

Mba B 70/20

20

PROF. FRANCESCO CEDRANGOLO



OSSIDAZIONI BIOLOGICHE

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. VI, 1943

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti di
legge.

PROF. FRANCESCO CEDRANGOLO

OSSIDAZIONI BIOLOGICHE

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. VI, 1943

ROMA - TIP. DEL SENATO DEL DOTT. G. BARDI

FRANCESCO CEDRANGOLO

OSSIDAZIONI BIOLOGICHE (*)

MMAGNIFICO Rettore, signori professori del corpo Accademico, signore e signori, è per me una personale soddisfazione trovarmi qui tra Voi in questo glorioso e antico Ateneo che già ai primi del secolo XVII veniva definito dal grande Galileo « Università di studio tanto celebre e famoso ». In particolare il mio ringraziamento va al Magnifico Rettore senatore Paolo Orano e al professore Aldo Spirito, Preside della Facoltà di Farmacia, la quale ha voluto creare nel suo seno la Cattedra di Chimica Biologica (la 7^a in Italia) cui mi ha fatto poi l'onore di chiamarmi.

Naturalmente in questo momento il mio pensiero corre grato e commosso al mio maestro Gaetano Quagliariello, sotto la cui guida paterna ed illustre nel Laboratorio di Napoli io mi sono formato. Tredici anni di lavoro continuo, intenso, silenzioso, in diuturna comunicazione con questo grande scienziato ed uomo nobile e buonissimo, mi fanno sperare di poter svolgere con tranquillità e con profitto il mio lavoro qui in mezzo a Voi.

Necessariamente il mio pensiero corre anche in questo momento alla grande figura scomparsa ma più che mai viva nell'animo di noi allievi, di Filippo Bottazzi, che con intuito geniale e tenace volontà tanto oprò perchè anche tra noi la Chimica Biologica avesse quel posto degno che la sua importanza e il suo sviluppo le assegnavano.

Purtroppo appena ai suoi inizi la Chimica Biologica Italiana segna oggi una battuta di arresto: la perdita di Francesco Paolo Mazza,

(*) Prolusione tenuta all'inaugurazione del Corso Ufficiale di Chimica Biologica (Perugia, Palazzo dell'Università, il 26 febbraio 1943).

**OSSIDAZIONI
BIOLOGICHE.**

che formatosi anch'egli nel Laboratorio di Napoli, giovanissimo si era creato una posizione di primo piano nel mondo scientifico. Noi suoi allievi, che tanto apprendemmo da lui, lo piangiamo con inconsolabile tristezza. Ma il lutto, se gravissimo per noi, colpisce tuttavia anche tutti i cultori delle discipline biologiche, perchè Francesco Paolo Mazza è stato uno di quei rari uomini, che nel passaggio per questa vita hanno la ventura di incidere nella Scienza, che essi più di ogni cosa amano, i segni duraturi della loro portentosa personalità.

Ho scelto per argomento della lezione di oggi le Ossidazioni Biologiche e questo per tre ragioni: 1° perchè esso è un argomento che si può dire nuovo, in quanto il suo maggiore sviluppo lo ha avuto proprio in questi ultimi dieci anni; 2° perchè è un argomento che credo interessi alla pari il chimico come il medico; 3° perchè è un capitolo su cui i chimici biologi italiani hanno lavorato apportandovi contributi oggi universalmente noti ed accettati.

Prima di entrare in argomento desidero far giungere un affettuoso ringraziamento al prof. Hans von Euler che gentilmente mi ha ospitato nel suo Laboratorio di Stoccolma per tutto il 1939, dandomi così agio di vedere da vicino tutto quanto in questi ultimi anni sul problema delle ossidazioni biologiche è stato fatto da lui e dalla sua Scuola, il cui nome, come Voi sapete, è legato a quelle delle più sensazionali scoperte in questo campo.

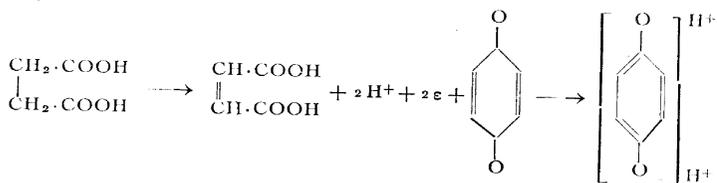
Conforme alla teoria del Wieland, il primo passo in ogni ossidazione biologica è l'attivazione dell'idrogeno. Nello stesso tempo le forze di superficie del catalizzatore attivano l'accettore. Nel caso quindi in cui l'accettore è l'O₂, questo vuol dire attivazione dell'ossigeno. In genere possiamo chiamare attivazione il processo nel quale i corpi che reagiscono, sono sottoposti al campo di forze superficiali del catalizzatore col risultato di una deformazione delle molecole di entrambi, il donatore e l'accettore.

Ogni ossidazione è necessariamente accoppiata con una riduzione, ogni deidrogenazione con una idrogenazione. La reazione fondamentale:



è indipendente dalla natura dell'accettore e del donatore e, inoltre, l'accettore può, naturalmente, essere anche l'O₂. In questa esposizione noi consideriamo col Wieland solo il trasferimento simultaneo di due atomi d'idrogeno. Il trasferimento di elettroni singoli, che oggi tuttavvia è ammesso nella catalisi da chinoni (Michaelis), non può avere qui posto.

