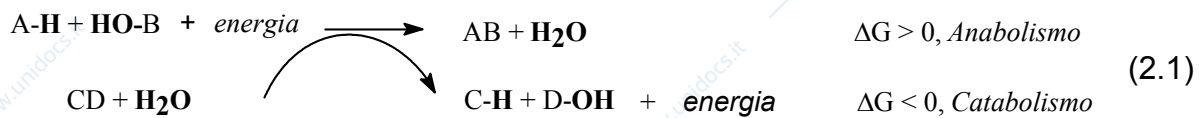


Cap. 2) CINETICA ENZIMATICA

2.1) Introduzione alla catalisi enzimatica

COSA FA UN ENZIMA?

L'attività vitale è basata su fenomeni **endoergonici**: gli organismi sintetizzano le necessarie macromolecole di struttura altamente organizzata (ordine) utilizzando una parte dell'energia liberatasi dalla demolizione di altre molecole.



Le due reazioni non possono avvenire casualmente, ma devono essere accoppiate. Inoltre, esse devono avvenire in maniera sufficientemente rapida da consentire il mantenimento dello stato vitale dell'organismo.

GLI ENZIMI ACCELERANO SELETTIVAMENTE LE REAZIONI VITALI

Infatti, alle temperature che usualmente si registrano all'interno degli organismi viventi ($\approx 37^\circ\text{C}$), le reazioni chimiche avverrebbero troppo lentamente. Si osservi che il verificarsi della condizione $\Delta G < 0$ **non** implica che la reazione sia veloce, ma solo che:

$$\frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{CD}]} < K_{\text{eq}} \quad (2.2)$$

cioè che la reazione è **termodinamicamente** spinta a procedere da sinistra a destra. Per convincersene, si consideri la reazione di combustione del **saccarosio** (zucchero comune):



Il ΔG di questa reazione è negativo ed elevatissimo ma, nonostante questo, nessuno ha mai osservato processi di combustione spontanea delle zollette di zucchero esposte all'aria ambiente nei bar! D'altra parte, la (2.3) rappresenta complessivamente una fonte di energia utilizzata dagli organismi viventi, uomo

compreso. All'interno delle nostre cellule, una complessa rete di reazioni, la cui somma equivale alla (2.3), è catalizzata da più enzimi i quali si occupano di liberare l'energia contenuta nella molecola di saccarosio **quando** e **dove** serve: né troppo velocemente, né troppo lentamente.

COME FA UN ENZIMA AD ACCELERARE LE REAZIONI CHIMICHE?

Gli esseri viventi sono costituiti in larga misura da acqua, quindi le reazioni vitali avvengono tutte in soluzione acquosa, laddove i processi di trasferimento di cariche fra specie chimiche diverse o tra parti diverse della stessa molecola sono relativamente lenti rispetto a reazioni che avvengano alla stessa temperatura ma in fase gassosa. In base alla ben nota teoria **dello stato di transizione**, le reazioni avvengono con formazione di un intermedio dalle caratteristiche non più totalmente riconducibili a quelle del **substrato** (il reagente delle reazioni enzimatiche) ma non ancora a quelle del **prodotto**. L'andamento della reazione può essere seguito in particolari diagrammi recanti in ascissa la coordinata di reazione ed in ordinata l'energia libera di Gibbs in unità arbitrarie (Figura 2.1).

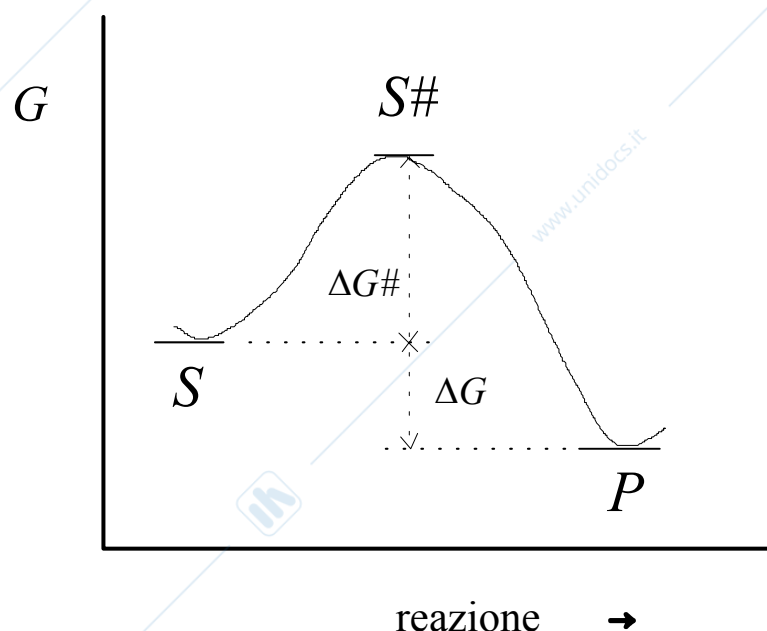


FIGURA 2.1. Livelli energetici di reazione

La reazione procede da sinistra (substrato) a destra (prodotto). Si noti come il composto intermedio di transizione $S^\#$ (detto **attivato** perché è inerentemente

instabile, collocandosi in corrispondenza di un **massimo** di contenuto energetico) sia posto ad un livello superiore sia a S sia a P. Nonostante la spontaneità della reazione, dovuta al $\Delta G < 0$, affinché una molecola di S possa trasformarsi in P, essa dovrà superare la barriera energetica ΔG^\ddagger . Le molecole di S dotate di energia sufficiente a vincere la barriera sono solo un'aliquota del totale. E' ovvio che quanto minore sarà il salto energetico da compiere, tanto più molecole S nell'unità di tempo si trasformeranno in P. La **velocità di reazione** dipende quindi dal ΔG^\ddagger .

La teoria dello stato di transizione postula delle circostanze e da esse trae una formulazione per la velocità di reazione. S'invoca l'equilibrio tra il complesso attivato e lo stato fondamentale:

$$\frac{[S^\ddagger]}{[S]} = K = \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (2.4)$$

Si assume che la frequenza di decomposizione della specie attivata sia quella **vibrazionale** ν del legame che deve spezzarsi. Il contenuto energetico del vibratore molecolare è, in base alla meccanica quantistica:

$$E = h\nu \quad (2.5)$$

e, in base alla meccanica statistica classica:

$$E = kT \quad (2.6)$$

Combinando le due precedenti relazioni, si ottiene:

$$\nu = \frac{kT}{h} \quad (2.7)$$

dove k è la costante di Boltzmann ed h quella di Plank. Viene inoltre assunto che il processo di generazione di P sia lo **stadio controllante** (= il più lento). Quest'atto non può che essere del primo ordine (perché?) e quindi può scriversi la velocità di scomparsa del substrato S in questi termini:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \nu[S^\ddagger] \quad (2.8)$$

Utilizzando la (2.4) e la (2.7) si ha:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right)[S] \quad (2.9)$$

In base alla teoria dello stato di transizione, la costante cinetica del primo ordine vale quindi:

$$k_1 = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad (2.10)$$

I valori caratteristici della frequenza di rottura del legame attivato a 25 °C sono dell'ordine di $10^{12} \div 10^{13} \text{ s}^{-1}$.

L'azione esplicata dagli enzimi abbassa la barriera energetica tra substrato e complesso di transizione. Ciò è essenzialmente conseguenza della formazione di ulteriori legami che stabilizzano il complesso. Viene così reso statisticamente facilitato il superamento della barriera: in media, un maggior numero di molecole S possederà energia sufficiente a valicare il massimo, e la reazione risulta accelerata. E' possibile dare una spiegazione semplicistica ma soddisfacente dei meccanismi molecolari che presiedono alle capacità catalitiche degli enzimi.

La struttura terziaria degli enzimi li configura come proteine **globulari**, per le quali si fa usualmente l'analogia con un gomitolo di lana. Il "gomitolo" trova una sua conformazione termodinamicamente stabile, a cui compete quindi un minimo di contenuto energetico. Esistono una (o più) regioni della molecola proteica, i **siti attivi**, costituiti da 3 a 20 amminoacidi spazialmente vicini (ma non necessariamente contigui nella catena!). La geometria del sito attivo è mantenuta dalle interazioni delocalizzate sull'intera catena polimerica. Volendo semplificare al massimo, si può affermare che le centinaia (o migliaia) di amminoacidi che danno luogo ad un enzima servono fondamentalmente per tenere stabile l'insieme di pochi legami costituenti il sito attivo.

Il sito è cataliticamente attivo perché in grado di "riconoscere" una determinata molecola S la quale si adatta ad una sua parte, in particolare a **tre residui amminoacidici** che con la loro posizione relativa individuano un piano di orientamento nello spazio. Si dà così luogo al **complesso enzima-substrato** (si parla spesso di meccanismo **chiave-serratura**). Le interazioni intermolecolari che s'instaurano delocalizzano cariche ed indeboliscono **selettivamente** i legami che dovranno rompersi affinché si abbia l'atto reattivo. Ciò abbassa la barriera energetica e la reazione risulta accelerata.

DI QUANTO UN ENZIMA PUÒ ACCELERARE UNA REAZIONE CHIMICA?

Le più veloci reazioni in fase acquosa comportano il trasferimento di protoni tra atomi elettronegativi, e sono **controllate dalla diffusione** (sono cioè così rapide da risentire della relativa lentezza con cui il protone “viaggia” in soluzione). La frequenza tipica di queste reazioni ha un limite teorico massimo di $10^{12} \div 10^{13} \text{ s}^{-1}$. Ora, la chimica delle reazioni enzimatiche è quasi completamente chimica delle reazioni del **carbonio**. Poiché il carbonio è poco elettronegativo, le interazioni acido-base fra molecole organiche sono più lente ed il limite massimo di velocità è considerevolmente più basso. Ciononostante, alcune reazioni risultano accelerate alla presenza di enzimi per un fattore di **10^{15}** . Una reazione che normalmente avverrebbe **una volta ogni mille anni** può verificarsi **32000 volte al secondo!** E' usuale caratterizzare le prestazioni di un enzima con il **numero di turnover**, ossia il numero massimo di molecole di S convertite in P per sito attivo e per unità di tempo. Per esempio, l'anidrasi carbonica, che catalizza l'idratazione della CO_2 ad HCO_3^- , ha numero di turnover dell'ordine di 10^6 s^{-1} (un milione di atti reattivi per secondo).

QUALI FATTORI INFLUENZANO L'AZIONE DEGLI ENZIMI?

Uno dei compiti di chi fa **biotecnologia** è proprio studiare i fattori in grado di alterare la velocità delle reazioni biocatalizzate. La velocità di una reazione enzimatica dipende da vari fattori, e certamente dalla **concentrazione** di determinate specie chimiche (**ligandi**) presenti nell'ambiente di reazione:

- **Enzima** (E)
- **Substrato** (S)
- **Prodotto** (P)
- **Inibitori** (I)
- **Attivatori** (A)

Non sempre queste sostanze, il cui effetto verrà studiato in dettaglio, sono tutte presenti nel mezzo di reazione. Un'ulteriore specie chimica gioca un ruolo basilare nel modulare l'attività degli enzimi: lo ione H_3O^+ , che determina il:

- pH del mezzo

Tutte le reazioni chimiche sono poi influenzate dalla:

- Temperatura dell'ambiente di reazione

e le reazioni catalizzate dagli enzimi non fanno certo eccezione.

Infine, vi è un ulteriore fattore che non è possibile individuare univocamente ma che possiamo indicare sotto il nome generico di:

- Ambiente di reazione

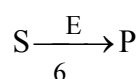
La moderna tecnologia enzimatica consente di far avvenire le reazioni in ambienti non convenzionali, le cui caratteristiche chimico-fisiche sono cioè lontane da quelle usualmente presenti nelle cellule viventi. Ciò si dimostrò un potente mezzo per "spingere" i processi verso reazioni usualmente non significativamente catalizzate, ottenendo dagli enzimi prestazioni fino a pochi anni fa impensabili.

L'individuazione qualitativa dei fattori in grado di influenzare la velocità delle reazioni enzimatiche non è però sufficiente per un utilizzo tecnologico dei biocatalizzatori. Infatti, per gli scopi applicativi si renderà necessario pervenire al **meccanismo cinetico**, cioè all'individuazione delle reazioni elementari attraverso cui si esplica l'azione degli enzimi. Si dovrà poi calcolare il valore delle **costanti cinetiche**, pervenendo così ad **equazioni cinetiche costitutive** che consentano di prevedere qualitativamente e quantitativamente la velocità delle reazioni enzimatiche.

Queste equazioni andranno poi impiegate nei **bilanci di materia nei reattori enzimatici**, al fine di sviluppare un'**ingegneria delle reazioni biochimiche** tesa ad un razionale sfruttamento delle caratteristiche tecnologicamente interessanti degli enzimi.

2.2) I primi modelli: l'equazione di Henri

Una reazione enzimatica può essere genericamente indicata con la:



(2.10)

La prima equazione cinetica costitutiva per la (2.10) data 1908, allorquando Henri osservò che: **i) la velocità iniziale di reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima; ii) la velocità iniziale di reazione cresce al crescere della concentrazione di S, ma non è ad essa direttamente proporzionale, poiché tende ad un valore limite.**

Tutti gli esperimenti noti di cinetica enzimatica condotti fino ad allora davano il risultato sintetizzato nella Figura 2.2.

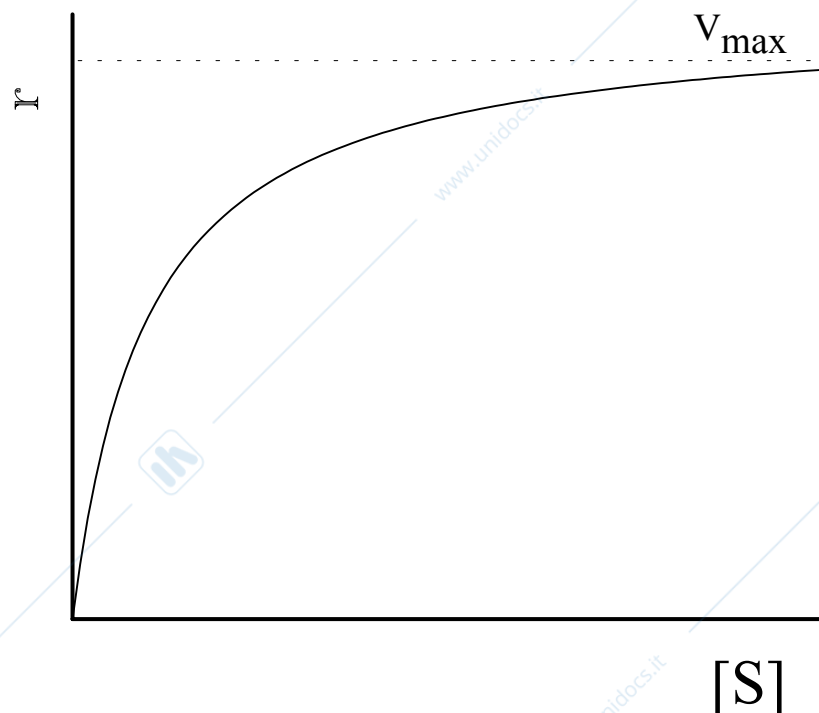
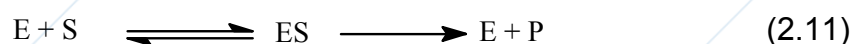


FIGURA 2.2. Dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di substrato. Henri dedusse da questo comportamento che le reazioni enzimatiche non sono **elementari**, ma avvengono piuttosto attraverso più stadi: il meccanismo di reazione è cioè **complesso**. Inoltre, basandosi anche sull'osservazione dell'elevatissima specificità degli enzimi per i loro substrati, egli correttamente predisse l'esistenza di un complesso enzima-substrato (ES) e teorizzò il seguente **schema di reazioni**:



L'equazione di Henri si scrive:

$$r = \frac{k_p [S]}{1 + \frac{[S]}{K}} \quad (2.12)$$

Dove:

r	velocità istantanea di formazione di P	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$
k_P	costante di dissociazione di ES a P	s^{-1}
K	una costante tipica dell'enzima	$\mu\text{mol cm}^{-3}$

2.3) La formalizzazione del rapido equilibrio: equazione di Michaelis e Menten

Dieci anni più tardi Michaelis e Menten confermarono i risultati sperimentali di Henri e proposero un'equazione cinetica leggermente modificata:

$$r = \frac{k_P [E]_t [S]}{K_S + [S]} \quad (2.13)$$

dove, posto $V_{\max} = k_P [E]_t$, (con $[E]_t$ = concentrazione **totale** di enzima) risulta evidente la tendenza alla **saturazione** espressa qualitativamente in Figura 2.2: per $[S] \gg K_S$, la (2.13) correttamente predice che r tende all'asintoto orizzontale di equazione $r = V_{\max}$. La (2.13) è nota come **equazione di Michaelis e Menten** e rappresenta il cardine della cinetica enzimatica: esistono equazioni costitutive diverse e più complesse e sono correntemente usate, ma la (2.13) esprime la legge cinetica più comunemente seguita dalla maggioranza dei più di **1500** enzimi noti a tutt'oggi.

