



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA DELL'AUTOMAZIONE

MODELLISTICA E CONTROLLO DI REAZIONI ENZIMATICHE

Laureando: Veronesi Giulio

Relatore: Prof. Picci Giorgio

Padova, 26 Aprile 2010

INDICE

INTRODUZIONE

1. CATALISI ENZIMATICA

- 1.1 NOMENCLATURA E CLASSIFICAZIONE
- 1.2 MECCANISMO DELLA CATALISI ENZIMATICA
- 1.3 UNITÀ DI MISURA DELL'ATTIVITÀ CATALITICA

2. CINETICA ENZIMATICA

- 2.1 LEGGE DI MICHAELIS-MENTEN
- 2.2 STIMA DELLE COSTANTI k_M E V_{MAX}
- 2.3 MINIMIZZAZIONE DEGLI ERRORI NELLA STIMA DELLE COSTANTI k_M E V_{MAX}

3. DERIVAZIONE DELLE EQUAZIONI DELLA VELOCITÀ DI REAZIONE IN CONDIZIONI DI EQUILIBRIO

4. CONTROLLO DI UNA REAZIONE ENZIMATICA

- 4.1 CONTROLLO A LIVELLO DELLE QUANTITÀ DI SUBSTRATO, ENZIMA E FLUSSO DI ALIMENTAZIONE-ESTRAZIONE
- 4.2 CONTROLLO A LIVELLO DELL'ENZIMA: INIBIZIONE E REGOLAZIONE ALLOSTERICA

APPENDICE: CINETICA CHIMICA

- A.1 REAZIONI DEL I° ORDINE
- A.2 REAZIONI DEL II° ORDINE
- A.3 DETERMINAZIONE DELL'ORDINE DELLA REAZIONE
- A.4 REAZIONI REVERSIBILI
- A.5 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI IN REAZIONI DEL I° ORDINE

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

L'*enzimologia*, la disciplina della biochimica che si occupa degli enzimi, è soggetta a continui e rapidi progressi.

Si ritiene che la nascita di questo settore scientifico sia stata nel 1926 con il futuro premio Nobel J. Sumner, artefice della cristallizzazione in laboratorio dell'ureasi (l'enzima che scinde l'urea in ammoniaca ed anidride carbonica), anche se già da molto tempo i processi biologici catalizzati dagli enzimi erano oggetto di interesse da parte della comunità scientifica.

Agli albori dell'umanità, gli uomini primitivi, trovandosi nella necessità di conservare il più a lungo possibile il latte, cominciarono a produrre latticini utilizzando una proteina estratta dallo stomaco dei vitelli: si trattava del caglio, un enzima identificato migliaia d'anni dopo.

Nel corso dei secoli, vari processi enzimatici, come la digestione della carne ad opera dei succhi gastrici o la conversione di amido in zucchero grazie alla saliva, erano del tutto noti, anche se non si conosceva il meccanismo per il quale questi eventi avessero luogo.

Fu L. Pasteur nel XIX secolo il primo che tentò di spiegare questi processi suggerendo che fossero causati dalla presenza di certe entità, da lui chiamate *fermenti*, contenute all'interno delle cellule del lievito.

In seguito, il fisiologo W. Kühne riprendendo gli studi di Pasteur, nel 1878 coniò il termine *enzima*, basandosi sul suo significato greco "all'interno del lievito".

Prima della definitiva consacrazione con Sumner, grossi passi in avanti furono portati dagli studi nel primo quarto dello scorso secolo di Henry, Menten, Michaelis, Briggs, Haldane ed in particolare di R. Willstätter, premio Nobel che sostenne e dimostrò la natura proteica degli enzimi.

Nell'ultimo decennio in molti settori ha preso piede la convinzione che la catalisi enzimatica possa essere utilizzata con profitto in svariati campi di

applicazione: dalle scienze biomediche al comparto agro-alimentare, dalla ricerca scientifica al mondo della produzione.

Essendo ora infatti completamente note le proprietà ed il funzionamento degli enzimi, si stanno applicando tutte queste conoscenze nell'industria.

Il risultato? Molti detergenti sono a base di complessi enzimatici, nel campo alimentare sono utilizzati per la produzione di latticini, dolcificanti (come l'aspartame), bevande; nell'industria chimica sono ampiamente impiegati per la sintesi di medicine, vitamine, composti organici e biocarburanti.

Numerosi scienziati e ricercatori ritengono l'applicazione industriale degli enzimi un campo di promettente futuro, merito della capacità che hanno gli enzimi di abbassare i tempi ed i consumi di energia nella produzione di sostanze.

Con questo elaborato intendo descrivere nel dettaglio il meccanismo della catalisi enzimatica (cap. 1 e 2), introducendo metodi per la modellizzazione matematica di questo tipo di reazioni (cap. 2, 3 ed Appendice) e fornendo indicazioni per il loro controllo (cap. 4).

Desidero ringraziare il prof. Giorgio Picci per la cortese e costante disponibilità accordatami.

VERONESI GIULIO

1. CATALISI ENZIMATICA

Gli *enzimi* possono essere definiti, tranne rarissime eccezioni, come catalizzatori specifici di natura proteica.

Si tratta infatti di proteine (ossia macromolecole composte dalle 20 unità strutturali fondamentali: gli amminoacidi) capaci di innalzare, anche enormemente (si può arrivare a 10^{16} volte) la velocità di reazioni chimiche termodinamicamente possibili, senza alterarne la costante di equilibrio.

L'azione catalizzatrice degli enzimi si differenzia da quella degli altri catalizzatori non enzimatici per tre caratteristiche:

1. *efficienza*: le reazioni enzimatiche si svolgono a velocità più elevate;
2. *specificità*: ogni enzima catalizza in genere una ben determinata reazione per uno specifico substrato;
3. *regolabilità*: la possibilità di variare l'azione dell'enzima da uno stato di bassa ad uno di massima attività.

La regolazione dell'attività enzimatica viene espletata da variazioni chimico fisiche del mezzo; si denotano substrati le sostanze che vengono trasformate nella reazione enzimatica e prodotti della reazione quelle che vi si formano.

1.1 NOMENCLATURA E CLASSIFICAZIONE

In natura ed artificialmente sono stati isolati migliaia di enzimi capaci di catalizzare un'enorme gamma di reazioni.

Dal 1950 in poi il numero degli enzimi identificati è cresciuto così rapidamente che la loro nomenclatura è divenuta confusa e caotica, infatti, se nel 1961 erano noti all'incirca 700 enzimi, nel 1992 ne erano stati scoperti ben 3196.

Per mettere ordine, nel 1956 fu istituita un'apposita commissione (“*International Commission on Enzymes*”), branca dell'organismo superiore “*International Union*

of Biochemistry” (IUB), che classificò gli enzimi assegnando a ciascuno un codice secondo i seguenti criteri:

1. Il primo numero indica la classe di appartenenza dell’enzima (ossidoriduttasi; trasferasi; idrolasi; liasi; isomerasi; ligasi);
2. Il secondo indica la sottoclasse;
3. La terza cifra rappresenta la sotto-sottoclasse;
4. La quarta cifra indica il numero seriale della sotto-sottoclasse.

Ad esempio l’enzima *glucosio-6-fosfato fosfatasi*, utilizzato nella trasformazione della sostanza chimica glucosio-6-fosfato in glucosio e fosfato, è classificato con il codice 3.1.2.9, quindi questo enzima appartiene alla 3^a classe (idrolasi), alla 1^a sottoclasse (esterasi), alla 2^a sottoclasse (fosfatasi) e nell’ambito di questa sottoclasse è il 9° enzima.

1.2 MECCANISMO DELLA CATALISI ENZIMATICA

La prima condizione che deve essere soddisfatta affinché una reazione chimica possa avere luogo è che l’energia libera delle molecole oggetto della reazione sia superiore a quella posseduta dalle molecole che si producono nel corso della reazione.

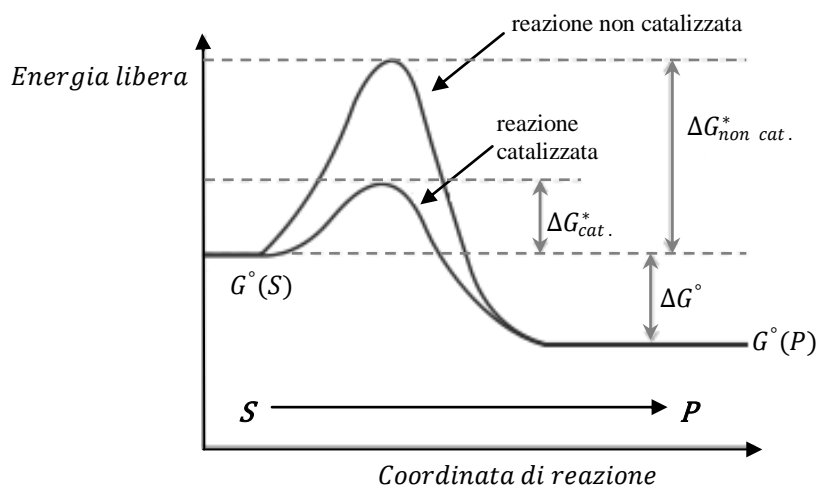
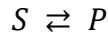


Fig. 1 - Diagramma della variazione dell’energia libera per la reazione $S \rightarrow P$. Si osserva che la presenza dell’enzima come catalizzatore abbassa l’energia di attivazione.