Nelle ordinarie reazioni di deidrogenazione con composti della Chimica organica, l'atomo d'idrogeno che deve essere trasferito è legato come idrogeno atomico non ionizzato. Quindi la reazione deve iniziare con la labilizzazione e susseguente ionizzazione dell'idrogeno, l'elettrone spostandosi sull'accettore e caricandolo negativamente. L'accettore è così reso capace di legare l'idrogenone. Ne deriva un legame eteropolare tra idrogeno ed accettore, oppure anche ne può derivare una configurazione polare dell'idrogeno rispetto al resto della molecola. Diamo un esempio nella deidrogenazione dell'acido succinico ad opera di un pigmento chinone, che raffiguriamo schematicamente come chinone



Naturalmente l'idrogeno trasferito può anche restare in un tipo più stabile di legame cioè legato per legame omeopolare. In questo caso l'intero atomo d'idrogeno, H⁺ + e, è trasferito come una Unità. Questo accade per esempio, se l'acetaldeide è trasformata in alcool etilico per idrogenazione ad opera di un qualunque donatore:



Questo si verifica anche alla fine se l'ossigeno molecolare è l'accettore. In questo caso l'acqua è il prodotto finale poco dissociato, mentre il perossido d'idrogeno, in cui l'idrogeno è legato in con-

deidrogenazione. Sulla base dei valori calorici o meglio, su quella dei valori dell'energia libera, sono da prevedere le possibili e le impossibili reazioni deidro-idrogenative. Se il processo deidrogenazione-idrogenazione è del tutto reversibile e se veri equilibri sono ottenuti, gli spostamenti degli elettroni o meglio la tendenza degli elettroni a spostarsi, possono essere direttamente misurati in termini di potenziale di ossidoriduzione. Dal valore del potenziale, si può calcolare ΔF :

$$\Delta F = nFE_0 \text{ Volta}$$

dove ΔF è la variazione di energia libera corrispondente al lavoro massimo, n è il numero di elettroni per cui la forma ossidata si distingue dalla forma ridotta, F è l'equivalente elettrochimico, E_0 infine è il potenziale normale del sistema a pH0, definito come la differenza di potenziale tra una miscela I a I delle due forme (ossidata e ridotta) del sistema e l'elettrodo normale a idrogeno. E_0 si ricava da:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Oss.}]}{[\text{Rid.}]}$$

dove E è il potenziale misurato alla concentrazione [Oss.], [Rid.] della forma ossidata, rispettivamente ridotta del sistema.

Sia qui accennato che il potenziale normale di un sistema si può anche ricavare dalla posizione di equilibrio del sistema in esame con un altro sistema di noto E_0 . Infatti:

$$E^I = E_0^I + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Oss.}^I]}{[\text{Rid.}^I]}$$

$$E^{II} = E_0^{II} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Oss.}^{II}]}{[\text{Rid.}^{II}]}$$

Alla posizione di equilibrio è $E^I = E^{II}$, quindi:

$$E_0^I - E_0^{II} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Oss.}^{II}] [\text{Rid.}^I]}{[\text{Rid.}^{II}] [\text{Oss.}^I]} = \frac{RT}{nF} \ln K$$

Una classifica degli enzimi delle Ossidazioni è in questo momento forzatamente incompleta, anzitutto perchè di molti enzimi non si conoscono ancora i caratteri e quindi non si sa a quali gruppi assegnarli, inoltre si può dire che ogni giorno nuove cognizioni si acquistano, che fanno ritenere errate le precedenti classifiche. Certo una classifica felice sarebbe quella chimica, che aggruppasse cioè i detti enzimi a seconda della loro natura chimica, ma purtroppo, come vedremo, solo di alcuni enzimi delle Ossidazioni si conosce la costituzione. È perciò che ancora oggi ci si deve limitare ad alcuni caratteri generali, vale a dire, ad esempio, se l'enzima in questione reagisce o no con l'ossigeno e, in caso positivo ancora se detta affinità per l'O₂ è assoluta o relativa, se contiene o no metalli pesanti ecc. Una classifica abbastanza soddisfacente basata appunto su questi criteri è quella proposta da K. G. Stern nel 1939 che noi qui riportiamo, modificandola però in molti punti ed allargandone il contenuto. Nell'esposizione che segue si è tenuto anche nel dovuto rilievo il paragrafo *Sistematica delle Deidrogenasi* dell'edizione 1942 delle *Lezioni di Chimica Biologica* di G. Quagliariello. Gli enzimi delle Ossidazioni si distinguono anzitutto in due grandi gruppi:

- A) *Enzimi fondamentali delle Ossidazioni;*
- B) *Enzimi ausiliari delle Ossidazioni.*

Gli Enzimi del Gruppo A) sono detti anche *Idrochinasi*, enzimi cioè che muovono l'idrogeno.

Le *Idrochinasi* sono poi divise in *Deidrogenasi* ed *Ossidasi*.

I. *Deidrogenasi*. — Le deidrogenasi sono enzimi deidrogenanti specifici, capaci di ridurre accettori diversi. Vanno distinte a loro volta in deidrogenasi anossitrope e deidrogenasi ossitrope.

- a) *Deidrogenasi anossitrope*. Queste comprendono due sottogruppi.
 - α) Sistemi liberi da metalli pesanti;
 - β) Sistemi eminici (citrocromi).

Mentre il sottogruppo β comprende solo i citrocromi (di questi si dirà a proposito dei fermenti eminici), il sottogruppo α comprende

una serie di enzimi diversissimi dal punto di vista dell'azione come della natura chimica che sono elencati qui sotto.

1° *Enzimi piridinici*. Sono proteine coniugate, il cui coenzima è il dinucleotide piridin-adenin-difosforico (CoI) o il dinucleotide piridin-adenin-trifosforico (CoII). A seconda della proteina cambia la specificità verso il substrato. Questi enzimi piridinici sono: la *formicodeidrogenasi* (*) delle piante superiori, che ossida l'acido formico a CO_2 ;

la *ossalicodeidrogenasi* (**) di alcune piante, che ossida l'ac. ossalico a CO_2 ;

la *alcoldeidrogenasi* (piante animali), che ossida l'alcool etilico ad aldeide acetica;

la *latticodeidrogenasi* (***) (piante animali), che ossida l'acido lattico a piruvico;

la *malicodeidrogenasi* (piante animali), che ossida l'acido malico a levogiro ad acido ossalacetico;

la *triosofosfatodeidrogenasi* (animali, lievito), che ossida l'aldeide fosfoglicerica ad acido fosfoglicerico;

la α -*glicerofosfatodeidrogenasi* (***) che ossida l'acido α -glicerofosforico ad aldeide fosfoglicerica;

la β -*ossibutirricodeidrogenasi* (piante, animali) che ossida l'acido β -ossibutirrico ad acido acetacetico.