La possibilità di derivare la (2.13) riposa su **sette** assunzioni:

1. E è un catalizzatore;
2. E ed S reagiscono **rapidamente** per dare il complesso ES;
3. Esiste un solo S ed un solo ES che si dissocia **direttamente** per dare P;
4. E, S ed ES sono **all'equilibrio** ;
5. **[E] << [S]** ;
6. Lo **stadio controllante** è la dissociazione di ES per dare E e P;
7. **Assenza** di reazione **inversa** nella (2.10).

Verrà nel seguito formalizzata una procedura generale attraverso la quale è possibile pervenire in modo sistematico alla formulazione di equazioni costitutive in accordo con un determinato meccanismo di reazione. Essa è di fondamentale

importanza, perché fornisce delle linee guida per la scrittura di equazioni corrette anche in presenza di meccanismi di reazione più complessi.

Prima di introdurre la procedura, occorre enfatizzare il significato dell'ipotesi di **rapido equilibrio** sulla quale si basa la formulazione di Michaelis-Menten. La formazione del complesso ES a partire dai ligandi liberi è molto veloce. Affermare che le tre specie E, S ed ES sono all'equilibrio significa ammettere una situazione **dinamica** e non statica. La reazione di associazione procede ad eguale velocità sia da sinistra a destra sia viceversa, ed il risultato **netto** è che nulla cambia. Ciò è rigorosamente vero solo se esiste un'unica via dissociativa per ES: quella che riporta ad E e S separati. Nello schema (2.11), però, esiste una seconda via **in parallelo** per la dissociazione di ES: la liberazione di una molecola P (atto **produttivo**). Ora, se questa seconda via venisse percorsa da ES con frequenza comparabile all'altra, non necessariamente l'equilibrio postulato rimarrebbe indisturbato. Non si potrebbe cioè ritenere sempre e comunque valida la relazione d'equilibrio:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.14)$$

Si avrebbe così un equilibrio distorto, in cui le concentrazioni delle tre specie coinvolte non necessariamente soddisfacerebbero la (2.14) in ogni istante. Se però si ammette che l'atto produttivo (ramo destro della **maglia di reazione**) avvenga con frequenza molto minore delle due reazioni a sinistra, allora la (2.14) sarà ancora valida: le specie E ed S spenderanno cioè la maggior parte del tempo ad effettuare i due passaggi improduttivi di associazione e dissociazione, e solo saltuariamente una molecola ES genererà prodotto. È chiaro che in queste condizioni la velocità con cui si osserva la comparsa del prodotto nell'ambiente di reazione sarà proprio quella di questo stadio lento (stadio controllante, appunto).

Ciò premesso, il formalismo per la costruzione delle equazioni cinetiche può così essere enunciato:

1) **Scrivere la maglia di reazioni**



2) **Scrivere la conservazione**

(bilancio di materia) per l'enzima

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

3) Esprimere la velocità dello stadio controllante

$$r = k_p[ES]$$

4) Dividere a destra ed a sinistra del segno "=" per $[E]_t$

$$r/[E]_t = k_p[ES]/([E] + [ES])$$

5) Esprimere le specie contenenti l'E in funzione di [E]

$$[ES] = ([E][S])/K_s$$

5) Sostituire nell'espressione cinetica

$$\frac{r}{[E]_t} = \frac{k_p[E]\frac{[S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s}} \quad (2.15)$$

L'equazione (2.15) può essere semplificata per dare la classica legge di Michaelis-Menten:

$$r/V_{\max} = \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.16)$$

universalmente nota in questa forma. Il K_m al denominatore è detto **costante di Michaelis** in onore dello scienziato. E' importante sottolineare che, in base alla trattazione del rapido equilibrio, K_m (che ha le dimensioni di una **concentrazione**) è la **costante dell'equilibrio di dissociazione del complesso ES**.

Si osservi che l'aliquota di molecole di E statisticamente impegnate nel complesso ES dipende dal valore di [S]. Infatti, il rapporto fra enzima libero ed enzima totale vale:

$$\frac{[E]}{[E]_t} = \frac{[E]}{[E] + [ES]} = \frac{K_m}{K_m + [S]} \quad (2.17)$$

e quindi il complemento ad uno rappresenta quanto cercato:

$$\frac{[ES]}{[E]_t} = 1 - \frac{[E]}{[E]_t} = \frac{[S]}{K_m + [S]} = \frac{r}{V_{\max}} \quad (2.18)$$

Si comprende ora il significato del fenomeno di saturazione: in base alla (2.18), al crescere di $[S]$ il rapporto r/V_{\max} tende ad uno e la velocità di reazione osservata al valore asintotico, allorquando praticamente tutte le molecole di E risultano complessate.

2.3) L'equazione di Van Slyke

E' interessante osservare cosa accade se si rimuove l'ipotesi 4) fra i postulati necessari alla definizione dell'espressione cinetica. Il modo più drastico di allontanare dalle condizioni di equilibrio le tre specie chimiche S, E ed ES è considerare la reazione di associazione irreversibile. Ciò modifica la maglia di reazione:



Una tale schema fu ipotizzato nel 1914 da Van Slyke a seguito di lavori sperimentali sull'**ureasi**. Si tratta di due reazioni irreversibili in serie: il tempo occorrente per la reazione globale (generazione di P a partire da S) è quindi la somma dei tempi caratteristici dei due passaggi reattivi. Il tempo caratteristico della prima reazione non è univoco, poiché essa è del **secondo ordine**, ma dipende da $[S]$, essendone inversamente proporzionale; il tempo caratteristico del secondo stadio, che è una reazione del **primo ordine**, è l'inverso della frequenza caratteristica (k_p) ed è una costante tipica di ES:

$$t_R = \frac{1}{k_1[S]} + \frac{1}{k_p} = \frac{k_p + k_1[S]}{k_1 k_p [S]} \quad (2.20)$$

La velocità di reazione (moli di S convertite per minuto per cm^3) si ottiene dividendo $[E]_t$ per t_R :

$$r = \frac{k_1[E]_t k_p [S]}{k_p + k_1[S]} \quad (2.21)$$

Quest'ultima equazione si riconduce a quella di Michaelis e Menten dividendo numeratore e denominatore per k_1 . La costante che comparirà a denominatore, che ancora una volta ha le dimensioni di una concentrazione, non ha però lo stesso **significato fisico** del K_m . Infatti, mentre nella trattazione di Michaelis e Menten essa è una vera e propria costante di un equilibrio chimico, nelle ipotesi di Van Slyke essa assume il senso di **rapporto tra due costanti cinetiche**.

2.4) La trattazione dello stato quasi stazionario

La sistematizzazione più generale possibile dell'equazione costitutiva cinetica si ebbe nel 1925 ad opera di Briggs e Haldane, i quali pervennero ad una trattazione che non richiedeva né l'equilibrio (Michaelis-Menten) né la totale irreversibilità (Van Slyke). Briggs ed Haldane osservarono che si poteva ammettere che [ES] crescesse nei primissimi istanti di contatto tra enzima e substrato (ordine di grandezza dei millisecondi) fino a portarsi ad un valore massimo che, pur non mantenendosi costante nel tempo decrescesse con continuità ma quasi impercettibilmente, sicché fosse possibile porre:

$$\frac{d[ES]}{dt} \cong 0 \quad (2.22)$$

Questa posizione, nota come ipotesi di stato **quasi stazionario**, stabilisce solo che la velocità di formazione del complesso ES è circa pari alla velocità di scomparsa. La Figura 2.3 rappresenta qualitativamente l'andamento nel tempo delle concentrazioni di tutte le specie presenti in un ambiente di reazione, a partire dall'istante iniziale, in cui si mettono a contatto E ed S alle concentrazioni rispettivamente $[E]_t$ e $[S]_0$.

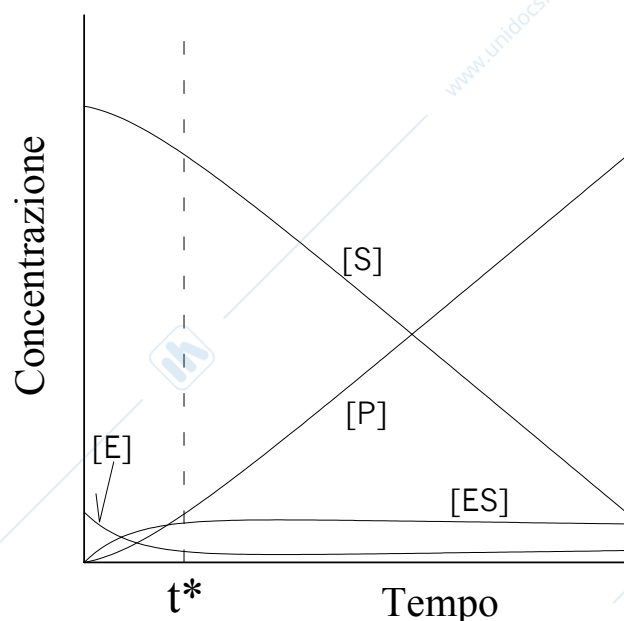


FIGURA 2.3. Andamento delle concentrazioni nel tempo

Nel diagramma t^* rappresenta il tempo di messa a regime entro il quale il complesso raggiunge lo stato quasi stazionario. Si osservi che per necessità rappresentative la Figura non è in scala corretta né sulle ascisse ($t^* \cong 1 \text{ ms!}$) né sulle ordinate ($[E]_{t \ll [S]_0}$). Negli ultimi venti anni, tecniche sperimentali molto sofisticate hanno consentito di seguire le specie chimiche nei tempi brevissimi, confermando gli andamenti di Figura 2.3. La teoria dello stato quasi-stazionario rappresenta quindi l'interpretazione più generale dei fenomeni cinetici e, come si vedrà, gli altri due approcci modellistici rappresentano dei casi particolari di questa.

Per quanto riguarda la derivazione matematica dell'equazione, la maglia di reazioni è ovviamente sempre la (2.11). Poiché la specie ES si forma per effetto della reazione di costante k_1 e scompare per effetto delle due reazioni di costanti k_{-1} e k_P , si pone:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_P)[ES] \cong 0 \quad (2.23)$$

L'ipotesi di stato quasi stazionario consente con ottima approssimazione di affermare che esiste la seguente relazione fra le specie coinvolte:

$$k_1[E][S] = \frac{(k_{-1} + k_P)}{k_1} = K_m \quad (2.24)$$

Il formalismo di costruzione dell'equazione costitutiva è fatto salvo, quindi si perverrà alla stessa equazione ma con un ulteriore significato da attribuire alla costante K_m : quello, più generale, stabilito dalla (2.24). La costante di Michaelis è vista ora come rapporto tra una somma di costanti cinetiche ed un'altra costante cinetica. Se risulta $k_{-1} \gg k_P$: la dissociazione verso E e S liberi è molto più veloce di quella produttiva, vigono le ipotesi di rapido equilibrio, ed al numeratore dell'espressione del K_m si può trascurare k_P . La costante di Michaelis è quindi una costante di equilibrio. Se invece risulta $k_{-1} \ll k_P$: la dissociazione produttiva è così rapida da rendere praticamente irreversibile la reazione di formazione di ES e la costante di Michaelis assume il senso di rapporto tra costanti cinetiche, valendo le ipotesi di Van Slyke. E' chiaro che esisteranno enzimi il cui comportamento è più vicino all'una od all'altra delle trattazioni limite, ma il modello dello stato quasi-stazionario è in grado di descrivere il comportamento di tutti.

2.5) Le proprietà della legge cinetica

Si faccia ancora riferimento alla Figura 2.2 ed all'equazione (2.16): nel piano cartesiano ($[S]$, r) abbiamo un'iperbole rettangola di asintoti $r = V_{\max}$ e $[S] = -K_m$. Di essa rappresentiamo ovviamente solo il tratto di ramo compreso nel primo quadrante, essendo prive di senso fisico le concentrazioni negative.

Se nella (2.6) si pone $[S] = K_m$, si ottiene $r = V_{\max}/2$. Si ha quindi il seguente significato fenomenologico del K_m : rappresenta il valore di $[S]$ in corrispondenza del quale si osserva una velocità di reazione pari alla metà di quella massimale. Si osserva dalla Figura 2.2 che $dr/d[S]$ non è costante, ma assume il valore massimo per $[S] = 0$, decrescendo continuamente al crescere di $[S]$ fino al valore 0 (saturazione). Nella parte di diagramma relativo a piccoli valori di $[S]$, la curva di Michaelis è in buona approssimazione assimilabile ad una retta (pseudo ordine **uno** di reazione); per alti valori di $[S]$, essa è nuovamente assimilabile ad una retta, ma orizzontale (ordine **zero** di reazione). Per valori di $[S]$ intermedi fra quelli estremi, l'equazione costitutiva esibisce curvatura variabile (ordine di reazione **apparente** variabile).

Naturalmente, non ha nessun significato parlare di valori di $[S]$ "piccoli" o "elevati", perché questi concetti assumono sempre significato relativo. Si osservi però che è possibile **adimensionalizzare** l'equazione costitutiva:

$$\frac{r}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (2.25)$$

Si vede facilmente che il parametro importante è non tanto $[S]$ quanto il rapporto $[S]/K_m$: se esso tende a zero, la (2.16) degenera nella:

$$r = \frac{V_{\max}}{K_m} [S] =_1 K [S] \quad (2.26)$$

che è appunto una legge cinetica del primo ordine rispetto alla concentrazione del substrato. Quando invece il rapporto $[S]/K_m$ tende all'infinito, si ottiene:

$$r = V_{\max} \quad (2.27)$$

che è una legge cinetica di ordine zero.

Si ricordi che il termine V_{\max} è costituito in realtà dal prodotto $k_P[E]_t$. La velocità di reazione osservata è dunque **sempre** direttamente proporzionale all'ammontare di enzima presente nell'ambiente di reazione.

Infine, dalle proprietà della legge cinetica discende una circostanza che, per quanto possa apparire banale, va enfatizzata: a parità di biocatalizzatore impiegato, non è possibile accelerare a piacimento una reazione enzimatica aumentando la **forza spingente** $[S]$, poiché V_{\max} costituisce un limite invalicabile. A titolo di esempio, se $[S] = 10K_m$, la velocità di reazione risulta circa il 91% della massima; per avere un aumento di un ulteriore 5% nella velocità occorre raddoppiare la concentrazione di substrato. La "pigrizia" delle reazioni enzimatiche prossime alle condizioni di saturazione costituisce un relativo difetto agli occhi del biotecnologo il quale quasi sempre (ma **non** sempre in assoluto) è interessato a lavorare con reazioni biochimiche che esprimano le più alte velocità possibili.

2.6) Definizioni preliminari per la determinazione delle costanti cinetiche

Il comportamento cinetico di un enzima che segua l'equazione costitutiva di Michaelis e Menten è completamente determinato noti che siano i due soli parametri V_{\max} e K_m . Per essere più precisi, più che V_{\max} occorre determinare la costante k_P , perché l'ammontare di enzima presente nel mezzo di reazione ($[E]_t$) è un parametro operativo su cui si ha usualmente libertà di scelta. Non disponendosi a tutt'oggi di soddisfacenti modelli molecolari predittivi, la determinazione delle due costanti cinetiche va fatta per via **sperimentale, misurando cioè l'effetto di $[S]$ su r** . L'unità di misura usuale per le concentrazioni di substrati e prodotti in cinetica enzimatica è la **millimolarità (10^{-3} M, indicata mM)**; quella per gli enzimi la **micromolarità (10^{-6} M, indicata μ M)**; se ne deduce che fra $[E]$ e $[S]$ c'è **usualmente** un rapporto **1:1000**.

L'unità di misura usuale per la velocità delle reazioni enzimatiche è **l'unità enzimatica internazionale (UE): 1 micromole di substrato convertito per minuto**.

La velocità di reazione r è **volumetrica**: si esprime tipicamente in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. Ne consegue che per calcolare il totale del substrato convertito occorre stimare r e moltiplicarne il valore per il **volume di reazione (V_R)** e per il **tempo di reazione (t_R)**.

2.7) Il metodo differenziale di analisi dei dati

Nella procedura sperimentale più largamente impiegata per le indagini cinetiche si fa uso di reattori **batch** su scala di qualche **mL**. Generalmente si tratta di provette contenenti dai 2 ai 5 mL di soluzione: il termine batch indica che dall'istante iniziale di reazione nulla più entra od esce dal sistema. Supponiamo di avere un tale

reattore contenente una soluzione di concentrazione $[S]_0$ di un certo substrato a determinate condizioni costanti di pH (ottenute con opportuno **tampone**) e temperatura (ottenute mediante **termostatazione**); supponiamo anche che l'ambiente di reazione sia **perfettamente miscelato**, ossia che la concentrazione di nessuna specie chimica in soluzione sia funzione dello spazio: in ogni punto del reattore vigono dunque condizioni di omogeneità. Nell'istante in cui aggiungiamo l'enzima a questo sistema, il biocatalizzatore andrà anch'esso in soluzione e si instaureranno le interazioni descritte in precedenza, con rapida messa a regime quasi stazionario. Se misurassimo $[P]$ e $[S]$ in funzione del tempo, osserveremmo un andamento del tipo indicato in Figura 2.4.

