

**A T T I**  
**DELLA**  
**SOCIETÀ TOSCANA**  
**DI**  
**SCIENZE NATURALI**  
**RESIDENTE IN PISA**

**MEMORIE - SERIE B**

**VOL. LXXXVI - ANNO 1979**

## INDICE

DE DOMINICIS V., CASINI S. - Memoria illustrativa per la carta della vegetazione della Val di Farma (Colline Metallifere) <i>Explanatory notes on the Farma Valley (Colline Metallifere) vegetation map</i> . . . . .	Pag. 1
MICELI P., GARBARI F. - Cromosomi ed anatomia fogliare di quattro <i>Allium</i> diploidi di Grecia <i>Chromosomes and leaf anatomy of four diploid Allium of Grece</i> . . . . .	» 37
FERRI S., CAPRESI P. - Ricerche sui flavonoidi di <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Compositae) <i>Chemical investigation on Matricaria chamomilla flavonoids (Compositae)</i> . . . . .	» 53
FERRI S., CARLOZZI C. - Influenza dell'idrolisi acida sulla morfologia, sulla cristallinità e sulla struttura dei granuli di amido <i>The effect of acid hydrolysis on the morphology, the crystallinity and the structure of Potato starch grains</i> . . . . .	» 63
CORSI G., PAGNI A.M. - Studi sulla flora e vegetazione del Monte Pisano (Toscana Nord-Occidentale). V. Le piante spontanee nella alimentazione popolare <i>Investigations on the flora and vegetation of Monte Pisano (North-Western Tuscany). V. The native plants in the human alimentation</i> . . . . .	» 79
VANNI S. - Note di erpetologia della Toscana: <i>Salamandrina terdigitata</i> , <i>Rana graeca</i> , <i>Coluber viridiflavus</i> , <i>Natrix natrix</i> <i>Notes of erpetologia of the Tuscany: Salamandrina terdigitata, Rana graeca, Coluber viridiflavus, Natrix natrix</i> . . . . .	» 103
FAGOTTO F. - The Speke's Gazelle and its habitat in Somalia <i>La Gazzella di Speke e il suo ambiente in Somalia</i> . . . . .	» 125
ONNIS A., STEFANI A., BISAIA L. - <i>Ampelodesmos tenax</i> Link (Gramineae): effetti della temperatura sulla germinazione in relazione alle condizioni dell'habitat <i>Ampelodesmos tenax (Gramineae): effects of temperature on germination in relation to habitat conditions</i> . . . . .	» 133
MALLEGNI F., FORNACIARI G. - Su di un calvario turricéfalo della tomba VII della Necropoli Eneolitica del Gaudio (Paestum) <i>A turricéfalic calvarium of Burial VII in the Gaudio (Paestum) Eneolithic Necropolis</i> . . . . .	» 149
BRANCONI S., DE DOMINICIS V., BOSCAGLI A., BOLDI L. - La vegetazione dei terreni argillosi pliocenici della Toscana meridionale. I. Vegetazione pioniera ad « <i>Artemisia cretacea</i> » <i>Vegetation in the clayey Pliocenic soil of Southern Tuscany. I. Pioneer vegetation characterized by the presence of « Artemisia cretacea »</i> . . . . .	» 163

- MALLEGNI F., FORNACIARI G., TARABELLA N. - Studio antropologico dei resti scheletrici della Necropoli dei Monterozzi (Tarquinia)  
*Anthropological study of skeletal remains of Necropolis of Monterozzi (Tarquinia)* . . . . . » 185
- NAVARI-IZZO F., LOTTI G., GIULIANI P. M. - Ricerche sulle interazioni tra zinco e acido gibberellico in *Pisum sativum* L.  
*Researches on the interactions between zinc and gibberellic acid in Pisum sativum L.* . . . . . » 223
- RAIMONDO F. M. - Reperti per la flora briologica delle Alpi Apuane. Le raccolte al Monte Procinto  
*Records for the bryological flora of the Apuan Alps. The collections at Mount Procinto* . . . . . » 237
- CASSOLA F. - Un interessante reperto al Lago di Montepulciano (Siena): il *Carabus clathratus antonellii* Luigioni (Coleoptera Carabidae)  
*A noteworthy capture at the Lago di Montepulciano (Siena): Carabus clathratus antonellii Luigioni (Coleoptera Carabidae)* . . . . . » 249
- BALDERI F., TOMASELLI M. - Il paesaggio vegetale della conca del Lago Torbido e del Lago Turchino al Monte Rondinaio (Appennino lucchese-modenese). III contributo. Nuovo reperto di *Woodsia alpina* (Bolton) S. F. Gray  
*Floristic and vegetational aspects of the glacial valley of Torbido and Turchino Lakes near Mount Rondinaio (Northern Apennines). III Contribution. New record of Woodsia alpina (Bolton) S.F. Gray* . . . . . » 253
- ABBA G. - Flora esotica del Piemonte. Specie coltivate e spontaneizzate e specie avventizie  
*Exotic flora of Piedmont. Naturalized and adventive species* . . . . . » 263
- SCRUGLI A., GRASSO M. P. - Contributo alla conoscenza delle *Orchidaceae* della Sardegna centrale  
*Contribution to the knowledge of Orchidaceae of Central Sardinia* . . . . . » 303
- VERGNANO GAMBÌ O., PANCARO L., GABBRIELLI R. - Investigations on a nickel accumulating plant: *Alyssum bertolonii* Desv. II. Phosphorus, potassium, iron and trace element content and distribution during growth  
*Ricerche su una pianta accumulatrice di nichel: Alyssum bertolonii Desv. II. Contenuto in fosforo, potassio, ferro e oligoelementi e loro distribuzione durante il ciclo vegetativo* . . . . . » 317
- CORSI G., MORELLI I., PAGNI A. M., CATALANO S. - Osservazioni morfologiche, isto-anatomiche, cariologiche e fitochimiche su *Melissa officinalis* s.l. (*Lamiaceae*)  
*Morphological, histo-anatomical, caryological and phytochemical observations about Melissa officinalis s.l. (Lamiaceae)* . . . . . » 331
- MARCHIONNI V., ROLANDO A. - Influence of bonellin on the time of sex inversion and on fertility in *Ophryotrocha puerilis*  
*Influenza della bonellina sul momento della inversione del sesso e sulla fertilità in Ophryotrocha puerilis* . . . . . » 355
- BRACALONI C., PISTOLESI G. - Indagini sulle zone umide della Toscana. II. Il padule di Bientina  
*Investigations on the wetlands of Tuscany. II. Il «padule di Bientina»* . . . . . » 363
- TOMEI P. E., PISTOLESI G. - Indagini sulle zone umide della Toscana. III. Aspetti floristici e vegetazionali del padule di Bientina. Nota preliminare

