

### Ottimizzazione del processo di biocatalisi

Sappiamo che esistono vari enzimi ottenibili da moltissimi organismi. Questi enzimi svolgono attività molto diverse e sono molto specifici.

Non è detto però che questi enzimi siano i catalizzatori più adatti ad essere utilizzati in un processo industriale, perché nelle biotrasformazioni le condizioni di reazioni sono diverse da quelle che troviamo in ambiente cellulare.

Specificità, stabilità ed attività sono i parametri che dobbiamo attentamente valutare.

Ci sono due approcci per risolvere questo problema:

- Ingegneria di processo

Usiamo l'enzima nella forma in cui si trova in natura ed adattiamo le condizioni di reazione allo specifico enzima, trovando un compromesso tra stabilità ed efficienza.

- Ingegneria proteica

Si disegna il processo ideale, il migliore possibile, decidendo le condizioni di reazione. In base a questo processo ideale cerchiamo il catalizzatore migliore possibile. Il biocatalizzatore si può ottenere attualmente in due modi:

- Possiamo cercare enzimi naturali non ancora scoperti
- Possiamo utilizzare tecniche di ingegneria proteica per adattare enzimi già conosciuti.

### Ricerca di attività enzimatiche in natura

Il nostro pianeta è caratterizzato dalla presenza di ambienti molto vari tra loro. Questi ambienti sono popolati da microorganismi, che si sono adattati a vivere in questi ambienti e che hanno evoluto enzimi adatti a funzionare alle condizioni più diverse.

Di particolare interesse per noi sono gli organismi che vivono in ambienti estremi, che chiamiamo **estremofili**. Tra gli estremofili distinguiamo gli organismi che si sono adattati a condizioni intermedie e quelli che si sono adattati a condizioni realmente estreme.

- termofili e ipertermofili

Organismi che riescono a vivere anche al di sopra della temperatura di ebollizione dell'acqua.

- Psicrofili

Si sono evoluti per vivere anche a temperature al di sotto dello 0

- Alofili

Adattati a vivere in ambienti ad alta salinità

- Acidofili

Si sono adattati a vivere in ambienti acidi

- Alcalofili

Adattati a vivere in ambienti basici

- Oligotrofi

Vivono in condizioni di ridotta presenza di nutrienti

- Radiofili

Si sono adattati a vivere in ambienti ad alti livelli di radiazioni (reattori nucleari)

- Barofili

Organismi che sopportano alte pressioni, ad esempio nelle profondità marine.

Gli estremofili sono diffusi attraverso i regni della natura, sia procarioti che eucarioti ed archaea. Tra gli archaea troviamo alcuni tra gli organismi più estremi.

Gli enzimi ricavati dagli estremofili sono molto apprezzati in ambito industriale. Vedi review di Elleuche.

## Termofili ed ipertermofili

Tra gli ambienti in cui possiamo trovare questo tipo di organismi sono i geysir e le solfatare. Sono stati isolati in ambienti tra gli 80° e 115°C, sia in ambienti naturali che impianti industriali. Tra questi troviamo la *Thermotoga maritima*, il *Thermus thermophilus* ed il *Pyrococcus furiosus*. Quest'ultimo è un Archaea ipertermofilo, in grado di replicarsi a temperature superiori ai 100°C.

## Enzimi termostabili

I termofili crescono in condizioni di temperatura tra i 50 e gli 80°. Gli enzimi di questi organismi hanno temperatura ottimale in genere tra i 60° e gli 80°.

