

Il contributo di Victor Henri alla nascita della cinetica enzimatica

di Paolo Parenti, Università di Milano-Bicocca

Introduzione

Gli scienziati moderni, talvolta, non amano occuparsi degli aspetti storici legati al soggetto della loro ricerca o delle loro lezioni, ma altri sostengono che questo atteggiamento andrebbe scoraggiato. E questo per almeno tre valide ragioni. La prima è che gli aspetti storici sono intrinsecamente coinvolgenti e forniscono ai docenti uno strumento importante per stimolare l'interesse dei loro allievi per la scienza. La seconda è che la nostra conoscenza di certi argomenti scientifici diventa più profonda se intrisa di alcuni elementi storici. In terzo luogo, la lettura della storia delle scoperte scientifiche ci illumina molto di più di qualsiasi altra tecnica su cosa sia il metodo scientifico.

Nello studio della storia della scienza ci si può render conto di come, spesso, le scoperte scientifiche siano inizialmente trattate con sospetto e incredulità oppure addirittura ignorate dai contemporanei. In molti casi, questi comportamenti hanno portato ad attribuire la paternità di idee e concetti a persone di consolidata reputazione sebbene queste non siano stati gli originali proponenti. La dimensione di questo fenomeno nelle scienze chimiche, fisiche e biologiche è stata riportata in alcune recenti pubblicazioni (de Levie, 2000; Andraos, 2005). Nella storia della biochimica un esempio di incorretta attribuzione di scoperta scientifica e di priorità concettuale è rappresentata dalla *equazione (o teoria) di Michaelis-Menten*. Numerosi documenti scientifici possono essere prodotti a sostegno del fatto che il credito dato a Michaelis e Menten come primi scopritori della relazione iperbolica tra velocità di una reazione enzimatica e concentrazione del substrato è completamente immeritato. A Michaelis e Menten si deve senz'altro il merito di aver perfezionato un'idea originale che fu di Victor Henri, ossia quella di derivare un'equazione di velocità basata sulla formazione di un complesso reversibile tra enzima e substrato. Essi, pur fornendo un metodo semplice per il calcolo della costante di dissociazione del complesso e forse per questo riuscendo a far comprendere più concretamente al mondo scientifico del tempo che l'equazione di velocità derivata sull'ipotesi dell'equilibrio chimico tra enzima e substrato era in grado di spiegare in modo razionale il comportamento cinetico di un enzima, non furono loro i primi a derivarla né a enunciarne il principio teorico su cui poggiava.

Origini della “equazione di Michaelis-Menten”

Prima della fine del XIX secolo erano note circa due dozzine di principi cataliticamente attivi, identificati sulla base dello specifico substrato trasformato. Tuttavia, dopo la scoperta di Eduard

Buchner (1860-1917) e del fratello Hans (1850-1902) sulla possibilità di riprodurre la fermentazione alcolica senza le cellule di lievito (Buchner, 1897), le ricerche nel campo dell'enzimologia subirono un'impennata, tanto che nel 1900 Carl Oppenheimer (1874-1941) fu in grado di elencare oltre 1300 pubblicazioni specifiche. Pochissimi autori, tuttavia, si erano dedicati agli aspetti cinetici delle reazioni catalizzate dagli enzimi.

I primi autori che affrontarono studi di cinetica enzimatica furono nel 1878 Max Barth (1855-1899) e nel 1883 Pierre Émile Duclaux (1840-1904), il direttore dell'Istituto Pasteur dal 1895 al 1904. Essi notarono che in presenza di dosi crescenti di saccarosio, ma di quantità fisse di invertasi (l'attuale saccarasi), la quantità di prodotto formato dopo un certo tempo non era proporzionale alla concentrazione iniziale di saccarosio. La scelta dell'invertasi come modello di studio delle reazioni enzimatiche non era casuale. Infatti, per merito degli studi di Ludwig Ferdinand Wilhelmy (1812-1864) la reazione di idrolisi del saccarosio era molto popolare tra gli studiosi di cinetica. Wilhelmy, analizzando la reazione in ambiente acido, aveva dimostrato che questa poteva essere seguita agevolmente mediante un polarimetro senza disturbarne il decorso. Tra l'altro questa tecnica gli permise di formulare nel 1850 l'equazione di velocità per le reazioni di primo ordine, il primo pilastro della moderna cinetica chimica.

Duclaux riprese i propri studi di cinetica enzimatica dieci anni dopo le prime esperienze e pubblicò sul finire del secolo (1898) un lavoro scientifico nel quale concludeva che la velocità di formazione dei prodotti nel corso della reazione enzimatica era, nel periodo iniziale, indipendente dai reagenti, ossia era costante. La diminuzione della velocità osservata a tempi più lunghi era dovuta, secondo Duclaux, ad una potente azione inibitoria da parte dei prodotti. Egli elaborò un'equazione empirica che aveva la seguente forma:

$$\frac{d[P]}{dt} = K - K_i \frac{[P]}{[S]_0} \quad (1)$$

dove K e K_i sono due costanti e $[S]_0$ e $[P]$ sono le concentrazioni di substrato iniziale e di prodotto.

Grazie ai progressi della cinetica chimica era ragionevole, a chi si occupava di enzimi, cominciare a chiedersi se alle reazioni promosse da tali enzimi potessero essere applicate le stesse leggi della chimica generale. Probabilmente i primi a muoversi in questa direzione furono Cornelius O'Sullivan (1842-1907) e Frederick William Thompson (1859-1930) che nel 1890 pubblicarono uno studio dettagliato sull'invertasi. Utilizzando il polarimetro eseguirono precise misure di velocità di catalisi ed esaminarono l'effetto di vari fattori che ne influenzano il decorso (quantità di enzima, temperatura, acidità del mezzo). Tuttavia, forse anche per il fatto che nello studio mancavano esperimenti circa l'effetto della concentrazione di saccarosio, O'Sullivan e Thompson arrivarono a con-

clusioni erranee: la reazione dell'invertasi fu ritenuta unimolecolare, cioè indipendente dalla quantità di enzima. Pertanto, secondo questi ricercatori, essa poteva essere adeguatamente descritta dalle comuni leggi della chimica generale ed era lecito applicare la relazione logaritmica:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - x} \quad (2)$$

dove k è la costante di velocità di primo ordine, t il tempo ed $[S]_0$ e $([S]_0 - x)$ le concentrazioni del substrato all'inizio e dopo un tempo t .

Gli esperimenti in funzione della concentrazione di substrato furono ripetuti due anni più tardi da James O'Sullivan (1855-1938), fratello di Cornelius. Tuttavia, sebbene i dati sperimentali mostravano una variazione della costante di velocità a diverse concentrazioni di saccarosio, i risultati non furono interpretati in modo corretto.

Nel frattempo, il chimico russo-tedesco Friedrich Wilhelm Ostwald (1853-1932) aveva intrapreso uno studio rigoroso sul fenomeno della catalisi, estendendo le sue ricerche a tutti i tipi di catalizzatori, inclusi gli enzimi (Ostwald, 1894). Le sue conclusioni si rivelarono fondamentali per la comprensione e la traduzione chimico-fisica del fenomeno catalitico. Secondo la definizione di Ostwald "l'azione catalitica consiste nella modificazione, da parte della sostanza che la promuove, il catalizzatore, della velocità alla quale la reazione avviene, senza che la sostanza sia parte dei prodotti della reazione". Lo sviluppo razionale del concetto di catalisi proposto da Ostwald fu assolutamente dipendente, come da lui stesso riconosciuto, dalla definizione del concetto di velocità di reazione chimica, così come era stato formulato da Wilhelmy.

