

## Cap. 1) CENNI DI MICROBIOLOGIA E BIOCHIMICA

### 1.1) Introduzione

L'uomo ha da sempre impiegato processi **biotecnologici** per ottenere prodotti alimentari (vino, pane, etc.). In queste lavorazioni egli faceva inconsapevole uso di **biocatalizzatori** costituiti da **microrganismi**, sfruttandone le **attività enzimatiche** in essi contenute. Lo sviluppo della consapevolezza scientifica sulla natura dei fenomeni connessi a queste trasformazioni può essere grosso modo articolato nei seguenti momenti:

1783 Spallanzani osserva per la prima volta attività **in vitro**.

*Il grande scienziato italiano dimostrò che il succo gastrico di falco era capace di per sé di liquefare la carne. In realtà, egli aveva evidenziato l'attività **proteasica** del succo: un concentrato di enzimi in grado di scindere le **proteine in amminoacidi**.*

1833 Payen e Persoz recuperano da un estratto di malto una sostanza in grado di promuovere l'**idrolisi** dell'**amido** e la chiamano "diastasi", cioè capace di separare, poiché mediante essa era possibile separare zuccheri solubili dall'amido insolubile.

*Oggi riconosciamo che il preparato era una soluzione impura dell'enzima **amilasi**.*

1835 Berzelius enuncia il concetto di **catalisi**, basandosi su osservazioni sulla **pepsina**.

*E' interessante osservare che il concetto di catalizzatore è stato sviluppato in seguito ad osservazioni su fenomeni biologici, ben prima che nascessero i catalizzatori artificiali.*

1871 Pasteur individua nei processi di fermentazione l'espressione dell'attività vitale di microrganismi.

*In quegli anni si ebbe una furiosa polemica con i maggiori chimici dell'epoca, principalmente Liebig e Stahl, fautori di una teoria puramente chimica della fermentazione.*

1878 Kühne propone il termine **enzima** (= nel lievito)

1897 I fratelli Buchner dimostrano che un enzima esplica la sua attività anche in assenza di **cellule**

1926 Sumner cristallizza l'enzima ureasi e dimostra, fra lo scetticismo generale, che si tratta di una **proteina**.

1960 Viene "sequenziata" la **ribonucleasi**

*E' stata cioè determinata la **sequenza degli amminoacidi (struttura primaria)** che formano la **macromolecola** enzimatica ( $PM = 13.700$  Dalton; peso dell'idrogeno = 1 Da)*

1969 La ribonucleasi è **sintetizzata**, cioè costruita artificialmente a partire dagli amminoacidi costituenti.

Negli ultimi quaranta anni, lo stato della conoscenza sui fenomeni che regolano la vita dei microrganismi ha raggiunto completezza tale da consentire lo sviluppo di una **biotecnologia** basata sul loro impiego. Un moderno **ingegnere biochimico** si pone come obiettivo l'utilizzo consapevole ed ottimale di microrganismi e/o di enzimi per lo sviluppo di processi di interesse industriale. Per quanto molte delle equazioni e dei modelli che si impiegano siano mutuati dall'ingegneria chimica tradizionale, non è pensabile affrontare lo studio dell'**ingegneria delle reazioni biochimiche** considerando la cellula come una "scatola nera", ossia senza prenderne in considerazione l'architettura interna ed i fenomeni che ne regolano il funzionamento vitale. In questo primo capitolo verranno pertanto sviluppate alcune nozioni elementari di **microbiologia** e di **biochimica**, sulla cui importanza si richiama l'attenzione degli allievi ingegneri chimici biotecnologi, i quali devono essere ben consapevoli del fascino intellettuale insito nel carattere interdisciplinare dell'indirizzo da essi scelto, ma anche delle necessità di arricchimento culturale che questo comporta.

## 1.2) Concetti introduttivi di microbiologia

Gli attributi propri della vita non si riscontrano mai tutti insieme nel mondo inanimato. Gli esseri viventi si **muovono**, **scambiano sostanze** con l'ambiente esterno, **reagiscono** agli **stimoli** che da esso provengono, **crescono**, si **riproducono** e **muoiono**. L'insieme di queste funzioni si regge essenzialmente sulla **sintesi ordinata** di **molecole giganti** a partire da costituenti più semplici. Queste **macromolecole** hanno scarsissima probabilità

di apparire spontaneamente e tendono a degradarsi. Il complesso delle reazioni chimiche che devono instaurarsi per assicurare il mantenimento della vita avviene perciò in sistemi strettamente controllati, ed è localizzato in spazi nettamente separati dall'ambiente circostante: le **cellule**.

La microbiologia si occupa dello studio degli organismi viventi di dimensioni caratteristiche tali da renderli invisibili ad occhio nudo, tipicamente inferiori al **decimo di millimetro**. Per quanto di dimensioni così ridotte, i **microrganismi** sono sistemi molto complessi. Lo studio delle loro caratteristiche può essere condotto solo attraverso l'analisi delle singole parti, in ciò confortati da un postulato finora mai sperimentalmente smentito: per quanto le varie cellule siano diverse, i loro componenti ed i meccanismi che ne regolano il funzionamento sono universali.