- Investigations on the wetlands of Tuscany. III. Floristic and vegetational aspects of « padule di Bientina ». A preliminary note . . . . . » 377*
- TOMEI P. E., ROMÈ A. - Indagini sulle zone umide della Toscana. IV. Considerazioni sulle specie ornitiche fino ad oggi note per il bacino del Bientina (Lucca-Pisa)  
*Investigations on the wetlands of Tuscany. IV. The birds of the « Padule di Bientina » (Lucca and Pisa districts) . . . . . » 411*
- BARTELLETTI A., TOMEI P. E. - Indagini sulle zone umide della Toscana. V. Il popolamento ornitico del Lago di Porta (Lucca, Massa-Carrara)  
*Investigations on the wetlands of Tuscany. V. The birds of the « lago di Porta » (between Lucca and Massa-Carrara districts) . . . . . » 433*
- PAOLI G., PELOSINI I. - I gruppi sanguigni del sistema ABO negli scheletri di età romana di Collelongo (L'Aquila, Abruzzo)  
*ABO blood-group determination on Roman Age skeletons from Collelongo necropolis (Abruzzo, Italy) . . . . . » 459*
- PAGNI A. M., CORSI G. - Cariologia di alcune specie d'interesse officinale della flora italiana  
*Karyology of some species of Italian officinal flora . . . . . » 465*
- FICINI G., LUCCHESI G. - Sulla presenza dell'Aquila reale — *Aquila chrysaetus* (L.) — in Toscana  
*On the presence of the eagle — Aquila chrysaetus (L.) — in Tuscany » 475*

S. FERRI (\*) e C. CARLOZZI

## INFLUENZA DELL'IDROLISI ACIDA SULLA MORFOLOGIA, SULLA CRISTALLINITA' E SULLA STRUTTURA DEI GRANULI DI AMIDO

**Riassunto** — Vengono riferiti i risultati di ricerche chimiche, microscopiche, micrografiche e roentgenografiche su granuli di amido di patata trattati con HCl per valutare l'influenza della idrolisi acida sulla morfologia, sulla cristallinità e sulla struttura dei granuli stessi nell'intento di affinare le conoscenze sulla loro ultrastruttura.

Dai risultati ottenuti emerge che l'azione acida determina sull'amido di patata i seguenti effetti: diminuzione del contenuto in amilosio e relativo conseguente aumento dell'amilopectina; depolimerizzazione della molecola di amilopectina; aumento dell'indice di cristallinità; diminuzione delle dimensioni dei cristalliti; distruzione degli strati esterni dei granuli.

Dalla interpretazione delle varie risultanze viene confermato che l'amilopectina costituisce la parte cristallina del granulo di amido, mentre l'amilosio, che viene completamente solubilizzato nel corso dell'idrolisi, rappresenta la sostanza amorfa.

Viene inoltre prospettato come l'amilopectina dell'amido di patata abbia diversi stadi di organizzazione; oltre l'amilopectina cristallina è presente una frazione amorfa che viene solubilizzata nel primo periodo di idrolisi acida e una frazione di amilopectina paracristallina messa in evidenza dal persistere nei diffrattogrammi della cosiddetta « banda di diffrazione », dopo che è stato allontanato completamente per idrolisi tutto l'amilosio. Nei successivi stadi dell'azione idrolitica si ottengono risultanze che sono indicative di un fenomeno di depolimerizzazione che interessa la molecola dell'amilopectina nel suo complesso correlabile anche con la variazione delle dimensioni delle micelle cristalline.

**Abstract** — *The effect of acid hydrolysis on the morphology, the crystallinity and the structure of Potato starch grains.* The effect of acid hydrolysis on Potato starch grains has been studied in order to gain further knowledge of their chemical and structural organization. To this end starch grains were treated with 1N HCl at intervals from 1 to 110 days and chemical, microscopical, micrographic and x-ray diffraction investigations were then carried out.

---

(\*) Istituto di Botanica dell'Università di Siena.

It was found that acid hydrolysis has the following effects on Potato starch grains: decrease of amylose content and consequent increase of amylopectin content, depolymerization of amylopectin molecules; increase of the crystallinity index; disaggregation of the external layers.

The interpretation of the different results seems to confirm that amylopectin is the crystalline portion of the starch grain, while the amylose, which is completely solubilized during hydrolysis, is the amorphous substance.

The amylopectin of Potato starch grain shows three different types of organization. In fact in addition to the crystalline amylopectin, both an amorphous portion (which is solubilized during the first stage of acid hydrolysis) and a paracrystalline portion — evidenced by the persistence of a « diffraction » diffuse halo (« banda di diffrazione ») after hydrolysis of all amorphous substances — can be found. During later stages of the acid treatment, results show a depolymerization phenomenon of the amylopectin molecules. Besides hydrolysing the amorphous substances the acid treatment seems also to affect bonds other than the glucosidic ones, causing the crystalline micelles to become smaller. This effect seems to occur at two different moments: a first time during the initial 24 hours, and later after 110 days of treatment.

**Key words**— Starch grains; acid hydrolysis effects.

Le caratteristiche fisiche e chimiche dei granuli di amido sono dovute alla organizzazione e al grado di associazione delle loro macromolecole; la completa conoscenza della ultrastruttura dei granuli di amido può essere di notevole importanza non solo per la biologia ma anche per l'industria ed in particolare per quella farmaceutica.

Tale ultrastruttura, sebbene sia stata studiata (cfr. J. A. RADLEY, 1968; A. FREY-WYSSLING, 1969; D. FRENCH, 1972) con metodi chimici, fisici e microscopici non è stata ancora completamente chiarita benché siano state prospettate diverse ipotesi. In particolare non è ancora nota la distribuzione delle zone cristalline ed amorfe nei granuli di amido.

