Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Mario Ageno

Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 1: Il catabolismo del glucoso

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **80** (1986), n.6, p. 458–466.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_6_458_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica) SIMAI & UMI
http://www.bdim.eu/

Biofisica. — *Compartimenti funzionali nella cellula batterica.* 1: *Il catabolismo del glucoso* (*). Nota (**) del Corrisp. MARIO AGENO.

SUMMARY. — The concept of functional compartment of a bacterial cell is discussed throughout. On the basis of previous experimental results, three such compartments are recognized in *E. coli*: 1) a compartment, CA, in which the nutrient is consumed and the energy and carbon requirements of the cell are satisfied; 2) a compartment, CM, in which the bulk of the biological materials is synthesized; 3) a compartment, CD, in which the chromosome is replicated and the cell division prepared.

The performance of the compartment CA is examined and three basic points are established: 1) All along the exponential growth of the O.D., the glucose transport system is saturated and the cell mass increase rate is proportional to the mass itself. When saturation fails (at $1 \div 2$ mg/l residual glucose concentration), the nutrient inflow decreases so rapidly as to bring to a sudden stop CM. In this way, a point transition is pratically effected. 2) In a stationary saturated culture, each cell must have a residual internal pool of ATP, in absence of which the cell could not start metabolizing glucose again in a refreshing medium. On the other side, the glucose transport system cannot work when phosphoenolpyruvate is absent. In the refreshing medium, the enzyme hexokinase acts as a starter: it phosphorilates glucose, which enters the cell by diffusion, till the phosphoenolpyruvate concentration is increased and the transport system begins to work. 3) It seems very likely that the enzyme phosphofructokinase switches over the functional compartment CM. When CM is off, the phophogluconate pathway remains open, with reduced energy consumption: the compartment CD keeps on working, until the glucose from the medium and the internal pool of precursors are exhausted. In a refreshing medium, the phosphofructokinase switch is initially off, the phosphoenolpyruvate is produced via phosphogluconate and CD cannot begin to work, until a sufficient precursor pool is available.

1. L'ORDINE INTERNO DELLA CELLULA BATTERICA

In un precedente lavoro [1], per descrivere certi aspetti della fenomenologia della crescita batterica in coltura liquida, abbiamo introdotto il concetto di *compartimenti funzionali* di una cellula. Vogliamo ora riprendere in considerazione tale concetto, per vedere fino a che punto esso possa essere utile per la teorizzazione della fisiologia dei batteri: se si tratta solo di uno schema mentale che rappresenta, tra i tanti possibili, un modo particolare di mettere ordine tra le nostre conoscenze, un modo di analizzare e descrivere nelle grandi linee il complesso dei processi interni; o se, invece, corrisponde ad un'effettiva arti-

(*) Questa ricerca è stata in parte finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato per la Fisica.

(**) Presentata nella seduta del 20 giugno 1986.

colazione del sistema, consentendo quindi di descriverne ordinatamente la più ovvia fenomenologia, non solo, ma anche di prevederne aspetti più particolari e riposti.

Com'è ben noto, la cellula procariotica è priva di un sistema di membrane interne capaci di isolare almeno parzialmente dal resto determinate regioni del citoplasma [2]. Solo nei batteri Gram-negativi, come *E. coli*, si possono chiaramente distinguere due regioni, separate dalla membrana citoplasmatica: una regione interna, occupata appunto dal citoplasma e dal nucleoide, ed una regione compresa tra la membrana citoplasmatica e la membrana esterna, il cosidetto spazio periplasmico [3]. Questa caratteristica strutturale svolge un ruolo importantissimo in tutte le interazioni del batterio col mezzo esterno, in particolare ai fini del rifornimento energetico dei processi interni [4] e nella chemotassi [5]. Non coinvolge tuttavia direttamente i processi fondamentali, per effetto dei quali la cellula si accresce e si riproduce. Questi processi si svolgono interamente nel citoplasma, interessando anche lo spazio periplasmico solo nelle ultime fasi del processo che provvede all'estensione delle strutture cellulari periferiche.

