CAPITOLO

9

Il metabolismo energetico: dal glucosio all'ATP

Il glucosio non brucia nella cellula: si lascia smontare, un gradino alla volta, e a ogni gradino cede un po' della sua energia.

OBIETTIVI

1. Descrivere la struttura dell'ATP e spiegare perché la sua idrolisi ha un $\Delta G^{\circ\prime}$ molto negativo.
2. Calcolare $\Delta G^{\circ\prime}$ di reazioni accoppiate e di trasferimenti di elettroni con $\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime}$.
3. Seguire il glucosio nella glicolisi, nell'ossidazione del piruvato e nel ciclo di Krebs, contando atomi di carbonio, ATP e coenzimi ridotti.
4. Spiegare il ruolo delle fermentazioni nel rigenerare il NAD^+.
5. Descrivere la catena respiratoria, la chemiosmosi e il funzionamento dell'ATP sintasi.
6. Calcolare il bilancio energetico della respirazione e la sua efficienza.

INDICE DEL CAPITOLO

9.1 L'ATP e i trasportatori di energia 2
9.2 Il metabolismo e le sue vie 7
9.3 La glicolisi e le fermentazioni 8
9.4 Dal piruvato al ciclo di Krebs 10
9.5 La catena respiratoria e la chemiosmosi 14
9.6 Il bilancio energetico della respirazione 20

Scienze naturali 5 · Parte II · Biochimica: le molecole della vita e il metabolismo · versione 1.0
Capitolo 9: Il metabolismo energetico: dal glucosio all'ATP · pagine 235–262 del volume completo · estratto per lo studio

Una velocista che scatta sui cento metri e una maratoneta al trentesimo chilometro bruciano lo stesso zucchero, il glucosio, ma in due modi diversi. La prima lo spezza in fretta senza aspettare l'ossigeno e ne ricava poca energia; la seconda lo ossida fino a diossido di carbonio e acqua e ne ricava quindici volte di più, ma più lentamente. In entrambi i casi la «moneta» che i muscoli spendono è la stessa molecola: l'ATP.

Nel primo biennio hai imparato i nomi delle tappe della respirazione cellulare; nel quarto anno hai visto che una reazione è spontanea quando la sua energia libera diminuisce e che il potenziale di una pila misura la stessa cosa in volt. In questo capitolo le due strade si incontrano: seguiremo gli atomi di carbonio del glucosio reazione per reazione, conteremo le molecole di ATP che se ne ricavano e capiremo, con la chimica delle ossidoriduzioni, perché la cellula ha bisogno di ossigeno e come una corrente di protoni fa girare un motore molecolare.

9.1 L'ATP e i trasportatori di energia

9.1.1 Nucleotidi e ATP

DA RICORDARE

Richiamo. Un *nucleotide* è formato da una base azotata, uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio o deossiribosio) e uno o più gruppi fosfato; i nucleotidi sono i monomeri del DNA e dell'RNA (vedi *Scienze naturali 2*, cap. 2, e *Scienze naturali 3*, cap. 13). L'ATP è un nucleotide con tre gruppi fosfato, e il ciclo ATP $\rightleftarrows$ ADP + P_i trasferisce energia dai processi che la liberano a quelli che la consumano (vedi *Scienze naturali 2*, cap. 5).

Conviene distinguere due parole. Un **nucleoside** è la sola unione della base con lo zucchero: l'adenina legata al ribosio forma l'*adenosina*. Il legame unisce l'atomo di azoto N9 della base al carbonio 1′ dello zucchero, ed è un legame N-glicosidico in configurazione β. Il nucleotide si ottiene esterificando con l'acido fosforico l'ossidrile in posizione 5′ del ribosio: con un fosfato si ha l'AMP (adenosina monofosfato), con due l'ADP, con tre l'ATP (Figura 9.1). I numeri con l'apice (1′, 2′…) indicano gli atomi dello zucchero, per distinguerli da quelli della base.

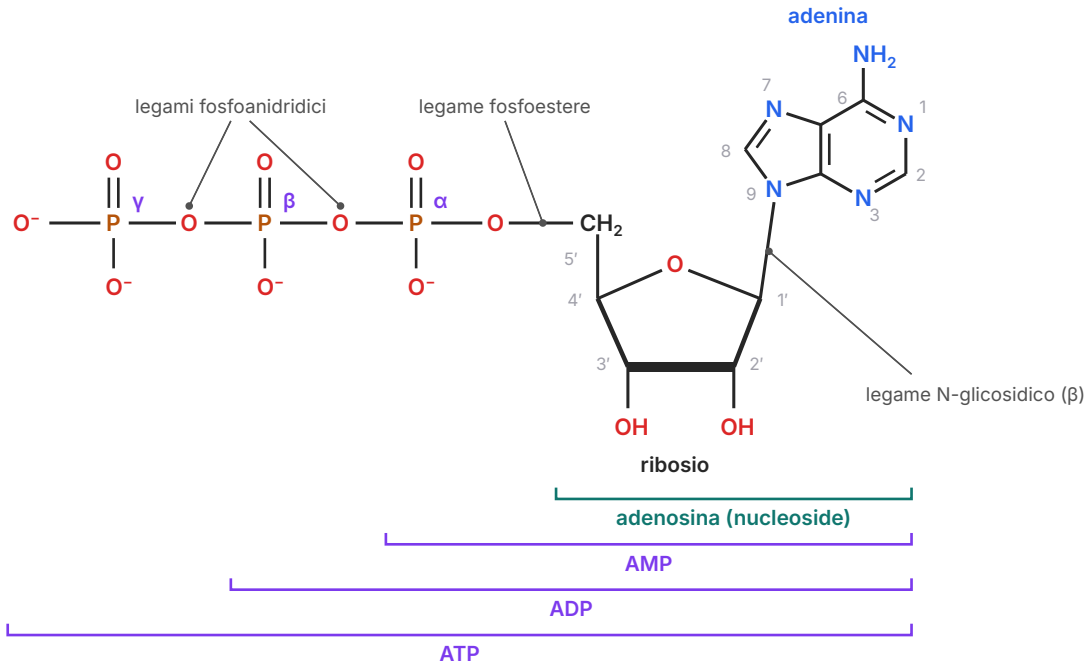


Figura 9.1 La struttura dell'ATP nella forma prevalente a pH 7, con quattro cariche negative (ATP^{4-}). L'adenina è legata con un legame β-N-glicosidico (N9–C1′) al β-D-ribosio, disegnato in proiezione di Haworth; il fosfato α è legato al C5′ con un legame fosfoestere, i fosfati β e γ con due legami fosfoanidridici. Le parentesi indicano l'adenosina e le molecole AMP, ADP e ATP.

I tre fosfati si indicano con le lettere α, β e γ a partire dallo zucchero. Il primo è unito al ribosio da un legame *fosfoestere*, come quello fra un acido carbossilico e un alcol (capitolo 5); i due successivi sono uniti fra loro da **legami fosfoanidridici**, il legame che si forma quando due molecole di acido fosforico si condensano perdendo una molecola d'acqua, come in un'anidride. A pH 7 quasi tutti gli ossidrili dei fosfati sono dissociati: l'ATP porta circa quattro cariche negative e nella cellula è quasi sempre legato a uno ione Mg^{2+}.

9.1.2 Perché l'idrolisi dell'ATP libera energia

Nel quarto anno hai calcolato le variazioni di energia libera delle reazioni chimiche (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 1). In biochimica, come hai già visto in quel capitolo, si usa una convenzione diversa per lo stato standard: tutte le specie a 1 M, ma a pH 7 invece che a $[H^+] = 1$ M, perché è il pH delle cellule. Le grandezze riferite a questo stato si scrivono con un apice in più: $\Delta G^{\circ\prime}$, $E^{\circ\prime}$. In queste condizioni l'idrolisi del fosfato terminale dell'ATP ha:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} \approx -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Il valore è grande e negativo per ragioni che si leggono nella struttura. I quattro fosfati carichi negativamente, vicini fra loro, si respingono: l'idrolisi li separa e allenta questa tensione. Il fosfato inorganico liberato, P_i, ha più strutture di risonanza del gruppo da cui proviene, ed è quindi più stabile. Infine i prodotti, più piccoli e più carichi in rapporto alle dimensioni, sono circondati dalle molecole d'acqua meglio del reagente. Nella cellula, dove la concentrazione dell'ATP è molto più alta di quella dell'ADP e del fosfato, la variazione reale ΔG è ancora più negativa: secondo le misure riportate nei manuali di biochimica, fra circa −50 e −65 kJ/mol.

L'ATP non è l'unico composto fosforilato della cellula, né quello con il valore più negativo. La Tabella 9.1 ordina alcuni composti per $\Delta G^{\circ\prime}$ di idrolisi: l'ATP sta a metà della scala, e proprio per questo può fare da intermediario, ricevendo il gruppo fosfato da composti che stanno più in alto e cedendolo a molecole che stanno più in basso.

Tabella 9.1 Variazione di energia libera standard biochimica per l'idrolisi di alcuni composti fosforilati e del tioestere acetil-CoA (valori arrotondati, da Nelson e Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*).

Reazione di idrolisi	$\Delta G^{\circ\prime}$ (kJ/mol)
fosfoenolpiruvato → piruvato + P_i	−61,9
1,3-bisfosfoglicerato → 3-fosfoglicerato + P_i	−49,3
fosfocreatina → creatina + P_i	−43,0
acetil-CoA → acetato + CoA	−31,4
ATP → ADP + P_i	**−30,5**
glucosio-1-fosfato → glucosio + P_i	−20,9
glucosio-6-fosfato → glucosio + P_i	−13,8
glicerolo-3-fosfato → glicerolo + P_i	−9,2

ERRORE FREQUENTE

«Il legame ad alta energia dell'ATP libera energia quando si rompe». Rompere un legame richiede *sempre* energia, e il legame fosfoanidridico non è particolarmente forte. Ciò che libera energia è la reazione di idrolisi nel suo insieme: si rompono e si formano legami, e i prodotti (ADP, fosfato e la loro acqua di idratazione) hanno un'energia libera molto più bassa dei reagenti. L'espressione «legame ad alta energia», ancora usata, è una scorciatoia per dire «legame la cui idrolisi ha un $\Delta G^{\circ\prime}$ molto negativo».

9.1.3 Le reazioni accoppiate

Molte reazioni di cui la cellula ha bisogno, come la sintesi di un amminoacido o l'unione di due nucleotidi, hanno $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo: da sole non procedono. La cellula le rende possibili con le **reazioni accoppiate**: unisce una reazione sfavorevole a una favorevole, quasi sempre l'idrolisi

dell'ATP, in modo che avvengano insieme. Poiché G è una funzione di stato, la variazione di energia libera di una reazione complessiva è la somma di quelle delle reazioni che la compongono, come le entalpie nella legge di Hess (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 1): se la somma è negativa, il processo accoppiato è spontaneo. Nel quarto anno hai visto l'esempio della fosforilazione del glucosio; eccone un altro.

ESEMPIO SVOLTO

La sintesi della glutammina

Problema. L'amminoacido glutammina si forma dal glutammato e dallo ione ammonio: glutammato + NH_4^+ → glutammina + H_2O, con $\Delta G^{\circ\prime} \approx +14{,}2$ kJ/mol. L'enzima glutammina sintetasi accoppia la reazione all'idrolisi di una molecola di ATP. Calcola $\Delta G^{\circ\prime}$ del processo complessivo.

Soluzione. Si sommano le due equazioni e i due valori:

$$\text{glutammato} + NH_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{glutammina} + \text{ADP} + P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} = (+14{,}2) + (-30{,}5) = -16{,}3 \text{ kJ/mol}$$

La reazione accoppiata è spontanea in condizioni standard biochimiche (Figura 9.2).

Come avviene davvero. Le due reazioni non si limitano ad avvenire nello stesso posto: l'enzima le unisce attraverso un *intermedio comune*. Prima trasferisce il fosfato γ dell'ATP sul glutammato, formando un composto fosforilato (il γ-glutamil fosfato) molto più reattivo; poi lo ione ammonio sostituisce il gruppo fosfato, che esce come P_i. Senza un intermedio comune, l'idrolisi dell'ATP disperderebbe la sua energia come calore.