Se la reazione consiste nella trasformazione del substrato S nel prodotto P :



e l'energia libera a pH 7.0 (quindi a condizioni standard) è indicata con il simbolo G° , è necessario che l'energia libera sia:

$$G^\circ(S) > G^\circ(P)$$

e di conseguenza, che al termine della reazione, si realizzi una caduta di energia:

$$\Delta G^\circ = G^\circ(P) - G^\circ(S).$$

Quando il valore del “salto” di energia ΔG° è negativo la reazione si dice termodinamicamente spontanea (o esoergonica) in quanto il raggiungimento del suo stato finale non richiede apporto di energia. Quando invece il valore di ΔG° è positivo, la reazione è endoergonica, quindi termodinamicamente non spontanea, e necessita di apporto energetico per poter decorrere.

Se la reazione dal substrato S al prodotto P decorre, si raggiunge alla fine ad uno stato di equilibrio la cui costante, sempre nelle medesime condizioni standard, è data dalla relazione di *Haldane* (1930):

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{[P]_\infty}{[S]_\infty}$$

dove con i simboli $[P]$ e $[S]$ si denotano le concentrazioni (in mol/m³) dei prodotti P ed S mentre si rimanda in Appendice la spiegazione dei valori $[P]_\infty$ ed $[S]_\infty$.

La costante di equilibrio K_{eq} è legata alla caduta di energia ΔG° dalla relazione:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln(K_{eq})$$

in cui R è la costante dei gas (8315 J/mol.K) e T è la temperatura assoluta (298K). Tanto più grande è il valore (negativo) di ΔG° , tanto maggiore è la quantità di P rispetto ad S all'equilibrio e quindi l'efficienza della trasformazione da S a P .

Si osserva che un elevato valore di ΔG° non ha nulla a che vedere tuttavia con la velocità di reazione.

L'altra condizione da soddisfare per consentire il decorso di una reazione chimica è che le molecole reagenti raggiungano il livello energetico dello stato di

transizione, caratterizzato da un insieme di fattori molecolari che favoriscono il passaggio di S a P , come pure di P a S .

L'energia necessaria per raggiungere lo stato di transizione, cioè la differenza tra l'energia allo stato di transizione e l'energia iniziale delle molecole reagenti, è detta energia di attivazione ed indicata in fig.1 con il simbolo ΔG^* .

Tanto più bassa è questa energia di attivazione, tanto più è probabile che le molecole reagenti raggiungano lo stato di transizione e quindi possano andare incontro alla reazione. Quindi più bassa è l'energia di attivazione, più elevata sarà la velocità di reazione.

Assumendo sempre che l'energia libera $G^\circ(S)$ sia maggiore della $G^\circ(P)$ (prima condizione) è evidente che l'energia di attivazione da S a P , $\Delta G^*(S \rightarrow P)$, è inferiore a quella da P ad S , $\Delta G^*(P \rightarrow S)$.

Questo implica che, seppur possibile, è meno probabile a parità di condizioni che le molecole P raggiungano lo stato di transizione rispetto alle molecole S .

Quanto minore è dunque la differenza tra $\Delta G^\circ(S)$ e $\Delta G^\circ(P)$, tanto è più probabile che la reazione avvenga sia nel senso $S \rightarrow P$ che in quello $P \rightarrow S$: in sostanza che sia reversibile.

Se k (in s^{-1}) è la costante che determina la velocità di reazione $S \xrightarrow{k} P$:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[S]$$

questa costante è legata all'energia di attivazione ΔG^* dalla legge di *Arrhenius*:

$$k = \frac{KT}{h} e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

in cui K è la costante di Boltzmann, h la costante di Planck, R la costante dei gas e T la temperatura assoluta.

La maggior parte della reazioni termodinamicamente possibili si svolge con estrema lentezza, o non si svolgono affatto, in quanto la maggior parte delle molecole reagenti non è in grado di raggiungere lo stato di transizione per carenza di energia necessaria.

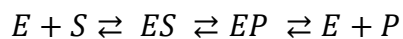
La peculiarità degli enzimi è la capacità di accelerare la velocità della reazione abbassando l'energia di attivazione ΔG^* . Di conseguenza, a parità di condizioni

fisiche iniziali, un numero più elevato di molecole di substrato è in grado di raggiungere lo stato di transizione.

È per questa ragione, ad esempio, che l'acqua ossigenata (H_2O_2), pur essendo spontaneamente decomponibile in acqua ed ossigeno, si scinde in realtà molto lentamente in assenza di enzimi catalizzatori. La sua decomposizione implica infatti un'energia di attivazione di 18 kcal/mol che si riduce a 2 kcal/mol in presenza della catalasi, l'enzima specifico.

L'enzima non altera tuttavia l'equilibrio della reazione (ossia la costante di equilibrio K_{eq}) ma accelera la velocità della reazione, abbassando pertanto il tempo nel quale si raggiunge lo stato di equilibrio.

Il meccanismo con il quale l'enzima abbassa l'energia di attivazione è legato alla formazione di un composto intermedio, chiamato complesso enzima-substrato ES :



In questo complesso le interazioni fra enzima e substrato aumentano il contenuto energetico locale e facilitano il raggiungimento dello stato di transizione. Inoltre la reazione $S \rightarrow P$ viene di fatto frazionata in una sequenza di reazioni intermedie ciascuna delle quali avente una propria energia di attivazione fortemente più bassa dell'energia di attivazione $S \rightarrow P$.

Il composto enzima-substrato ES si crea grazie ad un insieme di residui di amminoacidi (detti sito attivo), contenuti nella molecola dell'enzima, che hanno la proprietà di legarsi a regioni specifiche della molecola del substrato.

I legami che si originano, del tipo transitorio, terminata la reazione si dissociano dando luogo al prodotto P desiderato e all'enzima E di nuovo allo stato libero.

È pertanto possibile la ripetizione del processo.

1.3 UNITÀ DI MISURA DELL'ATTIVITÀ CATALITICA

Nel 1961 l' "International Commission on Enzymes" fissò l'unità internazionale U come unità di misura della capacità catalitica di un enzima.

1 U è definito come la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di una micromole (μmol) di substrato in un minuto sotto alcune condizioni standard.

Altri organismi internazionali (*IFCC*, *IUPAC*) successivamente hanno definito l'unità *Katal* che indica di quanto la velocità di reazione viene aumentata (rispetto al caso di reazione non catalizzata) con la presenza di un enzima. Queste unità di misura non sono tuttavia impiegate essendo una reazione enzimatica influenzata da tantissimi fattori diversi.

Uno dei metodi più comuni per valutare la capacità catalitica di un enzima è quello di utilizzare uno spettrofotometro che indica l'assorbimento di raggi ultravioletti dal substrato. L'attività catalitica dell'enzima corrisponde al cambiamento nel tempo (in minuti) di assorbimento di questi raggi e si esprime in micromoli al minuto, in accordo con la definizione di U descritta in precedenza.

2. CINETICA ENZIMATICA

L'analisi della cinetica di una reazione enzimatica, oltre che a fornire informazioni importanti sul meccanismo della stessa, è utile ed a volte necessaria per la valutazione dell'attività degli enzimi durante il processo di trasformazione.

La velocità di reazione si ricava dalla quantità del prodotto formatosi o dal substrato scomparso nell'unità di tempo.

La velocità della reazione enzimatica decresce con il tempo, come si può osservare dalla fig.2, ed a tale progressiva diminuzione contribuiscono:

1. la diminuzione della concentrazione del substrato;
2. l'accumulo del prodotto della reazione;
3. la denaturazione o disattivazione dell'enzima, che si accentua con il tempo dall'inizio della reazione per vari fattori: temperatura, variazione di pH, etc.

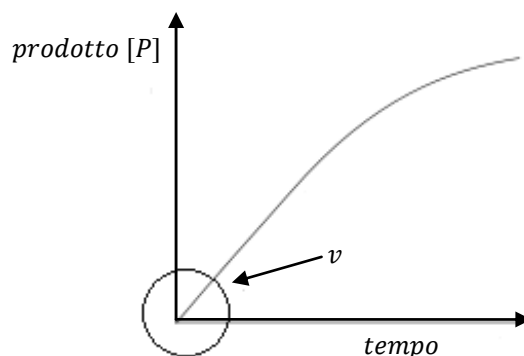


Fig. 2 - Velocità di reazione in funzione del tempo: essa gradualmente decresce.

Per queste ragioni la stima della velocità di una reazione enzimatica è tanto più fedele tanto più piccolo è l'intervallo di tempo, dall'inizio della reazione, entro il quale si determina la concentrazione del prodotto della reazione.

La velocità della reazione, così misurata, risente minimamente dei fattori sopradetti e viene denominata velocità iniziale: v .

Si osserva inoltre che per ogni determinata concentrazione del substrato $[S]$, la velocità iniziale v appena definita è proporzionale alla concentrazione dell'enzima, come mostrato in fig.3:

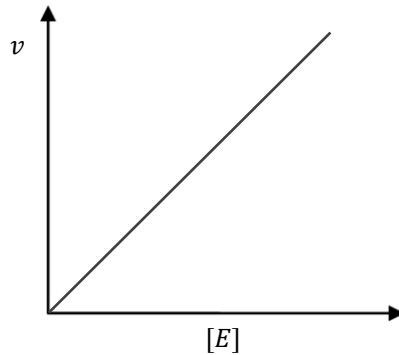


Fig. 3 - Variazione della velocità di reazione con la concentrazione dell'enzima.

2.1 LEGGE DI MICHAELIS-MENTEN

Studi compiuti nei primi anni dello scorso secolo mostrarono come la velocità iniziale di reazione v si comporta in maniera particolare rispetto alle diverse concentrazioni del substrato.

Infatti ad ogni concentrazione dell'enzima fissata, la variazione della concentrazione del substrato S fa modificare la velocità iniziale v secondo la curva di fig.4.

