

ERNST WALDSCHMIDT-LEITZ

dell'Università tedesca di Praga (\*)

## SULLA NATURA E SUL MODO DI AGIRE DEI FERMENTI.

Ringrazio il Direttore prof. Marotta del cortese saluto e dell'invito rivoltomi di tenere una lezione in questo magnifico Istituto, lieto di poter parlare in lingua italiana.

L'applicazione pratica dei processi fermentativi, per esempio della fermentazione alcoolica, è nota dai tempi preistorici. Ma l'essenza di tali processi non poteva esser conosciuta prima che fossero noti i fondamenti della chimica. Soltanto all'epoca di Justus v. Liebig si fecero delle ipotesi abbastanza esatte sull'andamento delle reazioni fermentative, dato che, oltre la fermentazione alcoolica, si erano studiate allora certe altre reazioni fermentative, fra le quali l'azione della maltoamilasi e dei fermenti idrolitici delle albumine nel tratto digestivo. La teoria della decomposizione (*Zersetzungstheorie*) di Liebig, secondo la quale la reazione fermentativa sarebbe un turbamento dell'equilibrio molecolare del substrato provocato dalla decomposizione della stessa molecola del fermento, fu la prima a considerare tali reazioni sotto un comune punto di vista. Essa fu però presto sostituita dalla teoria di Pasteur. Questi notò una stretta connessione fra certi processi fermentativi, p. e. fra la fermentazione alcoolica e il processo vitale di certi microorganismi, e perciò processi quali la fermentazione e la putrefazione li attribuì al ricambio assimilativo di tali microorganismi. Si dicevano possibili tali processi soltanto in presenza di cellule vive, e si spiegava p. es. la fermentazione alcoolica come vita del lievito senza ossigeno. Così si giunse alla differenziazione fra i così detti fermenti figurati, le funzioni dei quali sarebbero legate alla vita di microorganismi, e gli altri fermenti, quelli non figurati ovvero enzimi, p. e. quelli del tratto digestivo degli animali che

(\*) Lezione tenuta nell'Istituto di Sanità Pubblica il 15 giugno 1938-XVI.

sarebbero attivi anche all'infuori della cellula viva. Questa teoria vitalistica, e allo stesso tempo dualistica, di Pasteur rimase in vigore fino all'inizio del nostro secolo; fu abbandonata soltanto quando si conobbe che in molti casi la coerenza di un fermento con una cellula viva era fenomeno variabile.

Fu merito di Eduard Buchner l'aver ricostituito l'uniformità del concetto di fermento. Egli potè dimostrare che l'attività del più caratteristico fra i fermenti figurati, di quello della fermentazione alcoolica cioè, separato, in condizioni adatte, dalla cellula viva, permaneva indipendentemente dalla presenza di cellule nel sugo del lievito torchiato.

Lo sviluppo moderno del concetto di fermento, basato sull'identità del fermento e dell'enzima, prende così inizio dalla scoperta di Buchner. Allora la scienza fu in grado di indagare sulla natura e sul modo di agire dei fermenti e degli enzimi da un punto di partenza nuovo e semplificato. Oggi il funzionamento degli enzimi si può ritenere spiegato in quanto vi è di essenziale. Le indagini sull'andamento dei processi enzimatici dimostrarono che gli enzimi agiscono da catalizzatori, il che era già stato affermato da Mitscherlich e da Berzelius. Gli enzimi si possono perciò definire come catalizzatori di natura organica determinata e di modo di agire specifico i quali, pure essendo prodotti da sole cellule vive, da esse non dipendono nell'azione.

Sebbene le diverse opinioni sul modo generico di agire degli enzimi non riguardino che particolari insignificanti, un altro punto importantissimo della definizione data non sembra tanto fermamente assodato: la supposizione della struttura chimica determinata di questi catalizzatori. Willstätter, p. e., nonostante ampi esperimenti di culture di enzimi, non ebbe la possibilità di descrivere con certezza, nella qualità di individuo chimico, uno qualunque degli enzimi noti. Sembra quindi giustificata una serie di obiezioni contro la supposizione di una determinata struttura chimica degli enzimi. Secondo l'opinione di Fodor dovrebbero essere, gli enzimi, le particelle note del protoplasma, provviste però di una speciale attitudine dispersiva che dà loro la capacità di assumere un particolare stato colloidale, la perdita del quale avrebbe per conseguenza la perdita della loro attività.

Queste supposizioni, che paiono alquanto esagerate, furono però smentite dalle esperienze con la depurazione preliminare degli enzimi.

Lo stato colloidale, pure essendo di grande importanza per l'attività della maggior parte degli enzimi, non è un fattore decisivo; anzitutto non si può spiegare la spiccata specificità nella attività degli enzimi, se non supponendo una struttura chimica determinata. Fondandosi sulle esperienze, Willstätter emise l'ipotesi che una molecola di fermento avesse due componenti, e cioè un vettore (o supporto) colloidale e uno o più così detti gruppi attivi, intermediari nelle reazioni dell'enzima con il substrato. Secondo questa supposizione, il vettore colloidale influisce sul grado di attività catalitica, sull'attività quantitativa, mentre che i gruppi attivi determinano l'attività specifica, vale a dire qualitativa, di fronte ai vari substrati. Così lo studio moderno degli enzimi segue anzitutto due speciali linee di orientamento: le indagini sulla natura chimica degli enzimi e la questione della natura e della causa dell'attività specifica di essi.