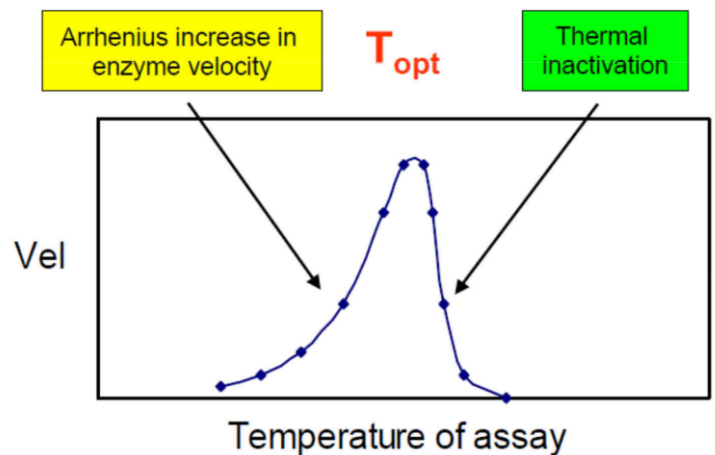
Guardando il grafico ci accorgiamo che all'inizio aumentando la temperatura la velocità di reazione aumenterà, secondo l'equazione di Arrhenius, fino ad un punto di massimo. Successivamente la velocità decrescerà più o meno rapidamente.

In questo caso il decremento di attività è molto brusco in seguito ad un lieve aumento di temperatura.

La fase discendente del grafico si attribuisce all'inattivazione termica.

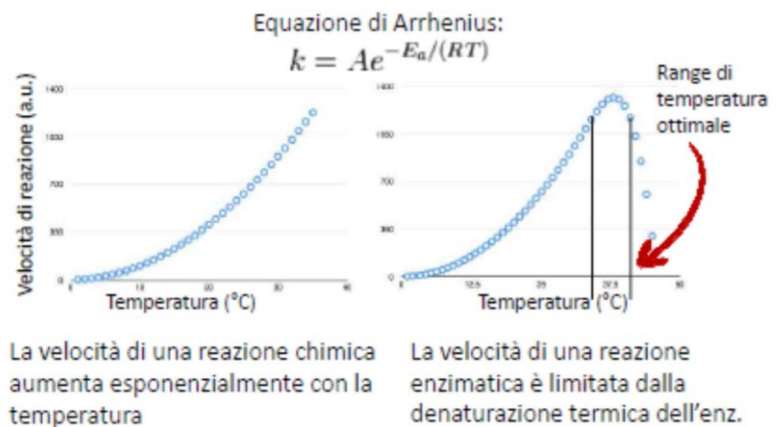
**Termoattività** vuol dire che l'enzima è attivo ad una certa temperatura.

**Termostabilità** vuol dire che l'enzima è stabile ad una certa temperatura, mantiene quindi la sua funzione e la sua struttura per un periodo di tempo consistente.



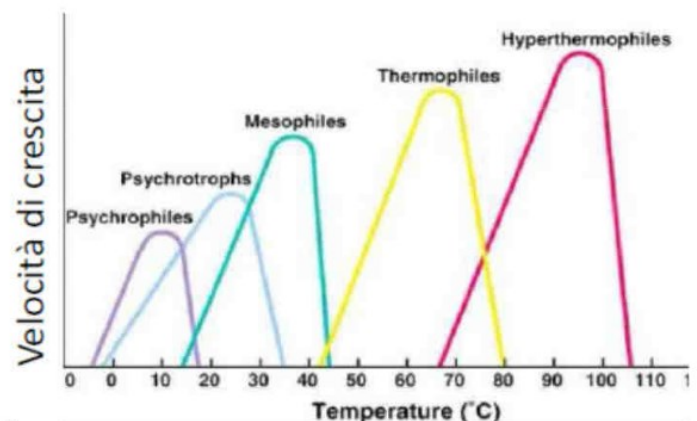
Nella parte più a sinistra dell'immagine vediamo la relazione tra attività enzimatica e temperatura.

Dopo l'iniziale fase di crescita esponenziale si ha un intervallo di temperatura in cui l'enzima è efficiente. Successivamente all'aumentare della temperatura si ha un decadimento della performance catalitica dell'enzima a seguito della inattivazione e denaturazione dello stesso.



## Termoattività

Dalla raffigurazione possiamo concludere in modo abbastanza generale che l'optimum di temperatura per gli enzimi termofili è più alto rispetto ai mesofili, che a loro volta hanno un optimum più alto rispetto agli psicrofili. Questo in generale è vero, anche se ci sono enzimi prodotti da mesofili che possono benissimo essere stabili ad altre temperature. Dipende molto dalla storia evolutiva del singolo enzima. In generale la temperatura a



cui l'organismo si riproduce e la temperatura di optimum di attività degli enzimi sono parametri che si avvicinano, ma non sempre coincidono.

