

## Determinazione delle legge di *Michaelis-Menten* con Minitab (Belluco Enzo - statistico)

### 1. Introduzione

La legge di *Michaelis-Menten* descrive l'andamento della velocità di una reazione catalizzata da enzimi, al variare della concentrazione del substrato e dall'enzima stesso. Questo modello, valido per enzimi non allosterici, fu proposto da *Leonor Michaelis* e *Maud Menten* nel 1913.

Il modello spiega come all'aumentare anche di poco della concentrazione del substrato disponibile all'enzima (di concentrazione supposta costante), la velocità della reazione aumenti vertiginosamente fino al raggiungimento di un valore massimo ( $V_{max}$ ) (fig. 1).

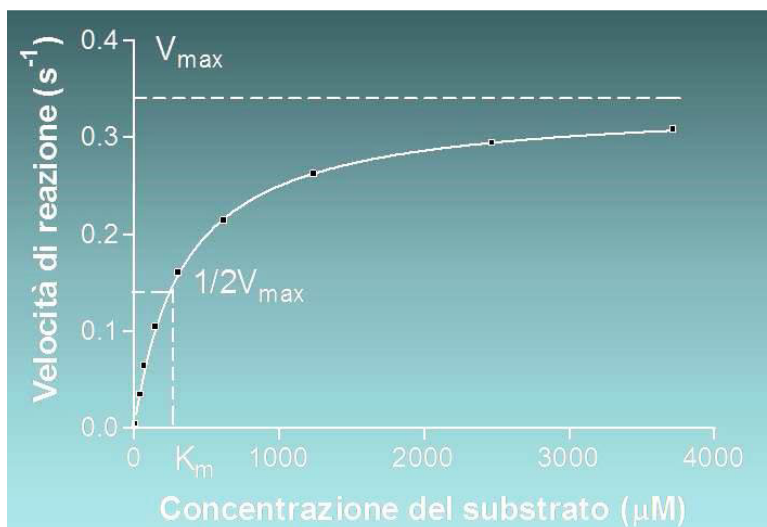


Fig. 1 - Rappresentazione grafica della legge di *Michaelis-Menten*

In formule:

$$Vel. = \frac{V_{max} \cdot Conc.}{K_m + Conc.}$$

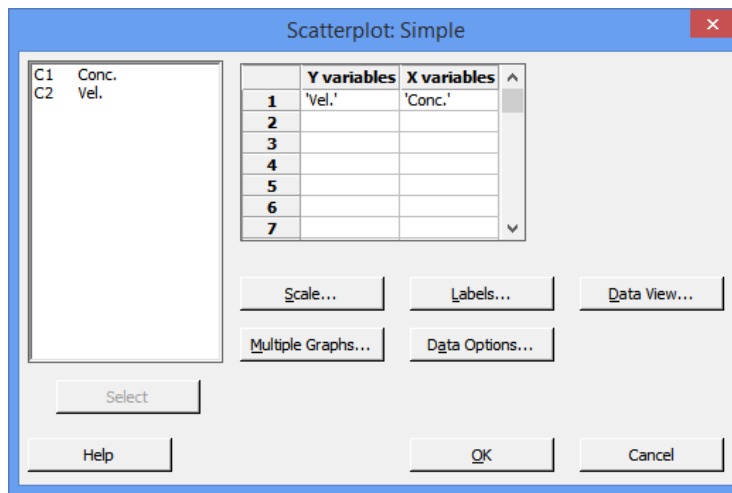
dove:

- *Conc.* = concentrazione di substrato;
- *Vel.* = velocità massima di reazione;
- $V_{max}$  e  $K_m$  parametri da determinare sulla base delle osservazioni empiriche.