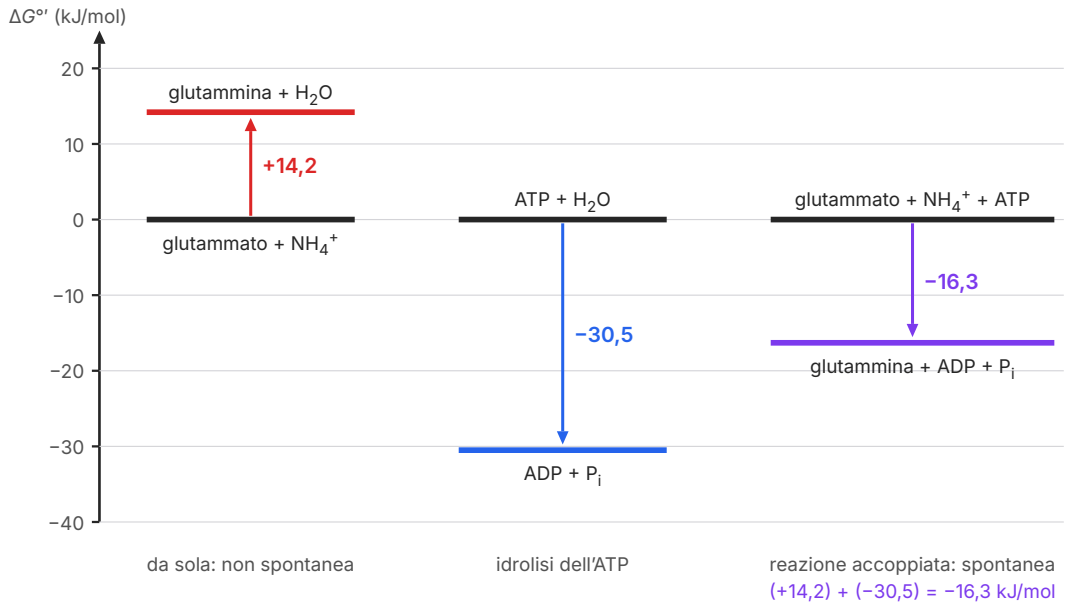


Figura 9.2 L'accoppiamento energetico nella sintesi della glutammina (scala verticale in kJ/mol, valori di $\Delta G°'$). La reazione da sola ha $\Delta G°'$ positivo; l'idrolisi dell'ATP ha $\Delta G°'$ negativo; la reazione accoppiata, somma delle due, ha $\Delta G°' \approx -16{,}3$ kJ/mol ed è spontanea.

9.1.4 I trasportatori di elettroni e il coenzima A

Nel capitolo 8 hai incontrato i coenzimi che derivano dalle vitamine del gruppo B. Tre di loro sono protagonisti di questo capitolo, perché trasportano elettroni da una reazione all'altra. Il **NAD^+** (nicotinammide adenina dinucleotide, dalla niacina) è un dinucleotide: il suo anello di nicotinammide accetta uno *ione idruro*, H^-, cioè un protone con due elettroni. Quando una deidrogenasi ossida un substrato, gli toglie due atomi di idrogeno: uno arriva sul NAD^+ come idruro, l'altro va in soluzione come H^+. Il **FAD** (flavina adenina dinucleotide, dalla riboflavina) accetta invece due atomi di idrogeno completi, e resta di solito legato in modo stabile al suo enzima.

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H^+ \qquad FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$$

Il NADH e il $FADH_2$ sono le forme ridotte, «cariche» di elettroni; NAD^+ e FAD le forme ossidate. Il **$NADP^+$** differisce dal NAD^+ solo per un gruppo fosfato in più sul ribosio dell'adenosina, ma questo basta perché gli enzimi li riconoscano come molecole diverse: in genere il NADH raccoglie elettroni nelle vie che demoliscono le molecole e li porta verso la produzione di ATP, mentre il NADPH li fornisce alle vie di sintesi, come la sintesi degli acidi grassi e la fotosintesi (capitolo 11).

Il terzo coenzima trasporta non elettroni ma gruppi acilici. Il **coenzima A** (CoA, dall'acido pantotenico) termina con un gruppo tiolico, –SH, e per questo si scrive spesso CoA-SH. Con l'acido acetico forma un tioestere, l'**acetil-CoA**, $CH_3CO–S–CoA$. Un tioestere è più reattivo di un estere comune, perché il legame C–S partecipa poco alla risonanza con il gruppo carbonilico (capitolo 5): la sua idrolisi ha $\Delta G^{\circ\prime} \approx -31{,}4$ kJ/mol, simile a quella dell'ATP, e il gruppo acetile si trasferisce facilmente ad altre molecole. L'acetil-CoA è il punto d'incontro della demolizione di zuccheri, grassi e amminoacidi.

9.2 Il metabolismo e le sue vie

Il metabolismo si divide in due versanti complementari. Il **catabolismo** è l'insieme delle reazioni che demoliscono molecole grandi e ridotte, come il glucosio e gli acidi grassi, in molecole piccole e ossidate, come CO_2 e H_2O: libera energia, che in parte viene conservata come ATP, e raccoglie elettroni sui trasportatori. L'**anabolismo** è l'insieme delle reazioni di sintesi, che costruiscono proteine, acidi nucleici, polisaccaridi e lipidi a partire da molecole semplici: consuma ATP e usa come riducente il NADPH. ATP e coenzimi ridotti sono i ponti fra i due versanti.

Le reazioni non avvengono isolate, ma in sequenze ordinate: una **via metabolica** è una serie di reazioni catalizzate da enzimi, in cui il prodotto di ciascuna è il substrato della successiva. Alcune vie sono *lineari*, come la glicolisi, che parte dal glucosio e arriva al piruvato; altre sono *cicliche*, come il ciclo di Krebs, in cui una molecola si rigenera alla fine di ogni giro e può riprendere il percorso. Nella cellula eucariotica le vie sono anche separate nello spazio: la glicolisi avviene nel citosol, l'ossidazione completa nei mitocondri, e la membrana che separa i due compartimenti decide quali molecole passano.

Il catabolismo del glucosio, come quello di tutti i nutrienti, si legge in tre stadi: le macromolecole del cibo vengono scisse nei loro monomeri (è la digestione, vedi *Scienze naturali 4*, cap. 7); i monomeri vengono trasformati in pochi intermedi comuni, soprattutto l'acetil-CoA; infine l'acetil-CoA viene ossidato a CO_2 nel ciclo di Krebs, e gli elettroni raccolti producono la maggior parte dell'ATP nella catena respiratoria. Questo capitolo segue il glucosio attraverso gli ultimi due stadi; il capitolo 10 vi farà entrare i grassi e le proteine.

Una cellula viva non è mai all'equilibrio chimico: è un *sistema aperto*, che scambia continuamente materia ed energia con l'ambiente (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 1). In una via metabolica molte reazioni sono vicine all'equilibrio e possono procedere nei due versi, a seconda delle concentrazioni; poche altre hanno un ΔG così negativo da essere, in pratica, irreversibili. Queste ultime sono i *punti di controllo* della via: gli enzimi che le catalizzano sono regolati, spesso in modo allosterico (capitolo 8), e decidono quanto materiale attraversa l'intera sequenza, come una chiusa decide la portata di un canale.

9.3 La glicolisi e le fermentazioni

9.3.1 Le dieci tappe della glicolisi

La glicolisi, che avviene nel citosol di quasi tutte le cellule, procariotiche ed eucariotiche, trasforma una molecola di glucosio (6 atomi di carbonio) in due molecole di *piruvato* (3 atomi di carbonio ciascuna) in dieci tappe, ciascuna catalizzata da un enzima diverso (Figura 9.3). Si divide in due fasi.

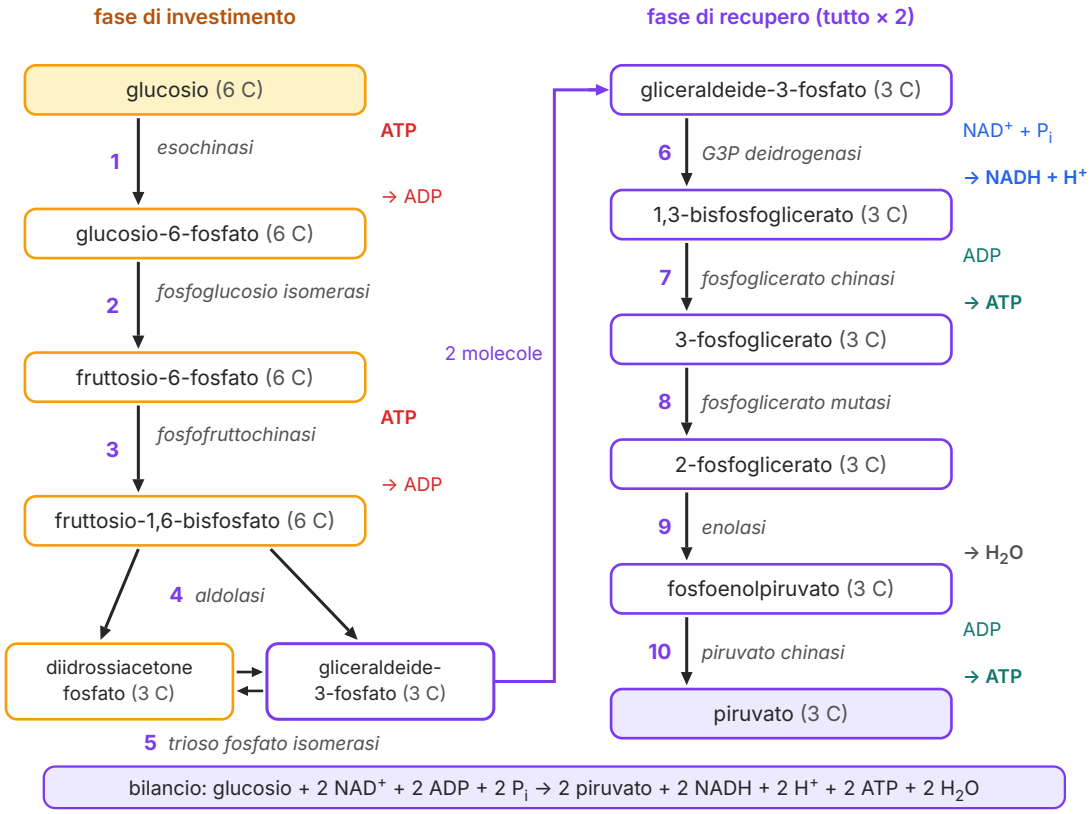


Figura 9.3 Le dieci tappe della glicolisi, con il numero di atomi di carbonio di ogni intermedio e i nomi degli enzimi. Nella fase di investimento si spendono 2 ATP e il glucosio (6 C) si scinde in due triosi fosfato (3 C); nella fase di recupero ogni tappa avviene due volte, una per ciascuna molecola di gliceraldeide-3-fosfato, e si formano 4 ATP e 2 NADH.

Nella **fase di investimento** (tappe 1–5) la cellula spende due molecole di ATP. Nella tappa 1 l'*esochinasi* trasferisce un fosfato dall'ATP al glucosio: il glucosio-6-fosfato, carico negativamente, non può più attraversare la membrana e resta nella cellula. Dopo l'isomerizzazione a fruttosio-

6-fosfato (tappa 2), la **fosfofruttochinasi** aggiunge un secondo fosfato (tappa 3), formando il fruttosio-1,6-bisfosfato. Nella tappa 4 l'*aldolasi* spezza questo zucchero a sei atomi di carbonio in due triosi fosfato, il diidrossiacetone fosfato (C1–C3) e la gliceraldeide-3-fosfato (C4–C6): è una condensazione aldolica letta al contrario (capitolo 5), possibile perché il fruttosio ha un gruppo carbonilico in C2 e un ossidrile sul carbonio β, C4. La tappa 5 trasforma il diidrossiacetone fosfato, un chetone, nel suo isomero aldeidico, la gliceraldeide-3-fosfato: da questo punto la via prosegue con due molecole uguali a tre atomi di carbonio.

Nella **fase di recupero** (tappe 6–10), che avviene due volte per ogni glucosio, si raccoglie l'energia. La tappa 6 è l'unica ossidazione della glicolisi: la *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi* ossida il gruppo aldeidico ad acido e lo unisce a un fosfato inorganico, trasferendo un idruro al NAD^+. Il prodotto, l'1,3-bisfosfoglicerato, contiene un'anidride mista fra un acido carbossilico e l'acido fosforico, con un $\Delta G^{\circ\prime}$ di idrolisi molto negativo (Tabella 9.1). Nella tappa 7 questo fosfato passa direttamente all'ADP e forma ATP. È la **fosforilazione a livello del substrato**: la sintesi di ATP per trasferimento di un gruppo fosfato da un substrato ad alta energia di idrolisi, senza membrane e senza ossigeno. Dopo lo spostamento del fosfato dal carbonio 3 al 2 (tappa 8) e la perdita di una molecola d'acqua (tappa 9, *enolasi*), si ottiene il fosfoenolpiruvato, il composto della Tabella 9.1 con il $\Delta G^{\circ\prime}$ più negativo: nella tappa 10 la *piruvato chinasi* ne trasferisce il fosfato all'ADP, ed è la seconda fosforilazione a livello del substrato.