Ad esempio, negli enzimi prodotti da organismi psicrofili si nota spesso che l'optimum di attività viene raggiunto attorno ai 20°C, anche se l'organismo ha una temperatura ottimale di crescita più basso, tra gli 0 e i 10°C.

### Stabilità e cinetica di attivazione

Il concetto di *stabilità* va declinato su due piani diversi:

- Stabilità cinetica

Indica a quale temperatura e per quanto tempo l'enzima rimane attivo

- Stabilità termodinamica

Indica a quale temperatura e per quanto tempo l'enzima mantiene la sua struttura senza denaturarsi.

La stabilità cinetica è la capacità di un enzima di mantenere la sua attività quando esposto ad una certa temperatura per periodi di tempo considerevoli. Il concetto di stabilità cinetica si basa sulla valutazione dell'**attività enzimatica**.

La stabilità cinetica può essere compresa da questa immagine.

A confronto ci sono un enzima proveniente da un *mesofilo* (in bianco) ed un termofilo (*in nero*).

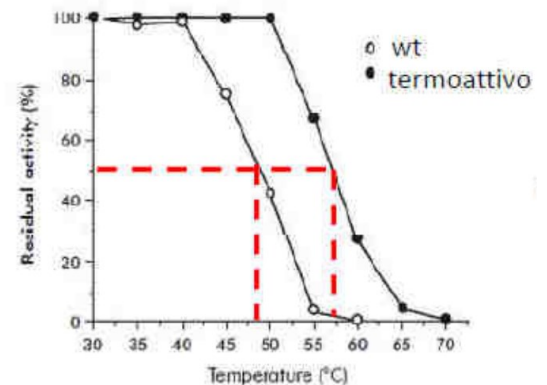
Sull'asse delle y abbiamo il livello di attività residua.

Sulle x abbiamo la temperatura.

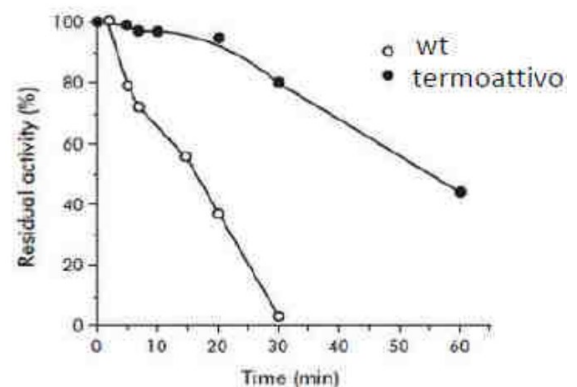
Misuriamo l'attività dell'enzima all'optimum di temperatura e la poniamo come il 100%

Misuriamo poi l'attività a temperature crescenti.

Da questi esperimenti è possibile ricavare la **T50** o **Tm** che indica la temperatura a cui l'enzima mantiene il 50% di attività.



In questo altro grafico valutiamo come varia l'attività residua dell'enzima, ad una temperatura fissa, col passare del tempo. Questa è una misura della *cinetica di inattivazione termica*.



Il concetto di **stabilità termodinamica** si riferisce alla capacità di non denaturare quando esposto ad alte temperature. Spesso stabilità cinetica e termodinamica coincidono, ma a volte ci sono lievi differenze; ci sono enzimi che perdono prima l'attività e poi la struttura.