### 2. Esempificazione

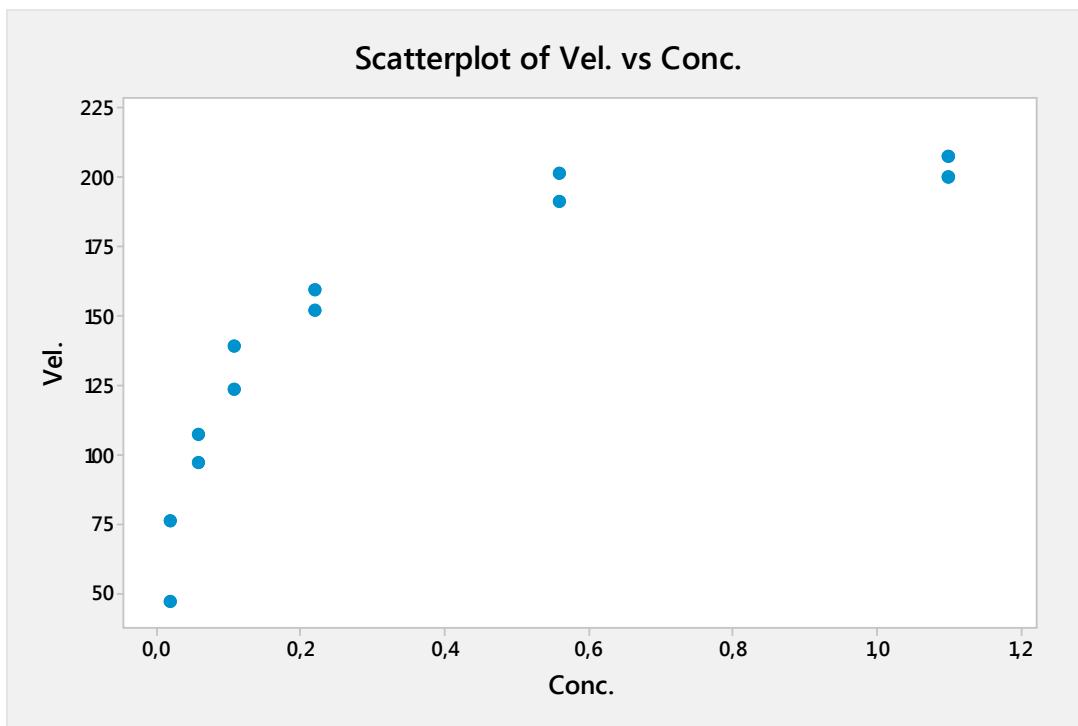
Nel worksheet **MMREGR** sono state registrate al variare della concentrazione di substrato, la velocità massima di reazione ottenuta. L'obiettivo è quello di implementare la legge di *Michaelis-Menten* utilizzando il comando **Nonlinear Regression** di Minitab.

Risulta utile, prima di tutto, una rappresentazione grafica del fenomeno osservato. Selezionare **Graph ► Scatterplot ► Simple**, in **Y Variables: Vel** e in **X Variables: Conc** (fig. 2):



**Fig. 2 - Scatterplot - Simple**

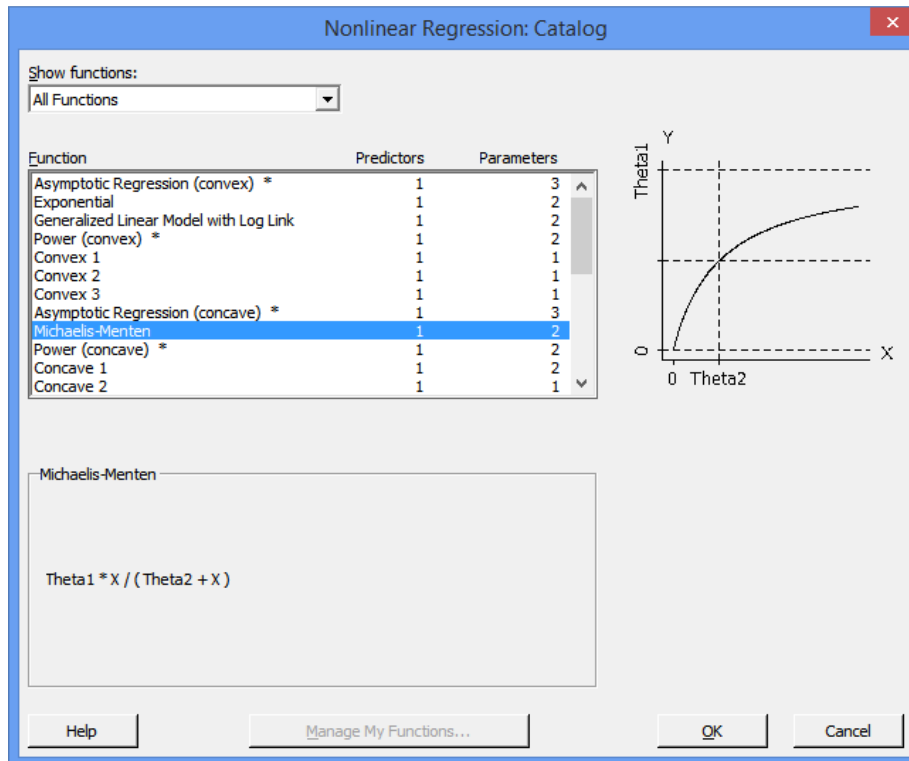
premendo **OK**, si ottiene (fig. 3):



**Fig. 3 - Scatterplot della velocità di reazione al variare della concentrazione di substrato**

Dall'esame del grafico (fig. 3) risulta che il fenomeno oggetto di studio può essere ben modellato dalla legge di *Michaelis-Menten*.

