

Lezione 11

Le Idrolasi: Fosfolipasi

Le fosfolipasi ed esterasi sono idrolasi strettamente correlate alle lipasi, che però operano su substrati diversi.

Fosfolipasi

Le fosfolipasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi di fosfolipidi, anche detti fosfoacil gliceroli.

I fosfoacil glicerolo sono derivati del glicerolo che hanno un gruppo fosfato sul carbonio 3, e delle catene aciliche sui carboni 1 e 2, tipicamente catene lunghe. Un composto così composto prende il nome di acido fosfatidico.

Nei fosfogliceridi il gruppo fosfato è normalmente esterificato con un alcol di piccole dimensioni.

Tra i fosfogliceridi troviamo:

- La fosfatidil etanolamina, dove il fosfato lega l'etanolamina, che a pH fisiologico ha un atomo di azoto protonato. Anche dette *cefaline*.
- La fosfatidil colina, dove il fosfato lega la colina, che è un derivato dell'etanolamina in cui l'N ha sostituenti metilici (CH₃)₃. Anche dette *lecitine*.
- La fosfatidil serina, dove il fosfato lega la serina in configurazione L.
- I fosfatidil inositoli, dove il fosfato lega il myo-inositolo. L'inositolo è un ciclitolo, cioè un anello a sei centri in cui tutti gli atomi sono atomi di carbonio, e tutti gli atomi dell'anello sono sostituiti con un gruppo ossidrilico. La struttura dell'inositolo è molto simile a quella dei monosaccaridi con conformazione a sedia, solo che l'O del ciclo è sostituito da un C. Ogni C porta un ossidrilico e 4 sostituenti diversi, per cui ogni C dell'inositolo è uno stereocentro, con la possibilità di avere 2⁶ stereoisomeri. Il mioinositolo è lo stereoisomero più abbondante nel nostro organismo.

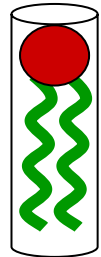
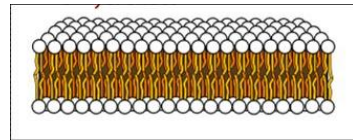
Caratteristica dei fosfolipidi è che gli acidi grassi presenti su C1 e C2 possono essere sia saturi che insaturi.

Proprietà

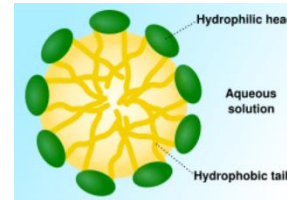
I fosfogliceridi sono importanti nella costituzione delle membrane cellulari, e ne regolano la fluidità in base al grado di saturazione delle catene aciliche che legano.

I fosfolipidi sono molecole anfifiliche, con le catene aciliche che formano una porzione idrofobica, ed il gruppo fosfato che è idrofilo. Possono essere quindi rappresentate come molecole con una testa polare e due code apolari.

Il fatto di avere questa conformazione è fondamentale per determinare la tipologia di assemblamento che si ha a livello macromolecolare. Il fosfogliceride come unità ha una forma pressoché cilindrica. Questo fa sì che i fosfogliceridi possano assemblarsi in maniera parallela l'una con l'altra, generando i doppi strati lipidici e quindi le membrane cellulari.

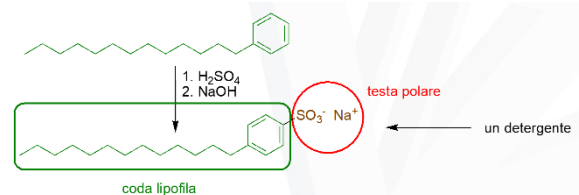


Se il fosfolipide avesse una sola coda, e fosse quindi un monogliceride, avrebbe una struttura conica, e non potrebbe assemblarsi in macrostrutture parallele come i doppi strati lipidici, ma darebbe luogo a strutture sferiche, quali le micelle.



