ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVII.

1910

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIX.

1° Semestre.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1910

preparai alcuni tubi con aldeide benzoica e iodio oppure iodiobenzolo, gli uni furono scaldati per cinque giorni a 100° e poi tenuti al buio, gli altri subito conservati al buio dal novembre 1906. Nel febbraio 1910 tutti conservavano il loro aspetto e la colorazione primitiva, nè si era depositata sostanza solida cristallina.

In queste ricerche mi valsi frequentemente dell'opera del laureando in chimica sig. Bosinelli. A lui rendo pubblicamente i miei ringraziamenti.

Chimica — *Sul comportamento di talune ureidi e sostanze puriniche rispetto a soluzioni di benzoato sodico.* Nota di Giovanni Pellini e Mario Amadori, presentata dal Socio G. Ciamician.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

Fisiologia vegetale — *Esperienze sulla condensazione enzimatica degli zuccheri.* Nota di E. Pantanelli e G. Faure, presentata dal Socio R. Pirotta.

Un organismo che si sviluppa rapidamente in cultura pura ed ha un potere amilolitico così potente, che i giapponesi se ne servono industrialmente per saccarificare la poltiglia di riso cotto destinata alla preparazione del Saké, è l'*Aspergillus Oryzae*.

Pochi giorni dopo la semina in substrati contenenti amido, il poderoso micelio di questo fungo ha emesso una energica amilasi, la cui attività (o concentrazione?) cresce poi sempre, anche dopo la formazione delle spore per raggiungere un massimo verso il 30-40° giorno a 25° C. In seguito la attività amilolitica diminuisce nuovamente.

Croft Hill [1] ha già avuto l'idea di servirsi dell'amilasi dell'*Aspergillus Oryzae* per tentare la catalisi enzimatica del processo opposto all'amilolisi, cioè della sintesi dell'amido, ed ha ottenuto una debole condensazione, facendo agire questo enzima sopra una soluzione al 60 % di glucosio.

Siccome però egli si serviva del prodotto commerciale conosciuto col nome di *diastasi Taka*, così era da sperarsi che partendo direttamente da culture del fungo in diversi stadii di sviluppo, si potesse colpire una maggiore attività sintetica della sua amilasi.

[1] Proceed. Chem. Society, XVII (1901), pag. 184.

L'*Aspergillus Oryzae* fu seminato sopra 500 cc. di soluzione nutritizia, sterile, contenente:

Tartrato ammonico	1	pt.
Fosfato acido di potassio	0,5	»
Solfato di magnesio cristallino . .	0,5	»
Amido di riso	2	»
Acqua di fonte	100	»

ed allevato in termostato a 25° C. In tali condizioni, il 3° giorno comincia già la formazione delle spore.

A distanza di 5 giorni, furono prelevati con pipetta sterile saggi del liquido culturale e vi fu determinata l'acidità debole (per la fenolftaleina) e totale (per il tornasole), lo zucchero riduttore, il carbidrato totale, l'amido (1), l'attività amilasica tenendo per un'ora a 56° 10 cc. del liquido e 10 cc. di una salda d'amido di riso al 2 %, e l'attività condensatrice aggiungendo a 5 cc. di liquido enzimatico 15 cc. di sciroppo di glucosio al 72 %, e lasciando in riposo per 48h a 45° C; nell'uno e nell'altro caso determinando il potere riduttore col liquido di Fehling secondo il metodo di Allihn al principio ed alla fine della prova.

Abbiamo già detto quale sia la curva dell'amilasi in funzione dell'età della cultura. Un enzima condensante il glucosio in quelle condizioni di prova comincia a notarsi quando l'attività amilasica è già in decadenza, verso il 35-40° giorno di cultura ed aumenta in seguito leggermente, ma irregolarmente, fino all'ottavo mese; più tardi scompare. L'amilasi invece si conserva anche in culture vecchie di un anno, sebbene assai debole; anche gli enzimi dei disaccaridi, maltasi ed invertasi (quest'ultima compare nelle culture di questa elegante plectascinea anche in assenza di saccarosio) si conservano sebbene indeboliti.

