ore con il solvente 3.

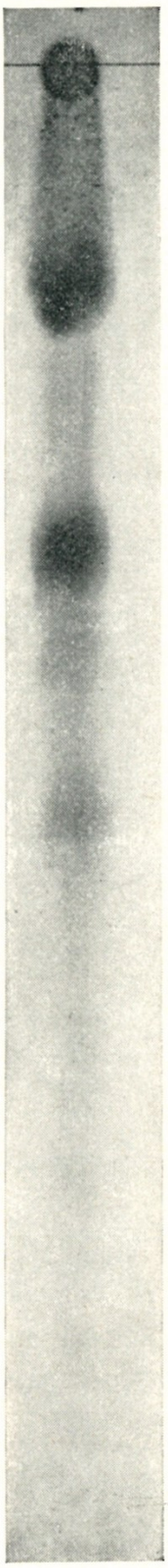


Fig. 11. - Radiocromatogramma del terreno (in assenza di fenilacetato, $Na_2\ ^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo) sviluppato con il solvente 2.

tive intense oltre quelle estraibili con acetato di butile, a parte il solfato inorganico quando questo rappresentava la fonte di zolfo. Erano presenti

TABELLA 2

Confronto cromatografico dell'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico con un composto isolato dal filtrato di una coltura del ceppo non produttore di penicillina sviluppato nel terreno di sostituzione di arginina contenente metionina-^{35}S.

Composto	Solvente n. 1 R_F	Solvente n. 2 R_F	Solvente n. 3 R_F	Solvente n. 4 R_F	Solvente n. 5 R_F	Solvente n. 6 R_F	Solvente n. 8 R_F
Acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico	0.86	0.68	0.26	0.83	0.84	0.86	0.75
Composto isolato	0.86	0.68	0.29	0.82	0.82	0.87	0.73



Fig. 12. — Radiocromatogramma bidimensionale del terreno (in assenza di fenilacetato, $Na_2\ ^{35}SO_4$ quale fonte di zolfo) sviluppato prima con il solvente 2 (→), poi con il solvente 1 (↓).

però alcune macchie molto deboli. I radiocromatogrammi mono- (figg. 10 e 11) e bidimensionali (fig. 12) dei terreni nei quali non era stato aggiunto l'acido fenilacetico ed il solfato rappresentava la fonte di zolfo, mostravano, oltre al composto estraibile con acetato di butile, una macchia che si

