

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
ANNO CCCXVI.

1919

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXVIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1919

Fisiologia. — *Contributo alla conoscenza degli enzimi. II: La proteasi e la lipasi dell'orzo germogliato* (1). Nota di D. MACESTRINI, presentata dal corrisp. S. BAGLIONI.

Proteasi. — Il potere proteolitico dell'orzo germogliato fu dimostrato da v. Gorup-Besanez (2), ed in seguito confermato da W. Windisch und B. Schellhor (3), da M. Fennbach e L. Hubert (4), e più recentemente da Francesco Weis (5) e da altri.

Le nostre ricerche furono continuate nel modo seguente: l'estratto acido di farina di orzo germogliato, ottenuto nel modo detto nella Nota precedente (6), si passava per un setaccio metallico con maglie di 1 mmq. e, avendo nel liquido lattiginoso, così ottenuto, riconosciuto un rilevante potere proteolitico, coi metodi qualitativi *fibrinolitico* e *gelatinolitico* furono fatte varie ricerche, determinando alla fine di ogni digestione la quantità degli aminoacidi formati, seguendo, in parte, una recente modificazione del metodo di S. P. L. Sørensen (7):

« La miscela digerita si versa in un palloncino da 250 cm.³; si aggiunge un eccesso di soluzione saturata di acetato di piombo, per precipitare carbonati e fosfati; dopo alcune ore, si precipita l'eccesso di sale di piombo, mediante soluzione saturata di solfato sodico purissimo, indi si porta a volume. Si filtra, si prende una parte aliquota, e si titola al fucolo, con la scelta di un controllo, sino al rosso vivo, come consiglia Sørensen » (8).

Mediante apparecchi Sukoff, già nella precedente Nota ricordati (9), si stabilì pure la temperatura ottima di azione e quella di distruzione.

(1) Ricerche eseguite nell'Istituto di fisiologia della R. Università di Roma, diretto dal prof. S. Baglioni.

(2) Von Gorup Besanez, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. 1875, S. 1510.

(3) W. Windisch u. B. Schellhor, Wochenschr. f. Brauerei, pp. 17, 334-336, 437-439, 449-452, 1900.

(4) M. Fennbach et L. Hubert, L. Maly Th. 30, 929; Compt. Rend. Acc. sc., 130, 1783-1795, 1900.

(5) Fr. Weis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1900-1901, 31, 73-79.

(6) D. Macestrini, Rend. Acc. dei Lincei, ser. 5^a, sem. 2^a, pag. 393.

(7) L. Sattimy, Arch. farm. sper., 1907, vol. XXIV, pag. 345.

(8) S. P. L. Sørensen, Biochem. Zeitschr. 1908, 7, 45-101.

(9) Sukoff, Chem. Zeitschr. 1901, n. 99, S. IIIII.

Dal complesso delle esperienze risulta:

1) la *proteasi* dell'orzo *germogliato* non è (a differenza dell'analisi), estraibile con acqua: non si trova nel filtrato, ma nell'emulsione;

2) la sua azione non si manifesta, se l'emulsione fu eseguita con semplice acqua distillata; è invece rilevante con emulsione acidula con acido acetico, alla concentrazione di gr. mole 0,03 $\frac{0}{100}$;

3) per avere un fermento molto attivo, è necessario che il contatto della farina con l'acqua acidula si prolunghi *almeno per 6 ore*, ad una temperatura tra 20° e 30° C;

4) neutralizzando l'acidità dell'emulsione con KOH, al tornasole, ed acidificando con HCL sino al titolo di gr. mole 0,03 $\frac{0}{100}$, il fermento mostrasi meno attivo;

5) alcalinizzando, dopo aver neutralizzato come sopra al tornasole, con KOH sino al titolo di gr. mole 0,03 $\frac{0}{100}$, l'azione del fermento è anche maggiormente attenuata;

6) la temperatura ottima di azione oscilla fra 45° e 50° C; quella di distruzione fra 52°-55° C.

* * *

Lipasi. — Le lipasi vegetali furono principalmente studiate nelle piante inferiori; nelle piante superiori furono sinora ricercate soltanto nei semi oleiferi (1).

Per rintracciare questo fermento nell'orzo *germogliato*, abbiamo preparato un'emulsione acidula, come per la *proteasi*; indi, per calcolare la quantità di grasso scisso, ci siamo valse di due diversi metodi, che si completano, cioè: del numero di acidità e del numero degli eteri. Col primo si è potuta calcolare la quantità degli acidi grassi liberi, contenuta negli olii di mandorle dolci, prima e dopo le singole digestioni, e per differenza il grasso digerito; col secondo la quantità degli eteri contenuti nello stesso grasso prima e dopo la digestione, e quindi il grasso indigerito.