L'attività di una cellula vitale può così essere schematizzata

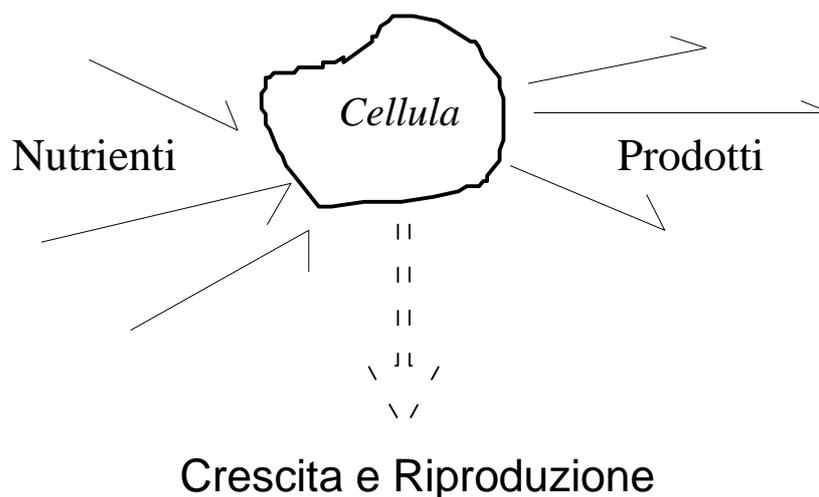


Figura 1.1 Schema di flusso di una cellula

Disponiamo di parecchie opzioni di utilizzo dei microrganismi: sviluppo di processi di **accrescimento della biomassa**, nei quali il prodotto desiderato sono le stesse cellule dei microrganismi (esempio, produzione di mangime per animali); **recupero dei prodotti** che la cellula genera a partire dalle sostanze contenute nell'ambiente che la circonda e che in esso rilascia (esempio, fermentazione ad etanolo); **estrazione** di prodotti non **escreti** all'esterno (esempio, produzione di **enzimi endocellulari**); elaborazione dell'**ambiente** in cui i microrganismi si trovano con eliminazione di sostanze nocive in altre a minore "impatto ambientale" (esempio, depurazione biologica di reflui); rimozione di inquinanti

mediante veicolazioni dall'ambiente esterno all'interno della cellula (esempio, **bioaccumulazione** di metalli pesanti).

E' tradizione della microbiologia di classificare i **protisti**, ovvero gli organismi viventi unicellulari e quelli costituiti da più cellule indifferenziate, secondo il seguente schema:

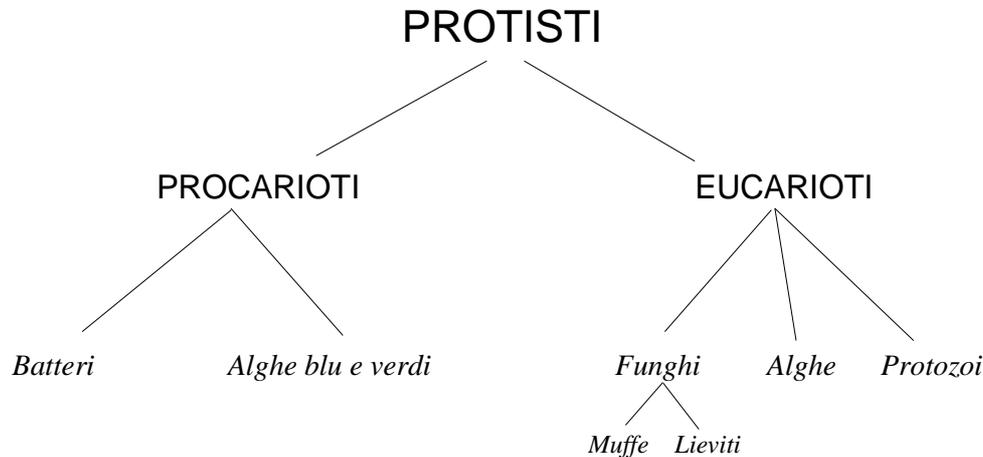


FIGURA 1.2 Classificazione degli organismi unicellulari e pluricellulari semplici

I **procarioti** sono organismi unicellulari **sprovvisi di un nucleo racchiuso in una membrana**. Hanno dimensioni ridotte ( $0.5 < D < 3 \mu\text{m}$ ,  $V \cong 10^{-12} \text{ cm}^3$ ,  $M \cong 10^{-12} \text{ g}$ ), contenuto d'acqua dal **50 al 80%** e si riproducono rapidamente: tipicamente, in condizioni ottimali **raddoppiano** di numero ogni **30 minuti**. Si noti che la dimensione caratteristica dei procarioti è limitata superiormente: l'ordine di grandezza del volume non supera il micron cubico perché le sostanze in esso contenute devono raggiungere concentrazioni tali da garantirne una sufficiente reattività. Esse **diffondono** in tutto lo spazio indifferenziato a disposizione sotto limitati gradienti di concentrazione. Se il volume fosse troppo elevato, il **costo energetico** della sintesi di questi reattivi sarebbe proibitivo.

L'interno della cellula procariota non appare infatti organizzato in strutture ben differenziate, a parte i **ribosomi**, sedi di importanti sintesi biochimiche, ed una zona **nucleare**, i cui confini non sono nettamente definiti, che rappresenta il settore preposto alla gestione del materiale informativo necessario al **controllo** delle attività vitali e di riproduzione. Il tutto è immerso in una fase acquosa, che prende il nome di **citoplasma** al cui interno si svolgono le funzioni metaboliche. L'insieme è delimitato da una **membrana plasmatica** spessa intorno ai  $70 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm}$ ) che svolge funzioni di regolazione degli scambi selettivi "IN e OUT" con l'ambiente circostante e da una **parete** più esterna dello spessore di circa  $200 \text{ \AA}$ , che svolge essenzialmente funzioni strutturali.

I **batteri** sono fra i rappresentanti della classe maggiormente impiegati a scopo biotecnologico. Questi microrganismi vivono generalmente **isolati** e sono molto **versatili**. Si adattano all'ambiente in cui si trovano, e possono utilizzare come nutrienti le sostanze più svariate: ne consegue che esercitano scarso **controllo** sull'ambiente stesso.

Questi procarioti vengono tradizionalmente distinti in base alla loro forma (**cocchi**, **bacilli**, **spirilli**) ed alle proprietà della loro parete rispetto alla reazione con un determinato colorante (**gram-positivi** e **gram-negativi**). Se ne conoscono inoltre di **aerobi** (necessitano dell'ossigeno per vivere) e di **anaerobi** (non ne necessitano, e spesso l'ossigeno risulta tossico per essi); questo diverso "stile metabolico" può essere **obbligato**, oppure **facoltativo**: in quest'ultimo caso il microrganismo si adatta all'ambiente cambiando opportunamente le sue vie metaboliche. Posti in un ambiente incompatibile con il mantenimento delle funzioni vitali, i batteri possono **sporificare**: si pongono in **animazione sospesa** e permangono sotto forma di spore, particolarmente resistenti, fino a che le condizioni esterne non ritornino adeguate per una piena funzionalità vitale.