Per quanto riguarda l'argomento della natura chimica degli enzimi, nel quale si presenta come prima necessità quella di isolare specie enzimatiche pure, i primi progressi importanti furono fatti da scienziati americani. Summer descrisse la preparazione di ureasi e catalasi, cristallizzate e fortemente attive, Northrop quella della pepsina cristallizzata; infine Northrop e Kunitz hanno preparato tripsina cristallizzata e peptidasi cristallizzata di pancreas e chimotripsina cristallizzata, l'enzima questo che coagula il latte. Questi preparati cristallizzati di enzimi sono tutte sostanze proteiche ed eccetto la catalasi che è di colore rosso per la presenza nella molecola di una componente simile all'emina, non è possibile stabilire nella composizione chimica dei singoli enzimi cristallizzati una differenza chiara anche nel caso di enzimi a modo di agire differente come ureasi da una parte e pepsina dall'altra. Non fu ancora trovata la spiegazione del perchè della loro attività specifica di fronte all'urea ed all'albumina. Eppure ci debbono essere tali differenze, e di certo consisteranno nella differente natura, che ancora non si conosce, degli stessi gruppi attivi. In base alle esperienze fatte con altri enzimi, delle quali mi occuperò più avanti, bisogna ammettere anche in questi casi nella molecola dell'enzima l'esistenza di un gruppo attivo specifico, di un gruppo prostetico cioè che richiede la specificità. Prendendo ciò in considerazione, anche Northrop potè dimostrare che per l'attività della pepsina cristallizzata è d'importanza essenziale

una regione determinata della molecola che contiene residui di tirosina.

Nella maggior parte dei casi finora analizzati e coronati da successo, la caratterizzazione dei gruppi attivi di un enzima avvenne per via indiretta. La prima dimostrazione la si ebbe nell'esempio della catalasi ed in quella della perossidasi. Zeile e Hellström nel 1930 provarono che deve considerarsi quale gruppo della catalasi, tanto del fegato quanto della zucca, una combinazione porfirinica del ferro; il che risultò da misure spettrofotometriche di preparati di enzimi fortemente depurati, nei quali, dopo un'ulteriore depurazione, il rapporto dell'attività catalasica e della quantità del ferro legato alla porfirina fu trovato costante. Possedendo il legame ferro-porfirina, la catalasi, analogamente al pigmento del sangue, forma combinazioni dissociabili con acido cianidrico e con idrogeno solforato, le cui costanti di dissociazione mostrano differenze numeriche per catalasi di origine diversa.

Partiti da queste nozioni sulla catalasi, Kulm e Florkin più tardi definirono il gruppo attivo della perossidasi di ravanelli quali combinazioni porfiriniche del ferro. Tuttavia le loro osservazioni non furono confermate dalle indagini che più tardi fecero Elliot e Keilin, sì che la questione della natura chimica del gruppo attivo della perossidasi non sembra definitivamente risolta.

La constatazione che almeno la catalasi debba contenere una combinazione di ferro-porfirina, pure non essendo più precisamente spiegata la struttura, ha condotto l'osservazione sull'attività catalasica e perossidasica di alcune altre combinazioni porfiriniche del ferro di struttura nota che si trovano in natura: e cioè dell'ossiemoglobina e dei suoi derivati. L'ossiemoglobina pura si distingue per una notevole attività catalasica e contemporaneamente anche perossidasica. Kuhn e Braun hanno dimostrato che variazioni nella struttura dell'ossiemoglobina sono accompagnate da variazioni visibili nella sua attività enzimatica. L'emina, p. e., ha una debole attività perossidasica, ma una forte attività catalasica. Se, introducendo 2 atomi di idrogeno, l'emina si trasforma in mesoemina, ne viene paralizzata l'attività catalasica mentre se ne rinforza quella perossidasica. Da ciò risulta che anche le modifiche insignificanti della struttura chimica del gruppo attivo, come l'introduzione di 2 atomi di idrogeno, hanno per conseguenza importanti modifiche qualitative.

Si vede da altri esempi di sostanze chimiche note, ad attività enzimatica, che una modifica del vettore colloidale non ha per conseguenza una modifica qualitativa, ma bensì quantitativa dell'attività. Così dimostrarono Willstätter e Pollinger che l'ossiemoglobina (pura e cristallizzata per conservarne la costanza della qualità) di diversi animali e contenente la stessa emina, ma un diverso componente vettore e cioè globina di composizione differente, è caratterizzata da una efficienza perossidasi quantitativamente diversa. Così, nelle stesse condizioni, si forma da:

1 mg. di ossiemoglobina di sangue equino	0,152 mg. di porporogallina
1 » » » » » canino	0,115 » » »
1 » » » » » suino	0,093 » » »

Le diversità nella natura chimica del vettore colloidale influiscono quindi, con ogni probabilità, sulle grandi differenze di attività del gruppo attivo, della combinazione ferro-porfirina, come fu osservato per l'emoglobina e i suoi derivati da una parte, e per le catalasi, molto più attive e che si trovano in natura, dall'altra.

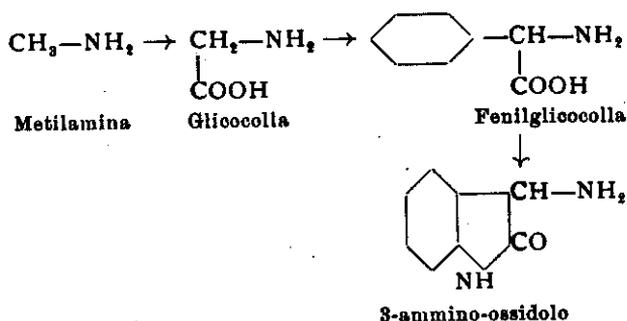
Il significato del vettore colloidale per l'attività del gruppo specificamente attivo è molto chiaramente messo in evidenza dalle nuove indagini di Warburg e Kuhn. Da essi fu provato che un pigmento, la flavina che è nota sotto il nome di vitamina di crescita B<sub>2</sub>, legato a un vettore colloidale, un'albumina, diviene un enzima vero, il fermento giallo della respirazione. E così si spiega anche la parte fisiologica che la vitamina di crescita ha nell'organismo; essa serve da gruppo prostetico nella formazione di un enzima. Tale sembra nell'organismo il compito di molte vitamine note. Come ha dimostrato Lohmann, la vitamina antineuritica, nell'organismo, legata all'albumina, forma il gruppo specifico attivo di un enzima: della carbossilasi; e la vitamina antiscorbutica, l'acido ascorbico, pare che serva da gruppo prostetico nella formazione della lipasi nell'organismo.