9.3.2 Il bilancio e la regolazione

Contando atomi e molecole: 6 atomi di carbonio entrano come glucosio ed escono come 2 × 3 nel piruvato; la fase di investimento consuma 2 ATP, la fase di recupero ne produce 2 × 2 = 4, e si formano 2 NADH. Il bilancio netto è:

$$\text{glucosio} + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\ \text{piruvato} + 2NADH + 2H^+ + 2ATP + 2H_2O$$

Delle dieci tappe, tre hanno nella cellula un ΔG molto negativo e sono di fatto irreversibili: quelle catalizzate dall'esochinasi, dalla fosfofruttochinasi e dalla piruvato chinasi. Il principale punto di controllo è la **fosfofruttochinasi**, un enzima allosterico: è inibita quando nella cellula c'è molto ATP o molto citrato (il primo intermedio del ciclo di Krebs, segnale che l'energia abbonda) ed è attivata quando aumentano l'ADP e l'AMP, segnale che l'ATP si sta esaurendo. Così la glicolisi accelera quando la cellula consuma energia e rallenta quando ne ha a sufficienza. Per tornare dal piruvato al glucosio la cellula non può percorrere la stessa strada al contrario: deve aggirare le tre tappe irreversibili con enzimi diversi, nella gluconeogenesi (capitolo 10).

9.3.3 Le fermentazioni: rigenerare il NAD^+

Nel citosol il NAD^+ è presente in piccola quantità: se il NADH formato nella tappa 6 non venisse riossidato, in pochi secondi il NAD^+ finirebbe e la glicolisi si fermerebbe. Con l'ossigeno, gli elettroni del NADH vengono portati alla catena respiratoria. Senza ossigeno, la cellula li scarica sul piruvato stesso o su un suo derivato: è il vero scopo delle fermentazioni che hai studiato nel

primo biennio (vedi *Scienze naturali 2*, cap. 5). La fermentazione non produce ATP; permette alla glicolisi di continuare, con il suo guadagno di 2 ATP per glucosio.

- nella **fermentazione lattica**, nei muscoli sotto sforzo intenso e nei batteri lattici dello yogurt, la *lattato deidrogenasi* riduce il piruvato a lattato: piruvato + NADH + H^+ → lattato + NAD^+. Il lattato prodotto dai muscoli passa nel sangue e viene riconvertito in glucosio dal fegato (il *ciclo di Cori*, capitolo 10);
- nella **fermentazione alcolica**, nei lieviti, la *piruvato decarbossilasi* stacca CO_2 dal piruvato e forma acetaldeide (etanale), che l'*alcol deidrogenasi* riduce a etanolo: piruvato → acetaldeide + CO_2; acetaldeide + NADH + H^+ → etanolo + NAD^+.

I lieviti possono sia fermentare sia respirare. Già Louis Pasteur aveva osservato che, quando si introduce aria in una coltura di lieviti che fermenta, il consumo di zucchero diminuisce bruscamente. È l'**effetto Pasteur**, e oggi lo sappiamo spiegare: con l'ossigeno ogni glucosio rende circa 15 volte più ATP, e la cellula, che regola la glicolisi in base all'ATP disponibile, ne demolisce molto meno.

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Buchner e la nascita della biochimica

A metà dell'Ottocento la fermentazione era al centro di una disputa. Per Justus von Liebig era un processo chimico; Pasteur aveva dimostrato che richiedeva lieviti vivi, e molti ne concludevano che solo un organismo intatto, con una «forza vitale», potesse compierla. Nel 1897 il chimico tedesco Eduard Buchner macinò cellule di lievito con quarzo e farina fossile (kieselguhr), le spremette sotto pressione e ottenne un succo privo di cellule vive. Aggiungendo zucchero, il succo sviluppava CO_2 e alcol: la fermentazione avveniva senza cellule. Buchner attribuì l'attività a una sostanza che chiamò *zimasi*; in seguito si capì che si trattava di una miscela di enzimi, gli stessi della glicolisi e della fermentazione alcolica.

L'esperimento, premiato con il Nobel per la chimica nel 1907, mostrò che le reazioni della vita si possono studiare in provetta, una alla volta, ed è considerato la nascita della biochimica. Come la sintesi dell'urea di Wöhler (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 6), tolse terreno all'idea di una chimica dei viventi diversa da quella del laboratorio. Buchner morì nel 1917, ferito al fronte rumeno durante la Prima guerra mondiale.

9.4 Dal piruvato al ciclo di Krebs

9.4.1 L'ingresso nel mitocondrio

Quando c'è ossigeno, il piruvato entra nel mitocondrio, l'organulo a due membrane che conosci dal primo biennio (Figura 9.4). La membrana esterna è attraversata da grandi pori proteici e lascia passare le piccole molecole; la membrana interna, ripiegata nelle creste, è invece imper-

meabile perfino agli ioni H^+, e ogni sostanza la attraversa solo con un trasportatore specifico. La membrana interna racchiude la *matrice*, dove avvengono l'ossidazione del piruvato e il ciclo di Krebs; nella membrana stessa si trovano la catena respiratoria e l'ATP sintasi. Il mitocondrio contiene anche un proprio DNA circolare e propri ribosomi, tracce della sua origine da un batterio (vedi *Scienze naturali 2*, cap. 3).

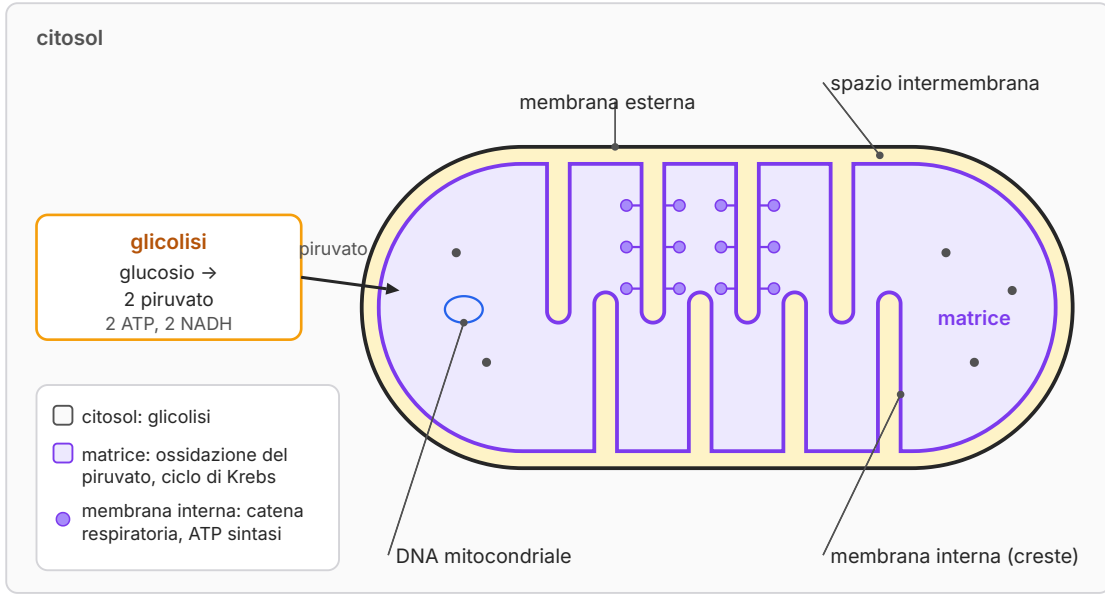


Figura 9.4 Le sedi del catabolismo del glucosio in una cellula eucariotica (schema; un mitocondrio è largo circa 0,5–1 µm). La glicolisi avviene nel citosol; il piruvato entra nella matrice, dove si svolgono la sua ossidazione e il ciclo di Krebs. La membrana interna, ripiegata nelle creste, contiene la catena respiratoria e le ATP sintasi, la cui parte sporgente (in viola) è rivolta verso la matrice.

Nella matrice il piruvato subisce una **decarbossilazione ossidativa**: perde un atomo di carbonio come CO_2 e il frammento di due atomi che resta viene ossidato e legato al coenzima A. La reazione è catalizzata da un enorme assemblaggio di tre enzimi diversi, il **complesso della piruvato deidrogenasi**, che lavora con cinque coenzimi, fra cui il NAD^+, il FAD, il CoA e la tiamina pirofosfato (dalla vitamina B_1):

$$\text{piruvato} + \text{CoA-SH} + NAD^+ \rightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + \text{NADH}$$

Per ogni glucosio la reazione avviene due volte: 2 × 3 atomi di carbonio diventano 2 CO_2 e 2 gruppi acetilici, e si formano altri 2 NADH. La reazione è irreversibile: l'acetil-CoA non può essere riconvertito in piruvato. Per questo, come vedrai nel capitolo 10, gli animali non possono trasformare in glucosio gli acidi grassi, che vengono demoliti proprio ad acetil-CoA.

9.4.2 Le otto tappe del ciclo

L'ossidazione dell'acetil-CoA avviene nel **ciclo di Krebs** (o ciclo dell'acido citrico), una via ciclica di otto reazioni che nella matrice ossida i due atomi di carbonio del gruppo acetilico a CO_2 e trasferisce i loro elettroni ai trasportatori. Prende il nome dal biochimico Hans Krebs. Ebreo, nell'aprile del 1933 era stato licenziato dall'università di Friburgo in base alla legge del 7 aprile sul pubblico impiego, che escludeva i funzionari «non ariani» (vedi *Storia 5*, cap. 8), ed era emigrato in Inghilterra, prima a Cambridge e poi, dal 1935, a Sheffield. A Sheffield, nel 1937, insieme con William Arthur Johnson, lo dedusse da esperimenti sul muscolo pettorale di piccione: alcuni acidi organici, aggiunti al tessuto, aumentavano il consumo di ossigeno molto più di quanto avrebbe richiesto la loro sola ossidazione, come se agissero da catalizzatori, e il citrato si formava dall'ossalacetato. La rivista *Nature* rifiutò il breve articolo; uscì nello stesso anno sulla rivista olandese *Enzymologia*. Nel 1953 Krebs ricevette il Nobel per la medicina, insieme con Fritz Lipmann, lo scopritore del coenzima A.

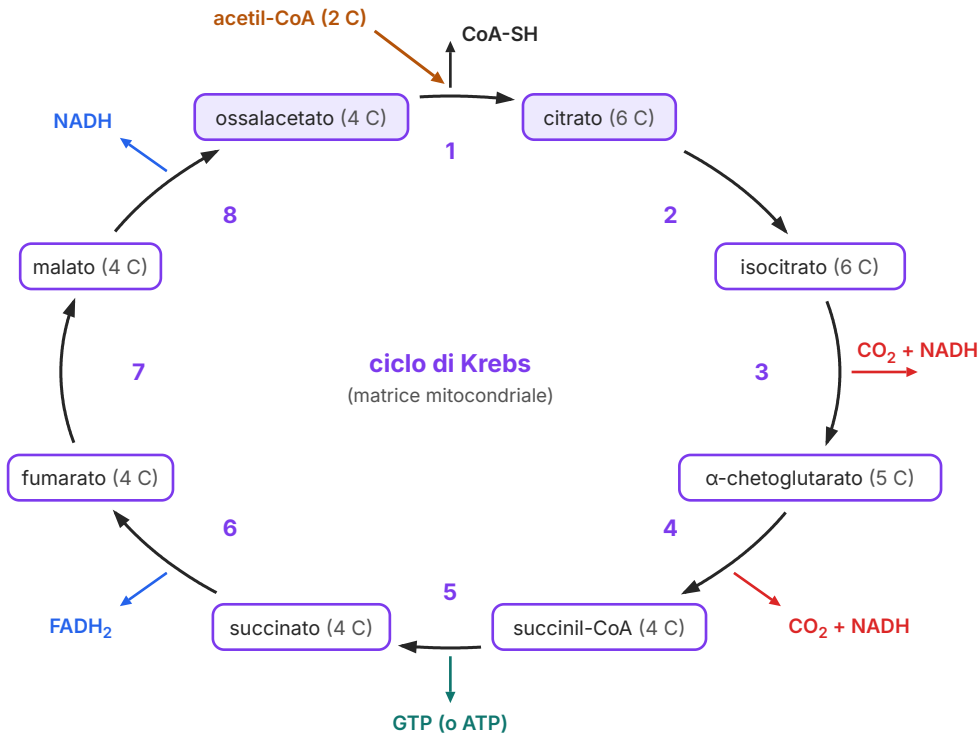


Figura 9.5 Il ciclo di Krebs, nella matrice mitocondriale: gli otto intermedi con il numero di atomi di carbonio; i numeri all'interno indicano le tappe descritte nel testo. Per ogni acetil-CoA che entra si liberano 2 CO_2, 3 NADH, 1 $FADH_2$ e 1 GTP (o ATP), e l'ossalacetato si rigenera. Le molecole d'acqua che entrano nelle tappe 1 e 7 e il CoA che entra nella tappa 4 ed esce nella 5 non sono indicati.

