

15. Giovanni SERLUPI-CRESCENZI. — Osservazioni sul sistema proteolitico del *Penicillium chrysogenum*.

Riassunto. — Vengono studiate alcune proprietà del sistema proteolitico del *Penicillium chrysogenum*, con particolare riguardo alla possibilità di inibirne l'attività in estratti non purificati del microorganismo.

Summary. — Certain properties of the proteolytic system of *Penicillium chrysogenum*, have been studied with particular attention to the possibility of inhibiting its activity in unpurified extracts of the microorganism.

Nel corso di ricerche sul metabolismo del *Penicillium chrysogenum* eseguite in questo Istituto, si era osservato che estratti del micelio di questa muffa, preparati in condizioni di temperatura non perfettamente controllate, perdevano per dialisi fino al 90% del loro contenuto di azoto. L'azoto dell'estratto diminuiva ancora se si ripeteva la dialisi dopo incubazione a temperatura ambiente. Queste osservazioni indicavano la presenza nel micelio del *Penicillium chrysogenum* di un sistema enzimatico avente una elevata attività proteolitica, che con ogni probabilità degrada altri enzimi presenti negli estratti della muffa.

Per tale motivo abbiamo esaminato alcuni fattori che regolano l'attività di questo sistema proteolitico in estratti grezzi del microorganismo ed in particolare abbiamo ricercato le condizioni più idonee ad inibire l'azione proteolitica. Uno studio dettagliato del sistema enzimatico era fuori dello scopo essenzialmente pratico di questo lavoro.

Una esauriente rassegna della letteratura si può trovare in un articolo di KOCH e DEDIC (¹), che hanno studiato l'attività proteolitica di 34 muffe diverse.

MATERIALI E METODI.

Organismo. — Dove non indicato altrimenti si è usato il ceppo di *P. chrysogenum* Wis. 49-133, cresciuto in cultura sommersa a 24°C in beute agitate da 500 ml con 100 ml di brodo culturale contenente corn steep 6%, lattosio 6%, CaCO₃ 1% (terreno corn steep-lattosio). I terreni indicati come « corn steep-glucosio » e « corn steep-galattosio » avevano la stessa composizione, tranne che tutto il lattosio era sostituito

rispettivamente da glucosio e da galattosio alla concentrazione del 3%; nei terreni indicati come « Jarvis e Johnson-glucosio » e « Jarvis e Johnson-galattosio » ai sali del terreno originale ⁽²⁾ si aggiungevano rispettivamente glucosio e galattosio alla concentrazione del 3%. La cultura veniva prelevata al momento opportuno, generalmente dopo 60 ore, quando l'attività era al suo massimo, filtrata ed il micelio, dopo tre lavaggi per sospensione in acqua distillata, veniva conservato a -20°C . Un campione di 3 g veniva essiccato in stufa a 100°C e serviva per la determinazione del peso secco.

Preparazione degli estratti. — Il micelio veniva sgelato e pestato in mortaio a 5°C usando celite 503 come abrasivo, fino a che all'osservazione microscopica le ife risultavano rotte per la maggior parte. Si aggiungeva quindi acqua alla stessa temperatura fino ad avere una sospensione contenente il 10% di micelio (p.s.). La sospensione veniva centrifugata per un'ora a 5°C e $1800 \times g$ e il sopranatante veniva usato per le prove enzimatiche dopo dialisi contro acqua distillata a 5°C .

Determinazione dell'attività proteolitica. — L'attività veniva determinata col metodo di ANSON ⁽³⁾ leggermente modificato per diminuire i volumi. In pratica a 3 ml del substrato si aggiungeva 1 ml dell'estratto da saggiare. Un ml della miscela veniva prelevato immediatamente e versato in 2 ml di acido tricloroacetico al 5%. Dopo 10' di incubazione si prelevava un altro ml e si trattava nello stesso modo. Dopo centrifugazione 2 ml del supernatante di ciascuno dei due campioni venivano versati in 10 ml di idrato sodico 0.5 N; infine si aggiungevano 3 ml del reattivo di FOLIN e CIOCALTEU ⁽⁴⁾ dil. 1:3.

Dopo 10' si leggeva il colore bleu in un colorimetro EEL col filtro 607. La differenza di lettura tra i due campioni è riportata come misura dell'attività proteolitica.

Preparazione dei substrati. — Un estratto del micelio preparato come descritto si trattava con acido tricloroacetico fino a una concentrazione del 5%. Il precipitato ottenuto era disciolto in una soluzione di 100 g di urea in 100 ml di idrato sodico 0.1 N. Dopo dissoluzione completa della proteina, la soluzione era portata al pH desiderato per aggiunta di fosfato monopotassico solido e diluita fino ad avere una concentrazione di proteina del 2% (peso/volume).