Contributi alla conoscenza della struttura e delle relazioni intercorrenti tra struttura e morfologia sono state già oggetto di pubblicazione da parte di uno di noi (A. BROGI, S. FERRI et al., 1971; S. FERRI, 1974). Da tali lavori era emersa l'opportunità di approfondire l'indagine attraverso lo studio delle influenze di trattamenti rivolti alla demolizione selettiva del granulo di amido. Nel presente lavoro, a prosecuzione di quelle ricerche, vengono riferiti i risultati di indagini microscopiche, micrografiche, chimiche e roentgenografiche su granuli di amido di patata trattati con HCl per tempi variabili da un giorno a 110 giorni.

## METODI E RISULTATI

Il trattamento acido è stato fatto su amido di patata B.D.H. con HCl (7,5%; pH = 1) in stufa a 37°C per periodi di tempo variabili. I campioni sono stati prelevati dalla soluzione acida dopo 1, 2, 4, 7, 12, 22, 50, 110 giorni e successivamente sono stati lavati ripetutamente con acqua, centrifugati ed essiccati.

### INDAGINI MORFOLOGICHE

#### *Osservazioni al microscopio ottico*

Sia l'amido nativo che l'amido sottoposto a idrolisi acida sono stati osservati in acqua e in liquido di Lugol al microscopio ottico di polarizzazione.

I granuli di amido dei campioni prelevati a 1, 2, 4, 7, 12, 22 e 50 giorni di trattamento acido non rivelano, rispetto all'amido nativo, modificazioni di rilievo nella forma, nella birifrangenza e nella « croce di estinzione » che, come è noto, è indice di un aggregato cristallino a struttura fibroso-raggiata (cfr. A. BROGI, S. FERRI et al., 1971). Le stratificazioni concentriche, invece, divengono via via più marcate con il procedere del trattamento acido e conferiscono ai granuli sempre più una caratteristica tessitura cipollare (cfr. S. FERRI, 1974). Nel campione trattato 50 giorni gli strati, separati nettamente l'uno dall'altro, mostrano a loro volta nel loro interno linee di stratificazioni tenui e fitte.

Caratteri diversi presenta l'amido trattato per 110 giorni: i suoi granuli, pur conservando la birifrangenza, mostrano una diminuzione dei valori di quest'ultima, cui si accompagna una croce di estinzione più sfumata. In gran parte dei granuli si notano spaccature soprattutto nella zona ilare; tali spaccature provocano frammenti cuneiformi in cui permangono evidenti le linee di stratificazione, ma non la birifrangenza.

Per quanto riguarda le dimensioni, con il progredire del trattamento acido, l'osservazione microscopica permette di notare un aumento percentuale del numero di granuli piccoli che è massimo nel campione di amido trattato per 110 giorni.

Il liquido di Lugol conferisce all'amido una colorazione diversa in rapporto al periodo di trattamento acido (vedi Tabella 1).

I granuli del campione trattato un giorno si colorano come

TABELLA 1

AMIDO DI PATATA		SOLUZIONE DI LUGOL	I.A.	AMILOSTIO %	AMILOPEPTINA %	GRUPPI TERMINALI %	INDICE CRISTALLINITA' %	MICELLE CRISTALLINE in Å	
								d <sub>(hoc)</sub>	d <sub>(oko)</sub>
nativo		blu-viola	4,08	21,4	78,6	0,88	56	148,5	110,7
trattato con HCl	1 g	blu-viola, viola-rosso	3,9	20,5	79,5	1,12	65	157	105
	2 gg	rosso-violaceo rosso	0,82	14,8	85,2	1,15	66	157	105
	4 gg	rosso	2,3	11,9	88,1	1,48	67	157	105
	7 gg	rosso	0,8	4,1	95,9	1,77	67,6	157	105
	12 gg	rosso	0,5	1,4	98,6	1,82	70	157	105
	22 gg	rosso	0,2	1,2	98,8	3,02	72	157	105
	50 gg	rosso-bruno	0	0	100	3,4	75	157	105
	110 gg	marrone	0	0	100	n.d.	80	154	105

quelli dell'amido nativo. Negli altri campioni trattati più a lungo vi è un colore predominante, ma vi sono anche granuli, di solito i più piccoli, che presentano varie sfumature. I granuli di amido trattati per 50 e per 110 giorni assumono la colorazione solo dopo diversi giorni di permanenza nel liquido di Lugol.

#### *Osservazioni al microscopio elettronico*

Le osservazioni sono state effettuate su materiale preparato con le tecniche di criodecapaggio e la strumentazione illustrata in un precedente lavoro (S. FERRI, 1974).

Nell'amido nativo di patata la superficie fratturata ha un aspetto granulare e creste di frattura decorrono più o meno radialmente: caratteristiche queste già osservate da R. LEONARD e C. STERLING (1972).

Nell'amido sottoposto a trattamento acido la superficie esterna dei granuli è quasi sempre intatta; nel loro interno si nota la presenza di strati separati da fasce concentriche (« zone di interstrato » Fig. 1) che fanno supporre una discontinuità nella struttura (M. S. BUTTROSE, 1963; C. STERLING, 1968) e che si fanno via via più evidenti con il procedere del trattamento.

A 22 giorni di trattamento acido gli strati si evidenziano al massimo (Fig. 2) per la presenza di « zone di interstrato » molto