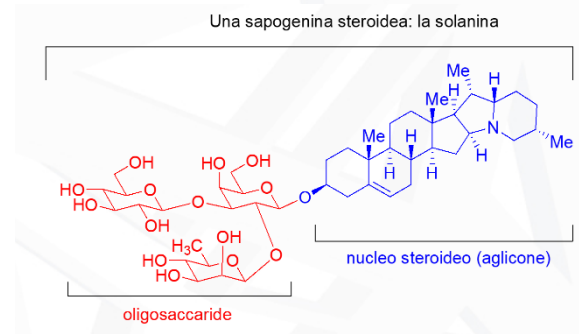
Le micelle sono generate dai saponi. I saponi vengono ottenuti per saponificazione dei trigliceridi, portando ai carbossilati di sodio o di potassio, quindi l'acido grasso in forma di sale.

Saponi ottenuti per sintesi chimica vengono prodotti a partire da derivati che prevedono una catena lipofila lunga con un anello benzenico che viene trattato con acido solforico e porta alla formazione di solfonati, con una testa polare ed una coda lipofila.



Altre strutture che possono dar luogo alle micelle sono le sapogenine, che sono derivati estratti da radici di alcune piante chiamate *saponarie*.

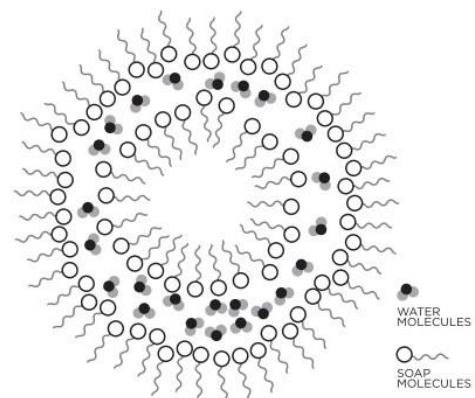
La saponaria (saponina) è costituita da derivati con una testa polare, nella molecola a destra un trisaccaride, ed una regione apolare, in questo caso un fitosterolo.



La liquirizia è una delle piante che produce queste saponine.

La micella è composta da fosfolipidi che si orientano con la testa polare verso l'esterno e la coda idrofobica verso l'interno. L'ambiente interno della micella è lipofilo, quindi riesce ad accogliere molecole lipofile, che vengono sospese in acqua.

Le bolle di sapone si formano con i saponi, perché le molecole di sapone si dispongono in maniera diversa nell'aria rispetto all'acqua, perché l'aria è apolare. Le molecole di fosfolipidi si dispongono quindi in due strati, uno esterno con le code rivolte verso l'esterno (l'aria) ed un altro con le code rivolte verso l'interno (sempre aria). Le teste polari dei due strati sono separate tra loro da molecole d'acqua. L'aria è composta principalmente da N_2 ed O_2 che essendo molecole omatomiche sono apolari. Per fare bolle di sapone più robuste si aggiungono molecole che migliorano le interazioni (ponti ad idrogeno) nello strato polare, ad esempio il glicerolo.



Rilevanza industriale dei fosfolipidi

I fosfolipidi possono dar luogo ad una varietà di strutture. Le micelle possono essere utilizzate come veicolo per il trasporto di farmaci nell'industria farmaceutica. Anche nell'industria cosmetica i fosfogliceridi permettono di mantenere miscele fasi idrofobiche ed idrofiliche.

Fosfolipasi

Le fosfolipasi sono enzimi di grande rilevanza industriale, e vengono utilizzate in vari ambiti.

- **Industria olearia**
Utilizzate per migliorare le proprietà fisiche degli oli di semi, nel processo di *degumming*, che prevede l'eliminazione di fosfolipidi vegetali per separarli dai trigliceridi, i quali vanno poi a comporre l'olio.
- **Nella produzione di integratori alimentari**
Fosfatidil serina e fosfatidil etanolamina
- **Lavorazione del tuorlo d'uovo**
Emulsionanti per la produzione di maionese ed altre salse.
- **Industria casearia**
La digestione di fosfolipidi aumenta il volume del formaggio. Sono usate per la produzione di mozzarella, yogurt, latticini e gelati.
- **Lavorazione dell'amido**
Nella produzione dello sciroppo di glucosio si usa una lisolecitina per idrolizzare la lisolecitina che blocca i filtri.
- **Panificazione**
Le fosfolipasi stabilizzano l'impasto, controllano il rapporto tra croccantezza e presenza di mollica nel pane. Aumentano il volume e prolungano il tempo di vita del prodotto. Oltre alle fosfolipasi vengono aggiunti emulsionanti fosfogliceridi con lunghe catene carboniose.
La prof dice che ste minchiate migliorano il pane, ma ora capisco perché il pane industriale qua fa così schifo...quando è bello il pane di giù!