Gustav Tammann (1861-1938), lavorando sull'emulsina (l'attuale fucosidasi), era convinto che la reazione non seguisse l'andamento logaritmico delle reazioni monomolecolari, tuttavia non riuscì ad elaborare un'equazione di velocità, poiché giudicava il problema troppo complesso (Tammann, 1895). Vari autori che cercarono di studiare la dipendenza della velocità dalla concentrazione di substrato ottennero risultati contrastanti, a volte in accordo e a volte in disaccordo con la legge di azione di massa delle reazioni monomolecolari. Tra gli altri, è da ricordare il contributo di Adrian John Brown (1852-1919), professore di *Malting and Brewing* all'Università di Birmingham dal 1900 al 1919. Studiando la fermentazione del saccarosio con il lievito *in toto*, Brown concluse che la velocità della reazione era indipendente dalla concentrazione di saccarosio (1892). Ciò sembrava ragionevole alla luce del fatto che la scissione del saccarosio era causata da un "fermento non-

organizzato”, al contrario della fermentazione alcolica che richiedeva cellule viventi¹. Tuttavia, dopo la scoperta dei fratelli Buchner, Brown avvertì l’esigenza di rivedere i suoi dati e nel 1902 riconsiderò il lavoro intrapreso dieci anni prima, studiando il processo catalitico con estratti cellulari. I risultati furono pubblicati in un celebre articolo il cui titolo è tra i più brevi di tutta la letteratura scientifica, *Enzyme action* (Brown, 1902). Il comportamento della reazione a differenti concentrazioni di saccarosio suggerì a Brown l’interpretazione corretta. Propose, infatti, che durante la reazione si dovesse formare un complesso enzima-substrato e che, pertanto, la necessità di passare attraverso un tale complesso ponesse un limite al procedere della reazione, poiché esso non poteva scindersi a velocità infinita per dare i prodotti. Anche Edward Frankland Armstrong (1878-1945), allievo di Fischer, sostenne tale teoria, proponendo che il complesso enzima-substrato fosse il “complesso attivato” (Armstrong, 1904). Tuttavia, malgrado queste idee fossero in accordo con la visione corrente del meccanismo d’azione degli enzimi, si trattava sempre di valutazioni qualitative. Nessuno di questi ricercatori provò a tradurre queste osservazioni sperimentali in un’equazione di velocità che tenesse conto della legge di azione di massa².

La prima equazione di velocità basata sul meccanismo proposto da Brown fu quella derivata dal neurobiologo e chimico-fisico Victor Henri (1872-1940). Questi, dopo alcuni anni spesi in studi di psicologia e neurobiologia (Nicolas, 1994), comincia ad interessarsi di vari aspetti di chimica fisica. Egli è convinto che non si possa comprendere a fondo i fenomeni biologici se non attraverso uno studio approfondito delle interazioni molecolari. Dal 1894 al 1896 lavora sulla catalisi nel prestigioso laboratorio di Ostwald a Lipsia e si trasferisce in seguito nel Laboratorio di Fisiologia Sperimentale dell’Università La Sorbonne, a Parigi. Si dedica, da subito, allo studio degli enzimi (che, come molti suoi contemporanei, chiama ancora fermenti), principalmente invertasi, amilasi e maltasi. Pubblica tutti i dettagli dei risultati dei suoi esperimenti in un’ampia monografia di 129 pagine, intitolata *Lois générales de l’action des diastases* (Henri, 1903). Successivamente divulga gli aspetti essenziali delle leggi generali da lui ricavate sull’azione catalitica degli enzimi in vari articoli scientifici sia in francese sia in tedesco (Henri 1904, 1905a, 1905b; Henri et al., 1904). Henri, basandosi sull’assunzione di Brown della formazione di un complesso reversibile tra enzima e substrato, è il primo, partendo da semplici equazioni, a ricavare la relazione matematica tra velocità i-

¹ Il termine di enzima coniato da Kuhne nel 1878 non era ancora entrato nell’uso comune e molti biochimici e fisiologi continuavano ad utilizzare il termine “fermento” distinguendo i “fermenti non organizzati”, gli attuali enzimi, dai “fermenti organizzati”, le cellule di lievito.

² La teoria basata sulla formazione di un complesso tra enzima e substrato non fu l’unica proposta nella storia dell’enzimologia. Hendrik Pieter Barendrecht (1871-?), stimolato dalla recente scoperta del fenomeno della radioattività, sostenne a più riprese che l’azione degli enzimi fosse mediata attraverso l’emissione di radiazioni. La teoria dell’azione a distanza, già avanzata nel 1896 dal chimico francese Nicolas Maurice Arthus (1862-1945), fu sviluppata da Barendrecht studiando l’azione dell’enzima ureasi. Secondo questa teoria “La radiazione, mediante la quale l’ureasi agisce sull’urea, viene emessa dalla molecola di enzima e può esercitare la sua azione idrolitica fino ad una certa distanza, probabilmente microscopica, sia con un raggio d’azione attorno all’enzima, sia forse in un dato momento solo in una certa direzione” (Barendrecht, 1920).

niziale di una reazione enzimatica e concentrazione di substrato. Egli formula una teoria generale sull'azione dell'enzima invertasi e la estende ad altri enzimi idrolitici, ponendo le basi della moderna cinetica enzimatica, come ricordato in una recente biografia (Debru, 1990). Henri dimostra sperimentalmente che: a) la velocità di reazione cresce con la concentrazione iniziale di substrato fino ad un valore massimo; b) l'aumento della velocità è direttamente proporzionale solo a valori bassi di concentrazione di substrato; c) la velocità è direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima; d) gli effetti osservati non sono dovuti a perdita di stabilità dell'enzima; e) il prodotto può avere un effetto inibitorio sulla velocità di reazione. Henri rappresenta una guida per molti studenti, alcuni dei quali proseguiranno gli studi di cinetica, e nel suo laboratorio si formerà il biochimico Emile François Terroine (1882-1974), secondo il quale "Victor Henri è la più originale e affascinante personalità scientifica che egli abbia mai incontrato" (Terroine, 1959).

Per motivi non chiari il mondo scientifico rimosse rapidamente il nome di Henri a favore di quelli di Michaelis e Menten, come persona a cui riconoscere la priorità intellettuale per la scoperta dell'equazione fondamentale della cinetica enzimatica. Questa situazione segnalata più volte negli ultimi cinquant'anni in vario articoli, libri e monografie (Segal, 1959; Segel, 1975; Friedman, 1981; de Levie, 2000; Kuhl, 2003; Andraos, 2005) non è riuscita, tuttavia, ad insinuare l'idea che fosse scorretto e ingiusto parlare di "equazione di Michaelis-Menten" o di "ipotesi di Michaelis-Menten". D'altra parte, come sottolineato da de Levie, "l'attribuzione del nome di una persona ad una determinata scoperta scientifica è talora un processo arbitrario, che prende corpo in un ambiente polarizzato da ambizioni personali e, forse, da pregiudizi di gruppo. Come la scienza anche l'assegnazione dei meriti scientifici è opera dell'uomo e soggetta alle stesse debolezze".

Al fine di far riemergere il contributo totalmente innovativo di Henri nel panorama scientifico del tempo è opportuno illustrare in dettaglio il cammino teorico, metodologico e deduttivo da lui percorso per arrivare alla derivazione dell'equazione di velocità. Riprenderemo i passi salienti della sua monografia e citeremo altri lavori pubblicati successivamente da lui e dai suoi allievi che confermano la teoria generale formulata nel 1903.

Ciò di cui Henri era alla ricerca era un'equazione di velocità in grado di soddisfare i dati cinetici e dalla quale si potesse calcolare la costante di velocità indipendentemente dalla concentrazione di enzima, da quella di substrato e dal tempo, e che, inoltre, fosse derivata da considerazioni teoriche che tenessero conto del meccanismo di reazione e della legge di azione di massa. Dopo aver dedicato ampio spazio alla descrizione dello stato dell'arte nella ricerca sull'azione degli enzimi agli inizi del XX secolo, discutendo criticamente tutti i lavori scientifici fino ad allora pubblicati sull'argomento da Duclaux a Brown, Henri descrive dettagliatamente i metodi utilizzati per la misura dell'attività enzimatica e riporta i risultati di tutti gli esperimenti da lui eseguiti sulla velocità di

idrolisi del saccarosio da parte della invertasi. Dapprima dimostra che l'enzima è stabile nelle condizioni di saggio e per tutta la durata degli esperimenti, poi misura l'effetto dei prodotti sul decorso della reazione, l'effetto della concentrazione iniziale di saccarosio e quello della concentrazione dell'enzima. Infine, formula una teoria e ne verifica sperimentalmente la validità non solo sulla saccarasi, ma anche su altri enzimi idrolitici. Riportiamo, traducendo il testo originale, le principali tappe del percorso così sinteticamente tracciato.

