

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIX.

1912

---

SERIE QUINTA

---

RENDICONTI

---

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

---

VOLUME XXI.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

---

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1912

Una determinazione ebullioscopica in benzolo, per quanto risponda sufficientemente al peso molecolare di un dimero, non può ritenersi sicura per il piccolo innalzamento ottenuto:

Solvente	Sost.	Conc.	Inn	M
12,25	0,1149	0,94	0,070	398

Calcolato per  $(C_{11}H_{12}O_3)_2 = 384$ .

Non è improbabile che il prodotto ottenuto per azione dell'acido solforico concentrato sull'isomiristicina sciolta in acido acetico glaciale corrisponda al dimero di quest'ultima, e però mi riservo di continuarne lo studio.

Porgo vivissimi ringraziamenti al prof. Enrico Rimini che mi ha indirizzato in queste ricerche, ed al laureando sig. Muzio Fedele che mi ha coadiuvato in alcune delle su riferite esperienze.

**Mineralogia.** — *Anfiboli di Monte Plebi presso Terranova Pausania* (Sardegna). Nota di DOMENICO LOVISATO, presentata dal Socio G. STRUEVER.

**Geologia.** — *Contributo allo studio del Cambriano della Sardegna*. Nota dell'ing. dott. M. TARICCO, presentata dal Socio C. F. PARONA.

Le Note precedenti saranno pubblicate nel prossimo fascicolo.

**Fisiologia vegetale.** — *Su la formazione del glicogeno nella cellula di lievito*. Nota di DIANA BRUSCHI, presentata dal Socio R. PIROTTA.

L'unico argomento per sostenere che la formazione del glicogeno nella cellula di lievito sia dovuta ad un enzima sintetico, si ha in una esperienza di Cremer (Ber. chem. Ges., 32, 1899, pag. 2002), il quale, avendo mescolato succo di lievito, spremuto col metodo di Buchner, ad una soluzione di fruttosio, vide formarsi in dodici ore una sostanza che si colorava in bruno con jodio.

Per chiarire la natura enzimatica del processo di formazione del glicogeno, ho fatto alcune esperienze, movendo dal seguente principio:

1. Se la formazione del glicogeno è dovuta ad un enzima, *narcotizzando* il lievito nel momento in cui sta per cominciare, essa dovrebbe aver luogo ugualmente come nel medesimo lievito non narcotizzato, visto che le

condizioni del liquido esterno non cambiano. A queste prove servì una razza pura isolata da un vino di Milazzo, nota per la facilità con cui forma il glicogeno, allevandola in mosto d'uva defecato e filtrato, addizionato di 5 gr. di tartrato ammonico per litro, in ampolle eguali, contenenti ognuna 100 cc. di mosto a 25° C. *Così l'etere come il cloroformio non impediscono la formazione del glicogeno se si applicano gradatamente al lievito in dose tale da non arrestare la fermentazione; la impediscono totalmente quando arrestano la fermentazione.* Questo risultato è ambiguo e si potrebbe spiegare ammettendo che la *glicogensintesi* sia della stessa natura della zimasi, o che la formazione del glicogeno dipenda dal processo di fermentazione, anzichè rappresentare una condensazione indipendente dello zucchero assorbito.

2. Ricorsi anche ad *antisettici* in dosi tali che notoriamente bastano a sospendere l'attività vitale senza molto danno degli enzimi, per lo meno di taluni enzimi, e cioè al timolo, alla formalina, al bisolfito di potassio. Il *timolo* però in dose appena sufficiente per arrestare la fermentazione impedisce totalmente la formazione di glicogeno; in quantità minore non impedisce nè l'uno, nè l'altro processo. Egualmente si comporta la *formalina*. Il *bisolfito* invece, in dose crescente da 60-80 mgr. per litro eccita notevolmente la fermentazione e la formazione di glicogeno; in dose crescente da 10 a 30 mgr. per 100 cc., ha una minore azione attivante, ma sempre parallela su ambo i processi; in dose crescente da 20 a 40 mgr. (per 100 cc.) attiva la fermentazione e limita la formazione di glicogeno a poche e piccole goccioline per ogni cellula, che si ridisciolgono più presto che nel controllo; ha quindi un'azione attivante su la glicogenasi e contraria alla sintesi.