Mentre i suddetti enzimi sono tutti proteine, il cui coenzima è la CoI, i seguenti sono proteine, il cui coenzima è invece la CoII: la *glucosodeidrogenasi* (fegato), che ossida il glucosio ad acido gluconico; la *glucosomonofosfatodeidrogenasi* (lievito, globuli rossi), che ossida l'estere di Robison ad acido 6 - fosfoglucosico;

la *fosfoglucosideidrogenasi* (lievito), che ossida l'acido 6-fosfoglucosico ad acido 6-fosfo-2-chetoglucosico.

(*) Si ricorda che nei batteri esiste una formicodeidrogenasi, che non è in relazione colla CoI-CoII.

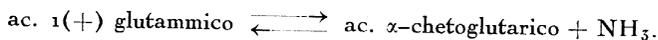
(**) In alcuni batteri esiste una ossalicoossidasi, che pure ossida l'acido ossalico a CO_2 , ma che non è un enzima piridinico.

(***) Si ricorda che esiste anche una latticodeidrogenasi (batteri, lievito) e una α -glicerofosfatodeidrogenasi (muscoli), che non sono enzimi piridinici.

Altri enzimi piridinici sono infine la *isocitricodeidrogenasi* e la *glutammicodeidrogenasi*.

La *isocitricodeidrogenasi* (Euler e Adler) è costituita da una proteina specifica, che si unisce indifferentemente colla CoI e colla CoII. È diffusa nelle piante e negli animali. La sua funzione è quella di ossidare l'acido isocitrico ad acido ossal-succinico.

Sotto il nome di *glutammicodeidrogenasi* sono invece compresi tre enzimi differenti: 1° la *glutammicodeidrasasi* del lievito (Euler), proteina specifica, il cui coenzima è la CoII; 2° la *glutammicodeidrasasi* delle piante superiori (Euler), proteina specifica il cui coenzima è la CoI; 3° la *glutammicodeidrasasi* degli animali (Euler), proteina specifica, il cui coenzima è indifferentemente la CoI o la CoII. Tutti e tre gli enzimi catalizzano la reazione:



Alcune apodeidrasasi in relazione colla CoI contengono nella loro molecola gruppi-SH, indispensabili per l'azione enzimatica (Cedrangolo e Adler). Incubando infatti con porfresside la triosofosfatoapodeidrasasi, questa si inattiva. L'alcolapodeidrasasi e la α -glicerofosfatoapodeidrasasi anche vengono inattivate dalla porfresside per quanto in misura minore. Del tutto resistenti si mostrano invece la lattico- e la malicoapodeidrasasi. Di rilievo inoltre è l'osservazione fatta da Cedrangolo e Adler che l'azione inibitrice della porfresside, quando esiste, si rivela solo se l'enzima e il radicale sono incubati insieme, ma non se la porfresside è aggiunta direttamente alla miscela di prova. Questo vuol dire secondo gli AA. che il substrato o il coenzima proteggono l'apoenzima dall'azione dell'ossidante, cioè in altre parole che i gruppi SH sono proprio essi la sede dell'affinità per il substrato o il coenzima.

2° *Succinodeidrogenasi*. È una deidrasasi citocromotropa. Secondo Hopkins come secondo Stern e più recentemente anche secondo Straub, esisterebbe un trasportatore intermedio tra succinodeidrasasi e citocromo *c*. I preparati più puri dell'enzima, che restano ancora quelli di Ogston e Green, contengono notevoli quantità di protidi, e la natura stessa dell'enzima sembra essere infine quella

di un protide, data l'osservazione di Jarmoschkewitsch che l'attività enzimatica è distrutta dall'azione delle proteinasi. La deidraasi è da considerarsi tra le deidraasi non complesse: un tentativo di H. Hellström, di isolare l'eventuale gruppo attivo è restato senza successo. Secondo un lavoro di Cedrangolo e Balbi del 1941, l'attività della succinodeidraasi è completamente abolita, quando una preparazione di questo enzima è incubata con porfresside. Un successivo trattamento con cisteina o acido ascorbico ripristina l'attività dell'enzima. Questi fatti permettono la conclusione che la molecola della deidraasi contiene gruppi SH-, la cui integrità è condizione indispensabile per l'attività dell'enzima. L'acido succinico protegge la deidraasi dall'ossidazione, il che vuol dire che i gruppi SH- fissi nella molecola dell'enzima, sono proprio essi la sede dell'affinità per il substrato. Inoltre Cedrangolo e Balbi in queste ricerche hanno osservato che anche gli acidi dicarbossilici, ossalico, malonico, glutarico, adipico, suberico e ezlaico, proteggono, per quanto sempre in misura minore rispetto all'ac. succinico e diversa per ciascuno, la deidraasi dall'attacco della porfresside. Perchè nessuno dei diacidi nominati è attivato dalla succinodeidrogenasi, si ha qui la precisa dimostrazione che adsorbimento del substrato ad un enzima e attivazione del substrato sono due processi diversi, di cui il secondo non è necessaria conseguenza del primo.

Mediante il metodo della protezione Cedrangolo e Balbi, infine, hanno dimostrato che l'affinità dell'enzima è massima per l'acido succinico e decresce, sia col diminuire che coll'aumentare del numero degli atomi di C dei diacidi.

Sia accennato in ultimo che la succinodeidraasi occupa un posto di primo ordine nel capitolo delle ossidazioni biologiche, perchè da molti AA. (Szent Györgyi, Breusch, ecc.) si ammette che la sua azione sia intercalata nell'ossidazione *in vivo* dei glicidi.

