ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIII.

1906

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XV.

1° SEMESTRE.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1906

nel caratteristico *sale di calcio* che cristallizza in cubi facilmente solubili nell'acqua e insolubili nell'alcool, il quale anzi lo fa precipitare dalle sue soluzioni acquose concentrate.

Per *azione dell'idrato sodico sul tetracloruro di carbonio in soluzione nell'acetone* ottenni, operando nelle medesime condizioni, lo stesso acido α-ossi-isobutirrico fusibile a 78°-79°.

Fisiologia. — *Proinvertasi e reversibilità dell'invertasi nei Mucor* (1). Nota di E. Pantanelli, presentata dal Socio R. Pirotta.

La continuazione dello studio del processo di secrezione degli enzimi, per il quale avevo già dovuto stabilire (2), che il substrato influenza diversamente la produzione intracellulare, la secrezione e l'azione dell'enzima, mi ha portato a scoprire altri due fatti importanti, la cui conoscenza è indispensabile per lo studio della secrezione, e cioè l'esistenza di una proinvertasi o zimogeno dell'invertasi nelle cellule di *Mucor Stalonifer* e *Mucedo*, la quale viene *secreta come tale* e si trasforma poi lentamente nel liquido esterno in invertasi attiva, e la relativamente grande facilità con cui l'invertasi passa da l'idrolisi del sacccarosio a la ricostituzione di un disaccaride partendo da lo zucchero invertito.

Tanto la proinvertasi come la reversione dell'invertasi faranno l'oggetto di lavori speciali; qui riporto solo alcuni dati principali, riferentesi specialmente a ciò che è necessario sapere di questi fenomeni prima di applicarsi a lo studio della secrezione dell'enzima.

L'esistenza di un zimogeno per un enzima così facilmente diffusibile, qual'è l'invertasi, era finora ignota (3); il solo Röhmann (4) ne suppone la presenza in certi organismi che non lasciano esosmire l'invertasi finchè la cellula è intatta. Per le cellule vegetali si conoscono in generale meno proenzimi, che per le cellule animali (5).

Eppure l'esistenza di questo zimogeno è facile a dimostrarsi. Esempio:

Una coperta bene sviluppata di *Mucor Mucedo*, cresciuta sul solito (6) liquido nutritizio, dopo lavaggio isotonico fu asciugata dolcemente fra carta

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Fisiologia del R. Istituto Botanico di Roma.

(2) I. *Meccanismo di secrezione degli enzimi*. Annali di Botanica, vol. II, pag. 113 (1905); II. *Influenza di colloidi su la produzione, secrezione ed azione dell'invertasi*. Rendiconti dell'Accademia dei Lincei (5), vol. XIV, 1° sem., pag. 377 (1906).

(3) Vedi i riassunti di Czapek, *Biochemie der Pflanzen*, vol. I, pag. 276 (1904) e Oppenheimer, *Die Fermente u. ihre Wirkungen*. II Aufl., pag. 250 (1904).

(4) Ber. d. chem. Ges., Bd. XXVII, pag. 3251 (1894).

(5) Czapek, loc. cit., pag. 80.

(6) Pantanelli, loc. cit., I (1905), pag. 120.

bibula e pesava fresca 18,5708 g. Fu allora divisa in due porzioni, di cui una (A), pesante 10,2034 g., fu maciullata con aggiunta di pura sabbia quarzosa, cloroformio ed acqua; 10 cmc. della poltiglia così ottenuta neutralizzavano 0,2 cmc. $^1/_{10}$ norm. NaOH. L'altra porzione (B) pesante 8,3674 g., fu pestata con sabbia quarzosa, cloroformio e soluzione 0,042 mol. di Na_2CO_3 in quantità tale, che la poltiglia rimase sempre perfettamente neutra rispetto al lackmus, debolmente alcalina rispetto al methylorange. I seguenti valori di CuO — invertasi, determinati con la solita metodica in condizioni identiche, sono corretti di tutte le diluizioni e riportati ad 1 gr. di micelio fresco. Nella colonna « lorda » è indicata la quantità di zucchero riduttore (mg. CuO) formata in un'ora a 56°, nella colonna « acido » la quantità di hexosio formata nelle stesse condizioni dal solo acido eventualmente aggiunto; la sottrazione di questo valore dal primo dà l'invertasi netta. La poltiglia di B fu divisa in 5 porzioni, di cui B rimase com'era, e a Ba, Bb, Bc, Bd, furono aggiunti gli acidi nella proporzione indicata. Le poltiglie così preparate soggiornavano a 18,5°.