Per la produzione industriale delle fosfolipasi si usa preferenzialmente *E.coli* (85,9%) e *Pichia pastoris* (8,6%).

Le fosfolipasi vengono classificate in base alla loro regioselezione e chemoselezione.

Le fosfolipasi A1 idrolizzano il legame estereo in posizione 1 del fosfogliceride. Le fosfolipasi A2 idrolizzano in maniera regioselettiva il legame estereo in posizione 2.

La fosfolipasi B non è regioselettiva, quindi idrolizza legami esterei sia in posizione 1 che in posizione 2.

Fosfolipasi C e fosfolipasi D sono chemoselettive ed idrolizzano legami fosfoesterei. Le fosfolipasi C rompono il legame fosfoestereo dal lato del glicerolo, mentre le fosfolipasi D rompono il legame estereo dal lato dell'alcol che forma la testa polare del fosfogliceride.

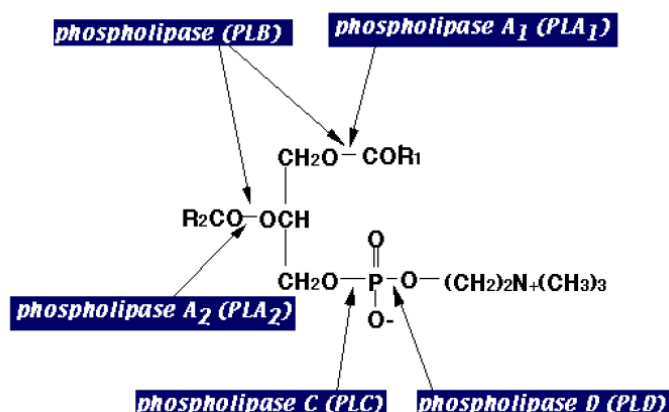
Le fosfolipasi A1, A2 e B che operano su legami esterei sono di fatto delle idrolasi analoghe alle lipasi, e possiedono la triade catalitica *serina-istidina-aspartico* ed operano con un meccanismo catalitico analogo.

In vivo queste fosfolipasi hanno una altissima specificità per i fosfogliceridi e non hanno attività sui trigliceridi. Diversamente dalle lipasi che hanno una ampia specificità di substrato.

In questi enzimi manca un loop, il loop $\beta 9$, che potrebbe essere il discriminatore della diversa specificità, ma potrebbe non essere l'unico fattore rilevante per la specificità.

Le fosfolipasi C e fosfolipasi D che idrolizzano legami fosfoesterei hanno meccanismi diversi.

La fosfolipasi D porta come prodotto all'acido fosfatidico, ed è un importante enzima coinvolto nel metabolismo dei fosfogliceridi. L'acido fosfatidico è un importante messaggero chimico coinvolto in meccanismi di trasduzione del segnale.



Negli ultimi anni è stato possibile ottenere fosfolipasi in quantità rilevanti per l'utilizzo industriale. Queste sono la fosfolipasi A1, A2 e C. La fosfolipasi D non è ancora stata prodotta a livelli industriali.

Fosfolipasi A2

Questa fosfolipasi ha suscitato grande interesse nell'industria dagli anni 2000. È stata espressa nei funghi nel 2002. Viene utilizzata per la panificazione ed il degumming degli oli di semi.

Questo enzima è stato evoluto mediante epPCR per il miglioramento della termostabilità. È anche stato usato lo shuffling per modificare la specificità di substrato di questi enzimi.

La PLA2 è stata inizialmente prodotta come sottoprodotto dell'insulina estratta dal pancreas di maiale. La produzione della proteina ricombinante in lieviti e funghi è stata ciò che ha accelerato l'utilizzo industriale dell'enzima.

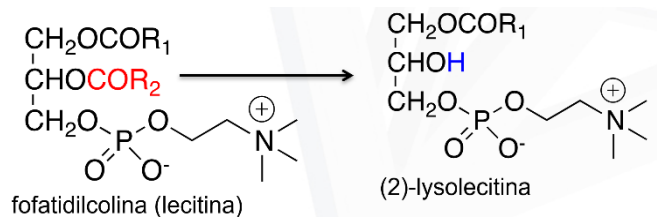
Produzione di lecitine

Le PLA1 e PLA2 vengono usate per modificare le lecitine, perché le lecitine hanno un basso potere emulsionante rispetto ai fosfogliceridi che hanno una sola catena lipofila. Le 2-lisolecitine (fosfogliceridi idrolizzati in posizioni 2) sono le più utilizzate industrialmente.