3° *Flavoproteina di Corran e Green; flavoproteina di Haas; diaforasi I e II di Euler e Adler.* Tutti e quattro hanno per coenzima il dinucleotide adenin-isoallossazinico (sono quindi fermenti gialli) e si distinguono per la diversità della proteina. Nessuno di essi reagisce coll'O₂. Tutti reagiscono colla CoIH₂ e colla CoIHH₂ (la dia-

forasi I secondo Euler reagisce però solo colla CoIH_2 , la diaforasi II, sempre secondo Euler, solo colla CoIIH_2 ; inoltre il flavoproteide di Corran pare reagisca solo colla CoIH_2 , assumendone l'idrogeno. Sono perciò dei trasportatori intermedi che si inseriscono tra fermenti piridinici e citocromi. Il 1° è stato isolato dal latte, il 2° dal lievito, il 3° e il 4° dai più diversi tessuti animali e vegetali.

4° *Piruvicodeidrogenasi*. È costituita da una proteina specifica e, come coenzima, dall'estere pirosoforico dell'aneurina. Ossida l'acido piruvico ad acido acetico e CO_2 . La sua esistenza pare provata nel *b. Delbrukii* (Lipmann), ma è anche ammessa nelle cellule degli animali superiori, dove, come è noto, l'ossidazione del piruvato procede rapida e completa (Cedrangolo). Poichè la diidro-cocarbossilasi non è autoossidabile, potrebbe darsi che effettivamente la deidrasa piruvica sia una deidrasa anossitropa, tuttavia date le scarse conoscenze che abbiamo su quest'enzima, ulteriori studi si rendono necessari per chiarire la sua posizione nella sistematica delle deidrasi.

5° *Deidrasi degli acidi grassi superiori*. L'esistenza di deidrasi specifiche, che deidrogenano gli acidi grassi superiori, è stata stabilita in seguito dei lavori di Quagliariello, che ha dimostrato per primi tali enzimi nella bile, nel fegato, e nel t. adiposo. Questi enzimi deidrogenano gli acidi grassi superiori, saturi ed insaturi (Mazza) ed hanno quindi una posizione di primo ordine nel metabolismo dei lipidi. Con Stern noi li poniamo tra le deidrasi anossitrope. Ma bisogna riconoscere che la loro assegnazione a questo gruppo resta ancora *sub judice*, perchè i detti enzimi non sono stati isolati e se ne ignora perciò la natura chimica e se sono o no in grado di reagire direttamente coll' O_2 . Il fatto che la deidrogenazione degli acidi grassi superiori è inibita dall'aggiunta di HCN (Quagliariello), fa supporre tuttavia che termine ultimo della catena sia anche in questo caso la citocromoossidasi e che in conseguenza gli enzimi che ossidano gli acidi grassi superiori siano delle deidrogenasi anossitrope citocromotrope.

b) *Deidrogenasi ossitrope*. Enzimi che reagiscono con accettori chimici così come con ossigeno molecolare. (Stern chiama *ossidrasi* gli

enzimi n. 3-7, intendendo che in essi l'affinità per l'O₂ è molto più spiccata, se non addirittura esclusiva).

Questo gruppo comprende i seguenti enzimi:

1° *Fermento originale giallo di Warburg*. È costituito da una proteina specifica ed ha per coenzima il mononucleotide isoallossazinico. È stato estratto dal lievito. Prende l'idrogeno dalla CoIH₂ e dalla CoIIH₂. Reagisce coll'O₂, ma anche col blu di metilene.

2° *Enzima di Schardinger*. Anche questo enzima è una flavoproteina, il cui coenzima è il dinucleotide adenin-isoallossazinico. Ossida aldeidi ad acidi, l'ipo-xantina a xantina e la xantina ad acido urico. Si trova soprattutto nel latte, ma anche nei tessuti degli animali.

3° *d-aminoacidoossidasi*. Ossida gli aminoacidi non naturali a chetoadidi e ammoniaca. È pure una flavoproteina (coenzima: il dinucleotide adenin-isoallossazinico). Si trova soprattutto nel rene (Krebs). Secondo Karrer esistono nel rene diverse *d-aminoacidoossidasi* perchè l'enzima puro non è in grado di ossidare tutti i *d-aminoacidi*, che sono invece ossidati dai comuni estratti renali.

4° *Ascorbicoossidasi*. Ossida l'acido ascorbico ad acido deidroascorbico. Si trova nelle piante.

5° *Glucosoossidasi (Aspergillus)*. Ossida il glucoso ad acido gluconico.

6° *Istaminasi*. Ossida l'istamina e le diamine, agendo su uno solo dei gruppi - CH₂-NH₂, che viene trasformato in gruppo aldeidico. Si trova negli organi degli animali.

7° *Tiraminasi*. Ossida la tiramina e le altre monoamine, che vengono così trasformate nelle corrispondenti aldeidi. Si trova anche essa negli organi degli animali.

II. *Ossidasi*. - Sono sistemi contenenti un metallo pesante, inibibili con HCN, dotati di assoluta affinità all'O₂ come accettore. Vanno divisi in due gruppi: a) *Ossidasi solubili*; b) *Ossidasi insolubili*. Mentre le *Ossidasi insolubili* sono rappresentate da un solo enzima, la *citocromoossidasi* d'importanza d'altronde eccezionale (di quest'enzima si dirà in particolare a proposito dei fermenti

eminici), le Ossidasi solubili comprendono l'*uricasi* (o *uricoossidasi*) e la *polifenolossidasi*.

Uricasi. Ossida l'acido urico ad allantoina. Si trova nel fegato e nel rene dei vertebrati (tuttavia non nell'uomo).