Poichè sinora si è sempre trovato che il vettore necessario per la sintesi di un enzima, l'albumina, deve essere specifico, non potendo qualunque albumina servire da latore, questa si può forse considerare come una specie di gruppo attivatore, nel senso degli esperimenti-tipo che ha descritti Langebeck. Con essi fu dimostrato che l'introduzione di gruppi

determinati nei singoli enzimi ha un influsso attivatore sul gruppo attivo che reagisce con il substrato. La metilamina agisce da catalizzatore nella decomposizione dell'acido piruvico in acetaldeide e acido carbonico. Il gruppo attivo in tal caso è quello amminico. La sua attività invece può essere ingrandita di quattromile volte l'originaria, introducendo nella molecola di metilamina prima un gruppo carbossilico, poi allo stesso atomo di carbonio uno fenilico e finalmente in posizione orto uno amminico (tabella I). Con questi esperimenti-tipo si conferma efficacemente l'idea che un certo gruppo chimico influisca sulla specificità enzimatica. Anche la carbossilasi contiene nel suo gruppo prostetico, che è la vitamina anti-neuritica, uno di questi gruppi amminici che, infatti, può ritenersi il gruppo attivo.

TABELLA I.

Introduzione di gruppi attivanti



Gli esperimenti-tipo sugli enzimi, d'altra parte, hanno dato ragione alla vecchia teoria di Michaelis e Menten la quale spiega l'attività degli enzimi mediante la formazione, in parte di legami labili e intermediari fra l'enzima ed il substrato, e in parte fra l'enzima ed i prodotti di decomposizione del substrato. Secondo questa teoria, che fu svolta sull'esempio della decomposizione della zucchero di canna a mezzo della saccarasi, anzitutto si forma un composto di addizione labile e dissociabile fra enzima e zucchero di canna che, in un secondo tempo di reazione, si decompone in enzima libero e nei prodotti di idrolisi dello zucchero di canna, glucosio e fruttosio. La velocità di idrolisi dello zucchero di canna dipende quindi dalla concentrazione della combinazione dello zucchero di canna con l'enzima che è l'unico a fornire le così dette molecole inter-

medianti la reazioni. L'andamento della reazione segue la legge dell'azione di massa. Perciò oggigiorno prevale la concezione che nelle molecole degli enzimi si trovi un gruppo specifico che si lega ai substrati.

Un'altra ipotesi poi fu fatta da Euler e Josephson, dapprima per la idrolisi enzimatica dello zucchero di canna, per rendere più comprensibile il processo. Essa sostiene, in sostanza, che la idrolisi dello zucchero di canna non viene effettuata dallo stesso gruppo della molecola dell'enzima che procura il legame con lo zucchero. Le due reazioni parziali dell'attività enzimatica, la formazione del legame fra l'enzima ed il substrato, e la scissione di questo, secondo questa ipotesi vengono effettuate da due gruppi diversi della molecola dell'enzima, dei quali l'uno si lega al substrato e l'altro lo demolisce. A questi corrispondono due gruppi del substrato che reagiscono in modo differente. La decomposizione del substrato avviene quindi in un altro posto da quello dove si forma il legame con l'enzima. Così questa recente teoria dell'attività degli enzimi rassomiglia, in modo significativo, alla teoria della catena laterale di Paul Ehrlich nella dottrina dell'immunità, con la sua differenziazione di gruppi aptofori e funzionali. E infatti si è riusciti a caratterizzare la natura dei gruppi reagenti nell'enzima come pure nel substrato, con l'esempio della demolizione enzimatica di peptidi. Di queste osservazioni vorrei dare breve comunicazione a loro signori.

Gli enzimi che disgregano i peptidi appartengono agli enzimi proteolitici i quali vengono divisi, a secondo della loro specificità, nei due gruppi delle proteinasi e delle peptidasi. L'attività delle proteinasi si limita, come risulta dal nome, alla idrolisi delle vere albumine, delle proteine. Essi sono senza effetto sui peptidi sintetici, mentre le peptidasi che attaccano i peptidi non agiscono sulle proteine. A secondo del loro differente modo di agire con l'albumina, le proteinasi si dividono di nuovo nei tre gruppi delle pepsinasi, fra le quali la pepsina, delle triptasi, fra le quali la tripsina, e delle papainasi, fra le quali le papaina. Le pepsinasi reagiscono con i cationi dell'albumina, le triptasi con gli anioni e le papainasi con le particelle dell'albumina elettricamente neutre ed a ciò corrisponde la diversa dipendenza della loro attività dalla concentrazione di ioni idrogeno.

Anche la suddivisione delle peptidasi è basata sulla diversità della loro azione di fronte alla molecola di peptide. Si distinguono così le

aminopolipeptidasi, la carbossipolipeptidasi, le dipeptidasi e le iminopeptidasi, a secondo delle strutture che nei peptidi si suppongono necessarie per reagire coi singoli enzimi.

In natura questi enzimi si trovano generalmente in miscele, nelle quali non si possono senz'altro distinguere le attività dei singoli componenti. Con l'aiuto dei metodi di preparazione che Willstätter ha introdotto nella chimica degli enzimi, fu dapprima possibile isolare i diversi enzimi da una cellula e distinguerne così le attività, in prima linea con l'applicazione dei metodi di adsorbimento ed eluzione degli enzimi.

TABELLA II.

**Prospetto degli enzimi proteolitici di varia origine**

Pancreas + Intestino	Organi animali	Lievito	Leucociti
Proteinasi pancreatica (tipo: tripsina) Protaminasi (tipo: tripsina) Carbossipolipeptidasi Aminopolipeptidasi Dipeptidasi Prolinasi	Catepsina (tipo: papaina) Carbossipolipeptidasi Aminopolipeptidasi Dipeptidasi Prolinasi	Proteinasi (tipo: papaina) Carbossipolipeptidasi Aminopolipeptidasi Dipeptidasi Prolinasi	Proteinasi (tipo: tripsina) Catepsina (tipo: papaina) Carbossipolipeptidasi Aminopolipeptidasi Dipeptidasi Prolinasi

La composizione di alcune miscele naturali più note di enzimi che attaccano l'albumina ed i peptidi si vedono elencate in questa tabella II. Essa mette a confronto i sistemi di enzimi proteolitici del canale intestinale degli animali, dei tessuti degli animali, dei globuli bianchi del sangue e del lievito.