A pagina 54 della sua monografia Henri afferma: “La formula logaritmica così come la si ottiene per l'azione degli acidi sul saccarosio fornisce l'espressione della costante di idrolisi

$k = \frac{1}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]_0 - x}$. Quando si calcolano i valori di questa espressione per le diverse misure fatte du-

rante l'idrolisi prodotta dall'invertasi, ci si accorge che essa non rimane affatto costante, ma presenta un aumento crescente molto regolare.” Per rappresentare il decorso della reazione più fedelmente occorre ricavare un'equazione specifica. Henri si accorge che effettivamente l'equazione:

$$2K_i = \frac{1}{t} \log \frac{[S]_0 + x}{[S]_0 - x} \quad (3)$$

fornisce una migliore approssimazione, ma soffre di due forti controindicazioni: è puramente empirica e cambia quando si passa da una concentrazione di saccarosio ad un'altra³. Henri riconosce che “l'azione della concentrazione del saccarosio è dunque molto complessa e non assomiglia a quella prodotta dagli acidi”. Inoltre, mentre “nessuna relazione semplice [tra velocità e concentrazione di substrato] può essere ricavata dall'esame dei numerosi esperimenti condotti, esiste proporzionalità tra velocità d'idrolisi e quantità di enzima”.

La derivazione dell'equazione di velocità è descritta nel Capitolo III, intitolato *Teoria dell'azione dell'invertasi*, che occupa 16 delle 129 pagine del libro. Esso si apre con il riconoscimento ad Emil Fischer per i suoi studi sull'idrolisi degli zuccheri da parte della saccarasi. Secondo Henri, la conclusione di Fischer che l'enzima forma con le sostanze che deve trasformare un complesso chimico intermedio che poi si dissocia a ridare l'enzima originale è di fondamentale importanza per poter sviluppare una legge d'azione generale. Henri afferma (p. 86): “È dunque naturale cercare di spiegare l'azione della invertasi sul saccarosio supponendo che si formino complessi intermedi”. Inoltre, poiché era noto che il cosiddetto zucchero invertito (il prodotto d'idrolisi del saccarosio) esercitava un'azione ritardante sulla scissione del saccarosio, Henri ipotizza l'esistenza di una combinazione intermedia anche tra l'enzima e lo zucchero invertito, in particolare con il frutto-

³ L'equazione (3) è talvolta riportata in letteratura come equazione di Henri.

sio, come risultava dagli esperimenti riportati precedentemente. Che caratteristiche hanno le combinazioni ipotizzate da Henri? Ce lo spiega nei passi immediatamente successivi. Egli scrive (pp 86-87): “Nella classificazione generale delle azioni catalitiche sappiamo che si può ammettere la formazione di combinazioni intermedie complete, ma anche la formazione di combinazioni incomplete, caratterizzate dalla presenza di un certo stato di equilibrio tra il catalizzatore e le sostanze da trasformare. La prima ipotesi conduce ad un’equazione di velocità avente l’espressione $\frac{d[P]}{dt} = K$ e la

curva sarà pertanto una linea retta. Queste considerazioni teoriche ci conducono allora a supporre che le combinazioni intermedie tra l’enzima e il saccarosio, come quelle tra l’enzima e lo zucchero invertito siano incomplete e diano luogo a stati di equilibrio. Infine, se noi ammettiamo che queste combinazioni siano incomplete, ne consegue che una certa quota di enzima rimarrà non combinata; due ipotesi sono allora possibili: 1) si potrà supporre che la parte di enzima non combinato agisca sul saccarosio e lo trasformi oppure 2) si potrà supporre che è il complesso tra enzima e saccarosio che si decompone e produce l’idrolisi del saccarosio. Quale dovrà essere la legge d’azione enzimatica se fossero valide entrambe le ipotesi che abbiamo indicato? Questa è la domanda a cui occorre dare subito una risposta.”

Henri prosegue la trattazione sviluppando gli aspetti matematici necessari al conseguimento di un’equazione di velocità basata sulle considerazioni teoriche sopra esposte. Scrive (pp. 87-91): “Supponiamo di aver una soluzione contenente la quantità $[S]_0$ di saccarosio a cui noi aggiungiamo la quantità $[E]_T$ di enzima: dopo un tempo pari a t minuti potremo osservare che nella soluzione sarà rimasta una certa quantità ($[S]_0 - [P]$) di saccarosio. Per le ipotesi fatte sopra supponiamo che l’enzima sia ripartito tra il saccarosio e lo zucchero invertito e che una parte rimanga non combinata. Sia dunque $[E]$ la concentrazione di enzima libero, $[ES]$ la concentrazione di enzima combinato con il saccarosio al tempo t , $[EP]$ la concentrazione di enzima combinato con lo zucchero invertito e $[P]$ la concentrazione di zucchero invertito⁴. Supponiamo, infine, che queste combinazioni presentino degli stati d’equilibrio ossia che seguano la legge di azione di massa. Possiamo procedere scrivendo le equazioni che esprimono le condizioni di equilibrio. L’equilibrio tra l’enzima e il saccarosio è regolato dalla seguente equazione:

⁴ La simbologia utilizzata da Henri non è quella indicata qui, la quale vuole far uso dei caratteri convenzionalmente impiegati nella trattazione cinetica moderna. Henri utilizzò i seguenti simboli: a , Φ , $a-x$, x , X , z , y , m ed n per indicare rispettivamente la concentrazione di saccarosio, la concentrazione di enzima totale, la concentrazione di saccarosio al tempo t , la concentrazione dello zucchero invertito, la concentrazione dell’enzima libero, la concentrazione del complesso enzima-saccarosio, la concentrazione del complesso enzima-zucchero invertito, la costante di associazione del complesso enzima-saccarosio e la costante di associazione del complesso enzima- zucchero invertito.

$$K_1 = \frac{[ES]}{[E] \cdot ([S]_0 - [P])} \quad (4)$$

L'equilibrio tra l'enzima e lo zucchero invertito è governato dalla seguente equazione:

$$K_2 = \frac{[EP]}{[E] \cdot [P]} \quad (5)$$

dove K_1 e K_2 sono due costanti equilibrio⁵; infine, scriviamo anche l'equazione di conservazione dell'enzima totale, E_T :

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EP] \quad (6)$$

Queste tre equazioni permettono di calcolare la quantità incognita di enzima non combinato e quella del complesso tra il saccarosio e l'enzima. In effetti, si ha:

$$[E] = \frac{[E]_T}{1 + K_1 ([S]_0 - [P]) + K_2 [P]} \quad (7)$$

e:

$$[ES] = \frac{K_1 [E]_T ([S]_0 - [P])}{1 + K_1 ([S]_0 - [P]) + K_2 [P]} \quad (8)$$

Stabilito questo, esaminiamo quale dovrà essere la velocità di idrolisi al momento t , a seconda che noi ammettiamo che sia l'enzima libero che agisce sul saccarosio oppure che sia il complesso che si decompone. Nella prima ipotesi la velocità è proporzionale alla concentrazione di enzima libero e alla concentrazione di saccarosio, sarà dunque proporzionale a $[E]$ e a $[S_0 - P]$, di conseguenza al prodotto di questi valori. Dunque:

$$\frac{d[P]}{dt} = K [E] ([S]_0 - [P]) \quad (9)$$

⁵ Da notare che Henri utilizza le costanti di associazione.

ossia sostituendo $[E]$ per il suo corrispondente valore definito dalla (7) si ottiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{K[E]_t ([S]_0 - [P])}{1 + K_1 ([S]_0 - [P]) + K_2 [P]} \quad (10)$$

Nella seconda ipotesi la velocità di formazione del prodotto è proporzionale alla concentrazione del complesso ES . Pertanto, sostituendo la (8) nell'equazione $\frac{d[P]}{dt} = K \cdot [ES]$ si ottiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{K \cdot K_1 [E]_t ([S]_0 - [P])}{1 + K_1 ([S]_0 - [P]) + K_2 [P]} \quad (11)$$

Queste due espressioni della velocità date dalla (10) e dalla (11) sono identiche tra loro, di conseguenza, qualunque sia l'ipotesi che è stata fatta, la legge secondo la quale si produce l'idrolisi del saccarosio sarà la stessa. Questo risultato presenta un interesse da un punto di vista della chimica generale, ma non mi fermerò qui. Dunque, la velocità della reazione ha per espressione:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{K_3 ([S]_0 - [P])}{1 + K_1 ([S]_0 - [P]) + K_2 [P]} \quad (12)$$

dove K_3 è una costante proporzionale alla concentrazione di enzima; K_1 e K_2 sono due costanti caratteristiche che potranno variare con il mezzo e la temperatura, ma che, una volta determinate, dovranno dare per K_3 lo stesso valore, qualunque sia la concentrazione di saccarosio o di zucchero invertito.