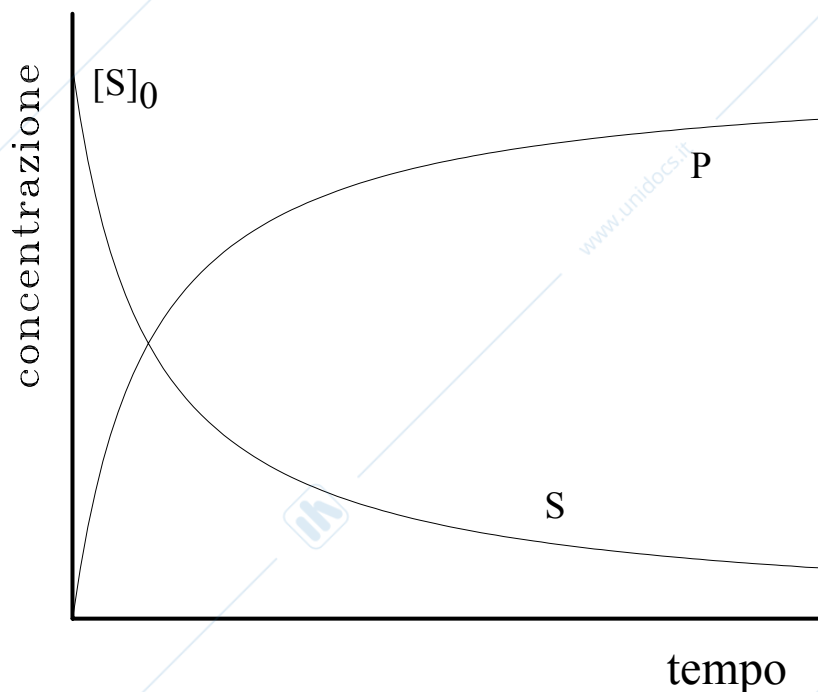


FIGURA 2.4. Andamento delle concentrazioni in un reattore batch

La concentrazione di prodotto è nulla all'istante iniziale, e tende a tempi lunghi ad un valore costante che, se supponiamo la reazione irreversibile e con **stechiometria**

1:1, è pari a $[S]_0$. L'andamento di $[S]$ sarà speculare, dovendosi soddisfare in ogni istante di tempo il bilancio di materia globale:

$$[S]_0 = [S] + [P] \quad (2.28)$$

Se ci si chiede quanto valga la velocità di reazione osservata, la risposta non potrà essere univoca. Per definizione di velocità, infatti, la r è **la variazione di concentrazione di S nel tempo**:

$$r = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (2.29)$$

E' evidente che la derivata della curva $P = P(t)$ nella Figura 2.4 non è costante ma varia da un valore massimo (per $t = 0$) al valore minimo ($r = 0$ per $t \rightarrow \infty$). Consideriamo un certo istante t^* in cui sia $[P] = [P]^*$. Il rapporto:

$$\frac{[P]^*}{t^*} = \frac{([P]^* - 0)}{(t^* - 0)} = r_m \quad (2.30)$$

rappresenta la velocità di reazione **media** nell'arco temporale $0 - t^*$.

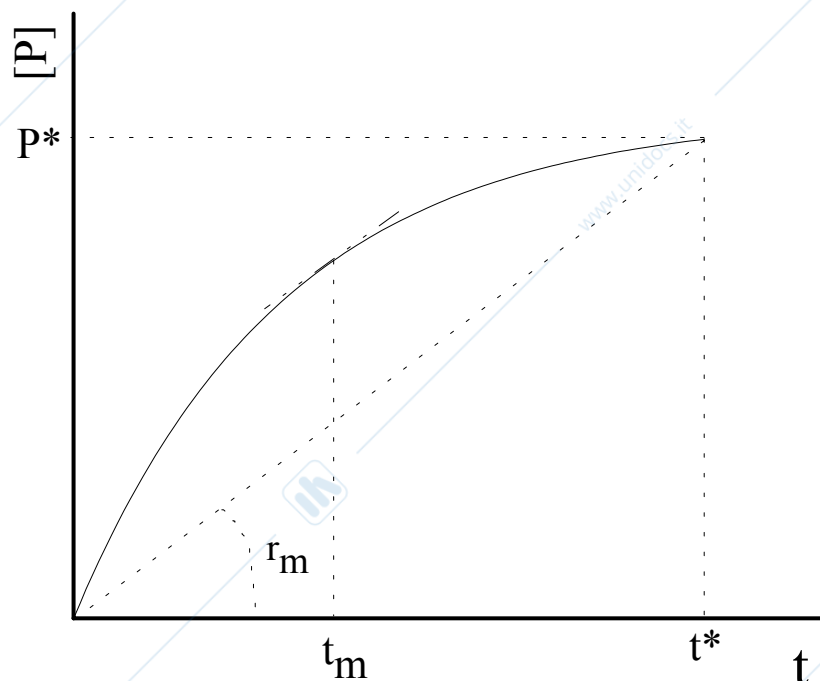


FIGURA 2.5. Determinazione grafica della velocità di reazione

Osservando la Figura 2.5 si può facilmente vedere che la velocità di reazione istantanea r ha assunto, in tale intervallo di tempo, valori sia **maggiori** (per $t < t_m$) che **minori** (per $t > t_m$) rispetto a quella media. Se volessimo misurare allora la velocità di reazione che compete a $[S]_0$ dovremmo far tendere a zero l'intervallo temporale di misura:

$$\lim_{t^* \rightarrow 0} (r_m) = \lim_{t^* \rightarrow 0} \left(\frac{[P]^* - 0}{t^* - 0} \right) = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = r \quad (2.31)$$

ottenendo così ciò che è usualmente indicata con velocità **iniziale** di reazione. Si osservi che per effettuare una tale misura rigorosamente si dovrebbe condurre un esperimento della durata dell'ordine di qualche microsecondo (appena maggiore del tempo di messa a regime del complesso ES). Nella pratica sperimentale ciò non è possibile. Per effettuare una misura attendibile di $[P]$, si cerca allora un compromesso in cui il tempo di reazione sia sufficientemente ampio per dar luogo ad un incremento di concentrazione di prodotto **analiticamente apprezzabile** ma non così tanto da far significativamente variare $[S]$ rispetto al valore $[S]_0$. Quando le variazioni indotte in un sistema da un esperimento per la misura di una sua variabile sono trascurabili, tale misura è detta **differenziale**. Cioè, si sostituisce alla derivata il rapporto incrementale. Si vede anche che per un certo intervallo iniziale la curva si confonde con la tangente nell'origine degli assi. Cioè, se l'esperimento dura fino ad un tempo compreso in tale intervallo, la velocità **iniziale** può stimarsi uguale a quella media ottenuta misurando $[P]$ in corrispondenza di t_R e dividendo poi per t_R .

2.8) La ricerca delle condizioni di linearità

Si è già osservato come la velocità iniziale di una reazione enzimatica sia direttamente proporzionale all'ammontare di enzima presente nell'ambiente di reazione. Si supponga di ripetere l'esperienza in reattore batch del paragrafo precedente varie volte, aumentando via via la concentrazione di enzima e tenendo fisso ogni altro parametro. Si otterrebbero le curve espresse in Figura 7. Infatti, il valore limite di ciascuna curva, parametrica in $[E]t$, è comunque $[P] = [S]_0$ ossia conversione totale del substrato in prodotto. L'incremento di concentrazione di biocatalizzatore altro non fa che aumentare la derivata iniziale della curva. Al procedere della reazione il consumo di substrato produce un abbattimento della derivata perché viene a mancare forza spingente per la reazione e si registra una

perdita di linearità tanto più precoce quanto maggiore è l'ammontare di enzima presente nel reattore.

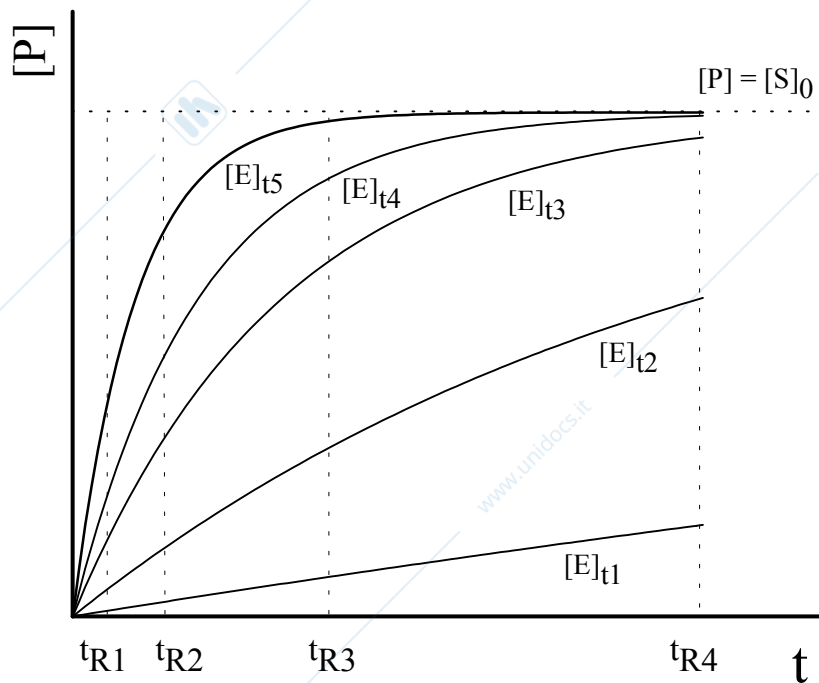


FIGURA 2.6. Effetto della variazione di $[E]_t$.

Si supponga di aver condotto gli esperimenti ai quattro tempi di reazione indicati in Figura 2.6. Riportando i dati ottenuti in funzione di $[E]_t$ parametrizzati in t_R , si otterrebbe la Figura 2.7.

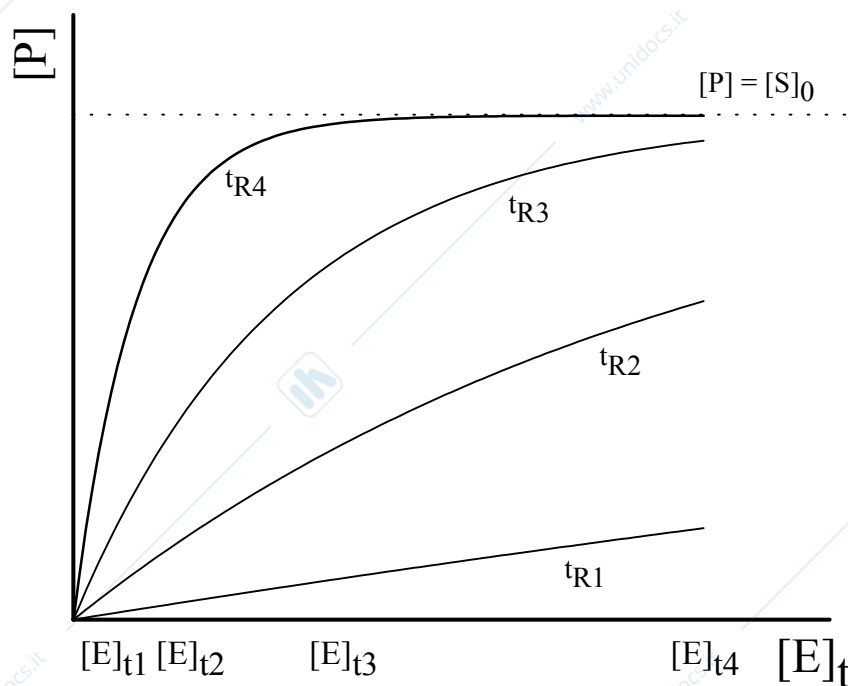


FIGURA 2.7. Formazione di prodotto al variare dell'ammontare di enzima

In altri termini, le condizioni di linearità vanno ricercate sia in funzione del tempo di reazione che della concentrazione di enzima. Il motivo di ciò risiede nel fatto che la linea retta è l'unica curva che coincide con la sua derivata in ogni punto. La stima della velocità di reazione si riconduce alla stima di una derivata, e ciò è più agevole e scevro da errori in presenza di linee rette.

2.9) Determinazione sperimentale di V_{\max} e K_m

La procedura sperimentale per la determinazione dei due parametri cinetici prevede delle misure di velocità iniziale di reazione a varie concentrazioni di substrato ed a parità di ogni altro parametro sperimentale, ammontare di enzima compreso. I dati ottenuti si disporranno sull'iperbole di Michaelis e Menten. Non è però agevole ricavare il valore dei parametri da una tale rappresentazione dei dati: V_{\max} è difficilmente apprezzato perché è un valore asintotico non raggiungibile sperimentalmente e K_m risulta di difficile stima per conseguenza, rappresentando il valore di $[S]$ cui corrisponde $r = V_{\max}/2$. Per ovviare a questa difficoltà, **Lineweaver e Burk** idearono una tecnica di diagrammazione dei dati che fa uso della linearizzazione dell'iperbole. Si consideri il piano $(1/[S], 1/r)$. In esso la curva di Michaelis e Menten ha equazione:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{V_{\max}} + \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} \quad (2.32)$$

La (2.32) rappresenta una retta di **intercetta sull'asse delle ordinate $1/V_{\max}$** e di **pendenza K_m/V_{\max}** , come rappresentato in Figura 2.8, dove con i cerchietti si sono indicati i risultati sperimentali. Ponendo $1/r = 0$ si ricava che **l'intercetta sull'asse delle ascisse vale $1/[S] = -1/K_m$** . I dati sono rappresentati non perfettamente allineati sulla retta tracciata, ad indicare che le misure sono affette da un certo **errore sperimentale**, il quale si ripercuote nell'incertezza sul valore stimato dei due **parametri cinetici**. La retta "tiene conto" di ciò, ed è detta interpolante: si ottiene mediante una **regressione lineare** come la retta che **minimizza la somma dei quadrati delle distanze da essa dei punti sperimentali**. Il piano di Lineweaver-Burk, detto anche dei **doppi reciproci**, è un comodo ausilio per interpretare

immediatamente la qualità dell'esperimento condotto, poiché la tendenza dei dati a disporsi lungo una linea retta è immediatamente percepita dall'occhio umano.

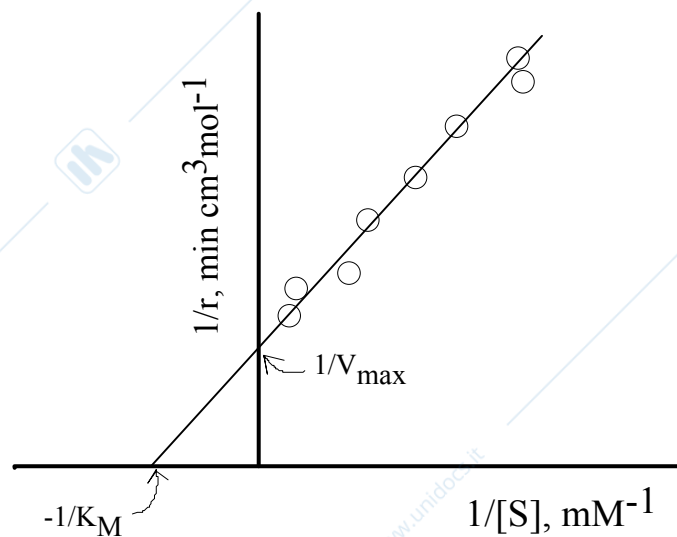


FIGURA 2.8. Il piano di Lineweaver-Burk

L'interpolazione dei dati a mezzo di regressione lineare è un metodo matematico di tipo **esatto**: note le coordinate dei punti, esistono formule **deterministiche** per generare i coefficienti della retta. Sono note anche interpolazioni di tipo non lineare, con le quali la correlazione potrebbe essere condotta direttamente sull'iperbole: si tratta di tecniche il cui risultato dipende dalla convergenza di calcoli iterativi che si arrestano quando lo scarto tra due successive stime dei parametri è minore di un errore prefissato. Le interpolazioni non lineari sono più complesse e soffrono dello svantaggio di fornire risultati fortemente dipendenti dal punto iniziale dei calcoli. Per avviare la procedura di calcolo occorre fornire al programma una stima iniziale del valore dei parametri: quanto più questa è vicina al valore vero, tanto migliore sarà la stima finale dei parametri.

Il piano di Lineweaver-Burk utilizza il reciproco delle variabili sperimentali. Sia la variabile indipendente $[S]$ che quella indipendente, r , sono affette da errore e quando assumono valori contenuti, il loro reciproco tende ad essere elevato. Ciò implica che i punti che si collocano in prossimità dell'angolo superiore destro del piano sono i più imprecisi. Questo aspetto negativo viene sinteticamente indicato dicendo che il piano dei doppi reciproci **dà troppo peso alle basse concentrazioni**. Sono state pertanto proposte tecniche di linearizzazione alternative, generalmente indicate con il nome dei loro inventori. A titolo d'esercizio, il lettore è invitato a "scoprirle" in prima

persona, partendo dall'equazione di Michaelis e Menten e determinando tipo di linearizzazione e relativo diagramma per la rappresentazione dei dati cinetici.

2.10) Effetto del pH

Il pH influenza in maniera marcata l'attività enzimatica, com'è ovvio attendersi poiché gli enzimi esplicano la loro azione naturale in ambienti altamente controllati e regolati. L'effetto della **concentrazione idrogenionica** sull'attività catalitica di un enzima ha generalmente l'andamento qualitativo illustrato in Figura 2.9.

