

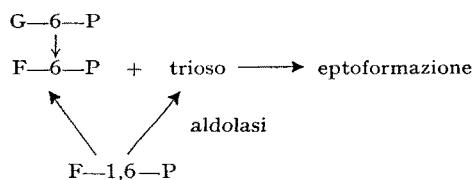
Il metodo di preparazione dell'estratto, le condizioni sperimentali seguite nelle prove enzimatiche, e i metodi di dosaggio, sono descritti nella nota precedente¹. L'unica variante era costituita dall'aggiunta del F-1,6-P alle prove enzimatiche contenenti il G-6-P (o il F-6-P). Prove enzimatiche di controllo contenevano il solo F-1,6-P. I risultati medi ottenuti da diverse esperienze sono riassunti nella Tabella.

Tabella

Substrato	μM eptoso/mg N ₂ proteico
7,5 μM glucoso-6-P	0,15
7,5 μM glucoso-6-P + 1,8 μM fruttoso-1,6-P	0,56
1,8 μM fruttoso-1,6-P	0,12

Come si vede, nelle prove enzimatiche contenenti il G-6-P insieme al F-1,6-P, si aveva la formazione di un numero di μM di eptoso molto superiore alla somma dei valori ottenuti nelle due prove in cui era presente singolarmente uno solo dei due substrati⁴.

Questa maggiore eptoformazione, a nostro parere, suffragherebbe l'ipotesi fatta precedentemente. I risultati ottenuti sono infatti facilmente interpretabili ammettendo che il meccanismo della eptoformazione sia identico in tutte e tre le prove. Esso potrebbe essere molto succinctamente così schematizzato:



Secondo lo schema, per la eptoformazione sarebbero necessari sia l'esoso-6-fosfato quanto il trioso.

Nelle nostre condizioni sperimentali, nelle prove in cui era presente il solo G-6-P, la velocità di eptoformazione sarebbe stata limitata dalle tracce di trioso-fosfato presenti nell'estratto; nelle prove in cui era presente il solo F-1,6-P, il processo sarebbe stato limitato dalla quantità di F-6-P derivato, durante l'incubazione, per idrolisi del F-1,6-P a livello del legame fosforico in posizione 1⁵. Nelle prove infine in cui erano presenti insieme ambedue i substrati, G-6-P e F-1,6-P, la velocità di eptoformazione

⁴ Lo stesso aumento, per quanto minore, si verificava anche nelle prove in cui, accanto al F-1,6-P, il G-6-P era sostituito dal F-6-P. Infatti, in presenza di 7,5 μM di F-6-P + 1,8 μM di F-1,6-P, si formavano 0,42 μM di eptoso/mg di N₂ proteico; in presenza invece delle sole 7,5 μM di F-6-P, se ne formavano 0,19 μM .

⁵ L'idrolisi del F-1,6-P è stata constatata dosando i fosfati liberi nel mezzo, prima e dopo l'incubazione, con il metodo di BERENBLUM e CHAIN⁶. Tale idrolisi si svolgeva soltanto a livello del legame fosforico in posizione 1. Infatti, come avevamo precedentemente constatato¹, durante l'incubazione non si aveva alcuna idrolisi del legame fosforico in posizione 6 del G-6-P e del F-6-P.

L'idrolisi del legame fosforico in posizione 1 del F-1,6-P, come abbiamo potuto constatare in prove enzimatiche a parte, veniva molto aumentata dall'aggiunta di Mg⁺⁺, il quale, come è noto, attiva la F-1,6-P-asi del muscolo scheletrico⁷.

Tracce di F-6-P erano d'altra parte già inizialmente presenti nel preparato commerciale di F-1,6-P da noi usato (NBCo), come è stato constatato mediante l'analisi eletroforetica su carta⁸.

⁶ I. BERENBLUM e E. CHAIN, Biochem. J. 32, 295 (1938).

⁷ K. LOHMAN, Biochem. Z. 262, 137 (1938).

⁸ H. E. WADE e D. M. MORGAN, Biochem. J. 60, 264 (1955).

sarebbe stata evidentemente molto maggiore, in quanto sarebbe aumentato di concentrazione il substrato che faceva da fattore limitante nel caso della eptoformazione a partire da G-6-P o da F-1,6-P separatamente.

S. SPERTI e V. MORET

*Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova,
12 Luglio 1958.*

Summary

F-1,6-P has been shown to increase the rate of 'non-oxidative heptoformation' from glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate in enzymatic preparations of rat skeletal muscle. The mechanism of this increase - probably due to triose-phosphate, formed by aldolase action on F-1,6-P - is discussed.