Le PLA2 vengono ancora prodotte in alcuni casi da pancreas porcino in soluzione tampone con Ca^{2+} .

Il processo industriale di utilizzo delle PLA2 prevede l'idrolisi enzimatica della lecitina, quindi in presenza di acqua che va poi rimossa. Si libera l'acido grasso durante la reazione, che va rimosso con un solvente organico, in genere acetone.

Si producono circa 3,3 milioni di tonnellate i condimenti con emulsionanti, che contengono tuorlo d'uovo per circa 165 mila tonnellate l'anno. Quello che fa la PLA2 è idrolizzare la fosfatidilcolina (lecitina) a 2-lisolecitina. La 2-lisolecitina è un emulsionante che stabilizza il prodotto per parecchio tempo.



Si può usare anche la PLA1, che idrolizza selettivamente la posizione il fosfolipide in posizione 1, perché sappiamo che comunque il gruppo in posizione 2 migrerà spontaneamente in posizione 1.

Degumming

Consiste nell'idrolisi dei fosfolipidi che rimangono all'interno del processo di produzione degli oli vegetali, che peggiorano la qualità del prodotto.

Si consumano circa 165 milioni di tonnellate all'anno.

Fino a qualche anno fa i fosfolipidi dell'olio di oliva venivano idrolizzati per via chimica, adesso si cerca di introdurre un processo biocatalitico, utilizzando le fosfolipasi. (*Ma dove? Faccio l'olio da quando sono nato e non se ne usano né sostanze chimiche né tantomeno enzimi...*). Le fosfolipasi hanno come vantaggio un miglioramento della resa dell'olio. Si riduce la temperatura a cui si esegue la reazione per via chimica dagli 80°C a circa 50°-60°C e si consuma meno acqua (*Lei scambia questo per procedure applicate all'olio di oliva, e dice che si applica all'olio extra vergine di oliva. Tutto questo non vale per l'olio di oliva ad uso alimentare!!! Se volete qualche piccola info sulla produzione dell'olio extravergine di oliva:*

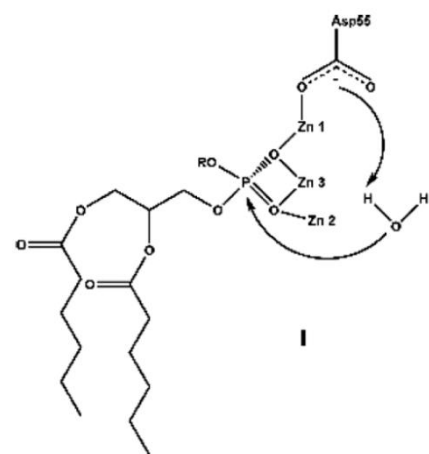
https://it.wikipedia.org/wiki/Estrazione_dell'olio_di_oliva).

Fosfolipasi C

I costi di produzione della fosfolipasi C sono ancora alti. Questa fosfolipasi ha una alta specificità di substrato. Idrolizza in maniera chemospecifica il legame fosfoestereo rispetto al legame estereo. In maniera regiospecifica idrolizza il legame estereo dal lato del glicerolo. Il prodotto sarà un diacil glicerolo.

Questi enzimi idrolizzano in maniera selettiva le fosfatidiletanolamine e le fosfatidilcoline, quindi nonostante idrolizzino il legame estereo dalla parte del glicerolo questi enzimi riconoscono anche la parte alcolica del substrato.

Il meccanismo di reazione prevede l'intervento di uno ione metallico, su cui ancora non c'è certezza.

