

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
ANNO CCCXVII.

1920

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIX.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1920

Chimica vegetale. — *Sintesi di un peptide dall'acido aspartico cogli enzimi vegetali* ⁽¹⁾. Nota preliminare di C. RAVENNA, presentata dal Socio G. CIAMICIAN.

Le esperienze descritte nelle precedenti Note ⁽²⁾ hanno dimostrato che, per prolungata ebollizione delle soluzioni acquose di asparagina, questa si trasforma parzialmente nell'acido asparagil-aspartico (di peptide dell'acido aspartico di Fischer), e che lo stesso di peptide può ottenersi dal malato acido di ammonio, il quale, per riscaldamento a 210°, dà origine ad un corpo dalla formula minima $C_4H_3NO_2$ (l'antica imide fumarica) a cui assegnammo la costituzione probabile di un'anidride dell'acido 2.5-dichetopiperazin-3.6-diacetico, $C_8H_6N_2O_4$. Da tale anidride venne appunto da noi ottenuto, per trattamento con acqua di barite a freddo, l'acido asparagil-aspartico. Nelle citate Note abbiamo messo in evidenza l'importanza che hanno, a nostro avviso, tanto la trasformazione dell'asparagina come quella del malato ammonico nel di peptide dell'acido aspartico: trasformazioni ottenute senza interventi chimici energici. Ci eravamo perciò proposti di studiare fino a qual punto le sintesi in parola potessero essere comparate coi processi naturali che conducono alla sintesi delle proteine nelle piante. Sebbene il programma di ricerche in questo senso sia appena all'inizio, pubblico nella presente Nota, sia pure con riserva, l'interessante risultato ottenuto facendo agire sull'asparagina i catalizzatori vegetali.

Nel corso delle esperienze delle quali da lungo tempo si occupano Ciamician e Ravenna ⁽³⁾, venne osservato che non soltanto le piante vive ma anche le piante triturate hanno attitudine a determinare particolari processi sintetici. Così la saligenina, la pirocatechina, l'idrochinone, il nitrile e l'acido mandelico, gli acidi lattico e tartarico e lo stesso glucosio si trasformano parzialmente in composti dai quali, per azione dell'emulsina o degli acidi diluiti, si rigenerano le sostanze originarie. La natura di tali prodotti, alcuni dei quali potrebbero essere glucosidi, non è per ora chiarita; rimangono peraltro innegabili gli effetti sintetici determinati dalle piante triturate, che furono specialmente dimostrati per la saligenina la quale, oltre a dare, come

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nel laboratorio di chimica agraria della R. Università di Bologna.

⁽²⁾ C. Ravenna e G. Bosinelli, questi Rendiconti, XXVIII, 2, 113 (1919); XXVIII, 2, 137 (1919).

⁽³⁾ G. Ciamician e C. Ravenna, questi Rendiconti, XVIII, 2, 594 (1909); XXVII, 2, 293 (1918). Vedasi anche la XII Memoria, *Sul contegno di alcune sostanze organiche nei vegetali*, in corso di pubblicazione.

fu detto, un composto scindibile dall'emulsina, si trasforma in larga misura nella polianidride saliretina.

Era perciò da supporre che le sostanze attive contenute nelle piante potessero trasformare l'asparagina nel dipeptide dell'acido aspartico che può essere considerato come un'anidride iminica. Le esperienze che descrivo in questa Nota preliminare indicano che deve formarsi appunto un composto di tale natura.

In un pallone, della capacità di circa tre litri, furono posti gr. 500 di foglie di spinaci triturate in poltiglia fine e gr. 20 di asparagina sciolta in 500 cc. di acqua tiepida. Al miscuglio si aggiunse un poco di toluolo come antisettico e si lasciò a sè il pallone tappato con cotone per 20 giorni, in termostato alla temperatura di 25° circa. La poltiglia venne quindi spremuta ed il liquido filtrato attraverso carta. Per vedere se dall'asparagina avesse preso origine l'acido asparagil-aspartico, tutto il liquido tale e quale, senza concentrarlo per evitare che col riscaldamento potesse formarsi il dipeptide, fu trattato con acetato basico di piombo in piccolo eccesso. Si ottenne un precipitato giallastro che venne lavato ripetutamente per centrifugazione, quindi sospeso nell'acqua e decomposto con idrogeno solforato. Il liquido, filtrato dal solfuro di piombo, lasciò separare, per concentrazione nel vuoto, dei cristalli aghiformi che fondevano a 100°; posti nel vuoto su acido solforico, sfiorivano mentre il punto di fusione si innalzava intorno ai 180° con decomposizione. Erano perciò con ogni probabilità costituiti dall'acido ossalico normalmente contenuto nelle foglie di spinaci.

Il liquido filtrato dall'acido ossalico, per ulteriore concentrazione nel vuoto, lasciò un residuo sciropposo misto ancora a pochi cristalli. Per trattamento con alcool i cristalli entrarono in soluzione mentre lo sciroppo si trasformò in una polvere (circa 1 gr.) amorfa, bianco-grigiastra, solubilissima nell'acqua, insolubile nell'alcool. Essa venne ripetutamente lavata con alcool e seccata nel vuoto su acido solforico. Riscaldata in tubo da punto di fusione, poco oltre i 100° si rigonfia dando una massa schiumeggiante che riempie il tubetto e trabocca. Questi caratteri hanno fatto ritenere che la sostanza in questione fosse realmente il dipeptide dell'acido aspartico. Le analisi non diedero peraltro numeri esatti per la difficoltà, stante la piccola quantità di cui disponevo, di separare la sostanza dalle materie che provenivano dagli spinaci.