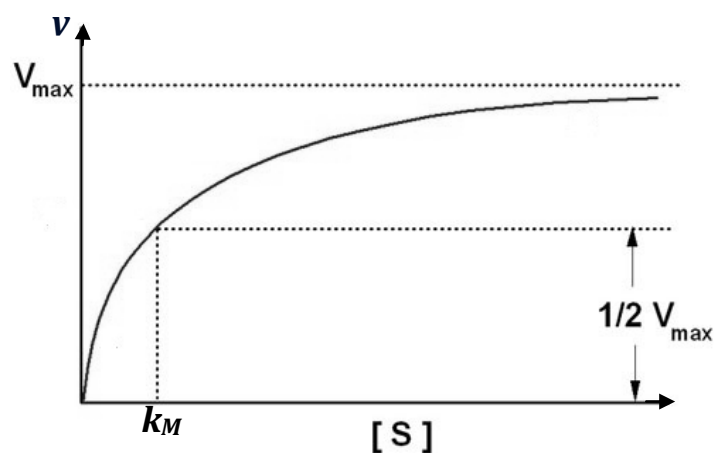


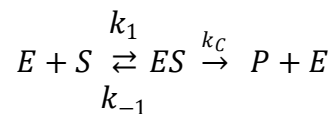
Fig. 4 - Andamento della velocità iniziale in funzione della concentrazione del substrato.

Il grafico mostra come a basse concentrazioni del substrato la v è direttamente proporzionale a $[S]$. Man mano che la concentrazione del substrato aumenta, l'incremento della v diminuisce progressivamente, fino al raggiungimento asintotico della velocità massima V_{MAX} . Sopra questo limite l'ulteriore aumento di $[S]$ non modifica più la v .

Il valore V_{MAX} è un'importante caratteristica cinetica di un determinato sistema "enzima-substrato" ed è dipendente, come si vedrà in seguito, soltanto dalla concentrazione dell'enzima.

Il peculiare effetto della concentrazione del substrato sulla velocità iniziale di reazione trova la spiegazione nella teoria postulata da *Michaelis* e *Menten* nel 1913, confermata da numerosi riscontri sperimentali.

Secondo questa teoria l'enzima E che, per definizione, è a concentrazione costante, reagisce con il substrato S per formare il complesso enzima-substrato ES . Questi va incontro ad una trasformazione molecolare che porta alla liberazione del prodotto di reazione P e alla rigenerazione dell'enzima libero E :



Ponendo $[E_0]$ la concentrazione iniziale dell'enzima, $[S]$ e $[P]$ le concentrazioni del substrato e del prodotto; l'equazione della velocità di formazione del composto ES alla relativa concentrazione $[ES]$ risulta:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_0] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_c[ES]$$

Riferendoci alle condizioni di equilibrio, si può porre $\frac{d[ES]}{dt} = 0$, quindi:

$$0 = k_1([E_0] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_c[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_{-1} + k_c + k_1[S]} = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_c}{k_1} + [S]}$$

definendo $\frac{k_{-1} + k_c}{k_1} = k_M$ (*costante di Michaelis-Menten*) e sapendo che il prodotto P si forma con velocità:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_C[ES]$$

si ottiene l'equazione di Michaelis-Menten che lega la velocità di formazione del prodotto con la concentrazione del substrato $[S]$ ad ogni prefissato valore di $[E_0]$:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_C[E_0][S]}{k_M + [S]} = \frac{V_{MAX}[S]}{k_M + [S]}$$

Questa funzione ha l'andamento del grafico di fig.4.

Si è posto $V_{MAX} = k_C[E_0]$, quindi si è giustificato il fatto che questo valore di "saturazione" dipende solamente dalla concentrazione iniziale dell'enzima.

Si può inoltre osservare che la costante di Michaelis-Menten k_M corrisponde alla concentrazione del substrato quando la velocità di reazione è semimassimale:

$$v = \frac{V_{MAX}}{2} \Rightarrow \frac{V_{MAX}}{2} = \frac{V_{MAX}[S]}{k_M + [S]} \Rightarrow 2 = \frac{k_M}{[S]} + 1 \Rightarrow k_M = [S]$$

Questa costante esprime quantitativamente l'affinità dell'enzima per il substrato: minore è il valore della k_M , maggiore è l'affinità. Infatti, se l'affinità dell'enzima per un determinato substrato è elevata, bastano poche molecole di substrato per saturare l'enzima e raggiungere il valore massimo V_{MAX} .

Il valore di k_M è quindi una caratteristica fondamentale di ogni reazione enzimatica.

2.2 STIMA DELLE COSTANTI k_M E V_{MAX}

Si è accennato precedentemente all'estrema importanza delle costanti k_M e V_{MAX} in una reazione enzimatica, tuttavia la risposta di fig.4 non è sufficiente per stimare la costante V_{MAX} essendo in realtà il valore $V_{MAX}/2$ (quello per cui $[S]=k_M$) difficilmente misurabile.

Si usa quindi determinare la V_{MAX} con altri criteri; tra i tanti, particolarmente noto è quello di *Lineweaver e Burk* (1934).

Secondo questo metodo si riportano i dati sperimentali su un diagramma, in ascissa del quale vi si pongono i valori di $1/[S]$ (i reciproci delle concentrazioni del

substrato), mentre sulle ordinate vanno posti i reciproci delle velocità iniziali di reazione rilevate $1/v$.

$$v = \frac{V_{MAX} [S]}{k_M + [S]} \xrightarrow{\text{reciproco}} \frac{1}{v} = \frac{k_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

I valori sperimentali si distribuiscono lungo una retta di pendenza k_M/V_{MAX} che taglia l'asse delle ordinate in corrispondenza del valore $1/V_{MAX}$ ed, estrapolata, l'asse negativo delle ascisse in corrispondenza del valore $-1/k_M$. Ricavati in base a tale retta le intersezioni con gli assi, si ottengono immediatamente i valori di k_M e V_{MAX} .

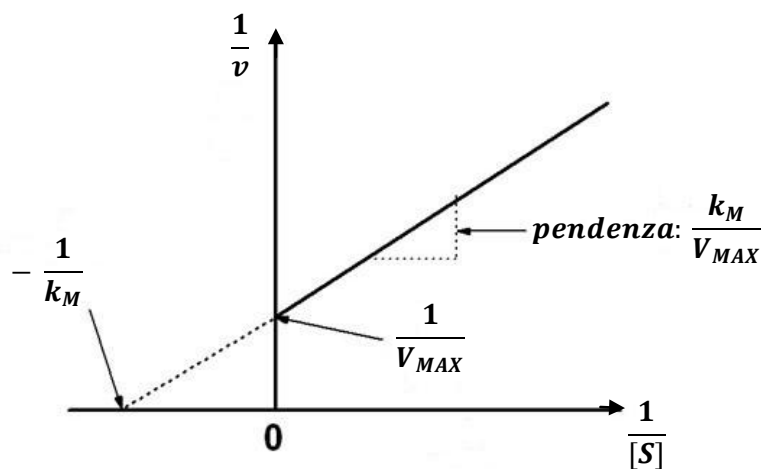


Fig. 5 - Diagramma di Lineweaver e Burk

Questa rappresentazione, anche se ampiamente usata, non è raccomandata perché troppo soggetta ad alterazioni causate dagli eventuali errori di misura: per valori di v “bassi”, piccoli errori di misura, infatti, si ripercuotono in grandi errori di $1/v$, rendendo inaffidabile il grafico ottenuto.

Introducendo una piccola modifica, ossia moltiplicando l'equazione precedente ambo i membri per $[S]$, è possibile incrementare la precisione del metodo:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{k_M}{V_{MAX}} + \frac{[S]}{V_{MAX}}$$

In ascissa si pone la concentrazione $[S]$, in ordinata i valori di $[S]/v$: ne risulta una retta di pendenza $1/V_{MAX}$ e di intercette k_M/V_{MAX} sull'asse delle ordinate e $-k_M$ su quello delle ascisse; fig.6.

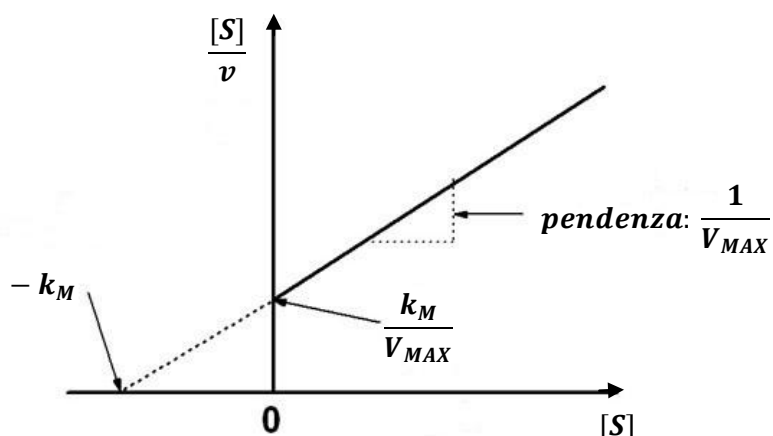


Fig. 6 - Diagramma di Hanes

A differenza del metodo precedente, stavolta eventuali errori nella misurazione di v , quando questi è piccolo, non si ripercuotono pesantemente nel grafico della retta essendo contestualmente bassi i valori di $[S]$.

Il procedimento così descritto, più attendibile del metodo di *Lineweaver* e *Burk*, è noto con il nome di metodo di *Hanes*.

2.3 MINIMIZZAZIONE DEGLI ERRORI NELLA STIMA DELLE COSTANTI k_M E V_{MAX}

I metodi introdotti nel paragrafo precedente per la stima delle costanti fondamentali di una reazione enzimatica k_M e V_{MAX} non sono abbastanza accurati quando vi è la necessità di valori delle stesse molto precisi: è necessario pertanto un approccio più rigoroso.