La separazione di tali miscele di enzimi è riuscita in una serie di casi, fra i quali vorrei menzionare la separazione degli enzimi del pancreas e dell'intestino (tabella III). Assorbendo la miscela degli enzimi a mezzo di argilla del tipo C $\gamma$ , in ambiente acido, si trovano poi nell'acqua madre dell'adsorbimento proteinasi, protaminasi e carbossipolipeptasi; le amino-polipeptidasi, dipeptidasi e prolinasi vengono adsorbite dall'argilla e si possono di nuovo liberare con alcali diluito. Le miscele che poi restano si possono, con altri mezzi di adsorbimento e modificando la reazione del mezzo, separare ancora nei singoli componenti.

E' noto che, l'attività di ogni enzima proteolitico, sia delle proteinasi come delle peptidasi, si basa sulla rottura di legami fra aggruppamenti acidi e amminici che si trovano nei peptidi. Un'esame più minuzioso della specificità ha invece mostrato che i singoli enzimi sono essenzialmente differenti nel modo con cui effettuano questa rottura. E l'esame dell'attività specifica delle peptidasi ha dato moltissimi schiarimenti, particolarmente per la nostra nozione generale sul meccanismo dell'attività degli enzimi.

TABELLA III.

**Separazione degli enzimi proteolitici del pancreas**

Proteinasi, Protaminasi, Carbossipolipeptidasi, Aminopolipeptidasi,  
Dipeptidasi, Prolinasi

+ Argilla C $\gamma$  ( $P_H = 4$ )

Soluzione residua (rimasta dopo l'adsorbimento): Proteinasi, Protaminasi, Carbossipolipeptidasi + Argilla C $\gamma$ ( $P_H = 7$ )		Eluzione: Aminopolipeptidasi, Prolinasi, Dipeptidasi + Idrato ferrico ( $P_H = 4$ )	
Soluzione residua : Proteinasi	Eluzione : Protaminasi, Carbossipolipeptidasi	Soluzione residua : Aminopolipeptidasi,	Eluzione : Prolinasi, dipeptidasi

Come risulta dalla tabella IV, i dipeptidi formano principalmente substrati specifici per la dipeptidasi; dall'aminopolipeptidasi i dipeptidi non vengono in nessun caso aggrediti, dalla carbossipolipeptidasi soltanto in pochi casi singoli di composizione speciale, p. es: se vi è presente un residuo finale di tirosina che è necessario, negli esempi citati, per la demolizione di peptidi superiori a mezzo della carbossipolipeptidasi. Si trova in tutti i casi che la carbossipolipeptidasi aggredisce i peptidi dal loro lato carbossilico, mentre l'aggressione dell'aminopolipeptidasi avviene dal lato amminico. Ci sono sempre delle determinate relazioni strutturali per la scissione di un peptide a mezzo di una delle peptidasi, e cioè la presenza di certi gruppi nel peptide nei quali avviene la reazione di attacco con l'enzima.

Così la prima unione della dipeptidasi e dell'aminopolipeptidasi avviene nel gruppo amminico libero dei peptidi. Soltanto in presenza di un gruppo amminico libero i peptidi si lasciano disgregare da uno dei

due enzimi. Se il gruppo amminico si modifica con l'introduzione di un residuo acido, questi enzimi non sono più attivi: viceversa il gruppo carbossilico libero si può modificare o eliminare senza restrizione della capacità a subire l'idrolisi enzimatica. Ne risulta che l'attività dell'aminopolipeptidasi e della dipeptidasi consiste nel distacco dell'amminoacido, portatore del gruppo amminico libero.

TABELLA IV.

**Specificità nell'attacco dei peptidi**

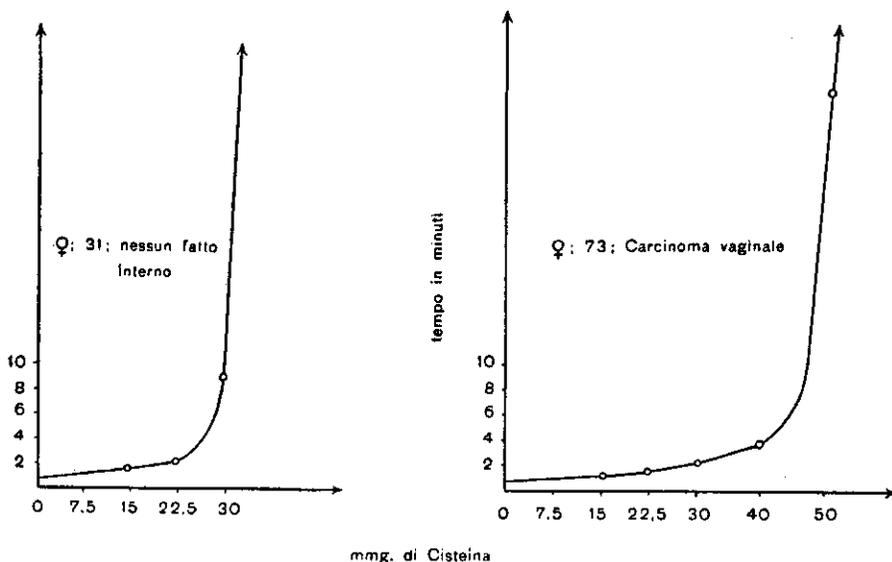
PEPSIDE	Dipeptidasi	Aminopolipeptidasi	Carbossipolipeptidasi
Dipeptidi :			
Glicilglicina . . . . .	+	—	—
Leucilglicina . . . . .	+	—	—
Glicil-tirosina . . . . .	+	—	—
Istidil-glicina . . . . .	+	—	—
Fenilalanil-arginina . . . . .	+	—	+
Glutamil-tirosina . . . . .	+	—	+
Glicil-prolina . . . . .	—	+	—
Glicil-sarcosina . . . . .	—	+	—
Polipeptidi :			
Leucil-triglicina . . . . .	—	+	—
18-Peptide . . . . .	—	+	—
Leucil-glicil-tirosina . . . . .	—	+	+
Leucil-diglicil-tirosina . . . . .	—	+	+
Leucil- triglicil-tirosina . . . . .	—	—	+

La unione della carbossipolipeptidasi con i suoi substrati è di altro genere; essa avviene nel gruppo carbossilico e l'attività di questo enzima consiste perciò nel distacco del residuo dell'amminoacido, portatore del gruppo carbossilico libero.