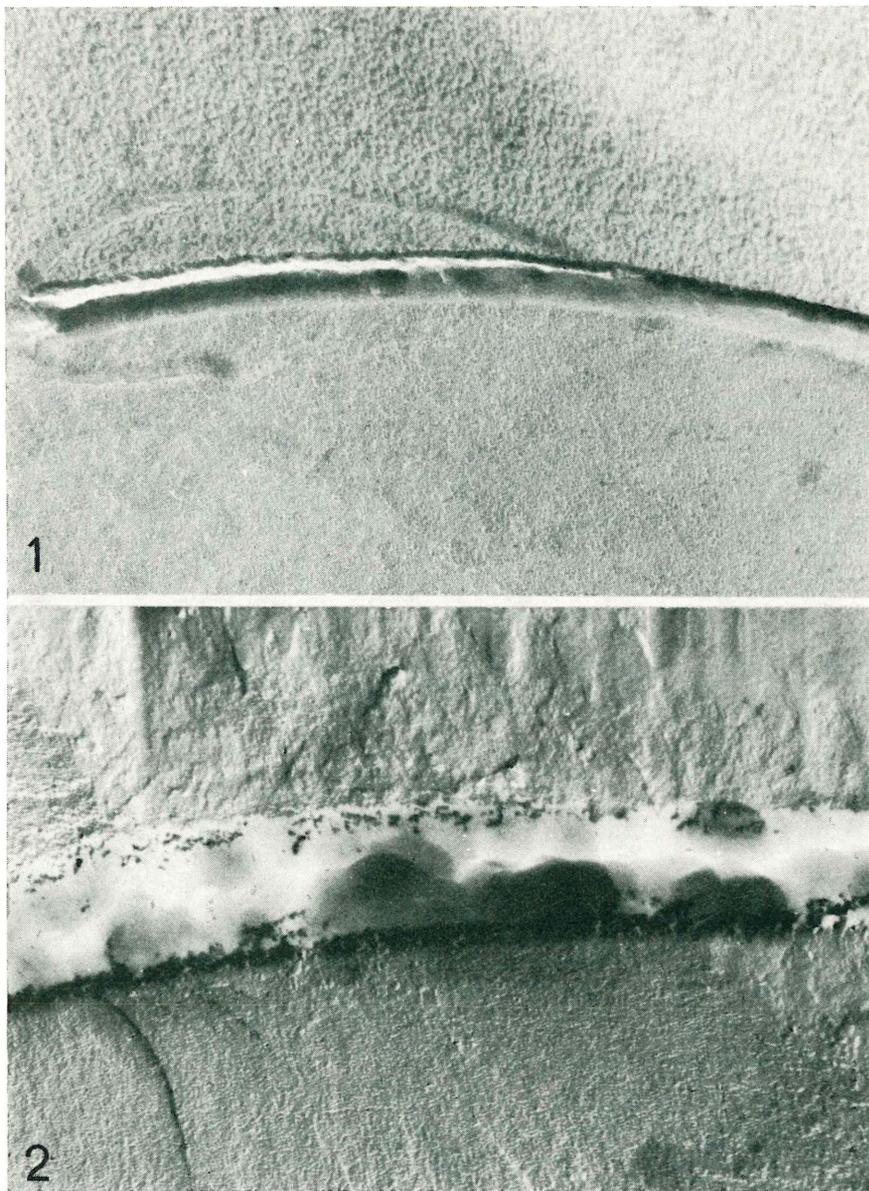


Fig. 1 - Particolare di granulo di amido di patata sottoposto a trattamento acido per 4 giorni. Si nota una incipiente zona di « interstrato ». (x 40.500)

Fig. 2 - Particolare di un granulo di amido di patata sottoposto a trattamento acido per 22 giorni. E' chiaramente visibile la « zona di interstrato ». (x 45.000)

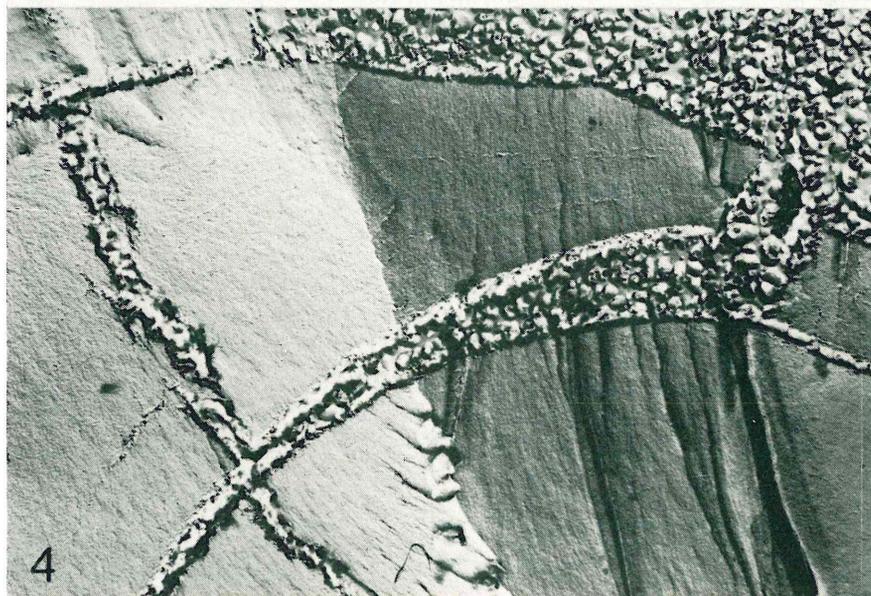


Fig. 3 - Particolare di un granulo di amido di patata sottoposto a trattamento acido per 22 giorni. Sono visibili due strati separati da una « zona di interstrato » (\*). Entrambi gli strati si stanno suddividendo come indica la presenza di due linee di stratificazione nello strato interno e di un maggior numero in quello esterno. (x 45.000)

Fig. 4 - Particolare di un granulo di amido di patata sottoposto a trattamento acido per 22 giorni. Si nota la presenza di fratture radiali entro gli strati, prima fase della loro frammentazione. (x 54.000)

ampie, apparentemente vuote; dalle micrografie non è possibile dedurre se l'asportazione del materiale sia avvenuta in senso centripeto o centrifugo. Non sembra che la permanenza in acido dopo il primo giorno di trattamento provochi una sensibile apparente riduzione nello spessore degli strati; provoca però la suddivisione degli strati stessi (Fig. 3) contrassegnata dalla comparsa, soprattutto in quelli esterni, di linee di stratificazione (« Feinstlamellen » di A. FREYWYSSLING e M. S. BUTTROSE, 1961). Tali suddivisioni si manifestano con linee discontinue simili ad un tratteggio che via via si uniscono tra loro. Prima che ciò avvenga non si rileva fra tratto e tratto alcuna differenza dalla rimanente parte acido-resistente del granulo. Negli amidi sottoposti a idrolisi più prolungata gli strati esterni vengono demoliti mediante frantumazione dovuta a fratture nel corpo degli strati (Fig. 4): piccole sezioni di strati sono allontanate e solubilizzate completamente quando ormai non fanno più parte integrante del granulo. Non si osservano spaccature ilari.

Dall'osservazione di numerose micrografie dell'amido trattato da 1 a 22 giorni risulta che la superficie di frattura è meno granulata di quella dell'amido nativo. Dopo 22 giorni di trattamento presenta invece una trama lassa non ben definibile.

Nell'amido trattato per 50 e per 110 giorni si manifestano fenomeni di retrogradazione la cui problematica verrà discussa ad uno stadio più evoluto delle ricerche.

