

vitro (in presenza di vari substrati: lievito o estratti di tessuti animali) la fosforilazione della tiamina avviene per trasferimento di radicali fosforici dall'ATP alla tiamina libera o alla tiamina monofosfato, si può avanzare l'ipotesi che deficienza di esteri fosforici ricchi di energia e difetto di fosforilazione della tiamina nell'organismo diabetico siano in qualche modo legati fra di loro.

Se tale ipotesi è esatta, la somministrazione di insulina dovrebbe essere seguita nell'organismo diabetico oltre che da un aumento della difosfotiamina, anche da un aumento di ATP.

Abbiamo preso in considerazione nella presente ricerca il comportamento del fosforo labile (P_{ATP}) (costituito, come è noto, essenzialmente dal fosforo che si libera per idrolisi dell'ATP) nell'animale diabetico in rapporto all'azione dell'insulina. Poiché d'altra parte avevamo dimostrato che la difosfotiamina esplica nel diabete pancreatico un'azione insulinosimile¹, ci è parso interessante studiare anche il comportamento del P_{ATP} dopo somministrazione di questo coenzima.

A tale scopo abbiamo determinato il P_{ATP} del fegato secondo il metodo di POTTER et collaboratori² in 11 ratti normali, in 11 ratti diabetici ed in 11 ratti diabetici dopo trattamento rispettivamente con insulina e con difosfotiamina (DPT)³.

Ratti	No animali	P_{ATP} mg p. 100 g fegato fresco media $\pm$ errore standard
Normali	11	23,8 $\pm$ 1,04
Diabetici	11	12,9 $\pm$ 0,41
Diabetici + insulina	11	20,3 $\pm$ 0,95
Diabetici + DPT	11	21,8 $\pm$ 1,03

Media dei valori del P_{ATP} di fegati di ratti normali e diabetici per allossana. Ai ratti diabetici l'insulina è stata iniettata per via intramuscolare alla dose di 30 U.I./kg e la difosfotiamina (DPT) alla dose di 45 mg/kg. Gli animali trattati venivano uccisi per decapitazione 60 e 90 minuti dopo la somministrazione dell'insulina e della DPT rispettivamente.

Questi risultati dimostrano che nei ratti diabetici per allossana si ha una diminuzione del P_{ATP} del fegato: ciò conferma le precedenti ricerche di MOSCHINI, CAHN e HOUGET e di BACCARI⁴. Sia l'insulina che la DPT riportano i valori del P_{ATP} alla norma.

Siamo quindi autorizzati ad ammettere che entrambe queste sostanze agiscono in ugual misura sulla sintesi dell'ATP nell'animale diabetico.

L'incremento dell'ATP dopo somministrazione di insulina si può ascrivere alla normalizzazione del metabolismo glicidico da parte di questo ormone.

Per quanto riguarda l'azione della DPT si possono più particolarmente prendere in considerazione i due seguenti possibili meccanismi:

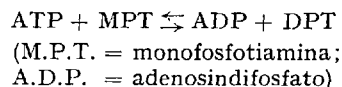
1° Apporto diretto di radicali fosforici dalla DPT all'ATP secondo il seguente equilibrio reversibile:

¹ N. SILIPRANDI, Acta Vitaminologica 4, 249 (1950).

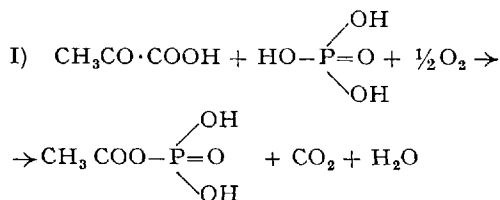
² V. R. POTTER, G. A. LE PAGE e H. L. KLUG, J. Biol. Chem. 175, 619 (1948).

³ La difosfotiamina ci è stata gentilmente fornita dalla Ditta Cutolo di Napoli.

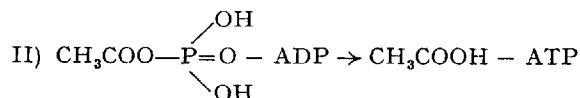
⁴ A. MOSCHINI, C. r. Soc. Biol. 111, 668 (1932). - TH. CAHN e J. HOUGET, C. r. Acad. Sci. Paris 203, 354 (1936). - V. BACCARI, Boll. Soc. it. Biol. Sper. 25, 356 (1949).



