

CINETICA ENZIMATICA: DETERMINAZIONE DELLA V_M E DELLA K_M DELL'ENZIMA SACCARASI

PRINCIPI TEORICI

Le reazioni che avvengono nelle cellule sono le stesse che avvengono in laboratorio, ciò che le differenzia è la *velocità* straordinaria a cui avvengono rispetto alla temperatura delle cellule viventi (generalmente molto bassa per una reazione chimica). Le reazioni cellulari sono molto veloci grazie agli **enzimi** i quali, da ottimi catalizzatori, abbassano l'energia d'attivazione dei reagenti mettendo in grado le molecole di *reagire anche a temperature moderate*, rompendo vecchi legami e formandone di nuovi. Quindi le reazioni avverrebbero ugualmente, anche senza gli enzimi, ma in tempi più o meno lunghi non compatibili con la vita.

Molti fattori influenzano l'andamento di una reazione enzimatica, in particolare la velocità delle reazioni catalizzate da enzimi (che può essere espressa con il *numero di turnover* = molecole di substrato accettate da una singola molecola d'enzima in ogni secondo, quando è messo alla presenza d'eccesso di substrato) è influenzata da: *concentrazione di substrato, concentrazione di enzima, temperatura, pH*.

- Per vedere come la concentrazione di substrato influenza la velocità di una reazione enzimatica si può ricorrere ad un modello abbastanza semplice (anche se non sempre valido per tutte le reazioni), sviluppato da L. Michaelis e M. Menten nel 1913, che analizza la dipendenza dell'attività enzimatica dalla concentrazione di substrato (curva iperbolica) e fornisce una misura dell'efficienza dell'enzima. Secondo questo modello è decisiva la quantità d'enzima impegnata nella catalisi (complesso ES): finché non tutte le molecole d'enzima sono impegnate l'aggiunta di nuovo substrato (aumento della [S]) fa aumentare la velocità della reazione. Si arriverà, però poi ad un punto in cui tutte le molecole dell'enzima saranno impegnate nella catalisi (saturazione) e l'aggiunta di nuovo substrato non avrà alcun effetto sulla V della reazione, quindi questa resterà la massima possibilmente raggiungibile (V_m) e costante.

Determinare il valore della [S] concentrazione di substrato, che dà V_m è sperimentalmente difficile, più facile è determinare la [S] che dà $1/2 V_m$. Questo valore corrisponde alla K_m (costante di Michaelis-Menten). Essa ci dà approssimativamente la misura dell'affinità di un enzima per il substrato. Più alta è la K_m , minore è l'affinità perché significa che, per raggiungere $1/2 V_m$, occorre una maggiore quantità di substrato che satura una certa quantità di molecole enzimatiche. Viceversa se la K_m è bassa significa che è necessaria una minore [S] per saturare una certa quantità di molecole enzimatiche e quindi l'affinità tra E e S è maggiore.

- Anche la [E] **concentrazione dell'enzima** influenza la reazione da esso catalizzata. Prendendo una soluzione di substrato la cui concentrazione sia in largo eccesso si nota che, aumentando la concentrazione dell'enzima, la V della reazione aumenta in modo direttamente proporzionale.
- Tutte le reazioni chimiche risentono nella loro V della **variazione di temperatura**. Generalmente un aumento di T porta ad un aumento di V . Nelle reazioni enzimatiche però abbiamo a che fare con molecole biologiche, gli enzimi, sensibili alle alte temperature. Quando la temperatura sale oltre $60\text{ }^\circ\text{C}$ molti di essi vengono denaturati e l'attività biologica cessa. Gli enzimi degli organismi superiori hanno in genere come limite massimo di T accettabile i $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$. La velocità della reazione quindi in un primo momento tenderà ad aumentare (quando un individuo ha la febbre il suo metabolismo è accelerato), se poi però si continua ad aumentare T fino alle temperature di denaturazione dell'enzima, la V ricadrà velocemente a 0.