#### INDAGINI CHIMICHE

##### *Determinazione del contenuto in amilosio e in amilopectina*

Il contenuto in amilosio è stato determinato mediante la titolazione amperometrica di Larson riproposta da J. N. BEMILLER (1964) con la quale si ottiene la quantità di iodio legata all'amilosio cioè la « Iodine Affinity » (I.A.). Come I.A. dell'amilosio puro è stato assunto il valore medio di 19 (J. HOLLO e J. SZEITLI, 1968). Il contenuto in amilopectina è stato dedotto per differenza.

La I.A. dell'amido nativo, in base alla media di molte determinazioni, è di 4,08, da cui si deduce che il contenuto in amilosio è di 21,4%; il restante 78,6% è costituito quindi da amilopectina.

Nei campioni di amido sottoposti a trattamento acido la I.A. risulta progressivamente più bassa: da un valore di 3,9 per l'amido

trattato per 1 giorno passa a 0 nell'amido trattato per 50 giorni. Si verifica quindi una diminuzione progressiva del contenuto in amilosio fino alla sua totale scomparsa nei campioni trattati a lungo (vedi Tabella 1).

### *Valutazione del grado di polimerizzazione dell'amilopectina*

La degradazione dell'amilopectina non si è potuta calcolare in maniera esatta in quanto non è noto il suo peso molecolare. Per valutare il grado di polimerizzazione è stato adoperato il metodo di B. SHASHA e R. L. WHISTLER (1964) basato sulla titolazione dell'acido formico liberato dai gruppi terminali non riducenti mediante ossidazione con metaperiodato di sodio.

Da tale titolazione è risultato che la quantità di acido formico aumenta progressivamente con la durata del trattamento acido. Dal contenuto in acido formico è stata dedotta la percentuale dei gruppi terminali liberi e i relativi valori sono riportati nella Tabella 1. Tali valori danno indirettamente l'indice del grado di depolimerizzazione.

## INDAGINI ROENTGENOGRAFICHE

### *Roentgenogrammi*

Le analisi roentgenografiche sono state eseguite su campioni di amido umido mediante un diffrattometro Rigaku-Denkij, radiazioni  $\text{CuK}\alpha$  filtrate con Nikel, nelle seguenti condizioni ottimali:  $R=16$ ;  $M=1$ ;  $T.C.=4$ ;  $KV=37$ ;  $mA=20$ ; velocità del goniometro di  $1^\circ/\text{min}$ .

I roentgenogrammi (Fig. 5) dei campioni di amido sottoposto a trattamento acido appartengono tutti all'amido di « tipo B », come quelli dell'amido nativo: il trattamento acido non ha alcuna sostanziale influenza né sulla posizione angolare dei picchi, né sull'andamento del loro profilo.

Con il progredire del tempo di trattamento, si verificano solo modificazioni nell'altezza della cosiddetta « banda di diffrazione » (che è dovuta alla componente paracristallina dell'amido, A. BROGI, S. FERRI et al., 1971) e di conseguenza nell'altezza dei picchi di dif-

frazione. Mentre tale banda va abbassandosi, l'altezza dei picchi di diffrazione va gradualmente aumentando.

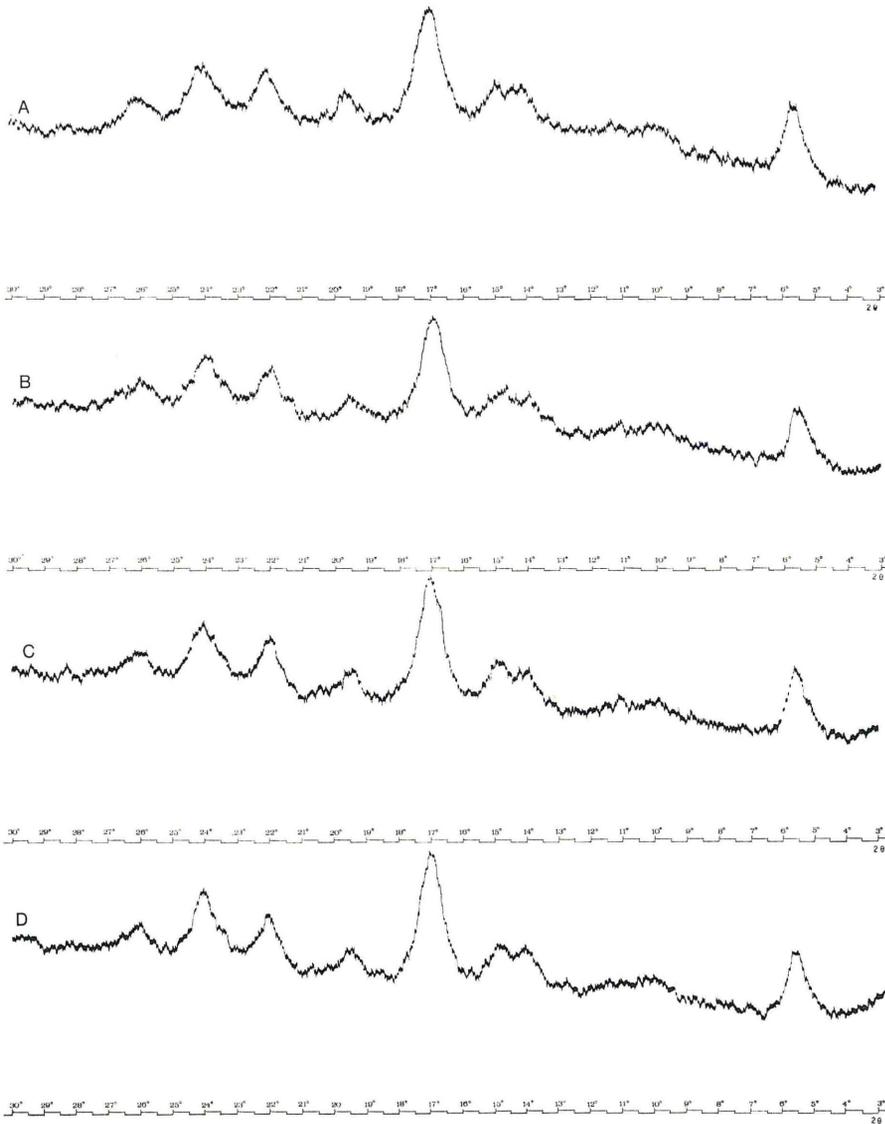


Fig. 5 - Roentgenogrammi di amido di patata nativo (A) e di amido di patata trattati con HCl per 4 giorni (B), per 22 giorni (C) e per 50 giorni (D). E' evidente la permanenza della cosiddetta « banda di diffrazione ».

