ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

2° SEMESTRE.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

Fisiologia. — *Microtitolazione alla formaldeide e sue applicazioni in fisiologia* [1]. Nota II del dott. A. Clementi, presentata dal Socio L. Luciani [2].

II.

Applicazione allo studio dei fermenti peptidolitici della microtitolazione alla formaldeide.

In ricerche precedenti [3] io ho studiato l'azione dei fermenti peptolitici sui *polipeptidi* mediante la *determinazione quantitativa dei gruppi aminici liberi*. I risultati, ottenuti colla *microtitolazione alla formaldeide, nella analisi di soluzioni di aminoacidi e di polipeptidi chimicamente puri* [4], mi hanno fatto prevedere la possibilità teorica di applicare la microtitolazione al formolo nello studio dei fermenti che scindono i polipeptidi, ottenendo il vantaggio dell'uso di quantità di polipeptidi ancora inferiori a quelle adoperate nelle ricerche precedenti in cui ho impiegato il metodo originale di Sörensen. Ho studiato nelle seguenti esperienze con questo procedimento l'azione del succo pancreatico, dell'estratto acquoso di fegato e di muscoli sul dipeptide *dl*-leucilglicina; le prove decorsero sempre sotto l'influenza antisettica del toluolo.

Tabella I.

48 ore a 37° in termostato	Quantità adoperata di NaOH 1/50 *n* in cmc.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 10:		
Estratto acquoso di fegato di vitello cmc. 0,2. Toluolo cmc. 0,5	1,170	
Acqua distillata cmc. 10:		
Estratto acquoso di fegato di vitello cmc 0,2. Toluolo cmc. 0,5	0,425	
Come leucina + glicocolla . . . calcolato . .	1,000	
Come leucina + glicocolla . . . trovato . . .	0,745	
	in mmgr.	in %
dl-leucilglicina . . . . . aggiunta . .	1,88	100
dl-leucilglicina . . . . . idrolizzata. .	0,94	50

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica fisiologica della R. Università di Roma.
(2) Pervenuta all'Accademia il 2 luglio 1915.
(3) A. Clementi, *Contributo allo studio dell'azione dei fermenti proteolitici sui polipeptidi*. Rendiconti della R. Acc. dei Lincei, vol. XXIV, serie 5ª, 1° sem., pag. 972.
(4) A. Clementi, *Microtitolazione alla formaldeide e sue applicazioni in fisiologia. I. Generalità sulla microtitolazione alla formaldeide*. Rendiconti della R. Accademia dei Lincei, vol. XXIV, serie 5ª, 2° sem., pag. 51.

TABELLA II.

48 ORE A 37° IN TERMOSTATO		QUANTITÀ ADOPERATA DI Na OH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 10: Estratto acquoso di fegato di vitello cmc. 0,2. Toluolo cmc. 0,5		1,050	
Acqua distillata cmc. 10: Estratto acquoso di fegato di vitello cmc. 0,2. Toluolo cmc. 0,5		0,425	
Come leucina + glicocolla . . .	calcolato . .	1,000	
	trovato . . .	0,625	
		in mmgr.	in °/.
dl-leucilglicina	aggiunta . .	1,88	100
	idrolizzata. .	0,47	25

TABELLA III.

48 ORE A 37° IN TERMOSTATO		QUANTITÀ ADOPERATA DI Na OH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 20: Estratto acquoso di muscolo pettorale di cane liberato dal sangue e freschissimo cmc. 0,5		1,200	
Acqua distillata cmc. 20: Estratto acquoso di muscolo pettorale di cane cmc. 0,5		0,150	
Como leucina + glicocolla . . .	calcolato . .	2,000	
	trovato . . .	1,050	
		in mmgr.	in °/o
dl-leucilglicina	aggiunta . .	3,76	100
	idrolizzata. .	0,18	5

TABELLA IV.

72 ORE A 37° IN TERMOSTATO	QUANTITÀ ADOPERATA DI NaOH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 20:		
Estratto acquoso di mucosa intestinale di vitello cmc. 0,5.	1,850	
Acqua distillata cmc. 20:		
Estratto acquoso di mucosa intestinale di vitello cmc. 0,5.	0,400	
Come leucina + glicocolla . . . calcolato . .	2,000	
Come leucina + glicocolla . . . trovato . . .	1,450	
	in mmgr.	in °/₀
dl-leucilglicina . . . . . aggiunta . .	3,76	100
dl-leucilglicina . . . . . idrolizzata .	1,68	45

TABELLA V.

48 ORE A 37° IN TERMOSTATO	QUANTITÀ ADOPERATA DI NaOH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 20:		
Estratto acquoso di muscolo di vitella cmc. 0,2.	1,300	
Acqua distillata cmc. 20:		
Estratto acquoso di muscolo di vitella cmc. 0,2.	0,300	
Come leucina + glicocolla . . . calcolato . .	2,000	
Come leucina + glicocolla . . . trovato . . .	1,000	
	in mmgr.	in °/₀
dl-leucilglicina . . . . . aggiunta . .	3,76	100
dl-leucilglicina . . . . . idrolizzata .	0,0	0

TABELLA VI.