Selezionare **Stat ► Regression ► Nonlinear Regression**, premere il pulsante *Use Catalog*, quindi selezionare l'equazione di *Michaelis-Menten* (fig. 4):

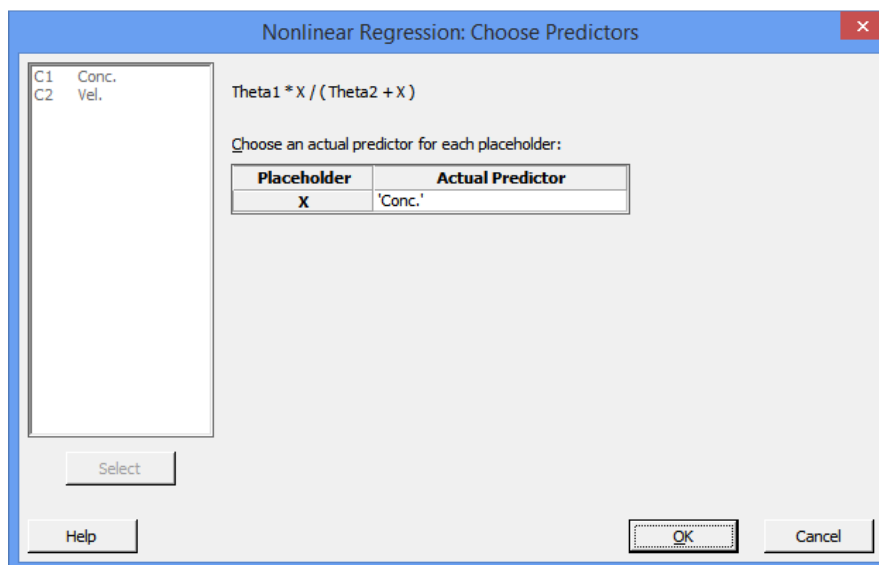


**Fig. 4 - Nonlinear Regression - Catalog**

Esaminando la fig. 4 si può notare dalla forma dell'equazione, che in Minitab:

- $V_{\max}$  corrisponde a Theta1;
- $K_m$  corrisponde a Theta2.

Dall'esame del grafico associato è immediato osservare come il parametro Theta1 rappresenti l'asintoto orizzontale e il parametro Theta2 la pendenza della curva. Premere OK, quindi in **Actual Predictor: Conc.** (fig. 5):



**Fig. 5 - Nonlinear Regression - Choose Predictors**

premere OK, in Response: Vel. (fig. 6):

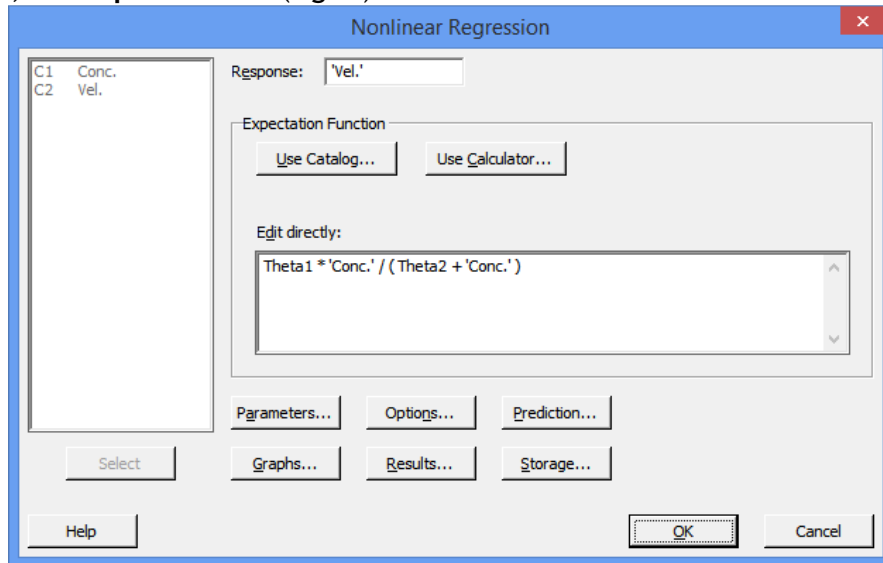


Fig. 6 - Nonlinear Regression

quindi, premere il pulsante **Parameters**. Per poter interpolare la curva Minitab utilizza algoritmi iterativi (*Gauss-Newton*, oppure *Levenberg-Marquardt*) che prevedono che l'utente indichi dei valori iniziali per i parametri (in questo caso Theta1 e Theta2). Tenendo conto di quanto indicato nella fig. 4 e nella fig. 3, è possibile ipotizzare Theta1 = 210 e Theta2 = 0,1. Quindi, in **Theta1: 210, Theta2: 0,1** (fig. 7):

