



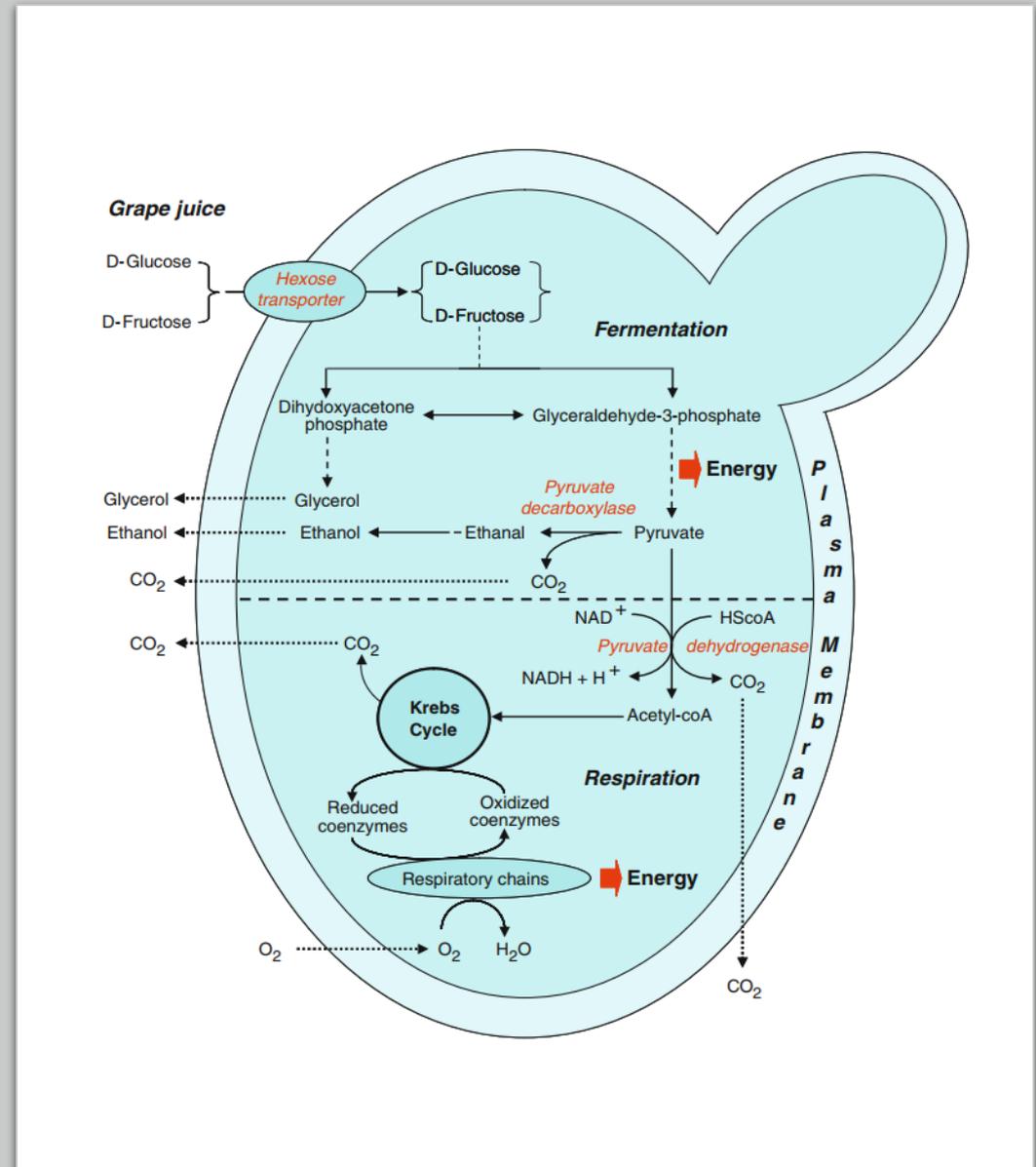
Il metabolismo dei lieviti

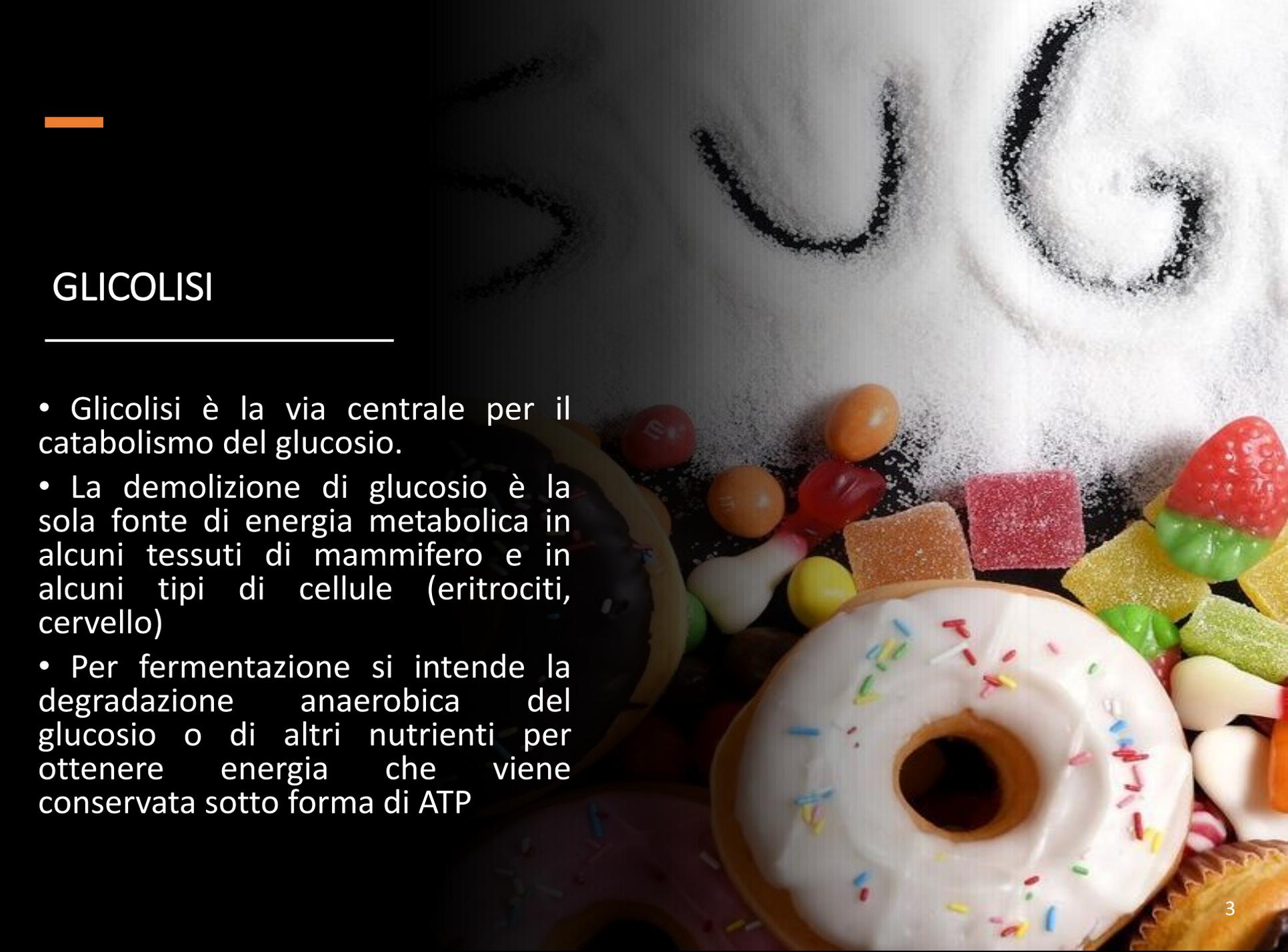
Le vie metaboliche della degradazione degli zuccheri

- In funzione delle condizioni di aerobiosi, i lieviti possono degradare gli zuccheri utilizzando due vie metaboliche:

- la respirazione e la fermentazione alcolica

- I due processi cominciano allo stesso modo con l'impiego della via comune delle glicolisi o via di Embden-Meyerhoff.

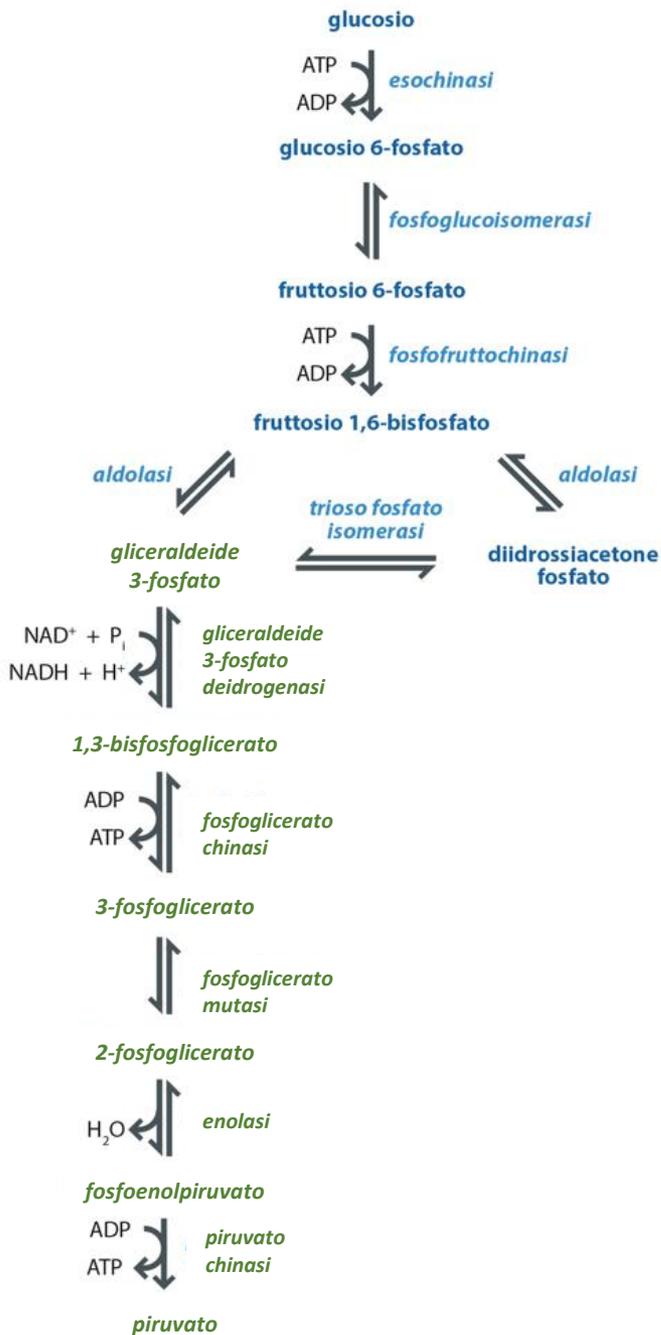




GLICOLISI

- Glicolisi è la via centrale per il catabolismo del glucosio.
- La demolizione di glucosio è la sola fonte di energia metabolica in alcuni tessuti di mammifero e in alcuni tipi di cellule (eritrociti, cervello)
- Per fermentazione si intende la degradazione anaerobica del glucosio o di altri nutrienti per ottenere energia che viene conservata sotto forma di ATP

-
- Nella glicolisi una molecola di glucosio (a sei atomi di carbonio) viene degradata mediante una serie di reazioni enzimatiche, che producono due molecole di piruvato, un composto a tre atomi di carbonio.
 - In tutto sono necessarie dieci reazioni catalizzate da enzimi citosolici, le prime cinque delle quali costituiscono la fase preparatoria (con dispendio di energia), mentre nelle successive cinque si ha la fase di recupero energetico (con produzione di energia).
 - Tutti gli intermedi glicolitici sono fosforilati, poiché il gruppo fosforico può avere tre funzioni utili: 1) Conferisce impermeabilità alla membrana plasmatica, 2) Permette di conservare l'energia metabolica (legami ad alta energia) e 3) Riduce l'energia di attivazione ed aumenta la specificità della reazione enzimatica.



FASE 1: Fosforilazione del glucosio per dar glucosio-6-fosfato (l'ATP è la fonte del gruppo fosfato e l'enzima è l'esochinasi)



FASE 2: Isomerizzazione del glucosio-6-fosfato a fruttosio-6-fosfato. (l'enzima è la fosfoglucisomerasi)



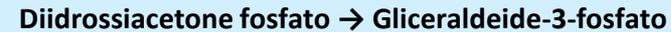
FASE 3: Fosforilazione del Fruttosio-6-fosfato per dare Fruttosio-1,6-bisfosfato (l'ATP è la fonte del gruppo fosfato e l'enzima è la fosfofruttochinasi)



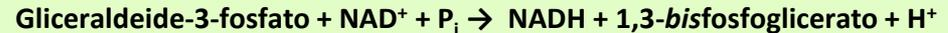
FASE 4: Scissione del Fruttosio-1,6-bisfosfato in due composti a tre atomi di carbonio, la gliceraldeide-3-fosfato e il diidrossiacetone fosfato. (l'enzima è aldolasi)



FASE 5: Isomerizzazione del diidrossiacetone fosfato a gliceraldeide-3-fosfato (l'enzima è la trioso fosfato isomerasi)



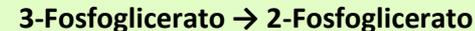
FASE 6: Ossidazione (e fosforilazione) della gliceraldeide-3-fosfato a 1,3 bisfosfoglicerato (l'enzima è la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi)



FASE 7: Trasferimento di un gruppo fosfato dall' 1,3-bisfosfoglicerato all'ADP (fosforilazione di ADP a ATP) per dare il 3-fosfoglicerato. (l'enzima è la fosfoglicerato chinasi)



FASE 8: Isomerizzazione del 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. (l'enzima è la fosfogliceromutasi)



FASE 9: Disidratazione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. (l'enzima è l'enolasi)



FASE 10: Trasferimento di un gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato all'ADP (fosforilazione di ADP a ATP) per dare il piruvato. (l'enzima è la piruvato chinasi)



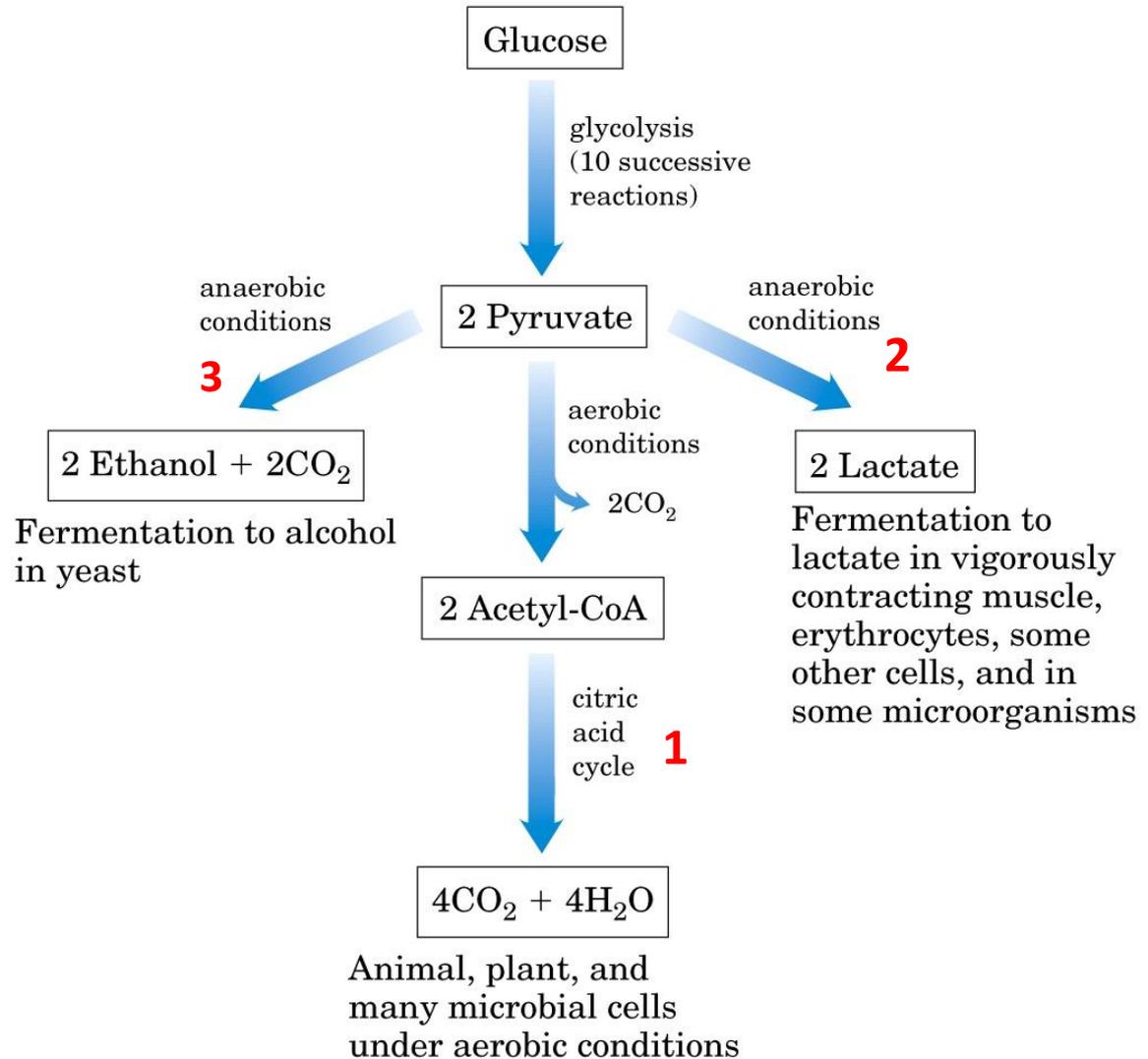
Il destino del piruvato:

Il piruvato è il cuore del metabolismo del carbonio, ha una posizione centrale in molti percorsi metabolici

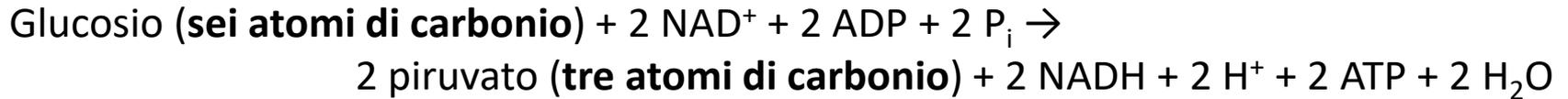
1. Ciclo dell'acido citrico;

2. Certi tessuti e tipi di cellule, la retina, il cervello e gli eritrociti convertono il glucosio in lattato anche in condizioni aerobiche;

3. In alcuni tessuti di piante ed in alcuni invertebrati, protisti e microrganismi come il lievito *Saccharomyces cerevisiae*



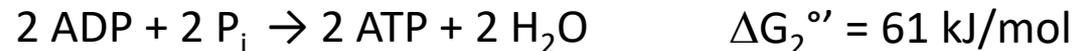
Formazione di ATP e NADH accoppiata alla glicolisi:



- **La conversione esoergonica del glucosio in piruvato:**



- **La formazione endoergonica dell'ATP da ADP e P_i:**

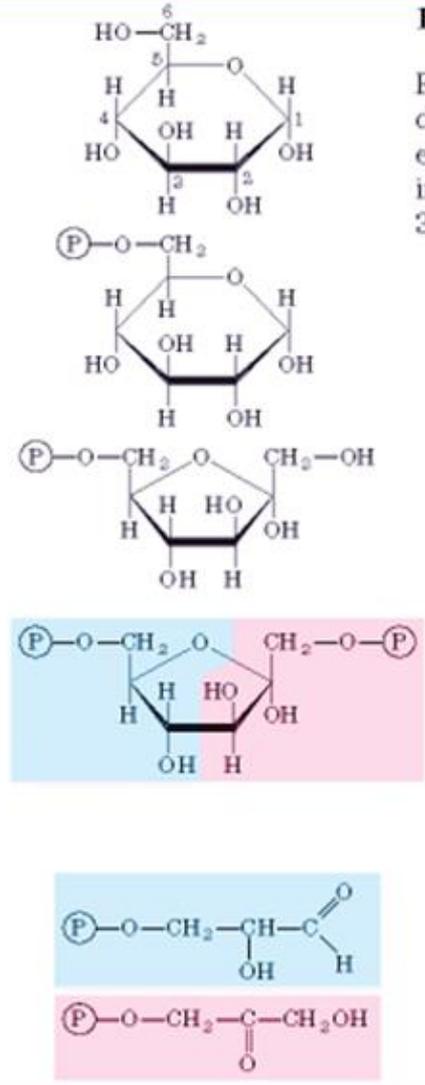
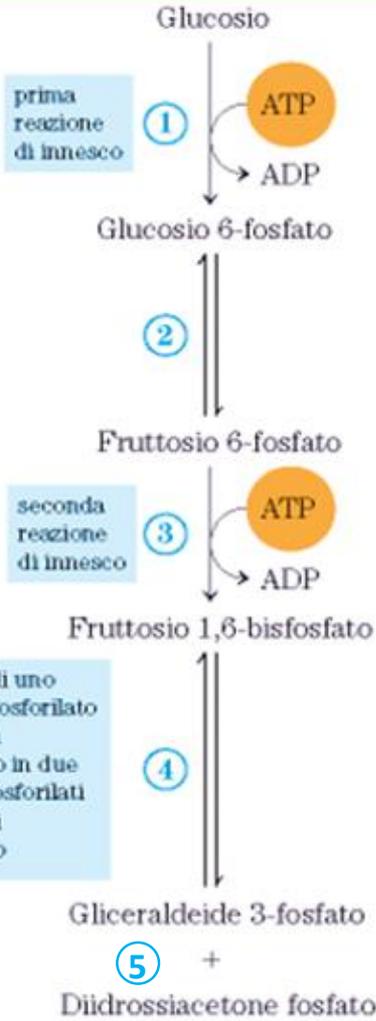


$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ\prime} &= \Delta G_1^{\circ\prime} + \Delta G_2^{\circ\prime} = -146 \text{ kJ/mol} + 61 \text{ kJ/mol} \\ &= -85 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

Nella cellula la glicolisi è un processo essenzialmente irreversibile spinto da una netta diminuzione dell'energia libera

Prima fase della glicolisi

(a)



Fase preparatoria

Fosforilazione del glucosio e sua conversione in gliceraleide 3-fosfato

- ① Esocinasi
- ② Fosfoesosio isomerasi
- ③ Fosfofruttochinasi-1
- ④ Aldolasi
- ⑤ Trioso fosfato isomerasi

Per ogni molecola di glucosio che percorre la fase preparatoria si formano due di gliceraleide 3 fosfato.