Sulla biochimica della fermentazione citrica da parte dell'*Aspergillus niger*

II⁰. Attività aspartico-glutamico transaminasica

In un lavoro precedente¹ abbiamo osservato che quando un ceppo selezionato di *Asp. niger* veniva coltivato (coltura superficiale) per circa 30 ore in un terreno carente di azoto (BERNHAUER) in cui si aveva accumulo di acido citrico, il rapporto tra la sua attività succino-deidrasica e quella «citrico-deidrasica» era molto maggiore rispetto a quello che si aveva allorché la stessa muffa veniva coltivata in un terreno completo (RAULIN) in cui l'acido citrico non si accumulava.

Questa osservazione suffragava l'ipotesi che nel nostro ceppo di *Asp. niger* potesse esser operante il ciclo tricarbossilico di Krebs e che l'accumulo di acido citrico, che si verificava allorché tale ceppo veniva coltivato in terreno di BERNHAUER, fosse dovuto ad una deficiente attività «citricodeidrasica».

Questo meccanismo non poteva però, da solo, spiegare il fatto che l'accumulo di acido citrico, durante la coltura del ceppo nello stesso terreno di BERNHAUER, aumentasse via via nel tempo in modo ben superiore a quello imputabile all'accrescimento della massa miceliare. D'altra parte abbiamo osservato che, coll'aumentare del tempo di coltura in BERNHAUER, diminuiva nel micelio dell'*Asp. niger* l'attività succino-deidrogenasica. Questo, a nostro parere, indicava che via via nel tempo diminuiva la velocità di rifornimento dell'acido ossalacetico, sia attraverso il ciclo tricarbossilico, sia anche attraverso il ciclo bicarbossilico eventualmente presente, perché la deidrogenazione dell'acido succinico è una delle tappe obbligatorie, in ambedue i cicli, per la formazione dell'acido ossalacetico.

Essendo d'altra parte quest'ultimo il necessario precursore per la biosintesi dell'acido citrico (com'è stato dimostrato da vari autori²), bisognava pensare che nel nostro ceppo sussistesse un altro meccanismo enzimatico, fornente acido ossalacetico, la cui attività aumentasse durante il tempo di coltura (30-48 h) in cui si verificava l'accumulo di acido citrico.

Nella ricerca oggetto di questa nota, abbiamo rivolto la nostra attenzione all'attività aspartico-glutamico transaminasica.

¹ V. MORET e M. LORINI, Rend. Acc. Naz. Lincei 23, 77 (1957).

² K. F. LEWIS e S. WEINHOUSE, J. Amer. chem. Soc. 73, 2500 (1951). - W. W. CLELAND e M. J. JOHNSON, J. Biol. Chem. 208, 679 (1954). - E. B. CHAIN, Proc. 3^o Cong. Int. Biochem. Bruxelles, 523 (1955).

Attività succino-deidrasica		Attività aspartico-glutamico transaminasica		Acido citrico accumulato nel mezzo colturale (mg)	
30 h	48 h	30 h	48 h	30 h	48 h
8,0	4,8	33,2	38,5	3,4	130
13,5	6,5	25,1	30,5	6,3	156
7,8	3,0	40,2	29,0	4,8	211
9,4	3,6	46,8	42,8	3,1	204
11,3	3,7	24,3	26,5	3,9	177
media: 10,0	4,4	33,9	33,4	4,3	175

Le condizioni ambientali di coltura (superficiale) del ceppo di *Asp. niger* in terreno di BERNHAUER e la preparazione dell'estratto enzimatico acellulare, sono quelle descritte nella nota precedente¹.

Le determinazioni venivano eseguite negli estratti dei due miceli ottenuti, dopo 30 h e dopo 48 h, dagli inoculi fatti con la stessa sospensione di spore, in modo che i valori ottenuti nei due tempi diversi fossero direttamente confrontabili, e non influenzati dalla diversità delle spore di volta in volta inoculate nella serie di esperienze.

L'attività succino-deidrogenasica veniva determinata misurando manometricamente al WARBURG il consumo di O₂ in presenza di bleu di metilene come trasportatore autossidabile di idrogeno.

L'attività aspartico-glutamico transaminasica veniva determinata col metodo di TONHAZY e coll.³, dosando l'acido piruvico derivato per decarbossilazione chimica dall'acido ossalacetico formatosi durante la transaminazione⁴. Tale dosaggio dell'acido piruvico (o, più precisamente, del suo dinitrofenil-ideazone) nell'estratto toluolico finale veniva eseguito sia direttamente a $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ (previa alcalinizzazione con KOH alcoolica), sia trattando l'estratto toluolico con Na₂CO₃ 15% e NaOH 1,5 N e facendo due letture al Beckman, una a $\lambda = 412 \text{ m}\mu$ e l'altra a 440 m μ , secondo il metodo proposto da GOODWIN e WILLIAMS⁵.