3. Ho provato infine un antisettico più blando, che, in dose limitata, agisce come narcotico anche sul lievito (cfr. Pantanelli, Ann. di Bot., II, 1905, pag. 345; IV, 1906, pag. 33): voglio dire l'*alcool etilico*. Aggiungendo un mol. di alcool (per 100 cc.) a lievito a piena fermentazione, ma ancora privo di glicogeno, questo si forma immediatamente in quantità tale da riempire totalmente la cellula, plasma e vacuoli; e se si aumenta gradatamente, per es. di 6 in 6 ore, la dose dell'alcool fino ad arrestare la fermentazione (quindi anche la moltiplicazione), le cellule restano cariche di glicogeno per 10-15 giorni, fino a che muoiono senza discioglierlo. Se invece si aggiunge in una volta una dose di alcool sufficiente per arrestare subito la fermentazione, ciò che porta anche una leggera contrazione delle cellule, il glicogeno compare egualmente più presto che nelle culture di controllo; ma in minutissimi granuli, poi aumenta gradatamente, ma non di più che nel controllo e si ridiscioglie con eguale rapidità.

È dunque escluso che anche in questo modo si riesca a separare l'attività glicogenetica dall'attività vitale: si tratta piuttosto di un'azione nutritiva o stimolante dell'alcool, ed anzi, giacchè l'esperimento lo dimostra, possiamo ritenere che anche in condizioni ordinarie di fermentazione, il gli-

cogeno compaia quando appunto si fa sentire su la cellula di lievito l'azione dell'alcool prodotto dalla fermentazione stessa. *Non è dunque la concentrazione dello zucchero presente ed assorbito, ma la produzione dell'alcool il fattore che determina la formazione del glicogeno nel lievito* (<sup>1</sup>).

4. Questa osservazione mi ha fatto pensare che la spinta alla condensazione dello zucchero in glicerina potrebbe essere data dall'*azione disidratante* dell'alcool ed ho allora provato, se ricorrendo, anzichè alla semplice narcosi, ad un'azione disidratante (plasmolitica) energica, combinata a narcosi si possa sospendere l'attività vitale del lievito e stabilire nello stesso tempo le condizioni di concentrazione del mestruo cellulare, che verisimilmente sono indispensabili alla condensazione dello zucchero in glicogeno, come per altri enzimi è stato dimostrato (cfr. Pantanelli, Rendic. Accad. Lincei (5), XVII, 1907, II sem., pag. 419; Ber. bot. ges., XXVI, 1908, pag. 494; Pantanelli e Faure, Rendic. Acc. Lincei (5), XIX, 1910, I sem., pag. 489). A questo scopo, a lievito in piena fermentazione in 100 cc. del solito mosto e ancora privo di glicogeno, ho aggiunto  $\frac{1}{10}$  di mol. di mannite, glicerina, saccarosio, cloruro di calcio, basandomi su misure di Pantanelli (Ann. di Bot., IV, 1906, pag. 1), secondo cui, il limite plasmolitico del lievito non arriva quasi mai a 10 *is.* (= 1 mol. (litro) di  $\text{KNO}_3$ ).

Ad una prima serie di culture furono fatte queste aggiunte, ad una seconda serie furono prima aggiunti 3 cc. di etere, e subito dopo le dette sostanze; ad una terza serie  $\frac{1}{10}$  di mol. di alcool e subito dopo le dette sostanze, lasciando per ogni serie i relativi controlli senza narcotico o senza disidratante. La *mannite* ed il *cloruro di calcio* da soli hanno plasmolizzato le cellule, senza impedire del tutto la formazione di glicogeno, che invece non si è formato affatto in presenza di queste sostanze e di etere o di alcool. La *glicerina*, com'era da prevedersi, data la sua permeabilità (Pantanelli, Rendic. Accad. Lincei (5), XV, 1905, I sem., pag. 719; Swellengrebel, Centr. f. Bakter. (2), XIV, 1905, pag. 374), non ha plasmolizzato alcuna cellula nè arrestato la fermentazione ed ha favorito grandemente la formazione di glicogeno; ma lo stesso è accaduto dopo l'aggiunta di etere o di alcool. Il *saccarosio* non ha prodotto plasmolisi nè arrestata la fermentazione: ha favorito la formazione di glicogeno e ne ha impedito il discioglimento, così che dopo qualche settimana le cellule ancora ne rigurgitavano, sebbene la fermentazione fosse cessata da un pezzo. In presenza di etere il