Se, all'inizio della reazione, noi abbiamo una miscela S_i di saccarosio e I di zucchero invertito, la velocità al momento t avrà per espressione:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{K_3 ([S]_i - [P])}{1 + K_1 ([S]_i - [P]) + K_2 ([P] + [I])} \quad (13)$$

Si può discutere la forma generale dell'azione della saccarasi servendosi dell'equazione (12) oppure della (13).

Consideriamo il caso in cui all'inizio noi abbiamo solamente del saccarosio e studiamo la velocità iniziale; questa velocità si ottiene evidentemente ponendo nell'espressione (12) $[P] = 0$. Pertanto:

$$\text{velocità iniziale}^6 = \frac{K_3 [S]_0}{1 + K_1 [S]_0} \quad (14)$$

Da ciò si vede che quando la concentrazione del saccarosio è molto bassa, il termine $K_1[S]_0$ diventa trascurabile rispetto ad 1 e la velocità è proporzionale alla concentrazione di saccarosio, ma, all'aumentare di questo, la velocità cresce prima rapidamente e poi più lentamente, in modo che quando il termine $K_1[S]_0$ è molto maggiore di 1, la velocità iniziale diventa approssimabile a $\frac{K_3 [S]_0}{K_1 [S]_0}$, ossia $\frac{K_3}{K_1}$, una costante, qualsiasi sia la concentrazione di saccarosio. Dunque per le soluzioni diluite la velocità di idrolisi è influenzata dalla quantità di saccarosio e per le soluzioni più concentrate essa è in pratica indipendente. Graficamente la relazione tra la concentrazione di saccarosio e la velocità iniziale è rappresentata da un'iperbole passante per l'origine e avente un asintoto parallelo all'asse delle x e ad una distanza pari a K_3 .” (In realtà, Henri avrebbe dovuto usare il termine “proporzionale” anziché “pari” oppure come aveva detto più sopra, scrivere che l'asintoto è posto alla distanza $\frac{K_3}{K_1}$).

La parte conclusiva del capitolo è dedicata al metodo per la determinazione sperimentale della costante K_3 . Henri ricava un'espressione di K_3 integrando la (12):

$$K_3 = \frac{[S]_0}{t} \left[(K_1 - K_2) \frac{[P]}{[S]_0} + K_2 \log \frac{[S]_0}{([S]_0 - [P])} \right] + \frac{1}{t} \log \frac{[S]_0}{([S]_0 - [P])} \quad (15)$$

e verifica sperimentalmente che il valore di questa grandezza si mantiene costante attribuendo valori arbitrari alle altre due costanti K_1 e K_2 . La (15) può essere riscritta mettendo in evidenza il tempo, una forma utilizzata da vari autori successivi (ad esempio, van Slyke e Cullen):

⁶ Utilizzando la simbologia di Henri questa equazione è scritta come:

vitesse initiale = $\frac{K_3 a}{1 + ma}$. Questa è la forma con cui compare in tutte le pubblicazioni successive, incluse quelle dei suoi allievi. La costante K_3 è talora indicata come K_2 o semplicemente K .

$$t = \frac{1}{K_3} \left[(1 + K_2 [S]_0) \log \frac{[S]_0}{([S]_0 - [P])} + (K_1 - K_2)[P] \right] \quad (16)$$

Henri non intuisce che utilizzando l'equazione della velocità iniziale ha in mano uno strumento per arrivare agevolmente ad una stima della costante di equilibrio K_1 : non si rende conto che il reciproco del suo valore corrisponde alla concentrazione di substrato in grado di produrre la metà della velocità asintotica. Da lì potrebbe poi arrivare a stimare K_3 . Per arrivare a tanto occorre attendere il contributo di Michaelis e Menten. Il merito di questi autori sta proprio in questo: nell'aver saputo fornire una nuova espressione dell'equazione della velocità iniziale, dalla quale era agevole elaborare un metodo semplice per la stima dei parametri cinetici, quelli che noi oggi chiamiamo K_m e V_{\max} e che nell'espressione di Henri sono equivalenti rispettivamente a $1/K_1$ e K_3/K_1 .

L'equazione (14) comparirà in almeno altre quattro pubblicazioni firmate da Henri. In un interessante articolo riassuntivo scritto in tedesco (Henri, 1905b) è anche proposta una rappresentazione grafica dell'equazione di velocità, da cui si evince, tuttavia, una scarsa attenzione da parte di Henri al rigore matematico (Fig. 1). La Figura rappresenta chiaramente un'iperbole, come già descritto da Henri, ed è anche la prima rappresentazione di quella che molti oggi indicano come iperbole (o curva) di Michaelis-Menten. Il testo che l'accompagna riprende i concetti generali già espressi altrove. Scrive Henri: "Se la concentrazione del substrato, sotto l'influenza dell'enzima, cambia, è alterata, si può osservare che la velocità della reazione cambia per effetto di una legge molto particolare, e questa legge ha un significato generale e si dimostrata valida per tutti gli enzimi finora esaminati. Indicando con AG la velocità iniziale (in tedesco *anfangsgeschwindigkeit*, ndt) di una reazione enzimatica, si ha la seguente relazione:

$$AG = \frac{K_2 a}{1 + ma} \quad (17)$$

dove K_2 e m sono due costanti, di cui m è una costante specifica dell'enzima. Questa legge generale ci mostra che per una bassa concentrazione (ad esempio 0.1 n) la velocità è proporzionale alla concentrazione, mentre per concentrazioni maggiori è quasi interamente indipendente da essa. Graficamente questa relazione può essere illustrata dalla curva mostrata in Figura 270. In questa curva, quando un determinato valore di a viene utilizzato, sulle ordinate si trova il corrispondente valore di velocità iniziale per una concentrazione costante di enzima. La complessa teoria su cui poggiano questi risultati delle reazioni enzimatiche è stata affrontata già da alcuni anni dall'autore; ne verrà

fatta qui di seguito breve menzione.” Il testo prosegue riproponendo la dimostrazione dell'equazione di velocità come già esposto più sopra nella monografia.

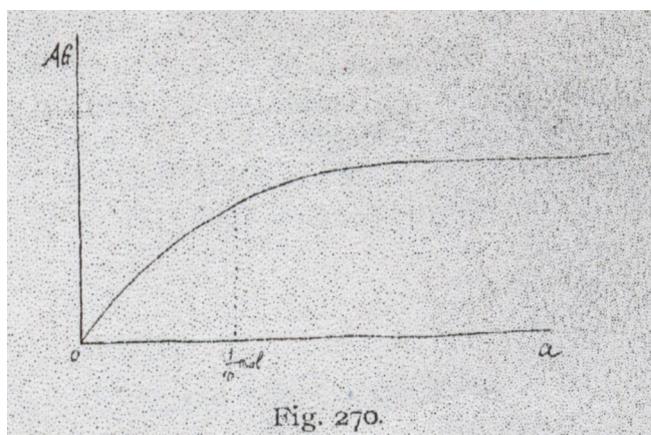


Fig.1. Prima rappresentazione grafica dell'equazione di Henri della velocità iniziale. Riprodotta da *Gesetze der enzymwirkung und heterogene katalyse* di Victor Henri pubblicato su *Zeitschrift für Elektrochemie* vol. 11 (1905) p.791.

L'equazione (17) compare anche in uno studio sulla cinetica della maltasi condotto dall'allievo Terroine (1904). È riportata e discussa nei rendiconti della Société Française de Physique (Anonimo, 1905) e anche nei rendiconti dall'Accademia delle Scienze di Parigi (Commission Prix Philipeaux, 1905).

