

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCÆI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

Chimica fisiologica. — *Contributo allo studio dell'azione dei fermenti peptolici sui polipeptidi* (1). Nota del dott. ANTONINO CLEMENTI, presentata dal Socio L. LUCIANI.

La sintesi artificiale dei polipeptidi e lo studio del loro comportamento biologico formano uno dei capitoli più brillanti della fisiologia dell'ultimo ventennio, che è valso a versare un fascio di luce nuova sul problema, così arduo e oscuro, della costituzione chimica della molecola proteica e delle trasformazioni, a cui essa va incontro durante i fenomeni della digestione nel tubo intestinale e durante il metabolismo cellulare. Dopo che mediante l'applicazione del metodo di Kossel e di Kutscher (2), per la determinazione quantitativa dei diaminoacidi (basi esoniche), e del metodo di Emilio Fischer (3), per la determinazione dei monoaminoacidi, una lunga schiera di illustri chimici fisiologi, sottoponendo alla analisi la molecola delle più svariate proteine, dimostrarono, che queste ultime sono costituite fundamentalmente dalle stesse pietre strutturali (gli aminoacidi), e che la differenza consiste in genere (tranne alcune eccezioni) nelle diverse proporzioni in cui esse sono presenti, alla attenzione dei fisiologi si è imposto il problema della ricomposizione sintetica del complesso edificio molecolare dell'albumina. Le ricerche di Schaal (4) sulla anidride dell'acido asparaginic e sulla trasformazione di questo in poliasparaginurea (Grimaux) (5) e in acido poliaspartico (Schiff) (6) e le ricerche di Schutzenberger (7) sulla unione di diversi aminoacidi (leucine e leucine) coll'urea mediante riscaldamento con anidride fosforica, e le ricerche di Lilienfeld (8), eseguite nel laboratorio di Kossel, e di Balbiano e Frasciatti (9), rappresentano ricerche iniziali in questo senso, le quali portarono alla sintesi di prodotti non ben definiti nè ben caratterizzabili, di cui rimangono sconosciuti la struttura e il grado di parentela con le proteine.

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica Fisiologica della R. Università di Roma.

(2) Kossel e Kutscher, *Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörpern*. Zeitschrift f. physiol. Chemie, XXXI, 165, an. 1900.

(3) Emil Fischer, *Ueber die Ester der Aminosäure*. Berichte der deutsche chemische Gesellschaft, 34, 4331, an. 1901.

(4) Schaal, *Ann. d. Chem.*, 157, 24, an. 1871.

(5) Grimaux, *Sur des colloïdes azotés*. Bull. Société chim., 38, 64, an. 1882.

(6) Schiff, *Ueber Poliaspartsäure*. Ann. der Chemie, 303, 183, an. 1898.

(7) Schutzenberger, *Recherches sur la synthèse des matières albuminoïdes et protéïques*. Comptes rendus, 106, 1407, an. 1888.

(8) Lilienfeld, *Ueber protenähnliche Substanzen*. Dubois Archiv., pag. 383, 1894.

(9) Balbiano e Frasciatti, *Ueber ein neues Derivat des Glykokolls*. Berichte der deutsch. chemische Gesellschaft, 33, 2323, an. 1900; 34, 150, an. 1901.

È ad Emilio Fischer⁽¹⁾ che spetta il merito immortale di essere riuscito per il primo a trovare dei metodi chimici esatti per legare fra loro le molecole degli aminoacidi stabilendo legami amidici tra il gruppo carbossilico e il gruppo aminico di distinte molecole, e ad ottenere, così, nuovi corpi chimicamente ben definiti e individualizzabili, che egli chiamò col nome generico di Polipeptidi o con quello speciale di Di-, Tri-, Tetrapeptidi a seconda del numero di aminoacidi, che prendono parte alla costituzione della loro molecola. Emilio Fischer ha voluto così adoperare una nomenclatura, che mentre da una parte ricorda la nomenclatura attualmente adoperata per la classe dei saccaridi, dall'altra indica, che questi corpi, artificialmente ottenuti per sintesi, sono molto affini ai peptoni naturali, i quali risulterebbero dall'unione di molte molecole di polipeptidi. I polipeptidi infatti hanno comuni con i peptoni molte reazioni colorate, come ad esempio la reazione del biureto, e reazioni colorate specifiche a secondo la presenza o la assenza di speciali aminoacidi nella loro molecola: così ad esempio i polipeptidi, in cui è presente il triptofano, danno positiva la reazione dell'acido gliossalico e negativa la reazione dell'acqua di bromo. La ebollizione dei polipeptidi di alto peso molecolare dà luogo a fenomeni, che ricordano la coagulazione delle proteine; d'altra parte poi i polipeptidi ad alto peso molecolare tendono a perdere la proprietà di cristallizzare e acquistano la tendenza a formare prodotti amorfi.