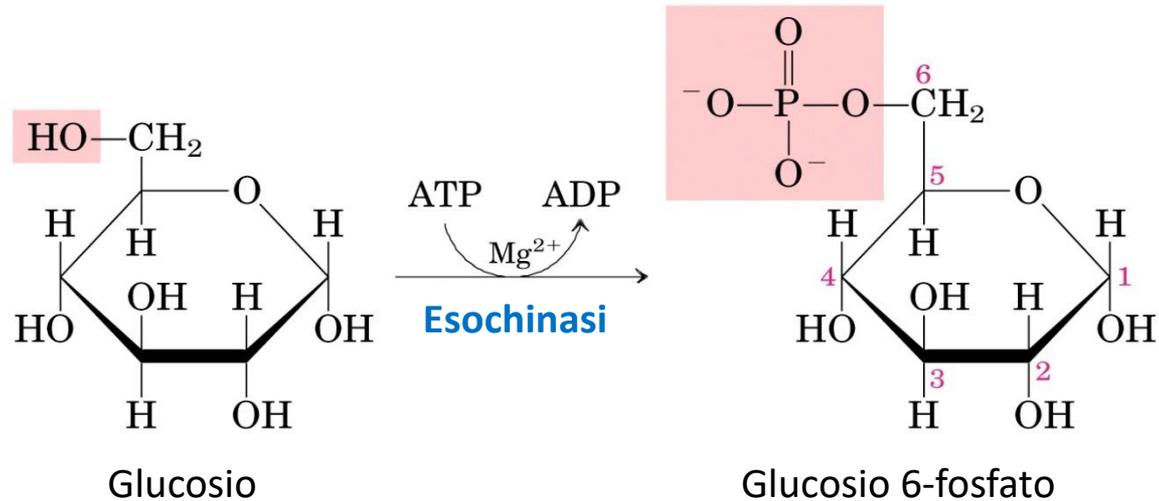
Entrambe entrano nella fase di recupero della via.

Nella prima fase vengono consumate due molecole di ATP per poter scindere la molecola di glucosio in due triosi fosfato.

Tappa 1: Fase preparatoria

Fosforilazione del glucosio da parte dell'esochinasi: è una reazione endoergonica irreversibile. È un esempio dell'uso dell'energia chimica prodotta dall'ossidazione dei nutrienti e poi intrappolata nella fosforilazione del ADP ad ATP

Questa reazione è un punto di controllo della via glicolitica

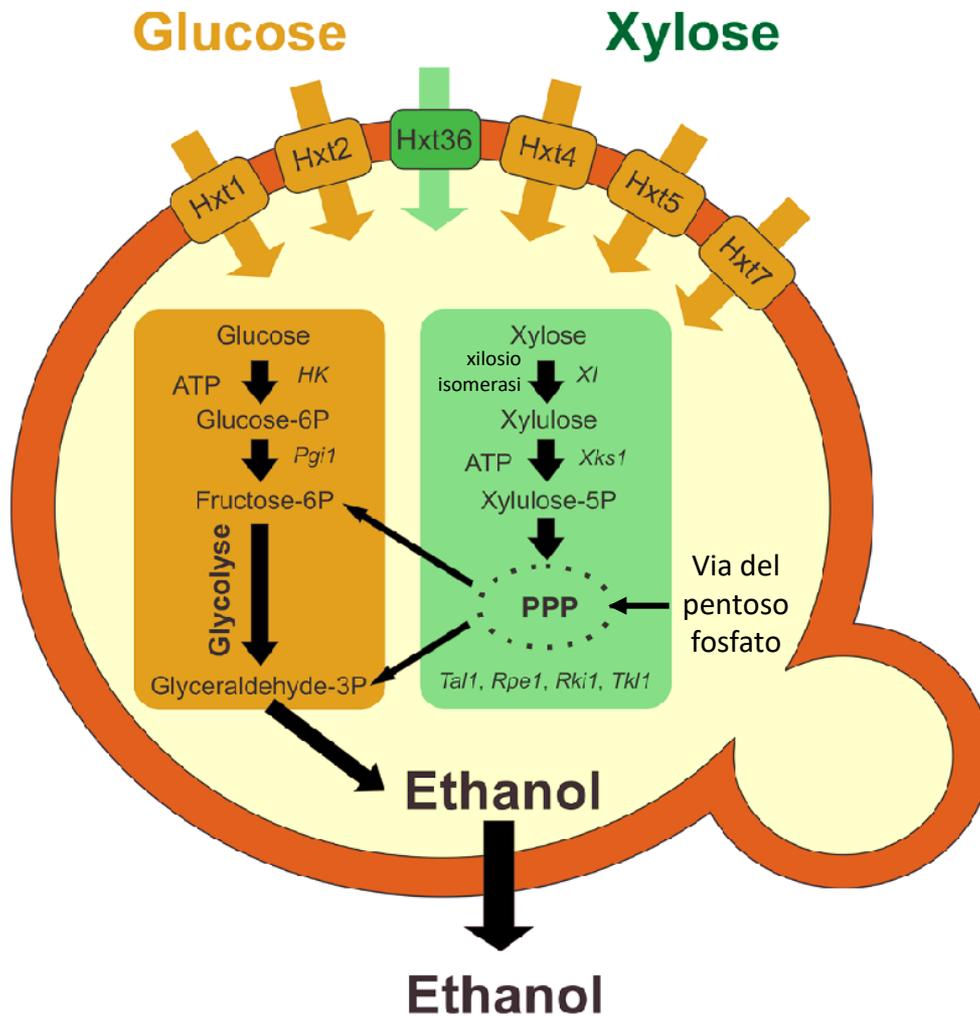


$$\Delta G'^{\circ} = -16.7 \text{ kJ/mol}$$



L'idrolisi dell'ATP è esoergonica

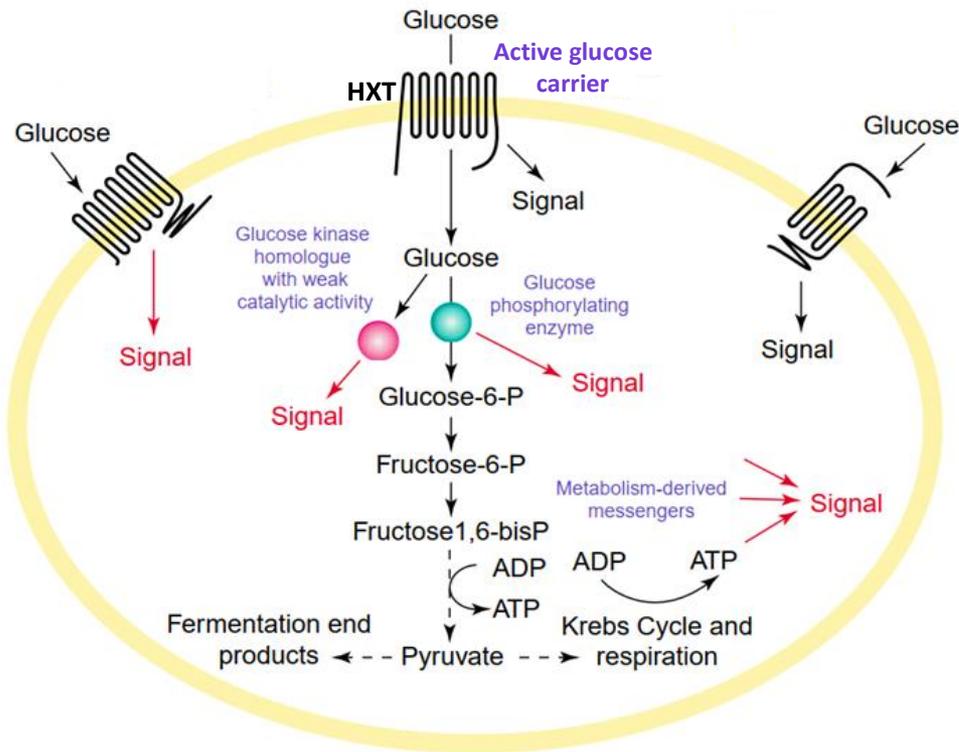




Il *Saccharomyces cerevisiae* possiede 19 trasportatori per gli zuccheri:

- Una famiglia multigenica di trasportatori per il glucosio e fruttosio chiamati **HXT (Hexose Transporters, HXT1-HXT17)**;
- Per il trasporto del maltosio, il Mal11p;
- Per il trasporto del galattosio, il Gal2p .

Naturalmente *Saccharomyces* non può fermentare il D-xilosio, solo con l'introduzione di una xilosio isomerasi lo trasformerà in xilulosio e lo potrà fermentare.



Filip Rolland *et al.*, Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.26 No.5 May 2001

La traslocazione di una molecola di zucchero all'interno della cellula richiede prima il legame e poi il riconoscimento dello zucchero da parte del trasportatore; per questo motivo il trasportatore deve possedere un meccanismo per l'identificazione del substrato.

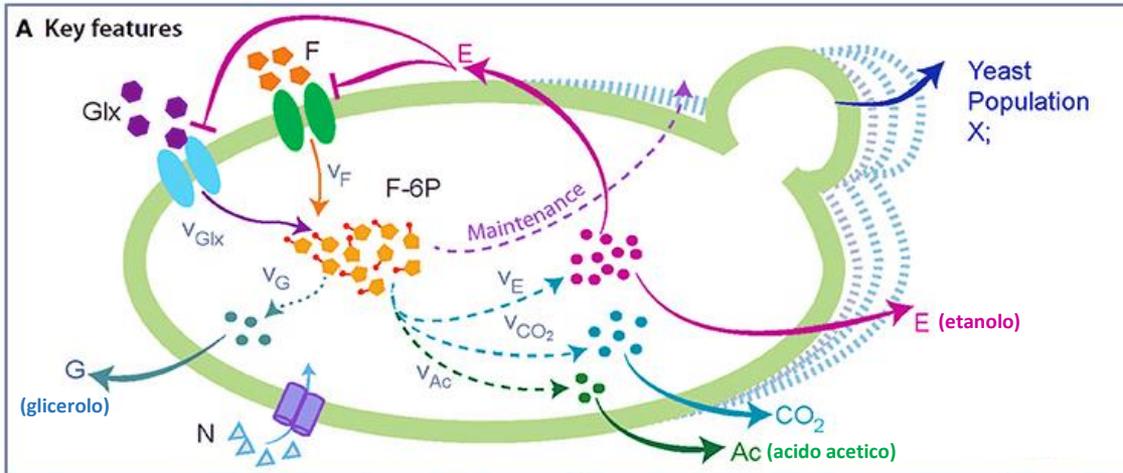
Una volta che il substrato zuccherino è riconosciuto e legato correttamente, si ha un cambiamento conformazionale del recettore perciò deve essere assicurata dalla corretta composizione lipidica.

A concentrazioni elevate di substrato, i trasportatori con siti multipli di attacco sono soggetti ad inibizione da parte dello stesso substrato; questo avviene perché le molecole di substrato tentano di legarsi simultaneamente al trasportatore.

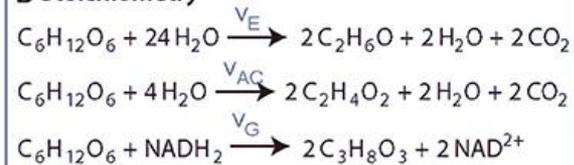
Questo affollamento intorno al trasportatore, ne impedisce il cambiamento conformazionale e come risultato non si ha la traslocazione dello zucchero all'interno della cellula.

Trasporto del fruttosio in *Saccharomyces cerevisiae*:

glucosio e fruttosio condividono gli stessi trasportatori, ciò significa che la loro assimilazione è competitiva; generalmente la K_M per il fruttosio è maggiore rispetto a quella per il glucosio di 2,5–5 volte.



B Stoichiometry



(etanolo (E), glicerolo (G), acido acetico (Ac))

David Henriques *et al.*, *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. *Front. Microbiol.*, 02 February 2018

Dalle differenze nella cinetica, è prevedibile che il glucosio sarà consumato più velocemente, cambiando così il rapporto glucosio/fruttosio, che è di 1:1

Come adattamento a questa alterazione l'enzima esochinasi passa da esochinasi II (enzima principalmente responsabile della catalizzazione della prima fase della glicolisi quando il glucosio è abbondante), avente un'uguale affinità per entrambi gli zuccheri, ad esochinasi I che ha una maggiore affinità verso il fruttosio (rapporto glucosio/fruttosio 1:3)

Questo passaggio permette alle cellule di compensare il cambiamento esterno nel rapporto glucosio/fruttosio e mantenere un corretto flusso glicolitico.

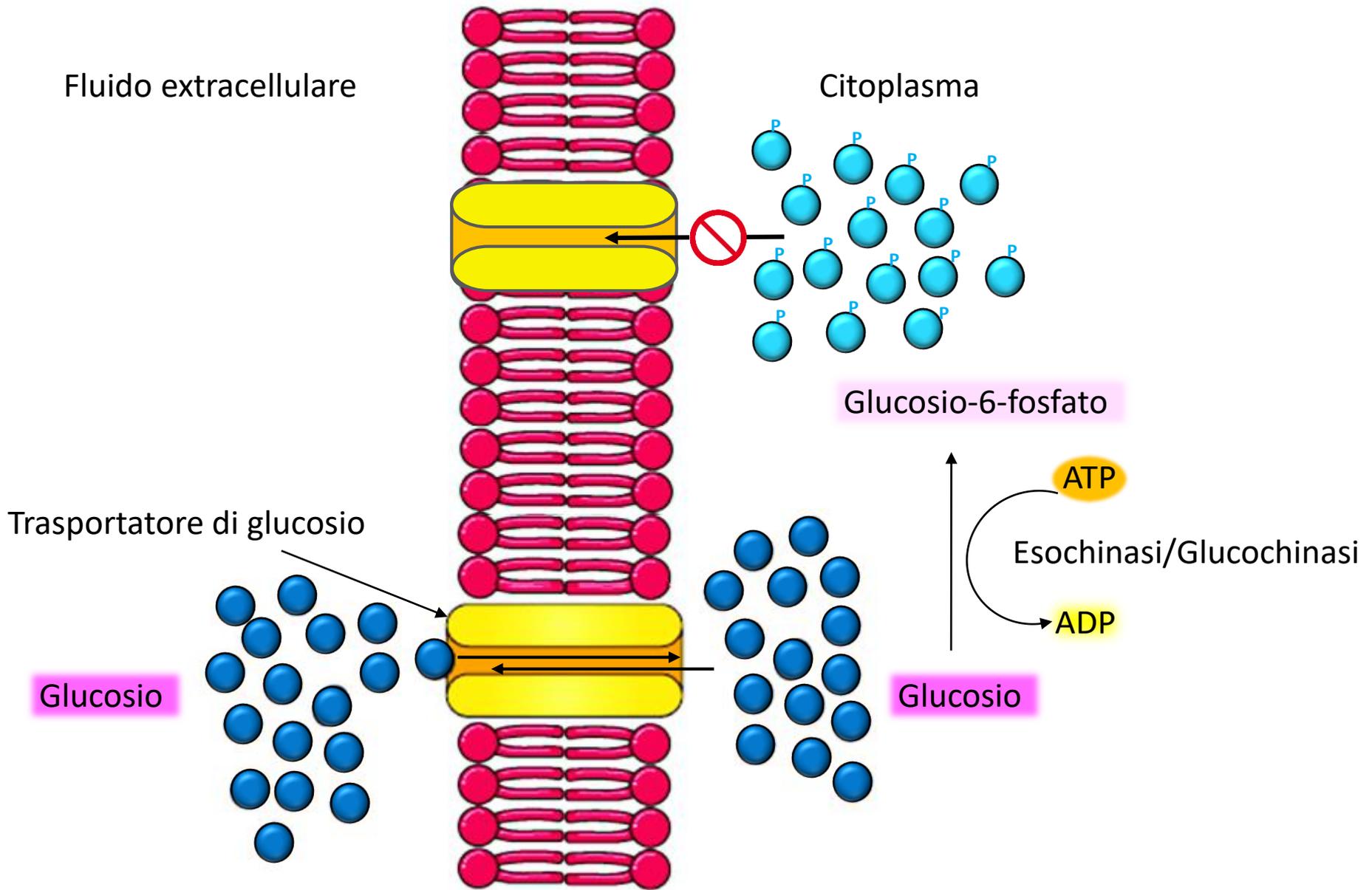
Table 8.2 Characteristics of sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae*

Hexose transporter	Glucose affinity ^a	Regulation by glucose ^b (Laboratory strains)	Expression during fermentation ^c (Wine strains)
Hxt1	Low	Induced by high [glucose]	Start of fermentation
Hxt2	Moderate	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Lag phase
Hxt3	Low	Induced by high and low [glucose]	Throughout fermentation
Hxt4	Moderate	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced during growth phase
Hxt5	Moderate high	Not regulated by glucose Regulated by growth rate	Not induced
Hxt6	High	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced in stationary phase
Hxt7	High	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced in stationary phase

^aReifenberger et al. (1997), Maier et al. (2002), Verwaal et al. (2002)