Si ha usualmente una tipica **curva a campana, più o meno simmetrica**, con la presenza di un massimo di attività in corrispondenza del **valore ottimale pH***. L'intervallo di pH in cui si sviluppa l'intera curva è generalmente abbastanza stretto, il che implica che piccole variazioni intorno al valore pH*, anche solo di un unità in più od in meno, si ripercuotono in marcate diminuzioni dell'attività catalitica. Questa estrema sensibilità è un meccanismo di regolazione previsto in natura per comandare le reazioni enzimatiche attraverso variazioni del pH nel **microambiente** interno agli esseri viventi, "accendendo" o "spegnendo" determinate attività.

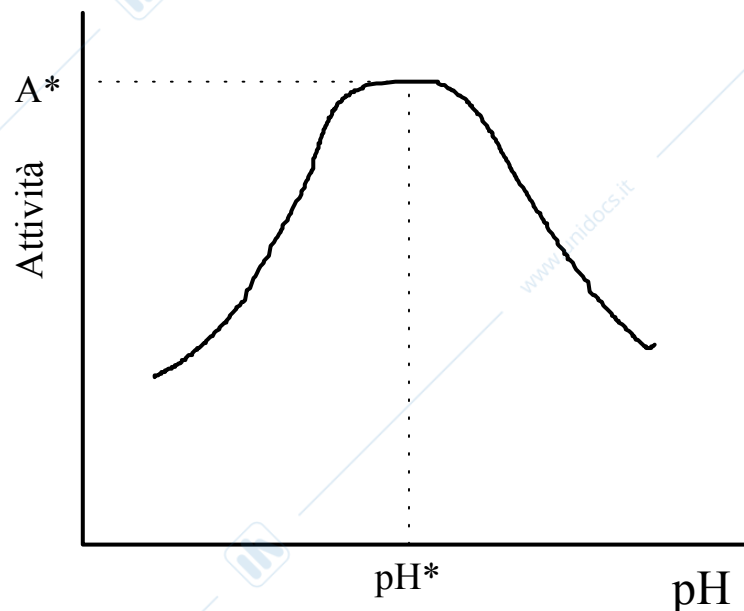


FIGURA 2.9. Andamento dell'attività enzimatica in funzione del pH

Nelle applicazioni biotecnologiche dovrà quindi in generale essere predisposto un ambiente di reazione a **pH controllato** in modo da ottenere il massimo possibile di velocità di reazione compatibilmente con le altre esigenze del processo. Ciò si

ottiene generalmente impiegando soluzioni tamponate, il cui uso induce una spesa di esercizio dovuto all'elevato costo dei prodotti chimici necessari per la loro preparazione. Naturalmente, se il processo sviluppato è ad alto **valore aggiunto**, ovvero la differenza di valore commerciale tra prodotto e substrato è elevata, la spesa per il controllo del pH è ampiamente giustificata. Nei casi in cui questo non fosse vero, si rinuncia spesso all'uso di soluzioni tampone e ci si limita ad intervenire in corso di reazione con piccole aggiunte di acidi o basi per correggere le eventuali deviazioni dal pH scelto.

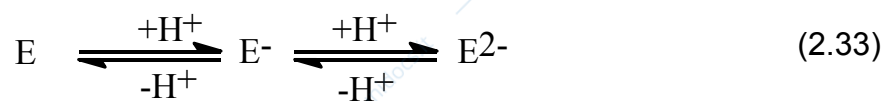
E' evidente che l'impiego tecnologico di un enzima implica la preventiva **caratterizzazione della sua attività in funzione del pH**. Ciò si fa usualmente con indagini cinetiche differenziali del tipo di quelle descritte per la determinazione dei parametri cinetici. Scelte cioè condizioni di saggio lineari, ci si pone ad un $[S]_0 \gg K_m$ e si determina l'effetto del pH su V_{max} (in ultima analisi, sul k_p). Per ottenere l'intera curva a campana spesso bisogna campionare intervalli di pH più ampi di quelli realizzabili con un solo tipo di tampone. Poiché l'attività enzimatica può risultare influenzata anche dal **tipo di ioni** presenti in soluzione, si avrà cura di scegliere i tamponi in modo che i loro rispettivi intervalli di tamponamento si sovrappongano parzialmente, in modo da avere uno o più valori di pH i cui esperimenti sono ripetuti con entrambi i tamponi. Risulterà così possibile la normalizzazione dei dati rispetto ad uno dei due tamponi scelto come riferimento: ad esempio, se a $pH = 4.80$ il tampone "1" dà come risultato in unità arbitrarie di attività A_1 ed il tampone "2" allo stesso pH dà A_2 , tutti i risultati ottenuti con quest'ultimo sono normalizzati rispetto al tampone "1" moltiplicandoli per A_1/A_2 .

Oltre alla procedura sperimentale per ricavare la curva attività-pH, è opportuno conoscere anche una qualche modellazione che spieghi in parte o completamente il comportamento di Figura 2.9. Nella letteratura scientifica sono noti molti modelli, alcuni dei quali tanto complessi da esulare dalle finalità del corso. E' però possibile formularne uno sufficientemente semplice da essere agevolmente trattato ma non così tanto da fornire risposte del tutto inadeguate.

Gli enzimi, come tutte le proteine, esibiscono usualmente una **distribuzione di cariche** sulla molecola il cui valore netto dipende dalle interazioni di equilibrio intermolecolari che si instaurano nel ambiente di reazione. Per ogni proteina, esiste un particolare valore di pH, detto **punto isoelettrico**, in cui la carica netta è nulla: sottoposta ad un campo elettrico, la molecola non tende a migrare. Diminuendo od

umentando il pH rispetto al punto isoelettrico, si otterranno distribuzioni di cariche diverse da zero e di segno opposto. Ora, osservando la Figura 2.9, si nota una certa rassomiglianza della curva in essa rappresentata con quella relativa a due neutralizzazioni acido-base affiancate. Questa circostanza ha dato luogo alla seguente interpretazione dei fenomeni legati al pH.

Si ammette che l'enzima possa esistere sotto tre diverse forme: E^- , a cui compete l'attività, E ed E^{2-} a cui **non** compete attività. In altre parole, acquistando o cedendo un protone, l'enzima E^- perde totalmente la sua attività catalitica. Si ammette che le tre specie siano all'equilibrio:



Dette quindi rispettivamente K_1 e K_2 le costanti del primo e secondo equilibrio di dissociazione, devono risultare verificate le due relazioni:

$$\frac{[H^+][E^-]}{[E]} = K_1 \quad (2.34)$$

$$\frac{[H^+][E^{2-}]}{[E^-]} = K_2$$

oltre che il bilancio globale di materia sull'enzima:

$$[E]_t = [E] + [E^-] + [E^{2-}] \quad (2.35)$$

La frazione di enzima attivo sul totale $Y^- = [E^-]/[E]_t$ può essere scritta in forma compatta utilizzando le relazioni (2.34) - (2.35):

$$Y^- = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (2.36)$$

La (2.36) è nota come **prima funzione del pH di Michaelis** (la seconda e la terza funzione sono analoghe e valgono, con ovvi simbolismi, per Y^{2-} e Y). Derivandola rispetto ad $[H^+]$ ed uguagliando a zero la derivata risulta che Y^- ha un massimo per:

$$[H^+]^* = \sqrt{K_1 K_2} \Rightarrow \log[H^+] = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (2.37)$$

Si è cioè dimostrata l'esistenza di un valore ottimo di pH. Vanno necessariamente osservate alcune peculiarità del modello sviluppato. In primo luogo, siccome le protonazioni sono le più veloci reazioni in soluzione acquosa, gli equilibri (2.33) sono **rapidi rispetto agli atti catalitici** (cfr. paragrafo 2.3). Si può quindi porre:

$$V_{\max} = k_P [E]_t Y^- = \frac{k_P E_t}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (2.38)$$

e correlando V_{\max} in funzione del pH è possibile stimare K_1 e K_2 .

In secondo luogo, il modello attribuisce le variazioni di attività esclusivamente all'effetto del pH su V_{\max} escludendo che esista anche un analogo effetto sul K_m . In realtà questo esiste, ma è di **entità molto modesta**, e può essere quindi trascurato.

Infine, in base al modello sviluppato, la perdita di attività è **reversibile**, oltre che di piccola entità e perfettamente simmetrica rispetto a pH^* (di quest'ultime affermazioni ci si può agevolmente convincere diagrammando la funzione Y^-). In realtà, spesso si osserva che **incubando** per un certo tempo un enzima a pH diversi da quello ottimale, e ripristinando poi il pH^* non si osserva nuovamente l'attività massima: il biocatalizzatore **ricorda** cioè l'insulto subito, e manifesta una disattivazione parzialmente irreversibile. Il fenomeno è tanto più evidente quanto più lontano da quello ottimale è il pH di incubazione. Evidentemente, il modello sviluppato è troppo semplicistico. Esso fornisce una buona interpretazione del comportamento dell'enzima solo per **piccole variazioni nell'intorno del pH^*** . Per variazioni di maggiore entità subentrano altri fenomeni che si sovrappongono a quello modellato e il cui effetto globale risulta nella perdita di attività effettivamente osservata.

2.11) Effetto delle specie ioniche in soluzione

L'attività enzimatica risente anche di effetti dovuti alle specie dissociate presenti nel mezzo di reazione. Il parametro che quantifica le interazioni elettriche proteina-soluzione è la **forza ionica**, espressa dalla:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i M_i Z_i^2 \quad (2.39)$$

dove M_i è la molarità dell' i -ma specie e Z_i la sua carica. Si osservi che stante la definizione di forza ionica non è tanto importante la **concentrazione** degli ioni quanto quella delle **cariche elettriche** in soluzione. A parità di ogni altro fattore, variare I implica alterare l'attività di un enzima, tant'è vero che continuando ad aumentare la forza ionica di una soluzione si può giungere fino a far **precipitare** l'enzima. Questo stato alterato può essere rimosso ripristinando le condizioni di forza ionica a cui il biocatalizzatore risulta solubile. Quindi, qualora si debbano confrontare attività enzimatiche ottenute in ambienti a pH regolato da due diversi tamponi, la soluzione a più bassa I va portata allo **stesso valore dell'altra**, eventualmente aggiungendo sali non tamponanti, ad esempio NaCl o KCl.

2.12) Inibizione dell'attività enzimatica

Si definisce **inibitore** qualsiasi sostanza che, presente nell'ambiente di reazione, è in grado di deprimere l'attività catalitica di un enzima. Il fenomeno dell'inibizione enzimatica è per certi versi simile a quello del cosiddetto **avvelenamento** dei catalizzatori artificiali ma presenta ovviamente delle caratteristiche peculiari dettate dalla natura biologica del catalizzatore enzimatico.

Spesso l'azione inibente di determinate sostanze è molto potente: è sufficiente che l'inibitore sia presente in tracce per bloccare totalmente l'attività catalitica di un certo enzima. Ad esempio, si stima che un microgrammo della tossina del *Clostridium botulinii*, presente in certi cibi in scatola avariati, è sufficiente per uccidere un uomo di 70 kg di peso. Questa forma così letale di avvelenamento, nota come **botulismo**, si spiega col fatto che la tossina è un potentissimo inibitore dell'attività di alcuni enzimi preposti al funzionamento del sistema nervoso. Tra l'altro, ciò dimostra indirettamente l'elevata efficienza dei catalizzatori enzimatici: le complesse reazioni chimiche che devono ordinatamente svolgersi per il corretto funzionamento del sistema nervoso sono catalizzate da enzimi presenti *in vivo* a livelli bassissimi di concentrazione. Una volta bloccate queste poche molecole con poche molecole di inibitore, si ha la crisi di tutto il sistema.

L'inibizione dell'attività enzimatica non ha però solo importanza in patologia e fisiologia, ma riveste grande rilevanza anche per le applicazioni biotecnologiche. Infatti, se si desidera realizzare determinate trasformazioni mediante la catalisi enzimatica, occorre preventivamente accertarsi dell'eventuale presenza di inibitori nell'ambiente di reazione e, se è il caso, rimuoverli. Il fenomeno si traduce in una riduzione della velocità di reazione e va quindi adeguatamente compreso, modellato e quantificato. E' compito tipico dell'ingegneria delle reazioni biochimiche utilizzare equazioni cinetiche costitutive per la predizione degli effetti inibitori, ed esistono interi

libri sull'argomento e dozzine di equazioni diverse, alcune molto complesse. Nel seguito si studieranno esclusivamente i meccanismi di inibizione dell'attività enzimatica più comuni, gettando le basi metodologiche per poter eventualmente affrontare casi più complessi qualora ciò si dovesse rendere necessario. Ci si occuperà di inibizioni reversibili, in cui l'inibitore è un ligando reversibile: rimuovendolo dall'ambiente di reazione si ripristina totalmente l'attività catalitica che si registrava in sua assenza.

a) Inibizione competitiva

In questo meccanismo d'inibizione il substrato S e l'inibitore I competono per legarsi all'enzima e sono **mutuamente esclusivi**: se E forma il complesso con S, I non può legarsi a sua volta; se E forma complesso con I, S non può a sua volta legarsi. Questo quadro può essere dovuto a diversi casi, illustrati in Figura 11.

1. I e S competono per lo stesso sito catalitico;
2. I ha un suo sito specifico, ma genera ingombro sterico per S e viceversa;
3. I e S competono per un sito secondario non attivo;
4. Il sito secondario è distinto ma c'è sovrapposizione;
5. I si lega ad un solo sito distinto, ma distorce la forma di quello di S e viceversa.

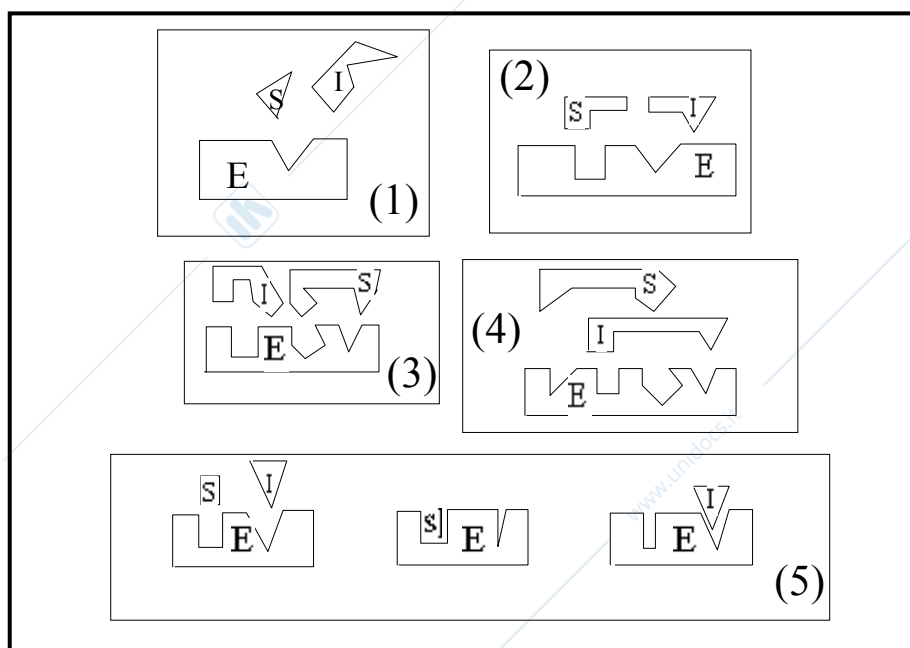
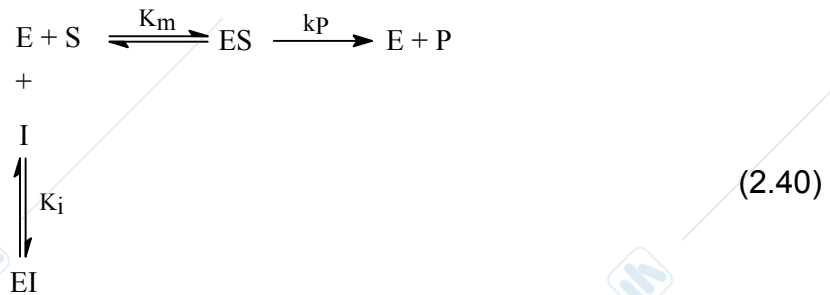


FIGURA 2.10. Possibili casi di inibizione competitiva

Quale che sia la situazione a livello molecolare il risultato pratico è sempre lo stesso: **se si lega I, non può farlo S e viceversa**. In base a questa descrizione fenomenologica è abbastanza semplice scrivere la maglia di reazioni del meccanismo competitivo. Una molecola di E ha **due vie in parallelo** mutuamente esclusive per formare complessi: con I e con S; solo il complesso ES è in grado di generare P.



L'equilibrio di dissociazione del complesso improduttivo EI è retto dalla **costante di inibizione** K_i , la quale stabilisce una relazione fra le specie chimiche coinvolte:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2.41)$$

Naturalmente la formazione del complesso produttivo ES continua ad essere regolata dalla costante di Michaelis:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.42)$$

E' opportuno osservare che in biochimica è d'uso scrivere gli equilibri come **dissociazioni: ciò significa che maggiore è una costante, minore è la tendenza dell'enzima a formare il complesso da essa regolato**. Ciò si applica anche al K_m : un alto valore di questa costante significa che l'enzima ha **bassa affinità per il substrato e viceversa**. In quest'ottica, piccoli valori della costante d'inibizione implicano alto potere inibente. Per esempio, una K_i dell'ordine del μM significa che statisticamente solo circa 1 molecola di enzima su 1000 non è impegnata a formare il complesso EI ed è quindi disponibile per l'atto catalitico.