### *Indice di cristallinità*

La coesistenza di due fasi, una cristallina e una paracristallina, rende difficile individuare un parametro che possa esprimere quantitativamente il grado di cristallinità. E ciò in quanto la presenza nei diffrattogrammi dei picchi di diffrazione maschera l'esatto andamento della cosiddetta « banda di diffrazione » dovuta, come si è detto, alla componente paracristallina. Tuttavia per una valutazione qualitativa si è ricorsi ad una espressione dell'indice di cristallinità mediante il rapporto  $\frac{I_p}{I_p + I_b}$ , dove  $I_p$  rappresenta l'altezza del picco di diffrazione più intenso e  $I_b$  quella della cosiddetta « banda di diffrazione ».

I valori dell'indice di cristallinità così valutato subiscono un incremento da 56% dell'amido nativo a 80% nell'amido trattato per 110 giorni (vedi Tabella 1).

### *Dimensioni delle micelle cristalline*

Le dimensioni delle micelle cristalline sono state calcolate applicando la formula di Scherrer (Z. NIKUNI e S. HIZUKURI, 1957) ai picchi 1 e 4 dei diffrattogrammi dell'amido nativo e dell'amido trattato con HCl, ottenendo così le dimensioni medie per le presunte direzioni  $a$  e  $b$  della cella elementare (R. E. RUNDLE et al., 1944).

Per l'amido di patata nativo sono stati ottenuti i valori di 148,5 Å per  $d_{(h00)}$  e di 110,7 Å per  $d_{(0k0)}$ , mentre per tutti i campioni sottoposti a idrolisi acida sono stati determinati valori leggermente più bassi dei precedenti e cioè rispettivamente 137 Å e 103 Å. Questi ultimi valori sono rimasti costanti indipendentemente alla durata del trattamento, eccetto per il campione sottoposto a idrolisi acida per 110 giorni in cui risultano 134 Å e 103 Å (vedi Tabella 1).

### DISCUSSIONE

La permanenza dell'amido di patata in acido cloridrico, nelle condizioni operative da noi impiegate, provoca risposte diverse nel tempo relativamente al contenuto in amilosio, agli effetti di diffrazione ai raggi X, alle caratteristiche osservabili al microscopio ot-

tico ed elettronico. Tali risposte possono essere così schematizzate:

- dopo un giorno di trattamento acido si evidenziano gli strati e si determina una diminuzione delle dimensioni dei cristalliti;
- dopo 4 giorni il contenuto in amilosio è circa la metà del contenuto iniziale;
- dopo 7 giorni il contenuto in amilosio è circa un quarto di quello dell'amido nativo;
- dopo 22 giorni aumenta l'altezza dei picchi di diffrazione, l'amilosio è quasi scomparso, l'ultrastruttura delle superfici di frattura appare diversa da quella dell'amido nativo;
- dopo 50 giorni l'amilosio è scomparso.

Le suddette risultanze sono inoltre accompagnate da una graduale diminuzione della cosiddetta « banda di diffrazione », da una graduale degradazione dell'amilopectina, da un graduale aumento della percettibilità degli strati e delle linee di stratificazione, da un graduale aumento dell'indice di cristallinità.

Dopo 110 giorni di trattamento si raggiunge il massimo di cristallinità e la massima evidenza degli strati; si osserva inoltre una distruzione degli strati esterni dei granuli.

Confrontando fra loro i diversi fenomeni, si può osservare che la cosiddetta « banda di diffrazione » (Fig. 5) si riduce in intensità via via che diminuisce la percentuale di amilosio, senza tuttavia sparire con la scomparsa dell'amilosio. La solubilizzazione dell'amilosio, considerata in relazione al tempo di trattamento acido, procede con diversa velocità (Fig. 6): l'amilosio diminuisce molto più rapidamente nei primi dodici giorni che non nei successivi 38 giorni.

Si può pertanto dedurre che il primo stadio dell'idrolisi acida interessa principalmente la parte amorfa del granulo di amido, come è stato del resto dimostrato con altri metodi sperimentali anche da K. KAINUMA e D. FRENCH (1971) e da J. P. ROBIN et al. (1974). Inoltre poiché a 50 giorni di trattamento i granuli di amido sono costituiti solo da amilopectina, è possibile affermare che l'amilosio (in quanto è il componente più facilmente idrolizzabile) è anche quello meno organizzato dei granuli di amido, mentre l'amilopectina rappresenta non solo la componente dell'amido più « organizzata » ma anche la parte più resistente all'idrolisi acida. Però la permanenza della cosiddetta « banda di diffrazione » nei diffrattogrammi

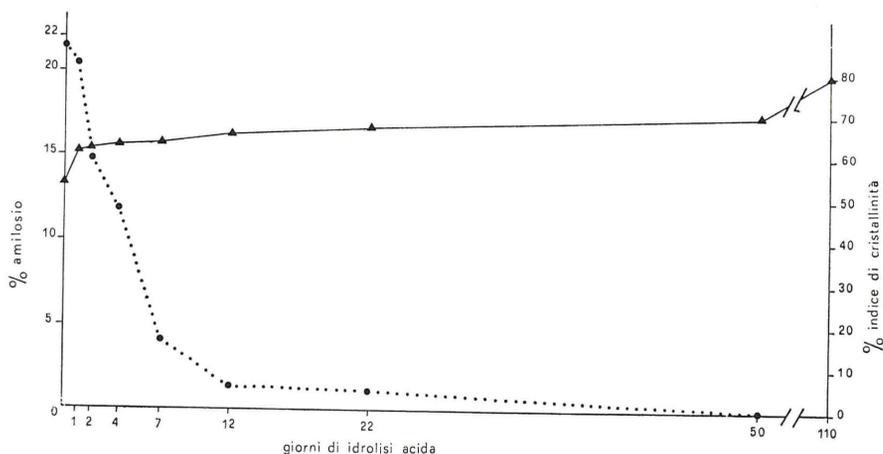


Fig. 6 - Percentuale di amilosio —▲— e dell'indice di cristallinità ...●... in funzione del tempo di idrolisi acida.

dei campioni di amido idrolizzato per 50 e per 110 giorni, nei quali l'amilosio è completamente solubilizzato (100% di amilopectina), indica che è ancora presente una sostanza paracristallina.