Nel 1908, un altro componente del gruppo di fisiologia sperimentale della Sorbona, M.lle Catherine Philoche, pubblica, sotto la guida di Henri, un ampio lavoro di tesi sulla cinetica della maltasi in cui si confermano i risultati del maestro. Il testo si articola in vari capitoli, seguendo uno schema simile a quello adottato da Henri nella sua monografia, con la differenza che Philoche arricchisce i propri risultati con un certo numero di grafici, del tutto assenti nel testo di Henri. Particolarmente interessante a fini storici il capitolo XI (Philoche, 1908), dove, oltre alla riproposizione dell'equazione (17) si include una buona rappresentazione grafica della stessa (Fig. 2). È questa la seconda volta che viene rappresentata graficamente l'iperbole definita dall'equazione della velocità iniziale. Secondo Philoche “la relazione tra la concentrazione di amido, di glicogeno e di maltosio e la loro velocità d'idrolisi si può tradurre in modo del tutto generale attraverso questa curva”.

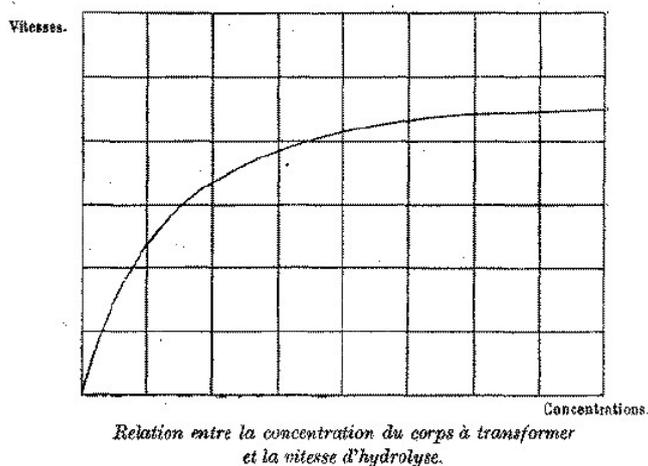


Fig. 2. Relazione tra concentrazione degli zuccheri (vedi testo) e velocità iniziale come rappresentata da Philoche (1908),

I risultati di Henri furono severamente criticati da Claude Silbert Hudson (1881-1952), il quale mise in evidenza la presenza di un errore metodologico compiuto dal francese, ossia quello di non aver aspettato che la mutarotazione fosse completa prima di raccogliere le misure al polarimetro dell'avvenuta reazione idrolitica del saccarosio. Poiché, infatti, la rotazione ottica del glucosio liberato nella reazione continua a diminuire, producendo una variazione nella stessa direzione dell'idrolisi, un incremento progressivamente più ampio si aggiunge alla velocità apparente di idrolisi man mano che la reazione procede e la concentrazione del glucosio liberato cresce. Così la costante di velocità di primo ordine può sembrare aumentare nel corso della reazione, anche se di fatto la velocità di idrolisi segue una funzione logaritmica. Ripetendo gli esperimenti di Henri, utilizzando la metodica di O'Sullivan e Tompson, Hudson (1908) mostrò che i risultati venivano meglio interpretati secondo l'ipotesi di questi ultimi. L'anno dopo, il chimico svedese Søren Peter Lauriz Sørensen (1868-1939) diede un ulteriore contributo allo studio della cinetica enzimatica valutando l'effetto del pH. Sørensen (1909) osservò che, al diminuire del pH, si verificava un progressivo incremento della costante di velocità di primo ordine e quindi evidenziò come gli esperimenti di Henri, condotti in acqua distillata, non potevano essere confrontati direttamente con quelli di O'Sullivan e Tompson e di Hudson, condotti in ambiente acido.

In quegli anni compaiono anche numerosi lavori di cinetica condotti utilizzando enzimi proteolitici, quali tripsina e pepsina. Prima gli studi di Thorburn Brailsford Robertson (1884-1930) e poi quelli di E.H. Walters, entrambi del Laboratorio di Fisiologia Rudolf Spreckels dell'Università della California, confermano che la reazione d'idrolisi da parte delle proteasi è adeguatamente descritta dall'equazione valida per le reazioni monomolecolari ossia dalla (2) (Brailsford Robertson, 1907; Walters, 1912). Intanto, il fisiologo sir Charles Arthur Lovatt Evans (1884-1968) studia

l'azione della catalasi e introduce per la prima volta il termine "substrato" per indicare la sostanza su cui l'enzima agisce complessandosi con esso come suggerito da Brown (Evans, 1907).

La questione cinetica fu ripresa in modo rigoroso nel 1913 dal biochimico berlinese Leonor Michaelis (1875-1949), uno scienziato eclettico e molto produttivo, autore di oltre 500 articoli, spesso pubblicati con i propri allievi come coautori. Nel 1910 era arrivata nel suo laboratorio una nuova dottoranda, Maude Leonora Menten (1879-1960) con la quale si mise al lavoro per ripetere gli esperimenti di cinetica dell'invertasi. I risultati dei loro studi portarono alla pubblicazione di un articolo passato alla storia come uno dei pilastri della moderna cinetica enzimatica (Michaelis e Menten, 1913). Il loro contributo, sebbene di grande valore sotto l'aspetto metodologico, non aveva in realtà quasi nulla di innovativo. Infatti, nell'introduzione al loro articolo Michaelis e Menten riconoscono chiaramente a Henri il merito di essere arrivato per primo "con successo ad un concetto razionale della natura dell'azione enzimatica portando alla formulazione matematica del decorso della reazione, che soddisfa piuttosto bene i fatti in molti suoi aspetti". Specificarono che, pertanto, il loro lavoro doveva essere considerato come un'estensione di quello di Henri. Essi avevano compreso che l'approccio di Henri nell'affrontare il problema della cinetica enzimatica era stato corretto e che le critiche mosse da Hudson erano sì valide, ma non di tale rilevanza da modificare sostanzialmente le conclusioni a cui Henri era giunto. Michaelis e Menten furono estremamente corretti e non certo a loro va imputato il fatto che la storia abbia ad essi attribuito l'originalità della scoperta.

Proprio per rimuovere ogni dubbio circa gli aspetti metodologici, Michaelis e Menten ripeterono le misure di attività dell'invertasi in condizioni di pH controllato e tenendo conto della mutarotazione. Come atteso, assumendo condizioni di equilibrio tra enzima, substrato e complesso enzima substrato essi confermarono i risultati di Henri, derivando un'equazione di velocità formalmente identica a quella ottenuta dal francese dieci anni prima:

$$v = C[E]_r \frac{[S]}{[S] + k} \quad (18)$$

dove C e k sono due costanti. L'equazione, secondo Michaelis e Menten si può meglio rappresentare in forma relativa, ponendo $V = \frac{v}{C[E]_r}$ e quindi la (18) diventa:

$$V = \frac{[S]}{[S] + k} \quad (19)$$

Come da essi stessi affermato, “quando la concentrazione di substrato diventa molto grande (rispetto a k) allora $V = 1$ ossia la velocità tende asintoticamente ad 1, la velocità massima possibile per una data concentrazione di enzima.” La costante k è la costante di dissociazione del complesso enzima-substrato ed è definita da Michaelis e Menten *costante di affinità*, poiché espressione della specifica affinità esistente tra l’enzima e il suo substrato. Secondo gli autori il metodo più semplice per ricavare il valore di k è quello di utilizzare una scala logaritmica:

$$V = \frac{10^S}{10^S + k} \quad (20)$$

Ponendo i dati su scala semilogaritmica, in corrispondenza dell’ordinata $V = \frac{1}{2}$ si ha il valore di $\log k$. Questo è il punto di flesso della curva e k rappresenta la concentrazione di substrato che fornisce il 50% della velocità massima (Fig. 3).