Composizione dei saggi d'inversione:

A. 10 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio.
B. 10 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio.
Ba. 5 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio + 1 cmc. 0.132 norm. HCl + 4 cmc. acqua.
Bb. 5 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio + 5 cmc. 0.132 norm. HCl + 4 cmc. acqua.
Bc. 5 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio + 5 cmc. 0.0375 norm. $H^+ . H_2PO_4^-$ (methylorange) (0.0863 norm. $H^+ H^+ . HPO_4^=$ (lackmus)).
Bd. 5 cmc. poltiglia + 10 cmc. di 40 % saccarosio + 5 cmc. 0.0398 norm. $CH_3 . COOH$.

Invertasi:

	Subito dopo la triturazione			Dopo 48 ore:		
	lorda	acido	netta	lorda	acido	netta
A.	127,5	—	127,5	360	—	360
B.	0	—	0	tracce	—	tracce
Ba.	1940	1632	308	2192	1632	560
Bb.	—	—	—	6089,6	4720	1369,6
Bc.	—	—	—	928	792	136
Bd.	—	—	—	816	130	686

In questa esperienza i preparati avevano soggiornato a l'aria in presenza di cloroformio, ma erano affatto privi di zucchero. Siccome è noto che gli enzimi si sciupano più facilmente se non sono « protetti » dal loro idrolito preferito, così ho fatto esperienze anche in presenza di saccarosio.

Esempio: Una coperta di *Mucor Mucedo*, coltivata parallelamente e in identiche condizioni della precedente, ma in presenza di 2,5 % silice colloidale, pesava fresca 24.1044 gr. Una porzione (A) di 14.4969 gr. fu pestata con acqua, un'altra (B) di 9.6075 gr. con soluzione 0.042 mol. $Na_2 CO_3$, in modo che la poltiglia diventò esattamente neutra per il lackmus. Determinazioni, calcoli e composizione dei saggi come nel caso precedente:

	Invertasi: Subito dopo la triturazione			Dopo 48 ore:		
	lorda	acido	netta	lorda	acido	netta
A.	345	—	345	446	—	446
B.	0	—	0	tracce	—	tracce
Ba.	1960	1632	328	3232	1632	1600

Tolti questi saggi in B fu sciolto tanto saccarosio da formare una soluzione al 10 %. Dopo di che B fu diviso in 4 porzioni, di cui una (B) rimase qual'era, mentre a Bb, Bc, Bd furono mescolati acido cloridrico, fosforico, acetico nelle proporzioni indicate. Le poltiglie così preparate soggiornavano, con cloroformio, accanto a le precedenti, a la temperatura di 18,5°. Naturalmente un po' di saccarosio fu invertito anche a questa temperatura nel tempo trascorso fino a la presa dei saggi, ciò che è indicato nella colonna « hexosio iniziale ».