Non si può dunque parlare, riferendosi alla cellula batterica e ai suoi processi interni fondamentali, di compartimenti spazialmente caratterizzati e distinti, anche se, certamente, il contenuto della sua regione interna è tutt'altro che una mescolanza caotica d'ogni sorta di metaboliti.

Dell'esistenza di un rigoroso ordine interno, anche spaziale pur in assenza di un sistema di membrane divisorie, ci sono come è ben noto indicazioni e dirette e indirette. Ad esempio, la compattezza strutturale del cromosoma [6], essenziale ai fini di una corretta segregazione dei cromosomi « figli » nella divisione cellulare [7], mette in evidenza una *regione nucleare* della cellula, ben distinta dal resto del citoplasma. E l'estrema brevità della vita della maggior parte almeno degli mRNA procariotici [8] limita certamente la sintesi proteica quasi esclusivamente ad una regione ristretta, nelle immediate vicinanze dei segmenti trascritti del cromosoma.

Ma, al di là di queste manifestazioni evidenti, l'ordine spaziale interno della cellula procariotica è ovviamente difficile da studiare. È presente nel citoplasma un gran numero di metaboliti diversi, parecchi dei quali con un numero di molecole non elevato o addirittura molto piccolo. Individuare la distribuzione spaziale anche solo dei più importanti tra essi, con una precisione tale che i dati risultino significativi sotto l'aspetto funzionale, sembra un'impresa molto ardua, se non disperata [9].

L'idea quindi di aggredire il problema dall'altro lato, cercando di individuare, attraverso il comportamento della cellula in condizioni appropriate, alcune grandi unità funzionali e di chiarire come ciascuna di esse dipenda dalle condizioni di crescita e come sia legata alle altre, sembra senz'altro idea valida. Tale individuazione diretta di compartimenti funzionali distinti (corrispondano essi a regioni diverse della cellula oppure no), è in fondo ciò che principalmente interessa dal punto di vista della organizzazione generale del sistema,

mentre la distribuzione spaziale di singoli metaboliti può anche essere, biologicamente parlando, solo scarsamente significativo.

2. Classificazione dei processi interni

Se ci proponiamo, prima di tutto, di descrivere secondo un ordine logico i processi interni in *Escherichia coli*, siamo portati a individuare cinque sistemi fondamentali, che corrispondono ad altrettanti aspetti essenziali del crescere e del riprodursi della cellula. Essi sono i seguenti.

1) Il sistema di alimentazione in energia e materiali, comprendente tutti i passi del catabolismo del glucoso (glicolisi e vie alternative, ciclo di Krebs e catena respiratoria). Di esso fanno parte anche:

a) i meccanismi di trasporto da e per il citoplasma;

b) i processi di fosforilazione del sistema dell'acido adenilico;

c) l'apparato chemotattico.

2) Il sistema per la biosintesi dei metaboliti intermedi, che riceve dal sistema di alimentazione tutti i precursori e l'energia necessari, ed elabora i monomeri per la sintesi delle macromolecole e le unità di base per l'estensione dell'involucro cellulare.

3) Il sistema di montaggio delle strutture cellulari periferiche.

4) Il sistema di sintesi delle proteine, entro cui si svolgono i processi di trascrizione e traduzione dell'informazione genetica. Esso provvede, oltreché alla sintesi delle proteine per il resto della cellula, anche alla fabbricazione delle sue stesse strutture, comprendenti un elevato numero di elementi di natura proteica, indispensabili perché il processo di sintesi delle proteine possa svolgersi regolarmente.

5) Il sistema del patrimonio genetico, o sistema del programma, entro cui si svolge il processo di duplicazione del cromosoma. Di esso fa parte anche il meccanismo che porta alla segregazione dei due cromosomi « figli » e alla successiva divisione cellulare.

3. Individuazione dei compartimenti funzionali

Studiando sperimentalmente, in condizioni semplici e rigorosamente controllate, il passaggio dalla fase di crescita esponenziale alla fase di saturazione di una coltura batterica [1], abbiamo messo in evidenza come l'insieme di quei cinque sistemi, caratterizzati fin qui solo speculativamente, vada riveduto dal punto di vista funzionale e riorganizzato in non più di tre compartimenti distinti.