Seguiamo un giro (Figura 9.5). Nella tappa 1 la *citrato sintasi* unisce il gruppo acetilico (2 C) all'ossalacetato (4 C) e forma il citrato (6 C), liberando il CoA. Il citrato è isomerizzato a isocitrato (tappa 2). Seguono due decarbossilazioni ossidative, simili a quella del piruvato: l'isocitrato perde CO_2 e diventa α-chetoglutarato (5 C, tappa 3), che perde un altro CO_2 e si lega al CoA formando il succinil-CoA (4 C, tappa 4); ognuna produce un NADH. Nella tappa 5 l'energia del tioestere del succinil-CoA forma, con una fosforilazione a livello del substrato, un GTP (nel fegato) o un ATP (in altri tessuti); i due sono equivalenti, perché il GTP cede facilmente il suo fosfato all'ADP. Le ultime tre tappe rigenerano l'ossalacetato: il succinato è ossidato a fumarato dalla *succinato deidrogenasi*, che trasferisce due atomi di idrogeno al FAD (tappa 6); il fumarato addiziona acqua e diventa malato (tappa 7); il malato è ossidato a ossalacetato, con un terzo NADH (tappa 8).

L'ultima tappa ha da sola un $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo, circa +29,7 kJ/mol: procede perché la prima tappa del giro successivo, con $\Delta G^{\circ\prime} \approx -32{,}2$ kJ/mol, consuma continuamente l'ossalacetato e ne tiene bassissima la concentrazione. Il bilancio di un giro è:

$$\text{acetil-CoA} + 3\text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{P}_\text{i} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + 2\text{H}^+ + \text{CoA-SH}$$

Per ogni glucosio i giri sono due, perché dal glucosio si formano due acetil-CoA. Contando insieme ossidazione del piruvato e ciclo, i 6 atomi di carbonio del glucosio sono tutti usciti come CO_2: 2 nella decarbossilazione del piruvato e 4 nel ciclo. Del glucosio non resta nulla, se non gli elettroni, ora sui trasportatori: in tutto, dalla glicolisi alla fine del ciclo, 10 NADH e 2 $FADH_2$.

> **ERRORE FREQUENTE**
>
> **«Il ciclo di Krebs consuma ossigeno» e «la glicolisi avviene nel mitocondrio».** Nessuna tappa del ciclo usa O_2: gli atomi di ossigeno dei CO_2 prodotti vengono dai substrati e dall'acqua, e l'O_2 che respiriamo è solo l'accettore finale degli elettroni nella catena respiratoria. Il ciclo però si ferma senza ossigeno, perché senza la catena il NADH e il $FADH_2$ non vengono riossidati e mancano NAD^+ e FAD. La glicolisi, invece, avviene nel citosol e non richiede né mitocondri né ossigeno.

9.4.3 Un crocevia del metabolismo

Il ciclo di Krebs non serve soltanto a demolire. Diversi suoi intermedi escono dal ciclo come materia prima per le sintesi: il citrato fornisce l'acetil-CoA per la sintesi degli acidi grassi nel citosol, l'α-chetoglutarato e l'ossalacetato danno origine agli amminoacidi glutammato e aspartato, il succinil-CoA è il punto di partenza dell'eme dell'emoglobina. Altre reazioni, viceversa, riforniscono il ciclo di intermedi: per esempio il piruvato può essere carbossilato direttamente a ossalacetato. Per questo il ciclo si dice una **via anfibolica**, che partecipa sia al catabolismo sia all'anabolismo: nel capitolo 10 lo ritroverai al centro della mappa del metabolismo.

9.5 La catena respiratoria e la chemiosmosi

9.5.1 La catena di trasporto degli elettroni

Gli elettroni raccolti dal NADH e dal $FADH_2$ arrivano all'ossigeno lungo la **catena di trasporto degli elettroni**, o catena respiratoria: una serie di trasportatori inseriti nella membrana mitocondriale interna, ciascuno dei quali si riduce prendendo elettroni dal precedente e si riossida cedendoli al successivo (Figura 9.6). La maggior parte dei trasportatori è riunita in quattro grandi complessi proteici, numerati da I a IV, che contengono gruppi capaci di ossidarsi e ri-

dursi: flavine, centri ferro-zolfo, ioni rame e gruppi eme come quello dell'emoglobina. Due trasportatori piccoli e mobili li collegano.

- Il **complesso I** riceve due elettroni dal NADH, che torna NAD^+, e li passa all'ubichinone.
- Il **complesso II** è la succinato deidrogenasi del ciclo di Krebs, l'unico enzima del ciclo inserito nella membrana: gli elettroni del succinato passano al FAD legato all'enzima e da qui all'ubichinone. Il $FADH_2$ non è libero, ma i suoi elettroni entrano nella catena a questo punto.
- L'**ubichinone** (o coenzima Q) è una piccola molecola liposolubile che si muove nel doppio strato lipidico e porta gli elettroni dai complessi I e II al complesso III.
- Il **complesso III** passa gli elettroni al **citocromo c**, una piccola proteina con un gruppo eme che si muove sulla faccia esterna della membrana interna, nello spazio intermembrana.
- Il **complesso IV** (citocromo c ossidasi) prende gli elettroni dal citocromo c e li cede all'ossigeno, che si riduce ad acqua: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$. È questo il punto in cui respiriamo.

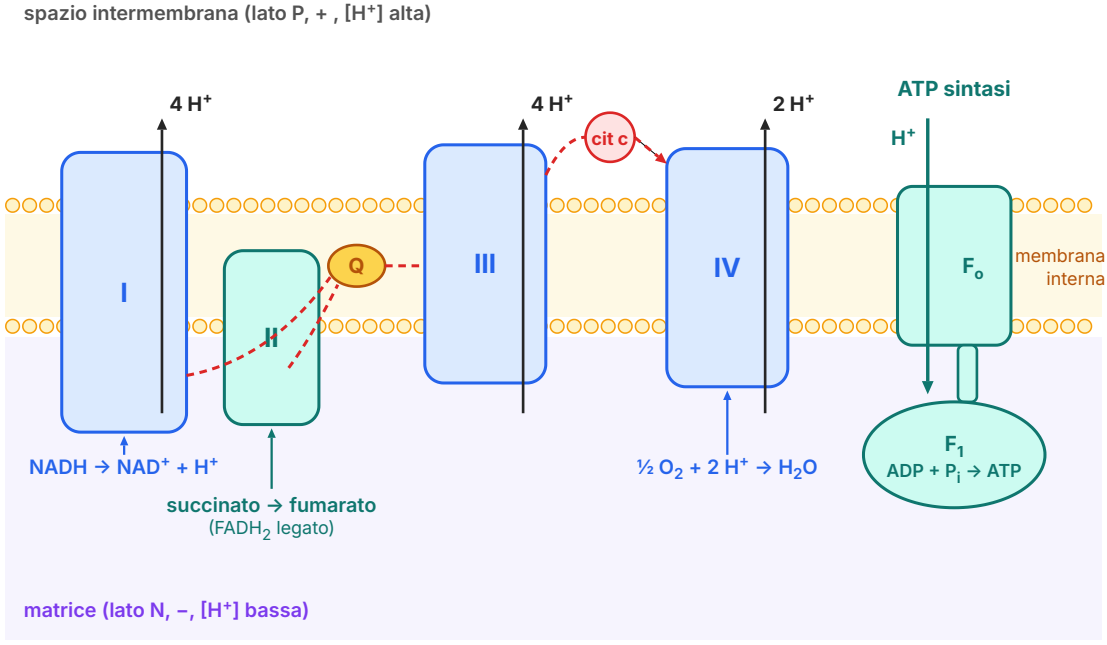


Figura 9.6 La catena respiratoria e l'ATP sintasi nella membrana mitocondriale interna (schema non in scala). In alto lo spazio intermembrana, in basso la matrice. Le frecce tratteggiate rosse indicano il percorso degli elettroni; le frecce nere verticali gli ioni H^+ pompati dalla matrice allo spazio intermembrana per ogni coppia di elettroni del NADH (4 + 4 + 2). Il complesso II non pompa protoni. Gli ioni H^+ rientrano nella matrice attraverso l'ATP sintasi, la cui parte F_1 sporge nella matrice.

Mentre gli elettroni li attraversano, tre complessi pompano ioni H^+ dalla matrice allo spazio intermembrana: per ogni coppia di elettroni del NADH, circa 4 il complesso I, 4 il complesso III e

2 il complesso IV, in tutto 10. Gli elettroni del succinato, che saltano il complesso I, ne fanno uscire solo 6. La Tabella 9.2 riassume i ruoli dei quattro complessi.

Tabella 9.2 I complessi della catena respiratoria. Il numero di protoni pompati si riferisce a una coppia di elettroni (valori comunemente accettati, Lehninger).

Complesso	Riceve elettroni da	Cede elettroni a	H^+ pompati
I (NADH deidrogenasi)	NADH	ubichinone	4
II (succinato deidrogenasi)	succinato (tramite FAD)	ubichinone	0
III (complesso del citocromo bc_1)	ubichinolo (QH_2)	citocromo c	4
IV (citocromo c ossidasi)	citocromo c	O_2	2

9.5.2 Dal potenziale all'energia libera

Perché gli elettroni vanno dal NADH all'ossigeno e non al contrario? Nel quarto anno hai imparato che ogni coppia redox ha un potenziale di riduzione, e che gli elettroni passano spontaneamente dalla coppia con il potenziale più basso a quella con il potenziale più alto (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 5). In biochimica si usano i potenziali standard a pH 7, $E^{\circ\prime}$. La coppia $NAD^+/NADH$ ha $E^{\circ\prime} = -0{,}320$ V, la coppia O_2/H_2O $+0{,}816$ V: gli elettroni del NADH scendono lungo la catena come l'acqua lungo una cascata a gradini, e ogni trasportatore ha un potenziale più alto del precedente (Figura 9.7). La variazione di energia libera si calcola con la relazione che già conosci:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime}$$

dove n è il numero di elettroni trasferiti, $F = 96\,485$ C/mol la costante di Faraday e $\Delta E^{\circ\prime}$ la differenza fra il potenziale della coppia che si riduce (l'accettore) e quello della coppia che si ossida (il donatore).