Una classe particolare di batteri è quella dei **cianobatteri** (noti anche come **alghe blu**) che sono i soli esseri capaci di vivere unicamente di materia inorganica (acqua, alcuni sali, anidride carbonica e azoto). Sono particolarmente voluminosi ( $30 \mu\text{m}^3$ ) e sono capaci di **fotosintesi**. Molto probabilmente i cianobatteri, esistenti da più di tre miliardi di anni, hanno costituito la prima fonte di ossigeno per l'atmosfera. Più recentemente, sono stati individuati **archeobatteri** che vivono nel buio totale degli abissi marini in prossimità di sorgenti solforose, da cui ricavano energia.

Il modesto volume dei batteri li ha resi a lungo **inosservabili** da parte dell'uomo, che però ha imparato a conoscerli attraverso gli effetti della loro presenza, dato che molti di essi sono parassiti nefasti per la sua salute. I batteri esistono ovunque, negli oceani, sulle rocce, nel pulviscolo atmosferico, a contatto di qualunque oggetto ed essere vivente (si stima che in un grammo di terreno fertile ne siano presenti parecchi miliardi) e svolgono un ruolo chiave nell'economia della **biosfera**. Esplicano la maggior parte del lavoro di **riciclaggio** delle **molecole organiche** dopo la morte degli organismi superiori.

Gli **eucarioti** possiedono un **nucleo** ben definito e racchiuso all'interno di una **membrana**. Svolgono le loro attività vitali in compartimenti ben differenziati al loro interno, separati ciascuno da membrane, e tra le varie zone avvengono in continuazione scambi. La maggiore diversificazione si ripercuote quindi nella necessaria presenza di più complessi meccanismi regolatori. Gli eucarioti possono raggiungere volumi caratteristici **1000 ÷ 10000 volte maggiori** di quelle dei procarioti. Ciò si deve al fatto che le reazioni

biochimiche vitali avvengono in tutta una serie di **organuli**, il cui volume è comparabile a quello di un'intera cellula procariota, ed al cui interno si possono raggiungere le concentrazioni di reattivi necessarie al buon procedere di esse. Non si osservano cellule molto più grandi perché il **fabbisogno** di nutrienti aumenta col **cubo** delle dimensioni, ma la **velocità di ingresso** di essi dall'ambiente circostante dipende dall'area della superficie esterna del microrganismo, e quindi dal **quadrato** delle dimensioni.

Il **nucleo** occupa circa da un terzo ad un decimo o anche meno del volume citoplasmatico degli eucarioti, a seconda delle dimensioni della cellula: al suo interno si distinguono uno o più **nucleoli**, mentre il restante spazio è occupato da zone uniformi di **cromatina**; l'intera struttura garantisce il **trasferimento di informazione genetica**. Fra gli organuli immersi nel citoplasma, i più numerosi sono i **mitocondri**, di forma filamentosa o di bastoncino, veri e propri **reattori biochimici** preposti alla gestione **energetica** (è l'unica parte della cellula che **consuma ossigeno** e nei microrganismi che utilizzano la luce vengono affiancati dagli analoghi **cloroplasti**, sede della **fotosintesi**). Questi organuli sono delimitati da una doppia membrana, che separa il volume totale in uno spazio matriciale, all'interno della prima membrana, ed in uno spazio di intercapedine fra le due membrane. Naturalmente anche negli eucarioti esistono i **ribosomi**, con funzioni identiche a quelle svolte nei procarioti. Si osservano poi delle strutture recanti da due a dieci sacche circolari schiacciate, i **dictiosomi** di **Golgi**, che spesso si collegano tra loro dando l'impressione di un **reticolo**: le funzioni di questi organuli sono essenzialmente legate alla **maturazione**, al **movimento** ed alla **ripartizione** di **macromolecole** tra compartimenti interni alla cellula e verso l'esterno. I **lisosomi** sono organuli tondeggianti, delimitati da una membrana fortemente **impermeabile**: il loro interno è acido e contiene vari enzimi idrolitici che, qualora si spandessero indiscriminatamente nel citoplasma, degraderebbero le macromolecole ivi contenute provocando la distruzione della cellula. Il funzionamento dei lisosomi è ovviamente mirato ad esplicarsi **quando e dove** serve provocare degradazioni. I **perissosomi**, non necessariamente presenti in tutte le cellule, contengono enzimi, le **ossidasi**, capaci di sottrarre idrogeno ad una sostanza ridotta combinandolo con ossigeno per produrre **perossido di idrogeno**, che è fortemente tossico. La concentrazione di perossido è controllata da un altro enzima, la **catalasi**, che lo decompone in acqua. Si pensa che questi organuli siano un retaggio di antichissime strutture preposte ad impedire all'ossigeno proveniente dalla fotosintesi di ossidarsi distruggendo molecole vitali. In mancanza dei loro enzimi, gli organismi viventi difficilmente sopravvivono.

Tipici rappresentanti degli eucarioti sono i **lieviti**, microrganismi molto importanti in biotecnologia, di lunghezza compresa tra 5 e 30  $\mu\text{m}$  e del diametro tra 1 e 5  $\mu\text{m}$ , che **non** possono estrarre energia dalla luce solare. Le **muffe** costituiscono un altro tipo di microrganismo molto impiegato nei processi biotecnologici. Esse sono **funghi superiori** dotate di strutture dette **miceli**, che si ramificano in **ife**. **Alghe e protozoi** possono essere rispettivamente riguardate come forme primitive di **piante** ed **animali** e vengono impiegate come fonte di alimenti per animali e per l'uomo. Infine, va ricordato che ultimamente si è sviluppata una biotecnologia che fa impiego di **cellule isolate** da **tessuti animali e vegetali**.

### Frazionamento delle cellule

Ciascuna delle strutture interne alla cellula descritte sommariamente in precedenza può contenere una o più sostanze di interesse pratico per il biotecnologo, che è quindi spinto al **recupero frazionato dei componenti la cellula**. Una delle tecniche più frequentemente impiegata per la separazione degli organuli sfrutta la **differenza di densità**. Si parte da una **sospensione cellulare**, la si **omogeneizza** (si rompe la membrana mediante **sonicazione**, oppure per **azione meccanica**) e si procede ad una **centrifugazione differenziale**.