È chiaro, in primo luogo, che al sistema di alimentazione [1] corrisponde un *primo compartimento funzionale* della cellula, CA, perfettamente caratterizzato, che comprende:

a) la glicolisi e le vie alternative, il ciclo di Krebs, la catena respiratoria;

b) i meccanismi di trasporto da e per il citoplasma;

c) i processi di fosforilazione del sistema dell'acido adenilico;

d) l'apparato chemotattico del batterio.

Il fatto poi, da noi dimostrato sperimentalmente [10], che in una coltura batterica in terreno liquido minimo, la curva di crescita della D.O. e quella della numerosità batterica procedano normalmente con periodi di duplicazione costanti, ma spesso anche diversi tra loro, e mostrino ben definiti punti di transizione dalla crescita esponenziale alla saturazione, temporalmente ben distinti tra loro, è una prova che gli altri quattro sistemi cellulari sopra elencati vanno raggruppati in due altri compartimenti funzionali distinti.

Il *secondo compartimento funzionale*, CM, è quello che viene bloccato quando la D.O. della coltura raggiunge la saturazione. Esso quindi comprende:

a) l'intero sistema [4] di sintesi delle proteine;

b) l'intero sistema [3] di montaggio delle strutture cellulari periferiche, dato che l'allungamento del batterio segue l'aumento della sua massa e quindi il suo contributo alla D.O. E inoltre:

c) quella parte del sistema [2] che elabora i precursori per la sintesi delle proteine e le unità di base per l'estensione dell'involucro cellulare.

Il *terzo compartimento funzionale*, CD, è quello che viene bloccato quando la numerosità batterica raggiunge la saturazione. Esso quindi comprende:

a) il sistema [5] del programma, col meccanismo che porta alla segregazione dei due cromosomi « figli » e alla divisione cellulare;

b) quella parte del sistema [2] che elabora i precursori per la duplicazione del DNA.

Resta ora da individuare quali possano essere gli « interruttori » che regolano il funzionamento di questi tre compartimenti. Quanto alla natura di tali interruttori, ne abbiamo già discusso in un lavoro precedente [11]. La biologia molecolare ha messo in evidenza, in numerosi casi, l'esistenza di enzimi allosterici multimerici [12], cioè costituiti da un aggregato di diverse unità allosteriche simili tra loro, ciascuna delle quali facilita con il suo il mutamento conformazionale delle altre, con azione cooperativa. La risposta al livello di concentrazione di un effettore è in tal caso decisamente di tipo logistico e approssima abbastanza bene un comportamento a soglia, di tipo « si/no », cioè proprio quello che è il comportamento di un interruttore. È dunque da vedere, esaminando i dettagli della biochimica cellulare, se esistono enzimi di questo tipo in posizione chiave, da candidare a responsabili delle funzioni che ci interessano.

4. IL CONTROLLO DEL FLUSSO ENERGETICO ENTRANTE

Incominciamo col prendere in considerazione il compartimento che comprende il sistema di alimentazione. Degli altri due compartimenti ci occuperemo in un prossimo lavoro.

Debbono, innanzi tutto, esser messi in rilievo due dati di fatto molto significativi:

1) per poter essere metabolizzato (ed essere quindi utilizzato per la produzione di ATP) il glucoso deve prima essere attivato. Ciò richiede due molecole di ATP per ogni molecola di glucoso.

2) L'andamento dei processi interni della cellula e, in particolare il flusso di glucoso elaborato, è indipendente dalla concentrazione del glucoso nel mezzo esterno, al variare di questa concentrazione anche per un fattore dell'ordine di 10^3 [10].

Da questi due fatti derivano indicazioni molto importanti per ciò che concerne l'organizzazione generale della cellula batterica. Scende dal primo che una cellula che non disponga di ATP non è in grado di nutrirsi e quindi di crescere e moltiplicarsi, anche se l'intero suo apparato biochimico è intatto e se nel mezzo è disponibile glucoso: è una cellula morta.

