

The Effect of Glycerol on the Biosynthesis of Benzylpenicillin by the Washed Cells of *Penicillium chrysogenum*

In the course of our studies on the effect of various carbohydrates on the biosynthesis of benzylpenicillin by the washed cells of *Penicillium chrysogenum*, suspended in phosphate buffer and phenylacetate (PA), we have studied the effect of glycerol and compared it with those of glucose, sorbitol, and mannitol on the one hand, and of lactate, pyruvate, citrate, malate, and succinate on the other. The experiments were conducted essentially as described by DESHPANDE and GANAPATHI¹. Tables I and II show that glycerol is about as effective as glucose, sorbitol, and mannitol in increasing the rate of biosynthesis of benzylpenicillin. Glucose, as estimated in the sample filtrates by the SOMOGYI method², disappeared in about 14 h whereas glycerol, as estimated by the method of RYLEY³, was present to the extent of 0.2% at the end of 24 h. No significant amounts of reducing sugar, as estimated by the SOMOGYI method, could be detected in the various hours in the filtrates in the experiments with glycerol, sorbitol, and mannitol (Table II). Lactate, pyruvate, citrate, malate, and succinate (tested as the sodium salts in about 1% concentration) had no appreciable effect on the biosynthesis of penicillin over what was observed with PA alone. In the PA plus glycerol system, no inhibition of biosynthesis of penicillin was observed when 2,4-dinitrophenol (DNP), cyanide (KCN), and arsenite were added in 0.0006 M, 0.0001 M, and 0.0002 M concentrations respectively, but, as seen from Table III, there were different degrees of inhibition when these compounds were added in 0.0006 M, 0.005 M, and 0.005 M concentrations respectively. The inhibition by cyanide is effective up to about 14 h only and not later, possibly due to the destruction of the cyanide by that time. It has also been observed that in the last three cases where there was inhibition of penicillin biosynthesis (Table III), glycerol disappeared at a slower rate.

It is evident that the mechanism of action of glycerol is similar to that of glucose, sorbitol, and mannitol, and different from that of lactate, pyruvate, and the other tricarboxylic acid cycle intermediates. It is likely that glycerol is converted into hexose in the present case according to the pathway suggested by HORECKER⁴; such conversion of glycerol into glycogen and hexose has been observed in the intact rat⁵, *Pseudomonas aeruginosa*⁶, *Acetobacter suboxydans*⁷, and the brown rot mould, *Poria vaillantii*⁸. Sorbitol and mannitol have also been observed to be converted into fructose by *Acetobacter suboxydans*⁹ and by spermatozoa¹⁰ by the action of dehydrogenases. The inability of lactate and pyruvate to increase the rate of biosynthesis of penicillin may be

Table I.—35 H mycelium (batch 2012), washed and suspended in 0.025 M phosphate buffer (pH 7.0). Mycelial dry weight: 1.77%.

Constituents added	Penicillin titre in units/ml after				
	3 h	7 h	11 h	14 h	24 h
PA (0.05%)	35	100	115	124	162
PA (0.05%) + glycerol (1%)	32	130	230	347	517
PA (0.05%) + glucose (1%)	34	125	260	350	504

Table II.—34 H mycelium (batch 2021), washed and resuspended in 0.025 M phosphate buffer (pH 7.0). Mycelial dry weight: 1.78%.

Constituents added	Penicillin titre in units/ml after			
	7 h	11 h	14 h	24 h
PA (0.05%)	83	117	122	179
PA (0.05%) + glycerol (1%)	94	198	259	386
PA (0.05%) + mannitol (1%)	98	173	225	480
PA (0.05%) + sorbitol (1%)	103	188	267	441

Table III.—41 H mycelium (batch 2051), washed and resuspended in 0.025 M phosphate buffer (pH 7.0). Mycelial dry weight: 2.24%.

Constituents added	Penicillin titre in units per ml after				
	3 h	7 h	11 h	14 h	24 h
PA (0.05%) + glycerol (1%) . . .	66	141	279	429	544
PA (0.05%) + glycerol (1%) . . . + DNP (0.0006 M) . . .	58	106	221	324	477
PA (0.05%) + KCN (0.005 M) . . .	26	46	112	201	500
PA (0.05%) + glycerol (1%) . . . + NaAsO ₂ (0.005 M) . . .	26	39	56	92	194

due to their not being converted, under the conditions of the experiment, into hexose by the reversal of the glycolytic pathway because of either the absence, or non-functioning, of the 'dicarboxylic acid shuttle' of TOPPER and HASTINGS¹¹. The passiveness of citrate, malate, and succinate in comparison with the effect of the hexoses is striking and seems to indicate *prima facie* that the tricarboxylic acid cycle plays no part in the biosynthesis of penicillin. Dinitrophenol, cyanide, and arsenite produce the inhibition at much higher concentrations than that observed with PA plus lactose system¹². Detailed work is being undertaken to understand the significance of this.