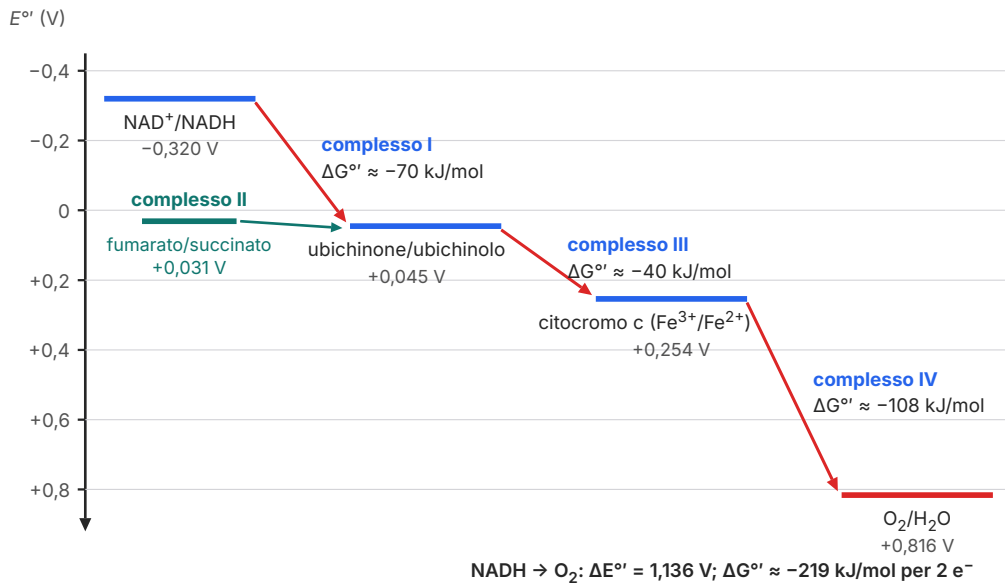


Figura 9.7 I potenziali standard di riduzione ($E°'$, a pH 7) dei principali trasportatori della catena respiratoria (valori da Nelson e Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*). L'asse è rivolto verso il basso: gli elettroni passano dalla coppia con il potenziale più basso a quella con il potenziale più alto e «scendono» cedendo energia libera; per ogni salto è indicato $\Delta G°' = -nF\Delta E°'$ per due elettroni. Gli elettroni del succinato entrano al livello dell'ubichinone.

ESEMPIO SVOLTO

Quanta energia libera dal NADH all'ossigeno?

Problema. Calcola $\Delta G°'$ per l'ossidazione del NADH da parte dell'ossigeno: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$, con i potenziali standard della Figura 9.7. Confronta il risultato con l'energia necessaria per sintetizzare una molecola di ATP.

Soluzione. L'accettore è l'ossigeno, il donatore il NADH; si trasferiscono 2 elettroni.

$$\Delta E°' = (+0{,}816\ \text{V}) - (-0{,}320\ \text{V}) = 1{,}136\ \text{V}$$

$$\Delta G°' = -2 \times 96\,485\ \text{C/mol} \times 1{,}136\ \text{V} = -219\,214\ \text{J/mol} \approx -219\ \text{kJ/mol}$$

(1 C × 1 V = 1 J.) In cifra tonda, circa −220 kJ/mol: è l'energia di circa 7 molecole di ATP, se servissero 30,5 kJ/mol ciascuna; in realtà dalla catena se ne ricavano circa 2,5 per NADH, perché nella cellula sintetizzare un ATP costa di più (ΔG di sintesi circa +50 kJ/mol) e una parte dell'energia si disperde come calore. La cellula non brucia il NADH in un solo passaggio, come in una fiamma: lo fa a gradini, e a ogni gradino una parte dell'energia sposta protoni.

9.5.3 La chemiosmosi di Mitchell

Fino agli anni Sessanta del Novecento i biochimici cercavano un composto intermedio fosforilato che collegasse il trasporto degli elettroni alla sintesi di ATP, come l'1,3-bisfosfoglicerato collega l'ossidazione alla fosforilazione nella glicolisi. Non lo trovarono mai, perché non esiste. Nel 1961 il biochimico britannico Peter Mitchell propose un'ipotesi diversa, accolta all'inizio con scetticismo: il legame fra le due cose non è una molecola, ma un *gradiente di protoni* attraverso una membrana. È la **chemiosmosi**: l'energia liberata dal trasporto degli elettroni viene usata per pompare ioni H^+ attraverso la membrana interna, e il ritorno spontaneo dei protoni attraverso l'ATP sintasi fornisce l'energia per sintetizzare ATP. Le prove sperimentali si accumularono negli anni Settanta, e nel 1978 Mitchell ricevette il Nobel per la chimica.

I protoni pompati nello spazio intermembrana producono due differenze fra i lati della membrana interna: una differenza di concentrazione, perché la matrice diventa meno acida dello spazio intermembrana, e una differenza di potenziale elettrico, perché la matrice resta carica negativamente rispetto all'esterno. Entrambe spingono i protoni a rientrare. Insieme formano la **forza motrice protonica**, che funziona come l'acqua raccolta dietro una diga: l'energia è immagazzinata nel dislivello, e la si recupera facendo passare l'acqua attraverso una turbina. Poiché la membrana interna è impermeabile agli ioni H^+, l'unica «turbina» disponibile è l'ATP sintasi.

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Quanto vale la forza motrice protonica

Spostare una mole di ioni H^+ dalla matrice allo spazio intermembrana costa energia per due ragioni. La prima è chimica: i protoni passano da una concentrazione più bassa a una più alta, e la variazione di energia libera vale $2{,}303\,RT\,\Delta\text{pH}$, dove ΔpH è la differenza di pH fra la matrice e lo spazio intermembrana. La seconda è elettrica: una carica positiva si sposta verso il lato positivo della membrana, e il lavoro per mole è $F\Delta\psi$, dove $\Delta\psi$ è la differenza di potenziale elettrico fra i due lati (lo stesso lavoro $q\Delta V$ che in fisica compie una carica q in una differenza di potenziale ΔV; vedi *Fisica 4*, cap. 11).

$$\Delta G = 2{,}303\,RT\,\Delta\text{pH} + F\Delta\psi$$

Nei mitocondri attivi si misurano tipicamente $\Delta\text{pH} \approx 0{,}75$ e $\Delta\psi \approx 0{,}15$–$0{,}2$ V. Con $\Delta\text{pH} = 0{,}75$, $\Delta\psi = 0{,}15$ V e $T = 310$ K (37 °C): $2{,}303 \times 8{,}314$ J/(mol·K) $\times$ 310 K $\times$ 0,75 = 4,5 kJ/mol, e 96 485 C/mol $\times$ 0,15 V = 14,5 kJ/mol, in tutto circa 19 kJ per mole di protoni. Il termine elettrico è più grande di quello chimico. Il passaggio di circa 4 moli di H^+ libera quindi circa 76 kJ: abbastanza per sintetizzare una mole di ATP nelle condizioni della cellula, dove servono circa 50 kJ.

9.5.4 L'ATP sintasi, un motore rotante

L'**ATP sintasi** è l'enzima della membrana interna che sintetizza ATP da ADP e P_i usando il flusso di protoni che rientrano nella matrice. È formata da due parti (Figura 9.6): la parte F_o, inserita nella membrana, contiene un anello di subunità proteiche attraverso cui passano i protoni; la parte F_1, una «testa» globulare che sporge nella matrice, contiene tre siti catalitici. Il passaggio dei protoni fa ruotare l'anello di F_o e un asse centrale fissato a esso; l'asse, girando dentro la testa F_1, ne deforma uno dopo l'altro i tre siti, che a turno legano ADP e P_i, li uniscono e rilasciano l'ATP. Ogni giro completo produce 3 molecole di ATP. Il meccanismo fu proposto dall'americano Paul Boyer e confermato dalla struttura tridimensionale della testa F_1, ottenuta dal britannico John Walker: i due ricevettero il Nobel per la chimica nel 1997. Nello stesso 1997 un gruppo giapponese osservò direttamente al microscopio la rotazione: attaccò un filamento proteico fluorescente all'asse di una testa F_1 isolata, che idrolizzando ATP lo faceva girare (cioè funzionava al contrario).

La sintesi di ATP che sfrutta il gradiente prodotto dalla catena respiratoria si chiama **fosforilazione ossidativa**: «ossidativa» perché l'energia viene dall'ossidazione dei trasportatori da parte dell'ossigeno. Nei mitocondri dei mammiferi l'anello di F_o ha 8 subunità, e ogni giro, che produce 3 ATP, richiede 8 protoni: $8/3 \approx 2{,}7$ H^+ per ATP. Circa un altro protone serve a portare nella matrice il fosfato e a scambiare l'ATP prodotto con l'ADP del citosol. In tutto occorrono circa 3,7 H^+, cioè, arrotondando, circa 4 H^+ per ogni ATP che arriva nel citosol. Con 10 protoni per NADH e 6 per succinato si ottengono circa $10/4 = 2{,}5$ ATP per NADH e $6/4 = 1{,}5$ ATP per $FADH_2$. I numeri non sono interi perché il legame fra elettroni e ATP passa attraverso il gradiente, che non conta le molecole una per una.

COLLEGAMENTI

Salute · Veleni, disaccoppianti e grasso bruno. Il cianuro e il monossido di carbonio si legano al complesso IV e bloccano il trasferimento degli elettroni all'ossigeno: la catena si ferma, il gradiente scompare e le cellule più esigenti, come i neuroni e le cellule del cuore, restano senza ATP in pochi minuti. Altri inibitori agiscono in altri punti: il rotenone, un insetticida di origine vegetale, sul complesso I; l'antibiotico oligomicina sulla parte F_o dell'ATP sintasi.

Un **disaccoppiante** fa invece l'opposto: lascia lavorare la catena ma rende la membrana interna permeabile ai protoni, che rientrano senza passare dall'ATP sintasi. L'ossigeno viene consumato, anzi più velocemente, ma l'energia del gradiente diventa calore invece che ATP. Negli Stati Uniti degli anni Trenta il 2,4-dinitrofenolo, un disaccoppiante, fu venduto come farmaco dimagrante: provocò febbri altissime, cecità e morti, e fu vietato per uso umano alla fine del decennio. Lo stesso principio è usato in modo controllato dal *grasso bruno*, abbondante nei neonati e nei mammiferi che vanno in letargo: i suoi mitocondri contengono una proteina disaccoppiante, la **termogenina**, che produce calore per mantenere la temperatura corporea.

9.6 Il bilancio energetico della respirazione

Ora possiamo contare (Figura 9.8 e Tabella E.1 in appendice). La fosforilazione a livello del substrato produce 4 ATP per glucosio: 2 netti nella glicolisi e 2 (come GTP) nel ciclo di Krebs. La fosforilazione ossidativa riceve 10 NADH e 2 $FADH_2$. I 2 $FADH_2$ e gli 8 NADH formati nella matrice danno $8 \times 2{,}5 + 2 \times 1{,}5 = 23$ ATP. I 2 NADH della glicolisi, però, si sono formati nel citosol, e la membrana interna non lascia passare il NADH: entrano nella matrice solo i loro elettroni, trasportati da un sistema di *navetta*. Nel fegato e nel cuore la navetta del malato-aspartato li consegna al NAD^+ della matrice, e ciascuno vale ancora 2,5 ATP; nel muscolo scheletrico e nel cervello la navetta del glicerolo-3-fosfato li consegna a un FAD, e ciascuno vale 1,5 ATP. Da qui la forbice: 2 NADH citosolici valgono 3 o 5 ATP.

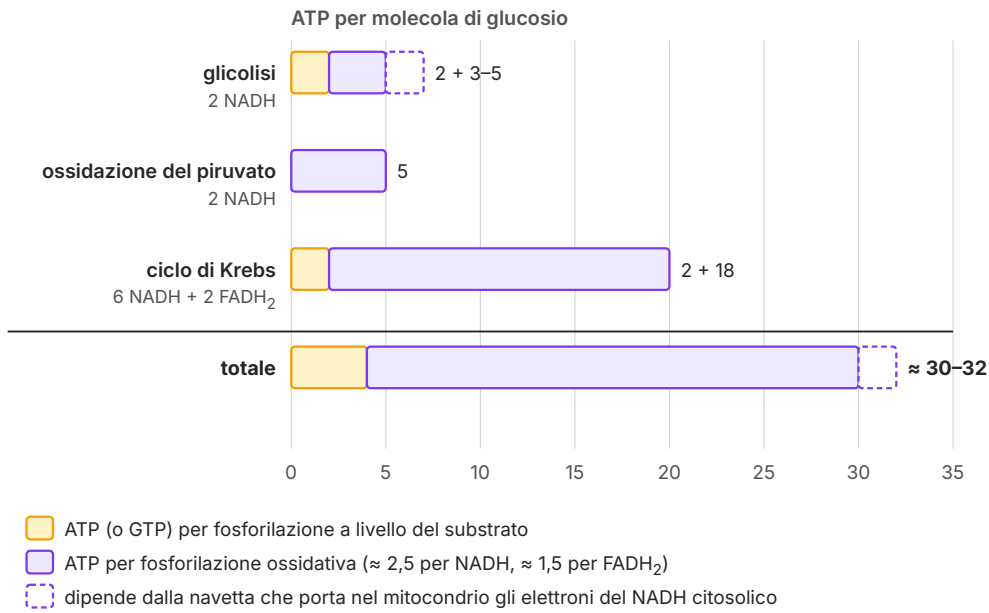


Figura 9.8 Il bilancio dell'ATP prodotto da una molecola di glucosio, con circa 2,5 ATP per NADH e 1,5 per $FADH_2$ (vedi Tabella E.1 in appendice). La parte tratteggiata della glicolisi dipende dalla navetta che porta nel mitocondrio gli elettroni del NADH citosolico (3 ATP con la navetta del glicerolo-3-fosfato, 5 con quella del malato-aspartato).