Il gruppo che si lega agli enzimi nei peptidi è quindi, per la dipeptidasi e aminopolipeptidasi, il gruppo amminico libero, e per la carbossipolipeptidasi il gruppo carbossilico libero. In concordanza con l'opinione precedente di Euler e Josephson anche le nostre esperienze conducono alla conclusione che alla unione dei peptidi con la dipeptidasi e probabilmente anche con l'aminopolipeptidasi prende parte un gruppo aldeidico o chetonico degli enzimi stessi. La unione di questi con il peptide avverrebbe quindi con la formazione di una cosiddetta base di Schiff.

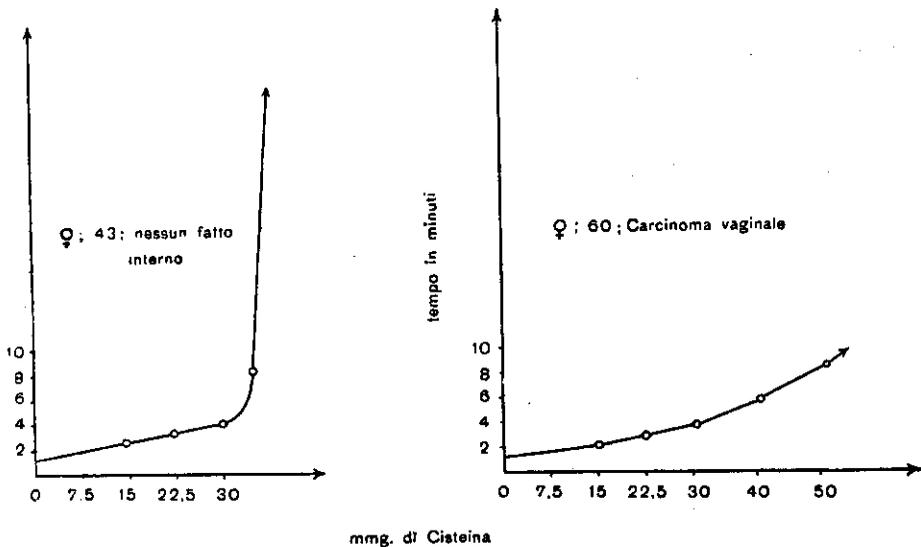
Con la formazione di un legame fra enzima e substrato il processo della catalisi enzimatica non è ancora esaurito; si deve completare con la scissione di questo complesso in enzima libero e prodotti di disintegrazione del substrato. Fra le ipotesi derivate dagli esperimenti tendenti a spiegare la reazione d'idrolisi, la più seducente suppone che fra l'enzima e il substrato debba avvenire ancora una seconda reazione, in concordanza alla « teoria delle due affinità » di Euler. Che in un peptide non solo quella parte della molecola, nella quale avviene l'unione della peptidasi, dunque quella portatrice del gruppo amminico libero, abbia influenza sulla scissione, viene mostrato dalla idrolisi di peptidi otticamente attivi. Così fra le due forme isomere della d,l-alanina-di-glicile viene disgregata soltanto la l-alanina-di-glicile che si trova in natura: quindi anche la metà della molecola che non partecipa all'unione determina la attitudine del peptide a venir idrolizzato. Secondo le indagini di Balla e Köhler, che si basano sui fenomeni dell'intercezione, bisogna supporre come secondo gruppo reagente nei peptidi il gruppo imminico della riunione dei peptidi stessi, e ciò non soltanto per la disintegrazione mediante le dipeptidasi e aminopolipeptidasi ma anche quella dovuta alla carbossi-polipeptidasi.

TABELLA V.



Quest'opinione viene particolarmente appoggiata dagli esperimenti recenti di Bergmann. Secondo questi la sostituzione dell'idrogeno del gruppo ammidico, anche soltanto con il metile, rende il peptide inattaccabile dalla dipeptidasi; così non viene attaccata la glicil-sarcosina, ma facilmente la glicilglicina, il peptide non sostituito. La necessità della presenza dell'atomo di idrogeno nella funzione carboammidica del peptide per la capacità a venir idrolizzata, secondo Bergman, deriva dal fatto che i peptidi non reagiscono con le peptidasi nella forma carbonilica ma in quella enolica, che quindi l'idrogeno del gruppo enolico deve considerarsi come secondo punto d'aggressione degli enzimi. Questa opinione, fondata su esperimenti, dà anche un'ottima spiegazione per la scelta sterica delle peptidasi fra i due antipodi ottici di un peptide. Soltanto negli isomeri che si trovano in natura i gruppi amminici e carbossilici sono sistemati vicini e perciò ambedue permettono contemporaneamente la reazione con l'enzima.

TABELLA VI.



Gli esperimenti sul meccanismo dell'attività della peptidasi hanno dunque provato che la «teoria delle due affinità» è una preziosa ipotesi di lavoro. Essi permettono una spiegazione dell'attività della peptidasi nel senso di una comune reazione chimica fra due gruppi chimici del-

l'enzima e del substrato, la di cui modifica o mutua concordanza influiscono sulla specificità enzimatica.

Per la comprensione del modo di agire degli enzimi è molto importante di non accertare soltanto l'andamento della reazione enzimatica fra l'enzima e il substrato, ma di prendere anche in considerazione i vari fattori che vi agiscono accelerando o rallentando la reazione. Così, oltre all'influsso generalmente osservato della concentrazione degli ioni idrogeno sulla velocità della reazione, si conoscono numerosi fenomeni di attivazione che vengono causati dall'azione di attivatori specifici.

TABELLA VII.