Polifenolossidasi. È costituita da una proteina specifica e dal rame come gruppo attivo (Kubowitz). Si trova nei vegetali. Ossida i polifenoli a chinoni. È detta anche cromoossidasi (per la sua azione i succhi vegetali anneriscono a contatto dell'aria). Anche la *luciferasi* e la *laccasi* sono polifenolossidasi. La *tirosinasi* pare invece sia un enzima diverso.

B. ENZIMI AUSILIARI DELLE OSSIDAZIONI.

1° *Catalasi*. Scinde l'acqua ossigenata in acqua e O_2 . Di essa si dirà a proposito dei fermenti *eminici*.

2° *Perossidasi*. Ossida diversi composti di natura fenolica solo in presenza di perossido di idrogeno, che funziona da accettore, e che viene così a ridursi ad acqua. Anche di quest'enzima si dirà nei fermenti *eminici*.

3° *Carbossilasi*. Decarbossila gli α -chetoacidi. Di quest'enzima si dirà a proposito degli enzimi tiazolici. Enzimi che decarbossilano gli α -aminoacidi con formazione di amine, certamente esistono nei batteri e pare anche negli animali superiori, ma non se ne conosce la natura chimica.

4° *Anidrase carbonica*. Trasforma il CO_2 in H_2CO_3 . Si trova negli organi degli animali.

5° *Idratasi* (fumarasi, aconitasi, enolasi). Introducono acqua in acidi insaturi e *viceversa* sottraggono acqua da ossiacidi. Tra esse merita menzione l'*enolasi*, che è una magnesio proteina (Warburg) e che trasforma reversibilmente l'acido 2-fosfoglicerico in acido fosfopiruvico.

6° *Aldolasi* (detta anche *zimosasi*). È una metalloproteina (Warburg). Scinde l'estere fruttosodifosforico in due molecole di trioso. Si trova nei tessuti degli animali.

7° *Carbolicasi*. Opera la condensazione aldolica delle aldeidi.

8° *Fosforilasi*. Trasforma il glicogeno in estere di Cori in presenza di fosfati inorganici.

9° *Isomerasi* (dette anche *esocinasi*). Trasformano alcuni composti di natura glicidica in prodotti isomeri. Ricordiamo la *fosfoglicomutasi*, che trasforma l'estere di Cori in estere di Robison, la *fosfoesomutasi*, che trasforma a sua volta l'estere di Robison in estere di Neuberg. Tra queste isomerasi ricordiamo infine la *fosfogliceromutasi*, presente nelle cellule degli animali, che trasforma l'acido 3-fosfoglicerico in acido 2-fosfoglicerico.

10° *Racemasi*. *Latticoracemasi* (batteri) che racemizza l'acido lattico otticamente attivo. *Tartaricoracemasi* (pancreas) che secondo Betti e Lucchi trasforma l'acido d-tartarico in acido mesotartarico.

11° *Reducasi* (batteri). Attivano l'idrogeno gassoso rendendolo capace di ridurre accettori diversi.

12° *Idroliasi* (batteri). Liberano idrogeno molecolare da substrati diversi (acido formico).

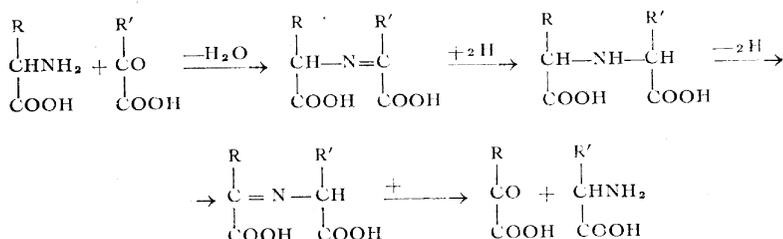
13° *Aspartasi* (vegetali). Si tratta di due enzimi, aspartasi I e II, che trasformano entrambi reversibilmente l'acido l(-) aspartico in acido fumarico e ammoniaca.

14° *Fosfoferasi*. Trasportano il radicale fosforico dall'acido adenilpirofosforico sull'esosomonofosfato ($2 \text{ esosomonofosfato} + 1 \text{ acido adenilpirofosforico} = 2 \text{ esosodifosfato} + 1 \text{ ac. adenilico}$), come pure dalla fosfocreatina sull'acido adenilico ($2 \text{ fosfocreatina} + 1 \text{ acido adenilico} = 2 \text{ creatina} + 1 \text{ ac. adenilpirofosforico}$) e infine dall'ac. fosfopiruvico sulla creatina ($1 \text{ acido fosfopiruvico} + 1 \text{ creatina} = 1 \text{ acido piruvico} + 1 \text{ fosfocreatina}$).

15° *Metilferasi* (Barrenscheen, 1942). Trasferiscono il radicale metilico da alcuni composti (donatori) ad altri (accettori). Per esempio, dalla colina e dalla metionina alla glicina (formazione di betaina) o alla glicociamina (formazione di creatina).

16° *Aminoferasi*. Catalizzano il trasporto intermolecolare reversibile del gruppo NH_2 (transaminazione) tra un α -aminoacido e un α -chetoacido dicarbossilico. Sono diffusissime nei tessuti ani-

mali e vegetali. Il meccanismo con cui avviene detto trasporto non è noto. In un primo tempo Karrer ha considerato come intermediari della transaminazione gli acidi α' -iminodicarbonici, conforme allo schema:



Questo schema non è stato ammesso però da Cedrangolo e Villano, perchè questi AA. trovano che gli acidi α - α' iminodicarbonici (octepina) non sono metabolizzati dai tessuti viventi e inoltre perchè da α -chetoacidi ed α -aminoacidi non è possibile mettere in evidenza *in vivo* la formazione degli acidi α' - α iminodicarbonici. Anche lo stesso Karrer successivamente ha confermato i risultati di Cedrangolo e Villano e ha in conseguenza ritirata la sua ipotesi degli acidi iminodicarbonici come intermediari della reazione di transaminazione.