Le cellule delle nostre colture, nella fase di saturazione (almeno se non sono in tale fase da troppo tempo), riprendono subito la loro attività biosintetica se trasferite in un mezzo ricco di glucoso [10]. Ciò significa che esse, anche nella fase di saturazione, non restano mai completamente prive di ATP: a parte il processo di attivazione del glucoso, tutti i processi interni che richiedono ATP non sono quindi in grado di esaurire l'ATP cellulare. Per ciascuno di essi deve esistere una concentrazione critica minima dell'ATP cellulare, al di sotto della quale il processo risulta completamente bloccato. La più bassa di tutte queste concentrazioni critiche è la concentrazione dell'ATP cellulare nel momento in cui alla cellula viene a mancare il rifornimento di glucoso. Tutto questo non potrebbe esser vero, se gli enzimi allosterici multimerici che svolgono la funzione di interruttori, non godessero di una proprietà estremamente importante: quella di essere del tutto inattivi, per valori della concentrazione dei relativi effettori al di sotto dei valori di soglia. Ciò per altro non risulta dalla ordinaria teoria degli effetti cooperativi tra le subunità di una proteina multimerica [12], mentre d'altra parte potrebbe giustificare dal punto di vista evolutivo la presenza nei passi chiave del metabolismo cellulare di grossi enzimi di questo tipo.

Quanto al processo di attivazione del glucoso, esso non deve essere bloccato dalla scarsezza di ATP, ma solo dalla mancanza o dalla scarsezza del glucoso stesso. In caso contrario infatti le cellule di una coltura in saturazione non sarebbero più in grado di riprendere la crescita.

Dal secondo dei due fatti sopra citati scende che deve esistere un diaframma, che limita l'ingresso del glucoso nella cellula ad un certo valore, qualunque sia la concentrazione di esso nel mezzo esterno.

Com'è ben noto, il glucoso entra nella cellula batterica con un meccanismo di trasferimento di gruppo, che non consuma energia [13]. Il gruppo trasferito è un fosfato, che passa da una molecola di acido fosfoenolpiruvico alla molecola di glucoso entrante, trasformandola in glucoso-6-fosfato. Mediatore del trasferimento è un complesso enzimatico, che comprende almeno quattro pro-

teine, detto complesso della fosfotrasferasi (PTS). Il PTS provvede dunque al primo passo nell'attivazione del glucoso e lavora in concorrenza con l'acido piruvico-cinasi, che trasforma l'acido fosfoenolpiruvico in acido piruvico, con la produzione di una molecola di ATP.

In una cellula di una coltura in saturazione, non viene metabolizzato glucoso e di conseguenza la concentrazione dell'acido fosfoenolpiruvico è estremamente bassa, dato che anche la acido piruvico-cinasi, stante l'alto livello di AMP, è sicuramente non inibita. Ne segue che, se la cellula viene trasferita in un mezzo ricco di glucoso, il meccanismo di trasporto non può entrare immediatamente in funzione. In un primo tempo, il glucoso deve quindi entrare nella cellula per semplice diffusione ed essere trasformato in glucoso-6-fosfato per altra via.

Ed infatti esiste nella cellula un enzima esocinasi, che catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato da una molecola di ATP a una molecola di glucoso, producendo appunto una molecola di glucoso-6-fosfato. Si tratta di un enzima dimerico, che funziona come sistema a due sostrati, con cinetiche di Michaelis-Menten: il legame col glucoso induce a quanto sembra un cambiamento conformazionale che favorisce e rafforza il legame con lo ATP. Si tratterebbe quindi di un enzima particolarmente idoneo a lavorare con concentrazioni di glucoso anche molto basse [14].

Solo in un secondo tempo, quando la concentrazione dell'acido fosfoenolpiruvico abbia raggiunto un conveniente livello, il sistema di trasporto potrà entrare in funzione, assicurando l'accesso di un flusso di glucoso molto maggiore e costante. La esocinasi viene quindi ad assolvere la funzione di motorino di avviamento.