	Dopo 48 ore:			
	lorda	hexosio iniziale	acido	netta
B.	880	540	—	340
Bb.	6592	440	2860	1432
Bc.	776	568	792	— 584
Bd.	832	696	130	— 14

Dunque, in presenza di saccarosio accade non solo una notevole trasformazione di proinvertasi in invertasi anche in ambiente neutro, ma perfino a 18,5° si ha un'attività inversiva che non cede a quella verificantesi in ambiente acido, ciò che è reso possibile dal fatto che il saccarosio, come ha dimostrato Kullgren [1], sebbene pochissimo dissociato, dà però abbastanza ioni di H^+ per catalisare in misura sensibile la propria idrolisi. Molto probabilmente la « protezione » dell' idrolito sul suo enzima, di cui è piena la letteratura enzimologica, è dovuta a questa favorita trasformazione dello zimogeno in enzima attivo, mentre questo, come dobbiamo ammettere dal suo

[1] *Studien über die Inversion.* Zeitschr. f. physik. Chemie, XLI, pagg. 407-426 (1902).

modo di agire, diminuisce continuamente anche in presenza della sostanza « proteggente ». Su questo punto importante ho in corso esperienze.

Nell'esperimento su riportato, in ambiente acido l' invertasi intracellulare a 18,5° non lavorò gran che, e ciò perchè il suo optimum di acidità è estremamente basso. In presenza di acido acetico, e molto di più in acido fosforico, colpisce il fatto sorprendente, che mentre a 18,5° l'attività inversiva nella poltiglia fu abbastanza vivace, a 56 l'attività si revertì e da l' hexosio che già esisteva nel saggio e da quello a cui l'acido dava origine fabbricò uno zucchero non riduttore. Ciò sta in armonia con quanto vedremo fra poco su la reversibilità dell'enzima.

Io non posso qui riportare tutte le esperienze eseguite sul passaggio della proinvertasi intracellulare di *Mucor* in invertàsi attiva. I risultati capitali finora assodati sono:

1) La proinvertasi intracellulare di *Mucor* passa extra vitam in invertasi attiva, forse per ossidazione lenta. Infatti l'aereazione favorisce il passaggio, il quale del resto si compie anche in assenza di ossigeno libero.

2) Il passaggio è catalisato da gli ioni di idrogeno. Infatti esso richiede la loro presenza, sebbene in quantità minuscole, e varia proporzionalmente a la costante di affinità dell'acido.

3) In ambiente neutro e più in ambiente leggermente alcalino l'enzima attivo si sciupa assai più presto che in ambiente acido, mentre la proinvertasi anche in ambiente alcalino si conserva per molto tempo. Infatti, mentre poltiglie inversive alcalificate perdono rapidamente l'attività idrolitica, la riacquistano lentamente se si restituisce loro anche dopo varî giorni una leggera acidità.

***

Importante è poi la comparsa di proinvertasi nel liquido culturale. L'uscita di zimogeno da le cellule di *Mucor*, paragonabile forse a la secrezione di succo pancreatico inattivo, non è costante in questi organismi, ma bensì varia a seconda delle condizioni interne od esterne, come avremo campo di vedere parlando della secrezione.

Ho stabilito la presenza di proinvertasi nei liquidi culturali misurando l'attività inversiva di questi liquidi appena tolti a la cultura e dopo alcuni giorni di dimora asettica. I seguenti numeri dànno un'idea dell'entità del fenomeno: Liquido di una cultura di *Mucor Mucedo* a 18,5° C., di 12 giorni. invertasi in 10 cmc. di liquido culturale : 230,3; dopo due giorni di dimora asettica a 18,5° : 248. Liquido di una cultura di 20 giorni: invertasi: 128; dopo due giorni a 18,5° : 204, e così via.

In determinate condizioni manca un tale aumento lento dell' invertasi estracellulare, ciò che è dovuto a tre cause: 1) l' invertasi secreta, special-

mente se il saccarosio presente è poco, si sciupa lentamente [1], ciò che maschera la secrezione di proinvertasi; 2) in certi casi manca realmente la secrezione di proinvertasi; 3) a l'azione inversiva subentra, in determinate condizioni, l'attività sintetica, ciò che maschera la secrezione e l'attivazione dello zimogeno e dell'enzima attivo.

Inoltre ho potuto stabilire, come vedremo nella Nota seguente, che accanto al proenzima le cellule secernono realmente anche dell'enzima attivo.