2° Sintesi dell'ATP per l'energia che si libera in seguito alla decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico secondo il seguente schema:



Reazione catalizzata dalla DPT.



Sono in corso ricerche per confermare i meccanismi prospettati.

E. CUTOLO e NORIS SILIPRANDI

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma, il 25 agosto 1951.

Summary

The labile phosphate (P_{ATP}) of the liver of alloxan diabetic rats is lower than that of normal rats. Both insulin and diphosphothiamine administration bring the P_{ATP} content of the liver of diabetic rats back to normal values.

Suggestions are made as to the probable mechanism of action.

Triosephosphates and Pyruvic Acid Intermediates in Fermentations of Pentoses by Living Cells of *Clostridium acetobutylicum*

The fermentation of pentoses, according to the theories generally adopted, may take place in one of two different ways:

(a) by fission between the carbons 2 and 3 of pentoses with formation of glycolaldehyde and glyceraldehyde or their phosphorylated derivatives¹;

(b) by oxydative decarboxylation yielding tetroses and trioses².

As indirect evidence in support to the first hypothesis, there are the recent experimental results of RAPPOPORT *et al.*³ and LAMPEN *et al.*⁴ obtained from the fermentation of 1-arabinose-1-C¹⁴ and d-xylose-1-C¹⁴ by *Lactobacillus pentoceticus*.

This bacterium converts both the pentoses, almost quantitatively, into acetic and lactic acids in equi-

¹ E. B. FRED, W. H. PETERSON, and A. J. DAVENPORT, J. Biol. Chem. 39, 347 (1919); 42, 175 (1920); 53, 111 (1922). - I. B. VAN DER LEK (Dissertation, Delft 1930). - M. J. JOHNSON, W. H. PETERSON, and E. B. FRED, J. Biol. Chem. 91, 570 (1931).

² F. LIPMANN, Nature 138, 588 (1936). - O. WARBURG and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 292, 287 (1937). - F. DICKENS, Biochem. J. 32, 1626, 1645 (1938).

³ D. A. RAPPOPORT, H. A. BARKER, and W. Z. ASSID, Arch. Biochem. Biophys. 31, 326 (1951).

⁴ J. O. LAMPEN, H. GEST, and J. C. SOWDEN, J. Bact. 61, 97 (1951).

molecular yields. In the experiments with pentoses labelled in C-1, all radioactive atoms were found in the methyl carbon of acetic acid and not in the carbons of lactic acid. This result proves that the methyl- and carboxyl-groups of acetic acid derive respectively from carbons 1 and 2 of arabinose or xylose. According to the authors mentioned above¹, the conversion of carbons 1 and 2 of pentoses into methyl- and carboxyl-groups respectively, suggests that a ketopentose or a similar phosphorylated derivative is formed as an intermediate.

If the fission occurs between carbons 2 and 3, the intermediate products should be glycol- and glyceral-aldehydes.

From bacterial cell-free preparations, RACKER² has found that triosephosphates are intermediates in the breakdown of pentose-5-phosphate, and this author was able to accomplish the condensation of triosephosphates with glycolaldehyde in the presence of aldolase of rabbit muscle.

The synthesis of ribose-5-phosphate was obtained by MARMUR and SCHLENK³ from glycolaldehydephosphate and fructose 1-6-diphosphate as source of triose.

The problem of the first split of pentoses has been studied by us using phenylhydrazine oxalate (= PO) as trapping agent in fermentations of xylose and arabinose with living cells of *Clostridium acetobutylicum*. In our experiments we were able to fix triosephosphates and pyruvic acid, but we were unable to identify glycolaldehyde as phenylhydrazone⁴ or glyoxal-osazone. We cannot, therefore, definitely assert whether glycolaldehyde is or is not an intermediate product in this fermentation, or whether this product is, in some particular form, hardly recognisable or detectable in the midst of oily products in the ether extracts of the medium.

The fixation of trioses and pyruvic acid as yet not isolated from bacterial fermentations of pentoses by living cells, is in agreement with the hypothesis that the C-3 moiety of pentoses is fermented via the normal way of hexoses. It is also supported by the fixation of the same intermediates from fermentations of glucose⁵ and by the isolation of phosphoglyceric acid from fermentation of arabinose by dried cells of *Propionibacterium pentosaceum*⁶.