Fatty oils have been reported to enhance the production of penicillin¹³. From the results reported here with glycerol, it seems attractive to postulate that a significant part of this effect might be due to glycerol liberated from the oils by hydrolysis.

We are very much indebted to Miss I. NALINI who carried out the bioassays reported here.

ROSHAN J. IRANI and K. GANAPATHI

Antibiotics Research Centre, Pimpri (Poona District, India), May 28, 1958.

¹¹ Y. J. TOPPER and A. B. HASTINGS, J. biol. Chem. 179, 1255 (1949). – H. KREBS, Johns Hopk. Hosp. Bull. 95, 19 (1954).

¹² V. N. DESHPANDE and K. GANAPATHI, unpublished observations. – G. N. ROLINSON, J. gen. Microbiol. 11, 412 (1954). – W. J. HALLIDAY and H. R. V. ARNSTEIN, Biochem. J. 64, 380 (1956).

¹³ R. J. ANDERSON, E. G. H. TORNUST, and W. H. PETERSON, Agric. Food Chem. 4, 556 (1955).

¹ V. N. DESHPANDE and K. GANAPATHI, Exper. 13, 475 (1957); J. sci. industr. Res. (India), 17 C, 59 (1958).

² M. SOMOGYI, J. biol. Chem. 195, 19 (1952).

³ F. J. RYLEY, Biochem. J. 59, 353 (1955).

⁴ B. L. HORECKER, Brewers Digest 28, 214 (1953).

⁵ L. I. GIDEX and M. L. KARNOSVY, J. biol. Chem. 206, 229 (1954). – P. SCHAMBYE, H. G. WOOD, and G. POPJAK, J. biol. Chem. 206, 875 (1954). – R. W. SWICK and A. NAKAO, J. biol. Chem. 206, 883 (1954).

⁶ G. HAUSER and M. L. KARNOSVY, J. biol. Chem. 224, 91 (1957).

⁷ J. G. HAUGE, T. E. KING, and V. H. CHELDELIN, J. biol. Chem. 214, 11 (1955).

⁸ B. C. SISON and W. J. SCHUBERT, Nature 181, 1015 (1958).

⁹ J. MCCORKINDALE and N. L. EDSON, Biochem. J. 57, 518 (1954). – B. L. HORECKER and A. H. MEHLER, Ann. Rev. Biochem. 24, 243 (1955).

¹⁰ T. MANN and I. G. WHITE, Nature 178, 142 (1956).

Résumé

Les auteurs ont trouvé que le glycérol active la biosynthèse de la benzylpénicilline obtenue par des cellules lavées de *P. chrysogenum* suspendues dans un tampon de phosphate et d'acétate de phényle. Le lactate, le pyruvate, le citrate, le malate et le succinate n'ont été d'aucun effet. Le dinitrophénol, le cyanide et l'arsénite inhibent la biosynthèse de la pénicilline à un degré variable dans le milieu PA plus glycérol, aux concentrations de 0,0006 M, 0,005 M et 0,005 M respectivement.

Hydrolyse enzymatique de la propionylcholine, de l'acétylthiocholine et de la butyrylthiocholine par le rectus de grenouille

Dans une note antérieure¹, nous avons montré que le rectus de grenouille contient non seulement une acétylcholinestérase (AcChE) mais aussi une pseudocholinestérase (XChE), ces enzymes hydrolysant respectivement l'acétylcholine et la butyrylcholine.

Dans ce travail, nous avons recherché quelles étaient les interventions de ces enzymes dans l'hydrolyse d'autres esters présentant un intérêt physiologique, à savoir, la propionylcholine (PrCh), dont la nature biologique a été démontrée par BANNISTER *et al.*², GARDINER *et al.*³ et les esters acétique (AcThCh) et butyrique (BuThCh) de la thiocholine, largement utilisés, depuis KOELLE et FRIEDENWALD⁴, pour la détection histochimique des «vraies» et «pseudo» cholinestérases.

Nos essais ont été réalisés, avec la méthode manométrique classique de Warburg-Ammon. La technique d'obtention des broyats de rectus, les conditions expérimentales sont celles qui ont été décrites antérieurement. Les concentrations terminales des PrCh, AcThCh et BuThCh étaient de 0,01 M, celle du muscle de 0,2 g par cupule. En raison de la lenteur des hydrolyses, les résultats ont, dans tous les cas, été relevés 120 min après la mise en contact de l'enzyme (inhibé ou non) avec le substrat: on s'est assuré, par des lectures régulières réalisées entre-temps, que le substrat ne s'épuisait dans aucun cas.

Les anticholinestérases utilisés sont, comme antérieurement, le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.), inhibiteur sélectif de la XChE et le diiodométhylate de la bis(pipéridinométhyl-coumaranyl-5)cétone (3318 CT), inhibiteur sélectif de l'AcChE.