IN SINTESI

- Glicolisi (citosol): glucosio → 2 piruvato; 2 ATP netti, 2 NADH.
- Ossidazione del piruvato (matrice): 2 piruvato → 2 acetil-CoA + 2 CO_2; 2 NADH.
- Ciclo di Krebs (matrice), due giri: 4 CO_2, 6 NADH, 2 $FADH_2$, 2 GTP (ATP).
- Fosforilazione ossidativa: ≈ 2,5 ATP per NADH, ≈ 1,5 ATP per $FADH_2$; $\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime}$.
- Totale: 4 ATP per fosforilazione a livello del substrato + 26–28 per fosforilazione ossidativa = **≈ 30–32 ATP per glucosio**.
- Efficienza: con $\Delta G^{\circ\prime} \approx -2870$ kJ/mol per l'ossidazione completa del glucosio, 32 × 30,5 kJ/mol / 2870 kJ/mol ≈ 34 % (circa 32 % con 30 ATP).

ERRORE FREQUENTE

«La respirazione produce 36 o 38 ATP per glucosio». Sono i valori dei vecchi manuali, calcolati supponendo che ogni NADH desse 3 ATP e ogni $FADH_2$ 2 ATP: 4 + 10 × 3 + 2 × 2 = 38 (36 con la navetta del glicerolo-3-fosfato). Le misure del rapporto fra ATP prodotto e ossigeno consumato e la conoscenza dell'ATP sintasi (protoni per giro, costo del trasporto di fosfato e ATP) hanno portato ai valori attuali, ≈ 2,5 e ≈ 1,5, e quindi a ≈ 30–32 ATP. Non sono numeri esatti né interi: sono stime, ma quelle vecchie sono superate.

Un'efficienza di circa un terzo, calcolata con i valori standard, è notevole: un motore a benzina converte in lavoro una frazione simile o minore dell'energia del carburante. Nelle condizioni reali della cellula, dove sintetizzare un ATP costa circa 50 kJ/mol, l'efficienza stimata è ancora più alta. Il resto dell'energia non va perduto per l'organismo: si libera come calore, e negli uccelli e nei mammiferi mantiene costante la temperatura del corpo. Confrontando le due strade del glucosio, la fermentazione rende 2 ATP, la respirazione circa 30–32: è questa differenza, circa 15 volte, che spiega l'effetto Pasteur e perché le cellule che consumano molta energia, come i neuroni e le fibre muscolari rosse, sono ricchissime di mitocondri.

COLLEGAMENTI

Scienze motorie e Matematica · Quanto ATP consumiamo in un giorno? Il consumo di ossigeno a riposo si usa come unità del dispendio energetico: per convenzione, 1 MET corrisponde a 3,5 mL di O_2 per kilogrammo di massa corporea al minuto, volume riferito a 0 °C e 1 atm. Una persona di 70 kg a riposo consuma quindi circa $3{,}5 \times 70 = 245$ mL di O_2 al minuto, cioè 353 L in un giorno, pari a $353 / 22{,}4 \approx 15{,}8$ mol di O_2.

Ossidando glucosio, a 6 O_2 corrispondono circa 32 ATP: le moli di ATP prodotte sono $15{,}8 \times 32/6 \approx 84$ mol, e con la massa molare dell'ATP (507 g/mol) fanno circa 43 kg. Eppure nel corpo ce ne sono solo pochi grammi alla volta: ogni molecola di ATP viene idrolizzata e rigenerata migliaia di volte al giorno. Durante una corsa il consumo di ossigeno può aumentare di oltre dieci volte; le fibre muscolari lente, ricche di mitocondri e di mioglobina, sostengono lo sforzo prolungato, quelle rapide si affidano soprattutto alla glicolisi e si affaticano presto (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 16). L'allenamento di resistenza aumenta il numero di mitocondri nelle fibre.

ESPERIENZA DI LABORATORIO

Il lievito al lavoro: fermentazione e deidrogenasi

Obiettivo. Confrontare la velocità con cui il lievito fermenta zuccheri diversi, con e senza aria; mostrare che il lievito trasferisce elettroni ai trasportatori.

Materiali. Lievito di birra secco; glucosio, saccarosio, lattosio; cinque beute o bottigliette da 250 mL; palloncini o, meglio, siringhe graduate da 60 mL collegate a tappi forati con un tubicino; un bagno d'acqua a 35 °C; un termometro; soluzione di blu di metilene allo 0,01 %; provette.

Procedimento. In ogni beuta sciogli 5 g di zucchero in 100 mL di acqua a 35 °C (una beuta per zucchero, più una con sola acqua come controllo), aggiungi 5 g di lievito, agita, chiudi con il tappo collegato alla siringa e metti nel bagno a 35 °C. Leggi il volume di gas raccolto ogni 5 minuti per 40 minuti. Prepara una quinta beuta con glucosio, lasciata aperta e agitata spesso perché resti a contatto con l'aria: pesala all'inizio e alla fine, ricava dalla perdita di massa la massa di CO_2 uscita e confrontala con quella corrispondente al volume raccolto nella beuta chiusa con glucosio. Nella seconda parte metti in due provette 5 mL di sospensione di lievito con glucosio, una delle quali bollita per 5 minuti e raffreddata, aggiungi 5 gocce di blu di metilene e osserva il colore; poi agita energicamente la provetta che si è scolorita.

Sicurezza. Occhiali; il blu di metilene macchia pelle e vestiti, usa i guanti. L'acqua calda e il lievito bollito si maneggiano con le pinze, e il riscaldamento lo fa il docente; nessuna fiamma libera vicino al banco. Non assaggiare le soluzioni.

Risultati attesi. Il glucosio e il saccarosio producono molto CO_2; il lattosio e l'acqua quasi nulla, perché il lievito di birra non ha un enzima che scinda il lattosio. Nella beuta aperta la differenza rispetto a quella chiusa è piccola: con tanto zucchero a disposizione il lievito di birra continua a fermentare anche in presenza di aria, e l'effetto Pasteur si osserva bene solo con poco zucchero. Il blu di metilene si scolora nella provetta con il lievito vivo, perché le deidrogenasi gli cedono elettroni e lo riducono a una forma incolore; agitando, l'ossigeno dell'aria lo riossida e il blu ricompare. Nel lievito bollito, con gli enzimi denaturati, il colore resta.

Domande. Quale gas si raccoglie, e da quale reazione proviene? Perché la beuta con il lattosio si comporta come il controllo? Quale ruolo ha il blu di metilene, e quale molecola della cellula imita?

SINTESI

- L'ATP è un nucleotide (adenina, ribosio, tre fosfati); la sua idrolisi ad ADP + P_i ha $\Delta G^{\circ\prime} \approx -30{,}5$ kJ/mol per la repulsione fra le cariche, la risonanza e l'idratazione dei prodotti, non per un legame particolarmente forte.
- Le reazioni accoppiate rendono possibili reazioni con $\Delta G^{\circ\prime} > 0$ unendole all'idrolisi dell'ATP attraverso un intermedio comune; i $\Delta G^{\circ\prime}$ si sommano.
- NAD^+ e FAD trasportano elettroni (come NADH e $FADH_2$) dalle reazioni di ossidazione alla catena respiratoria; il NADPH fornisce elettroni alle sintesi; il coenzima A trasporta gruppi acilici come tioesteri (acetil-CoA).
- Il catabolismo demolisce e libera energia, l'anabolismo costruisce e la consuma; le vie metaboliche, lineari o cicliche, sono controllate nelle tappe irreversibili.
- La glicolisi, nel citosol, trasforma un glucosio (6 C) in 2 piruvato (3 C) in dieci tappe: investe 2 ATP, ne produce 4 per fosforilazione a livello del substrato e forma 2 NADH; il punto di controllo principale è la fosfofruttochinasi.
- Le fermentazioni lattica e alcolica rigenerano il NAD^+ senza ossigeno, permettendo alla glicolisi di continuare con un guadagno di soli 2 ATP.
- Nella matrice il piruvato è decarbossilato e ossidato ad acetil-CoA; il ciclo di Krebs ne ossida il gruppo acetilico producendo per giro 2 CO_2, 3 NADH, 1 $FADH_2$ e 1 GTP, e fornisce anche intermedi per le sintesi.
- Nella membrana interna la catena respiratoria trasferisce gli elettroni dal NADH ($E^{\circ\prime} = -0{,}32$ V) all'O_2 (+0,82 V); $\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime} \approx -220$ kJ/mol, e i complessi I, III e IV pompano protoni nello spazio intermembrana.
- Secondo la teoria chemiosmotica di Mitchell (1961), la forza motrice protonica fa ruotare l'ATP sintasi, che produce ATP: è la fosforilazione ossidativa. Cianuro e disaccoppianti la bloccano in modi opposti.
- Il bilancio è di circa 30–32 ATP per glucosio (≈ 2,5 per NADH, ≈ 1,5 per $FADH_2$), con un'efficienza di circa un terzo; i vecchi valori di 36–38 sono superati.

ESERCIZI

Comprendere e ricordare

1. ● Nell'ATP, il legame che unisce il fosfato α al carbonio 5′ del ribosio è un legame:

   A. fosfoanidridico

   B. fosfoestere

   C. N-glicosidico

   D. tioestere

2. ● In quale compartimento della cellula eucariotica avviene la glicolisi?

   A. nella matrice mitocondriale
   B. nella membrana mitocondriale interna
   C. nel citosol
   D. nello spazio intermembrana

3. ●● Quale enzima catalizza il principale punto di controllo della glicolisi?

   A. l'esochinasi
   B. l'aldolasi
   C. la piruvato chinasi
   D. la fosfofruttochinasi

4. ● Per ogni giro del ciclo di Krebs si formano:

   A. 2 CO_2, 3 NADH, 1 $FADH_2$, 1 GTP
   B. 3 CO_2, 2 NADH, 2 $FADH_2$, 1 GTP
   C. 2 CO_2, 2 NADH, 1 $FADH_2$, 2 ATP
   D. 1 CO_2, 3 NADH, 1 $FADH_2$, 1 ATP

5. ●● Quando una deidrogenasi ossida un substrato, il NAD^+ accetta:

   A. un solo protone
   B. uno ione idruro, cioè un protone e due elettroni
   C. un atomo di ossigeno
   D. un gruppo fosfato

6. ●● Qual è l'accettore finale degli elettroni nella catena respiratoria?

   A. il NAD^+
   B. l'ubichinone
   C. il citocromo c
   D. l'ossigeno

7. ●● Nella fosforilazione ossidativa, l'ATP sintasi produce ATP grazie a ioni H^+ che passano:

   A. dalla matrice allo spazio intermembrana
   B. dal citosol allo spazio intermembrana
   C. dallo spazio intermembrana alla matrice
   D. dalla matrice al citosol attraverso la membrana esterna

8. ●● Nella fermentazione lattica, la riduzione del piruvato a lattato serve soprattutto a:

   A. rigenerare il NAD^+ necessario alla glicolisi
   B. produrre altre 2 molecole di ATP
   C. eliminare il CO_2 prodotto dalla glicolisi
   D. preparare il piruvato per il ciclo di Krebs

Vero o falso

9. ● Il legame fra i fosfati β e γ dell'ATP è un legame particolarmente forte, e romperlo libera energia.

10. ● Il ciclo di Krebs consuma direttamente ossigeno molecolare.

11. ● Nella glicolisi si producono 4 molecole di ATP per glucosio, ma se ne consumano 2.

12. ●● Una molecola di $FADH_2$ fornisce alla catena respiratoria tanta energia quanta una molecola di NADH.

13. ●● In presenza di un disaccoppiante, i mitocondri smettono di consumare ossigeno.

Applicare

14. ● Nella tappa 10 della glicolisi il fosfoenolpiruvato cede il suo fosfato all'ADP. Usando la Tabella 9.1, calcola $\Delta G^{\circ\prime}$ della reazione fosfoenolpiruvato + ADP → piruvato + ATP. La reazione è spontanea in condizioni standard biochimiche?