Quando si usavano altre proteine, queste venivano disciolte nella stessa maniera.

L'edestina e l'emoglobina erano prodotti commerciali della BDH Ltd., Poole, England.

L'ovoalbumina è stata cristallizzata come descritto da KEKVICK e CAMMON (5). La proteina di arachidi era preparata estraendo con NaOH N/10 la farina di arachidi, precipitando la soluzione con acido tricloroacetico al 5% e raccogliendo il precipitato per centrifugazione.

Inibitori. — L'ovomucoide è stato preparato come descritto da LINEWEAVER e MURRAY (6). Gli altri composti erano prodotti commerciali della massima purezza ottenibile.

RISULTATI.

Influenza dei substrati. - Il metodo usato dava una risposta lineare fino alle massime concentrazioni di enzima usate, mentre la risposta era influenzata solo poco dalla variazione della concentrazione del substrato. Una notevole variazione si aveva usando come substrati proteine differenti (Tab. 1). Questa variazione rispecchia un'effettiva differenza nella azione dell'enzima sulle diverse proteine che non si può spiegare col diverso contenuto in tirosina di esse.

TABELLA I

Attività di un estratto grezzo di micelio di *P. chrysogenum* su differenti substrati

Substrato usato	Attività
Proteine del <i>P. chrysogenum</i>	35
Emoglobina	66
Ovoalbumina	14
Edestina	21
Proteina di arachide	49

Le esperienze seguenti sono state eseguite usando come substrato la proteina del micelio per avvicinarsi il più possibile alle condizioni nelle quali interessava conoscere le proprietà dell'enzima.

Influenza delle condizioni di fermentazione. - Nella tabella II sono confrontate le attività di estratti preparati da miceli sviluppati in differenti terreni. Il terreno che dette i risultati più elevati fu quello a base di corn-steep e lattosio.

TABELLA II

Attività di estratti preparati da miceli di *P. chrysogenum* sviluppati in differenti terreni

Terreno di sviluppo		Attività
Jarvis e Johnson	galattosio	18
Jarvis e Johnson	glucosio	27.5
Corn steep	galattosio	22.5
id.	glucosio	20.5
id.	lattosio	39.5

Nella Tab. 3 sono riportati i dati ottenuti durante una fermentazione in questo terreno. L'attività per grammo di micelio diminuisce continuamente col tempo, ma se si tiene conto dell'aumento del peso secco si trova che l'attività per volume di cultura ha un massimo intorno alla sessantesima ora.

TABELLA III

Attività di estratti di micelio di *P. chrysogenum* sviluppato in corn steep lattosio a differenti tempi di fermentazione

Ore di fermentazione	A t t i v i t à		
	per grammo di micelio (p. s.)	per grammo di azoto non dializzabile del micelio	per 100 ml di cultura
24	47	21	22
48	37	19	30
72	28	25	49
96	20	31	41
120	15	36	30

Influenza del pH e della temperatura. - Nella Fig. 1 è riportato l'andamento dell'attività col pH. Il massimo di attività è a pH 6, ma si nota nella curva un'attività residua a pH alcalino, che fa supporre la presenza di almeno due enzimi con differenti optimum di pH.

L'optimum di temperatura è a 37° come si può vedere dalla Fig. 2. Questi dati concordano con i dati sulla stabilità riportati nella Tab. 4