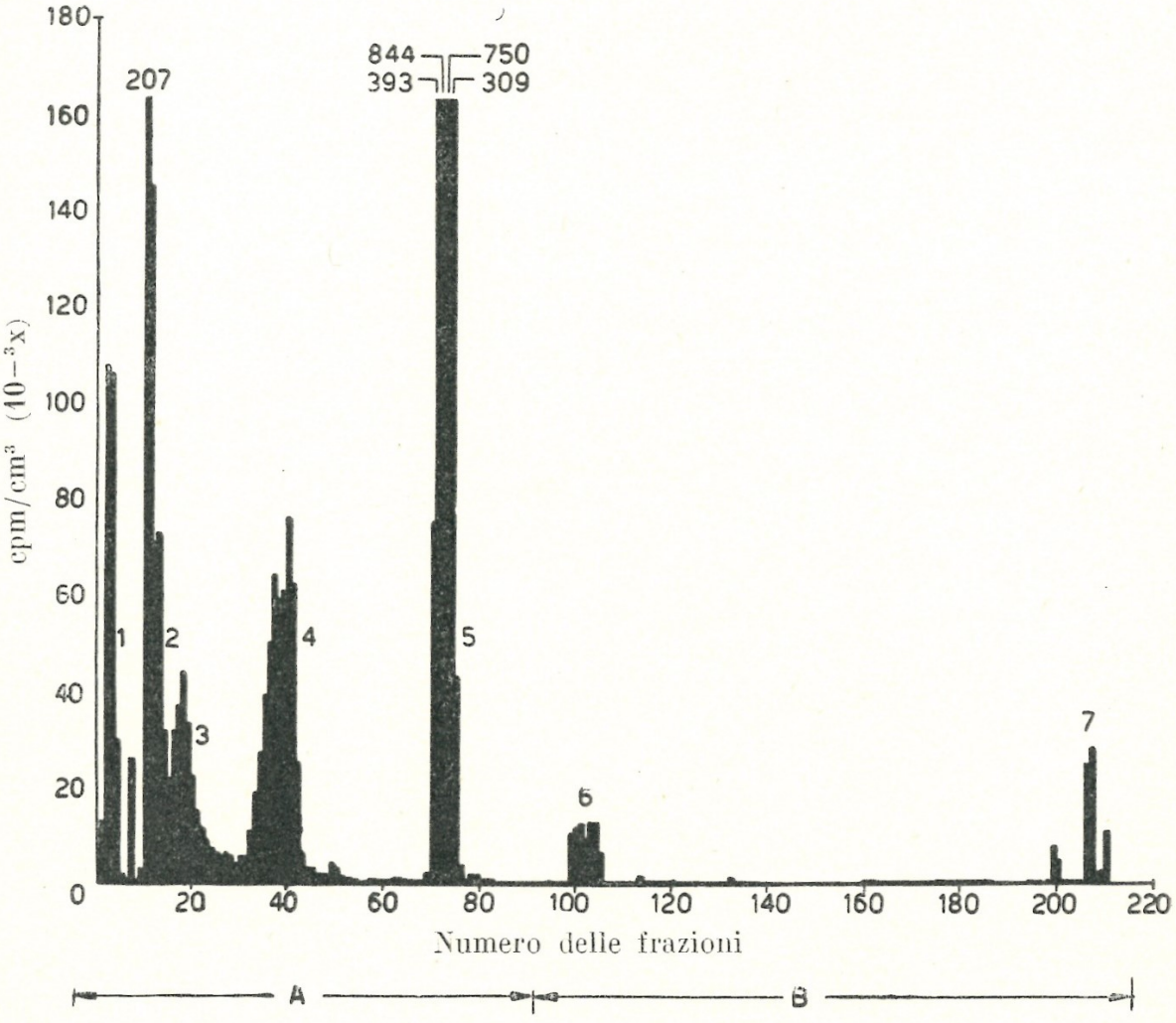


Fig. 13. - Cromatografia di scambio ionico del terreno di sostituzione di arginina contenente solfato sodico ^{35}S, dopo 72 ore di fermentazione con il ceppo produttore di penicillina in assenza di fenilacetato.

A. *Cromatografia su Dowex-1 formiato*: Frazioni 1-6, percolato e lavaggi; 7-48, acido formico 4 N nella riserva; 49-97, acido formico 8 N + formiato ammonico 1,6 M (1:1) nella riserva.

B. *Cromatografia su Dower-50* H^+ *del picco* 1: Frazioni 98-107, percolato e lavaggi; 108-151, acido cloridrico N nella riserva; 152-198, acido cloridrico 5 N nella riserva; 199-203, acqua; 204-220, ammoniaca N.

poteva identificare con l'acido 6-amminopenicillanico trasformandolo in benzilpenicillina mediante fenilacetilazione ([11]). Una macchia praticamente immobile dovuta a peptidi era pure presente. Un'ottima separazione dei vari metaboliti solforati poteva effettuarsi ricorrendo alla cromatografia di scambio ionico. Da una colonna di resina Dowex-1 formiato si ottene-

vano cinque picchi principali (fig. 13); il primo conteneva i composti non fissati dalla resina, il secondo ed il terzo una miscela di composti solforati non identificati, il quarto un unico composto identico al prodotto estraibile con acetato di butile descritto precedentemente, il quinto solfato inorganico. Il primo picco si passava su una colonna di resina Dowex-50 H^+. Il picco eluito dall'acqua conteneva una sola sostanza, la solforilcolina. Applicando un gradiente lineare di acido cloridrico non compariva radioattività nell'eluato, mentre con ammonica N si otteneva una frazione che contiene probabilmente dei peptidi in quanto dà per idrolisi acida (22 ore a 105° con acido cloridrico 6 N) cistina e metionina. La Tabella 3 riporta le mobilità su carta dei vari composti.

TABELLA 3

Cromatografia su carta dei picchi ottenuti nella cromatografia di scambio ionico del terreno di sostituzione di arginina contenente solfato sodico ^{35}S, dopo fermentazione con il ceppo produttore di penicillina in assenza di fenilacetato.

	Solvente n. 1 R_F	Solvente n. 2 R_F	Solvente n. 3 R_F	Elettroforesi cm (*)
Picco n. 2 Picco n. 3	miscele non separate	miscele non separate		
Picco n. 4	0.81	0.59	0.03	
Composto estraibile con acetato di butile	0.81	0.59	0.02	
Picco n. 5				15.0
Solfato sodico				14.0
Picco n. 6	0.23	0.51		
Solforilcolina	0.21	0.50		
Picco n .7	0.00	0.00		

(*) Distanza dall'origine in direzione dell'anodo.