Debbo qui rinunciare ad ulteriori particolari; ricorderò solo che la trasformazione della proinvertasi secreta in invertasi si compie in modo analogo, ceteris paribus, a la trasformazione dello zimogeno intracellulare, solo che gli optimum di acidità sono più elevati.

***

Dopo la scoperta di Croft Hill [2], secondo cui in soluzione al 40 % di glucosio per azione della maltasi di lievito si forma a lungo andare, a 25° C., un disaccaride, che secondo Emmerling [3] è isomaltosio, sono rapidamente aumentati i dati su le sintesi enzimatiche. Emmerling [4] trova che la maltasi di lievito ricompone l'amigdalina da glucosio e isonitrilglucoside dell'acido amigdalico, Kastle e Loevenhart [5] che le lipasi animali sintetizzano gli eteri grassi, Croft Hill [6] che la diastasi « Taka » forma maltosio da glucosio, Fischer ed Armstrong [7] che la lattasi riunisce glucosio e galattosio a formare lattosio, Cremer [8] che il succo spremuto di lievito condensa il fruttosio in glicogeno. Per molti enzimi però non riesciva la dimostrazione della sintesi, ed uno di questi pareva fosse l'invertasi, finchè Visser [9] ha provato, che anche l'invertasi esegue una lenta sintesi a 25° C., tale che dopo mesi non è ancora formato l'1 % di disaccaride, per altro in soluzioni piuttosto diluite. Con simile lentezza l'emulsina sintetizzava la salicina nelle esperienze di Visser. Questo autore ha anche sviluppato una teoria, con la quale si prevede la quantità di prodotti d'idrolisi che può

(1) Pantanelli, loc. cit., I, (1905), pag. 122; qui dati anteriori di Fernbach.

(2) Journ. of the chem. Society, vol. LXXXIII, pag. 534 (1898).

(3) Ber. chem. Ges., Bd. XXXIV. pag. 600 (1901); Croft Hill, ibidem, pagg. 1380 1384; Enunerling, ibidem, pagg. 2206-2207.

(4) Ber. chem. Ges., Bd. XXXIV, pag. 3810 (1901).

(5) Kastle e Loevenhart, Amer. chem. Journal, vol. XXIV, pag. 491 (1900). Ulteriore letteratura in Czapek, loc. cit., pagg. 79, 129. Cfr. Bodenstein, Bullettino del Congr. chim. intern. in Roma (1906).

(6) Proceed. chem. Society, vol. XVII, pag. 184 (1901).

(7) Fischer und Armstrong, Ber. chem. Ges., XXXV, pagg. 3144-3153 (1902); Armstrong, Chemical News., vol. LXXXVI, pagg. 166-167 (1902).

(8) Ber. chem. Ges., Bd. XXXII, pag. 2062 (1899).

(9) *Reaktionsgeschwindigkeit und chemisches Gleichgewicht* ecc., Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. LII, pagg. 257-309 (1905).

essere risintetizzata a 25° C. in determinate condizioni. Non è questo il luogo per discutere la teoria di Visser, la quale, pur essendo più perfezionata di quelle di Henri e di Herzog, non tiene però conto di alcuni fattori importanti, quali la natura colloidale dell'enzima, le variazioni di concentrazione del solvente, le variazioni degli ioni di H^+ per la variazione dello zucchero invertito ecc.

In realtà la sintesi di un disaccaride non o poco riduttore da glucosio e fruttosio per opera dell' invertasi di *Mucor* è assai più cospicua di quanto indica Visser per l' invertasi di lievito. L'azione revertente dell'enzima di *Mucor* si fa sentire, quando lo zucchero invertito raggiunge press'a poco la concentrazione del saccarosio non ancora invertito, è assai più forte a temperatura elevata che a temperatura ordinaria, dove predomina, ceteris paribus, l'idrolisi. Ciò può produrre notevoli errori nella determinazione dell' invertina secondo il metodo di O' Sullivan, Fernbach e me, ed è appunto per questa via che io ho sco perto la reversione. Del resto anche in presenza di ioni H^+ (acidi diluiti, anche a freddo) senza l'enzima, si ha una reversione in soluzioni concentrate di zucchero invertito, come trovò E. Fischer [1]; si formano allora accanto ad isomaltosio delle « destrine di reversione » sostanze precipitabili con l'alcool, non riducenti.

