

SINTESI BIOLOGICA DELLA TREONINA (*)

A. ROSSI FANELLI

SYMMARIUM. — Cum KÖGL et BORG (1941) suspicati sint activationem fermentationis alcoolicae a glycina productam oriri ex huius mutatione in treoninam, Auctor demonstrat glycina, saccaromycetis opportuna ratione incubatam, mutari in treoninam ex dimidia circiter parte. Censet Auctor treoninam ita obtentam, esse formam laevam naturalem. Etiam acidus pantotenicus excitat fermentationem alcoolicam, treoninae synthesim fovens.

I. - INTRODUZIONE E SCOPO DELLE RICERCHE (1)

EULER e coll. nel 1924 scoprirono nel succo di lievito bollito un nuovo fattore che denominarono fattore Z; esso aveva la proprietà di favorire la fermentazione alcolica del lievito senza produrre contemporaneo aumento delle cellule. Gli stessi Autori dimostrarono subito che il fattore Z era caratterizzato dalla grande stabilità all'azione del calore, degli acidi e degli alcali e che era diverso dalla cozimasi. La scoperta di questo nuovo fattore nel lievito provocò subito una vasta fioritura di ricerche atte a individuare ed isolare il fattore stesso.

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio Gaetano Quagliariello il 14 giugno 1945.

(1) Le spese per queste ricerche sono state sostenute dalla Commissione per lo studio dei Problemi dell'Alimentazione. Ringrazio vivamente S.E. il prof. Quagliariello, direttore dell'Istituto di Chimica Biologica della R. Università di Napoli, che con tale aiuto e con la larga e cortese ospitalità concessami nel suo Istituto, mi ha permesso di completare queste ricerche che avevo iniziato nell'Istituto di Chimica Biologica della R. Università di Pavia.

MYRBÄCH e EULER [2] esclusero che esso potesse identificarsi con il triptofano, l'istidina, l'alanina e che l'attività dell'estratto di lievito dovesse attribuirsi al suo alto contenuto in esosofosfato. Una serie di ricerche fu eseguita nell'Istituto di Stoccolma [3] per differenziare il fattore Z dal Bios e dagli altri costituenti del complesso B e per cercare con metodi di arricchimento di isolare ed individuare il composto stesso. Queste ricerche riuscirono, per altro, solo a dimostrare che il fattore è ubiquitario nel mondo animale e vegetale, come i componenti del Bios, e in prove di arricchimento si riuscì ad ottenere un preparato appena 8 volte più attivo del prodotto di partenza. PHILIPSON [4], della stessa scuola, dimostrò poi che il fattore Z non poteva identificarsi con l'aneurina nè con l'acido nicotinico.

MYRBÄCH e coll. [5] in una prima serie di ricerche avevano osservato che il lievito secco non si lasciava attivare dal fattore Z. Essi pensarono perciò che l'azione di questo fattore consistesse in una modificazione della permeabilità cellulare. Ma gli stessi Autori sperimentando con razze diverse di lievito constatarono che alcuni preparati di lievito secco venivano attivati dal fattore Z. La diversità dei risultati potrebbe esser dovuta al fatto che i preparati di lievito secco contengono ancora un numero più o meno elevato di cellule vive; la questione quindi se il fattore Z è capace di attivare la fermentazione di cellule morte, non più capaci cioè di riprodursi, rimane tuttora aperta. Nel 1934 BORCHARDT e PRINGSHEIM [6] riuscirono ad ottenere, partendo dal lievito secco sgrassato, un preparato 100 volte più concentrato e poco dopo KÖGL e coll. [7] partendo dalla «marmite», un preparato circa 10.000 volte più attivo. Nello stesso anno EULER e LARSON [8], studiando comparativamente le proprietà del Bios e del fattore Z, giunsero alla conclusione che quest'ultimo doveva avere una massa molecolare di 200 circa. Mentre PHILIPSON [9] della stessa scuola credette di identificare il fattore Z con il Bios II di LUCAS [10].

Subito dopo però VAN HULSEN (della scuola di KÖGL) [11] trovò del tutto inattivo come fattore Z l'estere metilico della biotina (cristallizzato a partire dal Bios II). Le ricerche erano giunte a questo punto quando nel 1941 KÖGL e BORG [12] pubblicarono i risultati assai interessanti delle loro ricerche. Questi Autori, riprendendo antiche osservazioni di MYRBÄCH e coll., sperimentarono l'azione sulla fermen-

tazione alcoolica di miscele di aminoacidi che avevano la seguente composizione:

- 1) l(+) ac. aspartico, glicina, l(+) isoleucina, l(-) tirosina, l(+) valina.
- 2) l(+) arginina, l(+) ac. glutammico, l(-)leucina, d, l-fenilalanina, d, l-prolina.
- 3) l(+) alanina, l(-) cistina, l(-) istidina, d, l-lisina, l(-) ossiprolina.

Gli Autori trovarono l'inatteso risultato che la miscela 1) produceva un aumento della fermentazione che andava fino al 100 %. Incoraggiati da questi primi successi gli Autori saggiarono separatamente i vari aminoacidi componenti la miscela 1) trovando che la glicina, tra tutti i componenti, si dimostrava straordinariamente attiva, non solo, ma l'effetto dell'aminoacido si verificava non subito, ma dopo un periodo di induzione più o meno lungo raggiungendo un massimo dopo la 1^a h. Estendendo le ricerche ad altri aminoacidi allora conosciuti, gli Autori trovarono che solo la treonina, scoperto nel 1935 da Rose, mostrava un'azione dello stesso ordine di grandezza di quella della glicina, ma che tra i due aminoacidi esisteva una sostanziale differenza: mentre la glicina per agire aveva bisogno di un periodo di induzione più o meno lungo, la treonina si mostrava attiva appena aggiunta. Gli Autori conclusero, per questo comportamento, che il fattore Z molto probabilmente doveva identificarsi con la treonina ed emisero l'ipotesi che questa veniva sintetizzata dal lievito a partire dalla glicina. Purtroppo però gli Autori non riuscirono a dimostrare sperimentalmente questa loro supposizione isolando o determinando la treonina eventualmente formatasi, e conclusero le loro ricerche affermando che « die Bildung von Threonin aus Glycin wenigstens auf biologischem Wege wahrscheinlich zu machen ».