15. ●● L'ultima tappa del ciclo di Krebs, malato + NAD^+ → ossalacetato + NADH + H^+, ha $\Delta G^{\circ\prime} \approx +29{,}7$ kJ/mol; la prima, acetil-CoA + ossalacetato + H_2O → citrato + CoA-SH, ha $\Delta G^{\circ\prime} \approx -32{,}2$ kJ/mol. Calcola $\Delta G^{\circ\prime}$ delle due tappe considerate insieme e spiega perché il ciclo procede.

16. ●● Gli elettroni del succinato entrano nella catena respiratoria con $E^{\circ\prime} \approx +0{,}031$ V (coppia fumarato/succinato). Calcola $\Delta G^{\circ\prime}$ per il trasferimento di due elettroni dal succinato all'ossigeno ($E^{\circ\prime} = +0{,}816$ V) e confrontalo con quello del NADH (≈ −220 kJ/mol). Che cosa spiega la differenza?

17. ●● Segui gli atomi di carbonio di un giro del ciclo di Krebs: quanti ne hanno l'ossalacetato, il citrato, l'α-chetoglutarato e il succinil-CoA? In quali tappe esce CO_2? Quanti giri servono per ossidare completamente il gruppo acetilico derivato da una molecola di glucosio?

18. ●●● Calcola il numero di ATP prodotti dall'ossidazione completa di una molecola di glucosio in una cellula del fegato (navetta del malato-aspartato) e in una fibra muscolare scheletrica (navetta del glicerolo-3-fosfato), con 2,5 ATP per NADH della matrice e 1,5 per $FADH_2$. Indica il contributo di ogni fase.

19. ●●● Un vecchio manuale attribuisce 3 ATP a ogni NADH e 2 a ogni $FADH_2$. Rifai il conto per una cellula del fegato con questi valori e spiega perché il risultato è considerato superato.

20. ●● L'ossidazione completa del glucosio ha $\Delta G^{\circ\prime} \approx -2870$ kJ/mol. Calcola l'efficienza con cui l'energia viene conservata nell'ATP ($\Delta G^{\circ\prime} = -30{,}5$ kJ/mol) se si formano 30 ATP, e se se ne formano 32.

21. ●●● Un muscolo che lavora senza ossigeno ricava ATP solo dalla glicolisi e dalla fermentazione lattica. Quante molecole di glucosio deve consumare per produrre la stessa quantità di ATP che ricaverebbe da una sola molecola ossidata completamente (32 ATP)? Quanti NADH netti produce la fermentazione lattica di una molecola di glucosio?

22. ●●● Per ogni coppia di elettroni, i complessi I, III e IV pompano rispettivamente 4, 4 e 2 protoni. Sapendo che la sintesi e l'esportazione di un ATP richiedono circa 4 H^+, calcola quanti ATP si ottengono da un NADH e da un succinato ($FADH_2$), e quanti ATP corrispondono a una molecola di O_2 ridotta con elettroni del NADH.

23. ●● Il lievito fermenta 1,80 g di glucosio (M = 180,16 g/mol): $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$. Quale volume di CO_2 si sviluppa a 25 °C e 1,00 atm? Quante moli di NADH si formano e si riossidano in tutto?

Leggere dati e figure

24. ●● Osserva la Figura 9.3. a) In quali tappe si consuma ATP e in quali se ne produce? b) In quale tappa si forma il NADH, e quale gruppo funzionale viene ossidato? c) Perché le tappe da 6 a 10 vanno contate due volte? d) In quale tappa il numero di atomi di carbonio per molecola si dimezza?

25. ●● Osserva la Figura 9.7. a) In quale salto si libera più energia libera? b) Calcola $\Delta G^{\circ\prime}$ per il passaggio di due elettroni dal succinato all'ubichinone ($E^{\circ\prime}$ +0,031 V → +0,045 V) e spiega perché il complesso II non pompa protoni. c) Somma i $\Delta G^{\circ\prime}$ dei tre salti dal NADH all'ossigeno e confronta la somma con il valore calcolato direttamente.

26. ●●● Un gruppo di ricerca misura il consumo di ossigeno di mitocondri isolati in una soluzione con succinato e fosfato, aggiungendo varie sostanze una dopo l'altra (dati di esempio, costruiti secondo il modello chemiosmotico, in nmol O_2/min): solo mitocondri e succinato, 8; dopo l'aggiunta di ADP, 40; quando l'ADP si è esaurito, 9; dopo una nuova aggiunta di ADP e poi di oligomicina, 8; dopo l'aggiunta di 2,4-dinitrofenolo, 55; dopo l'aggiunta di cianuro, 0. Spiega ogni variazione con il modello della chemiosmosi.

Indagare e argomentare

27. ●● Progetta un esperimento per stabilire se il lievito fermenta il saccarosio più lentamente del glucosio. Indica la variabile indipendente, quella dipendente, quelle da tenere costanti, il controllo, le misure ripetute e le norme di sicurezza.

28. ●●● Il cianuro uccide in pochi minuti, il 2,4-dinitrofenolo provoca febbre altissima. Entrambi riducono la produzione di ATP nei mitocondri. Spiega perché i due effetti sono così diversi, collegandoli a che cosa accade al consumo di ossigeno e al gradiente di protoni. Perché invece la termogenina del grasso bruno è utile?

29. ●●● «L'esperimento di Buchner del 1897 è la nascita della biochimica.» Spiega quale idea l'esperimento mise in crisi, che cosa dimostrò e perché aprì la strada allo studio delle vie metaboliche tappa per tappa. Confrontalo con la sintesi dell'urea di Wöhler.

Verso l'esame

30. ●●● **Dal documento al colloquio.** Il matematico e astronomo Pierre-Simon Laplace, che con Antoine Lavoisier aveva misurato il calore prodotto dagli animali, scriveva nella seconda edizione (1798) dell'*Exposition du système du monde* (libro I): «L'air n'est point une substance homogène ; l'expérience a fait connoître qu'il est composé de trois parties de gas azot, et d'une partie de gas oxigène, gas éminemment respirable, dans lequel les corps répandent en brûlant, une vive lumière, et qui seul, paroît nécessaire à leur combustion, et à la respiration des animaux, que l'on sait être une combustion lente, principale source de la chaleur animale.» («L'aria non è una sostanza omogenea; l'esperienza ha fatto conoscere che è composta di tre parti di gas azoto e di una parte di gas ossigeno, gas eminentemente respirabile, nel quale i corpi, bruciando, spandono una viva luce, e che solo sembra necessario alla loro combustione e alla respirazione degli animali, che si sa essere una combustione lenta, principale sorgente del calore animale.») a) In che senso la respirazione cellulare è davvero una «combustione lenta», e in che cosa differisce da una combustione? b) Dove va a finire l'energia del glucosio che non viene conservata nell'ATP? Collega la risposta al primo principio della termodinamica (Fisica). c) Confronta la composizione dell'aria indicata nel testo con quella attuale. d) Lavoisier, il cui lavoro è alla base di questa frase, fu ghigliottinato nel 1794: in quale fase della Rivoluzione francese (Storia)?

31. ●●● **Collegare.** «Il mitocondrio è una pila.» Discuti l'affermazione collegando questo capitolo alle pile e ai potenziali di riduzione (*Scienze naturali 4*, cap. 5) e alla fotosintesi (capitolo 11): chi fa da anodo e chi da catodo, che cosa corrisponde alla corrente e al ponte salino, e in che cosa la chemiosmosi del cloroplasto somiglia e si oppone a quella del mitocondrio.

Approfondimento

32. ●●● In un mitocondrio attivo a 37 °C la matrice ha pH 0,80 unità più alto dello spazio intermembrana e un potenziale elettrico inferiore di 0,17 V. Calcola l'energia libera necessaria per pompare una mole di H^+ dalla matrice allo spazio intermembrana, distinguendo il termine chimico da quello elettrico. Bastano 3 moli di protoni per sintetizzare una mole di ATP, se nella cellula servono circa 50 kJ/mol?

PER APPROFONDIRE

- [LEH] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*: i capitoli sulla bioenergetica, sulla glicolisi, sul ciclo dell'acido citrico e sulla fosforilazione ossidativa, da cui sono tratti i valori di $\Delta G^{\circ\prime}$ e di $E^{\circ\prime}$ del capitolo.
- [STR] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*: per i meccanismi delle singole tappe e per la struttura dell'ATP sintasi.
- [ALB] B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*: il capitolo sulla conversione dell'energia nei mitocondri, con una chiara presentazione della chemiosmosi.

Glossario del capitolo

Acetil-CoA
Tioestere fra l'acido acetico e il coenzima A; trasferisce il gruppo acetilico ed è il punto d'incontro della demolizione di zuccheri, grassi e amminoacidi (ingl. *acetyl-CoA*).

Anabolismo
Insieme delle reazioni che sintetizzano molecole complesse da molecole semplici; consuma ATP e usa come riducente il NADPH (ingl. *anabolism*).

ATP sintasi
Enzima della membrana mitocondriale interna (e dei tilacoidi) che sintetizza ATP da ADP e fosfato usando il flusso di protoni a favore del gradiente; la parte F_o ruota nella membrana, la parte F_1 catalizza (ingl. *ATP synthase*).

Catabolismo
Insieme delle reazioni che demoliscono molecole complesse in molecole semplici, liberando energia che in parte viene conservata come ATP (ingl. *catabolism*).

Catena di trasporto degli elettroni
Serie di trasportatori della membrana mitocondriale interna che trasferisce gli elettroni dal NADH e dal $FADH_2$ all'ossigeno, pompando protoni; detta anche catena respiratoria (ingl. *electron transport chain*).

Chemiosmosi
Accoppiamento fra trasporto di elettroni e sintesi di ATP attraverso un gradiente di protoni ai due lati di una membrana (Mitchell, 1961) (ingl. *chemiosmosis*).

Ciclo di Krebs
Via ciclica di otto reazioni, nella matrice mitocondriale, che ossida il gruppo acetilico dell'acetil-CoA a 2 CO_2 producendo 3 NADH, 1 $FADH_2$ e 1 GTP per giro; detto anche ciclo dell'acido citrico (ingl. *citric acid cycle*, *Krebs cycle*).

Decarbossilazione ossidativa
Reazione in cui una molecola perde un gruppo carbossilico come CO_2 e contemporaneamente si ossida, cedendo elettroni a un trasportatore (ingl. *oxidative decarboxylation*).

Disaccoppiante
Sostanza o proteina che rende la membrana mitocondriale interna permeabile ai protoni, così che l'energia del gradiente diventa calore invece che ATP (ingl. *uncoupler*).

Effetto Pasteur
Diminuzione del consumo di zucchero di un organismo che fermenta quando dispone di ossigeno e può respirare (ingl. *Pasteur effect*).

Forza motrice protonica
Energia immagazzinata nel gradiente di protoni attraverso una membrana, dovuta alla differenza di pH e alla differenza di potenziale elettrico fra i due lati (ingl. *proton-motive force*).

Fosfofruttochinasi
Enzima allosterico della glicolisi che fosforila il fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato; inibito da ATP e citrato, attivato da AMP, è il principale punto di controllo della via (ingl. *phosphofructokinase*).

Fosforilazione a livello del substrato
Sintesi di ATP (o GTP) per trasferimento diretto di un gruppo fosfato all'ADP da un substrato con $\Delta G^{\circ\prime}$ di idrolisi molto negativo (ingl. *substrate-level phosphorylation*).

Fosforilazione ossidativa
Sintesi di ATP da parte dell'ATP sintasi, alimentata dal gradiente di protoni prodotto dalla catena respiratoria durante l'ossidazione di NADH e $FADH_2$ da parte dell'ossigeno (ingl. *oxidative phosphorylation*).

Legame fosfoanidridico
Legame P–O–P fra due gruppi fosfato, formato per condensazione con perdita di acqua; nell'ATP unisce i fosfati α–β e β–γ (ingl. *phosphoanhydride bond*).

Nucleoside
Molecola formata da una base azotata legata a uno zucchero a cinque atomi di carbonio, senza gruppi fosfato, per esempio l'adenosina (ingl. *nucleoside*).

Reazioni accoppiate
Coppia di reazioni condotte insieme, di solito attraverso un intermedio comune, in modo che una con $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo renda possibile l'altra con $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo; le variazioni di energia libera si sommano (ingl. *coupled reactions*).

Ubichinone
Piccola molecola liposolubile, detta anche coenzima Q, che si muove nella membrana mitocondriale interna e porta elettroni dai complessi I e II al complesso III (ingl. *ubiquinone*).