**Attività solfidrillica di sieri di fronte alla papaina**

STATO CLINICO	Sesso	Età	Attività papainica in % della massima
Normale . . . . .	maschile	38	100
Artrite . . . . .	femminile	28	92
Ulcera allo stomaco . . . . .	maschile	33	100
Atetosi . . . . .	maschile	60	100
Ulcera al tenne . . . . .	maschile	25	90
Sospetto di ulcera allo stomaco . . . . .	maschile	35	90
Carcinoma allo stomaco . . . . .	femminile	39	66
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	49	50
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	46	54
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	49	46

Gli esempi meglio esaminati si trovano fra gli enzimi proteolitici. Vi appartiene, p. es. la attivazione della tripsina del pancreas mediante un attivatore specifico, l'enterocinasi della membrana mucosa dell'intestino. Tempo addietro la reazione fra la tripsina e l'enterocinasi, dopo la scoperta nel laboratorio di Pawlow, si spiegava come modifica enzimatica della tripsina da uno stadio precedente inattivo, mediante l'enzima enterocinasi. In realtà invece la reazione avviene in base stechiometrica; si tratta di un semplice processo di attivazione.

Un riscontro ne è l'attivazione di un altro tipo di enzimi proteolitici, delle così dette papainasi alle quali appartiene la papaina del sugo di melone ed altre proteinasi, ed inoltre delle proteinasi endocellulari dell'organismo degli animali, fra le quali la catepsina. Questi enzimi si distinguono per un'attivazione specifica che subiscono per effetto dei composti cosiddetti

solfidrilici (contenenti cioè il gruppo SH), p. e. della cisteina, del glutatione ed anche dell'idrogeno solforato. Per quanto si sa, l'attivatore naturale della proteolisi endocellulare nelle piante e negli animali, chiamato rispettivamente fitocinasi e zoocinasi, è identico o molto affine con il glutatione, il tripeptide formato di cisteina, acido glutammico e glicocola, nella sua forma ridotta. È particolarmente notevole che soltanto la forma ridotta del peptide, e niente affatto quella ossidata, la forma disolfurica, attiva la proteolisi. Fra i processi ossidativi e idrolitici nell'organismo sembrano perciò esistere rapporti causali. Oltre a ciò risulta la possibilità di regolare almeno l'assimilazione intercellulare delle albumine mediante il potenziale ossidoriduttore nel senso dell'idrolisi da una parte e della sintesi dall'altra. Così le esperienze del botanico Mathes sull'assimilazione dell'albumina da parte delle piante superiori dimostra che in esse, accanto a un attivatore dell'idrolisi dell'albumina, esiste un attivatore della sintesi dell'albumina che viene formato dal primo mediante ossidazione. In base alla solubilità degli stessi (si possono separare, come la fitocinasi e la zoocinasi, mediante alcool diluito) sembra trattarsi di glutatione rispettivamente in forma ridotta o ossidata. Osservato dal lato chimico, l'attivatore dell'asportazione dell'albumina è una combinazione solfidrilica, e quello della produzione dell'albumina una combinazione disolfurica. La direzione dell'albumina nella pianta, per conseguenza, risulta dipendente dal potenziale di ossigeno; deficiente l'ossigeno si attiva l'idrolisi, esuberante l'ossigeno la sintesi. Questi risultati hanno fatto apparire in una nuova luce l'importanza fisiologica del glutatione; è evidentemente suo compito di accoppiare i processi ossidativi con quelli idrolitici.

La funzione del glutatione nell'organismo, del resto, non si limita a regolare la proteolisi. Anche un altro enzima, l'arginasi di Kossel e Dakin, che scinde l'arginina in urea e ornitina, viene attivato in modo specifico da composti contenenti il solfidrile come il glutatione, ed anche qui le combinazioni disolfuriche si sono dimostrate inattive. Con questo esempio si è inoltre potuto mostrare per la prima volta che le combinazioni solfidriliche da sole non effettuano l'attivazione, ma che ci vuole la cooperazione di un metallo pesante, ferro o rame, per attivare l'enzima. Anche per attivare la papaina o la catepsina, secondo recenti esperimenti, occorre la cooperazione di metalli pesanti.

TABELLA VIII.

Attività solfidrilica di sieri di fronte alla Metilglossalasi

STATO CLINICO	Sesso	Età	Capacità attivante pari a mmg. di Glutazione
Frattura . . . . .	maschile	26	0,08
Otite media . . . . .	maschile	43	0,08
Tonsillite . . . . .	maschile	20	0,09
Psoriasi . . . . .	femminile	21	0,10
Ernia . . . . .	maschile	25	0,08
Glaucoma . . . . .	femminile	51	0,09
Paralisi . . . . .	femminile	12	0,09
Tumore ai seni frontali (benigno) . . . . .	maschile	21	0,07
Tumore ai seni frontali (benigno) . . . . .	femminile	48	0,08
Lue . . . . .	femminile	18	0,10
Diabete . . . . .	femminile	51	0,10
Tubercolosi . . . . .	maschile	17	0,09
Ittero . . . . .	femminile	50	0,10
Nefrite . . . . .	maschile	28	0,10
Gravidanza (3 mesi) . . . . .	femminile	21	0,19
Gravidanza (5 mesi) . . . . .	femminile	36	0,19
Gravidanza (6 mesi) . . . . .	femminile	32	0,19

Da questi esempi dell'attività regolatrice degli attivatori enzimatici specifici, lor Signori vedono che i processi del ricambio nell'organismo non hanno luogo indipendentemente l'uno accanto all'altro, ma in una certa mutua dipendenza. Così evidentemente la direzione del passaggio dell'albumina nelle cellule, e secondo esperienze più recenti anche quella del passaggio degli idrati di carbonio, dipende dal potenziale ossido-reduttivo, cioè dai processi ossidativi del ricambio. Anche l'esterificazione degli idrati di carbonio con l'acido fosforico la quale inizia l'eliminazione di quelli nella fermentazione o nel muscolo, è chimicamente ed energeticamente accoppiata a un determinato processo ossido-riduttivo. Non la nuova formazione di enzimi, come prima si supposeva, ma l'introduzione o l'eliminazione di attivatori dirige in questi e molti altri casi il presentarsi degli effetti enzimatici.