L'equazione di *Michaelis* e *Menten* può essere riscritta aggiungendo un coefficiente $(1+e)$ che tiene conto dei vari errori di misura, sperimentali, imprecisioni, etc.

Se si compiono n prove ed assumendo l'errore di densità probabilistica approssimativamente uniforme in queste, l' i -esima misura ($i=1\dots n$) può essere espressa come:

$$v_i = \frac{V_{MAX} [S]_i}{k_M + [S]_i} \cdot (1 + e_i) \quad (*)$$

L'obiettivo è dunque minimizzare l'errore e_i per la trovare la migliore stima delle costanti k_M e V_{MAX} .

Per semplicità si minimizzerà l'errore quadratico e_i^2 , di conseguenza i migliori valori di k_M e V_{MAX} saranno quelli per cui la somma degli errori quadratici SS :

$$SS = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad (**)$$

sarà la più bassa possibile. Riscrivendo l'equazione (*):

$$e_i = \frac{k_M v_i}{V_{MAX} [S]_i} + \frac{v_i}{V_{MAX}} - 1 ;$$

ponendo $A = k_M/V_{MAX}$ e $B = 1/V_{MAX}$, e sostituendo in (**):

$$SS = \sum_{i=1}^n \left(\frac{A v_i}{[S]_i} + B v_i - 1 \right)^2$$

i valori \hat{k}_M e \hat{V}_{MAX} che minimizzano SS possono essere calcolati derivando quest'ultima espressione rispettivamente secondo A e B e poi ponendo a zero le derivate:

$$\frac{\partial SS}{\partial A} = \sum_{i=1}^n \frac{2v_i}{[S]_i} \left(\frac{A v_i}{[S]_i} + B v_i - 1 \right) = 0 ; \quad \frac{\partial SS}{\partial B} = \sum_{i=1}^n 2v_i \left(\frac{A v_i}{[S]_i} + B v_i - 1 \right) = 0 ;$$

introducendo \hat{A} e \hat{B} come valori che minimizzano SS , le espressioni precedenti possono essere riscritte:

$$\hat{A} \sum_{i=1}^n \left(\frac{v_i^2}{[S]_i^2} \right) + \hat{B} \sum_{i=1}^n \left(\frac{v_i^2}{[S]_i} \right) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{v_i}{[S]_i} \right) ;$$

$$\hat{A} \sum_{i=1}^n \left(\frac{v_i^2}{[S]_i} \right) + \hat{B} \sum_{i=1}^n (v_i^2) = \sum_{i=1}^n (v_i) ;$$

le cui soluzioni risultano:

$$\hat{A} = \frac{\Sigma(v_i^2) \cdot \Sigma\left(\frac{v_i}{[S]_i}\right) - \Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i}\right) \cdot \Sigma(v_i)}{\Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i^2}\right) \cdot \Sigma(v_i^2) - \left(\Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i}\right)\right)^2}$$

$$\hat{B} = \frac{\Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i^2}\right) \cdot \Sigma(v_i) - \Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i}\right) \cdot \Sigma\left(\frac{v_i}{[S]_i}\right)}{\Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i^2}\right) \cdot \Sigma(v_i^2) - \left(\Sigma\left(\frac{v_i^2}{[S]_i}\right)\right)^2}$$

È possibile ora ricavare i migliori valori di stima delle due costanti ricordando che:

$$\hat{V}_{MAX} = \frac{1}{\hat{B}} \quad \hat{k}_M = \frac{\hat{A}}{\hat{B}}$$

Questo risultato, per la prima volta dato da *Johansen e Lumry* (1961), è esatto: nessun altro aggiustamento è necessario per minimizzare l'errore quadratico *SS*.

2.4 EFFETTI pH E TEMPERATURA, SCELTA VALORI OTTIMALI

L'efficienza catalitica degli enzimi è notevolmente influenzata dal pH del mezzo in cui operano, numerosi studi hanno inoltre dimostrato come ogni enzima è caratterizzato da un pH ottimale, sopra o sotto il quale l'attività catalitica decresce, come si può apprezzare dalla fig.7.

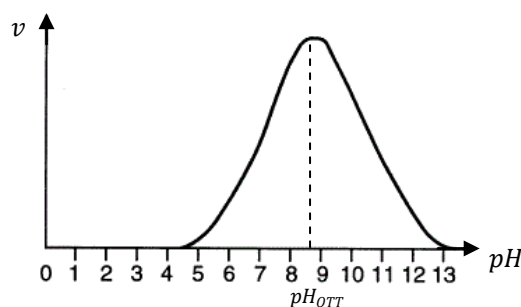


Fig. 7 - Dipendenza del pH nella velocità di reazione.

Riassumendo le numerose fonti in bibliografia, si può stabilire che i valori delle costanti k_M e V_{MAX} dell'equazione di *Michaelis-Menten* risultano funzioni del pH del substrato. Per trovare il pH più opportuno è necessario compiere una serie di misure

della velocità di reazione v in funzione della concentrazione del substrato (il quale avrà, volta per volta, pH imposto), ne conseguono così coppie di valori (k_M , V_{MAX}) dipendenti dal pH scelto tra cui scegliere quella ottimale.

Fortunatamente la maggior parte degli enzimi hanno pH ottimale intorno a 7, solo pochi di essi hanno pH ottimali molto bassi (ad esempio la *pepsina* a pH 1,5) o molto alti (come l'*arginasi* a pH 9,8).

Come si è visto per il pH, anche la temperatura ha una notevole influenza sull'attività catalitica degli enzimi.

La velocità delle reazioni enzimatiche cresce con l'aumento della temperatura, tuttavia al di sopra di un determinato valore che varia da enzima ad enzima, le proteine che lo compongono vengono denaturate.

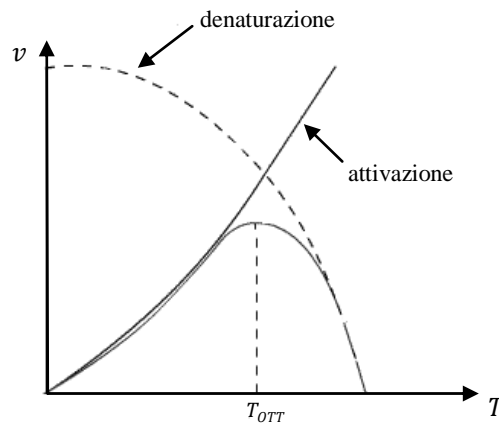


Fig. 8 - Velocità di reazione in funzione della temperatura: le due condizioni contrastanti di attività e denaturazione dell'enzima individuano una temperatura ottimale.

La temperatura ottimale è la risultante di queste due condizioni; in generale si è osservato che la maggior parte degli enzimi hanno temperatura ottimale intorno ai 35°-50°C.

3. DERIVAZIONE DELLE EQUAZIONI DELLA VELOCITÀ DI REAZIONE IN CONDIZIONI DI EQUILIBRIO

Fino ad adesso è stato trattato solo il semplice meccanismo di *Michaelis-Menten* per trovare l'espressione della velocità di formazione di un prodotto in una reazione enzimatica, come si è discusso nel paragrafo 2.1 .

In realtà spesso si ha a che fare con meccanismi più articolati, nei quali magari si formano più prodotti intermedi di reazione rispetto al solo *ES* o dove sono presenti più substrati.

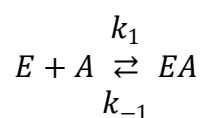
Quando si presentano casi del genere, un sistema per ricavare le equazioni delle velocità di reazione nelle condizioni di equilibrio è quello di utilizzare il metodo proposto da *King e Altman* (1956).

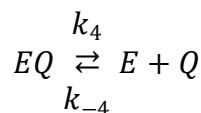
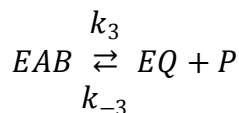
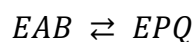
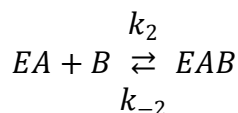
Si tratta di una procedura schematica che può essere applicata se il meccanismo di catalisi consiste in una serie di reazioni dove compaiono anche più complessi enzima-substrato ma si ha solo un enzima implicato in tale meccanismo.

Questo metodo non può essere usato, invece, nel caso di reazioni non enzimatiche, di reazioni con più enzimi o nel caso di reazioni enzimatiche dove però si manifestano relazioni tra i reagenti senza la presenza dell'enzima.

Per semplicità si preferisce presentare questo metodo tralasciando la dimostrazione matematica ma si descriverà dettagliatamente un esempio base.

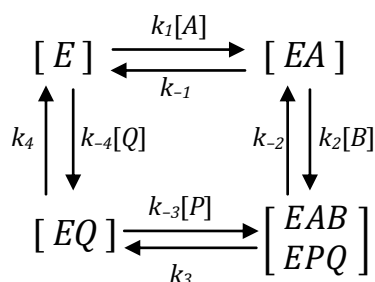
Supponiamo di avere una reazione enzimatica nella quale l'enzima *E*, alla concentrazione iniziale $[E_0]$, si comporta da catalizzatore per i due substrati *A* e *B* per ottenere i prodotti *Q* e *P* (desiderato, del quale si vuole conoscere l'espressione della velocità di formazione). Durante la reazione si formano inoltre i complessi enzima-substrato *EA*, *EAB*, *EPQ*, *EQ* secondo le relazioni:





La terza reazione non prevede costanti di velocità, tratteremo i composti EAB ed EPQ come un unico ente indipendente.