L'ipotesi di KÖGL e BORG mi è sembrata molto interessante ed ho eseguite le presenti ricerche con le quali è stato dimostrato, per via chimica, la sintesi biologica della treonina dalla glicina.

Dopo di essermi assicurato che il lievito di birra a mia disposizione ⁽¹⁾ era sensibile all'azione del fattore Z, ho fatto agire, in opportune condizioni, una sospensione di lievito su di una soluzione di gli-

(1) Il lievito mi è stato gentilmente fornito dalle Birrerie Meridionali di Napoli, alle quali rivolgo il più vivo ringraziamento.

cina in apparecchi di Warburg seguendo il corso della fermentazione dallo sviluppo di CO_2 nel tempo e determinando poi alla fine dell'esperienza la treonina formata, adoperando un metodo già sperimentato e trovato esatto e specifico. Ho, infine, studiato la ripartizione della treonina sintetizzata tra cellule e mezzo nutritivo e l'azione dell'ac. pantotenico sulla sintesi stessa.

II. - TECNICA SPERIMENTALE

Per le prove di fermentazione ho seguito le indicazioni di EULER e quelle di KÖGL apportando qualche modifica come verrà esposto più sotto.

Come terreno nutritivo ho impiegato una soluzione così costituita:

Glucoso	gr. 100	K_2HPO_4	gr. 0,16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	» 3	NaCl	» 0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	» 0,7	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	» 0,4
KH_2PO_4	» 1		

a 1 litro con acqua distillata. La soluzione veniva sterilizzata mediante tindalizzazione.

Come apparecchi ho adoperato comuni vasetti di Warburg di forma conica con diverticolo laterale della capacità di circa 30 cc e come liquido di livello nei manometri il liquido di Brodie. La temperatura durante l'esperienza è stata di 30° , l'agitazione di circa 100 escursioni al minuto.

1. - *Determinazioni del numero delle cellule.* Ho proceduto nel seguente modo (consigliato da PHILIPSON [13]). Da ogni prova si preleva esattamente, subito dopo di averla allestita, 0,4 cc di sospensione e si versa in un palloncino da 10 cc contenente 5 cc di una soluzione di sublimato al 0,1%, si agita e si porta a volume con la stessa soluzione, se ne preleva una goccia che viene posta nella camera del contaglobuli di Thoma-Zeiss. Dopo 5' si esegue la conta delle cellule con la tecnica usuale. Finita l'esperienza si preleva ancora da ogni vasetto

0,4 cc di sospensione e si determina il numero delle cellule con lo stesso procedimento. L'aumento percentuale (a) delle cellule è così calcolato:

$$a = \frac{b - c}{c} \times 100 .$$

dove c e b indicano il numero delle cellule all'inizio e alla fine dell'esperienza.

2. - *Metodo per il dosaggio della treonina* ⁽¹⁾. Il metodo si fonda sulla ossidazione della treonina ad aldeide acetica con tetracetato di Pb e determinazione fotometrica dell'aldeide.

Reagenti:

1) Preparazione del tetracetato di Pb (modificazione del procedimento di DIMROTH e SCHWEIZER [15]: In un pallone a 3 colli provvisto di un termometro, un'agitatore meccanico e di un tubo ripiegato a squadra che peschi fino al fondo del pallone, si pongono 100 cc di ac. acetico glaciale e 25 cc di anidride acetica, si riscalda a b. m. fino a 65°, si mette in moto l'agitatore e si lascia passare, attraverso il tubo a squadra una moderata corrente di cloro secco ⁽²⁾. Si introducono ora gr. 20 di Pb₃O₄ (seccati in stufa a 150° per 1-2 h) in 5 porzioni approssimativamente eguali attendendo prima di ogni nuova aggiunta che il colore che si forma sia scomparso. Si porta ora la temperatura a 75-80° (una temperatura maggiore riduce notevolmente il rendimento della reazione) e si lascia ancora per 90' circa. Finita la reazione si filtra rapidamente la sospensione ancora calda attraverso un filtro riscaldato a 70° circa. Il filtrato si lascia raffreddare in pesafiltro. A freddo cristallizza il tetracetato in forma di lunghi aghi splendenti che all'aria rapidamente si arrossano e si decompongono. Il residuo solido rimasto sul filtro è riportato nel pallone a 3 colli agitato per 15-20' a 70-80° con altri 100 cc di ac. acetico + 25 cc di anidride acetica. La sospensione viene rapidamente filtrata a caldo e lasciata cri-

⁽¹⁾ Adattamento e modificazione del procedimento di BLOCK e BOLLING [14].

⁽²⁾ Per ottenere facilmente in laboratorio cloro secco, in una boccia di svolgimento fornita di imbuto separatore, si introduce permanganato di potassio in sostanza finemente polverato, dall'imbuto si fa gocciolare poi cautamente HCl conc.; si sviluppa così Cl in quantità facilmente regolabile.

stallizzare come prima. Il residuo viene trattato ancora una volta con ac. acetico ed anidride acetica come sopra. I cristalli delle varie preparazioni si raccolgono alla pompa su di un imbuto di Büchner, si lavano con poco ac. acetico, si pressano bene sul filtro e si portano subito in essiccatore dove si conservano nel vuoto. Tutte queste operazioni devono venire eseguite molto rapidamente onde evitare la decomposizione dei cristalli. Con questo procedimento è possibile ottenere da 20 gr. di Pb_3O_4 circa 15 gr. di tetracetato.