Anche nei casi di perturbazione patologica del ricambio non un aumento o una comparsa nuova di enzimi, ma un cambiamento nello stato di attivazione degli enzimi presenti sembra essere la causa del ricambio alterato. Questo vale p. e. per il carcinoma: per il contegno degli enzimi nella stessa cellula del carcinoma, ma anche per la loro attività nel sangue.

Alterazioni quantitative degli enzimi nel sangue percettibili con certezza e applicabili diagnosticamente non furono ancora stabiliti nel cancro. Viceversa si possono trovare alterazioni sicure nell'« ambiente enzimatico » del sangue. Tali alterazioni si osservano p. e. nell'esame comparativo del coagulamento del sangue con il sangue normale e con quello carcinomatoso. La velocità del coagulamento nel carcinoma non si può chiaramente distinguere da quella normale; si vede però che si lascia influenzare in grado diverso. Kühnau e Morgenstern hanno trovato che la coagulazione del sangue normale viene ostacolata da composti solfidrilici come la cisteina e che il sangue, in presenza di una quantità sufficiente di cisteina diventa praticamente incoagulabile. In tal senso si possono dunque trovare differenze notevoli fra il sangue normale e il carcinomatoso, e precisamente nella quantità di solfidrile, in forma di cisteina o glutatione, che è necessaria per impedire il coagulamento del sangue o per prolungare il tempo che impiega a coagulare fino a un certo multiplo di quello normale: per conseguire lo stesso effetto occorre, per il sangue di un ammalato di carcinoma, un'aggiunta sempre maggiore di cisteina. Questo viene dimostrato dalle curve di ritardo del coagulamento mediante la cisteina che lor Signori qui vedono disegnate.

Da questo fenomeno crediamo di poter giudicare che nel sangue carcinomatoso debba essere presente una materia intercettante l'attività delle combinazioni solfidriliche, che ostacola cioè la reazione di queste con il sistema di coagulazione del sangue. Questa argomentazione si è potuta ampliare nel senso che non solo il solfidrile aggiunto subisca nel sangue carcinomatoso un indebolimento dell'attività, ma anche quello già esistente nel sangue, nella forma di cisteina, glutatione o albumina contenente SH, abbia, quando vi è il carcinoma, una reazione meno intensa. L'attività del solfidrile si può in tal caso comparativamente misurare mediante l'efficacia attivante di fronte a enzimi come papaina o metilgliossalasi.

Purr e Russel hanno osservato anni fa che i preparati di papaina, se inattivati con mezzi ossidanti, si possono riattivare per mezzo del sangue, e che esisteva una differenza quantitativa nella facoltà attivatrice del sangue umano normale e di quello carcinomatoso: il sangue carcinomatoso si rivelò meno attivo. Questa differenza esiste anche per il siero di sangue. Il siero di persone normali e di quelle ammalate di tumori ha la facoltà

di attivare papaina inattivata oppure anche metilgliossalasi di fegato incompletamente attivata. Ma i sieri degli ammalati di tumori si distinguono per il fatto che la loro facoltà attivatrice di fronte ai due enzimi risulta molto minore di quella dei sieri di confronto di individui sani. E' invece notevole che nella gravidanza l'attività sulfidrilica si manifesta aumentata in confronto con la normale. Tutte queste differenze sono state realmente osservate.

TABELLA IX.

**Attività sulfidrilica di sieri di fronte alla Metilgliossalasi**

STATO CLINICO	Sesso	Età	Capacità attivante pari a mmg. di glutazione
Carcinoma alla lingua . . . . .	maschile	73	0,03
Carcinoma alla vagina . . . . .	femminile	52	0,02
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	63	0,04
Carcinoma alla gola . . . . .	maschile	60	0,04
Carcinoma al palato . . . . .	maschile	58	0,03
Carcinoma al retto . . . . .	maschile	51	0,04
Carcinoma alla gola . . . . .	maschile	43	0,04
Carcinoma alla vagina . . . . .	femminile	36	0,02
Carcinoma al palato . . . . .	maschile	74	0,04
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	49	0,04
Carcinoma all'utero . . . . .	femminile	65	0,03
Carcinoma alla vagina, gravidanza . . . . .	femminile	49	0,23

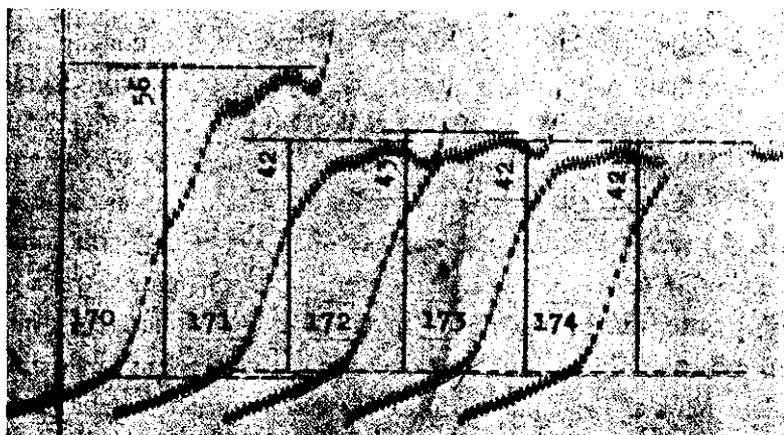
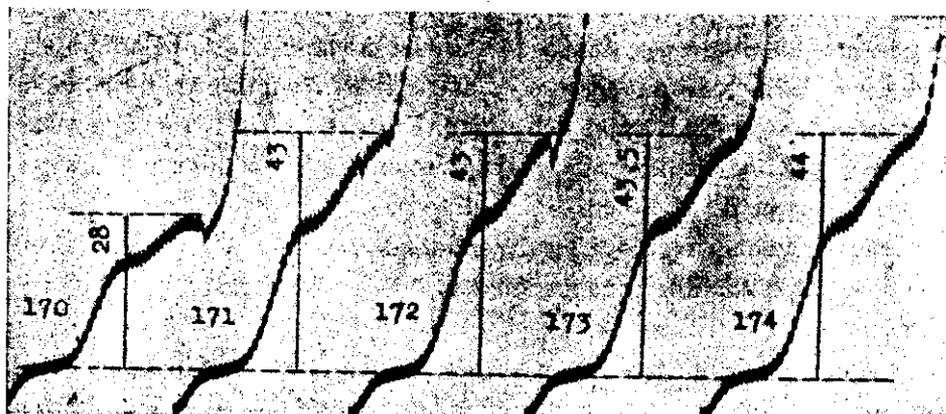
In modo più semplice e sicuro che non col saggio degli enzimi, l'attività dei sulfidrilici può essere accertata mediante l'analisi polarografica secondo Heyrovsky, con un procedimento speciale che è stato studiato da Brdicka. Così abbiamo fatto l'esperimento di determinare in modo comparativo l'attività del sulfidrilico di sieri normali e carcinomatosi a mezzo del polarografo. In tali determinazioni si sono manifestate le stesse differenze osservate nelle misurazioni di confronto eseguite con la papaina o la metilgliossalasi. Questa determinazione sembra adatta alla diagnosi di tumori maligni. Fu poi introdotta una perfezione del metodo consistente in una preliminare dealbuminizzazione dei sieri, ed in più di 500 casi di carcinoma di ogni genere e stadio di sviluppo, accertati indubbiamente per via istologica, si è potuto riconoscere, con questo metodo, il 95 % dei casi. Diagnosi negative per isbaglio non sono risultate che nei casi di carcinomi epiteliali, quelle positive erronee soltanto in casi di