La dimostrazione biologica, che gli aminoacidi si trovano effettivamente legati fra loro nella molecola proteica in modo analogo a quello in cui lo sono nella molecola dei polipeptidi, è di doppia natura:

1°) l'isolamento chimico dai prodotti di idrolizzazione delle sostanze proteiche di polipeptidi, di cui precedentemente era stata compiuta la sintesi chimica artificiale (Fischer e Abderhalden)⁽²⁾;

2°) l'analogia esistente tra il modo in cui i fermenti peptolitici agiscono sulla molecola dei polipeptidi e il modo in cui agiscono sulla molecola delle proteine (Fischer e Bergell)⁽³⁾.

Il metodo, seguito per la prima volta da Fischer e Bergell e da Fischer e Abderhalden⁽⁴⁾, per studiare l'azione dei fermenti peptolitici sui polipeptidi,

⁽¹⁾ E. Fischer und Fourneau, *Ueber einige Derivate des Glykokolls*, Berichte der deutsche chemisch. Gesellschaft, 34, 2868, an. 1908; E. Fischer, *Aminosäure, Polipeptide und Proteine*, pag. 23, Springer, Berlin, 1906.

⁽²⁾ E. Fischer und Abderhalden, *Bildung eines Dipeptides bei der Hydrolyse des Seidenfibroins*. Berichte der deutsch. Gesellschaft, 33, 752, an. 1906.

⁽³⁾ E. Fischer und Bergell, *Ueber die Derivate einiger Dipeptide und Ihr Verhalten gegen Pankreasferment*, Berich. der deutsche chem. Gesell., 36, 2592, an. 1903; E. Fischer und Bergell, *Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment*, Berichte der deutsch. Chem. Gesell., 37, 2103, an. 1904.

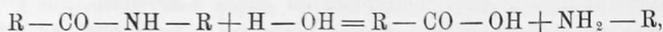
⁽⁴⁾ E. Fischer und Abderhalden, *Ueber das Verhalten verschiedener Polipeptide gegen Pankreassaft*, Zeitschr. f. Physiol. Chemie, XLVI, 52, an. 1915; E. Fischer und Abderhalden, *Ueber das Verhalten einiger Polipeptide gegen Pankreassaft*, LI, 264, an. 1907.

è un *metodo essenzialmente chimico* e ponderale consistente nell'isolamento e nella individualizzazione chimica, mediante la eterificazione, degli aminoacidi, in cui essi vengono o dovrebbero essere scissi per azione dei fermenti.

Abderhalden e Koerker⁽¹⁾ hanno elaborato in seguito un *metodo ottico* per lo studio dell'azione dei fermenti proteolitici sui polipeptidi, traendo profitto dal fatto osservato prima da Fischer, che molti polipeptidi sono otticamente attivi e posseggono un potere rotatorio più forte dei loro prodotti di scissione, donde la possibilità di constatare e seguire mediante determinazioni polarimetriche la scissione dei polipeptidi operata dagli enzimi.

Hans Euler⁽²⁾ ha elaborato un *metodo elettrometrico* per riconoscere e studiare la scissione dei polipeptidi operata dai fermenti.