(<sup>1</sup>) Infatti, nel lievito di birra o di distilleria, coltivato in substrato liquido, si forma glicogeno secondo Cremer (Zeitschr. f. Biol., XXXI, 1894, pag. 183) e Henneberg (Zeitschr. f. Spiritusind., 1902, n. 35), solamente in presenza di zucchero fermentescibile, non di lattosio, arabinosio, sorbosio, glicerina, mannite, amido, destrina, asparagina, peptone. I dati di Laurent (Ann. Inst. Pasteur, II, 1888, pag. 113; Bull. Soc. Belge de Microsc., XIV, 1890, pag. 29), che avrebbe ottenuto formazione di glicogeno anche in presenza di mannite, glicerina, lattosio, asparagina, peptone, glutamina, albumina, sono stati contraddetti da Cremer ed Henneberg.

saccarosio ha favorito la produzione del glicogeno, però meno che nelle cellule non eterizzate, e ne ha egualmente impedito la digestione. Invece in presenza di alcool si è avuto dapprima plasmolisi ed arresto della fermentazione; poi, scomparsa lentamente la plasmolisi, le cellule hanno ripreso a gemmare, a fermentare e in seguito è ricomparso il glicogeno in gran quantità.

Ho ripetuto la prova con la glicerina raddoppiando la dose ( $\frac{2}{10}$  di mol. per 100 cc.) ed ho ottenuto una transitoria plasmolisi tanto senza come in presenza di etere e dopo aggiunta di alcool: scomparsa la plasmolisi, le cellule hanno ripreso a sviluppare ed a fermentare e poco dopo è comparso il glicogeno.

Dunque, anche *combinando l'azione di un narcotico o di una sostanza che favorisce la formazione di glicogeno, quale è l'alcool, con l'azione di sostanze disidratanti, le quali dovrebbero favorire i processi sintetici, di condensazione, non si riesce a separare la produzione del glicogeno dalla piena attività vitale. Basta per molte cellule lo stato plasmolitico, che non rappresenta certo la sospensione dell'attività vitale, per impedire la formazione del glicogeno; scomparsa la plasmolisi, la facoltà di formare il glicogeno ricompare.*

5. Un altro mezzo per favorire le condensazioni enzimatiche consiste, secondo osservazioni di Pantanelli (Rendic. Acc. Lincei (5), XVI, 1906, pag. 419; XIX, 1910, pag. 489; Ann. di Bot., V, 1907, pag. 355; Ber. bot. Ges., XXVI, 1908, pag. 494), nel *neutralizzare l'acidità*, la quale si mostra invece favorevole alle idrolisi enzimatiche. Nel nostro caso questo mezzo presentava probabilità di riuscita, perchè Kayser e Boulanger (Chem. Centr., 1898, II, pag. 440) hanno trovato che il lievito forma tanto più glicogeno quanto minore è l'acidità dell'ambiente e che l'acido tartarico — il quale si trovava anche nel mosto d'uva da me adoperato — ha la massima azione inibente su la formazione del glicogeno. Anche Will (Centr. f. Bakter. (2), XVII, 1907, pag. 696) ha osservato più glicogeno in alcune razze di lievito coltivate in acqua di lievito *neutra* che in mosto d'orzo acido. Si sa poi che il glicogeno è digerito più presto nei liquidi molto acidi (Heinze, Centr. f. Bakter. (2), XII, 1904, pag. 360).

Quando il lievito era entrato in piena fermentazione e stava per formare il glicogeno, neutralizzavo con soda  $\frac{1}{5}$  norm., con o senza aggiunta di etere o di alcool nelle proporzioni su dette. Nelle culture non narcotizzate si osserva allora la formazione immediata di un'enorme quantità di glicogeno, che si ridiscioglie dopo 3-4 giorni. Nelle culture narcotizzate con etere si forma più glicogeno che nei controlli rimasti acidi, purchè la narcosi non sia spinta fino all'arresto della fermentazione, nel qual caso il glicogeno non si forma affatto; inoltre la quantità di glicogeno è minore che nelle culture neutralizzate, ma non eterizzate. Aggiungendo gradatamente alcool alle culture

neutralizzate, non si forma glicogeno, quando neppure è arrestata completamente la fermentazione. Quindi, *anche in ambiente neutro, non si riesce a provocare la formazione di glicogeno in cellule di lievito narcotizzate* (quando la fermentazione è avanzata).