- L'andamento tipico della V di una reazione enzimatica in funzione del **pH** è una curva gaussiana, in cui l'apice rappresenta il pH ottimale per quell'enzima e, comunque, la parte alta della campana (in cui la velocità ha valori intorno al massimo) corrisponde al *range di efficienza*. Via via che ci si allontana dal range d'efficienza ($\text{pH} < \text{ o } >$ di quello ottimale) la velocità decresce fino a raggiungere valori vicino allo 0. La scarsa efficienza dell'azione enzimatica a pH diversi da quelli inclusi nel range di efficienza è dovuta all'alterazione del grado di ionizzazione dei gruppi presenti nel sito attivo dell'enzima e/o dei substrati per cui la formazione del complesso ES risulta ostacolata. A valori estremi di pH si può avere anche la denaturazione dell'enzima. La sottostante tabella mostra i pH ottimali degli enzimi digestivi.

| ENZIMA | pH OTTIMALE | RANGE DI EFFICIENZA |
|---------------------|-------------|---------------------|
| PEPSINA | 1.5 | 1.0 - 2.0 |
| LATTASI | 5.8 | 5.4 - 6.0 |
| SACCARASI | 6.0 | 5.0 - 7.0 |
| MALTASI | 6.0 | 5.8 - 6.2 |
| AMILASI SALIVARE | 6.7 | 6.6 - 6.8 |
| AMILASI PANCREATICA | 7.1 | 7.0 - 7.2 |
| TRIPSINA | 7.9 | 7.8 - 8.0 |
| CHIMOTRIPSINA | 8.0 | 7.8 - 8.1 |
| LIPASI | 8.0 | 7.8 - 8.1 |
| FOSFATASI | 8.6 | 8.2 - 8.8 |

Gli enzimi denominati **INVERTASI (Saccharasi)** sono specifici per il legame β -D-fruttofuranosidico e catalizzano la reazione di idrolisi del saccarosio nei suoi due esosi D(+)-glucosio e il D(-) fruttosio

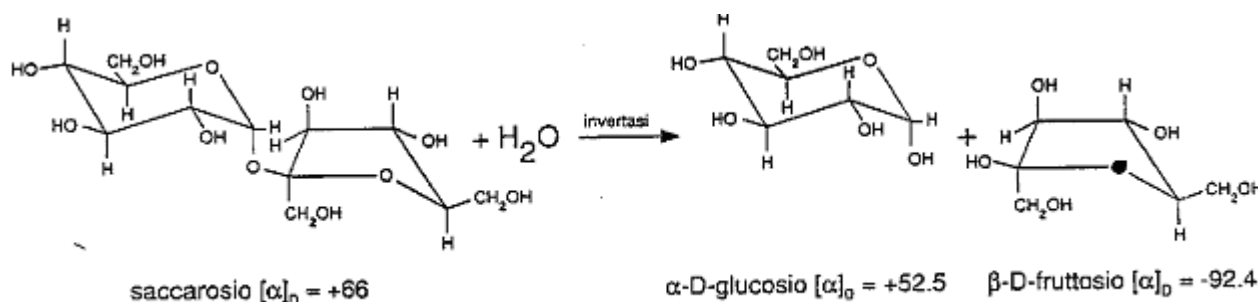


Figura 1: reazione enzimatica

Il nome d'**inversione** attribuito a questa reazione e per analogia all'enzima che la catalizza, deriva dal fatto che seguendone la sua evoluzione al polarimetro, si ha un cambiamento nel piano di rotazione della luce polarizzata da angoli positivi ad angoli negativi.

Infatti il saccarosio è destrogiro ($[\alpha] = 66,5^\circ$) mentre i prodotti della reazione risultano complessivamente levogiri, a causa del prevalente potere levo-rotatorio del fruttosio ($[\alpha] = -92,4^\circ$) sull'insieme dei poteri destro-rotatori delle forme α e β del glucosio ($[\alpha] = +52,7^\circ$).

L'invertasi fa avvenire questa reazione a temperatura ambiente e a pH debolmente acidi o neutri.

Il pH ottimale è 4,5 per l'enzima estratto da *Saccaromyces* e 7 se estratto da *Bacillus Subtilis*. Nel classico metodo chimico invece, la reazione procede a velocità apprezzabile solo per aggiunta d'acidi concentrati ed ebollizione della soluzione.

LA RIELABORAZIONE DELL'EQUAZIONE CINETICA

Un aspetto interessante nella trattazione delle cinetiche enzimatiche riguarda la rielaborazione matematica dell'equazione di Michaelis–Menten che consente di trasformare l'equazione di una curva in quella di una retta. La rielaborazione dell'equazione di Michaelis–Menten può essere ottenuta seguendo il metodo suggerito da Lineweaver–Burk o quello di Headie–Hofstee.

Nel nostro caso l'equazione verrà utilizzato il metodo di linearizzazione suggerito da Headie–Hofstee.