L'acido citrico veniva dosato col metodo di SAFFRAN⁶.

Nella tabella sono esposti i valori dell'attività succino-deidrogenasica (espressa in $\mu\text{l O}_2/\text{mg di N proteico in 20 min}$) e dell'attività transaminasica (espressa in $\mu\text{M di acido ossalacetico/mg di N proteico in 10 min}$) determinate nei miceli dopo 30 h e dopo 48 h di coltura in terreno di BERNHAUER.

I risultati ottenuti dimostrano che nell'intervallo di tempo 30-48 h, contemporaneamente ad un maggiore accumulo di acido citrico nel mezzo colturale, l'attività succino-deidrogenasica della muffa diminuiva e l'attività aspartico-glutamico transaminasica rimaneva praticamente costante.

A nostro parere quindi, la maggior formazione di acido ossalacetico necessaria per l'accumulo via via maggiore di acido citrico non può esser spiegata completamente né dall'attività transaminasica, né attraverso un meccanismo ciclico tricarbossilico o bicarbossilico eventualmente presente.

V. MORET e M. LORINI

*Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova,
21 luglio 1958.*

³ N. E. TONHAZY, N. G. WHITE e W. W. UMBREIT, Arch. Biochem. 28, 36 (1950).

⁴ Per questa determinazione l'estratto enzimatico veniva preparato in tampone fosfati potassici $M/10 \text{ pH} = 7,4$.

⁵ T. W. GOODWIN e G. R. WILLIAMS, Biochem. J. 51, 708 (1952).

⁶ M. SAFFRAN e O. F. DEUSTEDT, J. biol. Chem. 175, 849 (1948).

Summary

In a strain of *Asp. niger* grown in BERNHAUER medium, succinic-dehydrogenase activity decreased and aspartic-glutamic transaminase activity remained practically constant, while citric acid accumulated in the medium.

The Free Amino Acid Contents and Growth Rates of Polyploid *Saccharomyces*

Studies by SPIEGELMAN *et al.*¹ have suggested that haploid strains of *Saccharomyces* may possess twice the cellular free amino acid content of diploid strains. Such an indication is particularly provocative in two respects. First, in view of the established relationship between the quantity of the cellular free amino acid pool and the rate of protein synthesis², it suggests the possibility of a ploidy-dependent differential growth rate in yeasts. Direct information on this point has been scant and contradictory. BAUCH³, for example, has reported that polyploidization diminishes the growth rate of yeasts while WINGE and ROBERTS⁴ have maintained that the reverse is true. Second, of the numerous biochemical⁵, biophysical⁶ and morphological⁷ parameters defining ploidy in *Saccharomyces*, cellular free amino acid contents would be the first to show an inverse relationship to the level of polyploidy. This has crucial diagnostic significance since the absence of convincing cytogenetic information coupled with the extraordinarily cumbersome techniques of polyploid genetic analysis have recommended such parameters as the most rapid and reliable means for the precise identification of polyploidy in yeasts⁸ and other microorganisms as well⁹. Accordingly, the present study was undertaken to obtain definitive information concern-

¹ S. SPIEGELMAN, H. O. HALVORSON, and R. BEN-ISRAEL, *Amino Acid Metabolism* (W. McElroy and B. Glass, Johns Hopkins, Baltimore 1955), p. 124.

² H. O. HALVORSON and S. SPIEGELMAN, J. Bacteriol. 65, 496 (1953).

³ R. BAUCH, Naturw. 29, 503 (1941).

⁴ O. WINGE and C. ROBERTS, *The Chemistry and Biology of Yeasts* (A. H. Cook, Academic Press, New York 1958), p. 93.

⁵ M. OGUR, Arch. Biochem. and Biophys. 53, 484 (1954); J. Bacteriol. 69, 159 (1955). - M. OGUR, S. MINCKLER, G. LINDEGREN and C. LINDEGREN, Arch. Biochem. and Biophys. 40, 175 (1952).

⁶ W. H. LUCKE and A. SARACHEK, Nature 171, 1014 (1953). - A. SARACHEK, Cytologia 19, 77 (1954).

⁷ B. D. MUNDKUR, Exper. 9, 373 (1953). - G. F. TOWNSEND and C. C. LINDEGREN, J. Bacteriol. 67, 480 (1954).

⁸ C. C. LINDEGREN, G. LINDEGREN, R. B. DRYSDALE, J. P. HUGHES, and A. BRENES-POMALES, Genetica 28, 1 (1956).

⁹ J. B. CLARK and R. B. WEBB, J. Bacteriol. 70, 454 (1955). - J. E. OGG and M. R. ZELLE, J. Bacteriol. 74, 477 (1957).