Il primo passo del metodo di *King-Altman* è quello di incorporare tutto il meccanismo in uno schema chiuso comprendente tutte e sole le relazioni esistenti tra l'enzima ed i suoi composti:



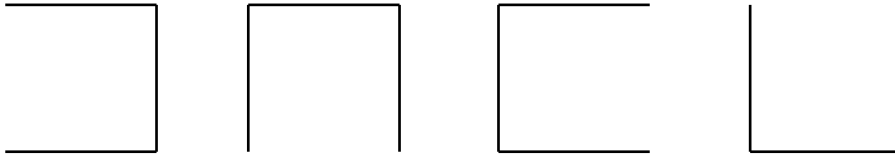
Tutte le reazioni devono essere trattate come del primo ordine.

Questo significa che le eventuali reazioni del II° ordine, come ad esempio la prima delle cinque relazioni dell'esempio, devono essere trasformate in "pseudo-reazioni" del primo ordine modificando la costante di velocità secondo la procedura descritta in appendice A.2 .

A questo punto, partendo dallo schema appena creato, si considera la forma geometrica della struttura principale e si devono trovare tutte le sottostrutture della principale con le seguenti proprietà:

1. comprendono solo linee della struttura principale;
2. connettono ogni coppia delle forme dell'enzima;
3. non sono chiuse.

Nel caso in oggetto, essendo la struttura principale un quadrato, le sole sottostrutture che soddisfano le tre proprietà sono:

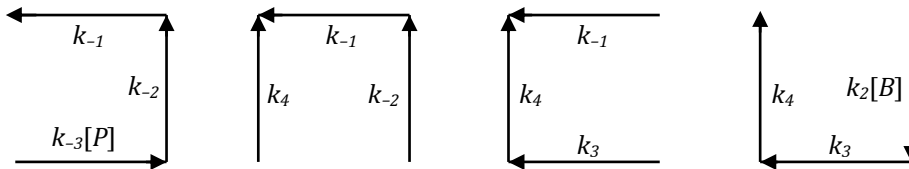


A titolo di controesempio, non soddisfano le proprietà elencate:



Per ogni forma dell'enzima, si prende una alla volta ognuna delle sottostrutture e si collocano le punte delle frecce (e le relative costanti) che sono indirizzate verso la forma enzimatica in oggetto facendo riferimento allo schema di partenza.

Ad esempio, se consideriamo l'enzima libero E , le quattro sottostrutture con le relative frecce e costanti che terminano in E risultano:



Ogni sottostruttura deve essere interpretata come il prodotto delle costanti (o "pseudo-costanti") di velocità e l'intera struttura equivale alla somma dei prodotti di queste sottostrutture.

Tornando all'esempio precedente, la prima sottostruttura vale $(k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P])$ mentre l'intera struttura che si riferisce all'enzima libero E , essendo come detto la somma delle sottostrutture, risulta $(k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_2k_3k_4[B])$.

La somma appena trovata è il numeratore di un'espressione che rappresenta, sul totale della concentrazione iniziale dell'enzima $[E_0]$ costante, la parte dell'enzima che durante la reazione si trova nello stato di E :

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_2k_3k_4[B]}{\Sigma}$$

Procedendo esattamente nello stesso modo, per ognuna delle altre tre forme in cui si trova l'enzima durante la reazione, ne consegue:

$$\frac{[EA]}{[E_0]} = \frac{k_1 k_{-2} k_{-3} [A][P] + k_1 k_{-2} k_4 [A] + k_1 k_3 k_4 [A] + k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q]}{\Sigma}$$

$$\frac{[EAB] + [EPQ]}{[E_0]} = \frac{k_1 k_2 k_{-3} [A][B][P] + k_1 k_2 k_4 [A][B] + k_{-1} k_{-3} k_{-4} [P][Q] + k_2 k_{-3} k_{-4} [B][P][Q]}{\Sigma}$$

$$\frac{[EQ]}{[E_0]} = \frac{k_1 k_2 k_3 [A][B] + k_{-1} k_{-2} k_{-4} [Q] + k_{-1} k_3 k_{-4} [Q] + k_2 k_3 k_{-4} [B][Q]}{\Sigma}$$

Essendo la concentrazione dell'enzima per definizione costante nel tempo, ovvero:

$$[E_0] = [E] + [EA] + ([EAB] + [EPQ]) + [EQ]$$

ne deriva che la somma delle quattro frazioni deve essere uguale ad uno, il che significa che il denominatore Σ di ogni frazione è la somma dei quattro diversi numeratori (quindi sarà formato in totale da sedici addendi: i quattro addendi di ogni sottostruttura per ognuna delle quattro forme dell'enzima).

La velocità di formazione del prodotto P desiderato in condizioni di equilibrio si ottiene sommando tutti i membri che generano P e sottraendo quelli che lo consumano, riferendosi al meccanismo iniziale.

Completando l'esempio, si giunge dunque:

$$\begin{aligned} v &= \frac{d[P]}{dt} \\ &= k_3([EAB] + [EPQ]) - k_{-3}[EQ][P] \\ &= [E_0](k_1 k_2 k_{-3} k_3 [A][B][P] + k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B] + k_{-1} k_{-3} k_3 k_{-4} [P][Q] + \\ &\quad + k_2 k_{-3} k_3 k_{-4} [B][P][Q] - k_1 k_2 k_{-3} k_3 [A][B][P] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q] - \\ &\quad - k_{-1} k_{-3} k_3 k_{-4} [P][Q] - k_2 k_{-3} k_3 k_{-4} [B][P][Q]) / \Sigma \\ &= (k_1 k_2 k_3 k_4 [A][B][E_0] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [P][Q][E_0]) / \Sigma \end{aligned}$$

4. CONTROLLO DI UNA REAZIONE ENZIMATICA

I metodi descritti nei capitoli 2 e 3 ed in Appendice permettono di modellare matematicamente la dinamica di una reazione enzimatica.

A questo punto si presenta il problema di controllare tale reazione nella maniera più efficace per soddisfare al meglio le specifiche che vengono fornite dal contesto, ad esempio industriale, di appartenenza.

Il controllo di una reazione enzimatica può avvenire secondo due importanti modalità: agendo sulle quantità di substrato, enzima e flussi di alimentazione-estrazione oppure agendo a livello delle proprietà chimiche dell'enzima, sfruttando i fenomeni dell'allosteroismo e dell'inibizione enzimatica.

4.1 CONTROLLO A LIVELLO DELLE QUANTITÀ DI SUBSTRATO, ENZIMA E FLUSSO DI ALIMENTAZIONE-ESTRAZIONE

Supponiamo di dover controllare una reazione chimica, catalizzata da un enzima E , con lo scopo di produrre una determinata sostanza P partendo da n diversi substrati S .

Questa reazione si compie in un reattore chimico CSTR mantenuto a temperatura e volumi costanti; le variabili di controllo sono il flusso di alimentazione f , la

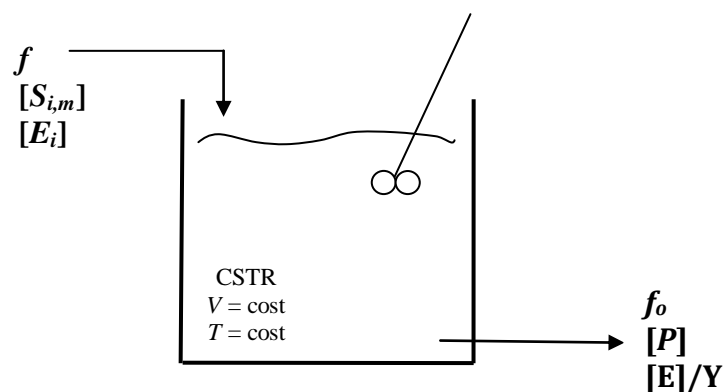


Fig. 9 - Schematizzazione reattore CSTR con ingressi ed uscite per il controllo della reazione chimica che avviene in esso.

concentrazione $[E_i]$ dell'enzima e le concentrazioni $[S_{i,m}]$ ($m = 1 \dots n$) dei substrati nel flusso di alimentazione; la variabile d'uscita di interesse è logicamente la concentrazione di P nel flusso di estrazione f_o (vedi fig. 9). Si suppone inoltre che in uscita vada persa con il flusso di estrazione una parte frazionaria del totale dell'enzima $[E]/Y$, con $Y > 1$.

La dinamica del reattore è completamente determinata dalla conoscenza nel tempo dell'andamento delle concentrazioni degli n substrati, dell'enzima e del prodotto. Questo può essere fatto semplicemente applicando le equazioni di bilanciamento di massa per ognuna delle sostanze implicate nella reazione e ricordando che $f = f_o$ per avere volume costante (d'ora in avanti si userà solo il simbolo f):

$$\begin{cases} V \cdot \frac{d[P]}{dt} = -f \cdot [P] + V \cdot h_{[P]}([E_0], [E_i], \frac{[E]}{Y}, S_m, k') \\ V \cdot \frac{d[E]}{dt} = f \cdot ([E_i] - \frac{[E]}{Y}) + V \cdot h_{[E]}([E_0], [E_i], \frac{[E]}{Y}, S_m, k'') \\ V \cdot \frac{d[S_m]}{dt} = f \cdot [S_{i,m}] + V \cdot h_{[S_m]}([E_0], [E_i], \frac{[E]}{Y}, S_m, k''') \end{cases}$$

dove ($m = 1 \dots n$) e le funzioni $h_{[P]}(\cdot)$, $h_{[E]}(\cdot)$, $h_{[S_m]}(\cdot)$ tengono conto del tasso di formazione o degradazione della sostanza in oggetto in dipendenza dell'enzima presente, dei substrati e delle relative costanti di velocità. Queste funzioni, come si è visto nel cap.3, si possono individuare con il metodo di *King e Altman*.