Per stabilità termodinamica si intende la  **differenza di energia libera**  tra la *forma nativa* e la *forma denaturata* dell'enzima.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

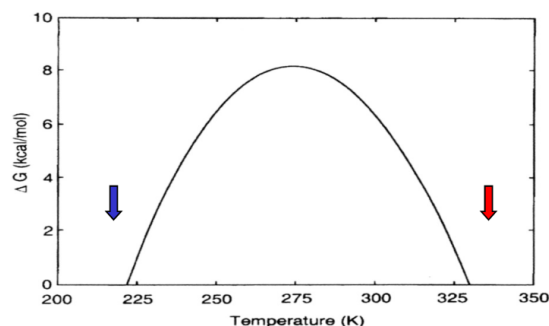
I cambiamenti che osserviamo nell'entropia e nell'entalpia sono entrambi funzioni della temperatura.

$$\delta\Delta H / \delta T = \Delta C_p$$
$$\delta\Delta S / \delta T = \Delta C_p / T$$

Un parametro importante è la **capacità termica** ( $\Delta C_p$ ), definita come *la quantità di energia che è necessario fornire ad una unità di soluzione per aumentarne la temperatura di 1°C*.

Se la soluzione è una soluzione proteica vediamo che quando la proteina denatura aumenta la capacità termica della soluzione. In questo modo si può misurare se una proteina si sta denaturando.

Quando facciamo studi basati sulla misura del  $\Delta G$  della reazione possiamo ottenere curve a campana come quella in figura. Questa curva ci dice ad esempio che a 275°K la proteina ha la massima stabilità perché avremo il massimo  $\Delta G$  tra forma nativa e forma denaturata, con la forma nativa che è favorita. Alle due estremità della curva  $\Delta G = 0$  indica che non c'è differenza di energia tra la forma nativa e la forma denaturata, la proteina è quindi denaturata. La proteina può denaturare sia a basse temperature che ad alte temperature.



Ci sono differenze nella struttura tra proteine dei termofili e quelle dei mesofili. Si è visto che nelle ribonucleasi, la proteina termofila ha più interazioni locali rispetto a quella dei mesofili. Nelle proteine da cold-shock si è osservata una differente disposizione delle cariche superficiali, che interagiscono quindi con il solvente.

### Analisi strutturali della stabilità termica

Negli ultimi 20 anni si sono svolti molti progetti di ricerca sugli enzimi estremofili.

Per studiare le basi strutturali servono strutture tridimensionali delle proteine.

*È necessario saper distinguere le variazioni strutturali e di sequenza che dipendono dalla deriva evolutiva, rispetto a quelle che sono veramente correlate all'adattamento all'alta temperatura.*

Vuol dire che quando si studia una famiglia di proteine si osserveranno delle variazioni amminoacidiche. Bisogna sicuramente confrontare enzimi omologhi, quindi amilasi mesofile con amilasi termofile ad esempio, ma non amilasi con lipasi.

Si noteranno delle variazioni nella sequenza. Molte di queste variazioni dipendono da una divergenza evolutiva. Vanno quindi identificate quali di queste variazioni hanno una reale influenza con l'adattamento a condizioni estreme.

Perché una proteina sia stabile deve ottimizzare una serie di interazioni, generalmente più interazioni ci sono e più è stabile la proteina. Le interazioni sono importanti sia all'interno della proteina, che con il solvente.

Va tenuto conto delle interazioni della proteina con metaboliti, cofattori e soluti compatibili, quindi le altre molecole con cui l'enzima interagisce.

Nel caso in cui l'enzima sia un oligomero è importante rafforzare le interazioni tra le subunità.

Tra le variazioni che più si osservano in una proteina termofila rispetto ad una proteina mesofila, troviamo:

- Aumento delle coppie ioniche

Si ha un aumento dei ponti salini

- Diminuzione delle dimensioni dei loop e delle parti ad alta mobilità.

Sono punti da cui può partire l'unfolding

- Si riducono le cavità all'interno delle proteine
- C'è una preferenza verso l'utilizzo di alcuni aminoacidi rispetto ad altri

Alcuni aminoacidi facilitano il processo di denaturazione

- Aumentano le interazioni idrofobiche tra subunità nelle proteine oligomeriche
- Ci sono cambiamenti nella superficie esposta al solvente.

Non è detto che nella stessa proteina si trovino tutte queste modificazioni adattative. Ogni famiglia di proteine ha utilizzato alcune di queste strategie per giungere al risultato.

Spesso le proteine termostabili sono strutturalmente più rigide rispetto a quelle dei mesofili. Sono più stabili ma mantengono lo stesso fold dell'omologo mesofilo.