Ciò fa supporre che nei granuli di amido l'amilopectina sia presente in diversi stadi di organizzazione: una prevalente frazione ben ordinata e quindi cristallina e una frazione assai poco ordinata (paracristallina), che secondo D. FRENCH (1972) e J. P. ROBIN et al. (1974) sarebbe addirittura « amorfa ». Ma se questa seconda frazione fosse del tutto amorfa, dovrebbe completamente venire idrolizzata, per quanto si è detto in precedenza, contemporaneamente all'amilosio, il che non si verifica nemmeno nei granuli trattati più a lungo. E' lecito quindi supporre che una parte di questa frazione resistente all'idrolisi più dell'amilosio, pur non costituendo un vero e proprio sistema ordinato secondo un reticolo cristallino, abbia un certo grado di organizzazione e sia localizzata nelle regioni adiacenti a quelle cristalline. Ciò sarebbe in accordo con il modello « cluster » dell'amilopectina proposto da D. FRENCH (1972, pag. 23): « parts of the amylopectin molecule crystallize during growth, thus sterically blocking off that portion from further chain elongation. Such a molecular pattern would have alternating crystalline and amorphous regions » o, secondo le nostre supposizioni, cristalline e paracristalline.

La frazione cristallina dovrebbe essere più resistente all'idrolisi per avere tutti i legami glucosidici protetti; altrettanto non può dirsi per le congiunzioni con le regioni amorfe o paracristalline, in cui dovrebbero predominare i legami  $\alpha$  1-6 (K. KAINUMA e D. FRENCH, 1971; J. P. ROBIN et al., 1974).

Quanto sopra è in accordo con le nostre osservazioni dalle quali si deduce che la struttura reticolare cristallina dei granuli di amido sottoposti a idrolisi acida sino a 110 giorni rimane inalterata in tutti i campioni trattati, come è dimostrato dalla permanenza della « croce di estinzione », dalla immutata birifrangenza dei granuli e soprattutto dal fatto che la posizione angolare dei picchi di diffrazione resta costante per tutta la durata del trattamento acido.

Man mano che aumenta il tempo di idrolisi acida, gli strati dei granuli diventano sempre più evidenti. I primi a comparire sono i più esterni e non sembra di poter confermare che la corrosione avvenga con uguale rapidità in tutti gli strati come osservato da M. S. BUTTROSE (1963) adoperando HCl a maggior concentrazione. Tra strato e strato vi sono zone apparentemente vuote (« zone di interstrato »), appena delineate a 4 giorni di trattamento (amilosio 11,9%; Fig. 1), molto evidenti a 22 giorni di trattamento (amilosio 1,2%; Fig. 2).

Queste osservazioni portano a pensare che la parte meno organizzata (per quanto detto sopra rappresentata da amilosio e probabilmente da una frazione di amilopectina) sia localizzata, almeno in una percentuale notevole, nelle « zone di interstrato » in accordo con E. BANCHER e J. HÖLZL (in C. STERLING, 1968).

La frazione amorfa è responsabile delle caratteristiche plastiche del granulo di amido (C. STERLING e B. J. SPIT, 1958; D. FRENCH, 1972) e la sua asportazione provoca una facile frammentazione dei granuli per deboli deformazioni. Infatti al microscopio ottico si osservano spaccature della zona ilare, provocate probabilmente da manipolazioni tecniche, e frammentazioni che interessano gli strati esterni con formazioni di frammenti cuneiformi privi di birifrangenza. Al microscopio elettronico non si osservano invece le spaccature ilari.

Ammettendo che la distruzione degli strati esterni non sia dovuta a stress provocati dai processi a cui questi granuli vengono sottoposti, si potrebbe pensare che la parte centrale del granulo

di amido di patata abbia una organizzazione diversa dalla zona periferica o media (D. GALLANT et al., 1972). Ciò potrebbe essere confermato anche dal fatto che negli strati esterni compaiono sottili linee di stratificazione (Fig. 3) che sono assenti nella parte ilare.

La degradazione dell'amilopectina, che inizia fin dal primo giorno di trattamento acido, dovrebbe interessare preferenzialmente molecole situate nelle « zone di interstrato » insieme all'amilosio. Tale asserzione non esclude la presenza di amilopectina (amorfa o meglio paracristallina) nel corpo dello strato, nel quale per altro sono evidenti modificazioni della superficie di frattura dopo una permanenza in acido abbastanza lunga.

I dati ottenuti con l'ossidazione mediante periodato ci permettono di notare un aumento dei gruppi terminali riducenti, cui corrisponde una diminuzione della lunghezza media delle catene. Tale diminuzione può derivare, oltre che dalla degradazione dell'amilopectina amorfa, anche dalla degradazione dell'amilopectina che compone gli strati esterni dei granuli la cui frammentazione consegue alla comparsa di linee di stratificazione concentriche e di fratture radiali (Fig. 4). Va inoltre tenuto presente che i granuli dell'amido trattato per 110 giorni, pur conservando sostanzialmente inalterate le caratteristiche cristalline e morfologiche, presentano con il liquido di Lugol una colorazione rosso-mattone indicante la presenza di amilopectina fortemente degradata.

Contemporaneamente ai suddetti fenomeni si è osservato che, con il progredire dell'idrolisi acida, l'indice di cristallinità dei campioni aumenta per raggiungere i valori più alti quando l'amilosio è del tutto scomparso (Fig. 6). Il forte aumento dell'indice di cristallinità dopo le prime 24 ore di permanenza dei granuli di amido nell'acido può confermare che l'idrolisi acida agisce preferenzialmente sulla sostanza amorfa. Anche C. STERLING (1960) ha trovato che la cristallinità è maggiore nell'amido sottoposto a trattamento acido che nell'amido nativo.

L'incremento dell'indice di cristallinità non deve però essere considerato in senso assoluto perché il trattamento acido non può provocare un aumento percentuale della sostanza cristallina per accrescimento della stessa, ma solo un aumento percentuale per arricchimento indiretto, dovuto alla diminuzione della sostanza amorfa e paracristallina.

Se per mezzo dei diffrattogrammi non è possibile fare una stima esatta della cristallinità, in quanto è difficile trovare un para-

metro che esprima la quantità relativa della frazione cristallina e di quella paracristallina, si possono però determinare e calcolare le dimensioni medie delle micelle cristalline dell'amido.