2) Preparazione del p-idrossidifenile: il procedimento si fonda sulla preparazione, col metodo di HIRSCH [16] modificato in qualche punto, del para + orto-idrossidifenile e nella separazione del composto para a mezzo della cristallizzazione frazionata dall'ac. acetico. Ed ecco come si procede: in una beuta da circa 250 cc tenuta in ghiaccio si misurano 5 cc di anilina di fresco distillata in corrente di vapore, 50 cc di acqua e 15 cc di HCl conc., si lascia raffreddare poi si aggiunge a gocce agitando una soluzione ottenuta sciogliendo gr. 3,75 di $NaNO_2$ in 7,5 cc di acqua. Al sale di diazonio così ottenuto si aggiungono gr. 15 di fenolo sciolti a caldo con aggiunta di 1,5 cc di acqua, si agita in agitatore elettrico per 1 h. Dopo tale periodo di tempo si interrompe l'agitazione si trasferisce il liquido in un imbuto separatore: si formano 2 strati, uno sottostante fenolico intensamente colorato in marrone e uno soprastante acquoso di colore gialletto. La soluzione fenolica si mette a parte e la parte acquosa si agita ancora 4 volte per 1 h con 5 gr. di fenolo ogni volta. Un'aliquota delle varie frazioni fenoliche, riunite assieme, si trasferisce in un recipiente di vetro fornito di un refrigerante a ricadere con giuntura a smeriglio a si riscalda a b. m. cautamente a 50-60° fino a inizio di reazione (forte produzione di gas). Terminato lo sviluppo di gas si aggiunge dal refrigerante il resto del liquido fenolico a piccole porzioni attendendo ogni volta che sia terminato lo sviluppo di gas. Si porta ora la temperatura a 90° e si riscalda per 2 h. Si forma così ancora un poco di acqua che si allontana. Il liquido si sottopone ora a distillazione frazionata: fino a 200° distilla acqua e fenolo. Si raccoglie la frazione tra 200-300°. Poichè il distillato solidifica rapidamente è opportuno riscaldare cautamente l'apparecchio di distillazione onde evitare l'ostruzione del tubo di deflusso. Il distillato si scioglie in 15 cc. di toluolo a caldo e si trasferisce in un imbuto separatore, si aggiunge

un eguale volume di una soluzione di NaOH 5%, si riscalda a 50-60° e si agita per 10-15'. Si ha un'intensa colorazione azzurra della fase acquosa. Si ripete l'estrazione a caldo della soluzione toluolica con NaOH 5% fino a che questa non dia più precipitato per aggiunta di HCl conc. Ai liquidi di estrazione riuniti si aggiunge ac. cloridrico conc. fino a completa precipitazione. Il precipitato si raccoglie sul filtro Jena (G4) alla pompa, si lava con soluzione acquosa di ac. cloridrico, si pressa bene e si scioglie in ac. acetico conc. Si lascia in in ghiacciaia. In questa maniera cristallizza solo il composto *para*, mentre l'*orto* resta nelle acque madri. I cristalli si raccolgono su filtro di vetro e si lavano con poco ac. acetico. Il prodotto della prima cristallizzazione fonde in genere intorno a 145°. Si ripete la cristallizzazione dall'acido acetico fino ad ottenere un composto a punto di fusione costante ed eguale 164-165°. Il p-idrossidifenile così ottenuto si presenta sotto forma di aghi bianchi splendenti come seta, isolati o aggruppati a fascio, solubili in acetone, etere, cloroformio, alcool etilico, alcool metilico, alcool n-butilico, tetracloruro di carbonio, insolubile in acqua, ac. solforico conc.

3) *Ac. acetico*. Per ottenere un ac. acetico che non dia prodotti che reagiscono con p-idrossidifenile bisogna bollire l'acido puro del commercio con 1% circa di bicromato potassico a ricadere per 7-8 h e distillarlo poi in apparecchio completamente di vetro (evitare i tappi di gomma o di sughero).

4) *Ac. solforico*. Poichè la reazione colorata dell'aldeide acetica col p-idrossidifenile è più sensibile e completa in presenza di tracce di Pb è opportuno tenere l'ac. solforico puro del commercio su toritura di Pb puro per 4-5 h prima di adoperarlo per la determinazione.

Descrizione dell'apparecchio per la determinazione della treonina. - L'apparecchio è quello riportato nella fig. 1. Il tubo I della lunghezza di circa cm. 20 e del diametro di 25 mm. contiene 20-25 cc di H₂SO₄ conc. e serve per fissare eventuali impurità dell'aria. Il tubo II è vuoto ed è adibito a sequestrare eventuali tracce di ac. solforico aspirate nel tubo dal tubo I. Il recipiente III in cui avviene l'ossidazione della treonina ad acetaldeide, è costituito da un provettone della lunghezza di circa 25 cm. e del diametro di 30 mm. con chiusura a smeriglio fornito di un sistema di due tubi che permette il passaggio dell'aria nella soluzione contenuta nel recipiente III che deve essere

mantenuto a 30°. Il recipiente IV viene immerso in un bagno a 3-4° e serve per fare condensare i vapori di ac. acetico e di acqua provenienti dal tubo III. Nel tubo V, che è simile per costruzione e dimensione al tubo I e II, si pongono perline di NaOH fino all'altezza di circa 10 cm., per fissare i vapori di acido eventualmente ancora presenti. Il tubo VI è simile al tubo III, in esso si introducono 10 cc di H_2SO_4 (reagente n. 4) e 5 o 6 gocce di acqua e dopo raffredda-