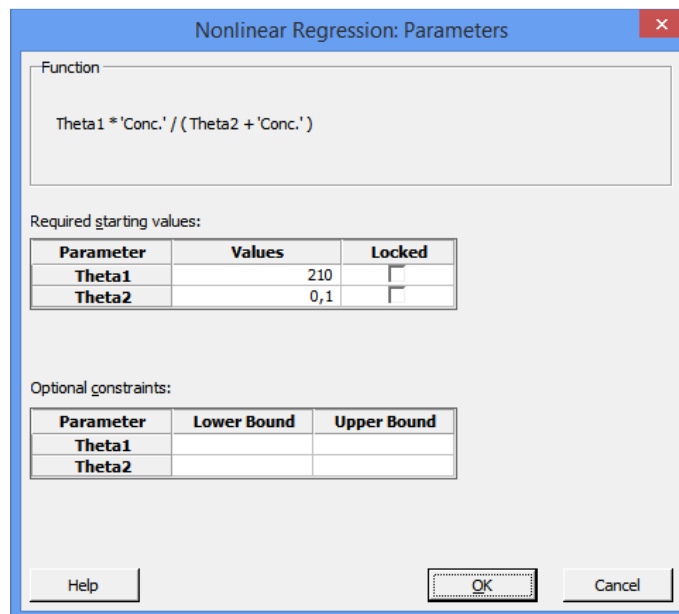


Fig. 7 - Nonlinear Regression - Parameters

Premendo ripetutamente OK, si ottiene (fig. 8, 9, 10):