Le dimensioni medie delle micelle cristalline dell'amido nativo bagnato relative alla cella elementare di R. E. RUNDLE et al. (1944) — secondo i nostri calcoli  $d_{(hoo)} = 148,5 \text{ \AA}$ ,  $d_{(oko)} = 110,7 \text{ \AA}$  — sono diverse dai valori riportati da altri autori, valori peraltro che non corrispondono tra loro, (R. H. WHISTLER e E. S. TURNER, 1955; C. STERLING e J. PANGBORN, 1960; Z. NIKUNI e S. HIZUKURI, 1957) e indicherebbero micelle cristalline di forma oblunga. La stessa forma presentano anche dopo il trattamento acido ma dopo il primo giorno le dimensioni diminuiscono passando rispettivamente, come si è già riferito, da 148,5 e 110,7 Å a 137 e 103 Å e successivamente restano costanti. Si può quindi affermare che nel corso dell'idrolisi le micelle non subiscono ulteriori riduzioni dopo quelle verificatesi nelle prime 24 ore, e ciò fino a che non si è verificata dopo molto tempo (110 giorni) anche una degradazione della amilopectina cristallina, che, come si è già accennato, costituisce la parte del granulo più resistente all'idrolisi acida. Inizialmente dunque l'attacco acido può solo provocare la rottura dei legami nelle zone dove esiste discontinuità di struttura e di conseguenza determinare lo sfaldamento delle regioni meno protette. Se in questo processo di erosione fossero sin dall'inizio direttamente interessate anche le micelle cristalline, si dovrebbe avere una ulteriore riduzione delle loro dimensioni anche dopo il primo giorno di trattamento acido, mentre ciò si apprezza solo dopo 110 giorni di trattamento, quando cioè si è determinata una notevole degradazione della amilopectina come indicherebbe la colorazione che l'amido assume per il trattamento con soluzione di Lugol.

Interpretando l'evoluzione del fenomeno si può in definitiva ritenere che contemporaneamente o dopo l'idrolisi di parte della sostanza amorfa e la degradazione di una frazione di amilopectina « paracristallina », l'acido eserciti la sua azione anche su legami diversi da quelli glucosidici, cioè su legami assai deboli (forse legami idrogeno) disposti lateralmente all'asse principale del modello « cluster » (D. FRENCH, 1972). Ne deriverebbe un maggior impacchettamento delle catene di amilopectina entro le regioni cristalline senza che la struttura cristallina dei granuli di amido venga a subire una significativa alterazione.

## OPERE CITATE

- BEMILLER J. N. (1964) - Iodometric determination of amylose, amperometric titration. In « Methods in Carbohydrate Chemistry » vol. 4<sup>o</sup> (Whistler R.L. ed.). Academic Press, New York and London.
- BROGI A., FERRI S., GHEZZO C. (1971) - Caratteri cristallografici degli amidi di patata e di mais. *Atti Accad. Fisiocritici Siena*, ser. 14; **3**, 127-151.
- BUTTROSE M. S. (1963) - Electron-Microscopy of acid-degraded starch granules. *Staerke* **15**, 85-92.
- FERRI S. (1974) - Morphological and structural investigations on *Smilax aspera* leaf and storage starches. *J. Ultrastructure Research*, **47**, 420-432.
- FRENCH D. (1972) - Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *Denpun Kagaku* (J. Jap. Soc. Starch Sci.), **19**, 8-25.
- FREY-WYSSLING A. (1969) - On the molecular structure of starch granules. *Amer. J. Bot.*, **56** (7), 696-701.
- FREY-WYSSLING A., BUTTROSE M. S. (1961) - Makromolekular Feinstlammellen in den Körnern der Kartoffelstarke. *Makromol. Chem.*, **44** (6), 173-178.
- GALLANT D., MERCIER C., GUIBOLT A. (1972) - Electron microscopy of starch modified by bacterial  $\alpha$ -amylase. *Cereal Chem.*, **49** (3), 355-365.
- HOLLO J., SZEITLI J. (1968) - The reaction of starch with iodine. In « Starch and its derivatives » ed. 4<sup>a</sup> (Radley J.A. ed.). Chapman and Hall, London.
- KAINUMA K., FRENCH D. (1971) - Nägeli Amylodextrin and its relationship to Starch Granule Structure. I. Preparation and Properties of Amylodextrins from various Starch Types. *Biopolymers*, **10**, 1673-1680.
- LEONARD L., STERLING C. (1972) - Freeze-Etched Surfaces in Potato Starch. *J. Ultrastructure Research*, **39**, 85-95.
- NIKUNI Z., HIZUKURI S. (1957) - Structure of starch granules. *Mem. Inst. Sci. Ind. Res.*, **14**, 173-181.
- RADLEY J. A. (ed.) (1968) - Starch and its derivatives. Ed. 4<sup>a</sup>, Chapman and Hall, London.
- ROBIN J. P., MERCIER C., CHARBONNIERE R., GUILBOT A. (1974) - Lintnerized Starches. Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starch. *Cereal Chem.*, **51**, 389-406.
- RUNDLE R. E., DAASCH L., FRENCH D. (1944) - The structure of the « B » modification of starch from film and fiber diffraction diagrams. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 130-134.
- SHASHA B., WHISTLER R. L. (1964) - End-group analysis by periodate oxidation, In « Methods in Carbohydrate Chemistry », vol. 4<sup>o</sup> (Whistler R.L. ed.), Academic Press, New York and London.
- STERLING C. D. (1960) - Crystallinity of Potato Starch. *Staerke*, **12**, 182-185.
- STERLING C. (1968) - The structure of starch grain. In « Starch and its derivatives » 4<sup>a</sup> ed. (Radley J.A., ed.), Chapman and Hall, London.
- STERLING C. (1971) - Fibrillar Structure in Lintnerized Potato Starch by Scanning Electron Microscopy. *Staerke*, **23**, 193-220.
- STERLING C., PANGBORN J. (1960) - Fine structure of potato starch. *Amer. J. Bot.*, **47**, 577-582.
- STERLING C., SPIT B. J. (1958) - Submicroscopic Structure of the Cereal Starch Grain. *J. Exp. Bot.*, **9**, 75-81.
- WHISTLER R. L., TURNER E. S. (1955) - Fine structure of starch granules sections. *J. Polym. Sci.*, **18**, 153-156.