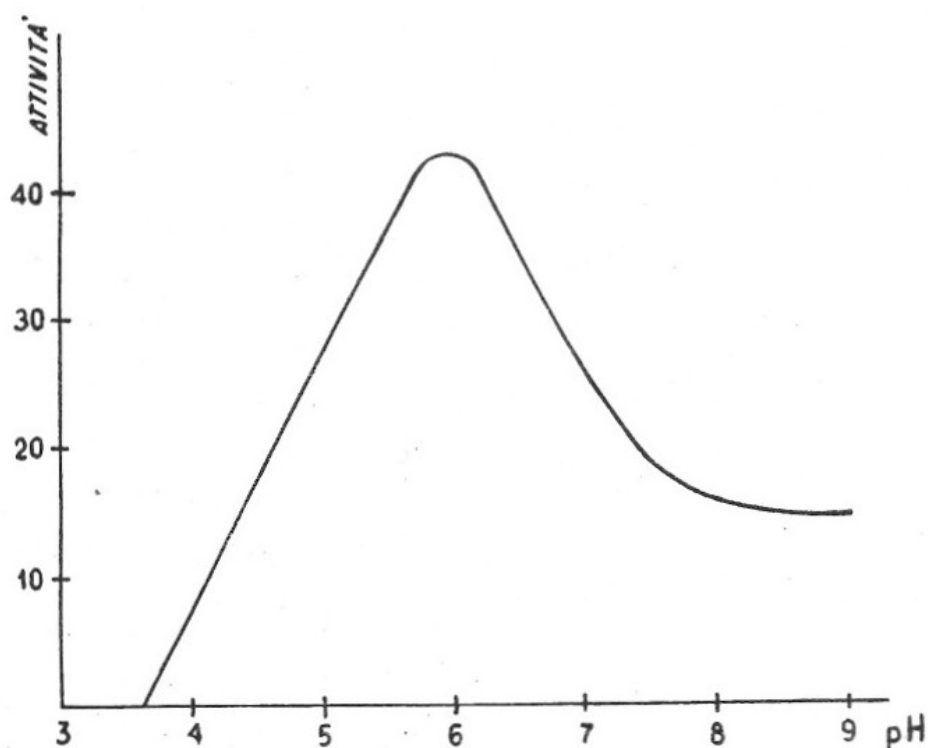


Fig. 1. - Variazione col pH dell'attività proteolitica a 37° di un estratto del micelio di *P. chrysogenum*.

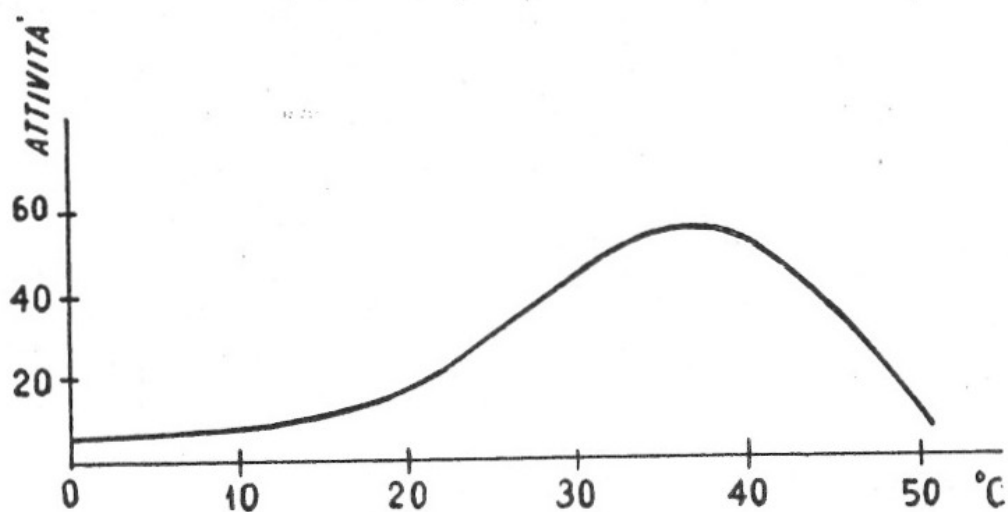


Fig. 2. - Variazione con la temperatura dell'attività proteolitica a pH 6 di un estratto del micelio di *P. chrysogenum*.

che mostrano come, mentre a 37° l'attività viene distrutta a pH inferiori a 5 o superiori a 7, a temperature superiori si ha una notevole inattivazione anche al pH ottimale.

TABELLA IV

Stabilità dell'attività proteolitica dopo incubazione per 75 min a differenti temperature e pH espressa in % dell'attività originale a 37° e pH 6

pH	Temperatura di incubazione		
	20° C	37° C	47° C
4	33	27	—
5	85	82	8
5.4	100	100	22
6	100	100	27
7	100	100	4
8	82	82	0

Inibitori. - Nella Tabella 5 è riportato l'effetto di una serie di sostanze che sono state descritte come aventi attività inibitrice su enzimi proteolitici di varia origine. Di queste solo l'ovomucoide aveva un effetto sensibile a concentrazioni ragionevoli, mentre le altre o non avevano effetto, o lo avevano a concentrazioni molto alte.

TABELLA V

Azione sull'attività proteolitica di differenti inibitori

C o m p o s t o	Concentrazioni	Inibizione %
Versene	1.2 mg/ml	0
Pirofosfato	0.02 M	10
Benzilmalonato	»	20
Citrato	»	15
Iodoacetato	»	10
Ossalato	»	8
Cisteina	»	0
Benzoato	»	0
Propionato	»	0
Butirrato	»	0
Semicarbazide	»	0
Idrossilammina	»	0
Cianuro di potassio	»	0
Solfuro di potassio	»	0
Azotidrato di sodio	»	0
Ioduro di cetilpiridinio	0.5 mg/ml	20
»	5 »	72
Bianco d'uovo	1.25 »	50
»	2 »	89
Ovomucoide	125 µg/ml	30
»	625 »	69

DISCUSSIONE.