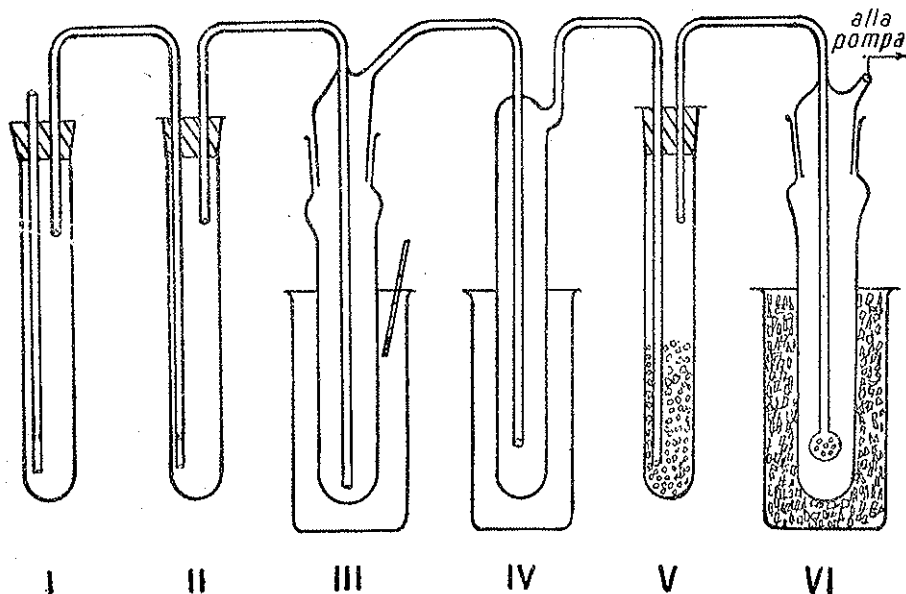


FIG. 1.

mento 20 mg di p-idrossidifenile che resta in sospensione nel liquido. Il tubo durante la determinazione viene tenuto in un recipiente contenente ghiaccio fondente. Le connessioni tra i vari tubi devono essere tutti in vetro tenute assieme da tubi di gomma a pressione. La corrente di aria durante l'aspirazione viene mantenuta costante.

Procedimento. - Per la determinazione della treonina si procede nel modo seguente: un volume noto della soluzione in esame viene misurato nel tubo di ossidazione dell'apparecchio e portato a secchezza tenendo il tubo stesso a b.m. bollente e aspirando l'aria mediante un tubo ripiegato a squadra connesso con una pompa aspirante e che giunge a pochi mm. dalla superficie del liquido. Con questo disposi-

tivo è possibile portare a secchezza il liquido in pochi minuti. Il residuo si scioglie in ac. acetico (reagente n. 3), si aggiunge 1 gr. di tetracetato di Pb, si porta il volume a 25 cc con ac. acetico (reagente n. 3), si immerge il tubo in bagno a 30° si fa passare una moderata corrente di aria per 1 h. Nel tubo VI si sviluppa un colore rosso-viola proporzionale alla quantità di treonina presente nel tubo III. Finita

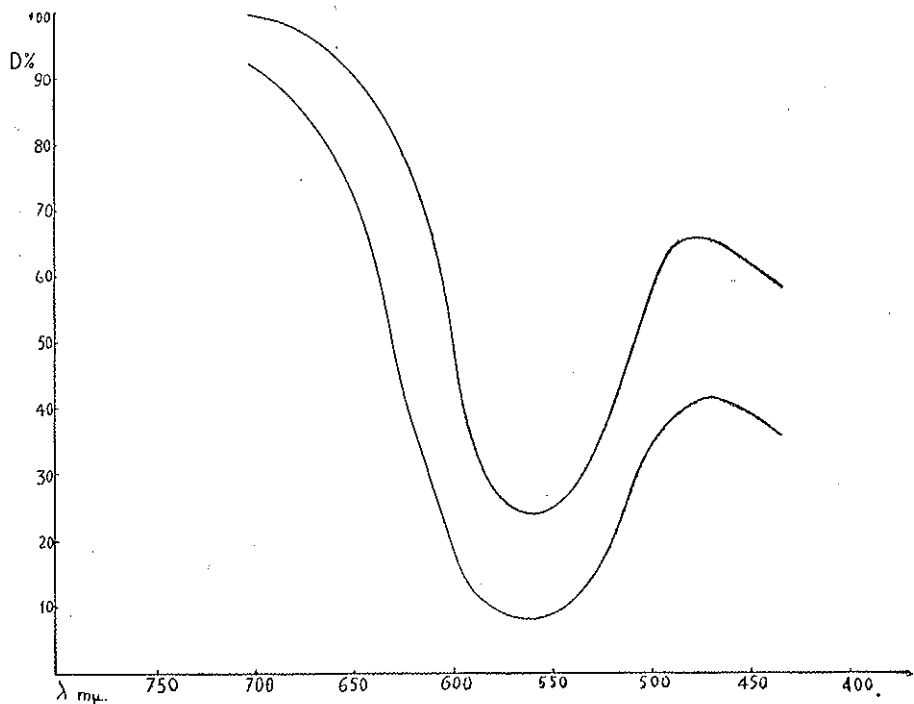


FIG. 2.

l'aereazione il tubo VI è immerso in un b. m. bollente per 2' esatti per eliminare l'eccesso di p-idrossidifenile. Si raffredda a circa 0° e si lascia a temperatura di stanza. Si legge al fotometro di Pulfrich col filtro S 57. Il colore rimane stabile anche dopo 24 h.

Determinazione della curva di assorbimento del colore. — Allo scopo di determinare la zona dello spettro in cui si ha il massimo di assorbimento, ho misurato al fotometro di Pulfrich l'assorbimento luminoso del composto colorato che si forma nella nostra reazione tra $\lambda = 750 \text{ m}\mu$.

a μ 434. I risultati di queste misure sono riportati nella fig. 2. I dati riportati nella grafica dimostrano che il massimo di assorbimento si ha a $\lambda = 570$ μ . Nelle determinazioni della treonina ho perciò impiegato il filtro S 57.