Le aminofersis secondo Braunstein e Kritzmann sono due: la aspartico- e la glutammico-aminofersis, la prima avente affinità per diacidi di quattro carboni, la seconda per diacidi di cinque. Secondo Cedrangolo e Carandante in realtà esisterebbero due *glutammicoaminoferasi*. La prima catalizzerebbe la transaminazione reversibile tra acido glutammico naturale e un α -chetoacido qualunque, la seconda la stessa reazione tra ac. glutammico non naturale e pure un α -chetoacido qualunque. In accordo colla terminologia di Braunstein e tenendo conto del meccanismo d'azione di questi enzimi, Cedrangolo e Carandante hanno proposto per i due enzimi rispettivamente i nomi di *l-glutammicoaminoferasi* e *d-glutammicoaminoferasi*. Dell'importanza delle aminoferasi per l'ossidazione degli aminoacidi naturali è detto oltre.

Abbiamo passato così brevemente in rassegna i principali enzimi delle ossidazioni, che sono a nostra conoscenza. Tale rassegna tuttavia non ha certo la pretesa di essere completa. Molti enzimi sono ancora così poco noti, che non si sa a quali gruppi assegnarli, di altri si può dire che si dubita addirittura della loro esistenza. Così non abbiamo nominato nè classificato la *diossimaleicoossidasi* (probabilmente una deidrogenasi ossitropa), che ossida l'acido diossimaleico ad acido dichetosuccinico, la α -*ossiglutaricodeidrase* (probabilmente una deidrase anossitropa), che ossida l'acido ossiglutarico ad acido chetoglutarico, la *maleicodeidrogenasi*, che ossida l'acido maleico ad acido ossalacetico. Un cenno merita pure la *colindeidrogenasi*, che ossida la colina ad aldeide betainica. È probabile che si tratti di una deidrase anossitropa, ma i caratteri dell'enzima si ignorano.

È un fatto che la colina *in vivo* è ossidata e sarebbe certamente utile uno studio in particolare sull'enzima che ossida la base, la quale, come è noto (Best, Cedrangolo), ha un'azione di primo piano nel metabolismo dei lipidi (secondo Cedrangolo la colina trasforma gli acidi grassi in glicidi).

Tra tutti gli enzimi, che abbiamo nominati, manca l'enzima o gli enzimi che ossidano gli aminoacidi naturali: infatti si è fatto solamente cenno della glutammicodeidrase, enzima piridinico, che ossida l'acido glutammico naturale ad ammoniaca e acido α -chetoglutarico. Il fatto è che non tutti i ricercatori sono d'accordo sull'esistenza a sè di un tale o di tali enzimi. Nel 1933 Krebs annunciava che gli aminoacidi naturali sono ossidati ad opera di un sistema enzimatico, la *l-aminoacidossidasi* presente nel fegato e soprattutto nel rene dei vertebrati, inibibile con HCN e inattivabile colla diluizione del protoplasma che necessariamente accompagna l'estrazione dell'enzima « effect of dilution ». Ma successivamente Braunstein (1939) ha negato l'esistenza di quest'enzima ed ha ammesso che tutti gli aminoacidi naturali sono ossidati attraverso le due reazioni successive: 1° transaminazione con acido α -chetoglutarico; 2° deaminazione dell'acido glutammico formatosi. Braunstein in questa sua ipotesi si basava soprattutto su un modello enzimatico acellulare, da lui costruito, che effettivamente era in grado di deaminare gli aminoacidi naturali attraverso le due reazioni

indicate. Cedrangolo e Carandante hanno ripreso in esame la questione e si sono preoccupati di vedere soprattutto che cosa succede degli aminoacidi naturali nella cellula vivente, la quale, ovviamente, è ben diversa dai modelli enzimatici artificiali, che si costruiscono in Laboratorio. Questi AA. hanno visto anzitutto che nel fegato e nel rene vivente l'acido α -chetoglutarico non solo non catalizza l'ossidazione della alanina naturale, ma anzi addirittura l'inibisce. Inoltre Cedrangolo e Carandante hanno stabilito che le poltiglie epatiche e renali deaminano molto più rapidamente l'alanina naturale che l'acido glutammico naturale. Per questi risultati si deve concludere che l'ossidazione indiretta dei *l-aminoacidi*, se anche ha luogo *in vivo*, è una via secondaria, mentre la via principale è la diretta ossidazione ad opera di un enzima specifico, la *l-aminoacidoossidasi*.

A quale gruppo appartenga quest'enzima, non si può dire oggi con sicurezza. Il fatto che l'ossidazione degli aminoacidi naturali è inibita dalla presenza di HCN, fa supporre che i 2 atomi di idrogeno, una volta staccatisi dalla molecola dell'aminoacido, seguano la via *citocromi-citocromoossidasi*, per cui infine non sembra errato per il momento classificare la *l-aminoacidoossidasi* tra le deidrogenasi anossitrope citocromotrope.

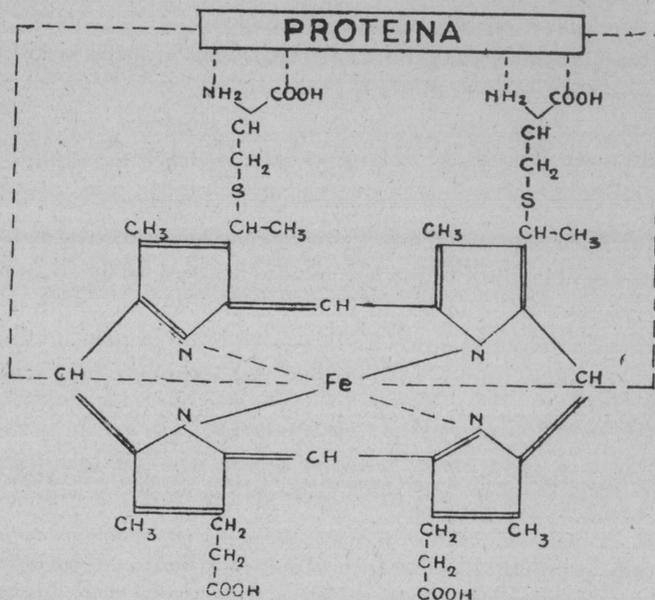
CHIMICA DEGLI ENZIMI DELLE OSSIDAZIONI.