Gli enzimi proteolitici del *P. chrysogenum* sono stati oggetto di studio da parte di BERGER, JOHNSON e PETERSON (7) e di KOCH e DEDIC (1). I primi nell'esame di trenta specie di muffe sviluppate in cultura superficiale hanno riscontrato che gli estratti di *P. chrysogenum* possiedono attività sia proteinasica che peptidasica. I secondi, in uno studio di 34 specie di muffe, hanno constatato un'elevata attività proteolitica sia negli estratti del micelio di *P. chrysogenum*, che nel suo filtrato di coltura, tanto in coltura superficiale quanto in coltura sommersa; l'attività proteolitica era misurata impiegando come substrato la gelatina.

I nostri risultati si riferiscono tutti a colture sommerse di *P. chrysogenum*, che, contrariamente alle colture superficiali rappresentano condizioni di omogeneità morfologica e fisiologica e consentono perciò di ottenere risultati riproducibili nello studio di attività metaboliche. Inoltre, in questo lavoro, le variazioni dell'attività proteolitica provocate dall'aggiunta di inibitori o da variazioni del pH, della temperatura, della composizione del terreno di coltura, sono state determinate impiegando come substrato del sistema proteolitico le proteine del *P. chrysogenum*, che ovviamente permettevano di riprodurre più fedelmente le condizioni nelle quali avviene la proteolisi negli estratti miceliali.

I risultati ottenuti hanno consentito di stabilire le condizioni più adatte per inibire, o almeno attenuare sensibilmente, l'attività proteolitica di estratti grezzi di *P. chrysogenum*. Si è visto infatti che, operando a pH maggiori di 7 o minori di 5, l'attività a 37° è inferiore al 50% di quella ottimale (pH 6) e che, quando le altre attività enzimatiche in esame lo consentano, è conveniente usare micelio di età inferiore alle 48 ore in cui l'attività per grammo di azoto miceliale è più bassa.

Fra i vari inibitori provati l'ovomucoide a concentrazioni di 0,6 mg/ml e lo ioduro di cetilpiridinio a concentrazioni di 5 mg/ml riducono l'attività al 30% di quella originaria (37°C - pH 6).

L'aggiunta di ovomucoide ed il controllo del pH, oltre che naturalmente il controllo della temperatura, vengono ormai adottati da noi come pratica usuale nella preparazione di estratti di *P. chrysogenum*, allorchè si desidera mettere in evidenza la presenza di particolari attività enzimatiche.

L'azione dell'ovomucoide, noto inibitore della tripsina, era già stata dimostrata da VON PECHMANN (7) nel caso della proteinasi di *Aspergilli*, da WETTER (8) nel caso di due proteinasi isolate da *Mortierella renispora* e da FUJII (9) nel caso della proteinasi di *Tricophyton gypseum*. In accor-

do con quanto aveva osservato VON PECHMANN ⁽⁷⁾ con *Aspergilli* anche il sistema proteolitico del *P. chrysogenum* è inibito da concentrazioni di ovomucoide considerevolmente superiori a quelle necessarie per inibire l'attività della tripsina.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) KOCH O. G. e DEDIC G. A. - Biochem. Z. 328: 536 (1957).
 - (²) JOHNSON M. J. e JARVIS E. G. - J. am. chem. Soc., 69: 3010 (1946).
 - (³) ANSON M. L. e MIRSKY A. E. - J. gen. Physiol., 17: 151 (1933).
 - (⁴) FOLIN O. e CIOCALTEU V. - J. biol. Chem., 73: 627 (1927).
 - (⁵) KEKVICK R. A. e CANNAN R. K. - Biochem. J., 30: 227 (1936).
 - (⁶) LINEWEAVER H. e MURRAY C. W. - J. biol. Chem., 171: 565 (1947).
 - (⁷) BERGER J., JOHNSON M. J. e PETERSON W. H. - J. biol. Chem., 117: 429 (1937).
 - (⁸) PECHMANN E. V. - Biochem. Z., 321: 549 (1951).
 - (⁹) WETTER L. R. - Canad. J. Biochem. Physiol., 32: 60 (1954).
 - (¹⁰) FUJII T. - Chem. Abstr., 49: 13302 (1955).
-