Prove in bianco. — È opportuno prima di ogni serie di determinazione eseguire una prova con i soli reagenti. Quando questi sono sufficientemente puri si sviluppa nel tubo VI una colorazione appena apprezzabile al fotometro. Questo valore viene peraltro sottratto da quello ottenuto nelle prove con treonina. Se l'ac. acetico non è abbastanza puro anche trattato con bicromato dà un valore troppo alto nella prova in bianco. In questo caso è necessario cambiare l'acido.

Con questo procedimento ho determinato la treonina alla fine dell'esperienza sia direttamente nel liquido nutritivo priva di cellule (*trionina libera*) sia dopo idrolisi del mestruo *in toto* (cellule + liquido) = (*treonina totale*).

Treonina libera. — Finita l'esperienza si preleva un determinato volume della sospensione si raffredda in ghiaccio, si centrifuga rapidamente, un'aliquota del liquido limpido privo di cellule (esame microscopico) si misura nel tubo di ossidazione dell'apparecchio per la determinazione della treonina e si porta a secchezza. Sul residuo secco disciolto in ac. acetico (reagente n. 3) si determina la treonina.

Treonina totale. — Ad un'altra aliquota del liquido di reazione si aggiungono subito 5 cc di H_2SO_4 8N e si idrolizza in apparecchio di vetro con refrigerante a ricadere per 20 h circa. Finita l'idrolisi, si trasferisce il liquido quantitativamente in un pallone tarato da 15 o 25 cc e si porta a volume con acqua. Una aliquota si misura in un tubo da centrifuga tarato a 10 cc, si aggiunge acetato di bario (soluzione satura) fino a completa precipitazione dei SO_4 , si porta a volume, si allontana il precipitato di solfato di bario per centrifugazione. Su di un'aliquota del liquido limpido portato a secchezza nel modo sopra esposto e disciolto in ac. acetico si determina la treonina.

La *treonina delle cellule* è calcolata per differenza:

$$[\text{treonina totale}] - [\text{treonina libera}] = [\text{treonina delle cellule}]$$

Esecuzione delle esperienze di fermentazione. — Il lievito viene ripetutamente lavato in recipienti sterili, spremuto su imbuto di Büchner

e conservato in ghiacciaia in pesafiltri sterili. Per ogni esperienza se ne pesa una determinata quantità in una beutina, si addiziona con il liquido nutritivo, si tappa con ovatta sterile e si lascia a temperatura di stanza per circa 20 h. Dopo tale periodo di tempo si rende omogenea la sospensione agitando, se ne preleva un'aliquota, si pone nel vasetto dell'apparecchio di Warburg, si aggiunge un determinato volume delle soluzioni delle sostanze da sperimentare, si congiunge il vasetto al manometro dell'apparecchio che si immerge nel bagno a 30°. Dopo 10-15', raggiunto l'equilibrio di temperatura, si iniziano le letture, per la determinazione della produzione di CO_2 , che si ripetono ogni 15'. Per mettere in evidenza l'eventuale aumento della fermentazione, si allestiscono contemporaneamente prove di controllo a cui, oltre la sospensione di lievito, si aggiunge solo un volume corrispondente di acqua.

La percentuale di attivazione viene calcolata nel modo seguente:

$$\text{attivazione per cento} = \frac{(\text{mm}^3 \text{ prova attivata} - \text{mm}^3 \text{ prova controllo})}{\text{mm}^3 \text{ prova controllo}} 100.$$

Alla fine dell'esperienza si staccano i recipienti dai manometri, si preleva un'aliquota della sospensione su cui si esegue la conta delle cellule, e un'altra su cui si determina la treonina.

III. - RISULTATI SPERIMENTALI

1. - FATTORE Z NELL'ESTRATTO DI LIEVITO.

Preparazione dell'estratto di lievito bollito. - 5 gr. di lievito lavato e pressato si sospendono in 10 cc di acqua in un recipiente di vetro munito di refrigerante a ricadere e si lascia a b.m. bollente per 1-1½ h. Dopo raffreddamento si filtra su imbuto di Büchner. Il filtrato limpido, trasferito in una beuta tappata con ovatta si tiene a 100° per 30', si raffredda e si conserva in ghiacciaia. Per saggiare l'attività si allestiscono 4 prove: due con 1 cc di sospensione di lievito (10 mg) + 1,2 cc di H_2O e due con 1 cc di sospensione di lievito + 1 cc di H_2O + 0,2 cc di estratto di lievito. Si segue la produzione di CO_2 facendo letture ogni 15'. All'inizio e alla fine dell'esperienza si determina il numero

delle cellule con la tecnica esposta precedentemente. I risultati di queste esperienze sono riportati nella tabella I.

Come si osserva dai dati riportati nella tabella l'estratto di lievito ha prodotto un'attivazione della fermentazione che va fino all'85%. Mentre però l'extraproduzione di CO_2 che si verifica nei primi 80-90' è

TABELLA I.

Tempo in minuti	mm ³ CO ₂ sviluppati		Attivazione %	Numero delle cellule in milioni	Aumento percentuale delle cellule
	prova in bianco	prova con estrat- to di lievito			
15	190	304	60	150	0
30	210	325	55	—	—
45	200	330	65	—	—
60	180	286	59	156	4
75	215	356	66	—	—
90	207	351	70	168	12
105	202	353	75	—	—
120	195	360	85	173	16

da attribuirsi esclusivamente all'attivazione della fermentazione, perchè il numero di cellule rimane praticamente costante, l'extraproduzione di CO_2 verificatasi successivamente è dovuta anche all'attività di nuove cellule formatasi sotto lo stimolo di fattori specifici contenuti nell'estratto di lievito. Dopo i primi 80-90' infatti si verifica, nelle prove addizionate con lievito un aumento delle cellule che va fino al 15% circa. Questi dati confermano l'osservazione analoga fatta da KÖGL e BORG in presenza di « marmite » [17].

2. - AZIONE DELLA GLICINA SULLA FERMENTAZIONE.