Studiando la maglia di reazioni (2.40) possono essere dedotte le caratteristiche dell'inibizione competitiva. La velocità di reazione osservata deve essere **sempre** direttamente proporzionale ad $[ES]$. La presenza di I sottrae enzima alla formazione del complesso produttivo e quindi, correttamente, la velocità di reazione inibita risulta minore di quella non inibita: $r_i < r$. Inoltre, ad un certo $[I]$ costante, più $[S]$ aumenta più l'enzima viene "spinto" ad associarsi verso destra nella maglia superiore ed $[E]$ tende a diminuire. Conseguentemente, per soddisfare la (2.41), parte di EI dovrà dissociarsi rilasciando altro enzima in forma libera. Se ne deduce che al crescere di $[S]$ gli effetti inibitori tendono a diminuire:

$$\lim_{\frac{[S]}{K_m} \rightarrow \infty} (r_i) = V_{\max} \quad (2.43)$$

L'equazione costitutiva cinetica che si deve ricavare per il meccanismo competitivo dovrà ovviamente soddisfare queste osservazioni. Si noti che il

formalismo stabilito per l'ottenimento dell'equazione di Michaelis-Menten è ancora valido. La differenza consiste nel passo 4), in cui al denominatore del secondo membro compare ora un complesso enzimatico in più:

$$\frac{r}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES] + [EI]} \quad (2.44)$$

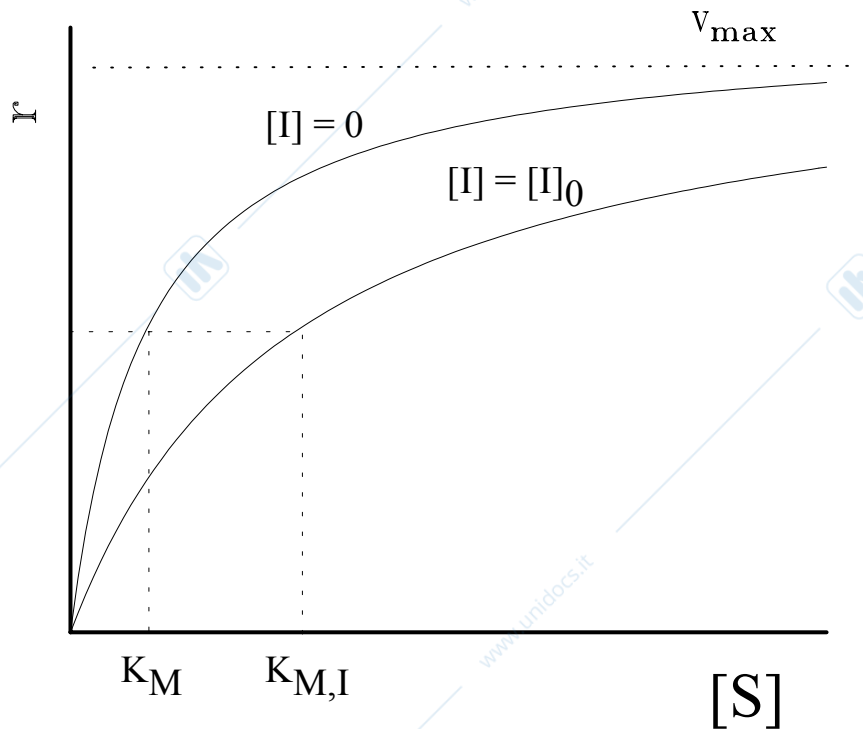
Ma è anche vero che la (2.41) fornisce una relazione in più fra le concentrazioni delle specie coinvolte che, in definitiva, possono ancora esprimersi tutte in funzione di [E] secondo il passo 5) della procedura. Si ottiene:

$$\frac{r}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_i}} \quad (2.45)$$

e, riarrangiando i termini, si giunge all'equazione cinetica costitutiva dell'inibizione competitiva:

$$r = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (2.46)$$

Si vede agevolmente che per $[S] \gg K_m$ la (2.46) tende all'asintoto $r = V_{\max}$ come la curva non inibita. Per qualunque $[I] > 0$, il denominatore dell'equazione è maggiore del corrispondente denominatore della Michaelis-Menten, per cui la curva giace sempre al disotto di quella non inibita. Inoltre, si consideri il termine $K_m(1+[I]/K_i)$: esso rappresenta un K_m apparente il cui valore è tanto maggiore quanto maggiore è [I]. **La presenza di un inibitore competitivo abbassa dunque l'affinità apparente dell'enzima verso il suo substrato.** L'andamento qualitativo di $r([S])$ è rappresentato in Figura 2.11.

FIGURA 2.11. Andamento di r nell'inibizione competitiva

Infine, si può definire un'**aliquota d'inibizione**:

$$i = 1 - \frac{r_I}{r} \quad (2.47)$$

che ovviamente assume valore unitario per inibizione totale e zero per totale assenza d'inibizione. Si vede facilmente che in questo caso risulta:

$$i = \frac{\frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S]}{K_m}} \quad (2.48)$$

Cioè, come atteso, l'aliquota d'inibizione competitiva dipende non solo dal valore del rapporto $[I]/K_i$, ma anche dal grado di saturazione $[S]/K_m$. Val la pena di ribadire che la velocità di una reazione enzimatica non è determinata tanto dalle concentrazioni dei ligandi in sé, quanto dal loro **rapporto** con la relativa costante di dissociazione.

Per la caratterizzazione cinetica di un enzima inibito competitivamente occorre determinare, oltre alle consuete due costanti V_{\max} e K_m , **una terza costante**, K_i . Qualsiasi forma di correlazione lineare di dati sperimentali, però, consente la determinazione di **due sole** costanti, perché due sono i coefficienti dell'equazione cartesiana della retta. E' evidente che gli esperimenti cinetici potranno condursi

ancora con le consuete tecniche differenziali ma andranno ripetuti più volte, variando $[I]$ da zero ad un valore massimo. In altre parole, si ripeterà la metodica per la determinazione sperimentale del K_m in presenza di diversi livelli di concentrazione di inibitore. Per quanto detto in precedenza, il valore di V_{max} ottenuto sarà sempre lo stesso, mentre il K_m apparente aumenterà al crescere di $[I]$. Nel piano dei doppi reciproci i dati tenderanno a disporsi secondo quanto illustrato dalla Figura 2.12, a).

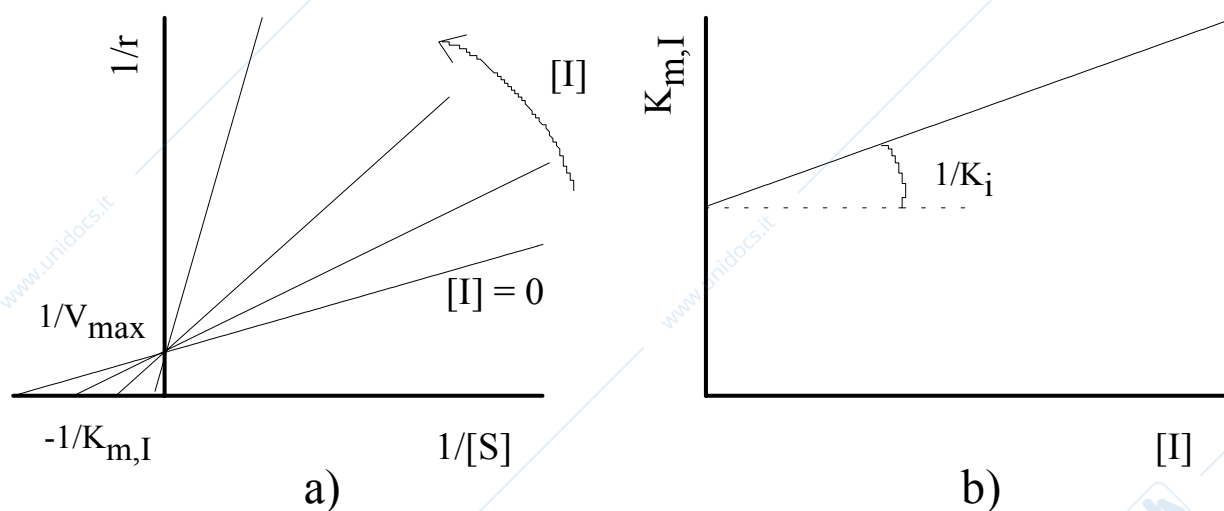
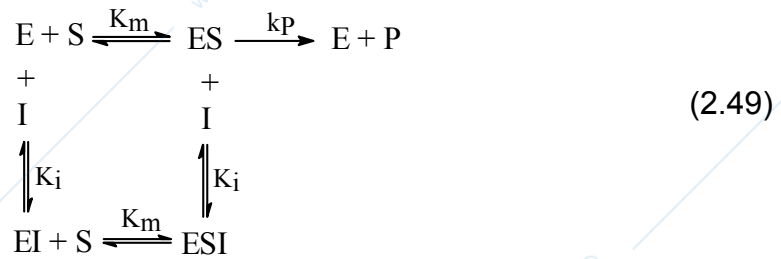


FIGURA 2.12. Inibizione competitiva: determinazione delle costanti cinetiche

Si otterrà cioè un **fascio di rette** di centro $(0, 1/V_{max})$ e parametriche in $[I]$. L'intercetta sul semiasse negativo delle ascisse dipenderà da $[I]$. Effettuando una seconda diagrammazione del K_m apparente come funzione di $[I]$ e correlando i dati, sarà evidentemente possibile calcolare K_i (Figura 2.12, b).

b) Inibizione non competitiva

In questo meccanismo, se I si lega per primo ad E , EI può formare, legando S , un complesso **ternario** EIS . specularmente, se S si lega ad E per primo, può aversi il complesso ternario ESI . In realtà esiste un solo tipo di complesso ternario; la diversa sequenza in cui compaiono le lettere nella sigla che lo designa sta solo ad indicare per quale via esso si è formato. A livello molecolare, si può ammettere che S ed I trovino sulla molecola enzimatica due siti diversi, per i quali non competono né si ostacolano. La natura non produttiva di ESI è allora dovuta al fatto che le interazioni che insorgono all'atto della formazione del complesso fra le tre specie chimiche non consentono la generazione di prodotto. In questo meccanismo di inibizione, **l'affinità dei complessi binari per l'altro ligando è identica a quella dell'enzima libero**. In altre parole, le interazioni fra complesso binario e terzo ligando sono rette dalle stesse costanti d'equilibrio. Tutto ciò si traduce nello schema di reazioni:



Vigeranno ora **quattro** relazioni tra le concentrazioni delle specie coinvolte nella rete di reazioni:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \quad (2.50)$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Dallo schema (2.49) si vede facilmente che per un certo [I], l'enzima **non può** essere spinto ad associarsi come ES aumentando la concentrazione di substrato cosa invece possibile per l'inibizione competitiva. Il che significa che **V_{max} alla presenza di inibitore è minore che in sua assenza ed è tanto minore quanto maggiore è [I]**. Inoltre, poiché le due forme E ed EI hanno per definizione la stessa affinità verso S, il **K_m deve rimanere invariato** rispetto a quello che si registrerebbe in assenza di inibitore. Questa fenomenologia è illustrata dalla Figura 2.13.

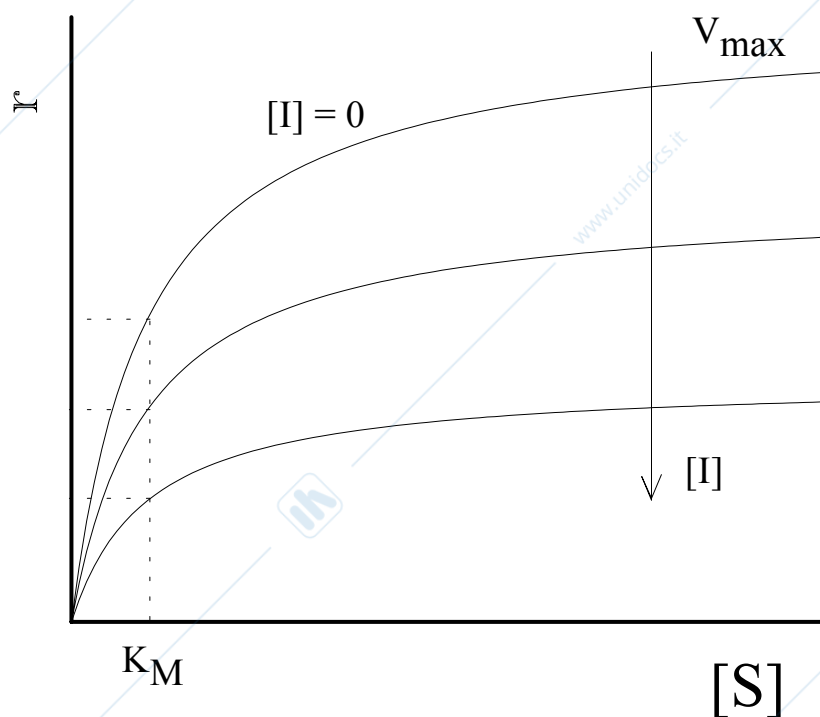


FIGURA 2.13. Inibizione non competitiva: andamento di r

Si osservi che a parità di concentrazione di substrato, il rapporto tra le ordinate della curve non inibita ed inibita è costante. Cioè, l'aliquota di inibizione **non dipende** da $[S]$, ma solo da $[I]$. L'effetto di un inibitore non competitivo è che in sua presenza una **parte costante dell'ammontare totale di enzima è sottratto alla catalisi**. Ora, anche una qualsiasi sostanza che **irreversibilmente si leghi ad E inattivandone un'aliquota** ha lo stesso effetto. Com'è dunque possibile distinguere se una determinata sostanza è un inattivatore irreversibile od un inibitore non competitivo? Si consideri la Figura 2.14 che rappresenta delle misure di V_{\max} in funzione di $[E]_t$: poiché $V_{\max} = k_p[E]_t$, i risultati relativi ad assenza della sostanza sono rappresentati dalla retta a) passante per l'origine e di pendenza k_p . Se la sostanza è un inibitore non competitivo, si avrà la retta b), di pendenza minore e pari a $(1-i)k_p$. Se invece siamo alla presenza di un inattivatore, si avrà la retta c), in cui non si osserva affatto reazione fino a che l'ammontare di enzima aggiunto al sistema non consenta di legare tutte le molecole della sostanza. Da quel punto in poi la pendenza sarà uguale al caso a) perché tutto l'inattivatore è stato **sequestrato** dall'enzima aggiunto in precedenza ed inattivatosi.

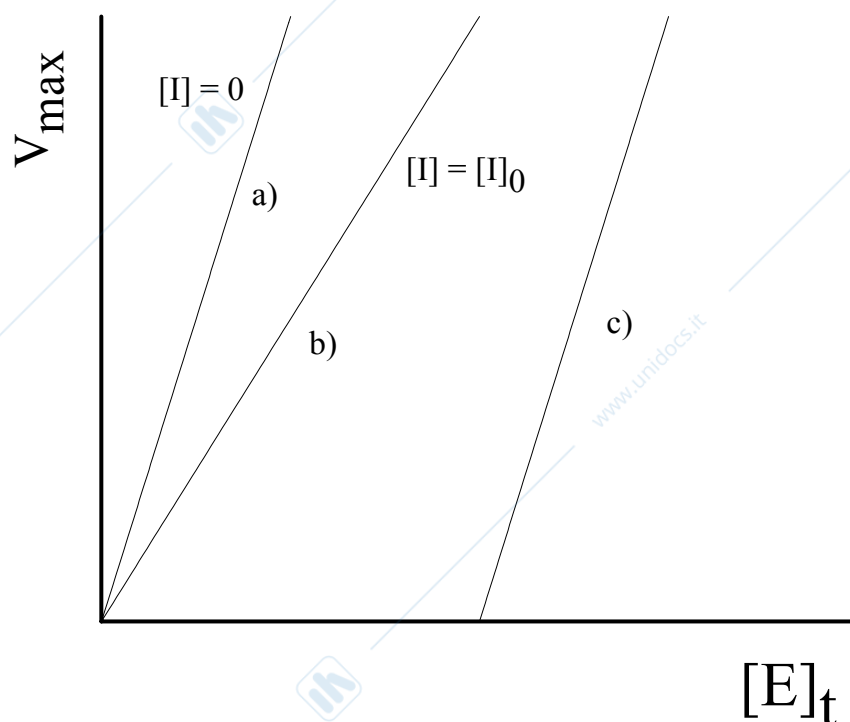


FIGURA 2.14. Discriminazione tra inibitore non competitivo e inattivatore

Per quanto riguarda l'equazione cinetica costitutiva dell'inibizione non competitiva, essa è rapidamente determinata con le consuete tecniche:

$$\frac{r}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES] + [ESI]} \quad (2.51)$$

con rapidi passaggi che si lasciano al lettore per esercizio, si ottiene infine:

$$r = \frac{V_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (2.52)$$

La presenza di un inibitore non competitivo non altera il valore del K_m . Infatti, la (2.52) può essere posta nella forma:

$$\frac{r}{V_{\max, I}} = \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.53)$$

dove $V_{\max, I} = V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$. Poiché il secondo membro della (2.53) è di tipo Michaelis-Menten, si è dimostrato che il solo parametro affetto dalla presenza dell'inibitore risulta V_{\max} .