L'attività dell'enzima condensante emesso nel liquido culturale è assai minore di quella dell'enzima contenuto nel micelio. Da un estratto acquoso di micelio di un mese di età preparato nel modo solito (2) abbiamo ottenuto i seguenti risultati, che riportiamo partitamente per dare una idea dell'entità del fenomeno.

5 cc. di estratto del micelio (1:5) furono mescolati con 15 cc. di soluzione concentrata di glucosio o zucchero invertito (ca. 4 mol.), oppure di saccorosio (ca. 2 mol.) ovvero di soluzione satura di lattosio. Questi miscugli furono addizionati di toluolo e conservati in pesafiltri con tappo smerigliato; l'esperienza fu fatta parallelamente a 45° e alla temperatura am-

(1) I metodi adoperati per determinare queste sostanze sono già stati descritti in precedenti lavori; per l'acidità v. Ann. di Botan., III (1905), pag. 120; per gli zuccheri e l'amido v. Staz. sperim. agr., XLI (1909), pag. 329.

(2) Descritto già in Jahrb. f. wiss. Botan., XL (1904), pag. 307.

biente. Dopo 4 giorni trovammo che il saccarosio ed il lattosio si erano idrolizzati, per ciò li abbandonammo e continuammo l'esperienza con gli altri due zuccheri.

Nella tabella i valori sono tutti calcolati come glucosio.

L'acidità dell'estratto di micelio adoperato era tale che 0,2 cc. di soluzione decinormale di NaOH bastavano a neutralizzarla per 100 cc. di estratto.

Milligrammi di zucchero riduttore in 1 cc. del miscuglio.

Zuccheri		al principio	dopo 4 giorni	dopo 11 giorni	dopo 36 giorni	dopo 115 giorni
Glucosio	a caldo . .	736	686	300	220	—
	a freddo . .	736	688	418	—	—
Z. invertito	a caldo . .	801	806	478	310	220
	a freddo . .	801	(856)	488	328	290
Glucosio controllo sterile .		736	—	—	—	528

Diminuzione dello zucchero riduttore in % del valore iniziale.

Zuccheri		dopo 4 giorni	dopo 11 giorni	dopo 36 giorni	dopo 115 giorni
Glucosio	a caldo . . .	7,24 %	44,9 %	71,3 %	—
	a freddo . . .	7,36 »	60,3 »	—	—
Z. invertito	a caldo . . .	—	39,2 »	47,6 »	64,5 %
	a freddo . . .	—	40,9 »	62,6 »	74,2 »
Glucosio controllo		—	—	—	28,9 »

Nella soluzione iniziale di glucosio, sterilizzata e tenuta come controllo, lo zucchero riduttore scese in 115 giorni a 528 mg., ossia ad un valore che nei miscugli con enzima era stato già raggiunto fra il 4° e l'11° giorno. In tutte queste prove lo zucchero non era diminuito per decomposizione, perchè alla fine dell'esperienza per mezzo di idrolisi con acido solforico diluito, si trasformò di nuovo quasi tutto il carbidrato in zucchero riduttore.

Per avere un'idea approssimativa della natura dei prodotti di condensazione, determinammo al principio ed alla fine dell'esperienza la *concentrazione molecolare* di questi miscugli mediante il *metodo crioscopico*, che prometteva risultati abbastanza netti, trattandosi di sostanze non elettrolite. Nella seguente tabella abbiamo riunito queste misure già calcolate in mol., paragonandole alle rispettive concentrazioni molecolari calcolate in base al potere riduttore, assumendo come unità di peso molecolare quello dei monosii (180).

Concentrazione molecolare.