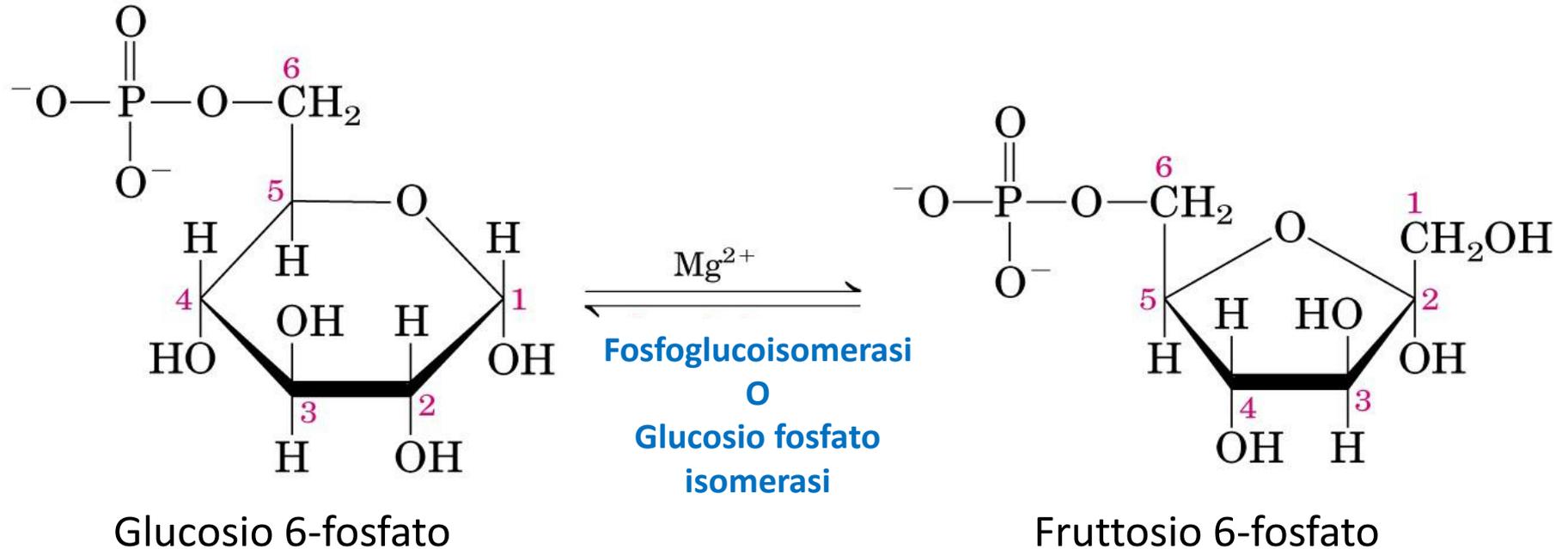
^bBoles and Hollenberg (1997), Özcan and Johnston (1999)

^cLuyten et al. (2002), Perez et al. (2005)

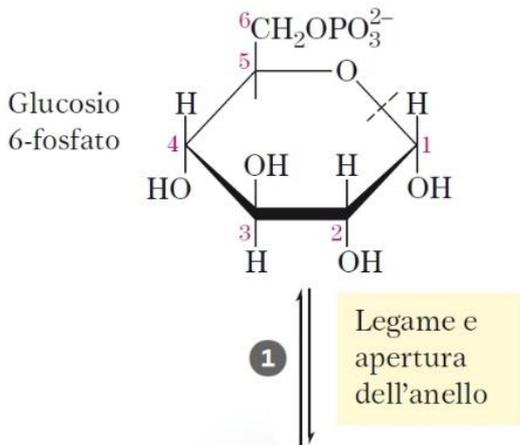


Il glucosio viene mantenuto nella cellula in seguito alla fosforilazione a glucosio-6-fosfato, tale composto non può attraversare facilmente la membrana plasmatica

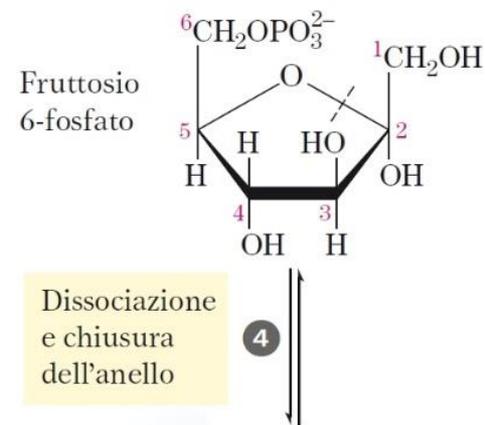
Tappa 2: Glucosio 6-fosfato isomerizzato a fruttosio-6-fosfato
(reazione reversibile)



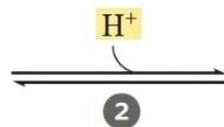
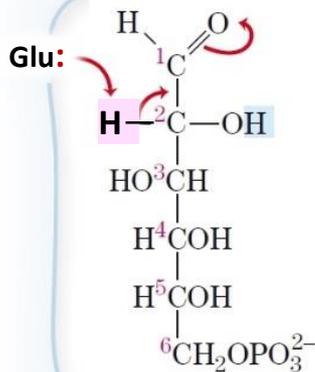
$$\Delta G'^{\circ} = 1.7 \text{ kJ/mol}$$



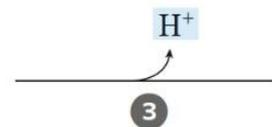
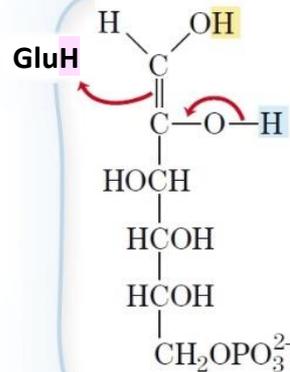
Il gruppo aldeidico C1 del glucosio 6 fosfato è ridotto a gruppo -OH ed il gruppo -OH in C2 è ossidato per dare il gruppo chetonico del fruttosio 6 fosfato. La reazione della fosfoglucoisomerasi procede attraverso la formazione di un intermedio enediolo.



Fosfoesiosio isomerasi



La rimozione del protone da parte del Glu (B:) del sito attivo porta alla formazione del *cis*-enediolo



La catalisi acida generale da parte dello stesso Glu facilita la formazione del fruttosio 6-fosfato

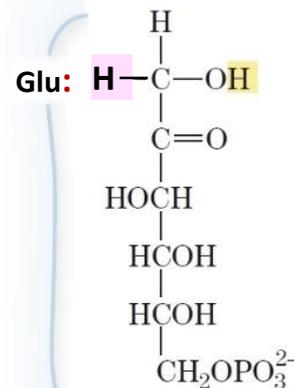
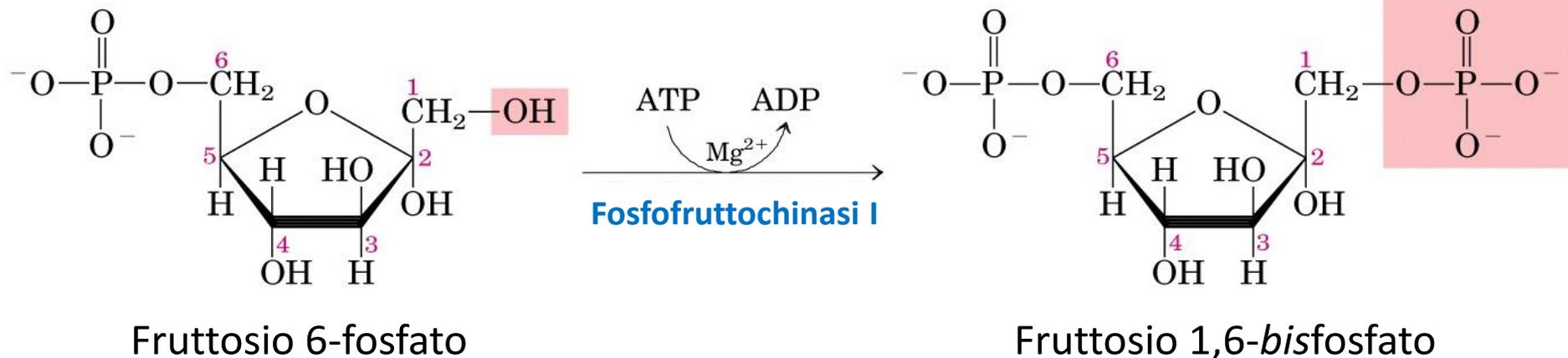


Figura 14.5 **MECCANISMO D'AZIONE** La reazione catalizzata dalla fosfoesiosio isomerasi. Le reazioni di apertura e chiusura dell'anello (passaggi da 1 a 4) sono catalizzate da un residuo di His posto sul sito attivo, tramite meccanismi che sono stati omessi per semplicità. Il protone (in rosa) inizialmente in C-2 è reso più facilmente rimuovibile per la vicinanza del gruppo

carbonilico adiacente e del gruppo ossidrilico. Dopo essere stato trasferito dal C-2 al Glu del sito attivo (un acido debole), il protone si scambia liberamente con la soluzione circostante; pertanto, il protone rimosso dal C-2 nella tappa 2 non è necessariamente lo stesso che viene aggiunto in C-1 nella tappa 3.

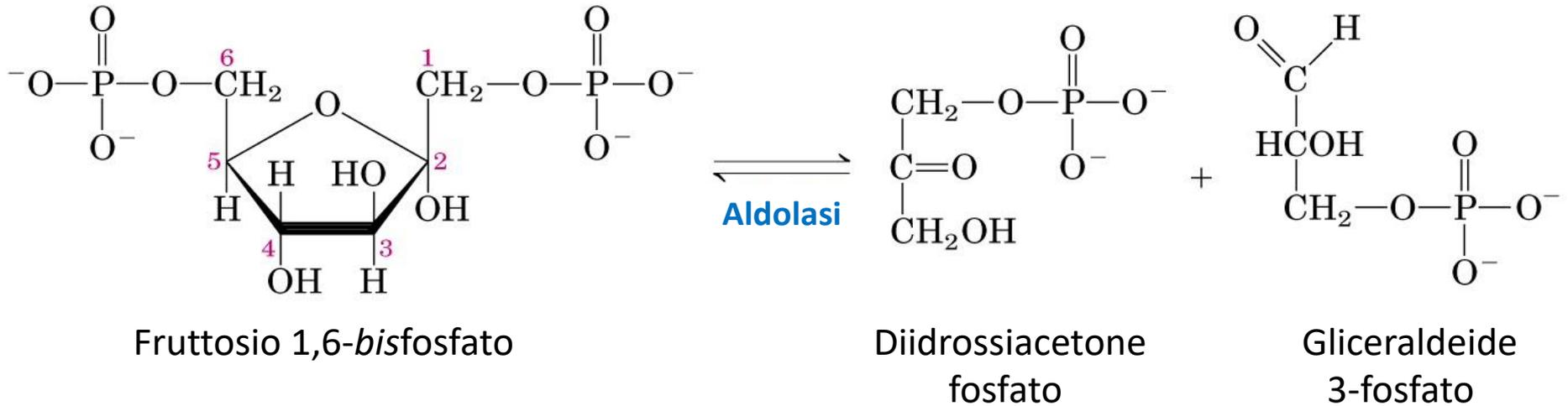
Tappa 3: Il fruttosio-6-fosfato è fosforilato per produrre fruttosio-1,6 *bis*fosfato (reazione irreversibile)

È l'enzima chiave che regola la glicolisi ed è soggetta a una complessa regolazione allosterica



$$\Delta G'^{\circ} = -14.2 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 4: il fruttosio 1,6 *bis*fosfato viene scisso in due composti a tre atomi di carbonio



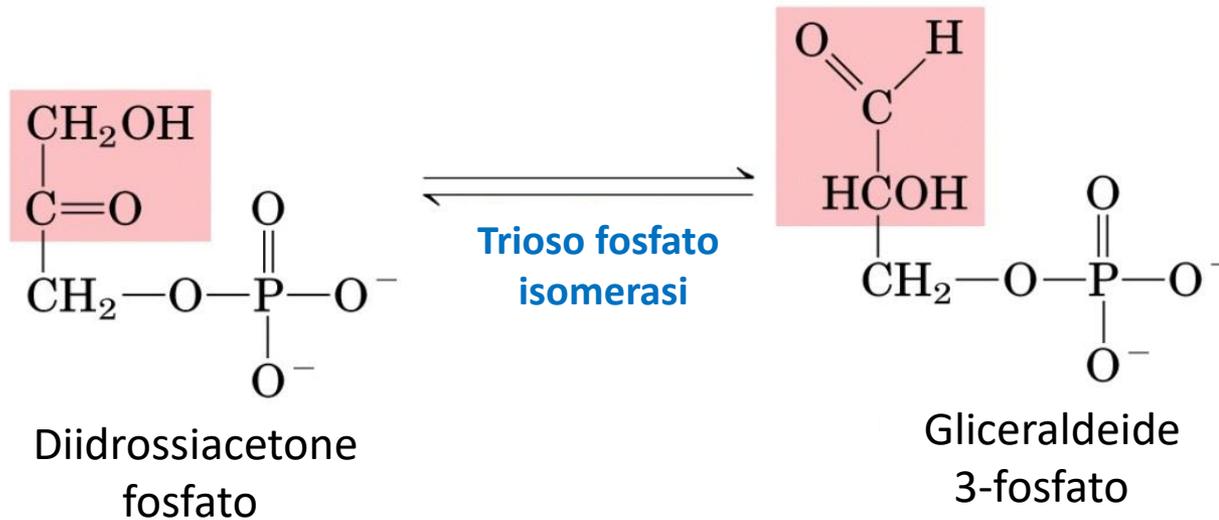
$$\Delta G'^{\circ} = 23.8 \text{ kJ/mol}$$

Nelle condizioni della cellula la variazione di energia libera è modesta perciò la reazione aldolasica è reversibile

L'aldolasi esistono in natura due tipi: la classe I è tipica degli animali caratterizzata dal formare un intermedio covalente un base di schiff, fra un residuo di lisina del sito attivo e il gruppo carbonilico del substrato. Non richiede ioni metallici per la sua attività catalitica. L'aldolasi di classe II è presente in batteri e funghi, questa contiene uno ione metallico Zn^{2+} nel sito attico. I cianobatteri ed altri organismi semplici possiedo entrambe le classi.

Tappa 5: il diidrossiacetone fosfato è convertito in gliceraldeide-3-fosfato

Dalla glicolisi vengono prodotto 2 molecole di gliceraldeide-3-fosfato: le due «metà» di glucosio sono diventate gliceraldeide 3-fosfato



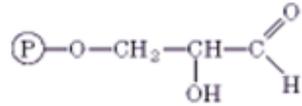
$$\Delta G'^{\circ} = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

La reazione della Trioso fosfato isomerasi completa la prima fase della glicolisi

Seconda fase della glicolisi

(b)

Gliceraldeide 3-fosfato (2)

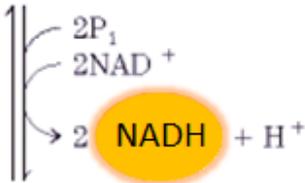


Fase di recupero energetico

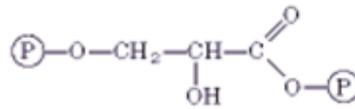
Conversione ossidativa della gliceraldeide 3-fosfato in piruvato, accoppiata alla formazione di ATP e NADH

Ossidazione e fosforilazione

6



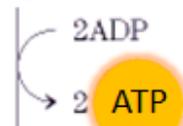
1,3-Bisfosfoglicerato (2)



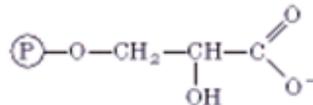
6 Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi

Prima reazione di formazione dell'ATP (fosforilazione a livello del substrato)

7



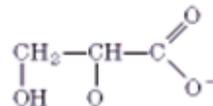
3-Fosfoglicerato (2)



7 Fosfoglicerato chinasi

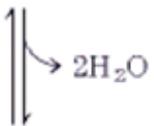
8

2-Fosfoglicerato (2)

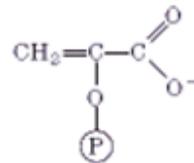


8 Fosfoglicerato mutasi

9



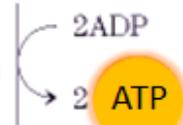
Fosfoenolpiruvato (2)



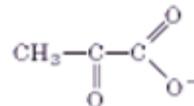
9 Enolasi

seconda reazione di formazione dell'ATP (fosforilazione a livello del substrato)

10



Piruvato (2)

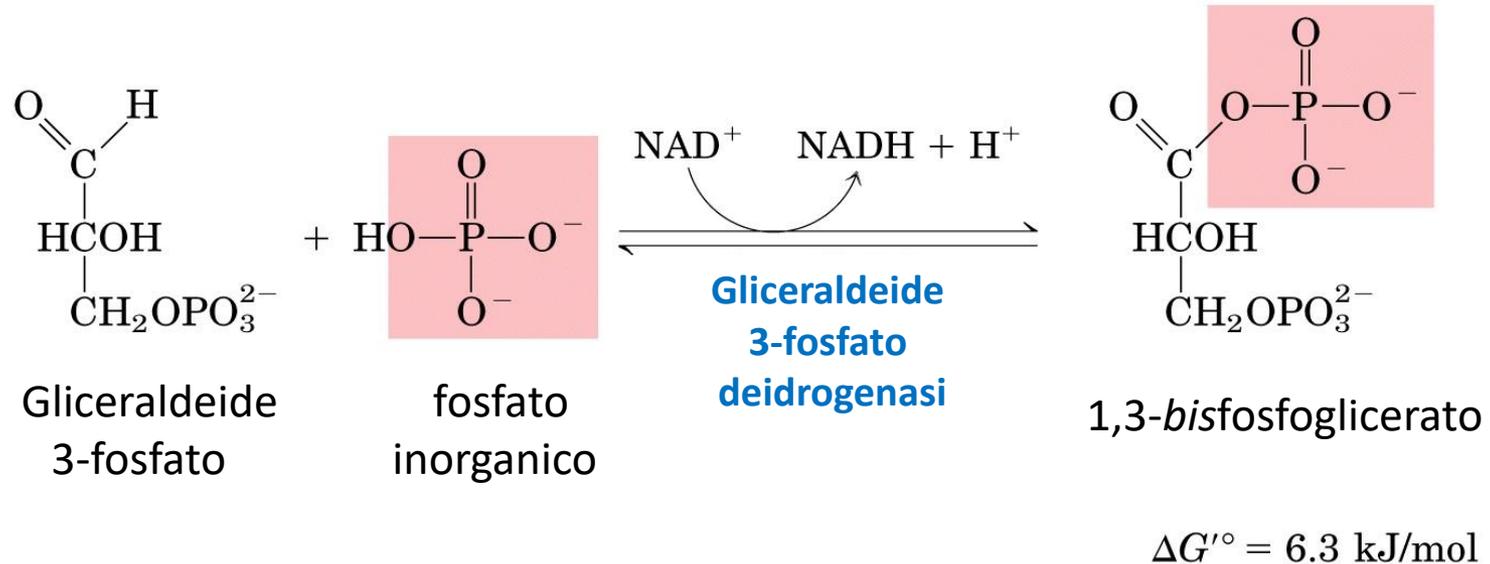


10 Piruvato chinasi

Le due molecole di gliceraldeide 3-fosfato formate entrano nella glicolisi e la formazione di due molecole di piruvato è accompagnata da 4 molecole di ATP con una resa netta di due molecole.