Come si è visto, solo di alcuni enzimi delle Ossidazioni è nota la natura chimica. Se perciò non è possibile una classifica chimica di tutti gli enzimi delle Ossidazioni, è possibile però almeno suddividere in gruppi determinati, in base della natura chimica, quegli enzimi, dei quali appunto è nota la struttura. Si tratta di enzimi complessi, costituiti di due parti, un supporto di natura proteica e un gruppo prostetico di basso peso molecolare, che in alcuni casi è addirittura semplicemente un metallo. Il supporto colloidale è in ogni caso una proteina e qui si incontrano le solite difficoltà, che si hanno quando si tenta di caratterizzare la fisionomia di un protide, al di fuori della semplice analisi quantitativa dei suoi costituenti. Di questi enzimi si conosce invece la natura

chimica del coenzima. A seconda perciò della struttura di quest'ultimo, noi distinguiamo i seguenti gruppi: fermenti *emini*, fermenti *piridinici*, fermenti *flavinici*, fermenti *tiazolici* e fermenti *metallici*.

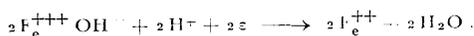
Fermenti emini. Questi sono i *citocromi*, la *citocromoossidasi*, la *catalasi* e la *perossidasi*.

Si distinguono tre citocromi: *a*, *b*, *c* (*). Allo stato ridotto essi presentano due bande d'assorbimento comuni, l'una a $\mu\mu$ 430-435, l'altra a $\mu\mu$ 521. Si distinguono per rispetto allo spettro d'assorbimento per mostrare il citocromo *a* ancora una banda d'assorbimento a $\mu\mu$ 604, il *b* a $\mu\mu$ 566 e il *c* a $\mu\mu$ 550. E_0 a pH 7 risulta - 0,04; + 0,260; + 0,290 Volta rispettivamente per il citocromo *b*, *c*, *a* (Ball). La struttura chimica del citocromo *c* è stata chiarita dalle ricerche di Theorell. Essa è rappresentata secondo la formula:



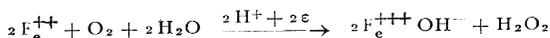
(*) Secondo KEILIN e HARTREE (1939) in realtà il citocromo *a* sarebbe costituito di due componenti: *a* e *a₃*. Quest'ultimo sarebbe identico colla citocromoossidasi. Secondo YAKUSHIJI e OKUNUKI nel cuore esisterebbe un secondo citocromo *c*, che viene indicato come citocromo *c₁*.

La riduzione del citocromo, che comporta un passaggio del ferro da trivalente a bivalente, si rappresenta coll'equazione:



La *citocromoossidasi* (fermento respiratorio di Warburg) non si è ancora potuto estrarre dalle cellule (*). Si ignora il valore del suo potenziale di ossido-riduzione. Warburg con metodo fotochimico ha stabilito per quest'enzima due massimi di assorbimento, rispettivamente a $\mu\mu$ 430-440 e a $\mu\mu$ 580-595. La costituzione dell'emina è anche ignota: per caratteri spettrografici si assegna alle cosiddette emine rosso-verdi di Warburg (*spirographis*-emina; *feoemina* b; *criptoemina*). La *spirographis*-emina, che è il gruppo prostetico della *clorocruorina* (pigmento del sangue del verme marino *spirographis*) ha la costituzione della protoemina, colla variante che in posizione 2 anzichè un vinile, è situato invece un formile.

La *citocromoossidasi*, reagendo col citocromo ridotto si riduce e si riossida poi per azione dell' O_2 (**);



(il ferro fornisce due elettroni all'ossigeno, la molecola di O_2 caricata rimuove 2H^+ dall'acqua e i rimanenti due idrossili soddisfano la carica positiva dei due atomi di ferro ferrico).

Della catalasi si ricorda solo che la sua emina è la protoemina (oltre all'emina contiene anche biliverdina nel rapporto di 3:1) e che secondo vedute recenti di Spirito il suo ufficio biologico non sarebbe

(*) Nel 1939 HOGNESS e coll., hanno annunziato di aver ottenuto dal lievito una citocromo-c-ossidasi, solubile in acqua.

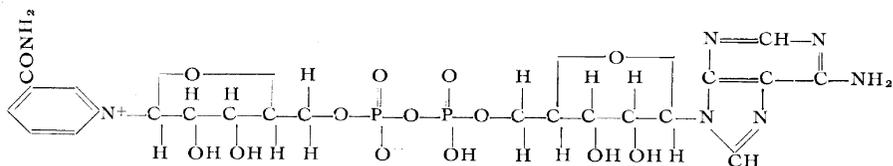
(**) TAMIYA e Coll., sostengono che la combinazione del fermento respiratorio coll' O_2 non involge un cambio di valenza del ferro da ferroso a ferrico ma che in tal caso si tratta di un complesso analogo all'ossiemoglobina, dove, come è noto, l'ossigeno molecolare è legato labilmente al ferro ferroso del pigmento. Secondo questi AA., però il fermento respiratorio sarebbe un enzima diverso dalla citocromoossidasi, il primo sensibile all'ossido di carbonio, il secondo all'acido cianidrico: nelle cellule la riossidazione della citocromoossidasi avverrebbe ad opera del fermento respiratorio che sarebbe a sua volta riossidato dall' O_2 atmosferico.

di scindere l' H_2O_2 ma invece quello di un trasportatore vero e proprio dell' O_2 . Anche l'emina della perossidasi è risultata identica con l'emina dell'emoglobina. La perossidasi è stata recentemente ottenuta cristallina da Hugo Theorell (1942).