Stante questa fenomenologia, nel piano di Lineweaver-Burk si otterrà un fascio di rette di centro $(-1/K_m, 0)$ e parametriche in $[I]$, la cui intercetta sull'asse delle ordinate consente la seconda correlazione per ricavare gli altri parametri, secondo la Figura 2.15 a) e b).

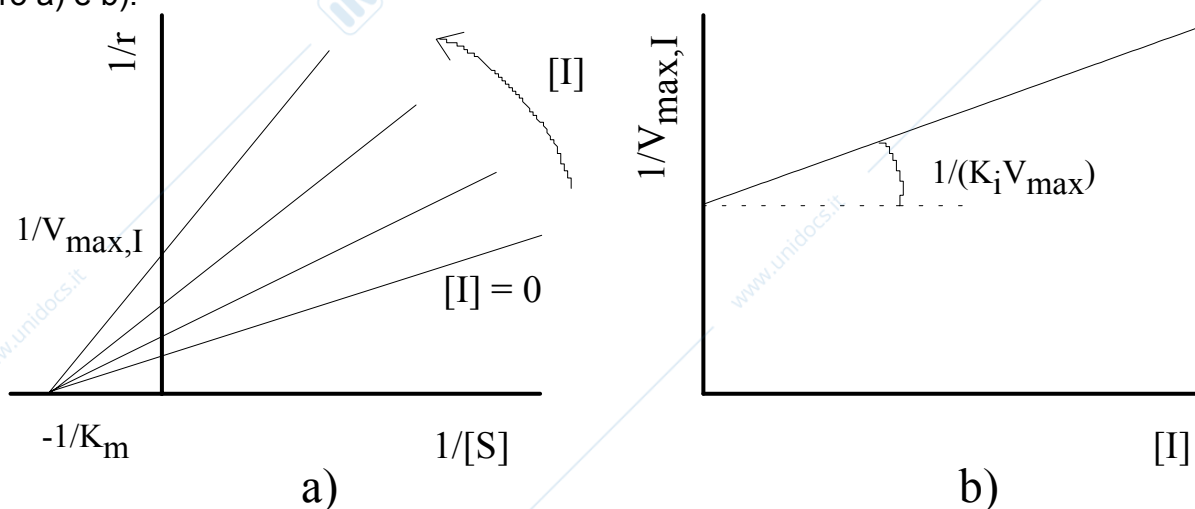


FIGURA 2.15. Inibizione non competitiva: determinazione delle costanti cinetiche

Infine, l'aliquota di inibizione sarà data dalla:

$$i = \frac{[I]}{K_i + [I]} \quad (2.54)$$

Per quanto riguarda l'aliquota di inibizione, essa verrà espressa da:

$$i = \frac{[I]}{[I] + K_i \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)} \quad (2.57)$$

dove i è crescente con $[S]$, ossia con il livello di saturazione (Figura 2.17).

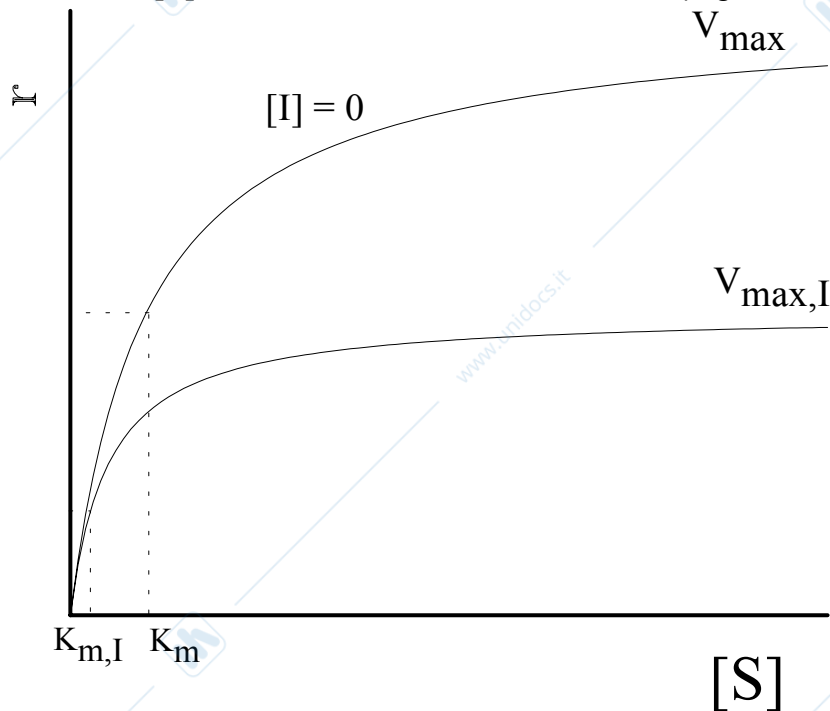
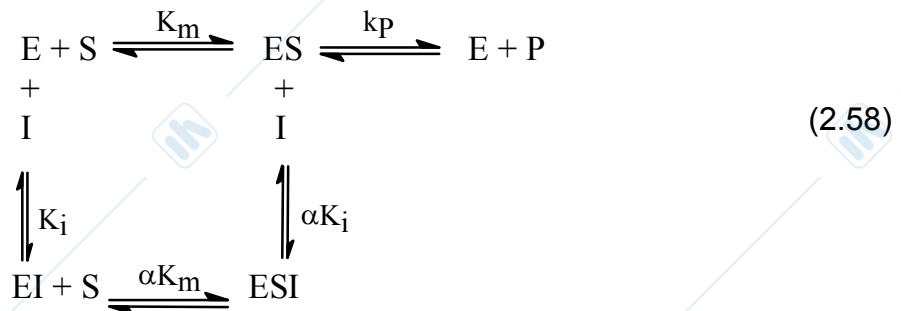


FIGURA 2.17. Inibizione acompetitiva: andamento di r

d) Inibizione non competitiva mista

Se l'affinità dell'enzima per i due ligandi non rimane inalterata anche nei complessi binari ES ed EI, si parla di inibizione non competitiva, ma di tipo "mista". Il più semplice schema prevede che l'affinità di E nei complessi binari per il secondo ligando sia decurtata di una stessa aliquota rispetto a quella dell'enzima libero:



con $\alpha < 1$. La (2.58) è simile al caso di inibizione non competitiva "pura", e **degenera in esso per $\alpha = 1$** . Non è possibile spingere tutto l'enzima verso la formazione del complesso produttivo ES: r_i sarà sempre minore di V_{max} . Inoltre, poiché EI ha minore

affinità per S rispetto a E, dovrà risultare $K_{m,I} > K_m$. ESI è un complesso totalmente improduttivo, e quindi: $[I]/K_i \rightarrow \infty, r_1 \rightarrow 0$. L'equazione cinetica é:

$$r = V_{\max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (2.59)$$

L'andamento nei piani $([S], r)$ e dei doppi reciproci è illustrato nelle Figure 2.18 e 2.19 rispettivamente. Il meccanismo non competitivo misto è caratterizzato da **due costanti**: K_i e α . In molti testi, la (2.59) si trova scritta con K_{i1} ($\equiv K_i$) e di un K_{i2} ($\equiv \alpha K_i$).

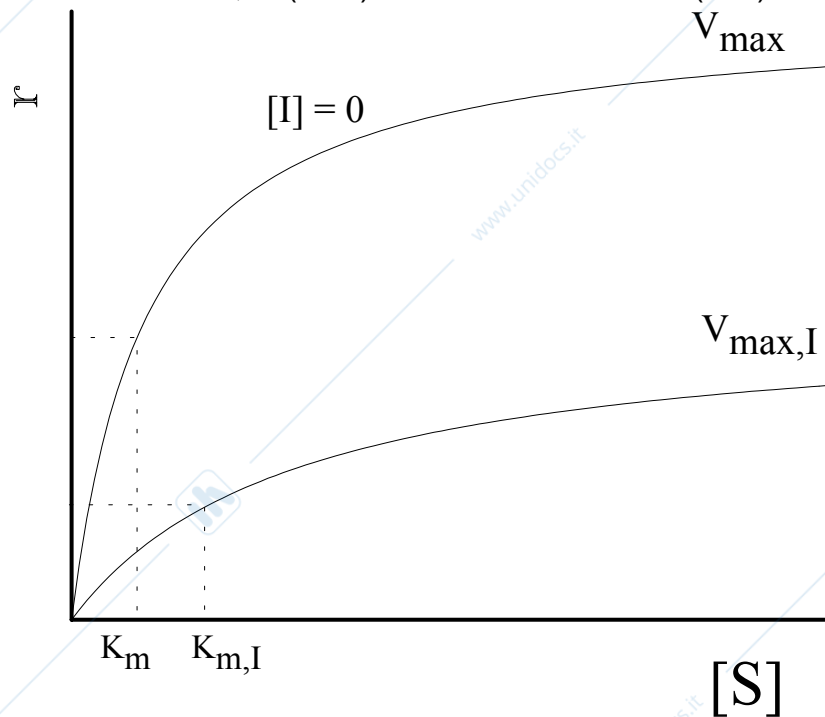


FIGURA 2.18. Inibizione non competitiva mista: andamento di r

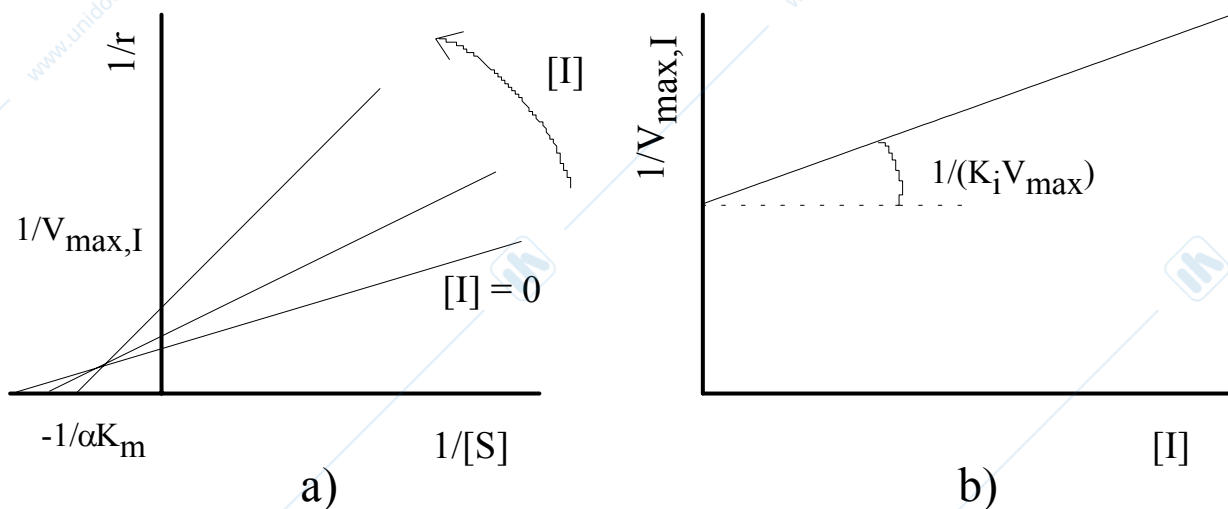


Figura 2.19. Inibizione non competitiva mista: determinazione delle costanti

e) Inibizione da eccesso di substrato

Alcune reazioni deviano inspiegabilmente dal comportamento comune: la velocità di reazione **non** è monotonamente crescente con $[S]$, ma passa per un **massimo** in corrispondenza di un certo valore $[S]^*$ per poi decrescere fino a tendere addirittura a zero (Figura 2.20). In questi casi il substrato gioca un doppio ruolo: **forza spingente** per la reazione e, ad alta concentrazione, **depressore**.

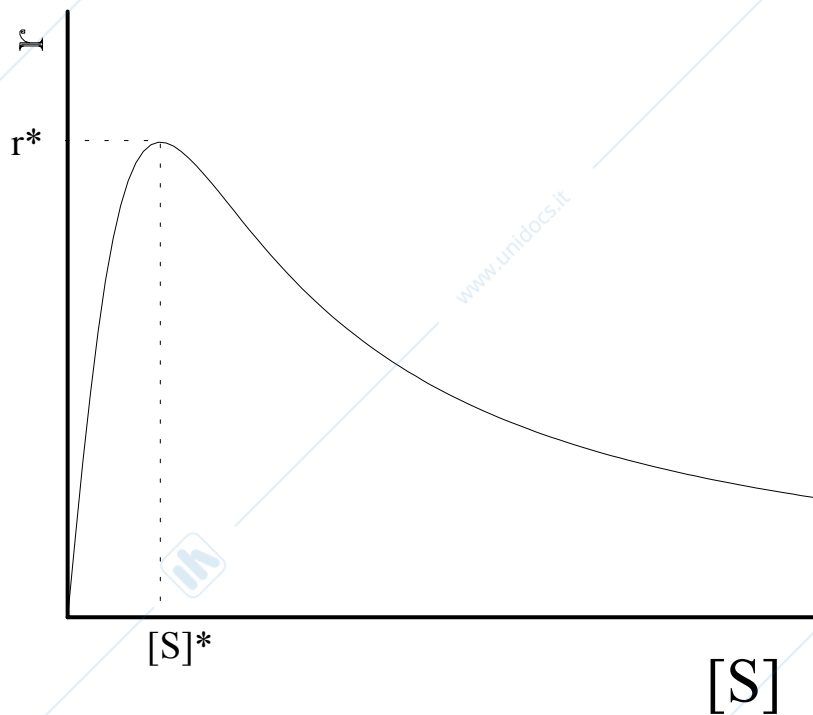


FIGURA 2.20. Inibizione da eccesso di substrato: andamento di r

Fra le reazioni di interesse pratico per l'industria biotecnologica il caso più noto di un tale comportamento è l'idrolisi del saccarosio a glucosio e fruttosio per opera dell'enzima **invertasi**:



Lo zucchero comune viene idrolizzato ad una miscela dei due isomeri la quale **ruota il piano della luce polarizzata in direzione opposta** a quella del saccarosio, da cui il nome dell'enzima. L'interesse industriale nasce dal fatto che la miscela di prodotti che si ottiene è dotata di maggior potere dolcificante del reagente. La velocità di questa reazione è praticamente nulla per $[S]$ pari a 1M (1000 mM).

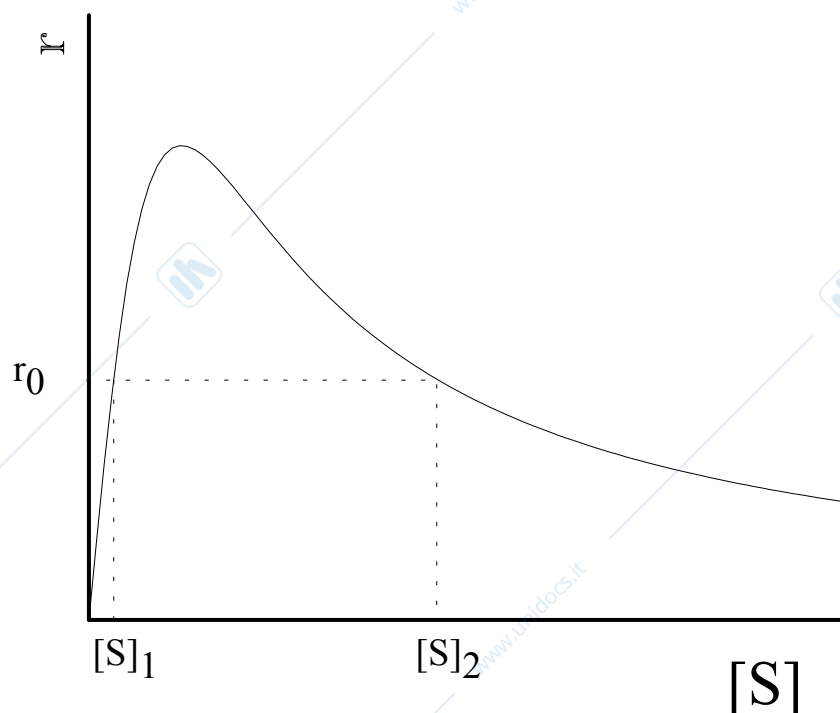


FIGURA 2.21. Inibizione da eccesso di substrato: non monotonia di r

Alcuni autori hanno proposto spiegazioni alternative all'inibizione da eccesso di substrato per il comportamento della invertasi. La (2.60) è un'idrolisi, ovvero una reazione a **due** substrati la cui velocità dipende dalla concentrazione di entrambi: il saccarosio e **l'acqua**. Ora, l'ordine di grandezza delle concentrazioni di un substrato è la millimolarità, quello dell'acqua in una soluzione è **50 molare**. L'acqua è cioè un substrato ampiamente disponibile, le sue variazioni di concentrazione dovute alla reazione sono trascurabili e le equazioni cinetiche non dipendono da $[H_2O]$. Ma il saccarosio è altamente solubile in acqua, oltre 1 M (342 g/L circa). Ogni molecola di saccarosio solvata alcune decine di molecole d'acqua. In una soluzione 1M, almeno una trentina di moli d'acqua **non sono disponibili per la reazione**. Quando la concentrazione di saccarosio tende ad aumentare, il rallentamento della velocità di reazione si può interpretare come dovuto a **crescente scarsità di acqua**. La corretta equazione cinetica sarebbe un meccanismo di Michaelis-Menten a due substrati.