Per eseguire una analisi delle differenze tra enzimi di organismi estremofili e mesofili sono necessarie le strutture tridimensionali dei rispettivi enzimi.

In uno studio (non dice quale) sono state analizzate strutture enzimatiche di termofili ed enzimi omologhi di mesofili, appartenenti a 25 famiglie enzimatiche diverse.

Sono state identificate 13 proprietà appartenenti a 5 categorie:

- Struttura della cavità
- legami ad idrogeno
- coppie ioniche
- struttura secondaria
- polarità della superficie dell'enzima

È stata fatta una analisi statistica e si è ottenuta una stima di come questi enzimi si sono evoluti per resistere a determinate condizioni ambientali.

- Cavità
  - Numero
  - Volume
  - Area superficiale

Si è visto che nei termofili le cavità sono diverse rispetto agli ipertermofili. Negli ipertermofili le cavità sono più piccole

- Ponti a idrogeno

La differenza tra i ponti a idrogeno formati non sembra statisticamente significativa.

- Coppie ioniche

Sono aminoacidi con carica opposta che possono formare ponti salini.

Si sono viste un maggior numero di coppie ioniche negli ipertermofili, il che ci dà una idea dell'importanza delle interazioni elettrostatiche negli enzimi evoluti per l'attività in ambienti caldi.

- Strutture secondarie

Si è visto che aumenta la frazione di alpha-eliche e beta-sheet, che tendono a fare interazioni deboli. Diminuisce la frazione di loop e strutture ad alta mobilità. In realtà questa caratteristica ha una importanza relativamente bassa nell'adattamento degli enzimi dei termofili.

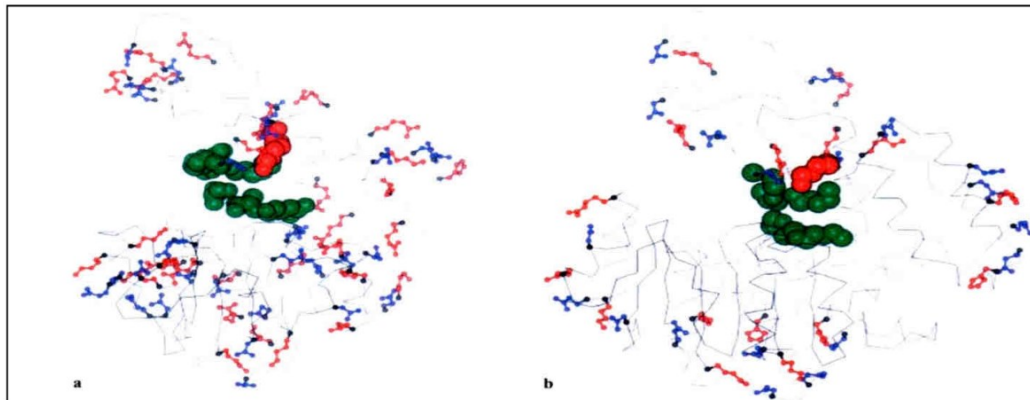
In ordine di importanza, si è visto che le caratteristiche più rilevanti negli enzimi termofili sono:

- Aumento delle coppie ioniche
- Diminuzione delle cavità (negli ipertermofili)
- Aumento nella polarità di superficie (termofili moderati)

### **Importanza dei ponti salini**

Danson ha paragonato la glutammato deidrogenasi del *Pyrococcus furiosus* e del *Clostridium symbiosum*. (min 9.30, lezione enzimi termostabili\_3. L'articolo a cui fa riferimento probabilmente non è di Danson, che viene citato anche dopo, ma molto probabilmente è questo: 10.1016/S0969-2126(01)00251-9).

L'enzima di *P. furiosus* ha una **temperatura di melting** ( $T_m$ ) di 113°C, mentre lo stesso enzima di *C. symbiosum* ha una  $T_m$  di 55°C. Entrambi gli enzimi sono oligomeri, in particolare omoesameri. I due enzimi hanno il 34% di identità di sequenza.



Nell'immagine vediamo l'enzima termofilo (a) e quello mesofilo (b).