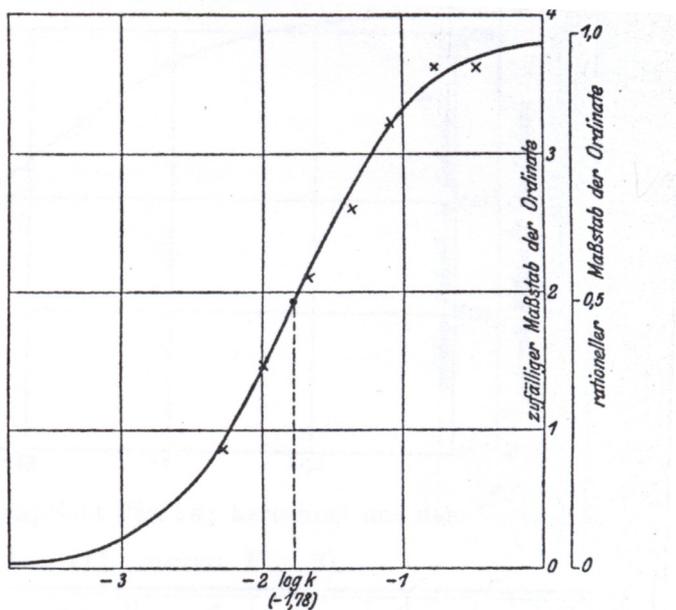


Fig. 3. Rappresentazione grafica dell’equazione della velocità iniziale secondo Michaelis e Menten (1913).

L’equazione (17) di Michaelis e Menten è formalmente identica a quella di Henri (14): è sufficiente dividere numeratore e denominatore della (14) per K_1 per ottenere la (17). Una semplice simulazione conferma che i dati sperimentali di velocità in funzione di concentrazioni crescenti di substrato forniscono stime identiche. Naturalmente il significato fisico dei parametri nelle due equazioni è diverso (Fig. 4).

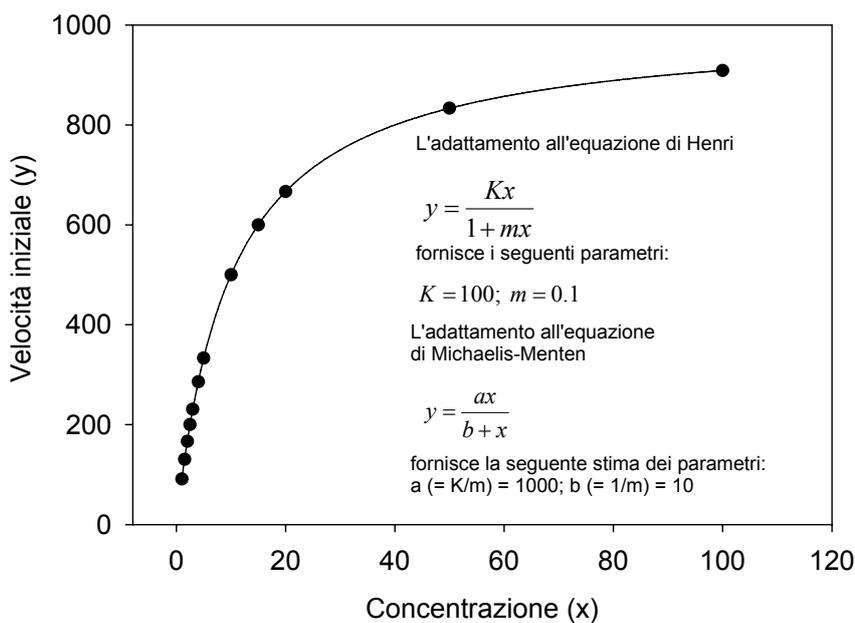


Fig. 4. Simulazione delle equazioni di Henri e di Michaelis-Menten.

Nel 1914 Donald Dexter van Slyke (1883-1971) e Glenn Ernest Cullen (1890-1940), apparentemente ignari del lavoro di Michaelis e Menten, ma non di quello di Henri, derivarono un'equazione di velocità formalmente identica a quella dei loro predecessori che ben interpretava i risultati dei loro esperimenti con l'ureasi (van Slyke e Cullen, 1914). Nelle loro conclusioni van Slyke e Cullen riconoscono il contributo innovativo di Henri e affermano: “Henri, il primo nel trovare con successo un'applicazione generale della legge d'azione di massa agli enzimi, arrivò attraverso un ragionamento in qualche misura diverso ad ottenere un'equazione praticamente identica alla nostra. Considerando l'enzima in costante equilibrio sia con il substrato sia con i prodotti e il processo di combinazione istantaneo, egli derivò l'equazione (16), dove K_1 e K_2 rappresentano rispettivamente le affinità dell'enzima per il substrato e i prodotti. Henri applicò con successo questa equazione all'invertasi e all'emulsina. Sebbene questi risultati siano stati criticati dalle accurate misure eseguite da Hudson, poiché Henri usò il polariscopio senza tener conto della mutarotazione del glucosio, esperimenti successivi confermano la generale applicabilità della legge da lui derivata.”

Nel sommario van Slyke e Cullen affermano che nel caso dell'ureasi “i dati sperimentali indicano che l'enzima demolisce l'urea in due reazioni successive: 1) combinazione dell'enzima con l'urea; 2) distruzione del complesso con liberazione dell'urea sotto forma di ammoniaca e anidride carbonica. Questo processo formulato in accordo con la legge di azione di massa conduce alla seguente equazione, che si è dimostrata reggere ottimamente la prova sperimentale:

$$t = \frac{1}{[E]_T} \frac{1}{k_1} \log \frac{[S]_0}{[S_0 - x]} + \frac{x}{k_2} \quad (21)$$

dove t è il tempo richiesto per la demolizione di una quantità x di substrato, il primo termine della sommatoria rappresenta il tempo consumato nel combinare l'enzima con il substrato e il secondo termine la porzione di tempo consumato nel decomporre il substrato", dove k_1 e k_2 le costanti di velocità di formazione del complesso enzima-substrato e di demolizione del complesso a dare i prodotti. Come riconosciuto dagli autori, questa equazione è formalmente identica a quella derivata da Henri nel caso particolare in cui il prodotto non abbia alcun effetto ritardante sulla velocità di reazione (in pratica quando il valore di K_2 della (16) è nullo)⁷. Sempre secondo il modello proposto da van Slyke e Cullen la formazione del complesso enzima-substrato sarebbe molto rapida e non all'equilibrio come nel modello di Henri. Il passo della reazione sarebbe dettato dalla più lenta reazione di decomposizione. Questa diversa situazione non è in contrasto con la teoria formulata da Henri, ma insito nelle proprietà catalitiche dell'ureasi. Infatti, tutti gli enzimi, secondo van Slyke e Cullen, agiscono secondo la legge d'azione di massa. L'equazione di velocità per l'ureasi derivata secondo queste assunzioni risulta essere:

$$\frac{dx}{dt} = [E]_T \frac{k_1 k_2 ([S]_0 - x)}{k_2 + k_1 ([S]_0 - x)} \quad (22)$$

dalla quale per integrazione si ottiene la (21) e che pertanto non è che un'altra variante dell'equazione di Henri (14).

Come mai, malgrado due prestigiosi biochimici del tempo, Leonor Michaelis dell'università di Berlino e Donald van Slyke del Rockefeller Institute di New York, giungendo alle stesse conclusioni, avessero chiaramente indicato che le basi per un'appropriata quantificazione del comportamento cinetico degli enzimi fossero state gettate da Henri, il contributo di quest'ultimo venne negli anni successivi completamente ignorato?

⁷ Le condizioni sperimentali scelte da van Slyke e Cullen per la misura dell'attività dell'ureasi furono impostate in modo tale che il prodotto non esplicasse il suo effetto inibitorio ossia in mezzo tamponato. Infatti, il carbonato d'ammonio prodotto durante la reazione tende ad alcalinizzare il mezzo deprimendo l'attività enzimatica.