Al biotecnologo basti sapere che l'inibizione da eccesso di substrato **correla** bene i risultati sperimentali e consente quindi di fare previsioni sulla velocità di reazione ottenibile in determinate condizioni. La precedente discussione ha chiarito che è possibile stimare una costante di inibizione da substrato **anche se in realtà l'enzima è limitato dalla scarsità d'acqua**. Essendo l'equazione cinetica costitutiva non lineare rispetto a $[S]$, non è possibile individuare una tecnica di diagrammazione dei dati sperimentali che dia luogo ad una retta nel piano. La classica tecnica di Lineweaver-Burk è in questo caso inefficiente, dando luogo al diagramma di un'iperbole (Figura 2.22).

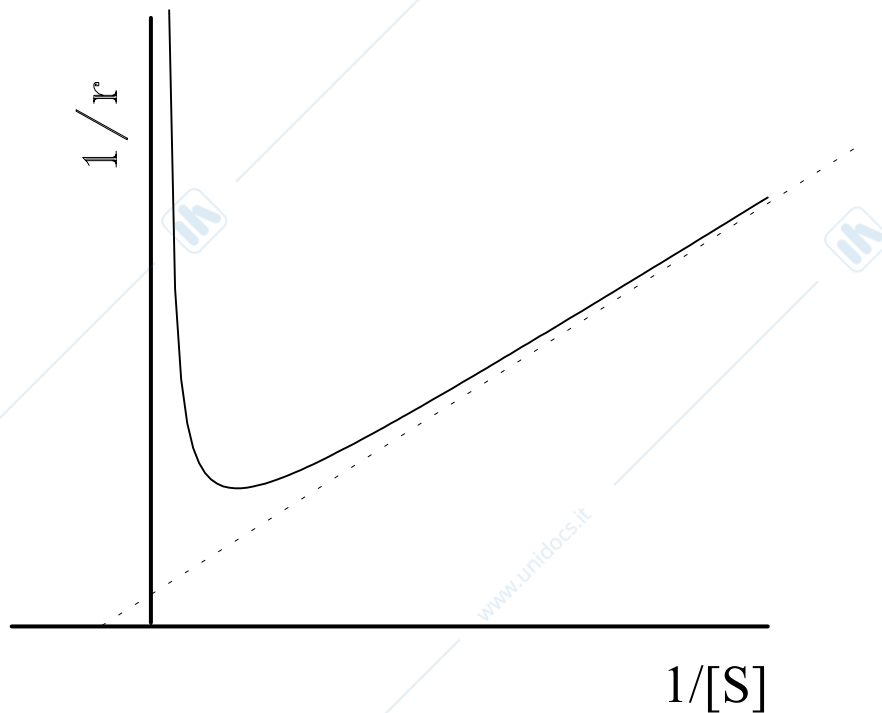


FIGURA 2.22. L'inibizione da substrato nel piano dei doppi reciproci

La curva presenta un asintoto obliquo, rappresentato dalla retta di Michaelis corrispondente ai due valori specifici di V_{\max} e K_m , a cui l'iperbole ovviamente tende per $1/[S] \rightarrow \infty$, ed un asintoto verticale, corrispondente all'asse delle ordinate. Con un simile andamento dei dati, è molto difficile stimare l'ascissa del minimo ($1/[S] = (K_m K_{iS})^{-1/2}$). Si ricorre allora ad un altro tipo di diagrammazione, impiegando il piano di **Hanes-Woolf** (Figura 2.23). In esso i dati si dispongono su una **parabola**:

$$\frac{[S]}{r} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{[S]^2}{V_{\max} K_{iS}} \quad (2.64)$$

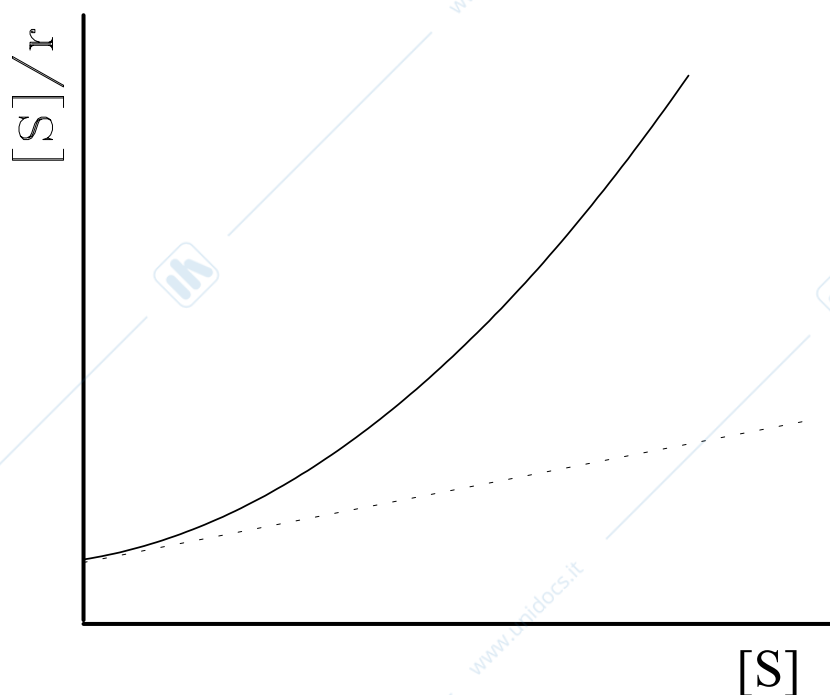


FIGURA 2.23. L'inibizione da substrato nel piano di Hanes-Woolf

In questo tipo di diagrammazione la retta di Michaelis rappresenta la tangente alla parabola nel punto di ascissa nulla. Ovviamente non è superata la non linearità dell'equazione, ma essendo la parabola "meno curva" di un'iperbole, risulta più semplice stimare V_{\max} e K_M dai dati di basso $[S]$. Noti questi due parametri, il K_{iS} si può ricavare per differenza tra i valori sperimentali e quelli che competerebbero alla corrispondente retta di Michaelis.

Si osservi che la (2.64) rappresenta nello spazio ($[S]$, $[S]^2$, r) l'equazione cartesiana di un **piano**, il quale è univocamente determinato da **tre** coefficienti. Quindi, una correlazione del tipo minimi quadrati, individuando il piano la somma dei quadrati delle cui distanze dai punti sperimentali è minima, consentirebbe il calcolo diretto dei tre parametri cinetici. Si tratta di una correlazione bilineare che estende alle tre dimensioni la classica correlazione lineare a due parametri ed è addirittura facilmente generalizzabile allo spazio cartesiano a n dimensioni.

A chiusura dell'ampio paragrafo sull'inibizione dell'attività enzimatica, giova accennare ad una particolare tecnica di diagrammazione dei dati sperimentali di velocità di reazione che talvolta risulta utile impiegare, soprattutto per la discriminazione del meccanismo d'inibizione: si tratta del piano di Dixon ($1/r$ in funzione di $[I]$, parametrico in $[S]$). Si lascia al lettore l'individuazione della disposizione dei dati in tale piano per ciascuno dei quattro casi di inibizione trattati.

2.13) Effetto della temperatura

Tutte le reazioni chimiche aumentano di velocità al crescere della temperatura e quelle catalizzate da enzimi non fanno eccezione. L'azione degli enzimi è interpretabile in termini di un abbassamento della barriera energetica fra substrato e complesso attivato (energia di attivazione). In base alle leggi della meccanica molecolare, ad una certa temperatura solo una determinata frazione sul totale delle molecole di substrato possiede energia sufficiente a varcare la barriera e questa frazione è una funzione crescente di T . Si suole esprimere ciò dicendo che la trasformazione da substrato a prodotto è un processo **attivato**, la cui velocità dipende dalla temperatura secondo la ben nota legge di Arrhenius:

$$r = Ae^{\frac{E_a}{RT}} \quad (2.65)$$

dove R è la costante universale dei gas, T la temperatura in **gradi Kelvin**, E_a l'energia di attivazione ed A il **fattore pre-esponenziale**, che dipende dalla temperatura ma in maniera molto debole rispetto all'esponenziale, usualmente da $T^{1/2}$: ciò autorizza a ritenere il termine pre-esponenziale **costante**, specie in intervalli ristretti di temperatura.

Stante la (2.65), la sensibilità di una reazione rispetto alla temperatura si annida in E_a . Quanto maggiore è questa costante, tanto maggiore è l'accelerazione indotta dall'incremento di temperatura. Le reazioni catalizzate da enzimi hanno normalmente energie di attivazione intorno alle **10000 cal/mol**: con tali E_a e nell'intorno delle usuali temperature **un aumento di dieci gradi centigradi si ripercuote circa in un raddoppio della velocità di reazione**. La (2.65) è espressa in termini di r : ora, come visto nei paragrafi precedenti, qualunque sia l'equazione costitutiva in essa è comunque presente il termine moltiplicativo $V_{max} = k_p[E]_t$. La dipendenza della velocità di reazione da T è **concentrata** nella costante cinetica k_p , e si scrive:

$$r = k_{p0} e^{\frac{E_a}{RT}} f([S]) \quad (2.66)$$

dove f rappresenta la dipendenza dalla concentrazione di substrato, ovviamente specifica del particolare meccanismo di reazione valido per la reazione in esame. Si osservi che in f sono contenute altre costanti quali K_M e le eventuali K_j , che **a rigore dipendono anch'esse dalla temperatura**. Ora, nella interpretazione dello stato quasi stazionario, il K_M è un rapporto fra costanti cinetiche e per esso si ha **blanda** dipendenza da T , sostanzialmente **trascurabile** rispetto al termine esponenziale.

Quanto alla dipendenza da T delle eventuali costanti di inibizione, è chiaro che esse avrà modo di manifestarsi solo in presenza dell'inibitore. Queste considerazioni rendono quindi valida la scissione della $r(T, [S])$ nel prodotto di due termini ciascuno funzione di una sola delle due variabili. La determinazione sperimentale consiste in prove cinetiche differenziali a $[S]$ ed $[E]_t$ costanti, ma a diverse temperature. La misura è molto importante perché conoscendo l'energia di attivazione di una reazione enzimatica è possibile prevedere l'effetto della temperatura sulla velocità del processo. La legge di Arrhenius è linearizzata nel **piano di Arrhenius, che reca in ascissa il reciproco di T (K^{-1}) ed in ordinata il logaritmo naturale di r** : Si ha una retta di pendenza $-E_a/R$. Aumentando indefinitamente la temperatura si dovrebbe registrare l'andamento della linea tratteggiata nelle Figure 2.24 e 2.25.

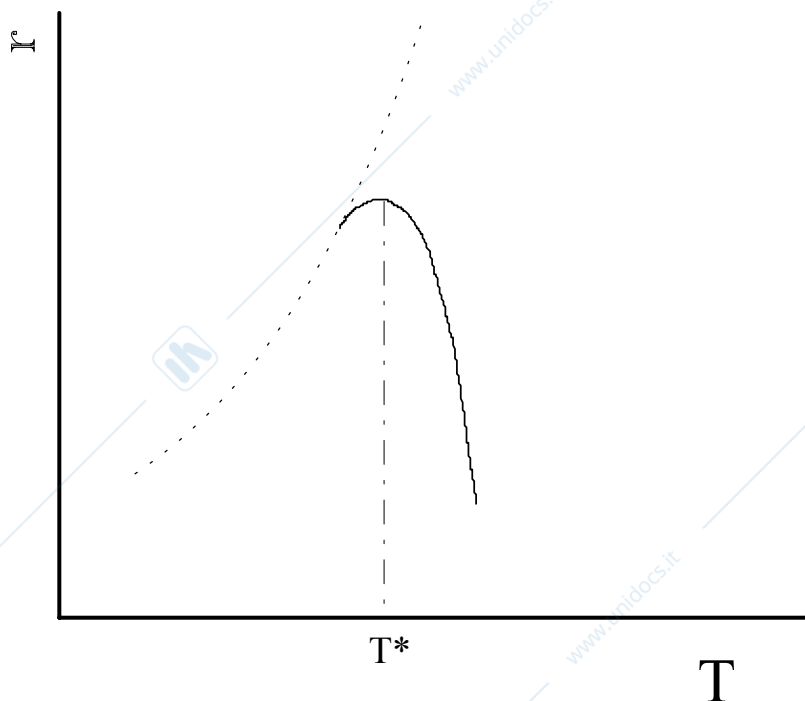


FIGURA 2.24. Velocità di reazione e temperatura

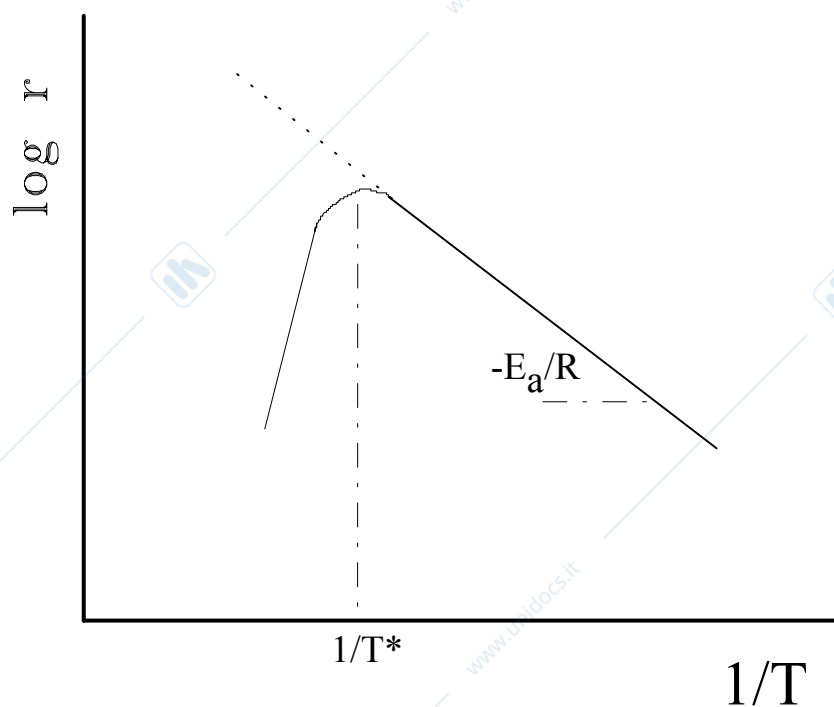


FIGURA 2.25. Diagramma di Arrhenius per una reazione enzimatica

Le reazioni enzimatiche seguono abbastanza fedelmente la legge di Arrhenius solo fino ad una certa temperatura, per poi discostarsene: il tasso d'incremento di velocità tende a diminuire e la velocità di reazione passa per un massimo in corrispondenza della **temperatura ottimale T^*** , per poi decrescere in maniera molto marcata (linea continua nelle Figure 24 e 25). Ciascun enzima ha una sua temperatura ottimale di reazione, più o meno alta a seconda della **fonte** di provenienza. Esistono microrganismi, detti **psicrofili** (amanti del freddo) che si sono adattati a vivere in ambienti intorno allo zero Celsius, e perfino qualche grado al disotto: gli enzimi che questi organismi hanno a corredo devono assicurare velocità di reazione significative alle basse temperature. All'altro estremo vi sono i microrganismi **termofili** (amanti del caldo) capaci di vivere in ambienti quali i geysers e le pozze di fango solfatariche. Gli enzimi di questa provenienza esibiscono T^* fra gli 80 ed i 90 °C. La maggior parte dei microrganismi è però **mesofila**, prospera cioè in ambienti a temperatura media e le T^* del loro corredo enzimatico cadono nell'intorno tra 30 e 60 °C.

Il biotecnologo è interessato a lavorare a temperature intorno a quella ottimale, posto che ciò sia compatibile con altre esigenze del processo. C'è però bisogno di pervenire ad una soddisfacente interpretazione del discostamento dalla legge esponenziale, perché la caduta di velocità a destra di T^* è usualmente così brusca che 5÷10 gradi in più sono sufficienti per ridurre r a valori di scarso interesse pratico.

Il comportamento di Figura 25 è tipico dei casi in cui vi siano **due fenomeni antagonisti**, entrambi favoriti dall'incremento di temperatura. Come è noto, le molecole non sono entità **statiche** ma vibrano di continuo, oscillando attorno ad una conformazione termodinamicamente favorita, alla quale compete un minimo di contenuto energetico. L'energia vibrazionale di una molecola è funzione crescente della temperatura, ma l'ampiezza delle oscillazioni non può aumentare indefinitamente, perché ad un certo punto avverrà la rottura dei legami meno forti e la conformazione verrà così irreversibilmente persa. Quando ciò accade ad una proteina, si parla di **denaturazione termica**. Gli enzimi manifestano proprietà catalitiche in forza del possedere una particolare conformazione la quale, come si è visto, è stabilizzata da legami deboli, ed il profilo termico di Figura 25 è facilmente spiegabile. Aumentando la temperatura si incrementa la velocità della reazione, ma anche quella del processo di denaturazione termica dell'enzima, che finisce per prevalere, **disattivando** il biocatalizzatore nell'arco del tempo necessario per la determinazione cinetica.

2.14) Disattivazione termica degli enzimi

Il biotecnologo ha bisogno di caratterizzare un enzima anche rispetto alla **cinetica di disattivazione**, studiando per questo fenomeno opportuni modelli che risultino adeguati a quantificarlo in maniera esatta.