I radiocromatogrammi (sviluppati con il solvente n. 1) dei terreni di coltura del ceppo non produttore sviluppato in presenza di fenilacetato e con solfato quale fonte di zolfo non indicavano metaboliti importanti. L'acido 6-amminopenicillanico era assente. Con metionina quale fonte di zolfo l'unico metabolita riscontrato in quantità considerevole era l'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico; l'acido 6-amminopenicillanico non era presente neppure in tracce.

3) Aspetti quantitativi.

Con la speranza di rilevare differenze quantitative fra il metabolismo del ceppo produttore di penicillina e quello del ceppo non produttore sono stati sottoposti ad esame quantitativo, mediante la tecnica di Frank e collaboratori ([16]), una serie di radiocromatogrammi. Il recupero della

Tabella 4

Distribuzione della radioattività fra varie frazioni ottenute da una fermentazione del ceppo produttore di penicillina e di quello non produttore, nel terreno di sostituzione di arginina contenente solfato ^{35}S.

	Ore	Radioattività (% del totale)		
		Ceppo 51-20 c		Ceppo 222
		In presenza di fenilacetato	In assenza di fenilacetato	
Terreno	0	100.0	100.0	100.0
	24	81.1	84.5	94.2
	48	63.4	74.0	66.2
	72	44.2	75.9	54.9
Autolisato	0	0.0	0.0	0.0
	24	10.0	9.7	5.4
	48	26.4	20.4	26.4
	72	38.0	13.2	38.3
Estratto alcoolico	0	0.0	0.0	0.0
	24	7.6	4.1	8.2
	48	21.0	18.6	23.0
	72	35.6	13.8	33.0
Sostanze estraibili con acetato di butile dal terreno acidificato	0	0.0	0.0	0.0
	24	2.1	0.3	0.1
	48	6.1	1.6	0.3
	72	10.6	1.6	0.1
Solforilcolina nell'estratto alcoolico	0	0.0	0.0	0.0
	24	1.0	0.5	0.2
	48	4.7	6.7	1.3
	72	6.1	5.2	2.7
Metionina nell'estratto alcoolico	0	0.0	0.0	0.0
	24	0.0	0.0	0.1
	48	0.3	0.6	1.2
	72	0.4	1.8	1.3

radioattività totale (somma delle radioattività del terreno e dell'autolisato del micelio) era compreso tra l'80 e il 110%.

I risultati di queste esperienze erano deludenti. Mentre infatti i campioni prelevati separatamente da due beute di una stessa fermentazione davano valori in ottimo accordo fra loro, la riproducibilità dei risultati di esperienze differenti era assai modesta. La sola differenza quantitativa, ripetutamente osservata, fra metabolismo solforato del ceppo produttore e quello del ceppo non produttore era costituita da una concentrazione di solforilcolina maggiore ed una concentrazione di metionina minore nel primo rispetto al secondo.

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati di un'esperienza quantitativa eseguita con il ceppo produttore di penicillina (sia in presenza che in assenza di fenilacetato e con solfato inorganico ^{35}S come fonte di zolfo) e con il ceppo non produttore.

In alcune esperienze la radioattività della solforilcolina costituiva circa il 15% della radioattività totale, un valore che corrisponde circa al 0,5% del peso secco del micelio. Woolley e Peterson ([19]) isolarono questo composto dall'*Aspergillus sydowi* in quantità pari al 0,26% (rispetto al peso secco) e Stevens e Vohra ([20]) trovarono per il *P. chrysogenum* un valore di circa 0,2%.

Dopo la solforilcolina il metabolita solforato quantitativamente più importante è il glutatione. I dati quantitativi elaborati dalla cromatografia di scambio ionico indicano che esso rappresenta il 2,5% della radioattività totale, corrispondendo approssimativamente al 0,10-0,15% del peso secco del micelio.

4) Assenza di solfatasi capace di idrolizzare la solforilcolina.

La costante presenza di notevoli quantità di solforilcolina negli estratti alcoolici e negli autolisati fece pensare opportuna la ricerca nel micelio di solfatasi capaci di idrolizzare il composto. Le varie esperienze eseguite a questo scopo dettero sempre risultati negativi, sia con micelio liofilizzato che con estratti, in tutte le condizioni sperimentali provate, cioè in differenti tamponi ed in presenza e in assenza di ioni magnesio. Per aumentare la sensibilità del procedimento analitico è stata pure usata la solforilcolina ^{35}S. Anche in tal caso però non fu possibile svelare la benchè minima quantità di solfato inorganico dopo incubazione con il preparato enzimatico, sia mediante cromatografia su carta che elettroforesi su carta.