7 GIORNI A 37° IN TERMOSTATO		QUANTITÀ ADOPERATA DI NaOH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 20:			
Estratto acquoso di muscolo di cane (lavati con acqua e lasciati 24 ore a temperatura ambiente) cmc. 0,5.		1,325	
Acqua distillata cmc. 20:			
Estratto acquoso di muscolo di cane cmc. 0,5.		0,310	
Come leucina + glicocolla . . .	calcolato . .	2,000	
	trovato . . .	1,015	
		in mmgr.	in %
dl-leucilglicina	aggiunta . .	3,76	100
	idrolizzata .	0,0	0

TABELLA VII.

7 GIORNI A 37° IN TERMOSTATO		QUANTITÀ ADOPERATA DI NaOH 1/50 *n* IN CMC.	
dl-leucilglicina 1/1000 *n* cmc. 20:			
Estratto acquoso di fegato di cane (dopo 24 ore della morte dell'animale) cmc. 0,5		1,435	
Acqua distillata cmc. 20:			
Estratto acquoso di fegato di cane cmc. 0,5.		0,200	
Come leucina + glicocolla . . .	calcolato . .	2,000	
	trovato . . .	1,235	
		in mmgr.	in %
dl-leucilglicina	aggiunta . .	3,76	100
	idrolizzata .	0,87	*23*

I risultati ottenuti in queste esperienze confermano, per quanto riguarda l'erepsina intestinale e la peptidasi epatica, i risultati delle mie ricerche precedenti [1], e cioè dimostrano quantitativamente, che solo la metà (o meno della metà) della quantità totale della *dl*-leucilglicina sottoposta alla loro azione viene idrolizzata dai fermenti peptidolitici; dimostrazione quantitativa del principio dell'azione asimmetrica dei fermenti peptidolitici sui polipeptidi racemici, dedotto finora specialmente dalle osservazioni polarimetriche.

Per quanto riguarda l'azione degli estratti muscolari sulla *dl*-leucilglicina i risultati ottenuti nelle presenti ricerche meritano qualche considerazione, poichè da essi non si rileva, che l'estratto muscolare abbia esercitato un'azione evidente sul dipeptide; è da ricordare in proposito, che in alcune esperienze Aberhalden e Teruuchi [2] facendo agire succo ottenuto con la pressa di Buchner da muscoli di vitello su gr. 1,5 di glicilglicina, su 4 gr. di leucilglicina e su 4 gr. di glicildl-alanina adoperando il metodo della eterificazione, non poterono constatare alcuna scissione dei dipeptidi aggiunti oppure una lievissima scissione. Gli Autori rilevarono questo fatto, ma non si credettero autorizzati per ciò a concludere, che il succo pressato di vitello possiede poca o nessuna azione proteolitica; essi ricordarono, che in altre esperienze, dove fu adoperato succo di muscoli freschi di coniglio, si potè constatare un'azione proteolitica. Per spiegare quindi questa contraddizione essi emisero l'ipotesi, o che i muscoli di vitello non sono adattati alla scomposizione e alla rigenerazione rapida delle proteine a differenza dei muscoli di conigli, o che i muscoli, adoperati nella loro esperienza, non erano abbastanza freschi; conclusero in ogni modo rilevando, che questo fatto meritava di essere ulteriormente studiato, tanto più che nel succo di muscolo di cane, essi trovarono presente l'azione proteolitica. I risultati delle mie ricerche credo che mettono nuovamente sul tappeto il problema della esistenza e del comportamento dei fermenti peptidolitici nel *tessuto muscolare:* infatti, oltre l'ipotesi di Aberhalden si può fare un'altra supposizione e cioè, che la presenza o l'assenza di sangue nel tessuto muscolare adoperato determini o partecipi alla variazione dei risultati delle diverse esperienze: mi riservo frattanto di riprendere la questione e mediante ricerche esaurienti risolverla definitivamente.

Le conclusioni, a cui le presenti ricerche conducono sono le seguenti:

1°. La *microtitolazione alla formaldeide* può trovare campo di applicazione fecondo nella ricerca e nello studio dei *fermenti che idrolizzano i polipeptidi.*

(1) A. Clementi, loc. cit.

(2) Aberhalden e Teruuchi, *Studien über die proteolistitche Wirkung der Prebsäfte einiger tierischer Organe sowie des Darmsaftes.* Zeitschrieft f. Physiologische Chemie. Bd. 49, 1906, pag. 5.

2°. La dimostrazione *quantitativa* del principio di Emilio Fischer dell'azione asimmetrica esercitata dalle peptidasi sui polipeptidi racemici, che a me è riuscito di portare per la prima volta applicando il metodo originale di Sörensen, scaturisce anche da queste ricerche in cui fu applicato il metodo della microtitolazione al formolo.

3°. A spiegare i risultati negativi ottenuti per quanto riguarda l'azione peptidolitica di *estratti acquosi muscolari* sono necessarie ulteriori esperienze che stabiliscano la parte che nel determinismo di tali risultati spetta al sangue o al siero di sangue.

Mi riserbo di studiare la possibilità pratica dell'applicazione della microtitolazione alla formaldeide per la determinazione dell'azione dell'arginasi, per la ricerca quantitativa degli aminoacidi nel sangue e in altri liquidi dell'organismo.

E. M.