L'equazione fondamentale che regola la velocità enzimatica è l'equazione di Michaelis–Menten

$$V = \frac{V_m * [S]}{K_m + [S]}$$

dove V = velocità iniziale della reazione
 V_m = velocità massima
 K_m = costante di Michaelis
 $[S]$ = concentrazione substrato

Si moltiplicano entrambi i membri per il denominatore, rimane

$$V * (K_m + [S]) = V_m * [S]$$

eseguendo il prodotto si ottiene

$$V * K_m + V * [S] = V_m * [S]$$

dividendo per $[S] * K_m$ si ottiene

$$\frac{V * K_m}{[S] * K_m} + \frac{V * [S]}{[S] * K_m} = \frac{V_m * [S]}{[S] * K_m}$$

da cui, semplificando, si ottiene

$$\frac{V}{[S]} + \frac{V}{K_m} = \frac{V_m}{K_m}$$

isolando $V/[S]$ si ottiene l'equazione di Headie–Hofstee

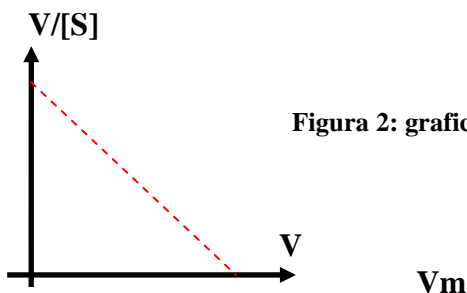
$$\boxed{\frac{V}{[S]} = \frac{V_m}{K_m} - \frac{V}{K_m}}$$

che rappresenta una retta con pendenza negativa, variabili $V/[S]$ (y); V (x); intercetta $a = V_m/K_m$ e coefficiente angolare $b = -1/K_m$.

L'intersezione con l'asse x fornisce il valore della V_m . Infatti ponendo $V/[S] = 0$ l'equazione diventa

$$\frac{V_m}{K_m} - \frac{V}{K_m} = 0$$

e quindi: $V = V_m$

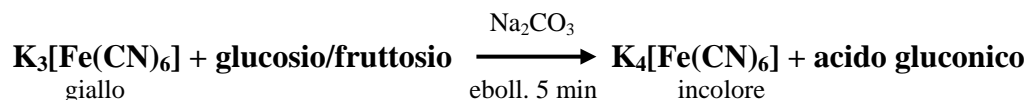


Trovato V_m si sostituisce nell'equazione della retta dei reciproci e si calcola $V/[S]$ che ci permette di calcolare K_m

DOSAGGIO ANALITICO

Il metodo colorimetrico sfrutta le proprietà riducenti del glucosio e fruttosio nei confronti di una sostanza, il ferricianuro di potassio, che è colorata di giallo se il ferro è presente allo stato ossidato e incolore, se presente allo stato ridotto di ferrocianuro (metodo di Folin-Wu).

La reazione può essere schematizzata come.



La presenza di carbonato di sodio ha la duplice funzione di creare l'ambiente basico necessario all'ossidazione del glucosio e fruttosio e bloccare la reazione enzimatica di inversione del saccarosio.

Dopo ebollizione per 5 minuti in bagnomaria bollente, viene misurata l'assorbanza residua della soluzione di ferricianuro alla lunghezza d'onda di 410nm. Tale assorbanza risulterà tanto più piccola quanto maggiore sarà stata la quantità di zucchero invertito dalla catalasi enzimatica.

La legge di Lambert Beer assume la forma:

$$A = A^\circ - KSCg$$

dove:

A è l'assorbanza residua della soluzione di ferricianuro

A° è l'assorbanza iniziale della soluzione di ferricianuro

C è la concentrazione di zucchero invertito espresso tutto come glucosio o fruttosio, formato dalla reazione nel tempo *t* di reazione.

L'equazione $A = A^\circ - KSC$ rappresenta l'equazione di una retta con pendenza negativa e con variabili **A** (*y*) e **C** (*x*), coefficiente angolare $b = -KS$ e intercetta **A°**.