Affermazione dell'equazione di Michaelis-Menten

Nonostante leggendo l'articolo di Michaelis e Menten si possa essere indotti a concludere che il problema cinetico dell'azione dell'invertasi fosse stato definitivamente chiuso, l'equazione di velocità sviluppata da Henri e perfezionata da Michaelis e Menten fa fatica ad affermarsi. Tra i più attivi studiosi di cinetica dell'invertasi di quel periodo figura senz'altro l'americano John Maurice Nelson (1876-1965), autore insieme ai suoi assistenti di numerosi articoli sull'argomento. Nell'introduzione di uno dei suoi primi lavori (Nelson and Vosburgh, 1917) ripercorre le tappe principali della storia della cinetica dell'invertasi da O'Sullivan e Tompson a Brown, da Henri a Michaelis e Menten, ma conclude: "È evidente dal resoconto appena esposto sulle opinioni dei precedenti investigatori, che hanno studiato la cinetica dell'azione dell'invertasi, che la sua vera natura è ancora una questione aperta, ed è desiderabile disporre di maggiori dati sperimentali". Nell'articolo Nelson non fa propria nessuna equazione in particolare, ma si limita ad affermare che i dati dei propri esperimenti sono in accordo con le seguenti conclusioni: "1) la velocità d'idrolisi è direttamente proporzionale alla concentrazione di invertasi; 2) la velocità è quasi indipendente dalla concentrazione di saccarosio in soluzioni concentrate, mentre in soluzioni diluite la velocità cresce con l'aumento della concentrazione del substrato e alla fine raggiunge un valore massimo; 3) i dati contraddicono chi sostiene che la cinetica dell'invertasi sia conforme alle reazioni unimolecolari". Nelson rappresenta graficamente i risultati delle sue misure utilizzando una scala lineare e sullo stesso grafico riporta, a sostegno delle sue conclusioni, anche i dati originali di Michaelis e Menten. I dati di velocità si adattano ad un'iperbole, crescono con la concentrazione di substrato fino ad un valore massimo. Malgrado questo rappresenti ciò che poi la storia chiamerà grafico di Michaelis-Menten, Nelson non interpola i dati secondo l'equazione di velocità da loro sviluppata.

Ancora nel 1921 Nelson e Hitchcock, in un altro articolo di cinetica, rilevando difformità di comportamento tra una preparazione di invertasi e un'altra affermano: "Se un'equazione generale per l'azione dell'invertasi normale fosse disponibile, sarebbe comparativamente agevole accertare dai dati sperimentali se una data preparazione sia normale o anormale". Pur essendo convinti che la reazione dell'invertasi non sia descritta dall'equazione delle reazioni unimolecolari (2), né l'equazione empirica di Henri (3), né quelle successive di Michaelis-Menten e van Slyke e Cullen (21) sembrano soddisfare Nelson, il quale propone una nuova equazione empirica in grado di descrivere in modo soddisfacente l'andamento nel tempo della reazione. Ancora una volta il problema dell'analisi cinetica dell'enzima viene spostata alla ricerca di un'equazione che possa interpolare i dati di formazione del prodotto nel tempo analizzando tutto il decorso della reazione e non, come

avevano sottolineato Michaelis e Menten, in modo più conveniente, limitando l'analisi alla velocità iniziale.

Anche l'eminente fisiologo inglese Sir William Maddock Bayliss (1860-1924), scopritore insieme a Ernest Henry Starling (1866-1927) del primo ormone, la secretina, è una personalità di rilievo nell'enzimologia di quel periodo, ma né le conclusioni di Henri né quelle di van Slyke e Cullen sembrano in grado di condurre ad un'equazione generale. Infatti, nella terza edizione della sua nota monografia, *The nature of the enzyme action* pubblicata nel 1919, relazionando sull'effetto della concentrazione del substrato afferma (p. 105): “Se la reazione procedesse in un sistema omogeneo attraverso la formazione di un complesso intermedio per azione di massa, ci si aspetterebbe che la velocità fosse direttamente proporzionale alla concentrazione di substrato, ma ciò in realtà succede solo in casi eccezionali. Nella maggioranza dei casi, la velocità, con una data quantità di enzima, è praticamente costante in un ampio intervallo di concentrazioni. Ciò è stato illustrato negli esperimenti di Frankland Armstrong con la lattasi, di cui si è già parlato, in quelli di van Slyke e Cullen [1914] sull'ureasi e in quelli di Nelson e Vosburgh [1917] sull'invertasi”. Stranamente, il testo non cita l'articolo di Michaelis e Menten, ma bisogna supporre che gli era probabilmente sfuggito, poiché la bibliografia riporta molti altri articoli di Michaelis.

Apparentemente il primo ad applicare in modo sistematico l'equazione così come derivata da Michaelis e Menten, utilizzandola per il calcolo delle affinità di diverse preparazioni di invertasi per vari substrati è il biochimico austriaco Richard Kuhn (1900-1967). Nel 1922, sotto la direzione di Richard Willstätter (premio nobel per la chimica nel 1915), ottiene il Ph.D. proprio su una tesi intitolata *Über Spezifität der Enzyme* (Sulla specificità degli enzimi), pubblicata su una rivista internazionale l'anno successivo (Kuhn, 1923).

È probabile che il lavoro di Kuhn abbia risvegliato gli animi di George Edward Briggs (1893-1985) e John Burdon Sanderson Haldane (1892-1964). In un breve articolo di sole due pagine passato alla storia con tanta enfasi quanto quello di Michaelis e Menten, Briggs e Haldane sviluppano una nuova teoria cinetica nella quale sia le limitazioni imposte dalle assunzioni di equilibrio sia quelle della irreversibilità potevano essere superate. Utilizzando un approccio non originale, ma prendendo spunto dalla teoria dello stato stazionario di Bodenstein (1913), Briggs e Haldane applicano la stessa teoria all'interazione enzima-substrato e derivano un'equazione di velocità. Ne risulta un'espressione formalmente identica a quella di Michaelis-Menten e di Van Slyke e Cullen (come da essi espressamente ammesso), ma già derivata prima ancora da Henri (qui del tutto ignorato). Tuttavia, l'equazione di Briggs e Haldane si dimostra più generale, in grado di contenere tutte le precedenti come casi particolari della stessa. L'equazione è pubblicata nella seguente forma:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{k_3 [E]_T ([S] - x)}{([S] - x) + \frac{k_2 + k_3}{k_1}} \quad (23)$$

dove k_1 , k_2 e k_3 sono, rispettivamente la costante di velocità di formazione del complesso enzima-substrato, la costante di velocità di scissione dello stesso complesso a ridare il substrato e quella di scissione a dare il prodotto. Perentoriamente essi concludono il loro articolo nel modo seguente. “Questa è l’equazione di Michaelis e Menten [1913] dove $(k_2 + k_3)/k_1$ rappresenta la loro costante K_s . Essi assumono che la reazione $E + S \rightleftharpoons ES$ sia sempre praticamente all’equilibrio e K_s la sua costante di equilibrio, ossia quando k_3 è trascurabile rispetto a k_2 . Van Slyke e Cullen [1914] d’altro canto assumono che il primo stadio della reazione sia irreversibile, ossia $k_2 = 0$, e arrivano alla stessa equazione.”

Quasi due anni più tardi Nelson e Larson (1927), apparentemente ignari del contributo di Briggs e Haldane, riconoscono che l’equazione di velocità (18) “rappresenta la relazione teorica, secondo l’ipotesi di Michaelis-Menten, tra la velocità d’idrolisi e la concentrazione di saccarosio originariamente presente nella soluzione.” Infatti, nell’introduzione essi avevano ammesso: “Michaelis-Menten furono tra i primi a offrire una spiegazione per questa particolare relazione tra la velocità d’idrolisi e la concentrazione di saccarosio”. Sebbene la frase possa far pensare che gli autori avessero in mente anche altri oltre a Michaelis e Menten e lo stesso Nelson avesse citato i lavori di Henri in precedenti articoli, qui lo scienziato francese non compare più nella bibliografia.