La reversibilità dell' invertasi di *Mucor* non è un fenomeno costante, anche date le dette condizioni, in qualsiasi modo e momento di cultura, più tosto anch'essa, come l'emissione di proinvertasi, dipende da condizioni esterne ed interne ben determinate, come vedremo occupandoci della secrezione.

Mentre rimando ad un apposito lavoro per le particolarità su la reversibilità dell' invertasi in ambiente acido, debbo però già qui menzionare un altro fatto importante.

Se dopo una prova d' inversione ad una temperatura qualsiasi, si neutralizza l'acidità necessaria al buon funzionamento dell' invertina con un forte eccesso di alcali, l'enzima viene distrutto e la sua attività si arresta entro pochi minuti fino ad alcune ore, come mostrarono O' Sullivan e Tompson [2]. Ben altro succede se ci si limita a rendere il saggio *appena alcalino*. In questo caso l' invertasi non è subito annientata, anzi a bassa temperatura conserva la sua attività per varî giorni, per altro con una continua diminuzione.

Ciò che è più meraviglioso, è che essa ora non idrolizza più, bensì *sintetizza*, anzi la reversione in ambiente alcalino è più vivace, ceteris paribus, che in ambiente debolmente acido. È facile convincersi di questo fatto: se si lascia riposare un saggio d' idrolisi debolmente alcalificato, si trova entro

[1] Fischer, Ber. chem. Ges., XXIII, pag. 3687 (1890); XXVIII, pag. 3024 (1895); Wohl, XXIII, pag. 2084 (1890).

[2] O' Sullivan e Tompson, *Invertase*, Journ. chem. Soc., LVII, pag. 852 (1890).

7-8 ore una notevole diminuzione dello zucchero riduttore [1]. Siccome però l'enzima perde realmente a poco a poco la sua attività anche in ambiente alcalino, così la reversione diminuisce lentamente per cessare entro alcuni giorni.

Riporto alcuni dati per mostrare l'ampiezza di questi fenomeni. Una soluzione al 40 % di saccarosio fu idrolizzata per 30′ a bagno-maria con 2 cmc. da 0,1 norm. HCl, poi si neutralizzò esattamente, rispetto a methyl-orange, con NaOH 0,1 norm., si raffreddò rapidamente e ad ogni 10 cmc. del liquido furono aggiunti 10 cmc. del liquido invertasico.

Reversione a 55° C., in un'ora:

	Acidità	Zucchero riduttore			Zucchero revertito
	cmc. $^1/_{10}$ norm.	iniziale	finale	revertito	in % dell'hexosio iniziale
Esp. I.	5,6	3776,1	3212	— 464,1	12,29 %
Esp. II.	3,8	3790	3080	— 710	18,74 »

Come si vede, si tratta di sintesi ben più vigorose di quelle osservate da Visser, ciò che è dovuto, come si vedrà meglio nel lavoro esteso, a tre cause: 1) la reversione in ambiente acido diventa considerevole solo a temperatura elevata; 2) la concentrazione totale dello zucchero (20 %) era nelle riferite esperienze superiore a quella adottata da Visser; 3) l'invertasi di *Mucor* tende a revertire assai più dell'invertasi di lievito.

Inoltre la reversione varia inversamente a l'acidità del mezzo e in ambiente alcalino cresce, entro certi limiti, proporzionalmente a la concentrazione degli ioni OH^-. Alcuni esempî: il liquido invertito fu preparato come sopra, poi fu aggiunta l'invertasi, indi alcalificato il miscuglio, che soggiornava asetticamente a 18,5°.