Si faccia riferimento alla Figura 1.3, che rappresenta schematicamente un rotore di centrifuga. Durante il funzionamento della macchina, una particella contenuta nella provetta solidale al rotore è soggetta alla forza di campo (diretta ortogonalmente all'asse di rotazione e nel verso crescente del raggio); alla forza di attrito ed alla spinta di Archimede (dirette come la prima, ma in verso opposto). L'accelerazione di gravità è ovviamente trascurabile, dato il regime di rapida rotazione in atto. L'equilibrio fra le forze impone:

$$6\pi\mu R u_r = \frac{4}{3}\pi R^3 G(\rho_p - \rho) \quad (1.1)$$

dove  $\mu$  è la **viscosità del mezzo liquido**,  $R$  il **raggio** della **particella**,  $u_r$  la **velocità di sedimentazione** ( $= dr/dt$ ),  $G$  l'**accelerazione di campo** ( $= \omega^2 r$ ),  $\rho_p$  la **densità della particella** e  $\rho$  quella del **liquido**. Si noti che si è fatto uso della legge di **Stokes**, assimilando il regime di moto a quello laminare: nelle condizioni praticamente vigenti ciò è sicuramente esatto.

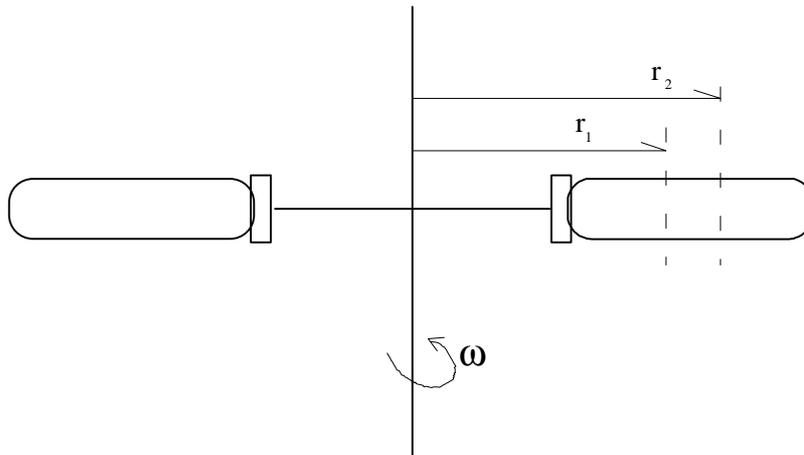


FIGURA 1.3 Il rotore di una centrifuga

Effettuando le sostituzioni indicate per le quantità espresse nella (1.2.1) si perviene alla seguente equazione differenziale:

$$\frac{dr}{r} = \frac{2}{9\mu} \omega^2 R^2 (\rho_P - \rho) dt \quad (1.2)$$

La (1.2) va integrata per ottenere il tempo **t** necessario alla particella per percorrere lo spazio radiale **compreso tra r<sub>1</sub> e r<sub>2</sub>**:

$$t = 9\mu 2\omega^2 R^2 (\rho_P - \rho) \ln\left(\frac{r_1}{r_2}\right) \quad (1.3)$$

Modulando opportunamente il tempo di centrifugazione e l'accelerazione **G** è possibile classificare le particelle in base alla loro densità. I valori di **G** che si riscontrano nelle centrifughe variano da un minimo di **600g** (600 volte l'accelerazione di gravità) ad un massimo di **60000g**. Per blandi regimi di rotazione, ad esempio **600g** per **10 minuti**, sedimentano al fondo di una provetta (circa 10 cm di cammino radiale) i **nuclei**, le **cellule** non rotte e grossi **frammenti** di **membrana** citoplasmatica. Si recupera la sovratanante e la si sottopone a centrifugazione più spinta, ad esempio **15000g** per **5 minuti**: sul fondo si raccoglieranno i **mitocondri**. Centrifugando ulteriormente il sovratanante (**60000g** per **1 ora**) si recuperano sul fondo i **ribosomi** e **frammenti** di **reticolo endoplasmatico**, mentre il sovratanante contiene essenzialmente del **citoplasma**.

### 1.3) Elementi di biochimica

Affinché la cellula possa espletare le funzioni vitali, in ognuna delle sue parti devono avvenire complesse reazioni chimiche: migliaia di diverse sostanze devono essere sintetizzate e scambiate fra i compartimenti interni e con il mondo esterno. La vita comporta la **sintesi ordinata** di **biopolimeri** a partire da sostanze chimiche a basso peso molecolare che la cellula ottiene dal mezzo in cui vive.

Il microrganismo preleva dall'ambiente **precursori** (18 ÷ 50 Da, **anidride carbonica, acqua, azoto**) e **intermedi** (50 ÷ 250 Da, **α-chetoacidi, acetati, malonati**, etc). I **mattoni costitutivi** delle macromolecole (100 ÷ 350 Da) sono **amminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi, glicerolo, mononucleotidi**. Assemblando queste unità si realizzano le **macromolecole**:  $10^3 \div 10^9$  Da, **lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici, proteine**.

La chimica della vita è essenzialmente chimica delle macromolecole. I polimeri presenti nelle cellule possono essere **ripetitivi**, formati da **una** sola unità **monomerica**, oppure **non ripetitivi**, costituiti anche da una ventina di differenti unità monomeriche. Le molecole giganti ripetitive conferiscono **resistenza strutturale** e **chimica** ai compartimenti cellulari. Inoltre, esse rappresentano un conveniente modo per **immagazzinare** nutrienti: ad esempio, un accumulo intracellulare di **glucosio** (180 Da) provocherebbe un intollerabile aumento della **pressione osmotica**, con conseguente **rottura** della membrana cellulare (perché?). Questo zucchero, nutriente **energetico** fondamentale, viene allora posto in riserva sotto forma del polimero **glicogeno**, un polisaccaride di peso molecolare fino a 10000 volte superiore, la cui esigua concentrazione citoplasmatica non dà luogo a problemi osmotici. La cellula provvede poi all'occorrenza a generare **gradualmente** il glucosio necessario **degradando controllatamente** le molecole di glicogeno.