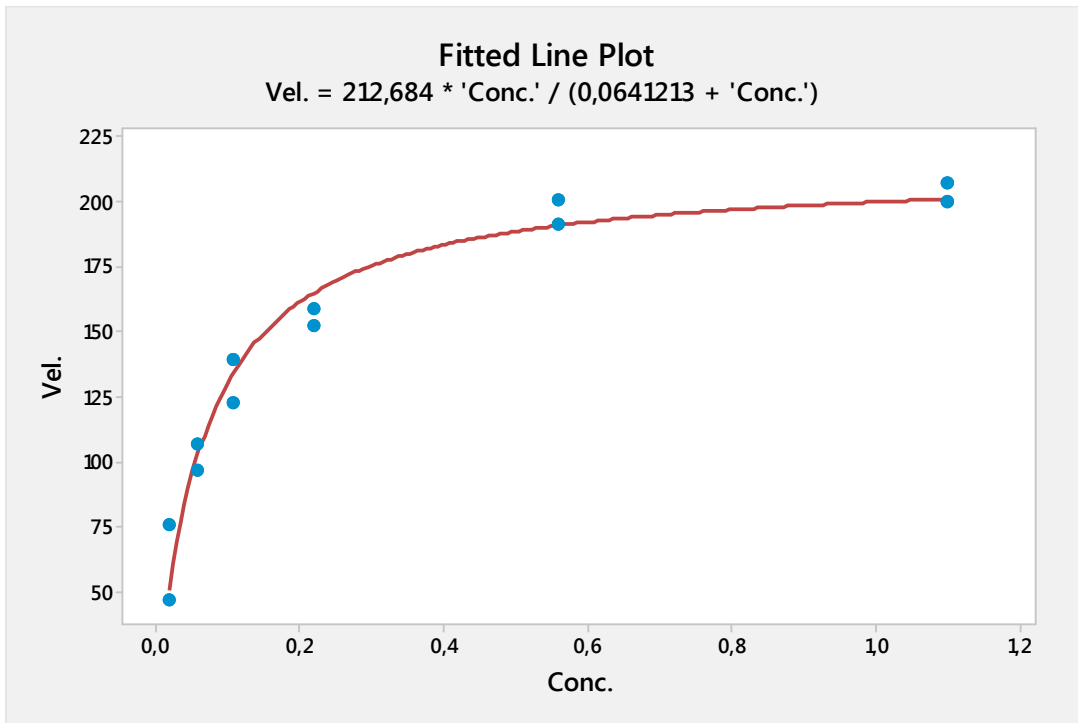


Fig. 8 - Fitted Line Plot

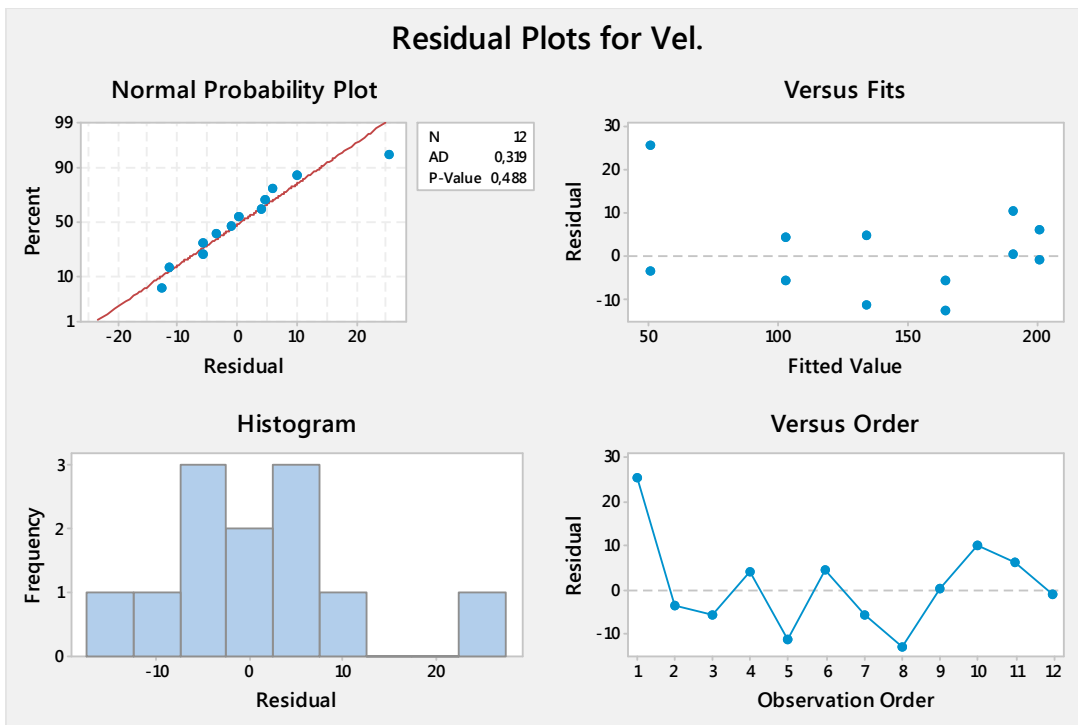


Fig. 9 - Residual Plot

Nonlinear Regression:  $Vel. = \text{Theta1} * 'Conc.' / (\text{Theta2} + 'Conc.')$

Method

Algorithm Gauss-Newton  
 Max iterations 200

Tolerance 0,00001  
Starting Values for Parameters

Parameter	Value
Theta1	210
Theta2	0,1

Equation

Vel. = 212,684 \* 'Conc.' / (0,0641213 + 'Conc.')

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	SE Estimate
Theta1	212,684	6,94716
Theta2	0,064	0,00828

Vel. = Theta1 \* 'Conc.' / (Theta2 + 'Conc.')

Lack of Fit

Source	DF	SS	MS	F	P
Error	10	1195,45	119,545		
Lack of Fit	4	497,95	124,487	1,07	0,447
Pure Error	6	697,50	116,250		

Summary

Iterations	8
Final SSE	1195,45
DFE	10
MSE	119,545
S	10,9337

**Fig. 10 - Session Window**

La fig. 8 riporta lo scatter plot delle due variabili, la rappresentazione grafica della funzione di *Michaelis-Menten* e l'equazione della stessa.

La fig. 9 i grafici dei residui.

La fig. 10 riporta:

- tabella del tipo di algoritmo utilizzato (**Method**), con il numero massimo di iterazioni e la tolleranza;
- tabella riportante i valori iniziali dei due parametri (**Starting Values for Parameters**);
- tabella riportante l'equazione determinata (**Equation**);
- tabella indicante le stime dei parametri (**Parameter Estimates**);
- tabella riportante i risultati del test **Lack of Fit** (per valutare eventuali curvature) e l'errore puro (**Pure Error**) che stima la variabilità nel caso di misure ripetute;

- tabella riepilogativa (**Summary**) che riporta il numero di iterazioni che sono state necessarie all'algoritmo per determinare una soluzione, la somma dei quadrati finale dell'errore (**Final SSE**), i gradi di libertà associati all'errore (**DFE**), l'errore quadratico medio (**MSE**) e la valutazione della dispersione complessiva ottenuta dai dati (**S**).