Assicuratomi che le colture di lievito erano sensibili all'azione del fattore Z sono passato a studiare l'azione della glicina sulla fermentazione.

tazione. Le condizioni sperimentali sono state identiche alle precedenti. I risultati sono riportati nella tabella II.

Come si osserva dai dati riportati nella tabella, 250 γ di glicina producono dopo un periodo di induzione di 1 h circa, un'attivazione

TABELLA II.

Tempo in minuti	mm ³ CO ₂ sviluppati			Attivazione %		N.ro delle cellule in milioni		
	prova in bianco	prova con glicina						
		(a)	(b)	(c)	(b)	(c)	(a)	(b)
15	220	218	222	0	0	160	158	162
30	222	230	229	4	4	—	—	—
45	237	243	251	3	4	—	—	—
60	236	318	306	35	30	—	—	—
75	228	319	318	40	48	—	—	—
90	240	351	371	50	55	—	—	—
105	245	362	367	48	50	—	—	—
120	250	368	380	47	52	165	168	169

della fermentazione che va fino al 50% senza aumento contemporaneo delle cellule. Una quantità doppia di glicina non produce un'ulteriore attivazione della fermentazione.

3. - FORMAZIONE DI TREONINA DALLA GLICINA.

Per dimostrare per via chimica la sintesi biologica della treonina dalla glicina, ho fatto le seguenti esperienze: in recipienti dell'apparecchio di Warburg si introducono 1 cc di sospensione di lievito, e 1 cc di una soluzione acquosa di glicina 0,025% e 0,3 cc H₂O. Si connettono i vasetti coi manometri, si immergono nel bagno a 30° e si segue manometricamente lo sviluppo di CO₂ per per 120'.

Altre prove che contengono al posto della soluzione di glicina un egual volume di acqua servono da controllo. Alla fine dell'esperienza

si estraggono gli apparecchi dal bagno e si determina nel liquido il contenuto in treonina totale nel modo esposto sopra. I risultati sono riassunti nella tabella III.

Poichè da 250 γ di glicina si possono ottenere teoricamente 396 γ di treonina i dati riportati nella tabella dimostrano che in questa espe

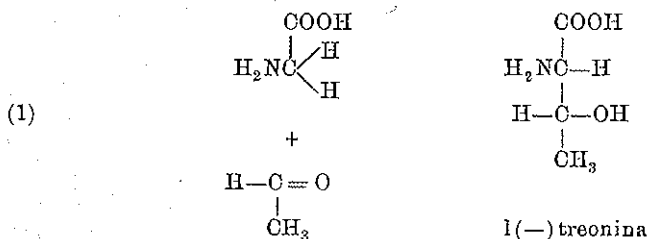
TABELLA III.

Treonina formata	Sintesi %	Extraproduzione CO ₂ mm ³	Attivazione %
215	54	135	50
205	51	125	46
190	48	117	43
180	45	124	44
210	53	130	48
Medie: 200	50	126	46

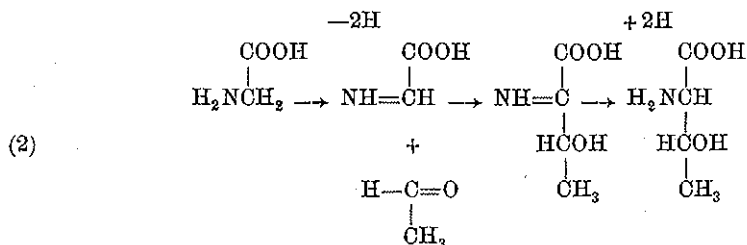
rienza si è ottenuta una sintesi del 50% circa (nella tabella non sono riferiti i valori della prova in bianco, ma essi sono stati detratti dalle prove con glicina).

Viene così dimostrata la sintesi biologica della treonina.

Resta ancora da chiarire il meccanismo con cui questa sintesi ha luogo. Allo stato attuale delle nostre conoscenze non possiamo che riferirci ai due schemi seguenti (proposti da KÖGL, l. c.):



Secondo questo schema un derivato non ancora noto della glicina verrebbe condensato con una molecola di acetaldeide a treonina mediante l'azione di un'aldolasi.



Secondo lo schema II la glicina verrebbe prima deidrogenata ad acido iminogliossilico, questo poi subirebbe una condensazione aciloinica con una molecola di aldeide acetica allo stato nascente per formare una molecola di treonina.

Dal confronto poi dei miei risultati con quelli ottenuti da KÖGL e BORG si può trarre ancora una interessante conclusione. Tale confronto mi sembra giustificato dal fatto che sia il lievito da me impiegato, sia quello impiegato dagli Autori olandesi risponde all'azione del fattore Z approssimativamente con la stessa intensità. Ora KÖGL e BORG avevano osservato che 200 γ di d, l-treonina producono un'attivazione del 23% e una quantità doppia (400 γ) un'attivazione del 45%, mentre io ho trovato a 200 γ di treonina formata un'attivazione corrispondente al 46% circa. Ora se nella sintesi si fossero formate tutte e due le forme d e l e se queste fossero ambedue attive come fattore Z, 200 γ di treonina avrebbero dovuto produrre un'attivazione eguale a quella ottenuta da KÖGL e BORG con 200 γ di d, l-treonina (= 23%), mentre io ho avuto un'attivazione del 45% eguale a quella ottenuta da KÖGL e BORG con una quantità esattamente doppia. Questo comportamento mi autorizza a pensare che *nella sintesi biologica si forma l-treonina e che delle due forme solo la L sia attiva come fattore Z* ⁽¹⁾.

(1) La treonina esistente in natura ed isolata da ROSE dalla fibrina e dalla caseina ha la stessa configurazione spaziale del d-treoso. Fu perciò dall'Autore designata come d(—) treonina ed assegnata alla serie *destro*. Ma poichè la disposizione del gruppo NH₂ e dell'atomo di idrogeno intorno al C α è uguale a tutti gli aminoacidi naturali, cioè alla serie *levo*, è più opportuno denominare l'aminoacido naturale come l(—)treonina.