I metodi finora in uso non sono dei metodi quantitativi, in senso assoluto ed io mi sono proposto di colmare tale lacuna. Poichè gli aminoacidi sono legati fra loro nella molecola dei polipeptidi in catena amidica, e poichè la loro scomposizione fermentativa dà luogo essenzialmente alla rigenerazione, da una parte, dei gruppi carbossilici e, dall'altra, dei gruppi amidici degli aminoacidi, secondo lo schema generale seguente:



è evidente che, determinando quantitativamente i gruppi aminici liberi dei polipeptidi prima e dopo l'azione dei fermenti peptolitici, possiamo riconoscere l'azione da questi esercitata sulla loro molecola. Il metodo che si può adoperare per la determinazione volumetrica dei gruppi aminici liberi è il metodo della titolazione al formolo di Sørensen. Lo stesso Sørensen⁽³⁾, descrivendo il suo metodo, scrisse: « Nello studio della scomposizione di polipeptidi o di miscele di polipeptidi, per cui manca finora un metodo generalmente pratico, la titolazione al formolo potrà essere di grande utilità ». Egli stesso, pur avendo adoperato il metodo della titolazione al formolo per lo studio della scissione di miscele di polipeptidi a costituzione chimica poco definita, non lo applicò per lo studio della scomposizione fermentativa dei polipeptidi allo stato chimicamente puro. Ricerche invece sulla determinazione quantitativa dei gruppi aminici liberi dei polipeptidi non mancano: Abderhalden e van Slyke⁽⁴⁾, Abderhalden e Haslian⁽⁵⁾ hanno studiato il comportamento di tutta una serie di polipeptidi rispetto al metodo di van Slyke della de-

(1) Abderhalden und Koerker, *Die Verwendung optisch activer Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente*. Zeitschr. f. Physiol. Chemie, LI, 294, an. 1905.

(2) Hans Euler, *Fermentative Spaltung von Dipeptiden*. Zeitschr. f. physiol. Chemie LI, an. 1905.

(3) Sørensen, *Enzymstudien*. Biochemische Zeitschrift, 7, 33, an. 1907.

(4) Abderhalden und van Slyke, *Die Bestimmung des Aminostickstoffs in einigen Polypeptiden*. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 74.

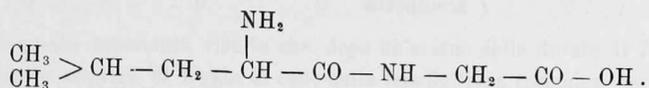
(5) Abderhalden und Haslian, *Ueber die Verwendung der Estermethode zum Nachweis von Aminosäuren neben Polypeptide*. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 77.

terminazione dei gruppi aminici liberi: Sørensen studiò il comportamento rispetto alla titolazione al formolo della anidride della glicocolla e della glicilglicina, e trovò, che l'anidride della glicocolla si comporta come un corpo neutrale e la glicilglicina come un acido monobasico.

Teoricamente noi dobbiamo ammettere, che il comportamento di un polipeptide rispetto al formolo resterà invariato nel caso in cui il polipeptide non viene scisso dal fermento proteolitico e invece cambierà nel caso in cui viene scisso dal fermento negli aminoacidi suoi componenti, data la rigenerazione dei gruppi aminici e carbossilici liberi di questi ultimi.

La leucilglicina è il dipeptide, che io ho scelto per le presenti esperienze.

La d-l-leucilglicina risulta costituita dalla unione in catena amidica di una molecola di leucina e di una molecola di glicocolla, secondo la seguente formola di costituzione



Ho preparato la leucilglicina racemica, secondo il procedimento usato da Emil Fischer e Brunner (1), cioè per trasformazione della glicocolla in bromisocapronilglicina e di questa in leucilglicina. La molecola della leucilglicina contiene un gruppo carbossilico e un gruppo aminico: quindi essa presenterà nella titolazione al formolo il comportamento di un acido monobasico. Per ricercare se tale comportamento rimanga inalterato, quando il dipeptide non viene scomposto dai fermenti peptolitici, e come esso varia, quando il dipeptide viene idrolizzato per azione fermentativa, ho sottoposto la leucilglicina all'azione del succo pancreatico e all'azione dell'estratto acquoso di fegato.

Azione del succo pancreatico sulla d-l-leucilglicina. — Per studiare il comportamento della leucilglicina verso il succo pancreatico, 10 cc. di soluzione 1/40 n. di leucilglicina furono mescolati a cc. 0,5 di succo pancreatico ricavato da un cane portante una fistola permanente pancreatica alla Pawlow, e dopo aggiunta di toluolo furono posti in termostato a 37 gradi per la durata di 25 giorni. Le cifre ottenute nella titolazione alla formaldeide di 10 cc. di soluzione di leucilglicina, di soluzione di leucilglicina più succo pancreatico, e di succo pancreatico più acqua, sono riportati nella seguente tabella:

(1) Fischer und Brunner, *Sintese von Polipeptide*, XI, Liebigs'annalen der Chemie, 340, 123, an. 1905; Fischer und Abderhalden, loc. cit., Zeitschr. f. physiol. Chemie, 46, an. 1905.