6. Ho tentato allora di procedere per un'altra via: culture in piena fermentazione furono neutralizzate e addizionate di tanto alcool da rallentare fortemente la fermentazione; non si formò glicogeno e quando la fermentazione fu cessata (dopo circa 12-13 giorni) fu sostituito il liquido con mosto fresco, addizionato di 2 cc. di etere (per 100 cc.). *La fermentazione non riprese, le cellule non si moltiplicarono, rimasero però vive e dopo tre giorni comparvero granuli di glicogeno in varie cellule.* Avevo dunque finalmente realizzato una condizione sperimentale, in cui, dopo aver sospeso con la narcosi l'attività fermentativa e moltiplicativa delle cellule di lievito, si poteva determinare la formazione del glicogeno. Probabilmente nel primo periodo avevo, con l'aggiunta di alcool, impedito l'attivazione dello zimogeno (*prosintesi*), già formato nelle cellule, processo che si svolse poi lentamente (tre giorni) quando ebbi sostituito il mosto fresco acido. È noto, da ricerche di Pantanelli e mie (Ann. di Bot., VIII, 1910, pag. 133), che la trasformazione degli zimogeni in enzimi attivi è possibile al di fuori dell'attività vitale, mentre la formazione degli zimogeni è opera del protoplasma vivo (*proinvertasi*, *proamilasi*).

7. Anche un'altra via fu battuta con leggero successo: ad una cultura in mosto normale, in cui il glicogeno si sia formato e ridisciolto, così da far ritenere che le cellule non contengano più *prosintesi*, tolgo il liquido e lo sostituisco col liquido di un'altra cultura, in cui, con l'aggiunta di molto saccarosio ( $\frac{1}{10}$  mol = 34,2 %) e di alcool ( $\frac{1}{10}$  mol = 4,6 %), non solo ho provocato un'abbondante formazione di glicogeno, ma ne ho impedito il discioglimento; questo liquido dovrebbe quindi avere una composizione tale da favorire la produzione del glicogeno. Subito dopo la sostituzione, aggiungo 1 cc. di etere. *Dopo circa 24 ore compare il glicogeno in varie cellule ed aumenta nei giorni successivi, sebbene la fermentazione e la moltiplicazione non riprendano e le cellule si mostrino piuttosto sofferenti.* In questo caso, pare che anche la *prosintesi* si formi in cellule narcotizzate. È un risultato che va d'accordo con l'esperienza di Cremer, in cui il fruttosio, aggiunto al succo spremuto dal lievito e già privo di glicogeno, determinò nuovamente la formazione di questa sostanza.

8. I risultati positivi di questa e della precedente serie di esperienze mi hanno fatto pensare che, per realizzare la formazione di glicogeno in cellule narcotizzate o versanti in necrobiosi per azione di un antisettico blando, abbia molta importanza la scelta del momento in cui si sottopone il lievito al trattamento, sopra tutto in rapporto con lo *stadio di fermentazione*. Per dilucidare questo punto, ho tolto il liquido fermentato ad un certo numero

di culture già prive di glicogeno e l'ho sostituito con mosto fresco, esattamente *neutralizzato*, poi ogni due ore ho narcotizzato con *etere* una di esse, in dose tale da arrestare via via l'ulteriore gemmazione e la fermentazione. Accade allora che nelle cellule già esistenti si forma glicogeno, finchè la fermentazione non è ancora visibile, mentre non si forma ancora nelle cellule non eterizzate e neppure nelle nuove cellule eterizzate. Quando invece la fermentazione è appena cominciata, allora, in presenza di etere, si forma glicogeno in tutte le cellule vecchie e nuove, sebbene in piccola quantità, mentre nei controlli non è ancora comparso. Infine, quando la fermentazione è in pieno vigore, la narcosi impedisce la produzione di glicogeno parallelamente all'arresto della fermentazione. Risultati analoghi ho avuto adoperando un antisettico, il bisolfito di potassio (200 mgr. per litro) al posto del narcotico.