4. - RIPARTIZIONE DELLA TREONINA SINTETIZZATA TRA CELLULE E LIQUIDO NUTRITIVO.

KÖGL e BORG nelle citate esperienze in base a sole prove biologiche, misurando cioè l'extraproduzione di CO_2 giungevano alla conclusione che la la treonina, che molto probabilmente si formava dalla glicina, rimane quasi esclusivamente nelle cellule di lievito ed in ogni caso passa nel liquido nutritivo solo in quantità del tutto trascurabili.

Ho ripetute queste esperienze con metodi più sicuri, determinando cioè per via chimica la ripartizione della treonina sintetizzata tra cel-

TABELLA IV.

	Totale γ	Treonina trovata			
		libera		nelle cellule	
		γ	%	γ	%
(¹) Prova di controllo . .	300	7	2	293	98
Prova + glicina . . .	490	160	33	330	67
Treonina sintetizzata .	190	153	80	37	20

lule e liquido esterno nel modo detto sopra. Le medie dei risultati di alcune esperienze sono riassunte nella tabella IV.

Questi risultati dimostrano: 1) Che il lievito fresco (pressato) contiene circa il 3% di treonina (nella sospensione di lievito da me impiegata sono contenuti, infatti, 10 mg. di lievito). 2) Nella sospensione di lievito, allestita nel modo sopra esposto, il 98% della treonina è contenuto nelle cellule, il 2% nel liquido esterno. 3) Della treonina sintetizzata dalla glicina il 20% si trova nelle cellule, l'80% nel liquido esterno.

(¹) La stessa ripartizione è stata trovata in prove eseguite nella sospensione di lievito appena allestita.

5. - AZIONE DELL'AC. PANTOTENICO SULLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA E SULLA SINTESI BIOLOGICA DELLA TREONINA.

Era già noto dalle ricerche di WILLIAMS [18] che l'ac. pantotenico (uno dei fattori del filtrato) favorisce la fermentazione alcoolica del lievito. KÖGL e BORG nelle loro recenti ricerche avevano osservato che

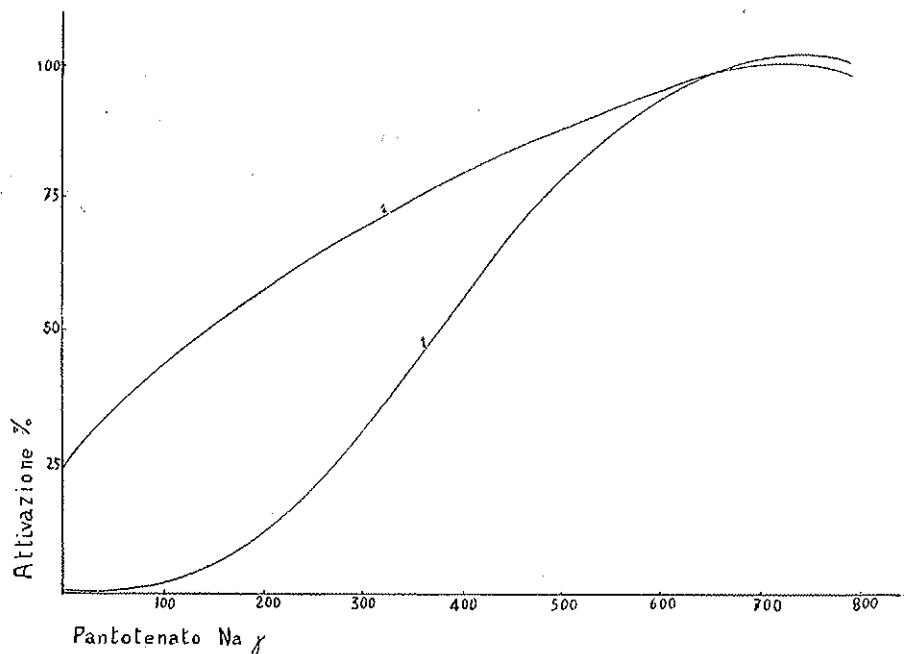


FIG. 3.

varie razze di lievito rispondevano in modo diverso all'azione dell'ac. pantotenico. Così per es. l'aggiunta di 10 mg. di pantotenato di sodio produceva in un lievito un'attivazione della fermentazione del 100%, in un altro un'attivazione del solo 10%. Ho perciò saggiato l'attività dell'ac. pantotenico sul lievito da me impiegato nel modo seguente: un determinato volume di sospensione in liquido nutritivo di lievito lavato viene misurato, assieme ad un noto volume di soluzione di pantotenato di sodio a varia concentrazione, in un vasetto dell'apparecchio di Warburg. Prove a cui si aggiunge un egual volume di acqua ser-

vono da controllo. Nella curva 1 della fig. 3 sono riportati i valori medi di alcune esperienze. Da essa si rileva come l'ac. pantotenico fino alla concentrazione di 100 γ circa non ha azione apprezzabile sulla fermentazione alcoolica, per quantità superiori favorisce la fermentazione fino a produrre un'attivazione del 100% con 700 γ . Quantità maggiori non producono ulteriore attivazione.

Questi risultati sono alquanto diversi da quelli di KÖGL e BORG i quali con 1200 γ di ac. pantotenico non ebbero alcun effetto ed il massimo di attivazione (=100%) venne raggiunto solo con 10.000 γ . Questo diverso comportamento può essere dovuto sia al diverso contenuto di ac. pantotenico dei lieviti impiegati, sia alla loro diversa sensibilità.