febbre e forte infiammazione e in certe malattie di fegato. L'esame del metodo, che nel frattempo avviene nella Clinica Chirurgica dell'Università di Giessen e nell'Istituto Finsen di Copenaghen che ne hanno pubblicato i risultati, ha dimostrato in modo indiscusso che l'analisi polarografica del siero è il metodo più specifico e anche il più semplice di tutti quelli raccomandati per la diagnosi del cancro. Esso ha inoltre il vantaggio che la sua esecuzione richiede approssimativamente solo 10 minuti di tempo e pochi decimi di centimetro cubo di siero con i quali si può ripetere la determinazione a piacimento. Voglio qui mostrare a lor Signori, in alcuni esempi, la differenza caratteristica nelle onde polarografiche dei sieri normali e carcinomatosi.

Dopo questa digressione nel campo dell'applicazione alla medicina, prego di volermi permettere di riprendere la questione dell'importanza fisiologica dei processi di attivazione degli enzimi in generale. La constatazione che la cellula non forma affatto dell'enzima nuovo quantunque ne abbia bisogno, ma che l'enzima già esistente subisce una modifica col venire trasformato nella forma attiva, vale anche per l'enorme incremento dell'attività enzimatica che si osserva nello sviluppo degli organismi delle piante durante la germinazione. Ciò vorrei illustrare con due esempi.

Così fu provato che lo sviluppo della capacità di saponificare i grassi nei semi del ricino comune, mediante la lipasi del ricino, non consiste in una formazione nuova di lipasi. L'intera quantità di lipasi si trova già nel seme dormente, ma in una forma nella quale può attaccare i grassi soltanto in presenza di una forte reazione acida, e non nel normale ambiente a reazione neutra. Per una modifica al vettore proteico della lipasi che avviene per l'attività degli enzimi che attaccano l'albumina del seme durante la germinazione, la lipasi divenuta attiva ed acquista la capacità di attaccare il grasso anche in ambiente neutro: si forma una lipasi con condizioni modificate di attività. La lipasi già esistente viene quindi mobilitata e abilitata all'attività per le condizioni regnanti nella cellula. Un certo ordine e equilibrio sembra regnare fra i processi di ricambio nel seme germinante. Dapprima, con l'attivazione delle proteasi, presumibilmente sotto l'influsso di combinazioni solfidriche in formazione, avviene la mobilitazione della sostanza albuminoide; soltanto poi, a grande distanza, ha luogo la mobilitazione del grasso di riserva del seme.

**Analisi polarografica prima e dopo la dealbuminizzazione**



170. Tumore ai polmoni, metastasi - 171. Colelitopatia  
172. Ipertiroidismo - 173. Gastrite - 174. Apoplessia.

Anche l'immenso incremento della capacità di idrolizzare l'amido che viene osservato nella germinazione del grano, nel malto, deve attribuirsi a una mobilitazione dell'enzima relativo, dell'amilasi, e non a una nuova formazione di enzima. Fra le due amilasi che si trovano nell'orzo e che si distinguono, a secondo dell'attività specifica di fronte all'amido,, in  $\alpha$ -amilasi e  $\beta$ -amilasi, durante la germinazione viene attivata l' $\alpha$ -amilasi con la liberazione di un attivatore specifico, dell'amiloci-

nasi, la quale ha luogo per opera di enzimi proteolitici del seme. L' $\alpha$ -amilasi è il vero e proprio enzima che trasforma l'amido in zucchero. Attivandolo a mezzo dell'amilocinasi si ottiene l'immenso incremento della capacità di formazione di zucchero, per la quale l'orzo germinante si distingue da quello riposante. Nemmeno qui è la formazione nuova di enzima, ma l'introduzione di uno specifico attivatore enzimatico e con ciò la mobilitazione dell'enzima che si presenta come la causa dell'aumentato ricambio.

Spero di avere con questi esempi indicato a lor Signori la importanza che ha l'influsso di attivatori enzimatici specifici sullo sviluppo e sull'estensione delle reazioni enzimatiche. Il significato di essi consiste anzitutto nel fatto che la cooperazione di tali attivatori mette la cellula in grado di accoppiare a vicenda processi enzimatici di natura del tutto differente, come gli idrolitici e gli ossidativi, e di stabilire con ciò fra questi un turno o un equilibrio determinato.

Lo studio delle attivazioni enzimatiche non promette soltanto la spiegazione delle connessioni dei processi enzimatici naturali e della loro regolazione. Esso contribuirà anche alla possibilità di descrivere i gruppi chimicamente attivi degli enzimi e di spiegarne il meccanismo dell'attività; e queste sono le questioni più importanti dell'indagine moderna sugli enzimi. Perciò possiamo sperare che anche questo metodo servirà a ottenere piena chiarezza sulle attività degli enzimi i quali oggigiorno hanno già perduto molto della loro misteriosità.

---

---