Les vitesses des hydrolyses enzymatiques sont rapportées dans le Tableau I. La propionylcholine occupe, sous cet aspect, une position intermédiaire entre l'acétylcholine et la butyrylcholine; les esters de thiocholine sont hydrolysés plus rapidement que les esters correspondants de la choline.

Ce même tableau montre que les C I 50 obtenues pour le D.F.P. et le 3318 CT permettent de rapprocher d'une part la PrCh et l'AcThCh de l'AcCh, et d'autre part, la BuThCh de la BuCh. Il apparaît ainsi que la PrCh et l'AcThCh sont, de façon prédominante tout au moins, hydrolysées par l'acétylcholinestérase et la BuThCh par la X cholinestérase.

Tableau I

Inhibitions des hydrolyses enzymatiques d'esters de la choline et de la thiocholine par le DFP et le 3318 CT

Esters		Hydrolyses enzymatiques*	Concentrations (M) inhibitrices 50%	
Nature	Concentrations		D. F. P.	3318 CT
AcCh . .	0,01 M	48,1 ± 16,2**	1,3 · 10 ⁻⁵	3 · 10 ⁻⁷
PrCh . .	0,01 M	24,1 ± 2,6	1,1 · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻⁶
AcThCh .	0,01 M	67,1 ± 10,4	3 · 10 ⁻⁵	2 · 10 ⁻⁶
BuCh . .	0,03 M	13,4 ± 3,2	3 · 10 ⁻⁹	3 · 10 ⁻⁴
BuThCh .	0,01 M	22,3 ± 3,2	6 · 10 ⁻⁹	2 · 10 ⁻³

* En mm³ CO₂ h/0,1 g muscle. ** Déviation standard.

Toutefois, quelques écarts des C I 50 et surtout l'analyse des courbes d'inhibition en fonction de la concentration des inhibiteurs montrent que les hydrolyses de la PrCh, de l'AcThCh et de la BuThCh ne peuvent pas être attribuées à un seul enzyme.

Les courbes d'inhibition par le D.F.P. (Fig. 1) sont les plus démonstratives.

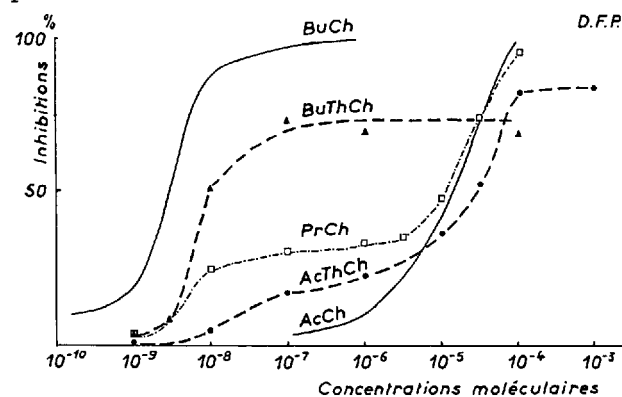


Fig. 1. Inhibition des hydrolyses des esters de choline et de thiocholine par le D.F.P.

En ordonnées: Inhibition en %.

En abscisses: Concentrations moléculaires de D.F.P.

□ --- □ PrCh ● --- ● AcThCh ▲ --- ▲ BuThCh
Chaque point est la moyenne d'au moins deux essais distincts réalisés chaque fois en duplicata. Les courbes de l'AcCh et de la BuCh sont empruntées au travail antérieur.

Pour la propionylcholine, la courbe se décompose très nettement en deux parties séparées par un long palier: dans la première partie, l'inhibition atteint jusqu'à 30% par l'effet de concentrations de D.F.P. ($1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$) qui n'influencent pas l'hydrolyse de l'AcCh mais inhibent celles de la BuCh jusqu'à 95–100%; la seconde partie, commençant pour 1 à $3 \cdot 10^{-6}$, est par contre très voisine de la courbe de l'AcCh; le palier intermédiaire correspond à une zone de concentrations où l'inhibition de la BuCh est maximale et où celle de l'AcCh débute à peine.

On ne peut donc s'empêcher de conclure que 30% de l'hydrolyse enzymatique de la PrCh sont en réalité assurés par la XChE.

Pour l'acétylthiocholine, la courbe se décompose de façon similaire, indiquant que la XChE intervient pour environ 15% de l'hydrolyse de cet ester.

Pour la butyrylthiocholine, aucun accident de la courbe ne permet de penser que l'AcChE interviendrait – en plus de la XChE – dans son hydrolyse.

¹ J. JACOB et M. DECHAVASSINE, Exper. 12, 434 (1956).

² J. BANNISTER, V. P. WHITTAKER et S. WIJESUNDERA, J. Physiol. 121, 55 (1953).

³ J. E. GARDINER et V. P. WHITTAKER, Biochem. J. 58, 24 (1954).

⁴ G. B. KOELLE et J. S. FRIEDENWALD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 70, 617 (1949).