FASE DI RECUPERO

Tappa 6: la gliceraldeide-3-fosfato viene ossidata a 1,3-*bis*fosfoglicerato

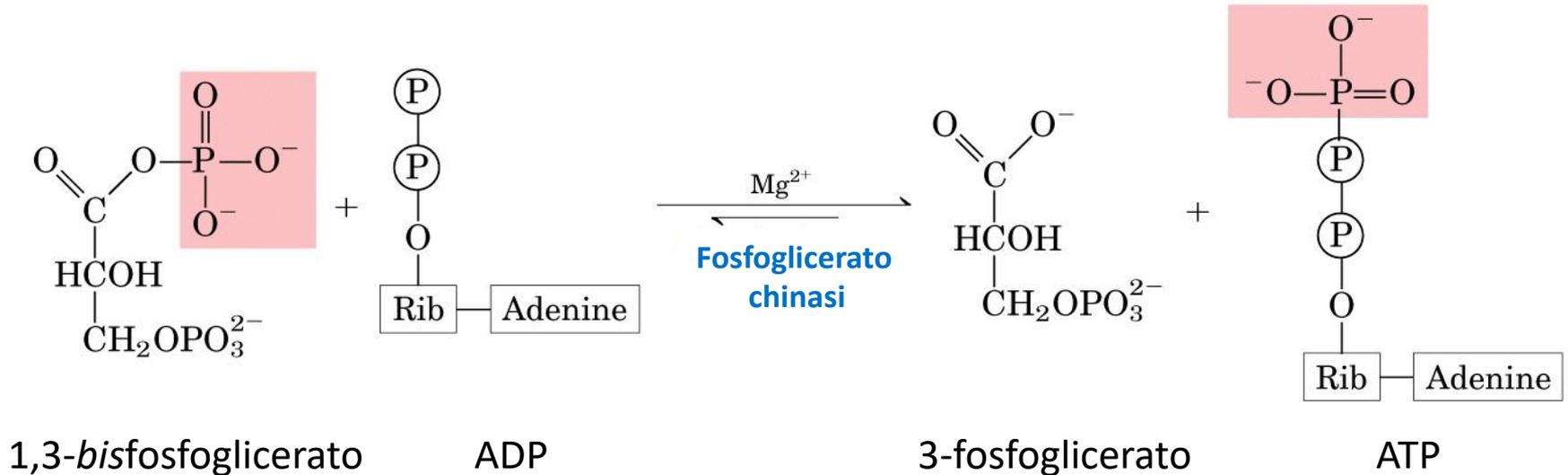


La reazione caratterizzante la glicolisi prevede l'aggiunta di un gruppo fosfato alla gliceraldeide 3 fosfato e contemporaneamente il trasferimento di elettroni dalla gliceraldeide 3 fosfato al NAD⁺

Il gruppo aldeidico viene ossidato invece di dar luogo a un gruppo carbossilico libero si forma un'anidride tra il gruppo carbossilico e l'acido fosforico.

L'acilfosfato ha $\Delta G'^{\circ} = -49,3 \text{ kJ/mol}$

Tappa 7: Trasferimento di un gruppo fosfato dall' 1,3-bisfosfoglicerato all'ADP per dare il 3-fosfoglicerato



$$\Delta G'^{\circ} = -18.5 \text{ kJ/mol}$$

La 6° e la 7° tappa costituiscono nel loro insieme un processo di accoppiamento energetico in cui l'1,3 bisfosfoglicerato è l'intermedio comune. La reazione complessiva è esoergonica

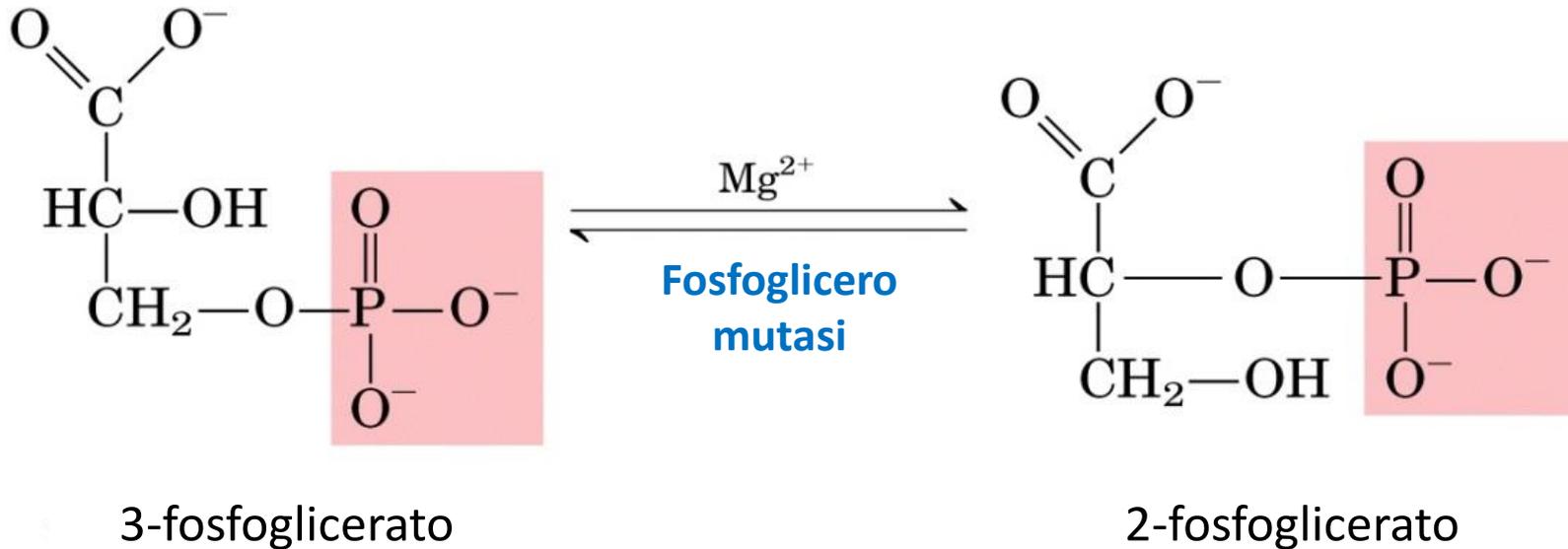
La formazione di ATP mediante il trasferimento di gruppi fosforici da un substrato come 1,3-bisfosfoglicerato viene detta:

FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO

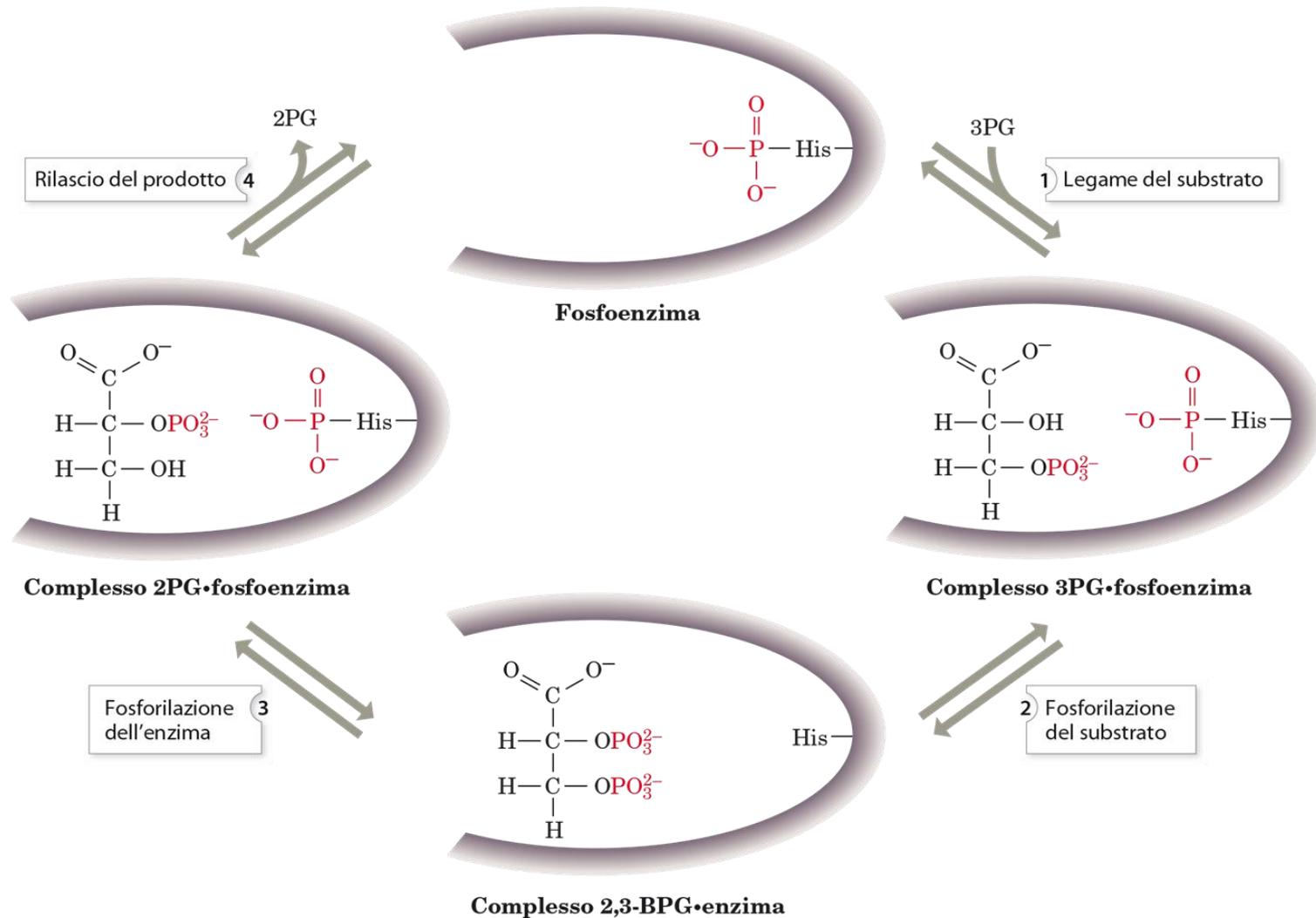
per distinguerla dalla fosforilazione ossidativa legata alla respirazione.

Tappa 8 : Isomerizzazione del 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato

L'enzima che catalizza la reazione è la fosfoglicerato mutasi che catalizza lo scambio reversibile del gruppo fosforilico tra il C2 e il C3 del glicerato

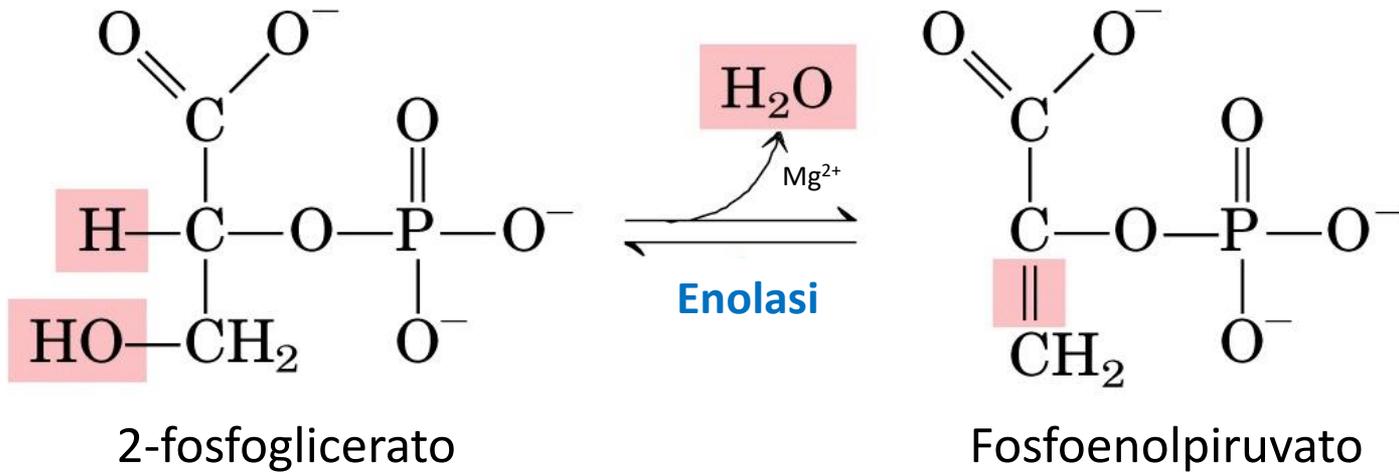


$$\Delta G'^{\circ} = 4.4 \text{ kJ/mol}$$



La reazione avviene in due tappe. Un gruppo fosforico inizialmente legato a un residuo di istidina della mutasi viene trasferito all'ossidrilico in C2 del 3 fosfoglicerato, formando il 2,3 bifosfoglicerato. Il gruppo fosforico in C3 del 2,3 bifosfoglicerato viene trasferito allo stesso residuo di istidina. Si forma il 2 fosfoglicerato e l'enzima fosforilato viene rigenerato.

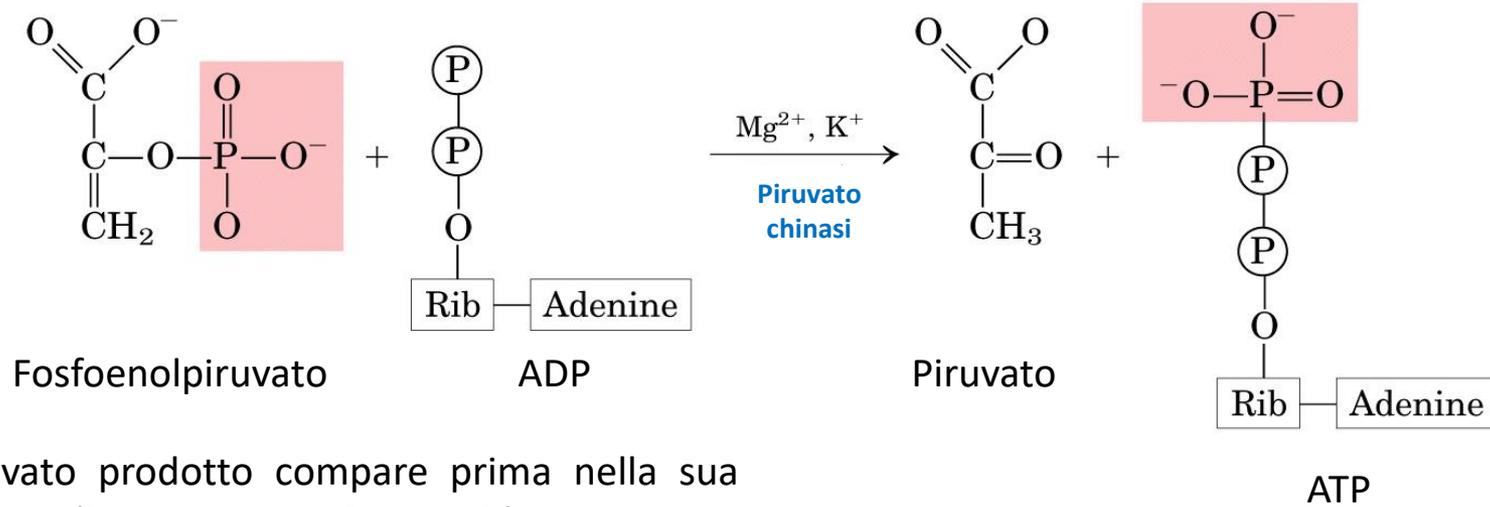
Tappa 9: Disidratazione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato



$$\Delta G'^{\circ} = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 10: Trasferimento di un gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato all'ADP per dare il piruvato.

FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO

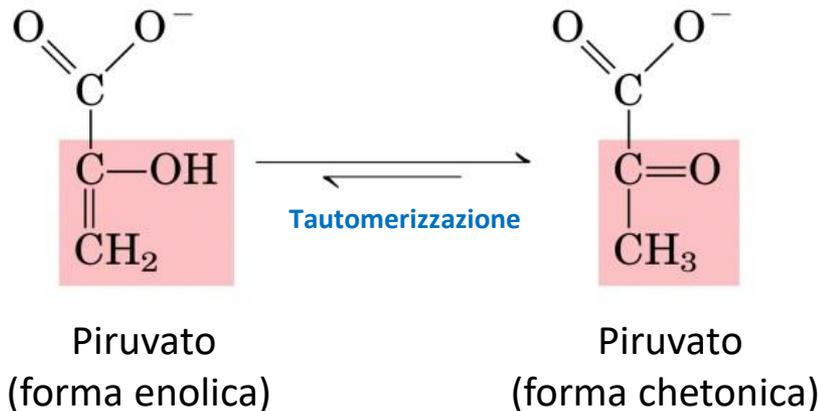


il piruvato prodotto compare prima nella sua forma enolica e tautomerizza rapidamente, non enzimaticamente, nella forma chetonica più stabile a pH 7,0

$$\Delta G'^{\circ} = -31.4 \text{ kJ/mol}$$

Fosfoenolpiruvato \rightarrow piruvato
 $\Delta G^{\circ\prime} = -61,9 \text{ kJ/mol}$

$\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$
 $\Delta G^{\circ\prime} = 30,5 \text{ kJ/mol}$



Variazioni dell'energia libera standard nelle reazioni della glicolisi

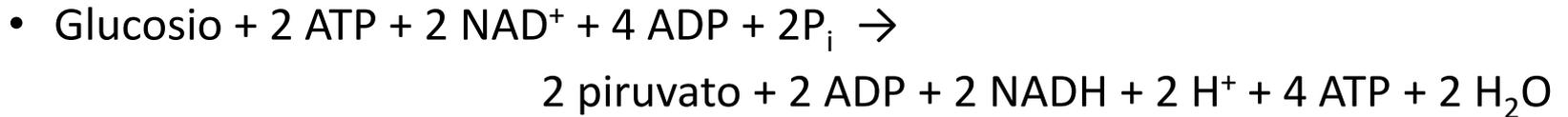
Tappa	Reazione	Enzima	$\Delta G^{o'}$		ΔG^{**}
			kJ mol ⁻¹	kcal	kJ mol ⁻¹
1	Glucosio + ATP → Glucosio-6-fosfato + ADP	Esochinasi/Glucochinasi	-16,7	-4,0	-33,9
2	Glucosio-6-fosfato → Fruttosio-6-fosfato	Glucosio fosfato isomerasi	+1,67	+0,4	-2,92
3	Fruttosio-6-fosfato + ATP → Fruttosio-1,6-bisfosfato + ADP	Fosfofruttochinasi	-14,2	-3,4	-18,8
4	Fruttosio-1,6-bisfosfato → Diidrossiacetone fosfato + Gliceraldeide-3-fosfato	Aldolasi	+23,9	+5,7	-0,23
5	Diidrossiacetone fosfato → Gliceraldeide-3-fosfato	Trioso fosfato isomerasi	+7,56	+1,8	+2,41
6	2(Gliceraldeide-3-fosfato + NAD ⁺ + P _i → 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H ⁺)	Gliceraldeide-3-P deidrogenasi	2(+6,20)	2(+1,5)	2(-1,29)
7	2(1,3-bisfosfoglicerato + ADP → 3-Fosfoglicerato + ATP)	Fosfoglicerato chinasi	2(-18,8)	2(-4,5)	2(+0,1)
8	2(3-Fosfoglicerato → 2-Fosfoglicerato)	Fosfogliceromutasi	2(+4,4)	2(+1,1)	2(+0,83)
9	2(2-Fosfoglicerato → Fosfoenolpiruvato + H ₂ O)	Enolasi	2(+1,8)	2(+0,4)	2(+1,1)
10	2(Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP)	Piruvato chinasi	2(-31,4)	2(-7,5)	2(-23,0)
Globale	Glucosio + 2ADP + 2P _i + NAD ⁺ → 2 Piruvato → 2ATP + NADH + H ⁺ 2(Piruvato + NADH + H ⁺ → Lattato + NAD ⁺) Glucosio + 2ADP + 2P _i → 2 Lattato + 2ATP	Lattato deidrogenasi	-73,3 2(-25,1) -123,5	-17,5 2(-6,0) -29,5	-98,0 2(-14,8) -127,6

* Si assume che i valori di $\Delta G^{o'}$ siano gli stessi a 25°C e a 37°C e siano calcolati in condizioni dello stato standard (concentrazioni 1 M di reagenti e prodotti a pH 7,0).

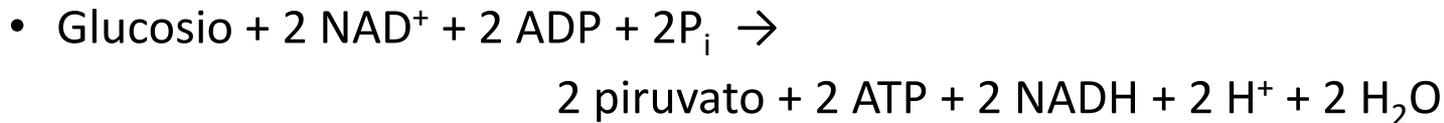
** I valori di ΔG sono calcolati a 310 K (37°C) usando le concentrazioni dello stato stazionario di questi metaboliti negli eritrociti.

Qual è la resa energetica della glicolisi?