La **cellulosa**, sintetizzata dai vegetali anch'essa a partire dal glucosio, è il biopolimero più abbondante sulla terra e rappresenta un valido esempio di molecola gigante ripetitiva con funzioni strutturali: conferisce infatti con le sue fibre resistenza meccanica ai tessuti vegetali. Le **proteine** costituiscono le molecole organiche più abbondanti presenti nella cellula, costituendo dal 30% al 70% in peso sul secco degli esseri viventi. Questi polimeri non ripetitivi esistono in una grande varietà di tipi ed esplicano le più svariate funzioni.

Nel seguito si darà una descrizione della struttura molecolare e dei meccanismi di sintesi di tutte le sostanze precedentemente citate.

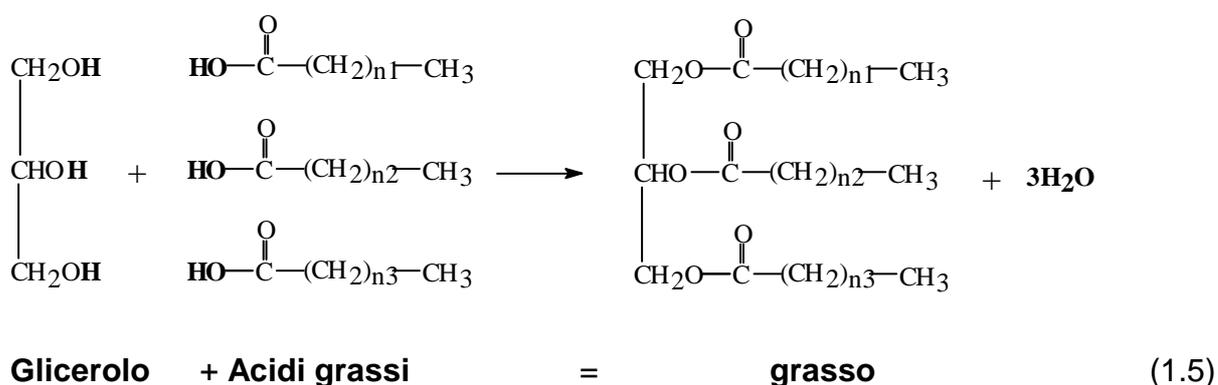
#### Lipidi

Sono **insolubili** in acqua e si ritrovano perciò elettivamente presenti nelle **membrane plasmatiche** ed in quelle degli **organuli**. Gli **acidi grassi** sono lipidi relativamente semplici, di formula generale:



con **n** generalmente **pari** e **compreso** tra **12** e **20**. Sono tuttavia presenti acidi a  $n = 3$  e  $5$ . L'acido rappresentato dalla (1.4) è **saturo** perché lo sono tutti i legami che costituiscono la catena polimerica; se uno di questi fosse un **doppio legame**, si parlerebbe di acido grasso **insaturo**. Gli acidi grassi svolgono un ruolo chiave nell'organizzazione del vivente mercé la loro natura **anfifilica**: la parte idrocarburica della molecola non è solubile in acqua, mentre la testa carbossilica lo è. Poste in prossimità **dell'interfacie** aria-acqua, delle molecole di acido grasso formano un **monostrato orientato**: le **teste polari** in **soluzione** e le **code apolari** dal lato **aria**. La solubilità degli acidi grassi è peraltro molto bassa. A concentrazioni superiori al limite necessario alla formazione del monostrato, infatti, le molecole si organizzano in **micelle**: si raggruppano cioè in strutture a **simmetria radiale**, al cui interno sono a contatto le parti idrofobiche e la cui zona esterna, idrofilica, è circondata di molecole di acqua. Il processo è spontaneo ed avviene con **diminuzione di energia libera** per effetto del maggior numero di **interazioni** idrofobiche ed idrofiliche rispetto al monostrato.

I **grassi**, importante **riserva energetica**, sono anch'essi lipidi e rappresentano gli **esteri** di acidi grassi e **glicerolo**:



se uno degli acidi grassi è sostituito dall'**acido fosforico** ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), si ha un **fosfogliceride**, altra classe di molecole di fondamentale importanza.

Immergendo un setto recante un piccolo foro in una soluzione acquosa di fosfogliceridi, si nota nell'apertura la formazione spontanea di un **doppio strato molecolare**, dello spessore di circa **70 Å**, in cui le molecole di fosfogliceride si **affacciano presentandosi** l'un l'altra le **code**. Questa disposizione planare richiama fortemente l'analoga struttura presente nella **membrana plasmatica**, prevalentemente costituita da fosfogliceridi, i quali esplicano un ruolo chiave nel regolare gli **scambi selettivi di materia** con l'ambiente esterno.

Infine, va ricordato che le **vitamine A, D, E e K** sono **liposolubili** e possono pertanto essere immagazzinate solo laddove siano presenti i lipidi.

### Zuccheri e polisaccaridi

I **carboidrati** hanno formula generale:



I **monosaccaridi**, o **zuccheri semplici**, hanno **n** compreso tra **3** e **9**: tale è il **glucosio**, la cui formula bruta è **C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>**: questo ed alcuni altri zuccheri semplici entrano a far parte di complesse vie metaboliche preposte allo sviluppo di energia necessaria al mantenimento delle funzioni vitali cellulari. Si conoscono anche molti **disaccaridi**, quale ad esempio il **saccarosio (zucchero comune)** la cui molecola è formata dalla **condensazione** di una molecola di glucosio ed una dell'**isomero fruttosio** mediante eliminazione di una molecola di acqua.

Di un polisaccaride, la cellulosa, si è già detto. Giova in questa sede menzionare un'altra macromolecola di interesse biologico: l'**amido**, polimero ripetitivo del glucosio con funzioni analoghe al glicogeno, ma sintetizzato dai **vegetali**.