Sembra dunque probabile che il diaframma per la metabolizzazione del glucoso sia costituito dal meccanismo di trasporto che, salvo che a concentrazioni del glucoso nel mezzo esterno estremamente basse (minori di $1 \div 2$ mg/l, [11]), lavorerebbe sempre al massimo della sua portata. Questa sarebbe proporzionale al numero di copie della fosfotrasferasi distribuite su tutto l'involucro cellulare: il che spiegherebbe come mai l'aumento della massa cellulare per unità di tempo sia sempre proporzionale alla massa stessa [10].

5. IL SECONDO PASSO NELL'ATTIVAZIONE DEL GLUCOSO

Non abbiamo ancora preso in considerazione il fatto che l'attivazione del glucoso non si esaurisce con la sua trasformazione in glucoso-6-fosfato (e poi, in presenza dell'enzima glucoso-6-fosfato-isomerasi, in fruttoso-6-fosfato). Il secondo passo, che richiede una seconda molecola di ATP, è la trasformazione del fruttoso-6-fosfato in fruttoso-1-6-difosfato, in presenza dell'enzima fosfofruttocinasi.

La fosfofruttocinasi è un grosso enzima allosterico (p.m. 380.000) su cui agiscono numerosi effettori diversi. È chiaramente uno dei punti chiave della regolazione della cellula, in quanto può avviare o bloccare la glicolisi. Essa è

attivata da alte concentrazioni di ADP e AMP, il che significa che in una cellula al minimo dell'ATP (quali le cellule di una coltura in saturazione), questo enzima non è inibito allostericamente.

La fosfofruttocinasi è invece inibita (oltreché da alte concentrazioni di acidi grassi e di acido citrico) anche da un'alta concentrazione di ATP, il che significa che in una cellula in piena metabolizzazione aerobica, in cui il sistema dell'acido adenilico è pressoché al massimo della fosforilazione, il glucoso-6-fosfato tende ad accumularsi. Su questo punto ritorneremo in un prossimo lavoro, in quanto dal glucoso-6-fosfato parte la via dell'acido fosfogluconico.

Per il nostro problema attuale, sarebbe importante conoscere il comportamento dell'enzima a concentrazioni molto basse dei suoi sostrati. Si supponga ad esempio che sia molto bassa la concentrazione dell'ATP: si è in questo caso in assenza di veti allosterici. Se tuttavia l'enzima (come avviene di regola per i grossi complessi enzimatici multimerici) avesse una risposta di tipo sigmoide per concentrazioni decrescenti di ATP, si presenterebbe per la sua attività una sorta di soglia. A concentrazioni di ATP molto basse, l'enzima diverrebbe allora nuovamente limitante per la glicolisi e ancora il glucoso-6-fosfato tenderebbe ad accumularsi. Una ipotesi del genere avviamente non è necessaria al fine di giustificare la presenza di una concentrazione residua di ATP nelle cellule di una coltura in saturazione, poichè la ulteriore elaborazione del glucoso-6-fosfato porta in definitiva in ogni caso ad un aumento e non a una diminuzione della riserva di ATP. Essa però potrebbe essere suggerita dal fatto che quando il glucoso nel mezzo è in via di esaurimento e il meccanismo di trasporto cessa di essere saturato, il compartimento funzionale CM della cellula si blocca, mentre il compartimento CD continua a funzionare. Sembra ragionevole pensare che il blocco di CM avvenga proprio a livello della fosfofruttocinasi con interruzione della glicolisi (che alimenta la sintesi degli ammino-acidi), mentre rimane attiva la via dell'acido fosfogluconico (che alimenta la sintesi dei nucleotidi). Alternativamente, l'interdizione della fosfofruttocinasi potrebbe essere causata dal calo della concentrazione del fruttoso-6-fosfato (il suo sostrato), conseguente alla diminuzione della disponibilità di glucoso.