	1 marzo 1915 27 " "	(in termostato a 37°)	Quantità adoperata di NaOH 1/5 n	
			in cem.	in % del calcolato
<i>d-l</i> -Leucilglicina	1/40 n. cc.	10	1,25	100
<i>d-l</i> -Leucilglicina	1/40 n.	10	1,30	
Succo pancreatico		0,5		
Succo pancreatico		0,5	0,10	
Acqua distillata		10		
Come leucina	{	calcolato	2,50	
+ glicocollo		trovato	1,20	
			in mgr.	in %
<i>d-l</i> -leucilglicina	{	aggiunta	42	100
		scomposta	0	0

Risulta, da questa esperienza, che 10 cc. di leucilglicina 1/40 n. richiedono, sia prima sia dopo un'azione della durata di 25 giorni, dei fermenti del succo pancreatico, la stessa quantità di cc. di NaOH n/5: *il risultato di questa esperienza dimostra, che la leucilglicina, non viene idrolizzata dal succo pancreatico.*

Un analogo risultato ebbero Fischer e Brunner (loc. cit.) servendosi del metodo chimico: essi sciolsero un grammo di leucilglicina in 35 cc. di acqua e 3 cc. di succo pancreatico, e lo lasciarono a digerire in termostato per 14 giorni: trovarono, che il liquido non era diventato otticamente attivo, e riottennero il dipeptide aggiunto: nella soluzione madre non poterono riscontrare col metodo della eterificazione la presenza di glicocollo e di leucina; in una seconda e in una terza ricerca il risultato fu eguale. Gli autori ne dedussero che il succo pancreatico non è capace di idrolizzare la leucilglicina racemica.

Azione dell'estratto acquoso di fegato sulla d-l-leucilglicina. — L'estratto acquoso di fegato di cane adoperato fu preparato pestando al mortaio con polvere di quarzo frammenti di fegato di cane da poco ucciso, diluendo con acqua e filtrando: 5 cc. dell'estratto acquoso così preparato furono mescolati con 10 cc. di una soluzione di leucilglicina racemica 1/20 n. e messi a digerire in termostato a 37 gradi per la durata di 7 giorni.

Le cifre ricavate dalla titolazione al formolo di 10 cc. di soluzione 1/20 n. di leucilglicina dalla titolazione al formolo di estratto acquoso di fegato più la soluzione del dipeptide e dell'estratto acquoso più acqua sono riportate nella seguente tabella:

10 febbraio 1915	(in termostato	Quantità adoperata di NaOH n/5
1 " "	a 17°)	in cem. in % del calcolato
<i>d-l</i> -Leucilglicina	1/20 n. cc. 10	2,30 92
<i>d-l</i> -Leucilglicina	1/20 n. " 10	4,30
Estr. acq. di fegato di cane	" 5	
Acqua	" 10	
Estr. acq. di fegato di cane	" 5	0,60
Come leucina	{ calcolato	5,00
+ glicocollo	{ trovato	3,70
		in mgr. in %
<i>d-l</i> -Leucilglicina	{ aggiunta	94 100
	{ scomposta	49 52

Da questa esperienza risulta che, dopo un'azione della durata di 7 giorni dell'estratto acquoso di fegato di cane sulla leucilglicina racemica, per la titolazione al formolo erano necessari cem. 3,7 di idrato di sodio 1/5 n.; come si vede, si ebbe un aumento rispetto al numero di cem. di idrato di sodio necessari per titolare 10 cc. di soluzione 1/20 n. di leucilglicina prima dell'azione dell'estratto acquoso di fegato. Questo risultato dimostra che *una scissione della leucilglicina in leucina e glicocollo avviene per opera dei fermenti epatici*; però questa scissione non è estesa a tutta la quantità di dipeptide presente nella soluzione, poichè, teoricamente, se tutta la leucilglicina fosse stata scissa in leucina e glicocollo, sarebbero stati necessari, per la titolazione al formolo, cc. 5 di NaOH n/5.