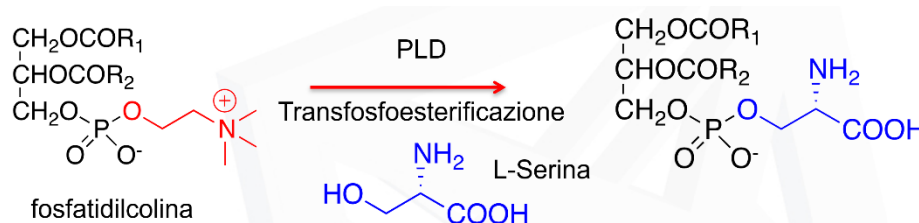


Il meccanismo catalitico presuppone la presenza di 3 atomi di zinco e di un acido aspartico in forma basica (aspartato) che agisce da base nell'attivazione di una molecola di acqua che fa da nucleofilo. Non è chiaro cosa succeda dopo sul derivato che ha subito l'attacco dell'acqua.

Transfosfoesterificazione con fosfolipasi D

Le fosfolipasi D idrolizzano il legame fosfoestereo dalla parte dell'alcol, portando come prodotto all'acido fosfatidico. Le fosfolipasi D possono effettuare reazioni di transfosfo-esterificazione. Nella reazione si parte da un intermedio che è un estere fosforico, che per mezzo di una reazione catalizzata dalla fosfolipasi D in presenza di alcol viene convertito in un estere che vede l'alcol della molecola di partenza sostituito con un secondo alcol, in quella che è una reazione di transesterificazione.

Le fosfolipasi D sono studiate principalmente per questa reazione di conversione. Il motivo è che partendo dalla fosfatidilcolina si può



sostituire la catena alcolica in modo selettivo per arrivare a dei fosfogliceridi di interesse farmacologico.

Il meccanismo catalitico è molto interessante. Prevede due sequenze di Istidina, Lisina ed acido aspartico, disposte simmetricamente. In questi enzimi si crea un intermedio covalente istidina – P.

Meccanismo

Si hanno due sequenze di tre amminoacidi disposti simmetricamente. I tre amminoacidi sono Istidina-lisina-acido aspartico. Di questi l'acido aspartico e l'istidina partecipano attivamente alla catalisi. Le due lisine presenti servono a coordinare il substrato.

Nel fosfogliceride sappiamo che il legame da rompere è tra fosforo e parte alcolica.

L'acido aspartico in forma basica si troverà adiacente all'istidina, che espone al gruppo carbossilato un azoto acido. L'azoto basico dell'istidina sarà rivolto verso il substrato.

Dall'altra parte in maniera simmetrica abbiamo il gruppo carbossilico dell'aspartico in forma acida, l'istidina che espone l'azoto basico verso l'acido, l'azoto acido è invece rivolto verso il substrato.

Il carbossilato basico attiva l'istidina, strappando un protone acido, gli elettroni di legame formano un doppio legame ed i carboni che non possono prendere più di quattro legami utilizzerà gli elettroni π per dare attacco nucleofilo sul fosforo, in una catena di trasporto di elettroni e protoni molto simile a quella della lipasi.

La differenza sta nel fatto che l'N elettronricco dell'istidina fa attacco diretto sul substrato.