### Nucleotidi

Alcuni biopolimeri assolvono all'interno della cellula funzioni **informazionali**: sono preposti alla **trasmissione** dei **caratteri ereditari** all'atto della **duplicazione** e contengono il "programma" di istruzioni per dirigere le sintesi verso la produzione delle giuste molecole nel momento e nel posto giusto. L'informazione è **codificata** nella **sequenza** dei mattoni fondamentali che formano queste complessissime macromolecole: i **nucleotidi**.

Si tratta di molecole a carattere acido che si possono considerare come ottenute a partire da tre costituenti: **acido fosforico**, uno **zucchero** a **cinque** atomi di carbonio ed una **base azotata**. Se lo zucchero è il **ribosio**, i nucleotidi formeranno il polimero **RNA**, **acido ribonucleico**; se lo zucchero è il **deossiribosio**, il polimero **DNA**, **acido deossiribonucleico**. Si conoscono **cinque** diverse basi azotate: **adenina (A)**, **guanina (G)** e **citocina (C)** sono **comuni** a RNA e DNA; **la timina (T)** si trova **solo** nel DNA e **l'uracile (U)** **solo** nel RNA. (A) e (G) sono delle **purine**, mentre (T), (C) e (U) delle **pirimidine**. Le formule di struttura sono riprodotte nelle illustrazioni del libro di testo, che si raccomanda vivamente di consultare per avere una chiara idea della disposizione spaziale degli atomi costituenti queste molecole fondamentali. Rimuovendo il gruppo fosfato dai nucleotidi si ottiene il corrispondente **nucleoside**. Tra questi, di primaria importanza risulta **l'adenosina**, della quale il corrispondente nucleotide può essere visto come il derivato **adenosin-monofosfato (AMP)**. L'aggiunta di due ulteriori molecole di acido fosforico porta alla fondamentale molecola **adenosin-trifosfato (ATP)**.

L'ATP è coinvolto nei processi **energetici** vitali: l'idrolisi del legame **fosfodiesterico** che congiunge il gruppo fosfato terminale al resto del nucleoside rende disponibili 7300 calorie per mole. Questa molecola rappresenta una riserva di energia, è presente in piccola quantità nelle cellule e deve quindi essere continuamente sintetizzata al loro **interno**, essendo troppo grande per poter passare attraverso la membrana citoplasmatica. Lo zucchero semplice glucosio è invece in grado di permeare la membrana e all'interno del citoplasma subisce la **glicolisi**: attraverso una decina di reazioni viene scisso in due molecole a tre atomi di carbonio. Si consumano **due** molecole di ATP, ma se ne producono **quattro**. Solo il 2% dell'energia chimica contenuta nel glucosio viene immagazzinata in ATP: la glicolisi ha quindi un **rendimento energetico** molto basso. I procarioti aerobi e tutti gli eucarioti utilizzano anche un meccanismo più evoluto della glicolisi, e cioè la **respirazione cellulare**, che prevede l'impiego di **ossigeno**. Il processo avviene nei mitocondri, e per ogni molecola di glucosio degradata si accumulano 36 molecole di ATP, con un rendimento energetico del **38%**. Maggiori dettagli sui cicli energetici saranno oggetto di altro corso di indirizzo.

### DNA e RNA

La condensazione dei nucleotidi avviene con gli **anioni fosfato** che fanno da **ponte** tra gli atomi di **carbonio 3'** e **5'** di due successive molecole (essendo **1'** quello che **lega** la **base**). Il processo, iterato moltissime volte, porta a molecole giganti. Ad esempio, il DNA

di un procariota può avere peso molecolare dell'ordine di  **$2 \times 10^9$  Da**. Le cariche negative dei gruppi fosforici sono bilanciate da **ioni bivalenti** nei **procarioti** e da **amminoacidi** negli **eucarioti**. La sequenza di nucleotidi inizia per convenzione dall'estremità recante il carbonio 5' libero e termina con quella avente il 3' libero. La struttura del DNA è costituita da **due catene polinucleotidiche** che corrono in **polarità opposta**, cioè all'estremità 5' di una corrisponde la 3' dell'altra, e che sono avvolte in **doppia elica destrorsa** con **passo di 34 Å (dieci nucleotidi)**. All'interno della doppia elica si trovano affacciate le basi azotate di ciascuna catena, che si **accoppiano** attraverso legami idrogeno: **A-T** mediante **due** legami, e **G-C** mediante **tre**. Non esistono altri possibili accoppiamenti: in questo modo le due catene sono l'una lo stampo dell'altra, nel senso che è possibile ricostruire una catena giustapponendo le opportune basi complementari a quelle dell'altra. Questa circostanza è la chiave per la **duplicazione** del DNA: una volta separate le due catene, su ciascuna di esse potrà essere costruita l'altra e si otterranno così due molecole di DNA perfettamente identiche all'originale.

Il DNA del batterio ***Escherichia coli*** è chiuso ad anello e forma un unico **cromosoma**, che si trova nella zona nucleare di questo procariota, e la cui circonferenza comprende **4700 kb (kilobasi, ovvero 1000 nucleotidi; il peso molecolare medio di 1 kb è 660 kDa)**. Il DNA degli eucarioti, contenuto nel nucleo, è diviso fra diversi cromosomi che possono essere molto più grandi di quello di un procariota, e che contengono fino a circa il 50% in peso di piccole **proteine**, dette **istoni**. Il tutto forma il materiale nucleare che prende il nome di **cromatina**. Gli eucarioti possiedono ulteriori, più piccole molecole di DNA nei mitocondri e nei cloroplasti. Inoltre, procarioti ed eucarioti hanno del DNA addizionale, da 4 a 50 kbasi di dimensioni, che forma i **plasmidi**, i quali codificano istruzioni per l'espletamento di funzioni non essenziali ma nondimeno utili, quali ad esempio lo sviluppo di resistenza agli antibiotici.