- **La reazione generale della glicolisi è:**



- **Cancellando i termini comuni a sinistra e destra si ottiene l'equazione della glicolisi in condizioni aerobiche:**



Resa energetica nelle due fasi della glicolisi

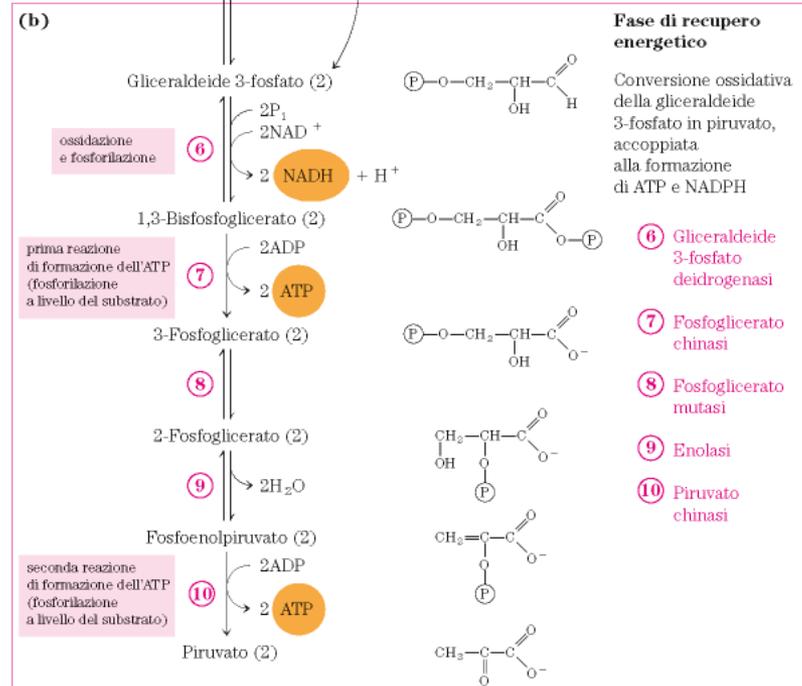
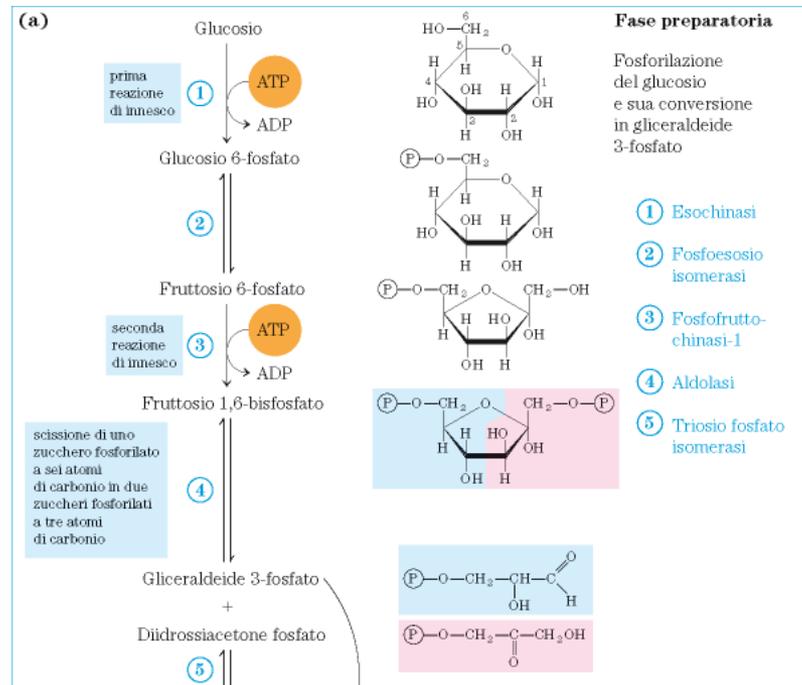
2 ATP consumati nella fase preparatoria

2 NAD⁺ ridotti a 2 NADH

2 P_i nella reazione di formazione del 1,3 bisfosfoglicerato

bisfosfoglicerato

4 ADP utilizzati per formare 4 ATP

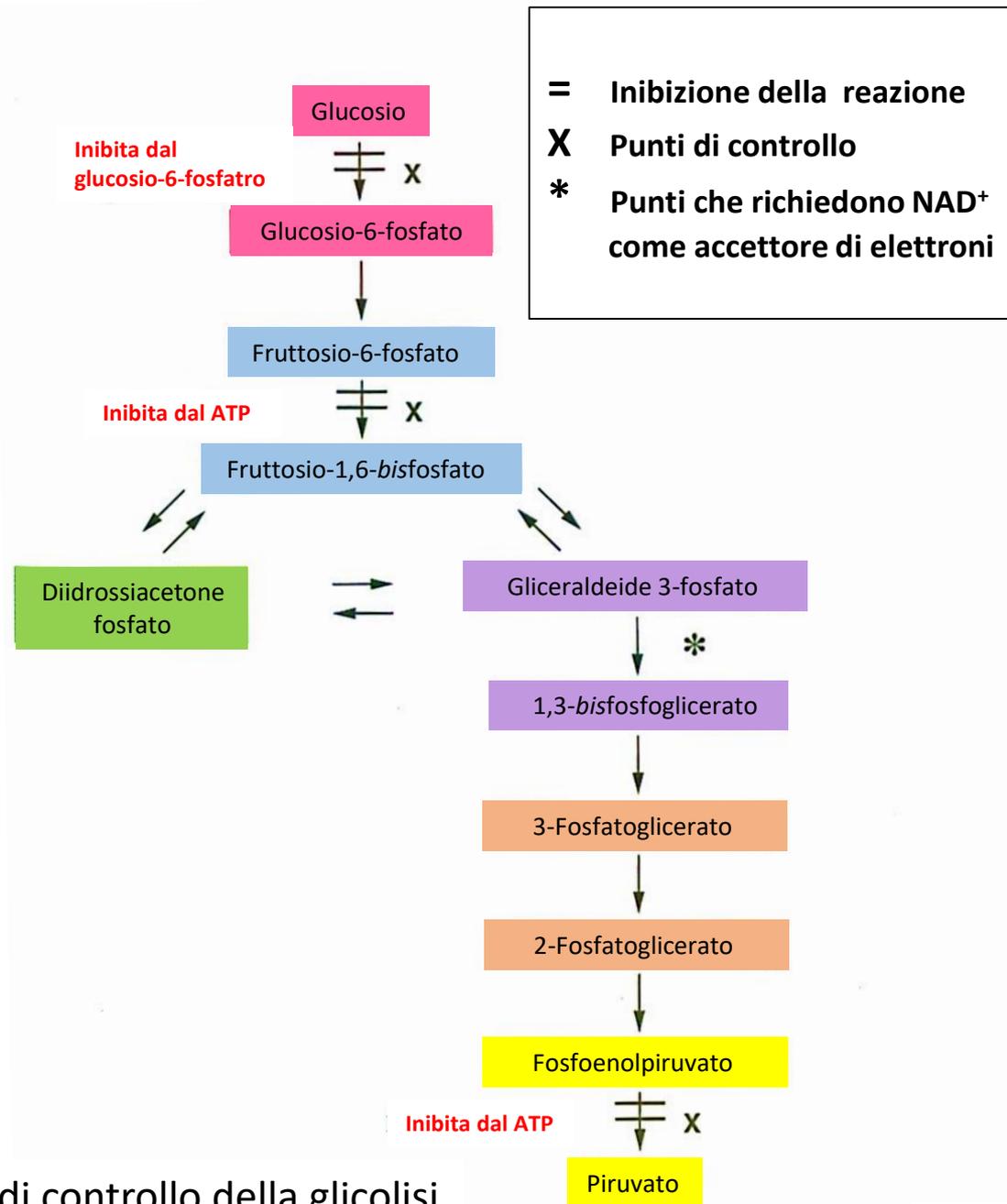


REGOLAZIONE GLICOLISI

Il flusso del glucosio attraverso la via glicolitica deve essere regolato al fine di mantenere costanti i livelli di ATP, ma anche per rifornire la cellula di intermedi della glicolisi da utilizzare nella biosintesi.

La regolazione della velocità si basa su un equilibrato bilanciamento tra il consumo di ATP, la rigenerazione del NADH e la regolazione allosterica di alcuni enzimi della glicolisi come:

- Glucochinasi (Glk1), Esochinasi 1 (Hxk1) ed Esochinasi 2 (Hxk2): capaci di fosforilare il glucosio, il fruttosio e il mannosio.
- Fosfofruttochinasi-1
- Piruvato chinasi



Punti di controllo della glicolisi

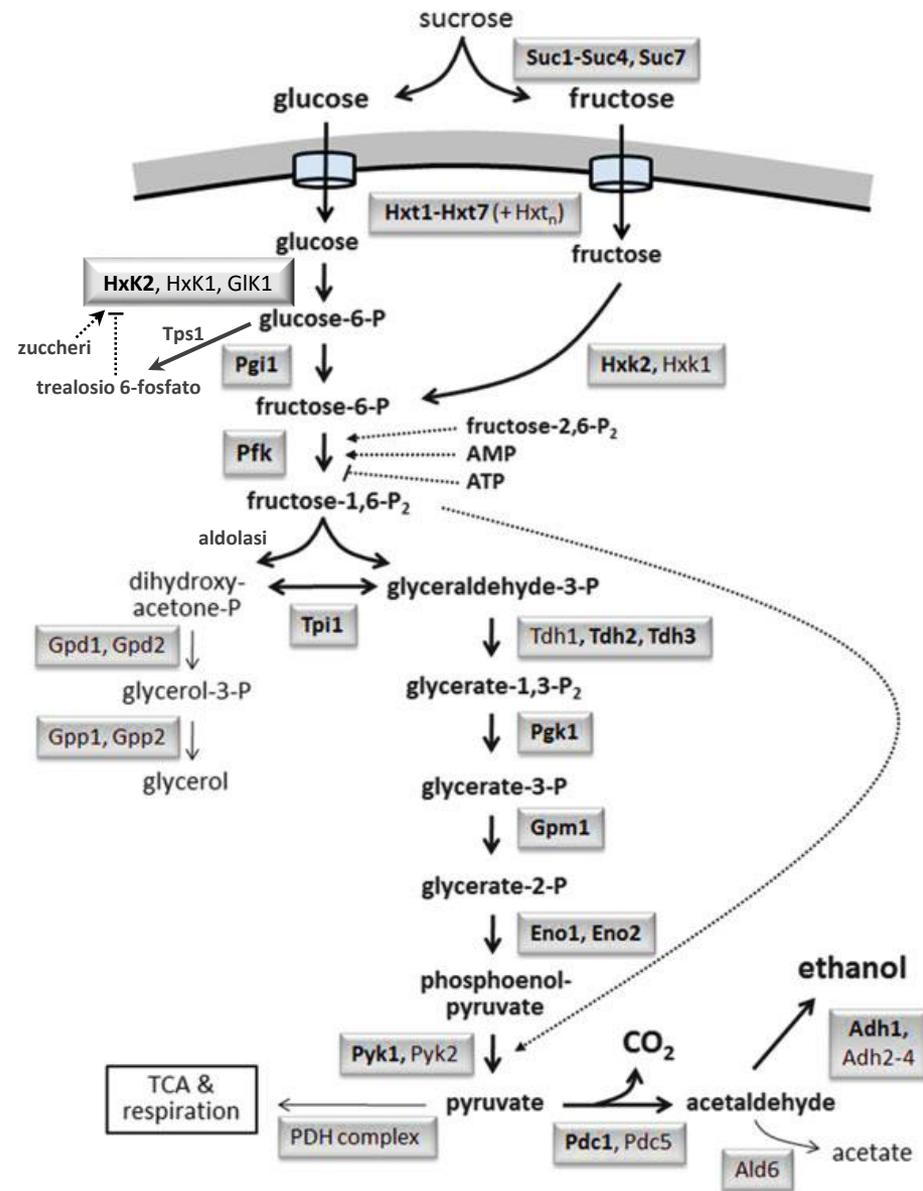
Glicolisi nel lievito

Il glucosio e il fruttosio vengono fosforilati dall'azione delle chinasi Glucochinasi (Glc1), Esochinasi 1 (Hxk1) ed Esochinasi 2 (Hxk2).

La glucochinasi utilizza glucosio o mannosio come substrati, mentre entrambe le esochinasi possono fosforilare glucosio, fruttosio o mannosio.

Studi sulla regolazione hanno dimostrato che Hxk2 è l'isoforma predominante nelle cellule in crescita e in presenza di glucosio e fruttosio.

I primi studi sulla regolazione dell'esochinasi del lievito indicavano l'ATP come inibitore. Tuttavia, la Hxk2 è principalmente attiva ad alta concentrazioni di zuccheri (nel mosto), ciò suggerisce che l'inibizione dell'ATP potrebbe non essere importante per l'attività del lievito. Invece, un potente inibitore allosterico della Hxk2 è il trealosio-6-fosfato, spiegando perché una carenza di trealosio-6-fosfato sintasi (Tps1) provoca l'inibizione della crescita.



- Pgl: fosfoglucoisomerasi
- Pfk: fosfofruttochinasi
- Tpi: trioso fosfato isomerasi
- Gpd: glicerolo 3-fosfato deidrogenasi
- Gpp: glicerolo 3-fosfato fosfatasi
- Tdh: gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi
- Pgk: fosfoglicerochinasi
- Gpm: fosfogliceromutasi
- Eno: enolasi
- Pyk: piruvato chinasi
- PDH: complesso della piruvato deidrogenasi
- Ald: aldeide deidrogenasi
- Adh: alcol deidrogenasi

Struttura cristallografica dell'Esocinasi (Hxk2) nel lievito: si esprime soprattutto durante la fase di crescita dei lieviti in un mezzo ricco di zuccheri.

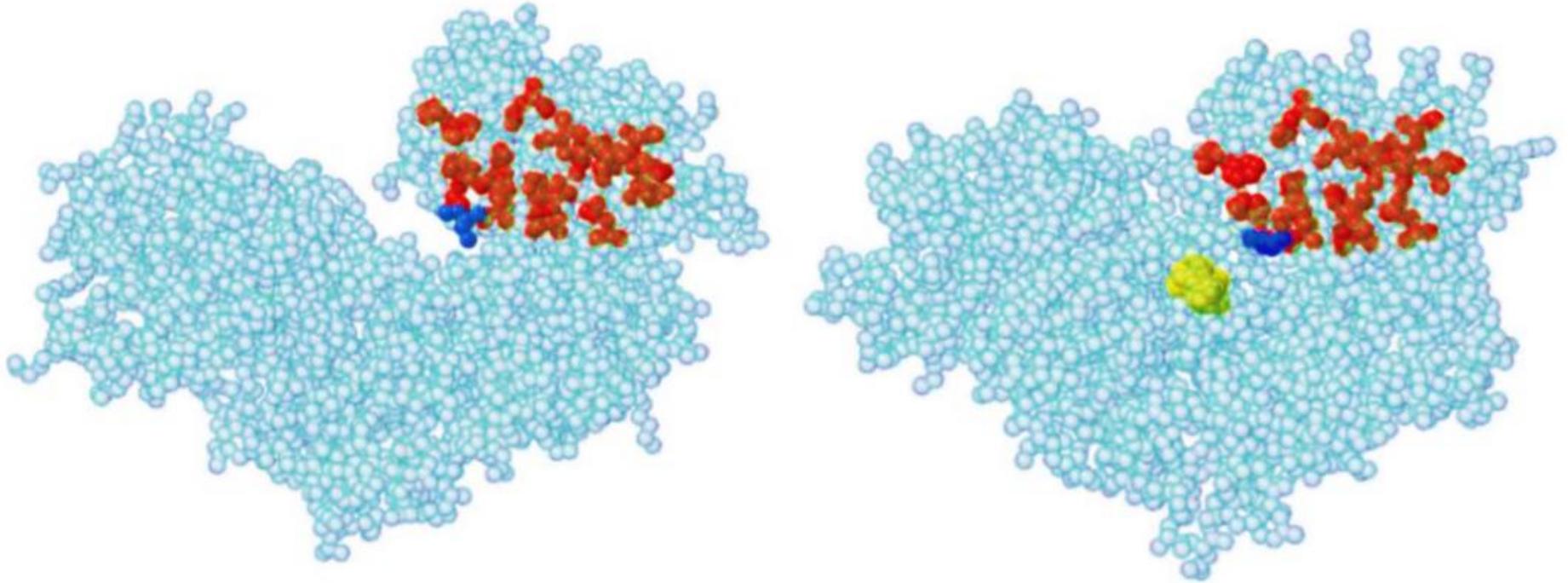


FIG. 5. **The conserved hydrophobic channel.** Amino acids forming the hydrophobic channel are displayed in *red*, and the residue in *blue* is serine 158. The channel is also highlighted in the *S. mansoni* hexokinase to show that in the closed conformation the channel end is close to the active site. The glucose molecule is shown in *yellow*.

Struttura dell'Esochinasi (Hxk1): parzialmente repressa dal glucosio, si esprime a partire della fase stazionaria.

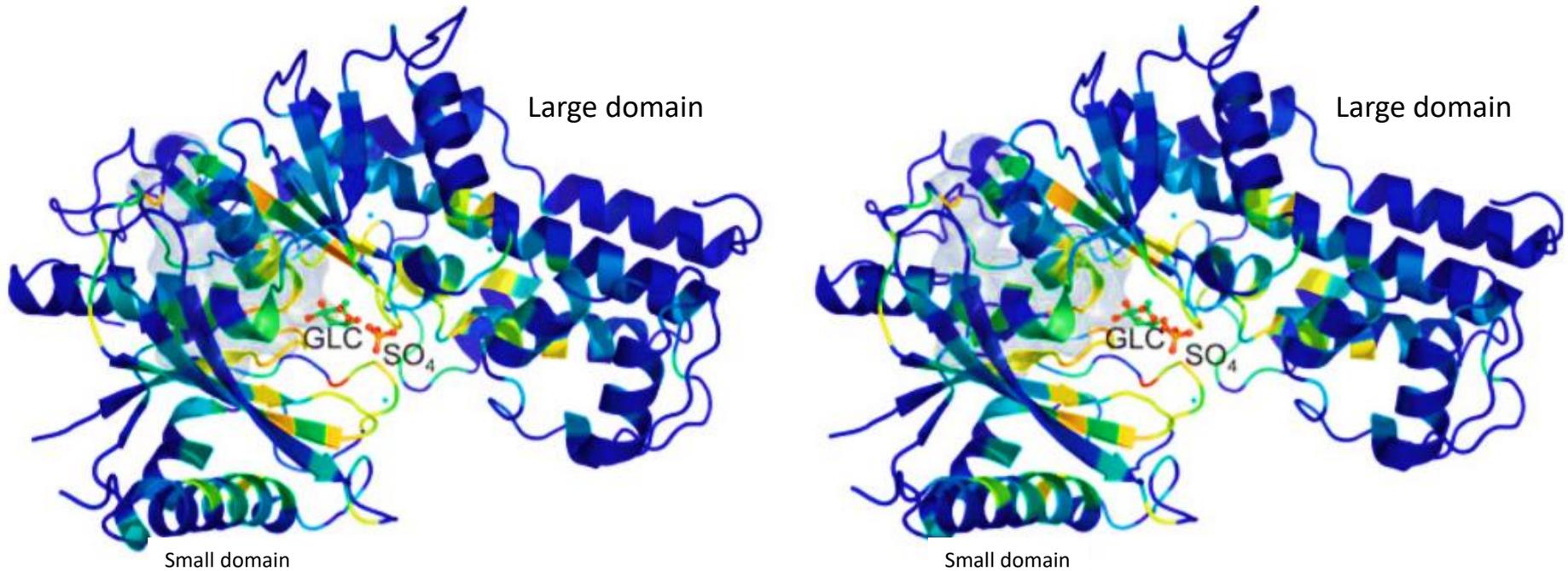
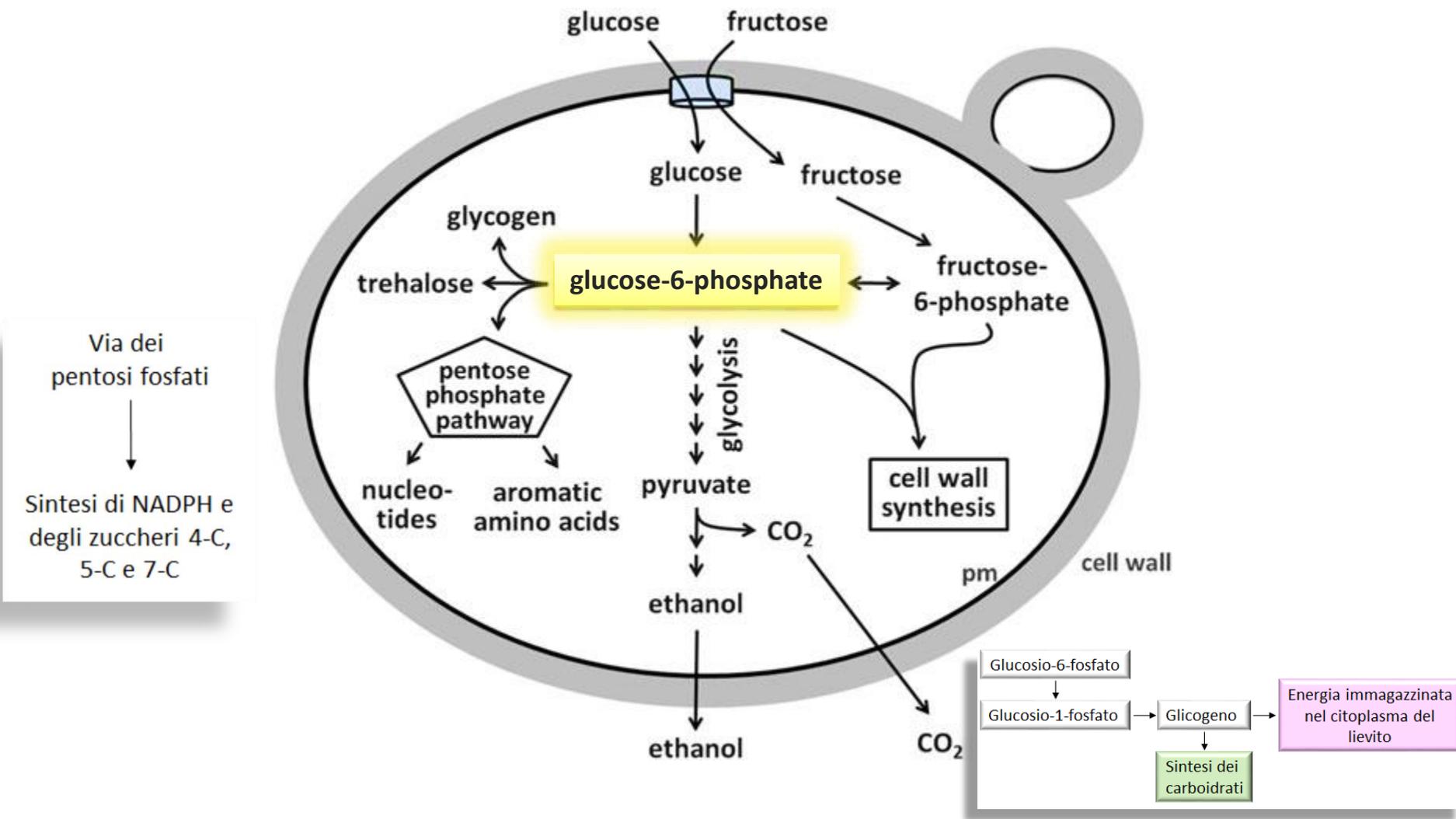