L'intersezione con l'asse della *x* rappresenta la concentrazione di glucosio oltre la quale abbiamo la decolorazione completa del ferricianuro di potassio.

$$A = A^\circ - KS C$$

$$y = b - a x$$

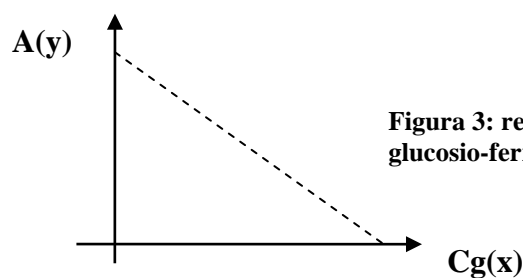


Figura 3: retta di taratura glucosio-ferricianuro

STUDIO DEL COMPORTAMENTO DELL'ENZIMA INVERTASI IN SOLUZIONE

ISTRUZIONI PER L'ESECUZIONE DELLA RETTA DI TARATURA

Reagenti:

ferricianuro di potassio; carbonato di sodio; glucosio o fruttosio $10^{-3}M$

- preparare 100cc di una soluzione di glucosio $10^{-2}M$ e da questa, per diluizione, 100cc di una soluzione $10^{-3}M$;
- preparare 500cc di reattivo sciogliendo nello stesso pallone 400mg di ferricianuro di potassio e 10g di carbonato di sodio;
- numerare 6 provette asciutte e porre rispettivamente

| mL di glucosio $10^{-3} M$ | mL di ferricianuro di potassio | mL H ₂ O (\div 10mL) | concentrazione di glucosio mM |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 0,25 | 5 | 4,75 | 0,025 |
| 0,5 | 5 | 4,5 | 0,05 |
| 1 | 5 | 4 | 0,1 |
| 1,5 | 5 | 3,5 | 0,15 |
| 2 | 5 | 3 | 0,2 |
| 2,5 | 5 | 2,5 | 0,25 |

- **immergere le provette in un bagnomaria bollente per 5 minuti**
- raffreddare e leggere le assorbanze a **410nm** dopo azzeramento con acqua.
- elaborare i dati: l'equazione della retta ottenuta sarà utilizzata in seguito per risalire dall'assorbanza della soluzione alla quantità di zucchero invertito, espresso in mM, prodotto dall'enzima.

DETERMINAZIONE DELLA V_M E DELLA K_M DELL'ENZIMA INVERTASI

Reagenti:

enzima invertasi; ferricianuro di potassio; carbonato di sodio; saccarosio 0,05M; tampone acetato pH 4,5 (CH₃COONa + CH₃COOH)

- preparare 100cc di una soluzione di saccarosio 0,05M
- preparare 500cc di tampone a pH 4,5 partendo da una soluzione 0,025M di acetato di sodio ed aggiungere CH₃COOH fino al valore di pH indicato
- numerare 8 provette asciutte e porre rispettivamente:

| mL di saccarosio 0,05 M | mL tampone acetato (÷ 5mL) | concentrazione di saccarosio mM |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 0,05 | 4,95 | 0,5 |
| 0,1 | 4,9 | 1,0 |
| 0,15 | 4,85 | 1,5 |
| 0,2 | 4,8 | 2,0 |
| 0,25 | 4,75 | 2,5 |
| 0,3 | 4,7 | 3,0 |
| 0,35 | 4,65 | 3,5 |
| 0,4 | 4,6 | 4,0 |
| 0,45 | 4,55 | 4,5 |
| 0,5 | 4,5 | 5,0 |

- **Immergere le provette in un bagnomaria a 40°C e dopo condizionamento aggiungere in ognuna 50µL di enzima.**
- **Dopo 1minuto bloccare al reazione con l'aggiunta di 5 mL di soluzione alcalina di ferricianuro di potassio**
- **Immergere le provette in un bagnomaria bollente per 5 minuti.**
- Raffreddare e leggere le assorbanze a 410nm dopo azzeramento con acqua.
- Elaborare i dati e determinare V_m e K_m

Informazioni su salute/ sicurezza/ ambiente

Consultare preventivamente le schede di sicurezza per le informazioni riguardanti tossicità/pericolosità ed i DPI da utilizzare per la manipolazione delle sostanze previste in questo metodo.

Per i prodotti di scarto derivanti dall'utilizzo di questo metodo attenersi alle specifiche procedure di laboratorio.

| Reagente | Simboli | Fraasi di rischio |
|------------------------------|--|-------------------|
| Potassio ferricianuro | Non abbiamo a disposizione dati adeguati per una valutazione tossicologica. Non è quindi possibile una classificazione secondo le corrispondenti categorie di pericolosità ai sensi della Direttiva 67/548/CEE e della normativa locale. In questo contesto non si escludono proprietà pericolose. | |
| Sodio carbonato | Xi | R:36 |
| Glucosio o fruttosio | Sostanza non pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE. | |
| Enzima invertasi | Sostanza non pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE | |
| Sodio acetato | Sostanza non pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE | |
| Acido acetico | C | R: 10-35 |