Zuccheri		Al principio dell'esperienza		Alla fine dell'esperienza	
		sec. il pot. rid.	sec. det. criosc.	sec. il pot. rid.	sec. det. criosc.
Glucosio	a caldo . . .	4,09 mol.	4,32 mol.	1,22 mol.	3,24 mol.
	a freddo . . .	4,09 »	4,32 »	—	—
Z. invertito	a caldo . . .	4,44 »	4,62 »	1,22 »	5,45 »
	a freddo . . .	4,44 »	4,62 »	1,61 »	5,10 »
Glucosio controllo		4,09 »	4,32 »	2,93 »	3,49 »

Nelle soluzioni concentrate di glucosio diminuì la concentrazione molecolare, ossia aumentò la grandezza media delle molecole, o in altre parole una porzione delle molecole di esosio che esisteva in principio nel miscuglio si è condensata in molecole più grosse, ed il confronto col potere riduttore mostra che questo prodotto di condensazione deve avere poca o punta capacità riduttrice.

Anche nella soluzione controllo sterilizzata di glucosio si ebbe una diminuzione nella concentrazione molecolare presso a poco eguale a quella osservata nel miscuglio con enzima, mentre il potere riduttore subì una diminuzione molto minore. Questo prova che in assenza dell'enzima non si è formato quel prodotto di reversione non riducente, bensì un polisaccaride ancora riducente, che probabilmente sarà stato maltosio o isomaltosio, per analogia a quanto hanno trovato Croft Hill, E. Fischer ed Emmerling.

Nei miscugli con zucchero invertito parrebbe che l'enzima avesse fatto perdere il potere riduttore ai due monosii iniziali senza operare alcuna condensazione di molecole. La reversione sarebbe quindi stata apparente in questo caso. Siccome in altre misure analoghe abbiamo notato anche per lo zucchero invertito una leggera diminuzione della concentrazione molecolare, non possiamo per ora spiegare questo fatto.

Influenza della concentrazione. Nelle esperienze accennate ed in quelle dei precedenti autori fu osservata una condensazione solamente in soluzioni molto concentrate. La chimica fisica insegna che gli agenti catalitici, quindi probabilmente anche gli enzimi, possono accelerare solamente le reazioni chimiche di natura reversibile. In realtà questo postulato è infirmato dalle innumerevoli reazioni di ossidazione e riduzione, che non hanno affatto carattere reversibile, mentre sono catalizzate da enzimi e da agenti inorganici. Anche per le reazioni idrolitiche l'esperienza ha scosso in molti casi la pretesa reversibilità; così la maltasi condensa il glucosio in isomaltosio, che essa non può idrolizzare, mentre l'emulsina sintetizza dal glucosio il maltosio, che essa non attacca (Armstrong); così la lattasi forma da un miscuglio di glucosio e galattosio l'isolattosio e non il lattosio, che essa idro-

lizza (Fischer e Armstrong); così la revertasi forma dallo zucchero invertito l'isomaltosio, la levulosina, delle destrine ecc., ma non il saccarosio.

Ad ogni modo è certo che non vi può essere reversione di una reazione idrolitica se i prodotti di idrolisi non superano la concentrazione in cui essi stanno in equilibrio con l'idrolito, di qui la necessità di adoperarli in forte concentrazione. Si potrebbe però ritenere che, in soluzione molto concentrata la reazione idrolitica non sia più monomolecolare, ma bimolecolare, assumendo la poca *acqua* presente la parte di *massa attiva* nel sistema, e non più di semplice solvente. Da ciò deriverebbe anzitutto una forte diminuzione della velocità di reazione e in secondo luogo la possibilità di ottenere la reversione del processo anche in presenza di una minor quantità di zucchero (prodotto dell'idrolisi), purchè si stabilisca una elevata concentrazione, o, se si vuole, si diminuisca la concentrazione dell'acqua, aggiungendo molecole di sostanze estranee.

I nostri tentativi in questo senso furono fatti anzitutto sostituendo a 2 mol. di glucosio 2 mol. di un sale neutro, la concentrazione del glucosio era così abbassata a 36 %, ma non si ebbe alcuna condensazione, con *cloruro sodico*, *cloruro potassico*, *solfato potassico* (questo in parte indisciolto). Non è però escluso che questi sali o qualcuno dei loro ioni paralizzassero la attività reversiva dell'enzima, e non disperiamo di ottenere risultato positivo ricorrendo ad altri ioni.