Figure 1

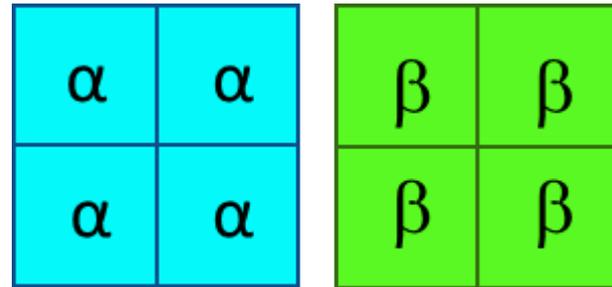
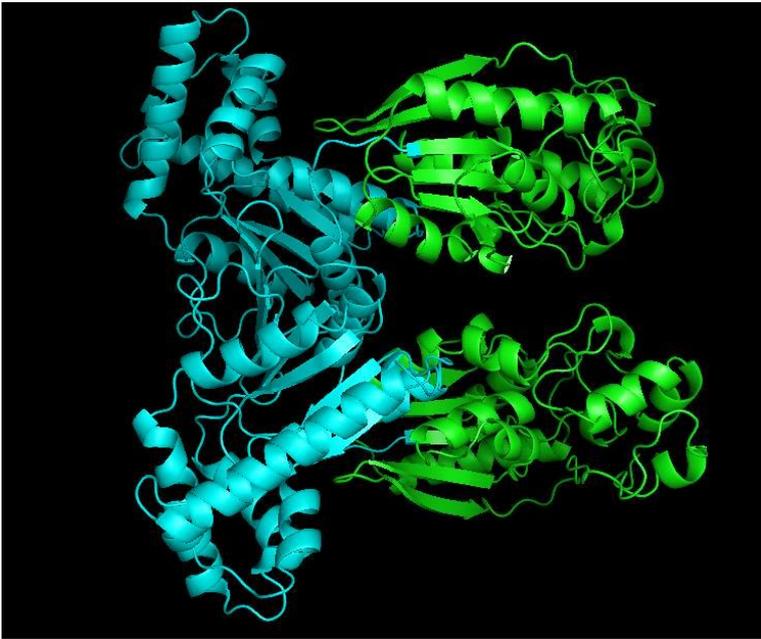
Overall fold of holo PI hexokinase. The protein is colored by residue conservation (ΔG): poorly conserved positions (low ΔG) are shown in "cold" colors, highly conserved positions (high ΔG) are shown in "hot" colors. The gray surface corresponds to the regions of the mechanical hinges, connecting the two domains.

Il Glucosio-6-P è un punto di ramificazione di diverse vie metaboliche



Il glucosio 6-P è comune a molte vie metaboliche e rappresenta un punto di ramificazione del metabolismo del glucosio

La fosfofruttochinasi 1 (PFK1) catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato ed è la prima reazione irreversibile della glicolisi.

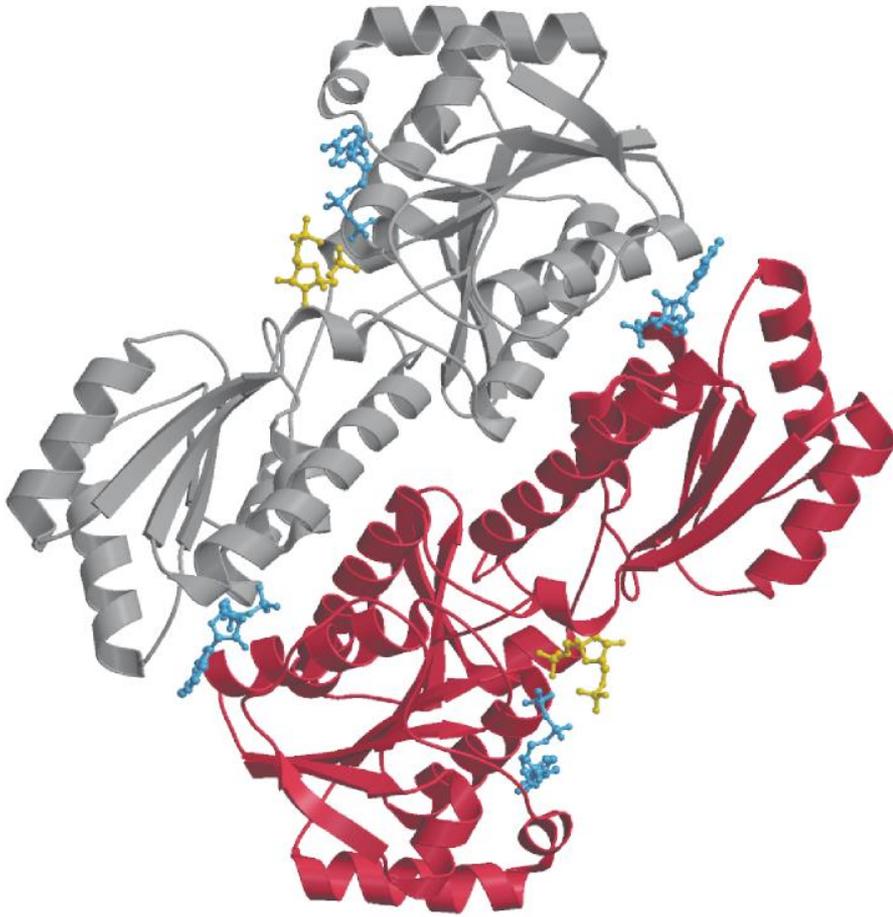


In *S. cerevisiae*, l'enzima ottamerico è costituito da 4 subunità α e 4 subunità β .

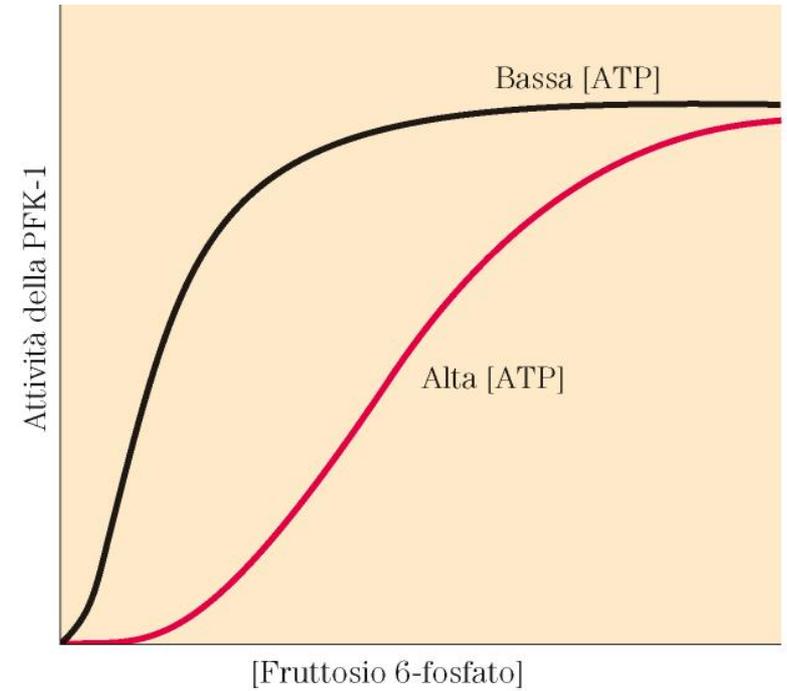
L'ATP è il più potente inibitore dell'enzima mentre, l'AMP e soprattutto il fruttosio-2,6-bisfosfato agiscono come attivatori.

La disponibilità di azoto (ammonio) nei mosti durante la fermentazione stimola l'attività della fosfofruttochinasi nel lievito.

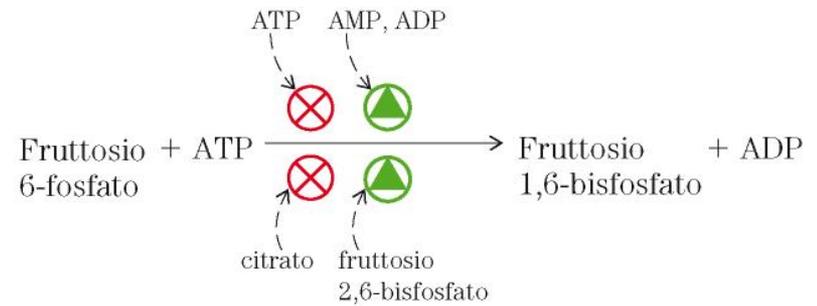
La fosfofruttochinasi-1 e la sua regolazione



(a)



(b)



(c)

Controllo della fosfofruttochinasi 1

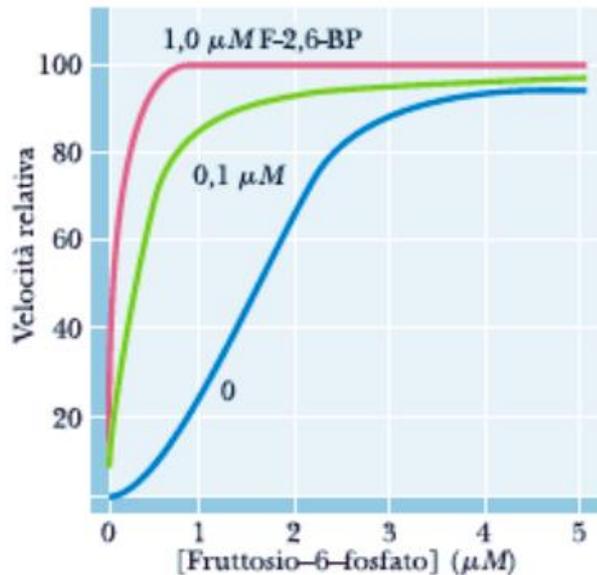
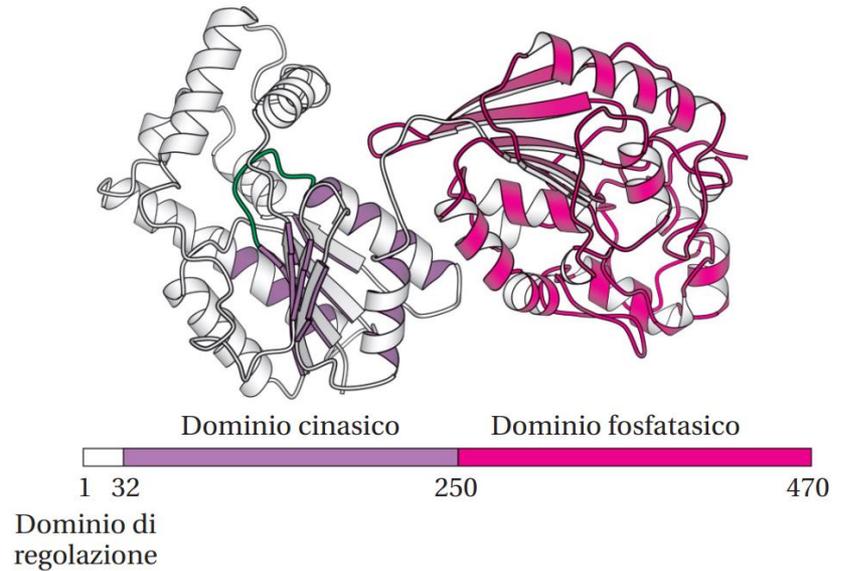


FIGURA 18.10 Il fruttosio-2,6-bisfosfato attiva la fosfofruttochinasi, aumentando l'affinità dell'enzima per il fruttosio-6-fosfato e ristabilendo la dipendenza iperbolica dell'attività enzimatica dalla concentrazione del substrato.

Il fruttosio 2,6 *bis*fosfato attiva la fosfofruttochinasi 1 diminuendo gli effetti inibitori dell'ATP.

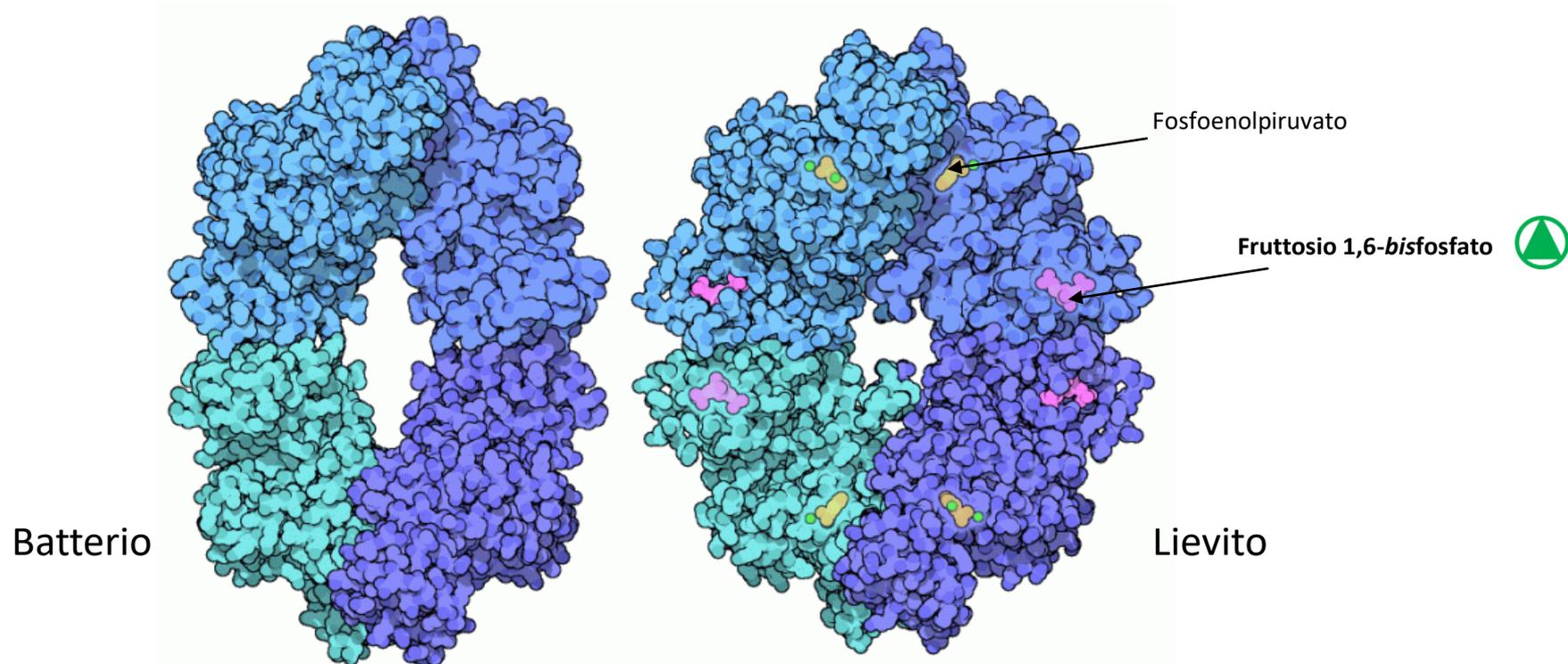
Questo è un attivatore allosterico che sposta l'equilibrio conformazionale dell'enzima tetraedrico dallo stato T allo stato R.