Ho inoltre voluto vedere se l'ac. pantotenico facesse aumentare l'attivazione prodotta dalla glicina sulla fermentazione. Ho perciò determinato l'extraproduzione di CO_2 in prove in cui si aggiungeva oltre a 250 γ di glicina quantità variabili di ac. pantotenico. I risultati di queste esperienze sono riportati nella curva 2 della fig. 3. L'andamento di questa curva è molto diverso da quello della curva 1: l'aggiunta di quantità crescenti di ac. pantotenico fa aumentare l'attivazione della sola glicina sino ad un massimo che per quantità di acido eguale a 600-700 γ corrisponde a quello del solo ac. pantotenico. Il tratto più interessante della curva è quello iniziale. Da esso infatti si ricava che l'ac. pantotenico, anche a concentrazioni in cui aggiunto da solo è inattivo, cioè fino a circa 100 γ , è capace di fare aumentare l'attivazione prodotta dalla glicina. Questa extraattivazione va poi diminuendo fino a raggiungere prima la somma delle due attivazioni (attivazione glicina + attivazione ac. pantotenico) e poi quella del solo ac. pantotenico. Questo comportamento ci ha fatto pensare che l'ac. pantotenico potesse avere azione sulla sintesi della treonina. Ho perciò determinato la quantità di questo aminoacido nelle prove in presenza e in assenza di ac. pantotenico ed ho trovato in media della prova con sola glicina 157 γ , nella prova con glicina + ac. pantotenico (10 γ) 204 γ di treonina, un'extra-produzione cioè di 47 γ di treonina corrispondenti ad un aumento del 30 % circa della sintesi ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ In queste esperienze non è stato notato alcun aumento apprezzabile del numero delle cellule.

Questi risultati dimostrano che l'ac. pantotenico favorisce la sintesi biologica della treonina; è anzi probabile che esso sia necessario o addirittura indispensabile alla sintesi stessa. Viene così indicata una nuova funzione di questa importante vitamina e dato un altro esempio di vitamine che intervengono nella sintesi biologica degli aminoacidi.

IV. — CONCLUSIONI

1) Viene confermata la presenza del fattore Z di EULER nell'estratto di lievito e l'attività della glicina sulla fermentazione alcolica prodotta dal lievito.

2) Viene dimostrata la sintesi biologica della treonina a partire dalla glicina. Da 250 γ di glicina si è ottenuta la formazione in media di 200 γ di treonina, una sintesi cioè del 50% circa. Della treonina sintetizzata il 20% si trova nelle cellule di lievito e l'80% nel liquido nutritivo.

3) Nella sintesi biologica si forma solo l(—)treonina che si è dimostrata essere anche la sola forma attiva come fattore Z.

4) Il lievito fresco (pressato) contiene circa il 3% di treonina.

5) L'ac. pantotenico aggiunto fino alla concentrazione di 100 γ non ha alcun effetto sulla fermentazione alcolica. Per concentrazioni maggiori produce un'attivazione che va fino al 100% con 500-1.000 γ .

6) L'ac. pantotenico è capace di far aumentare l'attivazione prodotta dalla glicina sulla fermentazione e questo avviene anche per concentrazioni di ac. pantotenico che da sole sono senza effetto.

7) All'aumento dell'attivazione prodotta dalla glicina fa riscontro un aumento della treonina sintetizzata dimostrandosi che l'ac. pantotenico favorisce la sintesi biologica della treonina. È possibile anzi che esso sia necessario o indispensabile alla sintesi stessa. Viene così indicata una nuova funzione di questa vitamina e dato un altro esempio di vitamine che intervengono nella sintesi biologica degli aminoacidi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] H. von EULER u. O. SWARTZ., Zeit. physiol. Chem., 1924, **140**, 146.
» K. MYRBÄCH., *Ibidem*, 1924, **141**, 297.
K. MYRBÄCH., *Ibidem*, 1924, **139** 30.
- [2] » u. H. EULER., *Ibidem*, 1928, **176** 265.
- [3] H. von EULER, E. BRUNIUS u. S. PROFF., *Ibidem*, 1928, **178**, 202
» u. JOHANSON., *Ibidem*, 1928 **178**, 209.
» E. BRUNIUS., Sv. Brugg. Manadsbl., 1928, **43**, 256.
» T. PHILIPSON., *Ibidem*, 1931, **198**, 1. Bioch. Zeit., 1932, **245**,
418, e 1932, **249**, 245.
- [4] T. PHILIPSON., Zeit. physiol. Chem., 1930, **193**, 75.
- [5] K. MYRBÄCH., Bioch. Zeit., 1933, **258**, 118.
- [6] H. BORCHARDT u. H. PRINGSHEIM., Bull. Soc. Chim. Biol. 1934, **16**, 736.
- [7] KÖGL., Naturw., 1937, 468.
- [8] H. von EULER u. H. LARSON., Zeit. physiol. Chem., 1934, **223**, 206.
- [9] T. PHILIPSON., *Ibidem*, 1930, **193**, 15.
- [10] G. H. W. LUCAS., Journ. Physiol. Chem., 1924, **28**, 1180.
- [11] C. D. von HULSEN., Dissertation. Utrecht, 16 March 1936 citato da KÖGL.
Zeit. physiol. Chem., 1941, **269**, 97.
- [12] F. KÖGL u. w. A. J. BORG., Zeit. physiol. Chem., 1941, **269**, 97.
- [13] T. PHILIPSON., *Ibidem*, 1930, **193**, 15.
- [14] R. J. BOCK a. D. BOLLING., Journ. of Biol. Chem., 1939, **130**, 365.
- [15] O. DIMROTH u. E. SCHWEIZER., Ber. d. deutsch. Chem. Gesell., 1923, **56**, 1375.
W. S. Mc. CLENAHAN, R. C. HOCKETT., Journ. Amer. Chem. Soc., 1938, **60**, 2061.
R. E. OESPER a. C. L. DEASY., *Ibiden*, 1939, **61**, 972.
- [16] R. HIRSCH., Ber. d. deutsch. Chem. Gesell., 1890, **23**, 3705.
- [17] F. KÖGL., l. c. p. 206.
- [18] R. D. WILLIAMS, W. A. MOSTER, E. ROHRMAN., Bioch. Journ., 1936, **30**, 2036.