Numero di acidità. — In vari palloncini tarati si pesano esattamente 1-2 gr. di olio di mandorle dolci; si versa in ciascun palloncino una determinata quantità di emulsione attiva, ovvero inattivata mediante ebollizione; in altri palloncini si versa soltanto uguale quantità di emulsione cruda o bollita, indi si portano tutti in termostato alla temperatura di 35°-40° C. In altri palloncini, che servono di controllo, ugualmente preparati, si determina sul momento il numero di acidità. Si versano cioè in ogni palloncino da 50 a 60 cm³ di alcool a 95°, neutralizzato alla fenoltaleina; si riscalda ogni palloncino a bagno maria sino ad ebollizione incipiente, si raffredda rapidamente, si aggiungono 7-8 gocce di soluzione alcoolica di fenoltaleina (1%), indi si titola con una soluzione normale decima di idrato potassico. Dal numero dei cm.³ di soluzione potassica impiegata, si calcola l'indice di acidità. Lo stesso metodo si segue dopo la digestione, e dalla differenza dei risultati tra il primo ed il secondo esame, si deduce la quantità degli acidi liberi,

(1) Cfr. Ch. Richet, *Dic. de Physiol.*, 1919, tom. X, fasc. I, pp. 158-160.

formatisi durante il processo digestivo, che si esprime in *acido oleico*, in *acido solforico* o semplicemente in mmgr. di potassa ⁽¹⁾.

Per ottenere il numero degli *eteri*, poichè nel caso nostro si trattava di grassi, già contenenti acidi liberi, si è proceduto prima alla determinazione del numero di saponificazione, indi si è fatta la differenza tra questo e il numero di acidità.

Numero di saponificazione. — In un palloncino tarato si pesano esattamente da 1 a 2 gr. di olio di mandorle dolci, indi si versa *emulsione attiva* di orzo germogliato; in un altro si versa *sola emulsione*, ed in un terzo *solo olio di mandorle*. Alla fine della digestione si aggiungono a ciascun palloncino 25 cm³ di soluzione alcoolica di KOH circa seminormale, si provvede ognuna di un tappo ad un foro, attraversato da un tubo di vetro lungo oltre un metro (refrigerante a riflusso), e si porta a bagno maria in ebollizione, ove si lascia, agitando di tanto in tanto, per mezz'ora o poco più. Tolto il palloncino dal bagno maria, vi si aggiungono 8-10 gocce di soluzione alcoolica di fenoltaleina (1%) e si titola a caldo l'eccesso di potassa rimasto libero, mediante acido cloridrico esattamente seminormale.

Si esegue pure una prova testimone: cioè si versano 25 cm³ della soluzione alcoolica di potassa circa seminormale in un altro palloncino e si seguita ad operare perfettamente come per le precedenti.

Dalla differenza fra la quantità di acido cloridrico seminormale adoperata nella prova testimone, e quella adoperata nella prova con la materia grassa o con la emulsione, si calcola la quantità di idrato potassico occorsa, nei singoli casi, per la saponificazione completa delle sostanze grasse; calcolando poi tale quantità di potassa in mmgr. per un grammo di sostanza grassa, si ha il numero di saponificazione ⁽²⁾.

Sottraendo il numero di *saponificazione* da quello dell'*acidità*, contemporaneamente in altre prove identiche determinato, si ottiene il numero degli *eteri*, espressione della quantità di grasso rimasta indigerita. I risultati delle nostre ricerche sono:

- I. Nell'orzo germogliato esiste un *fermento lipolitico*;
- II. Questo fermento è soltanto dimostrabile nelle emulsioni; come la *proteasi*, anch'esso manca nel liquido filtrato;
- III. In emulsione, eseguita con semplice acqua distillata, mostrasi molto debole; trovasi invece molto attivo nell'emulsione acidulata con acido acetico alla concentrazione di gr. mole 0,03 ‰;
- IV. Sotto la sua azione l'olio di mandorle dolci (dopo 48 ore ed alla temperatura di 31°-40° C) presenta un numero di acidità, espresso di mmgr. di KOH, talvolta superiore al 3 ‰, ed un numero di eteri che discende sino a 150;
- V. L'acido cloridrico, alla concentrazione di gr. mole 0,03 ‰, attenua l'azione della lipasi dell'orzo germogliato;
- VI. La temperatura ottima di azione è a circa 45° C, mentre quella di distruzione è a circa 55° C.

⁽¹⁾ V. Villavecchia, *Trattato di chimica analitica applicata*, vol. I, pag. 495, 1916.

⁽²⁾ Id. *ibid.*, pp. 500-502, 1916.