Non potendo per ora purificare completamente la sostanza, ho cercato di stabilirne l'identità per mezzo dell'idrolisi che avrebbe naturalmente dovuto condurre all'acido aspartico. Questo non poteva provenire dall'asparagina libera contenuta negli spinaci, perchè il prodotto era stato ottenuto per mezzo dell'acetato di piombo che non precipita nè l'asparagina nè l'acido aspartico e dalle quali materie la sostanza estratta differisce anche per la grande solubilità. Per farne l'idrolisi, tutta la sostanza rimasta (gr. 0,4) fu

bollita a ricadere per 12 ore con 20 cc. di acido solforico normale; dal liquido venne quindi eliminato l'acido solforico colla quantità esatta di barite, ed il filtrato dal solfato di bario fu concentrato rapidamente a bagnomaria in corrente d'aria. Si separò una crosta cristallina alquanto colorata che venne ridisciolta in acqua, bollita con carbone animale ed il filtrato nuovamente concentrato a piccolo volume. Si separarono, per raffreddamento, dei cristalli a forma di laminette che vennero nuovamente purificati dall'acqua nella quale a freddo sono poco solubili. La forma cristallina, come pure la microanalisi dimostrarono che essi erano costituiti da acido aspartico.

mg. 3.797 di sostanza diedero mg. 5,05 di CO_2 e mg. 1,85 di H_2O .

mg. 2,863 di sostanza diedero cc. 0,252 di N ($t = 18^\circ$; $p = 757$ mm.).

In 100 parti:

Calcolato per $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	Trovato
C 36,09	36,27
H 5,26	5,45
N 10,52	10,29

È lecito dunque affermare che il corpo ottenuto per precipitazione coll'acetato di piombo dall'estratto della poltiglia di spinaci può essere considerato come un polipeptide derivante dall'acido aspartico e probabilmente l'acido asparagil-aspartico sopramenzionato. Sebbene l'analisi non abbia dato i numeri esattamente richiesti, il contegno della sostanza ed il prodotto dell'idrolisi ne hanno fornito buoni indizi. Mi riservo tuttavia di dare la dimostrazione definitiva mediante esperienze su più larga scala che ho già iniziato.

Come controllo dell'esperienza ora descritta venne posto, contemporaneamente al primo e per uno stesso tempo, un altro pallone contenente soltanto 500 gr. di poltiglia di spinaci, mezzo litro d'acqua e un poco di toluolo per antisettico, allo scopo di vedere se l'acido asparagil-aspartico si trovasse naturalmente nella poltiglia di spinaci. Procedendo nel modo dianzi descritto, l'estratto acquoso fornì anche in questo caso, coll'acetato di piombo, un precipitato che venne sospeso in acqua e trattato con idrogeno solforato. Il liquido filtrato lasciò separare per concentrazione i cristalli di acido ossalico contenuto negli spinaci; e per ulteriore evaporazione rimase una piccola quantità di sciroppo che per trattamento con alcool si trasformò anch'esso in una polvere amorfa solubilissima nell'acqua. La polvere ha peraltro un contegno del tutto diverso dall'acido asparagil-aspartico. Riscaldata fino a 250° , annerisce senza rigonfiarsi; bollita come precedentemente per 12 ore con acido solforico normale si ottenne, dopo eliminazione dell'acido solforico colla quantità esatta di barite, un liquido che per concentrazione non lasciò separare cristalli. In questa prova non è stato dunque rinvenuto il peptide del-

l'acido aspartico formatosi, con ogni probabilità, nell'esperienza precedente coll'asparagina. Non è tuttavia da escludere in modo assoluto, anzi appare verosimile che, dato il modo della sua formazione, in piccola quantità possa essere presente anche nella stessa poltiglia di spinaci. La questione sarà ulteriormente esaminata nelle esperienze più in grande, già iniziate.

Un'altra prova di controllo fu eseguita lasciando a sè per egual tempo una soluzione di 20 gr. di asparagina in un litro di acqua e un poco di toluolo, allo scopo di vedere se alla temperatura del termostato l'asparagina si trasformasse parzialmente nel dipeptide dell'acido aspartico indipendentemente dalla presenza degli enzimi vegetali. Da questa soluzione non si ottenne peraltro traccia di precipitato coll'acetato di piombo. Ciò prova che l'acido asparagil-aspartico non si era formato, essendo la reazione coll'acetato di piombo assai sensibile.

Le esperienze preliminari descritte in questa Nota hanno dunque indicato che per azione di enzimi vegetali si forma dall'asparagina un peptide dell'acido aspartico e, per quanto è a mia cognizione, sarebbe questo il primo caso di una simile sintesi, per mezzo di catalizzatori organici, fuori dell'organismo. Come era stato messo in evidenza alla fine di una delle precedenti Note ⁽¹⁾, la formazione del dipeptide dell'acido aspartico per ebollizione delle soluzioni di asparagina appariva di qualche interesse anche dal punto di vista del metabolismo vegetale. Ora questo interesse mi sembra accresciuto dal fatto che dall'asparagina, per azione di enzimi vegetali, si può arrivare ad un composto che, data la frequenza di questa amide nelle piante, potrebbe essere considerato come un primo passo nella sintesi naturale delle proteine. Sarà però necessario di estendere la ricerca ad altri acidi amidati, ciò che mi propongo di fare.

Ringrazio infine il dott. Gaetano Bosinelli per la sua attiva e preziosa collaborazione in queste esperienze.

⁽¹⁾ Questi Rendiconti, XXVIII, 2, 117 (1919).