OSSIDAZIONI
BIOLOGICHE.

Fermenti piridinici. Questi fermenti sono stati tutti elencati nel gruppo delle deidrogenasi anossitrope. Si tratta di enzimi composti di una proteina e di un gruppo prostetico che è la cozimasi (Euler), detta anche codeidraasi I, oppure il cofermento di Warburg, detto anche codeidraasi II.

La cozimasi è il dinucleotide adenil-piridinico:



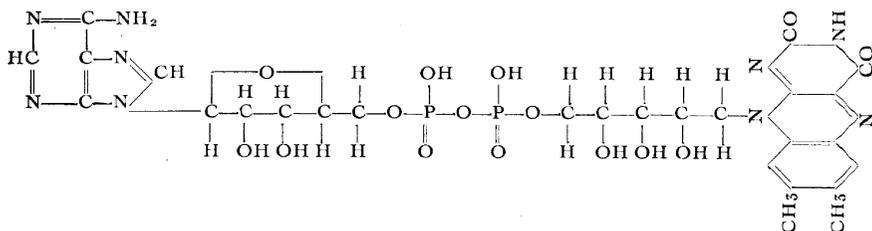
Per riduzione l'azoto del nucleo piridinico passa da pentavalente a trivalente: un atomo d'idrogeno ($\text{H}^+ + e$) fornisce un elettrone all'azoto che è così scaricato e l'idrogenione soddisfa la carica negativa dell'atomo di ossigeno del residuo fosforico; un altro atomo d'idrogeno viene assunto nella posizione 2 del nucleo piridinico. La diidrocozimasi presenta una larga banda di assorbimento tra 320 e $360 \mu\mu$ con il massimo a $340 \mu\mu$. La comparsa di questa banda di assorbimento è sfruttata per la determinazione quantitativa della CoI (Euler). E'_0 (pH7) = $-0,315$ Volta.

La formula della CoII non è nota. È certo che essa si distingue dalla CoI per un radicale fosforico in più, ma s'ignora dove tale radicale sia attaccato. Tuttavia recentemente Euler ed Adler hanno mostrato che è possibile enzimaticamente trasformare reversibilmente la CoII in CoI. Questo fa quindi supporre che la terza molecola di acido fosforico sia staccabile facilmente dalla molecola della CoII (e *viceversa* anche facilmente introducibile nella molecola della CoI) per cui oggi si pensa che essa si trovi esterificata con l'idrossile del carbonio 2 o 3 di una delle due molecole

di riposo (è anche ammissibile che essa si trovi in legame pirofosforico, ma libera per i due restanti gruppi OH).

Fermenti flavinici. Dei fermenti flavinici si è detto in molte occasioni. Quelli sicuramente noti sono: 1° il fermento giallo originale di Warburg; 2° il fermento di Haas; 3° il fermento di Corran e Green; 4° le diaforasi I e II di Euler; 5° la d-aminoacidoossidasi; 6° l'enzima di Schardinger (*). Ognuno di essi è costituito da una proteina specifica e da un coenzima che è il dinucleotide adenin-isoallossazinicco, eccetto il fermento originale di Warburg, il cui coenzima è costituito invece dalla sola metà allossazinicca del dinucleotide. Un fenomeno artificiale è stato costruito in Laboratorio da Warburg unendo la proteina del fermento originale con il dinucleotide allossazinicco: l'oleonozima così sintetizzato ha tutti i caratteri del fermento originale, il che vuol dire che è la proteina quella che ad un enzima imprime i caratteri della specificità e della affinità.

Ecco la formula del dinucleotide:



Per riduzione due atomi d'idrogeno si fissano ai due atomi di azoto, nel secondo e nel terzo ciclo dell'allossazina, nei quali spariscono i due doppi legami e se ne forma uno nuovo tra i due carboni per mezzo dei quali il secondo ciclo è condensato col terzo. Il potenziale della lattoflavina libera è: E'_0 (pH7) = - 0,191 Volta. L'unione della lattoflavina con la proteina specifica del fermento

(*) Un nuovo fermento flavinico è stato isolato dal lievito, più di recente, da HAAS, HORECKHER e HOGNESS. Il fermento è chiamato citocromo *c*-reduttasi. Esso reagisce colla $CoIIIH_2$ e con il citocromo *c* ossidato. Gruppo attivo: il mononucleotide isoallossazinicco.

ottenere la sintesi della cocarbossilasi coll'aiuto di un sistema acellulare. Il sistema completo è fatto di: 1° fosfatasi; 2° pirofosfatasi; 3° aneurina; 4° fosfati inorganici; 5° d-aminoacidi; 6° d-aminoacidoossidasi. L'energia, fornita nella deaminazione del d-aminoacido, è utilizzata per la fosforilizzazione della vitamina.

Fermenti metallici. - Sono costituiti da una proteina specifica e da un gruppo attivo, che è un metallo. Quelli sicuramente noti sono: 1° la polifenolossidasi (il rame è il gruppo attivo); 2° l'enolasi (magnesioproteina); 3° la zimoesasi (il gruppo attivo è un metallo pesante); 4° l'anidrasi carbonica (zinco-proteina). Anche l'ascorbicoossidasi e l'uricasi pare siano delle metallo-proteine.

RIASSUNTO

Dopo alcune brevi nozioni sul processo di attivazione dell'idrogeno e sul potenziale di ossido riduzione, l'A. passa a descrivere gli enzimi delle Ossidazioni. Sulla base della natura chimica, si distinguono poi i seguenti gruppi di fermenti: 1) eminici; 2) piridinici; 3) flavinici; 4) tiazolici; 5) metallici.

Esemplare fuori commercio per
la collezione agli eredi di
1938.

97840

100331