Il più semplice modello di disattivazione termica si basa sulla seguente descrizione fenomenologica. Si consideri una singola molecola di enzima E cataliticamente attiva ad una certa temperatura T: essa oscillerà in maniera più o meno ampia attorno alla conformazione stabile. All'aumentare di T l'ampiezza di queste oscillazioni crescerà sino a consentire la rottura di qualche legame, e la molecola si denaturerà passando ad una qualsiasi altra forma, genericamente indicata con E_D , alla quale si attribuisce **attività catalitica nulla**:



La conformazione cataliticamente attiva è unica, mentre esistono **moltissimi** modi per pervenire alla disattivazione, in dipendenza dei legami molecolari interessati. Il che dà ragione del fatto che la (2.61) è supposta **irreversibile**: la probabilità per la molecola E_D di ritornare all'unica forma attiva è infatti virtualmente nulla.

E' chiaro che il fenomeno dipende esclusivamente dal livello energetico vibrazionale della molecola e cioè in ultima analisi dalla temperatura del sistema. Considerando non più una sola molecola, ma un insieme di esse, non v'è quindi

luogo a supporre interazioni di sorta fra le molecole, e la disattivazione avverrà secondo le stesse modalità. Se si contasse il numero di molecole E che passa nell'unità di tempo alla forma E_D , lo si troverebbe **proporzionale al numero di molecole attive in quell'istante**: si tratta cioè di un fenomeno del **primo ordine rispetto alla concentrazione di enzima attivo**, il cui tasso di decremento è pertanto esprimibile dalla:

$$-\frac{\partial [E]}{\partial t} = k_D [E] \quad (2.68)$$

dove k_D , **costante di disattivazione termica, è funzione della temperatura del sistema**. Supponendo che all'istante iniziale tutte le molecole di enzima fossero attive ed alla concentrazione $[E]_0$, la (2.68) si integra:

$$[E] = [E]_0 \exp(-k_D t) \quad (2.69)$$

Il fenomeno segue cioè un **decadimento esponenziale**. k_D , **che ha le dimensioni dell'inverso di un tempo**, caratterizza totalmente il processo. Si può definire un **tempo di emivita**, ossia il tempo che occorre per dimezzare la concentrazione di enzima attivo:

$$t_{1/2} = \frac{\log(2)}{k_D} \quad (2.70)$$

$t_{1/2}$ non dipende da $[E]$: quanto maggiore è il k_D di un enzima, tanto più il suo tempo di dimezzamento è breve e quindi il biocatalizzatore è termolabile.

k_D è una vera e propria costante cinetica, e dipende dalla temperatura secondo la legge di Arrhenius:

$$k_D = k_{D0} \exp\left(-\frac{E_{aD}}{RT}\right) \quad (2.71)$$

con $E_{a,D}$ energia d'attivazione del **processo di disattivazione**, da **non confondere** con E_a , energia di attivazione della **reazione principale**. I processi di disattivazione termica sono usualmente molto più **sensibili** alla temperatura delle reazioni enzimatiche vere e proprie, il che spiega il crollo repentino di r osservabile a temperature maggiori di quella ottimale. **Le $E_{a,D}$ variano usualmente tra le 50.000 e le 100.000 cal/mole: la velocità del processo raddoppia per ogni aumento di 3÷5 gradi centigradi nella temperatura.**

La disattivazione termica degli enzimi implica una progressiva diminuzione dell'ammontare di catalizzatore attivo disponibile per l'atto catalitico, ed introduce la **variabile tempo** nelle equazioni costitutive. Risulta:

$$V_{\max}(T, t) = k_{P0} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) [E]_0 \exp(-k_D t) \quad (2.72)$$

dove anche il termine k_D è **a sua volta funzione di tipo Arrhenius della T**. La determinazione della costante di disattivazione termica è parte integrante della caratterizzazione di un enzima.

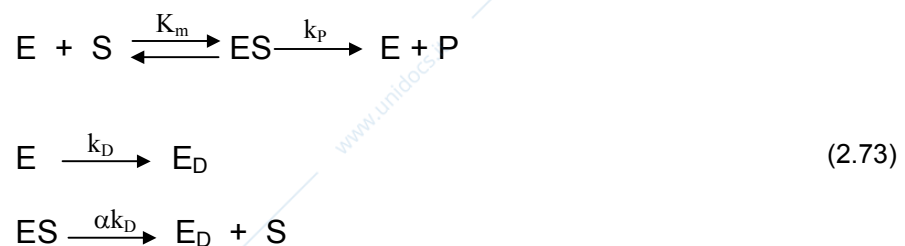
2.15) Stabilità allo stoccaggio

Per la determinazione sperimentale del k_D si stabiliscono delle condizioni di saggio cinetico differenziale (T , $[S]$, ecc) e si determina più volte la velocità di reazione dopo vari **tempi di stoccaggio**. Ossia, si tiene l'enzima in soluzione ad una certa temperatura (non necessariamente quella a cui si conduce il saggio cinetico) e si prelevano aliquote uguali di esso a vari tempi, impiegandole nel saggio cinetico. Si avranno così dati di velocità di reazione a vari tempi di stoccaggio ad una certa temperatura. In queste condizioni, la (2.72) stabilisce che, riportando in diagramma il **logaritmo naturale della velocità di reazione in funzione del tempo di stoccaggio si otterrà una retta di pendenza $-k_D$** . Se l'esperienza si ripete a varie temperature di stoccaggio, si avranno diversi valori della costante di disattivazione che consentono la determinazione dell'energia di attivazione del processo di disattivazione termica.

2.16) Effetto protettivo del substrato

Il biotecnologo sarebbe interessato a lavorare con enzimi totalmente stabili, cioè con un k_D praticamente nullo. Naturalmente ciò non è possibile, per cui una considerevole parte di studi viene dedicata alla **stabilizzazione** degli enzimi, ovvero all'individuazione di tecniche atte a ridurre la termolabilità. Una delle prime osservazioni fatte in tal senso è stata che **talvolta gli enzimi risultano più termoresistenti in presenza del loro substrato**. Una semplice spiegazione di questo fenomeno riposa sull'osservazione che un enzima impegnato nel complesso ES è in qualche maniera **bloccato** in una conformazione per definizione

cataliticamente attiva, poiché l'instaurarsi dei legami necessari alla formazione del complesso enzima-substrato riducono la "libertà vibrazionale" della proteina. L'ampiezza delle oscillazioni dovute all'energia vibrazionale è cioè ridotta in presenza del substrato. Si suole dire che la **stabilità operativa** (in presenza di S) di un enzima può (si badi bene, può: non è detto che lo sia) essere migliore di quella allo stoccaggio. Per interpretare l'effetto protettivo del substrato con un opportuno modello occorre fare alcune ipotesi. Si supponga per semplicità che l'enzima segua la cinetica di Michaelis-Menten e che si disattivi secondo un processo irreversibile del primo ordine. Alla consueta maglia di reazioni si affiancherà allora il processo in parallelo di disattivazione:



L'effetto protettivo del substrato implica che $\alpha \leq 1$. Inoltre, perché sia possibile postulare le maglie di reazioni di Michaelis e Menten **anche** in presenza della disattivazione, occorre che il fenomeno non distorca le interazioni tra le specie coinvolte nell'atto catalitico. In altre parole, deve potersi scrivere l'usuale relazione $K_m = ([E][S])/[ES]$ anche in presenza di concentrazioni variabili per effetto della contemporanea disattivazione. Ciò è possibile solo sotto l'ipotesi che **la disattivazione sia molto più lenta della reazione principale**, cosicché le molecole coinvolte nell'interazione reattiva possano immediatamente far fronte al decremento di [E] ed [ES] ridistribuendosi secondo quanto richiesto dal K_m . In definitiva, **il tempo caratteristico della reazione deve essere molto minore di quello della disattivazione**. Per un processo del primo ordine il tempo caratteristico è rappresentato dall'inverso della costante cinetica e quindi quello della disattivazione più rapida possibile (enzima libero) è $t_D = 1/k_D$. La reazione chimica non è del primo ordine, ma manifesta ordine dipendente dal livello di saturazione, zero per $[S]/K_m \gg 1$, quando la velocità è prossima a quella massima; uno per $[S]/K_m \rightarrow 0$, quando la velocità di reazione è molto minore di quella massima. E' facile vedere che in queste condizioni la pseudo costante del primo ordine risulta V_{max}/K_m . In definitiva, la modellazione risulterà valida se risulterà verificata la relazione $k_D K_m / V_{max} < 1$. Ciò premesso, si consideri il tasso di decremento della concentrazione totale di enzima attivo. Essendoci due processi di disattivazione in parallelo, esso sarà dato da:

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_D[E] + \alpha k_D[ES] \quad (2.74)$$

Il bilancio di materia sull'enzima attivo fornisce:

$$[E]_t = [E] + [ES] = [E] \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (2.75)$$

Infatti, dovrà sempre risultare $[ES] = ([E][S])/K_m$. Utilizzando queste relazioni si può scrivere la seguente equazione costitutiva della disattivazione termica in presenza di substrato:

$$-\frac{1}{k_D[E]_t} \frac{d[E]_t}{dt} = \left(K_m + \frac{\alpha[S]}{K_m + [S]} \right) \quad (2.76)$$

Si consideri il secondo membro della (2.76). Per $\alpha = 1$ (assenza di effetto protettivo del substrato) esso degenera in una forma analoga a quello della (2.68) e cioè correttamente il modello prevede che la cinetica di disattivazione rimanga inalterata anche in presenza di substrato. Per $\alpha = 0$ (totale protezione del substrato) a secondo membro è presente una quantità sempre minore dell'unità e tanto più piccola quanto maggiore è $[S]$ rispetto a K_m . Per $[S]/K_m \rightarrow \infty$, infatti, essa tende a zero. Cioè, se l'enzima è tutto impegnato nel complesso ES, non si manifesta affatto disattivazione. Per tutti i valori $0 < \alpha < 1$, infine, il tasso di disattivazione risulta comunque ridotto rispetto al corrispondente valore di stoccaggio.

A conclusione di questo paragrafo occorre osservare che la determinazione della stabilità operativa risulta impossibile con le tecniche tradizionali di analisi cinetica. Infatti, la presenza simultanea nell'ambiente di soggiorno dell'enzima e del substrato genera inevitabilmente del prodotto che verrà introdotto nel reattore all'atto del prelievo dell'aliquota di soluzione enzimatica necessaria al saggio cinetico, creando così una concentrazione di "fondo" di P che disturba la misura. Per determinare la stabilità operativa di un enzima occorre allora ricorrere a tecniche più sofisticate che prevedono l'impiego di reattori continui, e che pertanto verranno esaminate in un'altra parte del corso.

2.17) Meccanismo di disattivazione in serie

In base a quanto esposto nei paragrafi 2.15) e 2.16), la disattivazione termica degli enzimi è un processo del primo ordine, caratterizzato totalmente **dalla sola costante k_D** , per il quale il tasso di variazione è costante nel tempo. Nel rappresentare i dati sperimentali di una prova di stabilità, sia allo stoccaggio che operativa, è usuale **normalizzare** i valori della attività enzimatica stimata ai vari tempi riportandoli come **percentuale rispetto al dato iniziale**. Ci si attende quindi che i dati si dispongano su una linea retta nel diagramma semilogaritmico attività-tempo (Figura 2.26, linea tratteggiata).

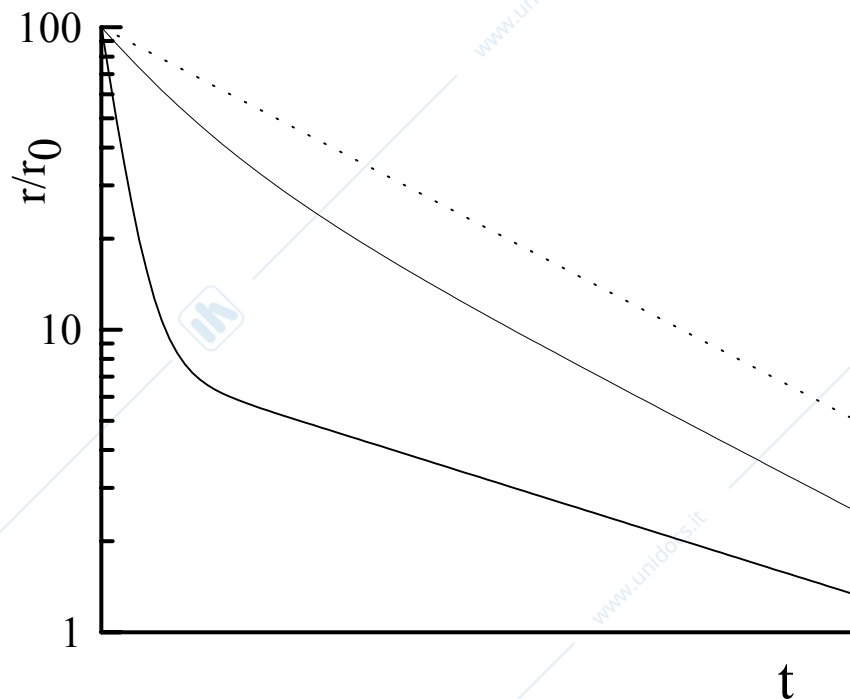


FIGURA 2.26. Possibili andamenti nel tempo dell'attività enzimatica

Non è però inusuale osservare andamenti del tipo di quelli delle linee a tratto intero. Si nota cioè una curvatura più o meno marcata, con un tasso di disattivazione maggiore nell'intorno del tempo iniziale e meno accentuato ai tempi lunghi. In certi casi i dati sono ben interpolati da due rette di pendenza diversa raccordate da un tratto curvilineo. I meccanismi di disattivazione finora studiati non possono spiegare un cambio di derivata nel diagramma, per cui occorre cercare un modello interpretativo più complesso. Siccome, come già detto, non è realistico ipotizzare un ordine di reazione diverso da uno per un processo che è essenzialmente legato allo

stato energetico delle singole molecole d'enzima, alcuni autori hanno postulato un meccanismo costituito da **due processi in serie del primo ordine**:



La proteina non passa direttamente dalla forma **nativa** E con **attività specifica** A_N a quella totalmente disattivata E_D , ma passa per una forma intermedia E_i alla quale compete una certa **attività** A_i , **minore di** A_N . Ciascuno dei due fenomeni in serie procede ad un tasso caratterizzato dalla sua propria costante di disattivazione, rispettivamente k_{D1} per il primo e k_{D2} per il secondo. E' chiaro che l'attività enzimatica riscontrata ad un certo tempo dipenderà dalla distribuzione istantanea dell'enzima nelle due forme attive. Il destino ultimo del sistema è rappresentato dalla presenza della sola specie E_D (**attività residua nulla**), mentre all'istante iniziale tutto l'enzima si trova nella forma **nativa** E (**attività massima**). Ai tempi intermedi, la specie E_i si forma per effetto del primo stadio della serie e scompare per effetto del secondo. Ciò si traduce nel seguente sistema di equazioni differenziali:

$$\begin{aligned} -\frac{d[E]}{dt} &= k_{D1}[E] \\ \frac{d[E_i]}{dt} &= k_{D1}[E] - k_{D2}[E_i] \end{aligned} \quad (2.78)$$

che deve essere integrato con le condizioni iniziali $t = 0$, $[E] = [E]_0$, $[E_i] = 0$. La prima equazione è direttamente risolvibile, ottenendosi l'usuale legge di decadimento esponenziale:

$$\frac{[E]}{[E]_0} = e^{-k_{D1}t} \quad (2.79)$$

Questa va inserita nella seconda equazione differenziale, la cui soluzione è:

$$\frac{[E_i]}{[E]_0} = \frac{k_{D1}}{k_{D2} - k_{D1}} (e^{-k_{D1}t} - e^{-k_{D2}t}) \quad (2.80)$$

L'attività istantanea globale della soluzione enzimatica sarà $A(t) = A_N[E] + A_i[E_i]$, ovvero:

$$\frac{A(t)}{A_N[E]_0} = e^{-k_{D1}t} - \left(\frac{A_i}{A_N} \right) \frac{k_{D1}}{k_{D2} - k_{D1}} (e^{-k_{D1}t} - e^{-k_{D2}t}) \quad (2.81)$$

Se $A_i = 0$, ovvero se la forma intermedia non manifesta attività catalitica, si ha:

$$A(t) = A_N [E]_0 e^{-k_{D1}t} \quad (2.82)$$

che è l'usuale legge di decadimento relativa ad un solo stadio del primo ordine. Se entrambe le attività specifiche sono diverse da zero, l'andamento della (2.81) dipende dal valore relativo delle due costanti di disattivazione: la maggiore delle due tenderà a far svanire prima l'esponenziale che le compete. Si può vedere facilmente che, per $t \rightarrow \infty$, ove risulti $k_{D1}/k_{D2} \gg 1$ l'equazione degenera in:

$$A(t) \cong A_i [E]_0 e^{-k_{D2}t} \quad (2.83)$$

che dà luogo nel diagramma semi-log ad un asintoto di pendenza $-k_{D2}$. Se invece risulta $k_{D1}/k_{D2} \ll 1$, la legge asintotica diventa:

$$A(t) \cong A_N [E]_0 \left(1 + \frac{A_i k_{D1}}{A_N k_{D2}} \right) e^{-k_{D1}t} \quad (2.84)$$

che manifesta pendenza pari a $-k_{D1}$.