Acetaldehyde was not trapped either in fermentations of glucose or in fermentations of pentoses, and therefore it is most probable that this product is not an intermediate in butyl alcohol fermentation.

Experimental Results

The preparation of experiment was the same as in a preceding paper²: *Clostridium acetobutylicum* was grown in 2500 ml of McDANIEL's medium containing 2% of glucose and 50 ml of growth factors (yeast and liver autolysate). After 12 hours of incubation, the cells were harvested by means of a Sharples centrifuge, washed and immediately suspended in 1000 ml of the same medium at 1% of 1-arabinose or *d*-xylose; arabinose is

shown to be better. The medium was made anaerobic by sweeping out the air with CO₂. The PO salt was added in two hours in three portions of 0.4 g each dissolved in 50 ml of distilled water containing 0.2 g of Na₂HPO₄. After 12–15 hours incubation, the medium was centrifuged and the clear liquid analysed for fixed products according to the preceding papers¹.

Triosephosphates were converted into methylglyoxal-2,4-dinitrophenylhydrazone:

m. p.	Calculated N %	Found
298°	25.93	25.85

Amount produced: 0.1–0.15 g per mille.

Pyruvic acid was isolated as phenylhydrazone by continuous ether extraction of the medium concentrated 1:3:

m. p.	Calculated N %	Found
188°	15.73	15.87

Amount produced: 0.1–0.2 g per mille.

Acetaldehyde: no acetaldehyde was found in the distillate from the medium of pyruvic acid added for freeing acetaldehyde from phenylhydrazine².

The author's thanks are due to S. A. Distillerie Agricole di Tresigallo for their support of this work.

V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and M. A. TISELLI

Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Pavia, August 17, 1951.

Riassunto

Da fermentazioni dello xilosio e dell'arabinosio con cellule vive di *Clostridium acetobutylicum* è stato possibile isolare i triosofosfati e l'acido piruvico. Il risultato depone a favore dell'ipotesi che la metà a C-3 dei pentosi venga demolita secondo lo schema di Meyerhof.

¹ V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. F. BETTINETTI, Arch. Biochem. 29, 291 (1950).—V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. C. BUSSI, Naturwiss. 38, 236 (1951).

² Since this paper has been submitted for publication, a work of R. KAUSHAL, P. JOWETT, and T. K. WALKER, Nature 167, 949 (1951) on the isolation of glycolaldehyde in the fermentation of pentoses by *Acetobacter acetigenum* is appeared.

Utilisation du citrate par *Escherichia coli*

Escherichia coli est généralement considéré comme une bactérie ne pouvant utiliser le citrate comme source d'énergie. Cette propriété sert d'ailleurs de test pour la différenciation des bactéries coliformes.

Tout récemment, VAUGHN¹ et ses collaborateurs ont montré que *Escherichia coli* peut cependant utiliser le citrate pour sa croissance à condition d'ajouter au milieu de culture un autre substrat (glucose, fructose, peptone, etc.).

Il était intéressant de rechercher si *Escherichia coli* cultivé dans ces conditions pouvait acquérir la faculté d'utiliser ensuite le citrate, sans autre source de carbone pour la respiration et la fermentation.

Nos expériences ont été faites avec des bactéries non proliférantes: *Escherichia coli* (souche M) est cultivé en

¹ D. A. RAPPOPORT, H. A. BARKER, and W. Z. ASSID, Arch. Biochem. Biophys. 31, 326 (1951).—J. O. LAMPEN, H. GEST, and J. C. SOWDEN, J. Bact. 61, 97 (1951).

² E. RACKER, Federation Proc. 7, 180 (1948).

³ J. MARMUR and F. SCHLENK, Arch. Biochem. Biophys. 31, 154 (1951).

⁴ H. O. L. FISCHER and C. TAUBE, Ber. Dtsch. chem. Ges. 59, 851 (1926).

⁵ V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and G. F. BETTINETTI, Arch. Biochem. 29, 291 (1950).

⁶ H. A. BARKER and F. LIPMANN, J. Biol. Chem. 179, 247 (1949).

¹ R. H. VAUGHN, J. T. OSBORN, G. T. WEDDING, J. TABACNIK, C. G. BEISEL et T. BRAXTON, J. Bacteriol. 60, 119 (1950).