Reversione a 18,5° in ambiente alcalino:

	Alcalinità	Zucchero riduttore			Zucchero revertito
	cmc. $^1/_{10}$ norm.	iniziale	dopo 24 ore	revertito	% dell'hexosio iniziale
Esp. I.	13,0	3742,8	3440	— 302,8	8,091 %
			Dopo 48 ore		
Esp. II.	14,4	3776,1	3408	— 368,1	9,738 »
Esp. III.	16,2	3790	2880	— 910	24,01 »

[1] Lo studio di questi fenomeni col metodo polarimetrico è assai più inesatto che col metodo di determinazione gravimetrica. Infatti, oltre a gli errori prodotti da la presenza di sostanze estranee in esperienze come le mie, O' Sullivan e Tompson (loc. cit. pag. 865) hanno trovato, che il destrosio formantesi dal saccarosio è nei primi momenti birotante, per cui l'osservazione polarimetrica non indica esattamente la quantità di hexosio che si forma. Pur troppo a tutti gli autori, Henri, Herzog, Visser ecc., è sfuggito questo fatto.

Infine un esempio di inversione a 56° in ambiente acido (0,2 cmc. $^1/_{10}$ norm.), seguita, nello stesso saggio, da inversione a 18,5° in ambiente debolmente alcalino (0,2 cmc. $^1/_{10}$ norm.): zucchero invertito a 56° in un'ora in presenza di acido: 345; zucchero revertito in 24 ore a 18,5° in presenza di alcali: 260.

È da considerarsi, che mentre in ambiente acido l'enzima ha bisogno di una concentrazione dei prodotti d'idrolisi pari a quella dell'idrolito per compiere la sintesi, in ambiente alcalino reverte anche se la concentrazione del saccarosio è molto superiore a quella dello zucchero invertito.

Fisiologicamente, la facile reversibilità anche a bassa temperatura in ambiente alcalino ha un'importanza altissima, perchè il citoplasma è debolmente alcalino [1], mentre il succo cellulare ha reazione acida. A la comune temperatura si compiranno quindi le sintesi più facilmente nel citoplasma, e difatti le cellule giovani, dove più vivace è il lavorìo formativo, ne sono di regola totalmente ripiene. Nel succo dei vacuoli invece predomineranno a la temperatura ordinaria le scissioni. Infatti le cellule adulte, le cellule in autodigestione, sogliono avere grandi vacuoli circondati da un sottile straterello di protoplasma.

Patologia vegetale. — *Intorno alla peronospora della canapa.* Nota del dott. Vittorio Peglion, presentata dal Socio G. Ciamician.

La peronospora della canapa (*Peronospora cannabina*), è stata osservata per la prima volta in Isvizzera presso Steffisburgh e sommariamente descritta dall'Otth. Nel 1898, segnalandone la presenza nei canepai del Ferrarese, il chiaro prof. C. Massalongo dava un'accurata illustrazione dei caratteri morfologici del micelio e dei conidiofori del parassita e descriveva le deformazioni specifiche subite dalle foglioline di canapa peronosporate. I dati raccolti dal prof. Massalongo e dal prof. Aducco erano tali da far ritenere il parassita della canapa pochissimo diffuso ed affatto benigno. Nel materiale di studio raccolto in quelle circostanze non furono rinvenute altre fruttificazioni all'infuori delle conidiali, onde rimaneva ipotetico il modo di svernare del parassita.

Difatti, mentre non è punto raro rinvenire dal maggio in poi delle foglie di canapa contorte e deformate dalla peronospora in questione e di osservare le copiose fruttificazioni conidiche che ne ricoprono di un denso strato bruno-violaceo la pagina inferiore, le più accurate indagini praticate su queste foglie, anche serbate a lungo in camera umida, non rivelano formazioni neppure incipienti di fruttificazioni più evolute, di oospore. Le ripetute osservazioni compiute durante un quinquennio nei canepai del Ferrarese, confermano a tale

[1] Pfeffer, *Pflanzenphysiologie*, II Aufl., Bd. I, pag. 490 (1897).