L’elemento che comportò la definitiva cancellazione di Henri come punto di svolta della storia della cinetica enzimatica fu probabilmente la pubblicazione, qualche anno più tardi, di un’influente monografia sugli enzimi di cui Haldane era l’unico autore (1930). Basata su un ciclo di lezioni che egli teneva fin dal 1923, nell’impostazione generale essa si rifaceva ai famosi testi di Bayliss, ma racchiudeva, con un’imponente serie di riferimenti bibliografici, tutti gli aspetti cinetici, catalitici e strutturali dei circa 28 enzimi allora noti. Di particolare interesse per il tema cinetico è il paragrafo a pagina 38 intitolato “Teoria di Michaelis”, dove Haldane enfatizza il ruolo fondamentale avuto da Michaelis e Menten nello sviluppare, a suo dire, “una teoria solo adombrata da Brown, Henri e altri”. Più avanti, ripercorrendo il ragionamento di Michaelis e Menten, introduce per la prima volta il termine K_m per indicare la costante di dissociazione del complesso enzima-substrato e la chiama *costante di Michaelis*. Lo stesso Michaelis, nella sua autobiografia (Michaelis et al., 1958) apprezzò molto questo riconoscimento tributatogli dagli inglesi. L’equazione di Michaelis riportata da Haldane ha quindi la forma che usualmente ritroviamo nei moderni testi di biochimica e precisamente:

$$v = \frac{Vx}{K_m + x} \quad (24)$$

Haldane commenta: “Rappresentata graficamente l’equazione fornisce un’iperbole rettangolare. La K_m è la concentrazione di substrato che produce metà della velocità limite. Abbiamo quindi due costanti per adattare i nostri dati, ma V dovrebbe essere (e di fatto lo è) proporzionale alla concentrazione di enzima, mentre K_m che è generalmente chiamata costante di Michaelis, è una caratteristica dell’enzima”.

Dei 624 riferimenti bibliografici riportati da Haldane nella sua monografia, che spaziano un arco di tempo che va dagli albori dell’enzimologia ai suoi tempi, ben 371 sono in lingua tedesca e quasi tutti degli inizi del ‘900, a significare come la scuola biochimica tedesca abbia avuto una profonda influenza in questo settore e, chissà, forse fu responsabile direttamente o indirettamente, con il sostegno dei biochimici inglesi, di aver oscurato il contributo e le idee innovative di Victor Henri.

Bibliografia

1. Andraos, J. 2005. Reaction intermediates in organic chemistry - The “big picture”. *Can. J. Chem.* 83: 1415-1431.
2. Anonimo. 1905. Société française de physique. Séance du 17 mars 1905. *Rev. Gen. Sci. Pur. Appl.* 16: 347-348.
3. Armstrong, E.F. 1904. Studies on enzyme action III. The influence of the products of change on the rate of change by sucroclastic enzymes. *Proc. Royal Soc.* 73: 516-526.
4. Barendrecht, H.P. 1920. L’uréase et la theorie de l’action des enzymes par rayonnement. *Rec. Trav. Chim.* 39: 2-87.
5. Barth, M. 1878. Zur Kenntnis des invertins. *Ber. Chem. Ges.* 11: 474-482.
6. Bodenstein, M. 1913. Eine theorie der photochemischen reaktionsgeschwindigkeiten. *Zeit. Phys. Chem.* 85: 329-397.
7. Brailsford Robertson, T. 1907. Studies in the chemistry of the ion-proteid compounds. IV.— On some chemical properties of casein and their possible relation to the chemical behavious of other protein bodies, with especial reference to hudrolysis of casein by tripsin. *J. Biol. Chem.* 2: 317-383.
8. Briggs, G.E., Haldane, J.B.S. 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* 19: 338-339.

9. Brown, A.J. 1892. Influence of oxygen and concentration on alcohol fermentation. *Trans. J. Chem. Soc.* 61: 369-385.
10. Brown, A.J. 1902. Enzyme action. *Trans. J. Chem. Soc.* 81: 373-388.
11. Buchner E (1897) Alkoholische Gahrung ohne Hefezellen. *Ber. Chem. Ges.* 30: 117-124.
12. Commission Prix Philipeaux. 1905. Seance du 18 décembre 1905. *Compt. Rend. Hebdom. Seances Acad. Sci.* 141: 1130-1131.
13. de Levie, R. 2000. What's in a name? *J. Chem. Ed.* 77: 610-613.
14. Debru, C. 1990. Victor Henri. In : Gillispie, Charles Coulston (ed.), *Dictionary of Scientific Biography*, Charles Scribner & Sons: New York, 1990, Vol. 18, Supplement II, 410-413.
15. Duclaux, E. 1883. *Microbiologie*. Paris, Masson.
16. Duclaux, E. 1898. Lois générales de l'action des diastases. *Ann. Inst. Pasteur Paris.* 12: 96-127.
17. Evans, Lovatt C.A. Sir. 1907. On the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by the catalase of blood. *Biochem. J.* 2: 133-155.
18. Fischer, E. 1894. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Ber. dt. Chem. Ges.* 27: 2985-2993.
19. Friedman, H.C. 1981. *Enzymes, Benchmark Papers in Biochemistry*. Hutchinson Ross, Stroudsburg, PA.
20. Haldane, J.B.S. 1930. *Enzymes*. Longman Green, London.
21. Henri, V. 1903. *Lois générales de l'action des diastases*. Hermann, Paris
22. Henri, V., M.lle Philoche, E.-F. Terroine. 1904a. Études sur la loi d'action de la maltase. *Compt. Rend. Hebdom. Seanc. Mem. Soc. Biol.* 56: 494-495.
23. Henri, V. 1904. *Recherches physico-chimique sur les diastases*. *Archivio di Fisiologia*, 1: 299-324.
24. Henri, V. 1905a. Gesetze der enzymwirkung und heterogene katalyse. *Zeit. Elektrochem.*, 11: 790-794.
25. Henri, V. 1905b. Théorie de l'action des diastases. *Compt. Rend. Hebdom. Seanc. Mem. Soc. Biol.*, 57: 610-613.
26. Hudson, C.S. 1908. Inversion of sucrose by invertase. *J. Am. Chem. Soc.* 30, 1160-1166.
27. Kühl, P.W. 2003. Renaming the Michaelis-Menten equation. *The Biochemist* 25: 6-7.

28. Kuhn, R. 1923. Über Spezifität der Enzyme. II Saccharase- und raffinasewirkung des invertins. *Zeit. Physiol. Chem.* 125: 28-92.
29. Michaelis, L., MacInnes, D.A., Granick, S. 1958. Leonor Michaelis. *Biograph. Mem. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 31: 282-321.
30. Michaelis, L., Menten, M.L. 1913. Zur kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49: 333-369.
31. Nelson, J.M., Hitchcock, D.I. 1921. The activity of adsorbed invertase. *J. Am. Chem. Soc.* 43: 1956-1961.
32. Nelson, J.M., Larson, H.W. 1927. Kinetics of invertase action. *J. Biol. Chem.* 73: 223 - 236
33. Nelson, J.M., Vosburgh, W.C. 1917. Kinetics of invertase action. *J. Am. Chem. Soc.* 39 : 790-811.
34. Nicolas, S. 1894. Qui était Victor Henri? *Année Psychol.* 94: 385-402.
35. O'Sullivan C., Tompson F.W. 1890. Invertase: a contribution to the history of an enzyme or unorganized ferment. *J. Chem. Soc. Trans.* 57, 834-931
36. Ostwald, W. 1894. Über die katalyse. *Z. Phys. Chem.* 15:705-706.
37. Philoche, C. 1908. Recherches physico-chimique sur l'amylase et la maltase. Chapitre XI. Discussion générales sur les loi d'action des diastases. *J. Chim. Phys.* 6: 400-423
38. Segal, H.L. 1959. The development of enzyme kinetics. In: *The enzymes* (PD Boyer, H Lardy, K Myrback, eds). Academic Press, New York, pp 1-47
39. Segel, I. 1975. *Enzyme kinetics*. John Wiley & Sons, New York.
40. Sørensen, S.P.L. 1909. Enzymstudien. II. Mitteilung. Über die messung und die bedeutung der wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen prozessen. *Biochem. Z.* 21: 131-304.
41. Tammann, G. 1885. Zur wirkung ungeformten fermente. *Z. Phys. Chem.* 18: 426-442.
42. Terroine, E.F. 1904. Étude sur la loi d'action de la malatse. Influence de la concentration du maltose. *Comp. Rend. Hebdom. Séances Acad. Sci.* 138: 778-779.
43. Terroine, E.F. 1959. Fifty-five years of union between biochemistry and physiology. *Ann. Rev. Biochem.* 28: 1-14.
44. van Slyke, D.D., Cullen, G.E. 1914. The mode of action of urease and of enzymes in general. *J. Biol. Chem.* 19: 141-180.
45. Walters, E.H. 1912. Studies in the action of trypsin. I. On the hydrolysis of casein by trypsin. *J. Biol. Chem.* 11: 267-230.