Ad esempio, nel caso della tipica reazione di *Michaelis-Menten*, essendo presente un solo substrato, le tre funzioni $h_{[P]}(\cdot)$, $h_{[E]}(\cdot)$, $h_{[S_m]}(\cdot)$ differiscono l'una dall'altra solo per un termine moltiplicativo e le equazioni che descrivono la dinamica del sistema sono:

$$\begin{cases} V \cdot \frac{d[P]}{dt} = -f \cdot [P] + V \cdot k_c \cdot \frac{([E_0] + [E_i] - \frac{[E]}{Y})[S]}{k_M + [S]} \\ V \cdot \frac{d[E]}{dt} = f \cdot \left([E_i] - \frac{[E]}{Y} \right) + V \cdot (k_{-1} + k_c - k_1) \cdot \frac{([E_0] + [E_i] - \frac{[E]}{Y})[S]}{k_M + [S]} \\ V \cdot \frac{d[S]}{dt} = f \cdot [S_i] + V \cdot (k_{-1} - k_1) \cdot \frac{([E_0] + [E_i] - \frac{[E]}{Y})[S]}{k_M + [S]} \end{cases}$$

Note queste equazioni, la scelta più semplice per controllare la reazione chimica è quella di determinare delle condizioni di equilibrio o di regime e linearizzare il sistema attorno a questi valori.

Il problema si è spostato dunque al trovare dei valori di equilibrio per il sistema, ma tutto ciò può essere risolto partendo dalle specifiche di regime (ad esempio vengono richiesti ben determinati valori di concentrazione del prodotto e di portata del flusso in uscita) e scegliendo di volta in volta le soluzioni più vantaggiose (come, a parità di flusso di alimentazione e prodotto, le quantità di enzima e substrato che consentono di minimizzare i costi). Al termine di queste considerazioni si perviene ai valori di equilibrio degli ingressi f^* , $[E_i]^*$, $[S_{i,m}]^*$, e degli stati $[P]^*$, $[E]^*$, $[S_m]^*$, $m = 1 \dots n$.

A questo punto è possibile linearizzare il tutto attorno ai punti di equilibrio; si presenta così l'opportunità di sfruttare la teoria dei sistemi in forma di spazio di stato e di implementare controllori con questi modelli.

Se definiamo gli stati del sistema con il vettore \mathbf{x} e gli ingressi con il vettore \mathbf{u} ;

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} [P] \\ [E] \\ [S_m] \end{bmatrix} \quad \mathbf{u} = \begin{bmatrix} f \\ [E_i] \\ [S_{i,m}] \end{bmatrix}$$

il sistema è esprimibile nella forma di spazio di stato:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{u}; \\ \mathbf{y} = \mathbf{C}\mathbf{x} = [P]; \end{cases}$$

e le matrici di linearizzazione $\mathbf{A}, \mathbf{B} \in \mathbb{R}^{(n+2) \times (n+2)}$, $\mathbf{C} \in \mathbb{R}^{1 \times (n+2)}$ si calcolano:

$$\mathbf{A} = \left[\frac{\partial f}{\partial \mathbf{x}} \right]_{\substack{\mathbf{x}=\mathbf{x}^* \\ \mathbf{u}=\mathbf{u}^*}}; \quad \mathbf{B} = \left[\frac{\partial f}{\partial \mathbf{u}} \right]_{\substack{\mathbf{x}=\mathbf{x}^* \\ \mathbf{u}=\mathbf{u}^*}}; \quad \mathbf{C} = [1 \ 0 \ \dots \ 0]$$

Tornando all'esempio della reazione di Michaelis-Menten, le matrici \mathbf{A} e \mathbf{B} ed il vettore \mathbf{C} del sistema linearizzato risultano:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial [P]} & \frac{\partial f_1}{\partial [E]} & \frac{\partial f_1}{\partial [S]} \\ \frac{\partial f_2}{\partial [P]} & \frac{\partial f_2}{\partial [E]} & \frac{\partial f_2}{\partial [S]} \\ \frac{\partial f_3}{\partial [P]} & \frac{\partial f_3}{\partial [E]} & \frac{\partial f_3}{\partial [S]} \end{bmatrix}_{\substack{[P]=[P]^*, [E]=[E]^*, [S]=[S]^* \\ f=f^*, [E_i]=[E_i]^*, [S_i]=[S_i]^*}}$$

$$= \begin{bmatrix} -\frac{f^*}{V} & -\frac{k_c[S]^*}{Y(k_M + [S]^*)} & k_c([E_0] + [E_i]^* - \frac{[E]^*}{Y}) \frac{k_M}{(k_M + [S]^*)^2} \\ 0 & \frac{-f^*}{YV} - \frac{(k_{-1} + k_c - k_1)[S]^*}{Y(k_M + [S]^*)} & (k_{-1} + k_c - k_1)([E_0] + [E_i]^* - \frac{[E]^*}{Y}) \frac{k_M}{(k_M + [S]^*)^2} \\ 0 & \frac{(k_1 - k_{-1})[S]^*}{Y(k_M + [S]^*)} & (k_{-1} - k_1)([E_0] + [E_i]^* - \frac{[E]^*}{Y}) \frac{k_M}{(k_M + [S]^*)^2} \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial f} & \frac{\partial f_1}{\partial [E_i]} & \frac{\partial f_1}{\partial [S_i]} \\ \frac{\partial f_2}{\partial f} & \frac{\partial f_2}{\partial [E_i]} & \frac{\partial f_2}{\partial [S_i]} \\ \frac{\partial f_3}{\partial f} & \frac{\partial f_3}{\partial [E_i]} & \frac{\partial f_3}{\partial [S_i]} \end{bmatrix}_{\substack{[P]=[P]^*, [E]=[E]^*, [S]=[S]^*; \\ f=f^*, [E_i]=[E_i]^*, [S_i]=[S_i]^*}}$$

$$= \begin{bmatrix} -\frac{[P]^*}{V} & \frac{k_c[S]^*}{k_M + [S]^*} & 0 \\ \frac{[E_i]^* - \frac{[E]^*}{Y}}{V} & \frac{f^*}{V} + \frac{(k_{-1} + k_c - k_1)[S]^*}{k_M + [S]^*} & 0 \\ \frac{[S_i]^*}{V} & \frac{(k_{-1} - k_1)[S]^*}{k_M + [S]^*} & \frac{f^*}{V} \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{C} = [1 \quad 0 \quad 0]$$

Ottenuto il modello del sistema in forma di spazio di stato, il passo successivo è quello di inserire il suddetto modello in uno schema a retroazione per il controllo, tramite le variabili di ingresso, dell'uscita di interesse.

La teoria illustra molti metodi per la realizzazione di controllori; si può dire che esistano due tipologie principali: la progettazione nel dominio della frequenza e la progettazione direttamente nello spazio di stato.

La progettazione nello spazio di stato si riconduce in generale al problema dell'allocazione degli autovalori del sistema in catena chiusa. Una volta individuati tali autovalori, basta retroazionare gli stati (se sono disponibili, fig. 10) tramite un'apposita matrice K o l'uscita (in caso contrario, fig. 11) tramite uno stimatore seguito dalla matrice K per ottenere un sistema che ha la stessa dinamica di quella caratterizzata dagli autovalori individuati.

Per quanto riguarda la matrice K , essa è determinabile risolvendo l'equazione:

$$\det(sI - (A - BK)) = (s + \lambda_1) \dots (s + \lambda_{n+2})$$

dove $\lambda_1 \dots \lambda_{n+2}$ sono gli autovalori che contraddistinguono la dinamica del sistema in catena chiusa.

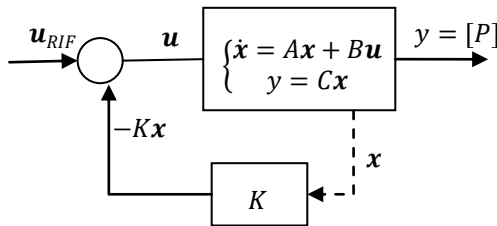


Fig. 10 - Schema di controllo con retroazione dello stato

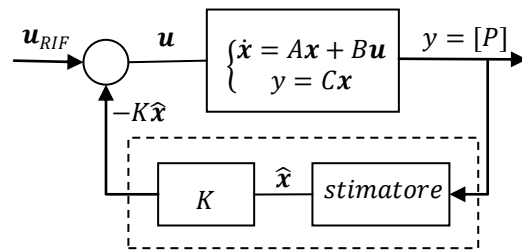


Fig. 11 - Schema di controllo con retroazione dell'uscita e stimatore

L'altro tipo di progettazione, nel dominio della frequenza, non prevede la conoscenza degli autovalori ideali del sistema in catena chiusa, cosa peraltro complicata, ma stavolta l'obiettivo è quello anteporre al processo un controllore che permetta al sistema retroazionato il rispetto delle specifiche di controllo. Il primo passo è quello di ricavare le funzioni di trasferimento ingresso-uscita del sistema; come noto:

$$G(s) = C \cdot (sI - A)^{-1} \cdot B = [G_f(s) \quad G_{[E_i]}(s) \quad G_{[S_{i,m}]}(s)]$$

A questo punto è necessario individuare una funzione di trasferimento $W(s)$ dell'intero sistema in catena chiusa: questo è possibile utilizzando delle relazioni che legano le specifiche fornite con i parametri tipici dei sistemi del secondo ordine (ζ e ω), ed eventualmente aggiungendo poli nelle posizioni più opportune.