Via metabolica
Serie di reazioni catalizzate da enzimi in cui il prodotto di ciascuna è il substrato della successiva; può essere lineare o ciclica (ingl. *metabolic pathway*).

Soluzioni

1. B. Il fosfato α è esterificato con l'ossidrile del C5′: è un legame fosfoestere; i legami fosfoanidridici uniscono α–β e β–γ.

2. C. La glicolisi avviene nel citosol; la matrice ospita l'ossidazione del piruvato e il ciclo di Krebs.

3. D. La fosfofruttochinasi è allosterica: inibita da ATP e citrato, attivata da AMP e ADP.

4. A. Due decarbossilazioni (tappe 3 e 4), tre deidrogenasi con NAD^+ (3, 4, 8), una con FAD (6), una fosforilazione a livello del substrato (5).

5. B. Il NAD^+ riceve uno ione idruro H^-; il secondo idrogeno tolto al substrato va in soluzione come H^+.

6. D. L'O_2, ridotto ad acqua dal complesso IV.

7. C. I protoni, pompati fuori dalla catena, rientrano nella matrice a favore del gradiente attraverso F_o.

8. A. Il NADH della tappa 6 deve tornare NAD^+, altrimenti la glicolisi si ferma; la fermentazione non produce altro ATP.

9. F. Rompere un legame richiede sempre energia; il $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo è quello dell'intera idrolisi, perché i prodotti (ADP, fosfato idratati e stabilizzati per risonanza) hanno energia libera molto minore.

10. F. Nessuna tappa del ciclo usa O_2; l'ossigeno serve solo come accettore finale nella catena, che rigenera NAD^+ e FAD.

11. V. 2 ATP nelle tappe 1 e 3; 2 × 2 = 4 nelle tappe 7 e 10; netto 2.

12. F. Gli elettroni del $FADH_2$ entrano a livello dell'ubichinone, saltano il complesso I e fanno pompare 6 H^+ invece di 10: ≈ 1,5 ATP contro ≈ 2,5.

13. F. Il consumo di O_2 continua e anzi aumenta, perché la catena non è più frenata dal gradiente; si ferma la sintesi di ATP e l'energia diventa calore.

14. PEP → piruvato + P_i: −61,9 kJ/mol; ADP + P_i → ATP: +30,5 kJ/mol. Somma: −31,4 kJ/mol. Sì, è spontanea (e nella cellula è irreversibile).

15. (+29,7) + (−32,2) = −2,5 kJ/mol. L'insieme è spontaneo: la citrato sintasi consuma l'ossalacetato appena formato e ne mantiene bassissima la concentrazione, il che rende negativo il ΔG reale della tappa 8.

16. $\Delta E^{\circ\prime}$ = 0,816 − 0,031 = 0,785 V; $\Delta G^{\circ\prime}$ = −2 × 96 485 × 0,785 J/mol = −151 kJ/mol (≈ −151 kJ/mol), contro ≈ −220 kJ/mol del NADH. Gli elettroni del succinato partono da un potenziale più alto e saltano il complesso I: si pompano meno protoni (6 invece di 10) e si formano ≈ 1,5 ATP invece di 2,5.

17. Ossalacetato 4, citrato 6, α-chetoglutarato 5, succinil-CoA 4 (e succinato, fumarato, malato 4). CO_2 esce nella tappa 3 (isocitrato → α-chetoglutarato) e nella tappa 4 (α-chetoglutarato → succinil-CoA). Da un glucosio si formano 2 acetil-CoA: servono 2 giri.

18. Fegato: glicolisi 2 ATP + 2 NADH × 2,5 = 5; ossidazione del piruvato 2 NADH × 2,5 = 5; Krebs 2 GTP + 6 NADH × 2,5 (= 15) + 2 $FADH_2$ × 1,5 (= 3). Totale 2 + 5 + 5 + 2 + 15 + 3 = **32** ATP. Muscolo: i 2 NADH citosolici valgono 2 × 1,5 = 3, totale **30** ATP.

19. Fegato: 4 ATP diretti + 10 NADH × 3 + 2 $FADH_2$ × 2 = 4 + 30 + 4 = **38** (36 con la navetta del glicerolo-3-fosfato). Il calcolo suppone rapporti interi che le misure non confermano: con circa 10 H^+ per NADH, 6 per $FADH_2$ e circa 4 H^+ per ATP (anello di 8 subunità più il trasporto di fosfato e ATP) si ottengono ≈ 2,5 e ≈ 1,5, quindi 30–32.

20. 30 × 30,5 / 2870 = 31,9 % ≈ 32 %; 32 × 30,5 / 2870 = 34,0 % ≈ 34 %.

21. La fermentazione dà 2 ATP per glucosio: servono 32 / 2 = **16** molecole di glucosio. NADH netti: 0, perché i 2 NADH della glicolisi sono riossidati dalla lattato deidrogenasi.

22. NADH: 4 + 4 + 2 = 10 H^+ → 10/4 = **2,5** ATP. Succinato: 4 + 2 = 6 H^+ (salta il complesso I) → 6/4 = **1,5** ATP. Una molecola di O_2 accetta 4 elettroni, cioè quelli di 2 NADH: 2 × 2,5 = **5** ATP.

23. n(glucosio) = 1,80 / 180,16 = 0,00999 mol; $n(CO_2)$ = 2 × 0,00999 = 0,0200 mol; $V = nRT/P$ = 0,0200 × 0,082 06 × 298,15 / 1,00 = **0,489 L**. Si formano 0,0200 mol di NADH (2 per glucosio, nella tappa 6) e altrettante si riossidano nella riduzione dell'acetaldeide a etanolo: il bilancio netto del NADH è zero.

24. a) Consumo nelle tappe 1 (esochinasi) e 3 (fosfofruttochinasi); produzione nelle tappe 7 (fosfoglicerato chinasi) e 10 (piruvato chinasi). b) Nella tappa 6: il gruppo aldeidico della gliceraldeide-3-fosfato è ossidato a gruppo carbossilico (che si lega al fosfato come anidride mista). c) Perché l'aldolasi forma due triosi e la tappa 5 converte il diidrossiacetone fosfato in gliceraldeide-3-fosfato: ogni glucosio dà 2 molecole che percorrono la fase di recupero. d) Nella tappa 4 (6 C → 3 C + 3 C).

25. a) Il salto citocromo c → O_2 (complesso IV), ≈ −108 kJ/mol. b) $\Delta G^{\circ\prime}$ = −2 × 96 485 × (0,045 − 0,031) J/mol ≈ −2,7 kJ/mol: troppo poco per pompare protoni contro il gradiente (ne servirebbero circa 20 kJ per mole di H^+). c) (−70,4) + (−40,3) + (−108,4) = −219,2 kJ/mol, uguale a −2 × 96 485 × 1,136 J/mol = −219,2 kJ/mol: i ΔG si sommano perché G è una funzione di stato.

26. Succinato: la catena lavora lentamente perché senza ADP l'ATP sintasi è ferma e il gradiente frena il pompaggio. ADP: l'ATP sintasi consuma il gradiente, la catena accelera (consumo ×5). ADP esaurito: si torna al valore basso. Oligomicina: blocca F_o, i protoni non rientrano e la catena rallenta anche con ADP. Dinitrofenolo: disaccoppiante, i protoni rientrano attraverso la membrana, il gradiente sparisce e la catena corre al massimo, senza ATP. Cianuro: blocca il complesso IV, nessun elettrone arriva all'O_2: consumo zero.

27. Traccia: variabile indipendente il tipo di zucchero (glucosio, saccarosio); dipendente il volume di CO_2 raccolto nel tempo (o la velocità iniziale, mL/min). Costanti: massa di zucchero (meglio a parità di moli di monomeri, perché il saccarosio è un disaccaride), massa e lotto di lievito, volume d'acqua, temperatura (bagno a 35 °C), pH, tempo di misura. Controllo: lievito in sola acqua (e, se possibile, lievito bollito con glucosio). Almeno tre repliche per condizione, media e dispersione. Sicurezza: occhiali, acqua calda maneggiata con cura, niente fiamme, contenitori non sigillati ermeticamente (il gas deve poter uscire nella siringa).

28. Traccia: il cianuro blocca il complesso IV: gli elettroni non arrivano all'O_2, la catena si ferma, il consumo di ossigeno crolla, il gradiente si esaurisce e non si forma più ATP per via ossidativa; neuroni e cuore, che dipendono quasi solo dalla respirazione, cedono in pochi minuti. Il dinitrofenolo lascia funzionare la catena (anzi il consumo di O_2 e di nutrienti aumenta) ma dissipa il gradiente: l'energia diventa calore, da cui l'ipertermia, mentre l'ATP diminuisce. La termogenina fa la stessa cosa in modo regolato e solo nel grasso bruno: produce calore utile ai neonati e agli animali in letargo.

29. Traccia: l'idea messa in crisi era che la fermentazione richiedesse cellule vive dotate di una «forza vitale» (posizione derivata dagli esperimenti di Pasteur). Buchner mostrò che un estratto senza cellule fermenta lo zucchero: la fermentazione è opera di sostanze chimiche, gli enzimi. Da allora si poterono estrarre, separare e studiare in provetta i singoli enzimi e i singoli intermedi, ricostruendo la glicolisi tappa per tappa. Wöhler (1828) aveva mostrato che una sostanza prodotta dai viventi, l'urea, si poteva ottenere da un composto inorganico; Buchner mostrò che anche i *processi* dei viventi avvengono fuori dalla cellula. Entrambi indebolirono il vitalismo, l'uno sul piano dei composti, l'altro su quello delle reazioni.

30. Traccia: a) l'equazione complessiva della respirazione è quella della combustione del glucosio, e ΔG totale è lo stesso (circa −2870 kJ/mol); ma nella cellula l'ossidazione avviene in molte tappe catalizzate da enzimi, a 37 °C, gli elettroni passano ai trasportatori (NADH, $FADH_2$) e scendono gradualmente fino all'O_2, e circa un terzo dell'energia è conservato come ATP grazie alla chemiosmosi; nella fiamma tutto diventa subito calore e luce. b) Primo principio: l'energia si conserva; la parte non conservata nell'ATP si libera come calore, la «chaleur animale» di Laplace, che mantiene la temperatura corporea di uccelli e mammiferi; collegamento con il calori-

metro a ghiaccio di Lavoisier e Laplace. c) Il testo indica un rapporto azoto/ossigeno di 3 : 1 (25 % di ossigeno); oggi sappiamo che l'aria secca contiene circa il 78 % di azoto e il 21 % di ossigeno in volume (più l'1 % circa di argon), rapporto vicino a 4 : 1. d) Nel periodo del Terrore (1793–1794), Lavoisier fu condannato come ex appaltatore delle imposte (fermier général) e ghigliottinato l'8 maggio 1794.

31. Traccia: come in una pila (*Scienze naturali 4*, cap. 5), un riducente (il NADH, $E^{\circ\prime}$ −0,32 V, «anodo») cede elettroni a un ossidante (l'O_2, +0,82 V, «catodo») attraverso un circuito esterno, la catena di trasportatori; $\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime}$. Il flusso di elettroni corrisponde alla corrente; il ruolo del ponte salino, che chiude il circuito con ioni, ricorda il flusso di protoni attraverso la membrana, che però qui non è una perdita ma è usato per produrre lavoro (ATP). Nel cloroplasto (capitolo 11) l'energia della luce spinge gli elettroni «in salita», dall'acqua al $NADP^+$: la catena funziona come una cella alimentata da fuori più che come una pila; i protoni sono pompati nel lume dei tilacoidi e rientrano nello stroma attraverso un'ATP sintasi molto simile a quella mitocondriale. Stesso principio chemiosmotico, verso opposto del flusso degli elettroni rispetto all'ossigeno (O_2 prodotto anziché consumato).

32. Termine chimico: 2,303 × 8,314 × 310,15 × 0,80 J/mol = 4,75 kJ/mol; termine elettrico: 96 485 × 0,17 J/mol = 16,4 kJ/mol; totale ≈ 21,2 kJ/mol di H^+. Con 3 mol di protoni: 3 × 21,2 ≈ 63 kJ, più dei circa 50 kJ/mol richiesti: in linea di principio bastano. Nella realtà ne servono circa 4, perché l'anello di F_o ha 8 subunità (8 H^+ per 3 ATP, cioè circa 2,7 per ATP) e un altro protone serve a importare il fosfato e scambiare l'ATP con l'ADP; il margine copre anche le perdite.