

TEKBIOFARM

SCIENZE, TECNOLOGIE E BIOTECNOLOGIE
PER L'INDUSTRIA DEL FARMACO

Direttore

Silvio Massimo LAVAGNA

Sapienza – Università di Roma

UNILAB S.a.S di Lavagna Silvio Massimo & Co.

Comitato scientifico

Manrico BERNARDINI

Special Product's Line, Unilab Biotech

Roberta VENTURI

Special Product's Line, Menarini Biotech

Daniela SECCI

Sapienza – Università di Roma

TEKBIOFARM

SCIENZE, TECNOLOGIE E BIOTECNOLOGIE
PER L'INDUSTRIA DEL FARMACO



L'unicità può essere il prodotto di processi
che sono essi stessi comuni a tutta la materia vivente.

Robert FOLEY

La collana è indirizzata agli operatori del mondo dell'industria farmaceutica che operano in sinergia con il mondo accademico. Accoglie e promuove opere relative ai settori scientifico disciplinari Farmaceutico tecnologico applicativo, Chimico farmaceutico, Chimico industriale, Biochimico, Biologico farmaceutico, Biotecnologico.

La collana si struttura in ventuno moduli e ciascuno di essi è composto da un numero variabile di monografie, al fine di armonizzare le tematiche trattate e per rendere più snella e accessibile la consultazione. La divisione è stata scelta per offrire contenuti sempre aggiornati e in costante evoluzione, nel pieno rispetto di quanto le normative nazionali ed europee indicano per l'intero settore.

MODULI TEMATICI

1. Farmaci biologici e biosimilari.
2. Biochimica, biochimica industriale e biotecnologie.
3. Specialità farmaceutiche solide orali.
4. Specialità iniettabili liofilizzate.
5. Specialità farmaceutiche per uso topico.
6. Impianti e tecnologie per la produzione di A.P.I. (Principi Attivi Farmaceutici).
7. Impianti per la produzione di specialità farmaceutiche per via fermentativa.
8. Ingegneria Farmaceutica.
9. Sviluppo e validazione dei metodi analitici.
10. Automazione e controllo di processo negli impianti HVAC.
11. Ambiente, sicurezza ed igiene industriale.
12. Utilities Farmaceutiche.
13. Clean rooms e classificazioni delle aree in accordo alle GMPs (Good Manufacturing Practices).
14. Rabs, Isolatori e manipolazione di A.P.I. heigh potency.
15. Validation Master Plan.
16. Cleaning in Place e metodi di pulizia e sanitizzazione.
17. Studio dei layouts e dei flussi del personale, delle materie prime, degli intermedi e dei prodotti finiti.
18. Magazzini di stoccaggio in/out.
19. Tecnologie e macchinari di processo.
20. Preparazioni iniettabili liquide ed acqua per uso farmaceutico.
21. Normativa di riferimento e bibliografie.



Vai al contenuto multimediale

Gli enzimi e l'industria

Tendenze innovative in biocatalisi

MODULO 2

VOLUME 2

a cura di

Marco Piumetti
Cristina Pagliano

Contributi di

Miriam Aisa, Mara Arduino
Alessandro Asaro, Anna Barale
Gaspare Bellomo, Federica Beraudo
Emanuele Berruto, Giulia Bucca
Giuseppe Carrieri, Carlotta Caruso
Dario Giovanni Casà, Andrea Cassani
Leonardo Clemente, Nicola Cocco
Giovanni Antonio Cuffaro, Piera Di Prima
Beatrice Ferro, Ylenia Foddi
Carla Giacobino, Paolo Giorsello
Giulia Iannello, Yuri Kitamukai Alexandre
Gianluca Mancino, Cristina Manera
Sonia Martinez, Isabella Miniotti
Alberto Novello, Francesco Novo
Ivano Operti, Cristina Pagliano
Claudia Paribello, Marco Piumetti
Giacomo Ribotta, Marcello Rospiccio
Gabriele Ruggiero, Lorenzo Santese
Luigi Antonio Sequi, Emilia Tardanico
Astrid Tavolaro, Corinne Trabbia
Alessio Truncali, Andrea Antonio Vazzana





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it

info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXVIII

Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it

info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20

00020 Canterano (RM)

(06) 45551463

ISBN 978-88-255-2113-9

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: dicembre 2018

Indice

- 9 Introduzione
Marco Piumetti, Cristina Pagliano
- 11 La complessità dei sistemi biologici
Marco Piumetti
- 21 Dalla struttura tridimensionale degli enzimi alla ingegnerizzazione di nuovi biocatalizzatori
Cristina Pagliano
- 31 Studi meccanicistici di inibizione enzimatica: teoria e applicazioni tecnologiche
Giulia Bucca, Isabella Miniotti, Andrea Antonio Vazzana
- 51 Immobilizzazione degli enzimi: tecniche e applicazioni
Emanuele Berruto, Carlotta Caruso, Andrea Cassani, Beatrice Ferro
- 73 L'impiego della logica fuzzy nella gestione dei processi biotecnologici
Leonardo Clemente, Alberto Novello
- 89 Il lisozima: proprietà chimico-fisiche e applicazioni
Alessandro Asaro, Gaspare Bellomo, Carla Giacobino, Gabriele Ruggiero
- 105 Strategie per la produzione di insulina
Mara Arduino, Anna Barale, Francesco Novo, Ivano Operti
- 121 Enzimi utilizzati nei processi estrattivi di gas e petrolio
Giuseppe Carrieri, Paolo Giorsello, Yuri Kitamukai Alexandre, Astrid Tavolaro