La funzione del DNA è conservare i **geni**, cioè i **segmenti di molecola** che codificano le istruzioni per la sintesi di molecole di RNA di specifica sequenza nucleotidica, le quali a loro volta coordinano la sintesi delle **proteine** che avviene nei ribosomi. Ogni cellula contiene migliaia di molecole per ciascuna delle migliaia di diverse proteine che possiede a corredo e la sintesi deve essere incessantemente operativa per rimpiazzare le molecole deteriorate. Utilizzando l'RNA come **intermediario**, si può "leggere" il programma di sintesi proteica tutte le volte che serve senza rischiare di danneggiare il prezioso ed unico DNA con troppo frequenti "consultazioni", le quali avvengono per grossi capi nella seguente maniera. I due filamenti della doppia elica si separano per un certo tratto,

esponendo un gene. I nucleotidi che andranno a formare la molecola di RNA, nel loro moto casuale, urtano contro quelli del DNA e stabiliscono un **contatto** basato sulla **corrispondenza ordinata** (**U** di fronte ad **A**, **A** di fronte a **T**, **G** di fronte a **C**, **C** di fronte a **G**): l'**enzima RNA-polimerasi** catalizza la condensazione della sequenza di nucleotidi e si forma una molecola di **RNA messaggero (m-RNA)**, molto più corta del DNA, ma tuttavia lunga fino a diversi micron, che si distacca dallo stampo, consentendo alla doppia elica di richiudersi. L'm-RNA costituisce circa il 2% sul totale dell'RNA di una cellula. Circa un 16% è invece costituito da **RNA di trasferimento (t-RNA)**, molto più piccolo, da 75 a 90 nucleotidi, che svolge compiti di **intermediazione** durante la lettura del codice di sintesi nei ribosomi. Il restante circa 80% è **RNA ribosomale (r-RNA)**.

### Amminoacidi e proteine

Le proteine sono polimeri non ripetitivi, di peso molecolare compreso tra 6 e oltre 1000 kDa, che si presentano in configurazione fibrosa o globulare. Queste macromolecole assolvono negli organismi viventi una grande varietà di funzioni: **regolatorie (insulina)**; di **trasporto (emoglobina)**; **protettive (trombina)**; di **immagazzinamento (caseina)**; **strutturali (collagene)**; **contrattili (miosina)**. Infine, sotto forma di **enzimi** le proteine svolgono il loro ruolo più importante: **biocatalizzatori** in grado di accelerare le reazioni vitali, che in loro assenza non avverrebbero con velocità sufficiente.

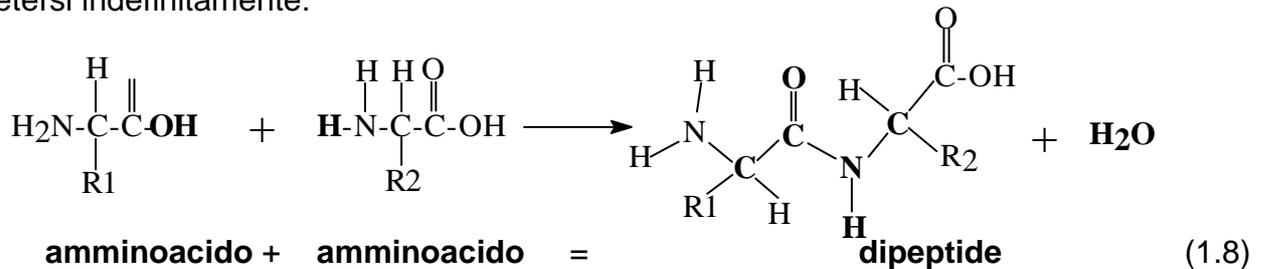
Indipendentemente dalla funzione svolta, le proteine presentano analoga composizione elementare media (**C, 50%**; **O, 23%**; **N, 16%**; **H, 7%**; **S, 3%**; **altro, 1%**) e sono costituite a partire dai **venti** diversi **α-amminoacidi** conosciuti in natura. Gli amminoacidi sono composti **bifunzionali** corrispondenti alla formula bruta (1.7). Si noti il gruppo **R** unito al carbonio **α** (il più **prossimo** al **carbossile**): esso **caratterizza** la molecola che, presentando un atomo di **carbonio asimmetrico**, può esistere in due forme **isomeriche**, delle quali solo la forma "**L**" appare generalmente in natura, la "**D**" essendosi ritrovata in alcuni **antibiotici** e nella **parete cellulare** di alcuni microrganismi.



Il gruppo **acido (carbossile)** e quello **basico (amminico)** di un amminoacido possono **ionizzarsi** in soluzione acquosa: la molecola presenta carica **positiva** a **pH bassi** e

**negativa** a **pH alti**. Il pH al quale l'amminoacido ha **carica netta nulla** è detto **punto isoelettrico**, corrisponde ad un **minimo di solubilità** ed è caratteristico di ciascuna molecola. In alcuni casi anche il gruppo R può essere polare ed addirittura ionizzabile.

La formazione delle proteine si basa sul **legame peptidico** che si instaura fra la funzione carbossilica di un amminoacido e quella amminica di un altro. Si ha una **condensazione** con eliminazione di una molecola d'acqua ed il processo può ovviamente ripetersi indefinitamente:



Il legame peptidico ha parziale carattere di **doppio legame**, e quindi i **sei atomi in neretto** nella (1.8) giacciono in **un piano**. I frammenti amminoacidici che rimangono dopo la condensazione vengono detti **residui** e prendono il nome dal corrispondente amminoacido, assumendo la desinenza **"-ile"**. I polimeri a basso numero di residui costituiscono i **polipeptidi**: ad esempio, molti **ormoni**, regolatori biologici di estrema importanza, sono polipeptidi. Per convenzione, si fa partire l'elenco dei residui (in termine tecnico, la **sequenza**) dall'estremità contenente il gruppo **amminico** libero. Le proteine possiedono un numero di residui dell'ordine di almeno un **centinaio**, e dato che il **peso molecolare medio** di un **residuo** è circa **120**, queste macromolecole hanno peso dell'ordine di **10 kDa**, e le più grandi conosciute eccedono i **1000 kDa**. E' chiaro che, al crescere della lunghezza della catena polimerica, le proprietà chimico-fisiche della macromolecola sono principalmente dettate dalla natura dei gruppi "R" dei residui, mentre le estremità libere perdono viepiù importanza.