Se $G_*(s)$ è la funzione di trasferimento da controllare, il controllore $D(s)$, nel caso di sistema con retroazione unitaria, si determina risolvendo:

$$W(s) = \frac{D(s)G_*(s)}{1 + D(s)G_*(s)}$$

Tornando all'esempio dell'equazione di *Michaelis-Menten*, se desideriamo controllare il prodotto in uscita con il flusso di alimentazione, mantenendo costanti

gli altri ingressi, la funzione di trasferimento sulla quale progettare il controllore $D(s)$ è $G_f(s)$; lo schema di controllo è il seguente:

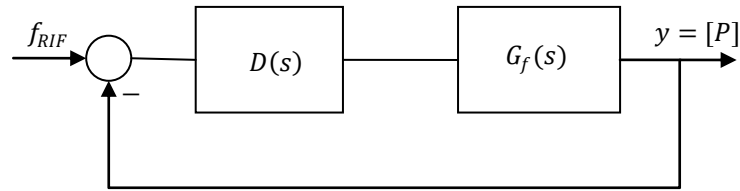


Fig. 12 - Controllo del prodotto in uscita tramite il flusso di alimentazione con controllore $D(s)$

4.2 CONTROLLO A LIVELLO DELL'ENZIMA: INIBIZIONE E REGOLAZIONE ALLOSTERICA

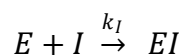
Quasi tutti gli enzimi sono suscettibili di inibizione da parte di composti capaci di combinarsi con la molecola enzimatica in modo reversibile o irreversibile.

Controllando opportunamente questi composti è possibile di conseguenza regolare la reazione catalizzata dall'enzima.

Le conoscenze dell'inibizione enzimatica trovano impiego nel campo farmaceutico: l'azione di molti farmaci è basata sulla loro capacità di inibizione nei confronti di specifici enzimi implicati nella patologia oggetto della cura.

Esistono vari tipi di inibizione a seconda del substrato, dell'enzima o della sostanza inibitrice presenti nella reazione.

L'*inibizione competitiva* si verifica quando un enzima viene a contatto con un composto strutturalmente simile al suo substrato specifico: la somiglianza di struttura chimica dell'inibitore con il substrato "trae un inganno" l'enzima che si lega indifferentemente ad entrambi, in questo modo l'inibitore sottrae parte dell'enzima al substrato. Se denominiamo $[I]$ la concentrazione della sostanza inibitrice e k_I la costante di velocità nella trasformazione dall'enzima al composto enzima-inibitore:



La formula che descrive matematicamente il caso dell'inibizione competitiva :

$$v = \frac{V_{MAX} [S]}{k_M \left(1 + \frac{[I]}{k_I}\right) + [S]}$$

Sperimentalmente si rileva che l'inibitore induce un aumento della k_M globale (quindi diminuisce l'affinità dell'enzima per il substrato) ma non altera la V_{MAX} , come mostrato in fig.13.

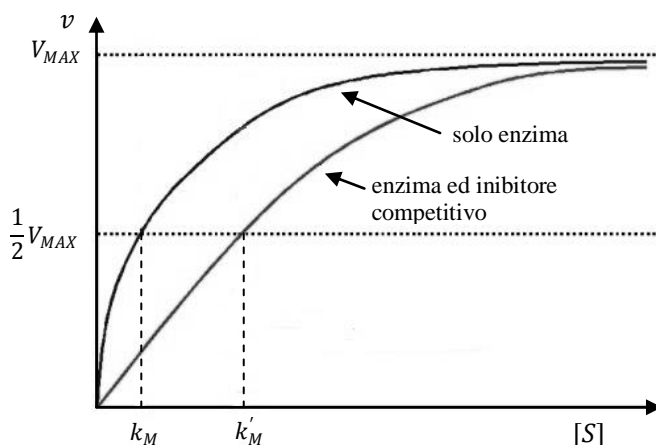


Fig. 13 - Inibizione competitiva

Molti farmaci esplicano la loro azione inibendo competitivamente precisi enzimi.

L'altro tipo di inibizione è quella *non competitiva*, nella quale la sostanza inibitrice si lega reversibilmente all'enzima ma non in corrispondenza del suo sito attivo: la nuova sostanza che si forma, tuttavia, non è in grado di catalizzare la reazione con il substrato.

L'equazione che esprime il legame della velocità di reazione con la concentrazione del substrato in presenza dell'inibitore I è la seguente:

$$v = \frac{\frac{V_{MAX}}{\left(1 + \frac{[I]}{k_I}\right)} [S]}{k_M + [S]}$$

In questo caso si osserva che l'inibizione non competitiva si traduce in una diminuzione della costante V_{MAX} mentre la k_M non viene alterata, come mostrano i grafici di fig. 14.

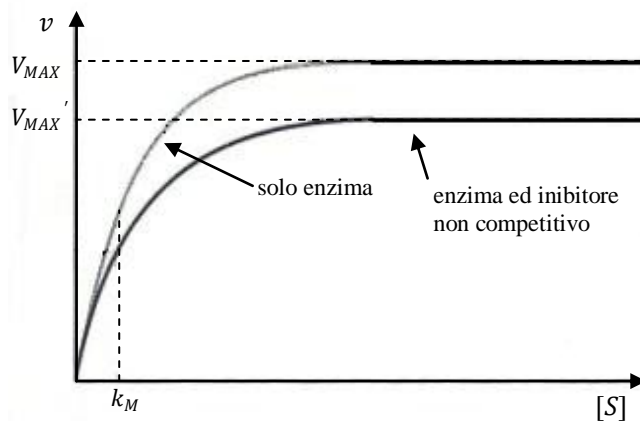


Fig. 14 - Inibizione non competitiva

Sono noti come inibitori non competitivi per molti enzimi dell'organismo umano alcuni metalli tossici quali il piombo ed il mercurio.

Per completezza va aggiunto che esiste anche il caso di inibizione *incompetitiva*, nella quale l'inibitore si lega solo con il composto *ES* (enzima-substrato), portando alla simultanea diminuzione delle costanti k_M e V_{MAX} .

Non è da trascurare infine il fatto che l'accumulo dei prodotti della reazione implica una progressiva inibizione dovuta sia alla diminuzione del substrato, sia all'aumento del prodotto di reazione. In questi casi i prodotti della reazione esplicano una particolare azione inibitrice di tipo competitivo.

Un altro importante fenomeno per la regolazione dell'attività di un enzima è quello dell'*allosterismo*. Gli enzimi suscettibili ad andare incontro a questo tipo di controllo sono detti enzimi allosterici, la cui attività può essere depressa o esaltata da specifici composti detti *effettori allosterici*. A differenza degli inibitori competitivi, gli effettori non si legano al sito attivo, ma ad un sito specifico detto sito allosterico.

Il cambiamento conformazionale indotto nella molecola enzimatica dall'effettore allosterico causa una variazione di affinità dell'enzima per il substrato e questa alterazione modifica la cinetica della reazione.

Gli enzimi allosterici, infatti, non sono caratterizzati dalla tipica cinetica descritta da *Michaelis-Menten*, ma esprimono una risposta del tipo sigmoideale, secondo l'equazione:

$$v = \frac{V_{MAX} [S]^n}{k_M + [S]^n}$$

dove n è la indice di cooperatività (costante di *Hill*): se $n=1$ non si ha nessuna cooperatività, per $n>1$ si ha cooperatività positiva altrimenti siamo nel caso di cooperatività negativa.

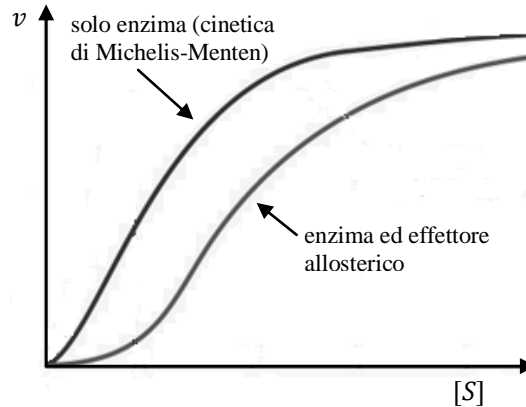


Fig. 15 - Modificazione allosterica, si osserva la risposta sigmoidale

A basse concentrazioni di substrato, l'aumento della v al crescere della $[S]$ è molto esiguo, mentre a più elevate concentrazioni di $[S]$ la velocità di reazione subisce un massiccio aumento progressivo per raggiungere asintoticamente il valore della V_{MAX} . La sigmoidicità della curva deriva dal fatto che le prime molecole di substrato si legano al sito attivo con una certa difficoltà, ma una volta legatesi, esse facilitano il legame delle successive molecole di substrato in corrispondenza degli altri siti attivi. Questo tipo di regolazione è molto comune nei processi metabolici degli organismi viventi.

APPENDICE: CINETICA CHIMICA

Una reazione chimica è classificabile secondo due criteri:

1. *molecolarità*: il numero di molecole implicate nella reazione;
2. *ordine*: comprendente la descrizione della cinetica della reazione e come i termini delle concentrazioni dei reagenti si combinano tra loro per ottenere l'espressione della velocità di reazione.

Le reazioni enzimatiche solitamente hanno ordini molto elevati ma lo studio degli ordini più bassi può essere ciononostante utile perché, come si è visto nel cap. 1, queste reazioni possono essere scomposte in passi molto elementari del I° o del II° ordine.

A.1 REAZIONI DEL I° ORDINE

In una reazione del I° ordine $A \xrightarrow{k} P$, la velocità di reazione v si esprime:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] = k([A_0] - [P])$$

dove k è la costante di reazione mentre $[A_0]$ è la concentrazione iniziale della sostanza A. Si può inoltre affermare che in ogni istante $[A] + [P] = [A_0]$.