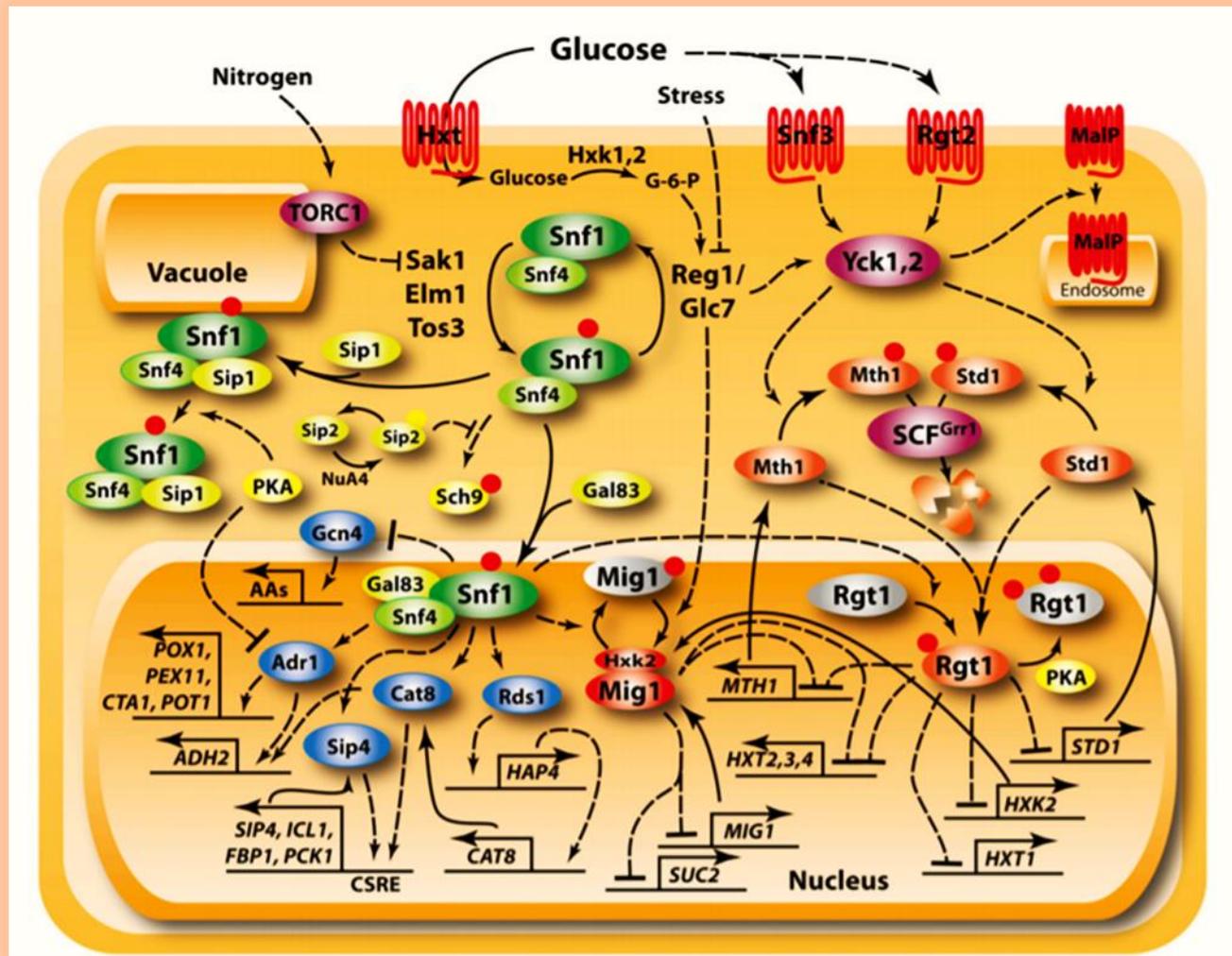
Struttura dell'enzima tandem

Il fruttosio 2,6 bisfosfato si forma dalla fosforilazione del fruttosio 6 fosfato, una reazione catalizzata dalla fosfofruttochinasi 2, mentre viene defosforilato dalla fruttosio 2,6-*bis*fosfatasi, entrambi presenti in unica catena polipeptidica chiamato enzima a tandem

La fase finale della glicolisi, mediata dalla piruvato chinasi, genera il secondo ATP ed è essenzialmente irreversibile. L'enzima funge da secondo punto di controllo della glicolisi ed è anche regolato allostericamente.



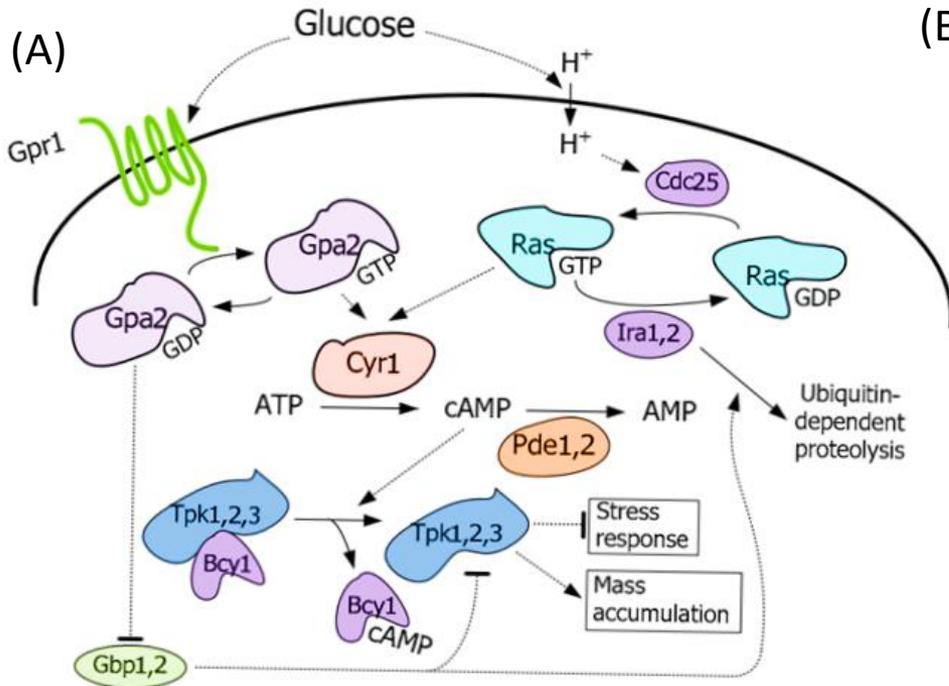
Confronto tra la piruvato chinasi batterica, che si trova nella forma inattiva più stretta, e la struttura della proteina nel lievito dove si trova nella forma attiva e possiede diverse molecole di un potente attivatore, il fruttosio 1,6-bisfosfato (rosa), legate nei siti regolatori. I siti attivi contengono un analogo dell'acido fosfoenolpiruvico (giallo) e due ioni metallici, uno ione potassio ed uno ione manganese (verdi) che aiutano la reazione.



James R. Broach. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*, Vol. 192, 73–105 September 2012

Snf3 e Rgt2 sono proteine regolatrici coinvolte nel rilevamento del glucosio. La proteina Snf3p è un sensore per le basse concentrazioni di glucosio, mentre la Rgt2p lo è per le alte concentrazioni. Uno dei fattori chiave che regola l'espressione dei geni *HXT* è lo stesso glucosio. Oltre alla concentrazione di glucidi, altri fattori regolano l'espressione genica degli *HXT*; importantissimo è che vi siano condizioni di crescita ottimali per il lievito.

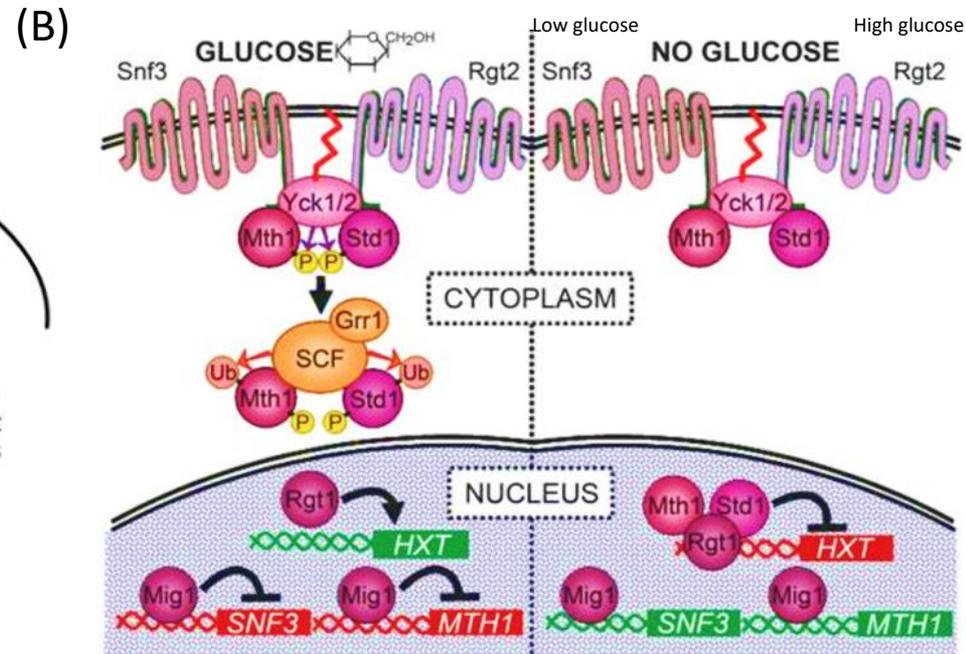
Vie di segnalazione che rispondono al glucosio extracellulare in *Saccharomyces cerevisiae*



(A) Il percorso cAMP-PKA: La proteina di membrana Gpr1 funge da recettore per il glucosio extracellulare e stimola l'adenilato ciclasi dove l'AMPc sopprime la risposta allo stress e stimola la crescita, regola la glicolisi e la gluconeogenesi sia a livello trascrizionale che traduzionale.

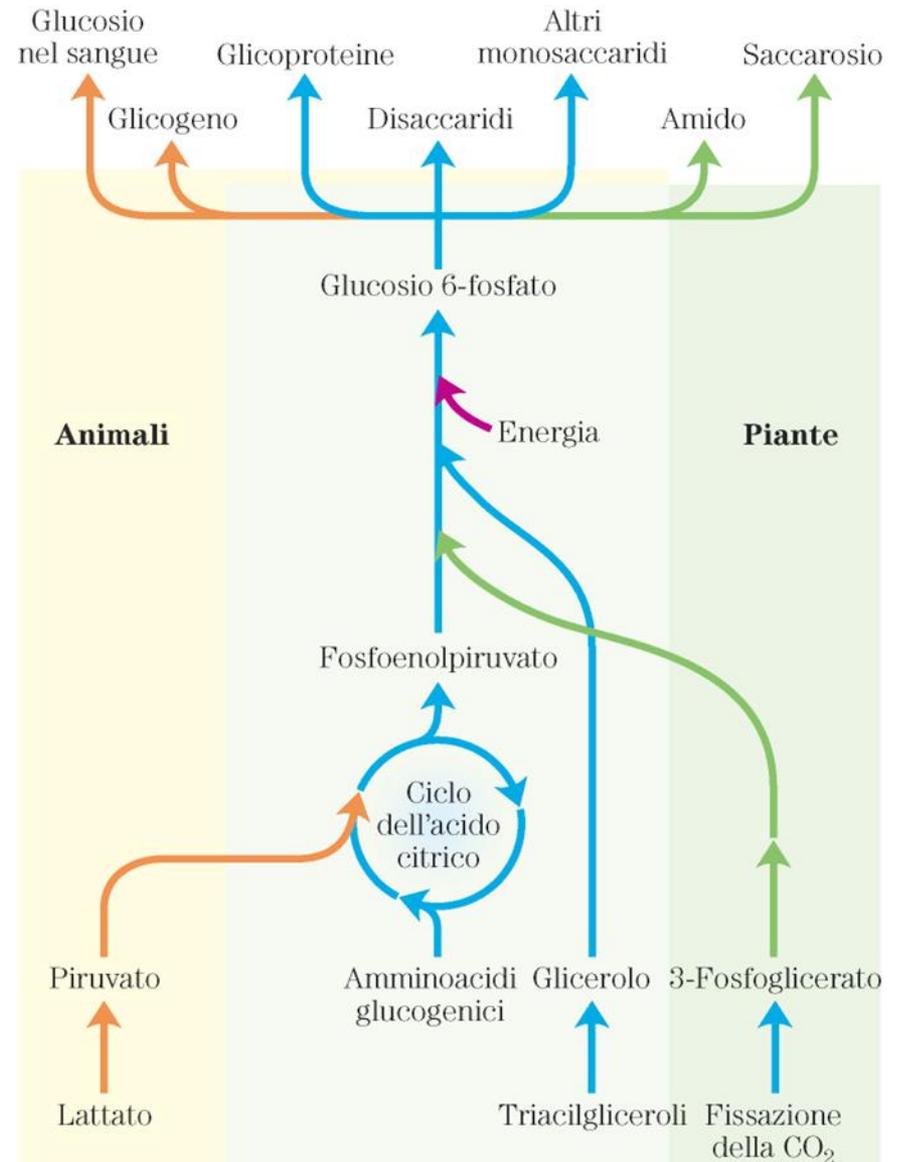
Meiling Wu *et al.*, Simulating Extracellular Glucose Signals Enhances Xylose Metabolism in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms* 2020, 8, 100

Stefano Busti. Glucose and regulation of cell cycle in *S. Cerevisiae*: analysis of mutants impaired in sugar uptake mechanisms. Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Industriali – XXI ciclo. Anno Accademico 2008-2009.



(B) Il percorso Snf3/Rgt2-Rgt1: alti e bassi livelli di glucosio extracellulare sono rilevati dalle proteine Rgt2 e Snf3 della membrana. Quando il glucosio si lega a questi recettori attiva la degradazione delle proteine Std1 e Mth1 e converte il gene Rgt1 in un attivatore trascrizionale che può stimolare l'espressione di HXT. La trascrizione dei geni trasportatori dell'esoso (HXT) viene repressa dal Rgt1 in assenza di glucosio.

Uso di altri substrati nella glicolisi



Fruttosio

fruttosio



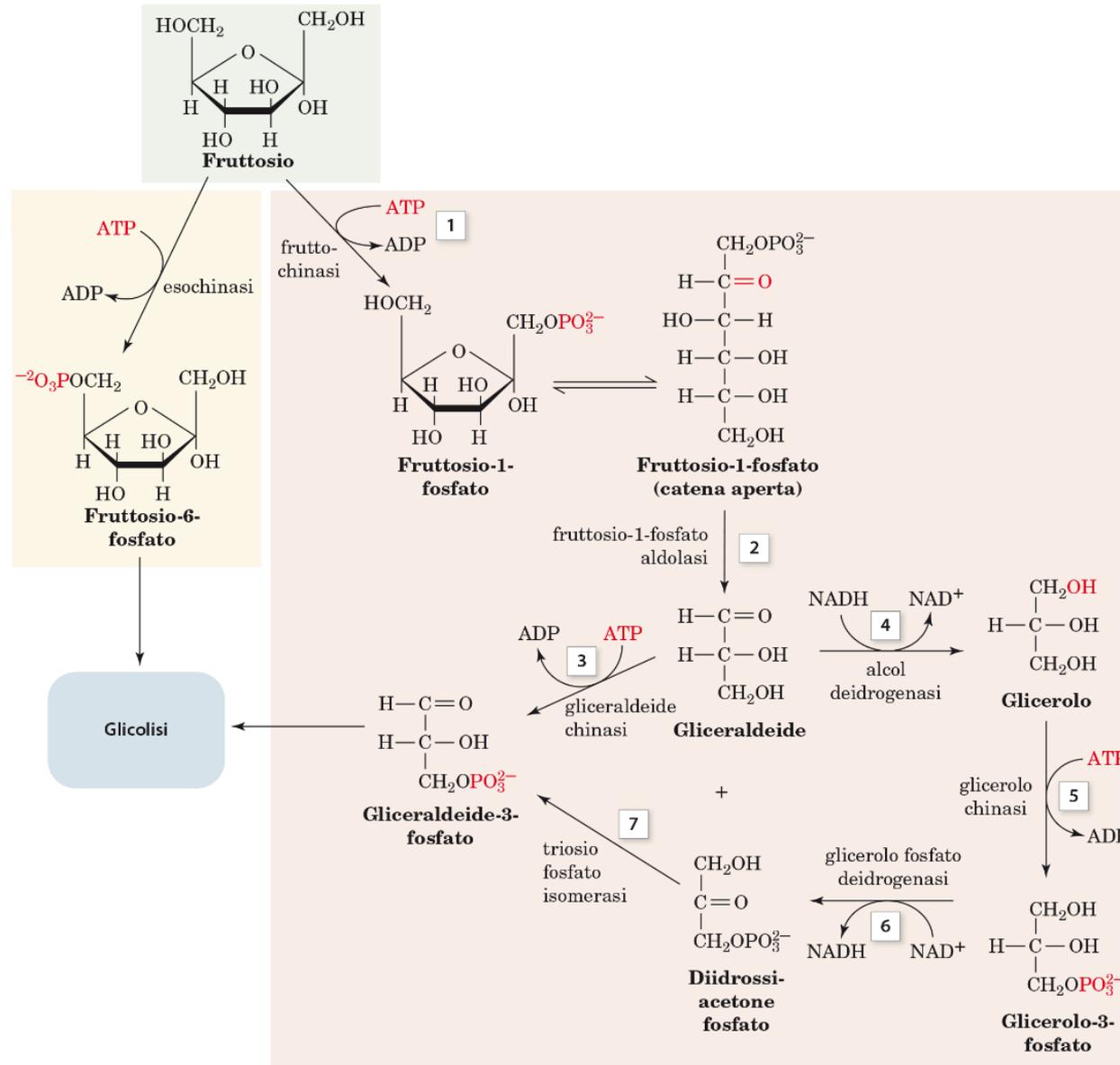
fruttosio 1-fosfato

fruttosio 1-fosfato aldolasi

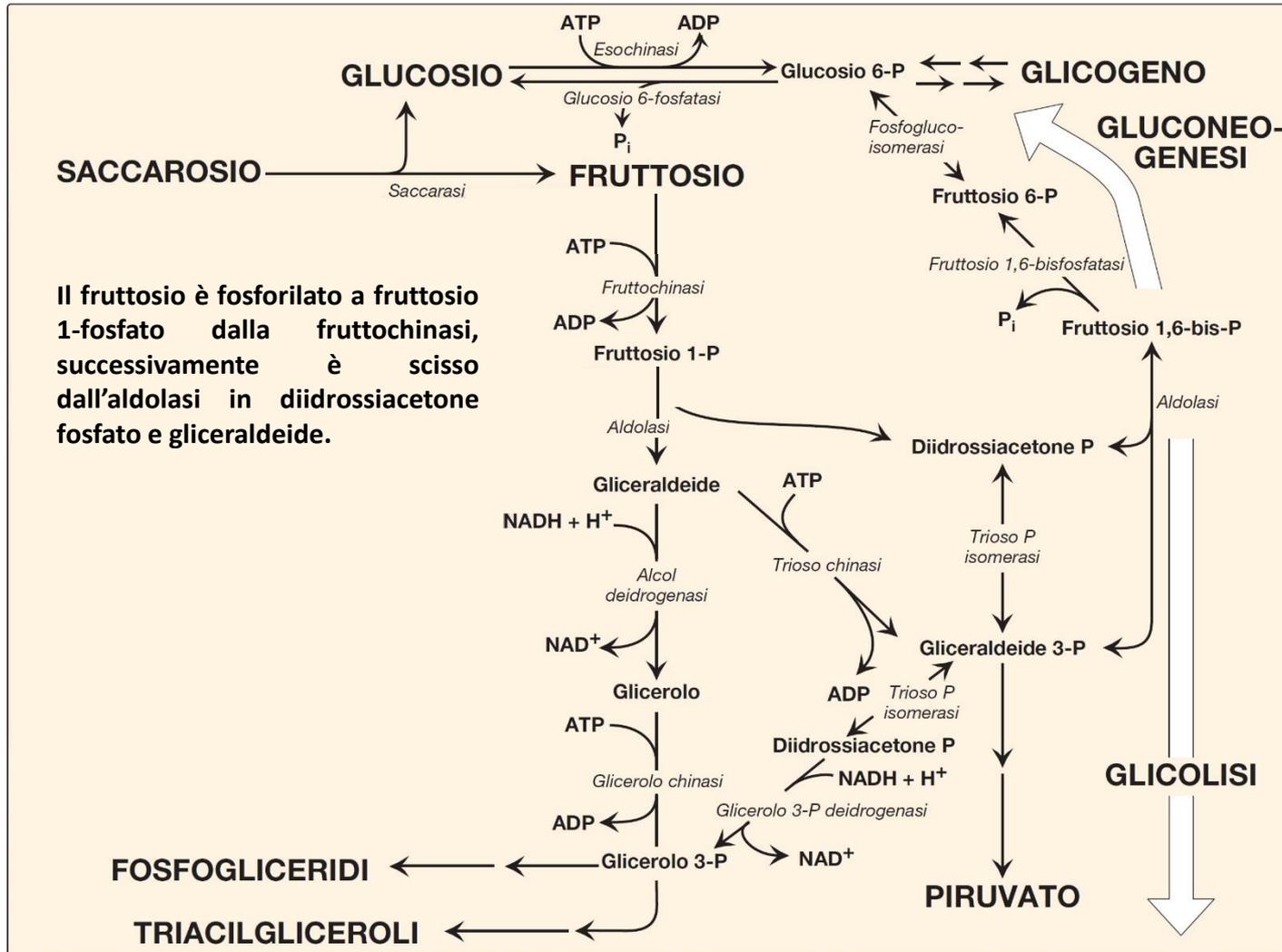
gliceraldeide +
diidrossiacetone fosfato