In base al calcolo dell'N aminico, risulta che dei 94 mmgr. di *d-l*-leucilglicina aggiunta solo 49 furono scissi per azione dell'estratto acquoso del fegato: cioè esattamente la metà della quantità totale di *d-l*-leucilglicina sottoposta all'azione dell'estratto di fegato venne scomposta in leucina e glicocollo.

Questi risultati concordano perfettamente con quelli ottenuti dagli autori che studiarono precedentemente l'azione dei fermenti proteolitici sui polipeptidi con altri metodi di ricerca, specialmente per ciò che riguarda il modo in cui agiscono i fermenti peptolitici sui polipeptidi racemici: infatti, mentre da una parte confermano, che la leucilglicina viene scissa dall'estratto di fegato (Abderhalden e Teruchi) (1), e non dal succo pancreatico (Fischer

(1) Abderhalden und V. Terunchi, *Das Verhalten einiger Peptide gegen Organextrakte*, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 47, 466, 1906; Abderhalden und V. Terunchi, *Studien über die proteolitische Wirkung der Pressäfte einiger tierischen Organe sowie des Darmsaftes*, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 49, 1, 1906.

e Brunner, loc. cit.), *rappresentano il primo dato di indole quantitativa finora noto a favore del principio di E. Fischer, che i polipeptidi racemici vengono scissi dai fermenti peptolitici in modo asimmetrico*, cioè che delle due forme otticamente attive, di cui risulta costituito il polipeptide racemico, ne viene idrolizzata dai fermenti peptolitici solo una metà.

Furono Fischer e Bergell (loc. cit.) che per i primi osservarono che la pancreaticina, agendo sulla carbetoxilglicil-dl-leucina, mette in libertà della leucina sinistrogira; subito dopo, essi osservarono che la pancreaticina, agendo sulla leucilalanina racemica, mette in libertà leucina sinistrogira e lascia intatta una parte del dipeptide. Per ciò che riguarda la leucilglicina, Abderhalden e Teruchi (loc. cit.), facendo agire estratto acquoso di fegato di vitello su 5 grammi di leucilglicina racemica, poterono isolare dai prodotti di scissione gr. 1,3 di leucina sinistrogira, e in una seconda esperienza, in cui sottoposero all'azione dell'estratto di fegato 4 grammi di leucilglicina, riottennero gr. 0,7 di leucina sinistrogira e gr. 0,5 di cloridrato di etere di glicocola e gr. 0,7 di anidride di leucilglicina; così finora, poichè il metodo adoperato, non può essere strettamente quantitativo, *fu dimostrato solo qualitativamente* che la scomposizione fermentativa dei polipeptidi racemici decorre in modo asimmetrico. La esperienza surriferita dimostra per la prima volta quantitativamente, che della quantità totale del dipeptide sottoposto all'azione dei fermenti peptolitici epatici, solo la metà viene scissa nei suoi componenti.

Riserbandomi di estendere le presenti ricerche, io credo frattanto di potere venire alle seguenti conclusioni sintetiche:

1°) *Per lo studio della azione dei fermenti peptolitici sui polipeptidi, un metodo praticamente assai adatto è il metodo volumetrico della titolazione alla formaldeide dei gruppi aminici liberi dei polipeptidi e dei loro prodotti di scissione.*

2°) *Questo metodo presenta rispetto al metodo chimico di E. Fischer, il vantaggio di poter adoperare per ogni esperienza quantità piccole di polipeptidi; rispetto al metodo ottico di Abderhalden, il vantaggio di poter sperimentare anche con polipeptidi di aminoacidi otticamente inattivi; rispetto al metodo elettrometrico di Euler, il vantaggio della rapidità delle determinazioni; rispetto a tutti questi metodi insieme, il vantaggio di potere eseguire determinazioni rigorosamente quantitative.*

3°) *Applicando il metodo volumetrico della titolazione al formolo si rileva che per azione del succo pancreatico la d-l-leucilglicina non viene scissa, mentre per azione dei fermenti peptolitici del tessuto epatico, solo metà della quantità totale di d-l-leucilglicina aggiunta viene idrolizzata; questo risultato rappresenta il primo dato sperimentale di natura quantitativa, finora assodato, a favore del principio dell'azione asimmetrica dei fermenti peptolitici dell'organismo sui polipeptidi racemici.*