Integrando l'espressione precedente:

$$\int \frac{d[P]}{[A]} = \int k dt \Rightarrow \int \frac{d[P]}{[A_0] - [P]} = kt + \alpha \Rightarrow -\ln([A_0] - [P]) = kt + \alpha ;$$

α è la costante di integrazione e può essere ricavata sapendo che all'inizio della reazione il prodotto P è nullo:

$$\text{se } t = 0 \Rightarrow [P] = 0 \Rightarrow \alpha = -\ln([A_0])$$

allora:

$$-\ln([A_0] - [P]) = kt - \ln([A_0]) \Rightarrow \ln\left(\frac{[A_0] - [P]}{[A_0]}\right) = -kt$$

nel tempo la concentrazione di P si può esprimere dunque:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-kt})$$

A.2 REAZIONI DEL II° ORDINE

Le reazioni del II° ordine sono quelle per cui la velocità di reazione è proporzionale al prodotto di due concentrazioni.

Una reazione di questo tipo può essere, ad esempio, $A + B \xrightarrow{k} P + Q$; la velocità di formazione del prodotto P risulta:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k([A_0] - [P])([B_0] - [P])$$

dove k è in questo caso la costante di reazione del II° ordine mentre $[A_0]$ e $[B_0]$ sono le concentrazioni iniziali dei reagenti A e B . Integrando questa espressione:

$$\int \frac{d[P]}{([A_0] - [P])([B_0] - [P])} = \int k dt$$

$$-\ln([A_0] - [P]) + \ln([B_0] - [P]) = ([B_0] - [A_0])kt + \alpha ;$$

α può essere ricavata come nel caso precedente e vale: $\alpha = -\ln([B_0]/[A_0])$

Sistemando l'equazione:

$$\ln\left(\frac{[A_0]([B_0] - [P])}{[B_0]([A_0] - [P])}\right) = ([B_0] - [A_0])kt \Rightarrow \frac{[A_0]([B_0] - [P])}{[B_0]([A_0] - [P])} = e^{([B_0] - [A_0])kt} ;$$

infine, se assumiamo $[A_0] \ll [B_0]$, ad ogni istante della reazione si avrà $[P] \ll [B_0]$ e l'equazione precedente si può semplificare:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-k[B_0]t})$$

Si è ricavata quindi un'espressione analoga a quella di una reazione del I° ordine, la costante $k[B_0]$ viene spesso chiamata "pseudo-costante" del primo ordine.

A.3 DETERMINAZIONE DELL'ORDINE DELLA REAZIONE

Il modo più semplice per determinare l'ordine di una reazione è misurare la velocità v alle diverse concentrazioni del reagente A .

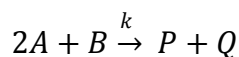
A questo punto si riporta in un grafico $\ln(v)$ sulle ordinate ed $\ln([A])$ in ascissa: la pendenza della retta che si ottiene è uguale all'ordine della reazione.

Se nella reazione intervengono più reagenti, la pendenza della retta è la somma complessiva degli ordini di ciascun reagente.

Per determinare l'ordine di ognuno di essi si fa variare la concentrazione di ogni reagente separatamente mantenendo costante la concentrazione degli altri e si riporta in un grafico $\ln(v)$ sulle ordinate ed $\ln([X])$ sulle ascisse, dove X è il reagente in esame.

Come nel caso precedente, la pendenza della retta che ne consegue altro non è che l'ordine del reagente in oggetto.

Ad esempio, nella reazione del secondo ordine in A e del primo ordine in B :



la velocità di formazione del composto P vale:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A]^2[B]$$

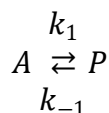
quindi:

$$\ln(v) = \ln(k) + 2 \ln([A]) + \ln([B])$$

Tracciando il grafico di $\ln(v)$ su $\ln([A])$ con $[B]$ tenuto costante, la retta risultante avrà pendenza due mentre nel caso di $\ln(v)$ su $([B])$ con $[A]$ costante la retta avrà pendenza unitaria.

A.4 REAZIONI REVERSIBILI

Molte reazioni chimiche sono reversibili, ovvero nella forma:



In questo caso la velocità di reazione si può scrivere:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_1([A_0] - [P]) - k_{-1}[P] = k_1[A_0] - (k_1 + k_{-1})[P]$$

questa equazione differenziale è del tipo già visto nei casi precedenti, dunque:

$$\int \frac{d[P]}{k_1[A_0] - (k_1 + k_{-1})[P]} = \int dt \Rightarrow \frac{\ln(k_1[A_0] - (k_1 + k_{-1})[P])}{-(k_1 + k_{-1})} = t + \alpha$$

ponendo $[P]=0$ quando $t=0$, si ricava come al solito $\alpha = \frac{-\ln(k_1[A_0])}{(k_1+k_{-1})}$ e si giunge:

$$\frac{k_1[A_0] - (k_1 + k_{-1})[P]}{k_1[A_0]} = e^{-(k_1+k_{-1})t} \Rightarrow [P] = \frac{k_1[A_0]}{k_1 + k_{-1}}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t})$$

che può essere scritta:

$$[P] = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t})$$

dove il valore $[P]_{\infty} = \frac{k_1[A_0]}{k_1+k_{-1}}$ è il valore della concentrazione di P dopo un tempo infinito, ad esempio all'equilibrio. Analoga trattazione può essere svolta per la concentrazione di A all'equilibrio: $[A]_{\infty}$.

Si ricorda infine che la costante di equilibrio della reazione reversibile vale:

$$K_{eq} = \frac{[P]_{\infty}}{[A]_{\infty}}$$

A.5 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI IN REAZIONI DEL I° ORDINE

Gran parte delle reazioni di interesse sono per ogni reagente del I° ordine ed in questi casi il problema di determinare la velocità di reazione si riduce al problema di ricavare le costanti di reazione k .

Nell'ipotesi più generale possibile di reazione reversibile:

$$[P] = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t}) \Rightarrow [P]_{\infty} - [P] = [P]_{\infty}e^{-(k_1+k_{-1})t};$$

si ha:

$$\ln([P]_{\infty} - [P]) = \ln([P]_{\infty}) - (k_1 + k_{-1})t$$

Riportando l'andamento di $\ln([P]_{\infty} - [P])$ in funzione del tempo si ottiene una retta di pendenza $-(k_1+k_{-1})$; combinando con il fatto che $[P]_{\infty} = \frac{k_1[A_0]}{k_1+k_{-1}}$ si può ricavare il valore di k_1 e k_{-1} .

Per poter essere affidabile, questo metodo necessita di un valore molto accurato di $[P]_{\infty}$, requisito piuttosto difficile da soddisfare nelle prove di laboratorio.

Si ottengono numerosi miglioramenti con il metodo di *Guggenheim* (1926) grazie al fatto che per determinare le costanti k non vi è la necessità della conoscenza di $[P]_{\infty}$.

Secondo questo criterio si misurano due set di valori $[P]_i$ e $[P]_i'$ al tempo t_i e t_i' tale che $t_i' = t_i + \tau$, dove τ è costante.

In questo modo:

$$[P]_{\infty} - [P]_i = [P]_{\infty}e^{-(k_1+k_{-1})t_i};$$

$$[P]_{\infty} - [P]_i' = [P]_{\infty}e^{-(k_1+k_{-1})(t_i+\tau)};$$

sottraendo si ottiene:

$$[P]_i' - [P]_i = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})\tau})e^{-(k_1+k_{-1})t_i};$$

passando ai logaritmi:

$$\ln([P]_i' - [P]_i) = \ln([P]_{\infty}) + \ln(1 - e^{-(k_1+k_{-1})\tau}) - (k_1 + k_{-1})t_i;$$

oppure, in base decimale:

$$\log([P]_i' - [P]_i) = c - \frac{(k_1 + k_{-1})t_i}{2,303}$$

Così il grafico di $\log([P]_i' - [P]_i)$ in funzione del tempo t_i risulta una retta di pendenza $-(k_1+k_{-1})/2.303$ come illustrato in fig. 16.

A questo punto, essendo facilmente stimabile in laboratorio il valore della costante di equilibrio K_{eq} :

$$K_{eq} = \frac{[P]_{\infty}}{[A]_{\infty}} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

le due costanti di reazione k_1 e k_{-1} possono essere determinate.

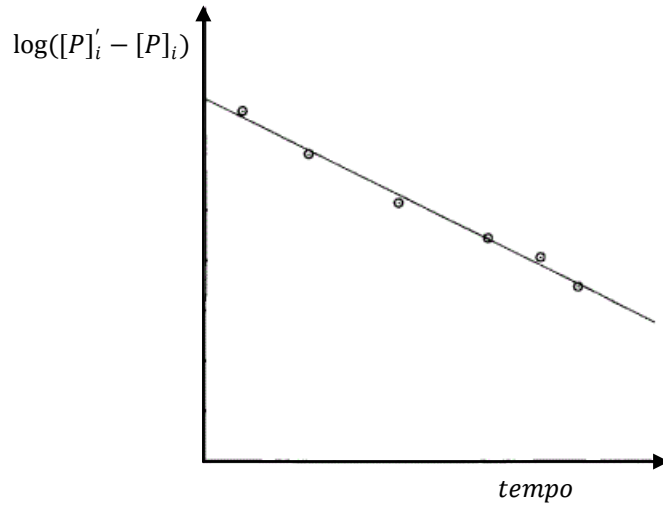


Fig. 16 - Diagramma di Guggenheim

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Cornish-Bowden: "Fundamentals of Enzyme Kinetics", Portland Press ;
- [2] W. Aehle: "Enzyme in Industry", Wiley-WCH ;
- [3] A. S. Bommarius, B. R. Riebel: "Biocatalysis", Wiley-WCH ;
- [4] A. Siliprandi, G. Tettamanti: "Biochimica medica", Piccin ed. ;
- [5] E. Fornasini, G. Marchesini: "Appunti di teoria dei sistemi", Libreria Progetto ed. ;
- [6] P. Atkins, J. de Paula: "Physical Chemistry for the Life Sciences", Oxford University press;
- [7] S. Carrà, L. Forni: "Aspetti cinetici della teoria del reattore chimico", Tamburini ed.