Intanto, sostituendo a 2 mol. (sopra quattro) di glucosio 2 mol. di *mannite*, cioè di una sostanza non elettrolita assai affine allo zucchero, abbiamo ottenuto una condensazione del 36,2 % a temperatura ordinaria, e ciò prova che o la mannite entra anch'essa in condensazione insieme al glucosio, o la nostra tesi della funzione dell'acqua come massa attiva è giusta. Una nuova questione, che bisognerà risolvere.

Condensazione del maltosio. Finora abbiamo parlato della condensazione del primo gradino della sintesi dell'amido; ma dal glucosio per arrivare a questo carbidrato, che in un cloroplasto si forma in pochi minuti, nella *Spirogyra* in 15-20″ di illuminazione intensa, quanto è lunga la strada! Facendo agire liquidi culturali di *Aspergillus Oryzae*, o estratti acquosi o glicerinati del micelio, o il micelio stesso, impastato con tripoli ed asciugato fra carta, poi alla pompa e polverizzato, su soluzioni anche molto concentrate di maltosio (2 mol. = 68,4 %), non abbiamo finora potuto osservare una condensazione, per lo più anzi anche in quegli sciroppi si ha idrolisi (per opera della maltasi).

Le osservazioni precedenti di uno di noi sulla revertasi dei funghi [1] ci hanno però consigliato di ricorrere ad un ambiente debolmente alcalino,

[1] Rend. Accad. Lincei, 1907, II sem., pag. 424: Ber. Bot. Ges., XXVI *a* (1908), pag. 502.

ed in questo non solo abbiamo osservato una condensazione del 30-40 % del maltosio iniziale a 35° C, in 10 giorni, in sciroppi contenenti 68-70 % di maltosio, ma anche in soluzioni contenenti 8-10 % di maltosio si ebbe una reversione a prodotti non riducenti, precipitabili con alcool in forma di grossi fiocchi, cioè di natura destrinoide, oscillante fra 18 e 25 % del maltosio iniziale a 25° C in 10 giorni. Per ottenere questo risultato, basta che 100 cc. del miscuglio contengano 5-10 cc. di NaOH decinormale libera.

Questo fatto, già osservato anche per la revertasi, fa ritenere che l'enzima che opera la condensazione del maltosio non sia il medesimo che accelera l'idrolisi dell'amido o delle destrine a maltosio; nel miscuglio di enzimi fabbricato dal fungo si avrebbero accanto l'amilasi o destrinasi agenti in ambiente acido, e l'enzima sintetizzante, cioè condensante il maltosio, il quale agisce invece in ambiente alcalino.

Ricordando ora che il protoplasma della cellula in tutti gli organismi suole essere debolissimamente alcalino, mentre il succo dei vacuoli o in senso più generale estraplasmatico è più o meno acido, viene in luce un certo nesso tra i fatti da noi osservati *in vitro* e ciò che succede nella cellula vivente. Quivi il granello d'amido si forma sempre ed esclusivamente entro il plasma o stroma del cromatoforo, il quale è, al pari del citoplasma entro cui si trova immerso, debolmente alcalino, come dimostra la sua affinità per i coloranti acidi. D'altra parte il protoplasma che riempie totalmente la cellula giovanissima, a poco a poco si riduce ad un sottile strato periferico, mentre compaiono e s'ingrossano a dismisura i vacuoli; con ciò il terreno favorevole ai processi sintetici diminuisce progressivamente, mentre aumenta il campo per i processi idrolitici, costituito da vacuoli pieni di succo più o meno acido. Di qui l'attività costruttiva delle cellule giovani e quella distruttiva delle cellule adulte; di qui la difficoltà di fabbricare amido nei cloroplasti vacuolosi che s'incontrano nelle foglie colpite da malattie diverse.

Considerazioni simili si potrebbero estendere ancora largamente a tutti i casi di cellule in cui si osserva contemporaneamente la ricomparsa di un abbondante plasma ed il ripristino delle attività sintetiche, ma prima dovremo arricchire il patrimonio di fatti realmente osservati in questo campo delle sintesi enzimatiche, ancora ben poco noto.