5) Sintesi enzimatica della solforilcolina.

Più successo si è avuto in uno studio preliminare della sintesi enzimatica della solforilcolina. E' stato infatti visto che il prodotto si forma allorchè un estratto di *P. chrysogenum* viene incubato con cloruro di

Tabella 5

Identificazione cromatografica della solforilcolina ^{35}S sintetizzata enzimaticamente (*).

	Solvente n. 1 R_F		Elettroforesi cm (**)	
Prima dell'incubazione	0.0			+ 10.0
Sistema completo dopo l'incubazione	0.0,	0.21	— 0.5.	+ 10.5
Senza cloruro di colina	0.0			+ 10.2
Senza ATP	0.0			+ 10.4
Senza enzima	0.0			+ 10.2
Solforilcolina		0.22	— 0.4	
Solfato sodico	0.0			+ 10.2

(*) Sono riportate soltanto le mobilità dei prodotti radioattivi.
(**) — indica mobilità verso il catodo, + verso l'anodo.

colina, adenosin-5'-trifosfato, ioni magnesio e solfato sodico ^{35}S ([21]). La identificazione con la solforilcolina del nuovo prodotto radioattivo che si forma in tali condizioni, poteva dimostrarsi mediante la cromatografia su carta e l'elettroforesi su carta (Tabella 5).

DISCUSSIONE

L'esame dei radiocromatogrammi mostra che non ci sono differenze qualitative nella distribuzione dei metaboliti solforati presenti nel ceppo produttore e in quello non produttore. Considerevole interesse riveste la presenza nel ceppo produttore sviluppato in assenza di fenilacetato di un composto solforato di natura acida, biologicamente inattivo ed estraibile con acetato di butile. Poichè questa sostanza è formata soltanto allorchè il fenilacetato è assente ed è prodotta soltanto dal ceppo produttore, è probabile che essa sia in qualche modo correlata con il processo della biosintesi della penicillina. In assenza di fenilacetato si forma inol-

tre dal ceppo produttore, ma in quantità inferiore, l'acido 6-amminopenicillanico recentemente descritto da Batchelor e coll. ([11]). I principali metaboliti solforati riscontrati nel micelio del *P. chrysogenum* sono la solforilcolina e il glutatione. La prima è presente in quantità considerevoli, circa 0,2-0,5% del peso secco miceliale, e probabilmente serve da riserva di solfato inorganico, legato però in forma organica. E' stato dimostrato da vari ricercatori ([20]) ([22]), come pure in questo lavoro, che la solforilcolina è utilizzata dalla muffa per la biosintesi della penicillina quando venga somministrata quale unica fonte di zolfo; in tal senso è interessante osservare che nel micelio non si riesce a svelare la presenza di solfatasi capaci di idrolizzare la solforilcolina a colina e solfato inorganico. (Similmente Egami e Itabashi ([23]) non riuscirono a mettere in evidenza solfatasi per la solforilcolina nell'*Aspergillus oryzae*, che pure contiene solforilcolina). Si deve quindi pensare che nel micelio operi un meccanismo per il trasporto del solfato della solforilcolina, differente da una semplice idrolisi. La solforilcolina, scoperta la prima volta da Woolley e Peterson nell'*Aspergillus sydowi* ([19]), e ritrovata poi nel micelio di *P. chrysogenum* da De Flines ([24]) e da Stevens e Vohra ([20]), ed in vari altri funghi dagli autori di questo lavoro ([25]), svolge evidentemente un ruolo centrale nel metabolismo solforato di questi organismi; essa rappresenta il primo metabolita del solfato inorganico e lo studio delle reazioni biochimiche successive costituisce un campo di notevole interesse. La sua sintesi enzimatica è stata descritta da Kaji e McElroy ([26]) in *Aspergillus sydowi*, e dagli autori di questo lavoro ([21]) in *P. chrysogenum.*

Dopo la solforilcolina il glutatione rappresenta il più importante metabolita solforato; esso è presente in quantità pari al 0,15% circa del peso secco miceliale. E' stato dimostrato ([27]) che l'utilizzazione del glutatione per la produzione della penicillina decorre in modo del tutto simile a quella della cistina. Il glutatione è presente in quantità analoghe nel lievito ([28]) ed in concentrazioni anche maggiori (circa 0,28%) in *E. coli*, in cui si pensa che funga da riserva di zolfo ([29]) ([30]).