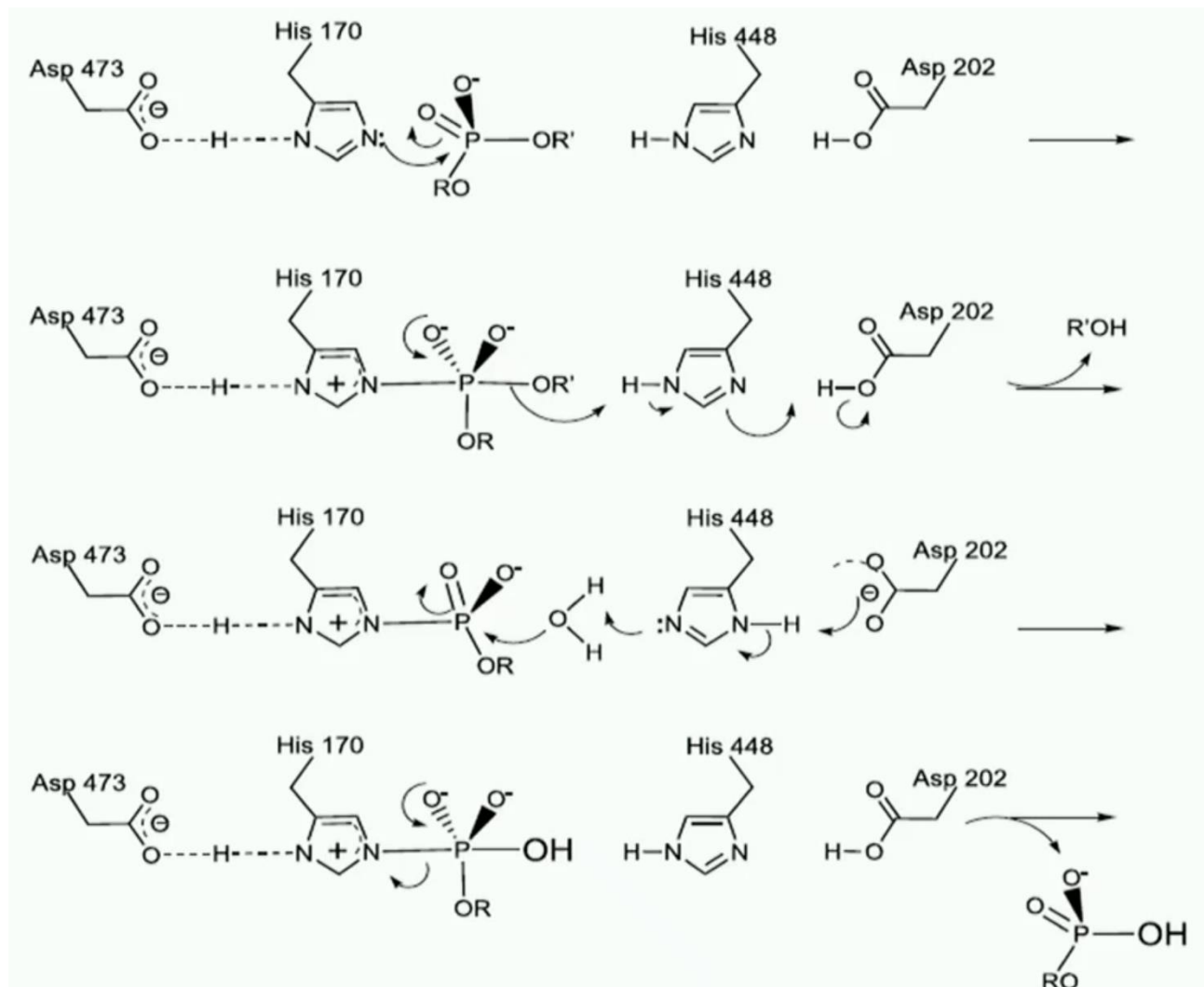
Si forma un intermedio covalente tra N basico dell'istidina ed P del fosfolipide, il quale formando un nuovo legame romperà uno dei due legami con l'ossigeno. Analogamente a ciò che succede col carbonio carbonilico.

Questo intermedio è instabile. Uno dei due atomi di O cercherà di ripristinare il doppio legame con il fosforo, che porta all'uscita del miglior gruppo uscente. Il gruppo uscente sarà la parte alcolica, che va protonata per essere un buon gruppo uscente. La protonazione avviene da parte dell'istidina, come nelle lipasi.

All'uscita del gruppo uscente avremo il substrato legato all'istidina all'enzima. Serve l'attacco del nucleofilo per staccare il substrato dall'enzima. Se si vuole eseguire una reazione di idrolisi il nucleofilo sarà l'acqua, mentre se si vuole eseguire una reazione di transesterificazione il nucleofilo sarà un alcol.

Il nucleofilo va attivato, e viene attivato dall'N elettronricco dell'altra istidina, che si crea per la catena di trasporto degli elettroni sul versante prossimo al substrato. Il nucleofilo attivato attacca il P del substrato, si forma un intermedio tetraedrico ancora attaccato ad una delle istidine dell'enzima. La riformazione del doppio legame sull'intermedio permette il distacco del prodotto dall'istidina, ripristinando l'enzima e rilasciando il fosfolipide.

A questo meccanismo catalitico non partecipa la serina ma l'istidina, perché il legame N-P è più debole del legame O-P, e quindi viene rotto più facilmente.



La PLD è poco studiata per la difficoltà nella produzione, e viene principalmente usata nell'industria farmacologica. Un utilizzo è nella transesterificazione della fosfatidilcolina che viene transfosfoesterificata con la serina per ottenere la fosfatidilserina.

L'unica altra fonte di fosfatidilserina era il cervello di bovino.