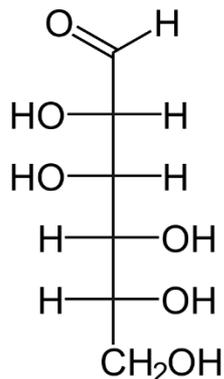
gliceraldeide 3-fosfato



Metabolismo del fruttosio

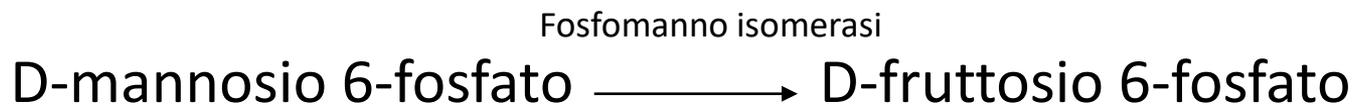
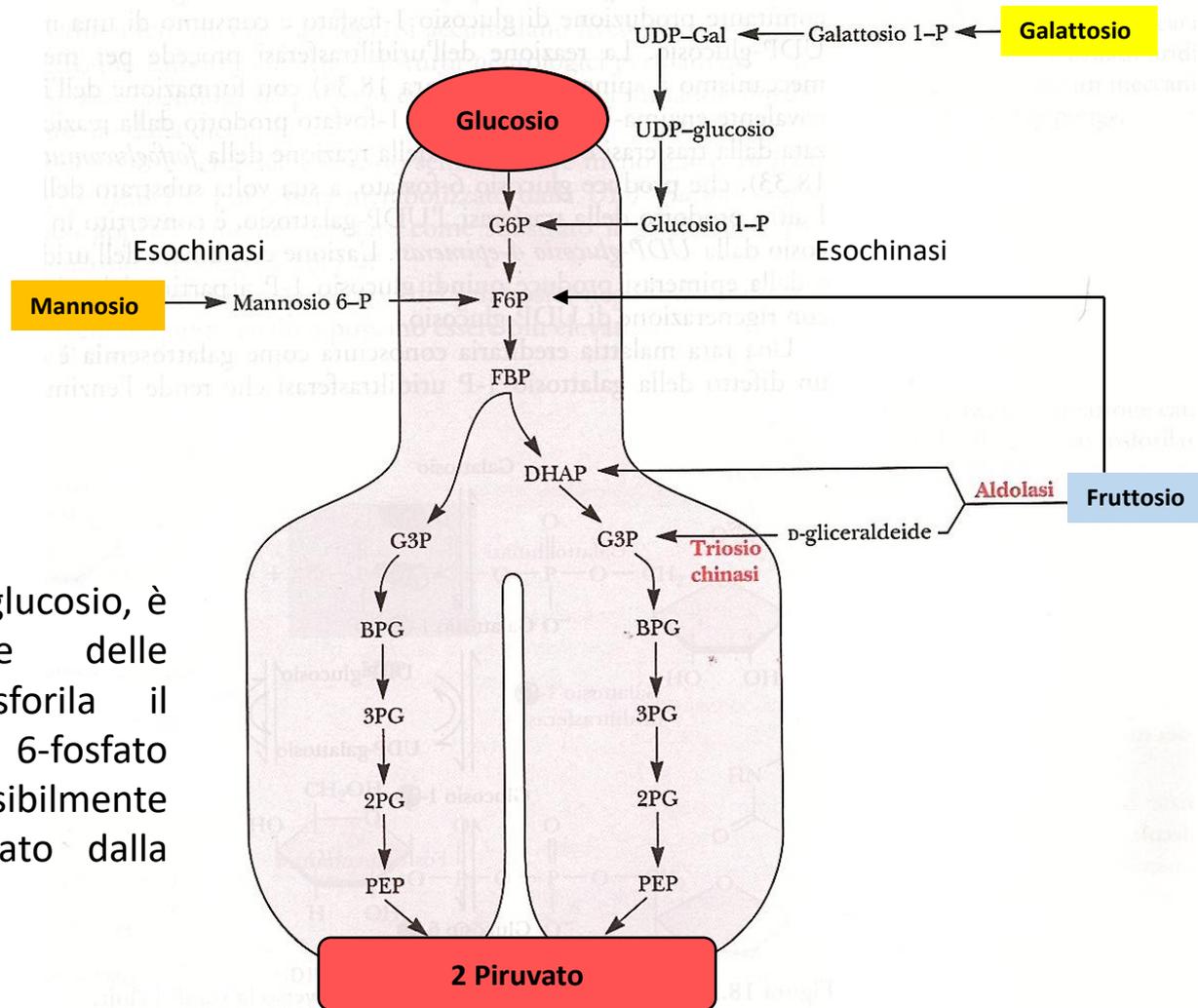


Mannosio

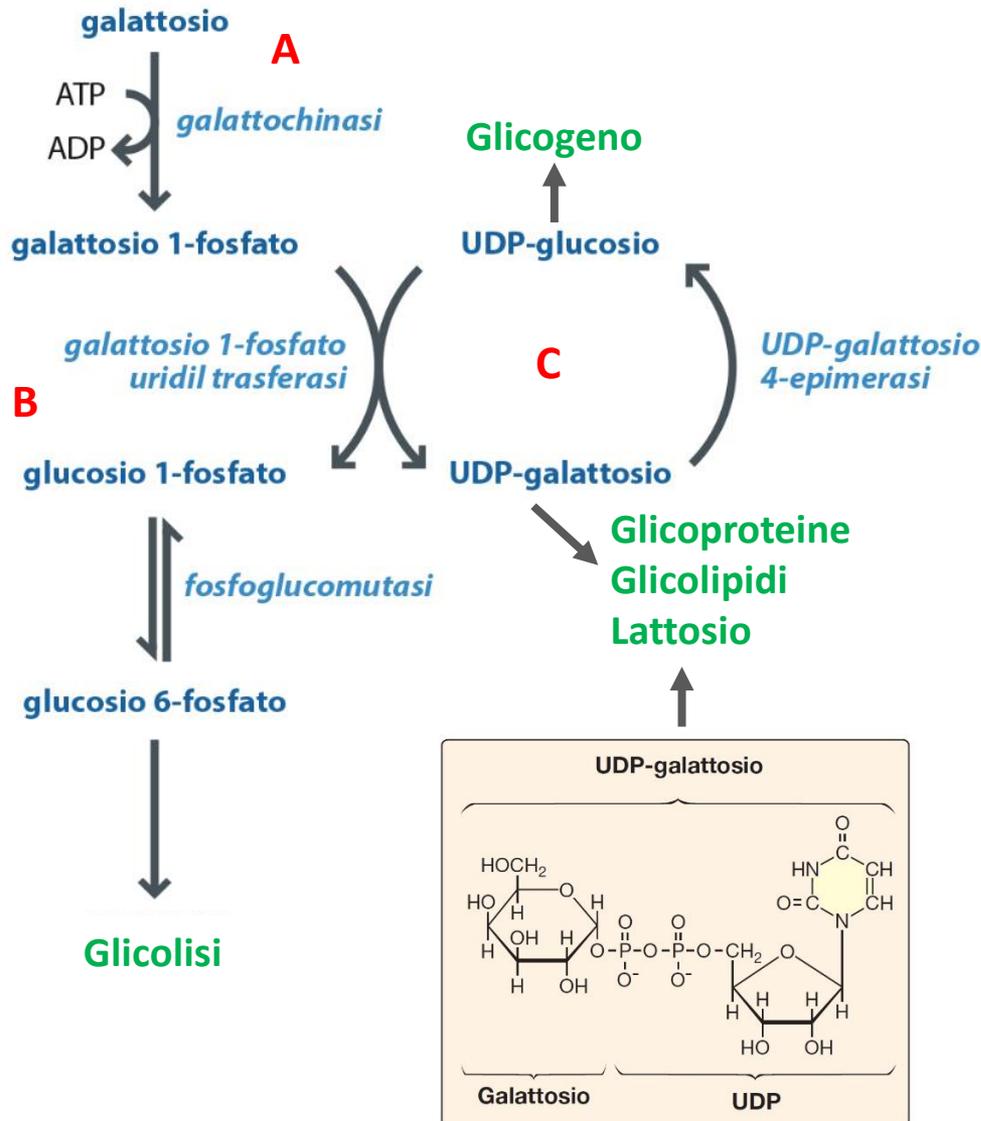


D-Mannose

Il mannosio, epimero in C-2 del glucosio, è un componente importante delle glicoproteine. L'esochinasi fosforila il mannosio, producendo mannosio 6-fosfato che, a sua volta, può essere reversibilmente isomerizzato a fruttosio 6-fosfato dalla fosfomannosio isomerasi



Metabolismo del galattosio (via di Leloir)



A. La fosforilazione: il galattosio deve essere fosforilato dalla galattochinasi che produce galattosio 1-fosfato:

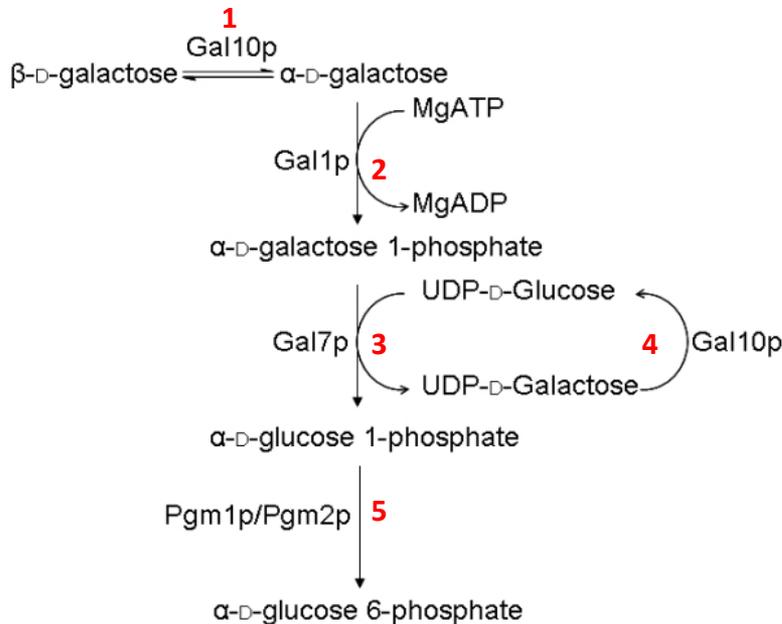
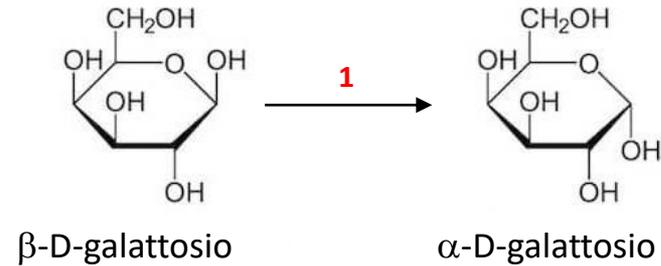
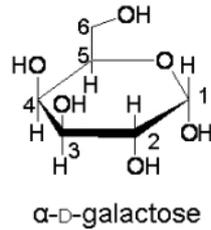
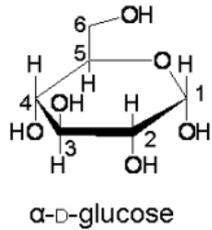


B. La formazione di uridina difosfato-galattosio: il galattosio 1-fosfato non può entrare nella glicolisi se non è prima convertito in uridina difosfato (UDP)-galattosio. Ciò avviene in una reazione di scambio in cui l'UDP-glucosio reagisce con il galattosio 1-fosfato producendo UDP-galattosio e glucosio 1-fosfato. L'enzima è la galattosio 1-fosfato uridiltrasferasi (GALT). Il glucosio 1-fosfato può essere isomerizzato a glucosio 6-fosfato ed entrare nella glicolisi.

C. La trasformazione del UDP-galattosio in UDP-glucosio: l'UDP-galattosio deve essere trasformato nel suo epimero dalla UDP-galattosio 4-epimerasi. L'UDP glucosio può partecipare a reazioni biosintetiche.

D. L'UDP-galattosio nelle reazioni di biosintesi: può servire come donatore di galattosio nella sintesi di lattosio, glicoproteine, glicolipidi.

Nel *Saccharomyces* il galattosio è metabolizzato dagli enzimi della via di Leloir: sono richiesti 5 enzimi per trasformare il galattosio in glucosio 6-fosfato



1) Galattosio mutarotasi: conversione di β -D-galattosio in α -D-galattosio

2) Galattochinasi: forma il galattosio 1-fosfato (fosforila l' α -D-galattosio)

3) Galattosio 1-fosfato uridiltransferasi: trasforma il galattosio 1-fosfato in UDP-galattosio

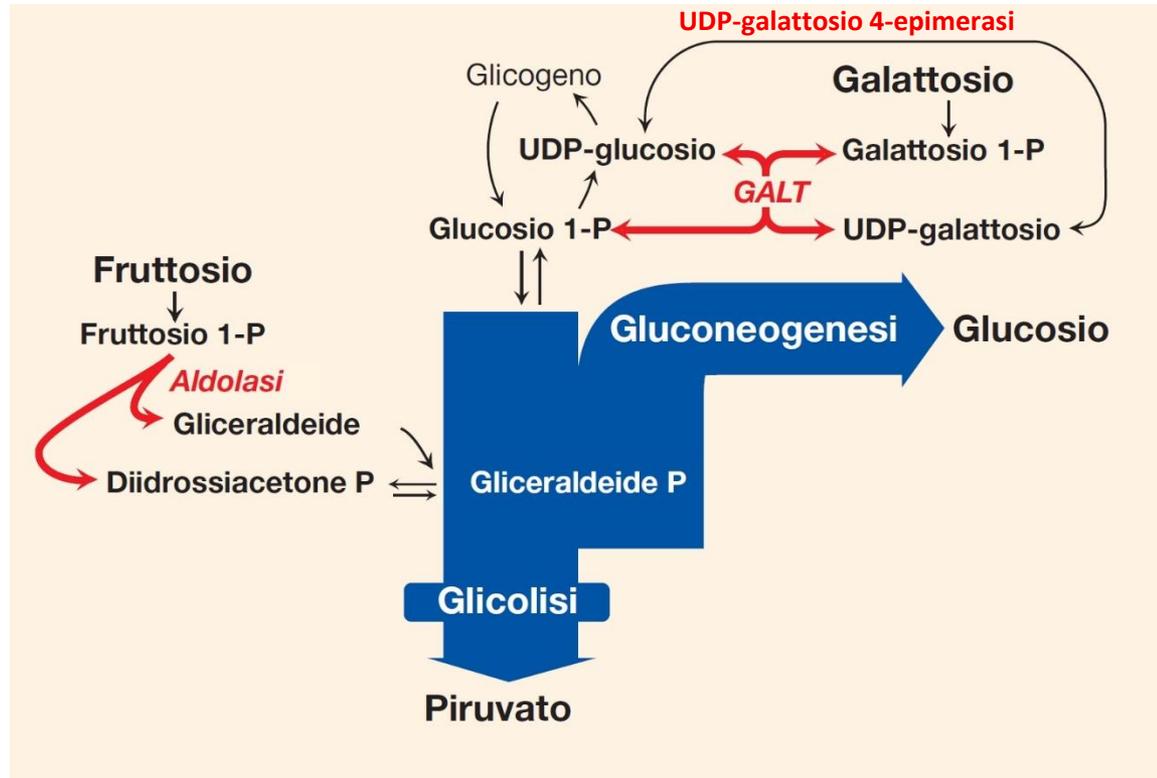
4) UDP-galattosio 4-epimerasi: trasforma UDP-galattosio in UDP-glucosio

5) Fosfoglucomutasi: converte il glucosio 1-fosfato in glucosio 6-fosfato

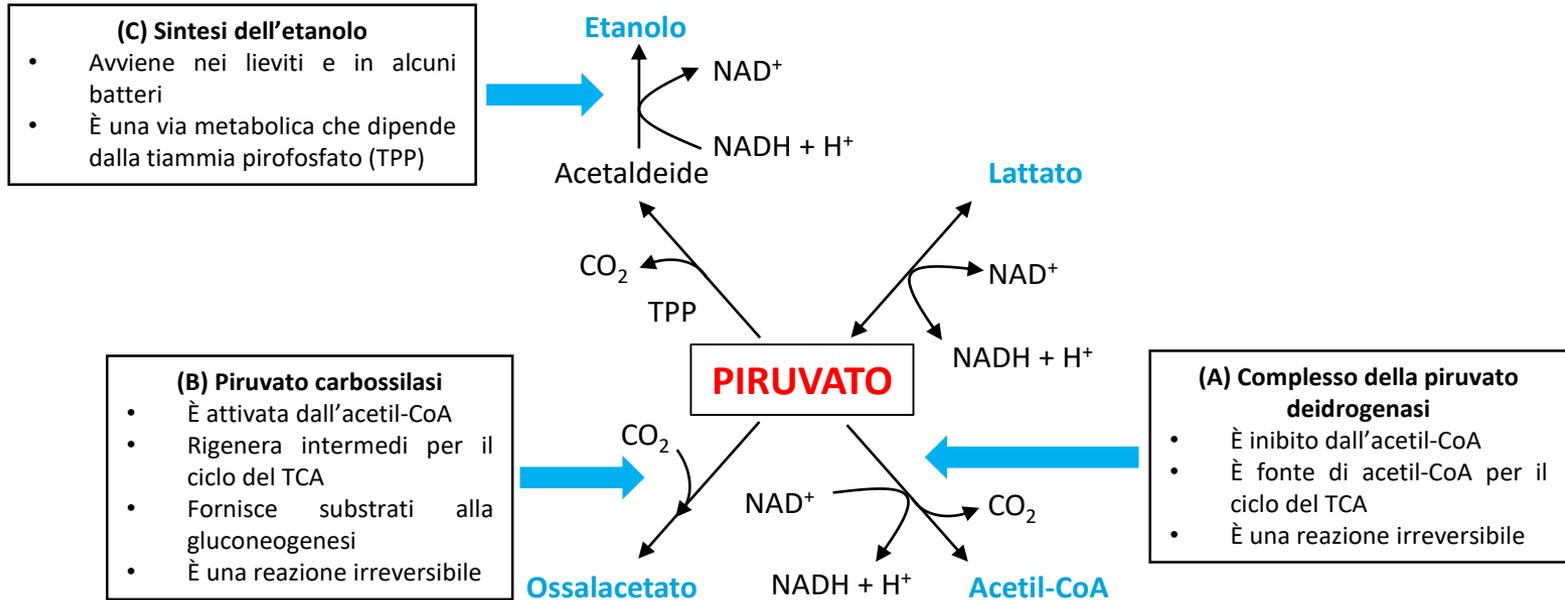
Metabolismo del fruttosio e galattosio

La fonte principale di fruttosio è il saccarosio che, in seguito alla scissione enzimatica, libera fruttosio e glucosio in quantità equimolari. Inizialmente il fruttosio è fosforilato dalla fruttochinasi, successivamente è scisso dall'aldolasi in diidrossiacetone fosfato e gliceraldeide.

La principale fonte di galattosio è il lattosio. Il galattosio è inizialmente fosforilato a galattosio 1-fosfato dalla galattochinasi. Il galattosio 1-fosfato è trasformato in UDP galattosio dalla GALT (galattosio 1-fosfato uridiltrasferasi), che utilizza UDP-glucosio come fonte nucleotidica. Per entrare nel flusso principale del metabolismo del glucosio, l'UDP-galattosio deve prima essere isomerizzato a UDP-glucosio dalla UDP-galattosio 4-epimerasi.



Destini metabolici alternativi del piruvato



- A. La decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA: avviene ad opera del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHC). Questo enzima trasforma irreversibilmente il piruvato in acetil-CoA, substrato del ciclo dell'acido citrico e fonte di carbonio per la sintesi degli acidi grassi.
- B. La carbossilazione del piruvato a ossalacetato: da parte della piruvato carbossilasi che catalizza una reazione irreversibile. Tale reazione genera un intermedio del ciclo dell'acido citrico e fornisce il substrato per la gluconeogenesi.
- C. La riduzione del piruvato a etanolo: avviene mediante la decarbossilazione da parte dell'enzima piruvato decarbossilasi. Il NADH deve essere riciclato a NAD⁺ per evitare che limiti l'attività glicolitica.