La via dell'acido fosfogluconico realizza un ciclo, in cui ogni tre molecole di glucoso-6-fosfato elaborate, una viene trasformata in una sola molecola di gliceraldeide-3-fosfato (anziché due), evitando l'impiego di una molecola di ATP e producendo contemporaneamente 6 molecole di NADPH (e 3 di CO_2) a spese di 3 molecole d'acqua e di 6 molecole di $NADP^+$ (fig. 1).

Così, la fosfofruttocinasi, anche se blocca la via normale della glicolisi, non è affatto in grado di bloccare completamente la produzione di ATP, ma solo di limitarla alla portata della via dell'acido fosfogluconico. Questa, in condizioni di pieno funzionamento aerobio, rappresenta il 30% circa della portata della via di Embden-Meyerhof e quindi non più che (1/6) 30%, cioè il 5% circa della gliceraldeide-3-fosfato viene prodotta per questa via. È perciò abbastanza ragionevole attendersi che, quando la concentrazione del glucoso nel mezzo esterno non è più saturante del meccanismo di trasporto, si determini il blocco della fosfofruttocinasi, con una riduzione improvvisa della produzione di energia

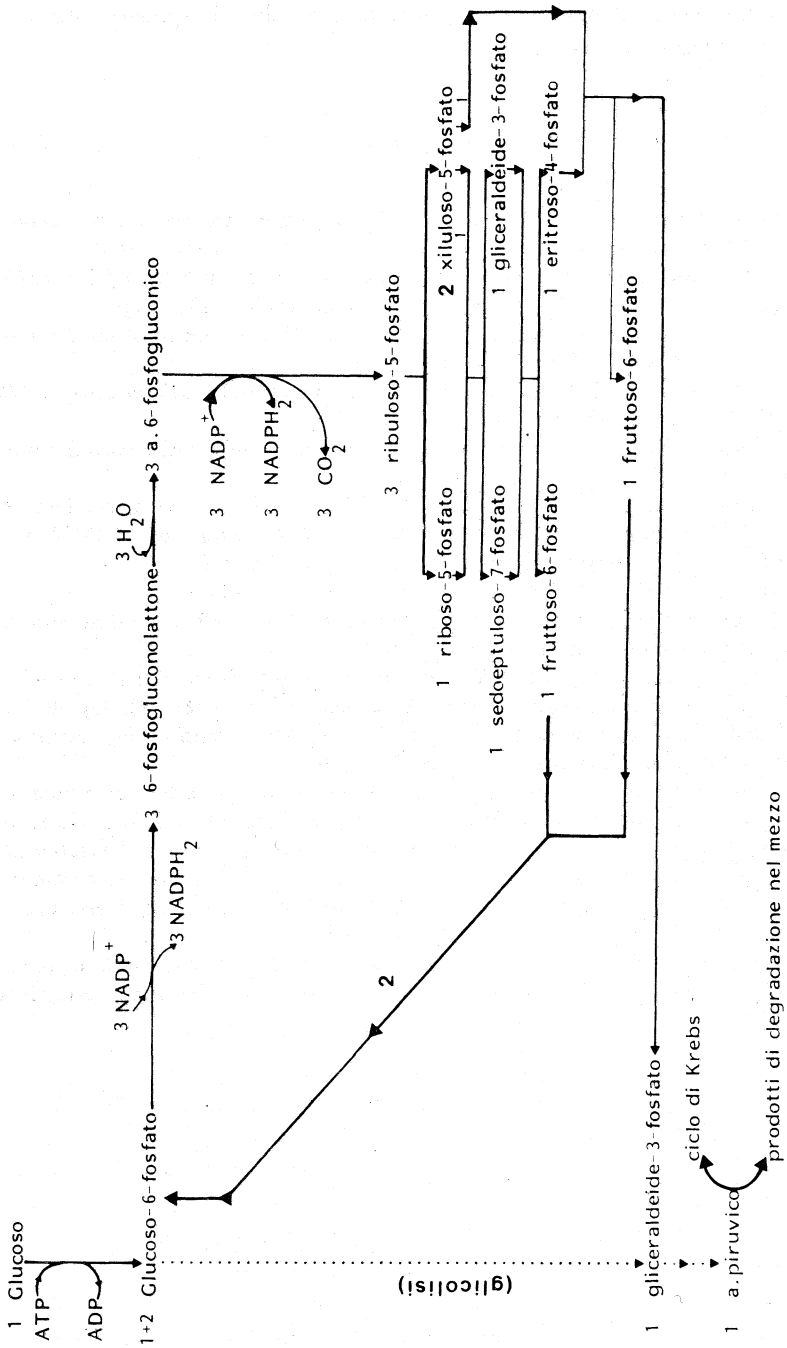
1 Glucoso
ATP
ADP
1+2 Glucoso-6-fosfato
3 6-fosfogluconolattone
3 H_2O
3 a. 6-fosfogluconico
3 $NADP^+$
3 $NADPH_2$
3 CO_2
3 ribuloso-5-fosfato
2
1 riboso-5-fosfato
2 xiluloso-5-fosfato
1 sedoeptuloso-7-fosfato
1 gliceraldeide-3-fosfato
1 fruttoso-6-fosfato
1 eritroso-4-fosfato
1 fruttoso-6-fosfato
3 $NADP^+$
3 $NADPH_2$
2
(glicolisi)
1 gliceraldeide-3-fosfato
ciclo di Krebs
1 a. piruvico
prodotti di degradazione nel mezzo