E' stato dimostrato che la metionina può essere desaminata ossidativamente dal micelio del *P. chrysogenum* ([31]) a dare il chetoacido corrispondente. E' stato ora visto che l'ossiacido derivato per riduzione del gruppo chetonico, cioè l'acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico, è un metabolita prodotto dal *P. chrysogenum* sviluppato in presenza di metionina, sia nel caso del ceppo produttore che in quello del ceppo non produttore. La formazione di acido 2-ossi-4-metilmercaptobutirrico era stata

dimostrata precedente da Akobe ([32]) nell'ascomicete *Oidium lactis* e nel *Bacillus subtilis*.

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

BIBLIOGRAFIA

([1]) Brandl E., Carilli A. e Chain E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 222 (1961).
([2]) Schmidt E. e Wagner W. - Ann., 337: 54 (1904).
([3]) Hurlbert R. B., Schmitz H., Brumm A. F. e Potter V. R. - J. biol. Chem., 209: 23 (1954).
([4]) Moore S. e Stein W. H. - J. biol. Chem., 192: 663 (1951).
([5]) Lineweaver H. e Murray C. W. - J. biol. Chem., 171: 565 (1947).
([6]) Camici L., Sermonti G. e Chain E. B. - Bull. World Hlth. Org., 6: 265 (1952).
([7]) Paladino S. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition), 17: 145 (1954).
([8]) Craig L. C., Gregory J. D. e Hausmann W. - Anal. Chem., 22: 1462 (1950).
([9]) Somogyi M. - J. biol. Chem., 185: 19 (1952).
([10]) Humphrey J. H. e Lightbown J. W. - J. gen. Microbiol., 7: 129 (1949).
([11]) Batchelor F. R., Doyle F. P., Nayler J. H. e Rolinson G. N. - Nature, 183: 257 (1959).
([12]) Toennis G. e Kolb J. J. - Anal. Chem., 23: 823 (1951).
([13]) Consden R., Gordon A. H. e Martin A. J. P. - Biochem. J., 38: 224 (1944).
([14]) Burma D. P. - Anal. chim. Acta, 9: 513 (1953).
([15]) Markham R. e Smith J. D. - Biochem. J., 52: 552 (1952).
([16]) Frank M., Chain E. B., Pocchiari F. e Rossi C. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 893 (1960).
([17]) Ballio A., Chain E. B. e Dentice di Accadia F. - Rend. Ist. sup. Sanità. 18: 1183 (1955).
([18]) Serlupi-Crescenzi G. - Risultati non pubblicati.
([19]) Wolley D. W. e Peterson W. H. - J. biol. Chem., 122: 213 (1937).
([20]) Stevens C. M. e Wohra P. - J. am. chem. Soc., 77: 4935 (1955).
([21]) Navazio F., Ballio A., Chain E. B. e Dentice di Accadia F. - IV International Congress of Biochemistry, Abstracts of Communications, 133 (1958).
([22]) Hockenhull D. J. D. - Biochem. J., 43: 498 (1948).
([23]) Egami F. e Itabashi M. - Chem. Abstr., 45: 10278 (1951).
([24]) De Flines J. - J. am. chem. Soc., 77: 1676 (1955).
([25]) Ballio A., Chain E. B., Dentice di Accadia F., Navazio F., Rossi C. e Ventura M. T. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 393 (1961).
([26]) Kaji A. e McElroy W. D. - Biochim. biophys. Acta, 30: 190 (1958).
([27]) Stevens C. M.. Vohra P., Inamine E. e Roholt O. A. - J. biol. Chem., 205: 1001 (1953).
([28]) Javillier M., Polonovski M., Florkin M., Boulanger P., Lemoigne M., Roche J., Wurmser R. - Traité de Biochimie Générale, Part 1, p. 649. Masson et Cie., Paris 1959.
([29]) Roberts R. B. e Bolton E. T. - Science, 115: 479 (1952).
([30]) Cowie D. B., Roberts R. B. e Bolton E. T. - Science, 119: 579 (1954).
([31]) Knight S. G. - J. Bacter., 55: 401 (1948); Arch. Biochem., 25: 299 (1950).
([32]) Akobe K. - Z. physiol. Chem., 244: 14 (1936).