Gli amminoacidi non sono gli unici costituenti di queste macromolecole. Le proteine **coniugate** contengono altri composti, sia **organici** che **inorganici**: il componente non amminoacidico prende il nome di **gruppo prostetico**. Ad esempio, l'**emoglobina** contiene quattro gruppi **eme**, che sono dei composti **organometallici** del **ferro**.

La molteplicità delle funzioni svolte dalle proteine nella cellula vivente riposa ovviamente sulla peculiare combinazione di amminoacidi necessaria a produrre la macromolecola. La sequenza di una particolare proteina è codificata nel m-RNA attraverso un codice basato su una **tripletta** (un **codone**) di basi **successive**: per

esempio, **CAG = glicina, CGC = arginina, AGU = serina, AUC = isoleucina**, e così via. Dato che **quattro** basi prese a **gruppi di tre** hanno **64** diverse combinazioni, il codice è ridondante ed alcuni amminoacidi possono essere rappresentati da più triplette.

Esistono 20 diversi t-RNA, ognuno capace di legare ad un'estremità uno ed un solo amminoacido, e recante all'altra estremità una tripletta, l'**anticodone, complementare** di quelle presenti sull'm-RNA. Il messaggero si inserisce nell'interstizio presente fra le due **subunità** che costituiscono la struttura di un ribosoma, e vi **scorre** attraverso. Quando un t-RNA possiede l'anticodone complementare del codone del messaggero che gli passa accanto, vi si colloca di fronte e l'amminoacido che trasporta si stacca, legandosi all'ultimo residuo precedentemente agganciato alla costruenda catena polipeptidica, che così si allunga a ritmo di una **ventina di unità al secondo**. Ogni m-RNA scorre in successione attraverso molti ribosomi, ripetendo con un lieve sfasamento temporale la stessa sintesi. La catena inizia sempre dal codone AUG (metionina), che il più delle volte verrà rimosso a molecola completata.

Come accennato in precedenza, le proteine svolgono una grande varietà di compiti all'interno della cellula ed è quindi naturale che ne esistano migliaia di varietà, le quali si distinguono fra loro non soltanto per la sequenza di residui che le compongono. Una molecola proteica è infatti caratterizzata da **quattro** diversi **livelli di organizzazione spaziale**.

Si chiama **struttura primaria** la **sequenza** degli **amminoacidi** costituenti la catena polimerica.

Si chiama invece **struttura secondaria** la **modalità di estensione** della catena polimerica imposta dall'**orientamento relativo** dei residui. La conformazione spaziale di una proteina non è infatti determinata dalla sola sequenza degli amminoacidi costituenti. Pur essendo la catena parzialmente impedita nei suoi gradi di libertà rotazionali per effetto della rigidità indotta dai legami peptidici, **un** legame su **tre** lungo la macromolecola è libero di **ruotare**. Ciò consente di portare il gruppo **C=O** di un residuo in prossimità del gruppo **NH** del residuo a distanza di **quattro unità** da esso: può così aver luogo la formazione di un **legame idrogeno** senza ingenerare alcuna distorsione nei legami vicini. Così, i diversi piani peptidici si **avvitano** nella cosiddetta  **$\alpha$ -elica**, che è **destrorsa** e conta **18 unità** per ogni **cinque giri**. Esistono anche conformazioni a **superelica**, costituite da due o tre  $\alpha$ -eliche avvolte tra di loro. E' poi possibile una seconda modalità di formazione di legami idrogeno ed avviene fra gruppi **C=O e NH di due distinte catene polimeriche**: la

conformazione che ne risulta è simile a quella di una striscia di carta pieghettata più volte e viene infatti indicata come struttura a  **$\beta$ -foglio ripiegato** (vedi Figura 1.4).

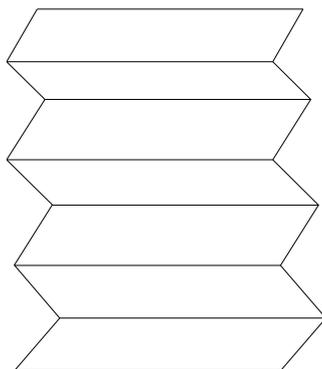


Figura 1.4 La struttura " $\beta$ "

Ingenerandosi queste strutture in alcune porzioni della molecola proteica, questa ne risulta stabilizzata per effetto del minore contenuto energetico. In soluzione acquosa, altri legami intramolecolari giocano poi un ruolo essenziale nello stabilizzare una proteina, e sono dovuti ai vari gruppi chimici in catena laterale delle unità amminoacidiche. Esiste infatti fra gli amminoacidi un ampio spettro di tipologie: mentre alcuni hanno catena laterale **alifatica** (alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina) e quindi in soluzione manifestano comportamento **idrofobico**, altri sono facilmente **ionizzabili** (acido glutammico, acido aspartico, lisina, arginina), oppure consentono la formazione di legami **idrogeno** (serina, treonina, asparagina, glutammina, tirosina) di **ponti disolfuro** (cisteina) e così via. Il complesso di queste **interazioni** rende possibile che la catena polimerica si ripieghi su sé stessa dando luogo ad una complessa conformazione **tridimensionale**: la **struttura terziaria**.

Infine, alcune proteine consistono di più di una unità polimerica e le diverse catene sono tenute insieme da interazioni simili a quelle descritte in precedenza. Il modo in cui le diverse unità si uniscono per dare luogo alla macromolecola ne costituisce la **struttura quaternaria**.

Come si vedrà nel seguito, l'**organizzazione spaziale** della molecola riveste importanza fondamentale perché è su di essa che si fondano le **capacità catalitiche** degli **enzimi**. Lo studente è chiamato a riflettere sul fatto che non esiste processo biotecnologico che non si espliciti attraverso l'azione di enzimi. Di conseguenza, praticamente tutta la restante parte del presente corso è dedicata allo studio degli enzimi, delle leggi che ne regolano il funzionamento, ed allo sviluppo dei fondamenti necessari

per una **tecnologia enzimatica**: in altre parole, all'**ingegneria delle reazioni biochimiche**.