Fig. 1

a un livello dell'ordine del 10% circa della produzione precedente, e abbia quindi luogo il blocco di CM (non più alimentato dai necessari precursori), mentre CD continua il suo funzionamento normale. Anche su questo punto ritorneremo in un prossimo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

[1] AGENO M., CLARO M. e DE BLASIO A. - *Il raggiungimento della saturazione in una coltura batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », *80* (5) (maggio 1986).

[2] Si veda per esempio: STANIER R.Y., ADELBERG E.A. e INGRAHAM J.L. (1976) - *The Microbial World.* 4th ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs. Cap. 3.

[3] INGRAHAM J.L., MAALØE O. e NEIDHART F.C. (1983) - *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland Mass. Pag. 26 sgg.

[4] MANDELSTAM J., MCQUILLEN K. e DAWES I. eds. (1982) - *Biochemistry of Bacterial Growth*, 3rd ed., Blackwell, Oxford. Pag. 147 sgg.

[5] KOSHLAND E. Jr. (1980) - *Bacterial Chemotaxis as a model Behavioral System*, Raven Press, New York.

[6] Si veda per esempio: LEWIN B. (1983) - *Genes*, Wiley, New York. Pag. 441-443.

[7] JACOB F., BRENNER S. e CUZIN F. (1963) - *On the regulation of* DNA *replication in bacteria*, « Cold Spring Harbor Quant. Biol. », *28*, 239.

[8] Si veda per esempio: LEWIN B., citato in [6], pag. 143-145.

[9] Si veda per altro il recente volume: NANNINGA N. ed. (1985) - *Molecular Cytology of* Escherichia coli, Academic Press, London.

[10] AGENO M., SALVATORE A.M. e VALLERANI D. - *Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », *80* (4), (aprile 1986).

[11] AGENO M., BENINI M. e MATRICCCIANI M.A. - *Fattori limitanti la crescita batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », in questo fascicolo.

[12] MONOD J., WYMAN J. e CHANGEUX J.P. (1965) - *On the nature of allosteric transitions: A plausible model* « J. Mol. Biol. », *12*, 88. KOSHLAND D.E., NEMETHY G. e PILMER D. (1966) - *Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits*, « Biochemistry », *5*, 365. Vedi anche: SAVAGEAU M.A. (1976) - *Biochemical System Analysis*, Addison-Wesley Reading Mass. pag. 66 sgg.

[13] MANDELSTAM J. *et al.*, citato in [4], pag. 88 sg.

[14] GUTFREUND H. (1972) - *Enzymes: Physical Principles*, Wiley, London, pag. 138 sg. WALSH C. (1979) - *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco, pag. 224-228.