In verde e rosso troviamo il *sito attivo*, mentre in rosso e blu vediamo i *ponti salini*. Possiamo vedere che il termofilo ha un maggior numero di ponti salini vicino al sito attivo, che è stabilizzato dai ponti.

### Composizione aminoacidica

In generale in negli enzimi termofili si è visto che sono presenti un maggior numero di aminoacidi carichi. Diminuiscono invece gli aminoacidi Asparagina e Metionina, che non sono stabili ad alta temperatura; l'asparagina ad esempio diventa acido aspartico.

### Citrato sintasi

La citrato sintasi è un enzima coinvolto nel ciclo di Krebs. In uno studio Danson ha analizzato questo enzima da organismi che vivono a varie temperature:

- *Arthrobacter* (15°C)
- *Maiale* (37°C)
- *Thermoplasma* (55°C)
- *Sulfolobus* (80°C)
- *Pyrococcus* (100°C)

Questo enzima è molto conservato, quindi è interessante valutarne le differenze nell'adattamento.

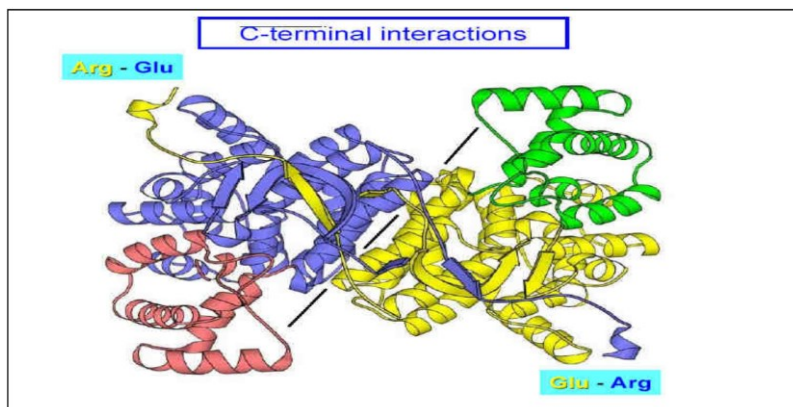
Questo enzima è un dimerico, si è visto che aumentano le interazioni tra le due subunità

all'aumentare della temperatura a cui gli organismi vivono.

Quando un enzima multimerico viene esposto al calore, la prima forma di unfolding si ha nella perdita del contatto tra le subunità. Rafforzando le interazioni tra le unità si stabilizza l'enzima e se ne previene la denaturazione.

L'ipertermofilo è molto stabile.

Vediamo nell'immagine le due subunità, una in blu e rosso, l'altra in giallo e verde. Vediamo che la subunità blu ha un braccio che si estende verso



la subunità gialla e forma un contatto, cioè una interazione ionica tra Glutammato e Arginina, e lo stesso fa la subunità gialla con un braccio che si lega alla subunità blu.

### **Vantaggi nell'utilizzo di enzimi termostabili**

L'utilizzo di enzimi resistenti ad alte temperature permette di eseguire reazioni ad alta temperatura.

Questo ha diversi vantaggi:

- Ridotti rischi di contaminazione da parte di altri microorganismi.
- Diminuisce la viscosità della soluzione.
- Aumenta la solubilità di alcuni substrati.

Che problemi ci sono nel produrre enzimi da termofili?

La fermentazione dei termofili è spesso lenta ed ha basse rese

Sono necessarie apparecchiature speciali

Ad alte temperature diminuisce la solubilità dei gas nei liquidi

Substrati, reagenti e cofattori possono essere instabili.

Questi problemi sono stati risolti ingegnerizzando i processi di produzione, grazie alla migliore conoscenza di questi organismi, ma soprattutto grazie alle tecnologie di DNA ricombinante, che permettono di esprimere i geni dei termofili in organismi mesofili, decisamente più facili da coltivare.

Sono disponibili vari enzimi termofili ricombinanti, tra cui la Taq polimerasi da *Thermus aquaticus*.

Enzimi industriali sono stati selezionati perché utili in processi dell'industria tessile o nel trattamento delle biomasse.