Questi fatti mostrano che la spinta alla condensazione del glicogeno, cioè *la formazione del proenzima sintetico si ha nel plasma subito dopo l'assorbimento dello zucchero*, ma soltanto in plasma che abbia già passato una fermentazione o abbia appena cominciato a fermentare la sintesi *effettua* la condensazione del glicogeno anche in cellule narcotizzate. Invece, *in cellule già in piena fermentazione, la narcosi impedisce anche l'azione della sintesi*. Questa apparente contraddizione dimostra che il glicogeno si forma per condensazione di qualche *prodotto intermedio della fermentazione*, probabilmente da un prodotto delle prime fasi del processo, ossia *la formazione del glicogeno rappresenta una reversione parziale di un processo singolo nella catena dei processi di digestione dello zucchero*, che noi percepiamo nell'insieme con fermentazione alcoolica. Si potrebbe cioè paragonare la sintesi del glicogeno alla formazione dell'asparagina dagli aminoacidi e da ammoniaca durante la digestione delle albumine nelle piante verdi: un processo laterale regressivo di sintesi, che si innesta sopra *una* delle fasi principali del processo principale di digestione.

Ciò spiega perchè solo in un dato momento della fermentazione sia possibile separare questa sintesi enzimatica dalla piena attività vitale, e perchè l'aggiunta di alcool (che per l'azione di massa ostacola le ultime fasi del processo fermentativo) e la plasmolisi con sostanze inerti (mannite, cloruro di calcio) favoriscono o provocano la formazione di glicogeno <sup>(1)</sup>. Data la sua natura di processo laterale, si comprende perchè

1) la formazione del glicogeno non sia di alcuna utilità per il lievito in condizioni di normale fermentazione, come hanno riconosciuto Will (Allgem. Brauer u. Hopfenzgt., 1892, pag. 1088) Lindner (Mikrosk. Betriebskontr., 1898, pag. 254), Meissner (Centr. f. Bakter. (2), IV, 1900, pag. 517; Wortmann (Landw. Jahrb., XXII, 1892, pag. 557); Henneberg (Zeitschr.

<sup>(1)</sup> La neutralizzazione del liquido ambiente può invece agire favorevolmente perchè inibisce il lavoro della glicogenasi (enzima idrolitico).

f. Spiritusind., 25, 1902, n. 35), Heinze (Centr. f. Bakter. (2); XII 1904-1905, pag. 60), mentre il glicogeno può, tutt'al più, rappresentare una sostanza di riserva per lievito che venga artificialmente messo a digiunare;

2) perchè il glicogeno scompare dal lievito quando lo zucchero non è ancora tutto fermentato (Jodlbauer, Zeitschr. f. Rübenzuckerind., 1888; Gontscharuk, Centr. f. Bakter (2), VI, 1900, pag. 546; Meissner; Wortmann, Ber. 20. Weinbaukongress, Mainz, 1902, pag. 31; Henneberg, Zeitschr. f. Spiritusind., 33. 1910, pag. 242; Heinze);

3) perchè il glicogeno si formi in maggior quantità nel lievito molto aereato (Henneberg), dove i prodotti di digestione dello zucchero sono utilizzati meglio per la costruzione di materiali cellulari diversi;

4) infine, perchè il glicogeno si forma, a preferenza in presenza di zuccheri fermentiscibili, mentre non è del tutto impossibile la sua origine anche da materiali non fermentiscibili, ma che possono comparire durante la digestione degli zuccheri, come la glicerina, l'acido lattico, l'acido succinico (Laurent).

Applicando anzi i nostri procedimenti di narcosi, plasmolisi ecc., si potrebbe passare in rassegna una gran quantità di composti organici e vedere quali di essi cadano sotto l'azione della glicogensintesi: si arriverebbe così a stabilire, da una parte, quale sia il prodotto intermedio della fermentazione, da cui il glicogeno si suole formare nel lievito; dall'altra parte, si porrebbe appunto la mano su almeno uno di quei prodotti intermedi della fermentazione alcoolica, la cui identificazione affatica da tanto tempo i ricercatori.

Agronomia. — *Siderazione o Biocoltura?* Nota del professore C. LUMIA, presentata dal Socio R. PIROTTA.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.