- 135 Produzione di biodiesel da microalghe
Miriam Aisa, Federica Beraudo, Giacomo Ribotta, Marcello Rospiccio
- 153 Produzione di biometano da rifiuti organici
Dario Giovanni Casà, Giovanni Antonio Cuffaro, Piera Di Prima, Alessio Truncali
- 175 Tecnologie enzimatiche per l'estrazione dell'olio da matrici vegetali alimentari
Nicola Cocco, Ylenia Foddi, Cristina Manera, Emilia Tardanico
- 191 Applicazione degli enzimi nell'industria tessile
Giulia Iannello, Gianluca Mancino, Lorenzo Santese, Corinne Trabbia
- 207 Enzimi attivi a basse temperature nei detergenti: panoramica e prospettive
Sonia Martinez, Claudia Paribello, Luigi Antonio Sequi

Introduzione

MARCO PIUMETTI, CRISTINA PAGLIANO

Negli ultimi decenni diverse metodologie didattiche sono state introdotte nell'istruzione media, superiore e universitaria per consentire un miglior apprendimento da parte degli studenti. In particolare, sono state proposte tassonomie degli obiettivi educativi e didattici che prevedono una classificazione sistematica fondata sulla descrizione di comportamenti pedagogici d'insegnamento-apprendimento. Tra queste, la tassonomia degli obiettivi educativi ideata da Benjamin Bloom (1956) è considerata una delle più interessanti. La tassonomia di Bloom, rivisitata da Anderson e Krathwohl nel 2001, identifica un sistema gerarchico dei livelli di apprendimento in cui gli obiettivi educativi sono disposti su una struttura piramidale secondo un ordine crescente di complessità: *ricordare, comprendere, applicare, analizzare, valutare e creare*. Secondo tale struttura, il vertice della piramide, ovvero il più elevato grado di apprendimento, lo si può ottenere nel momento in cui lo studente agisce mettendo insieme diversi elementi per realizzare un prodotto originale o un nuovo punto di vista, attingendo da informazioni, concetti ed esperienze passate. Sulla base di tali considerazioni didattico-pedagogiche, questo testo è stato realizzato unendo i contributi scientifici elaborati in gruppo dagli studenti iscritti al corso di Biochimica Industriale, tenutosi al Politecnico di Torino nell'anno accademico 2017-2018, per il corso di laurea magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili. Gli studenti hanno partecipato attivamente alla realizzazione di articoli originali approfondendo lo studio di specifiche tematiche inerenti alla biochimica industriale proposte durante le lezioni in aula. La raccolta dei vari contributi ha permesso di realizzare un testo introduttivo alle recenti applicazioni della biochimica e dei potenziali sviluppi nei diversi settori industriali. Inoltre, i due capitoli introduttivi, riguardanti aspetti più generali della biochimica, permettono al lettore di familiarizzare con tali tematiche. Infine, un particolare ringraziamento va a coloro che al Politecnico di

Torino hanno incentivato e consentito la realizzazione del libro: la Prof.ssa Debora Fino, il Prof. Raffaele Pirone ed il Prof. Antonello Barresi.

La complessità dei sistemi biologici

MARCO PIUMETTI

1. Introduzione

Gli organismi viventi sono costituiti da strutture biologiche, le cellule, in grado di svolgere le funzioni tipiche dei viventi, quali nascere, nutrirsi, crescere, riprodursi ed infine morire. Ciascuna cellula presenta un'organizzazione interna complessa, in cui differenti componenti individuali interagiscono in un sistema dinamico.

Gli organismi più semplici sono formati da cellule singole come ad esempio i batteri, i protozoi, diverse specie di alghe ed i lieviti. Il batterio, una delle forme di vita più semplici che si possa immaginare, contiene una parete cellulare composta da peptidoglicani, al di sotto della quale è presente la membrana cellulare, un'importante struttura biologica su cui sono presenti degli enzimi che rendono possibili i processi metabolici indispensabili per la vita del microrganismo a temperature relativamente basse. Gli organismi pluricellulari, quali le piante, gli animali e molti funghi, sono costituiti da numerose cellule in grado di comunicare tra loro mantenendo così l'equilibrio fisiologico dell'intero organismo [1]. Infatti, la comunicazione intercellulare coordina le attività tra cellule rendendo possibili diversi processi fisiologici come la risposta immunitaria, la crescita e l'omeostasi. D'altro canto, è ben noto che difetti di comunicazione tra le cellule possono dar luogo allo sviluppo di numerose patologie [2].

2. Proprietà emergenti, adattative ed auto-organizzanti

L'organismo vivente può essere immaginato come un sistema dinamico, un insieme di più elementi reciprocamente interconnessi ed interagenti tra loro e con l'ambiente esterno. Tale sistema si comporta come un tutt'uno, mantenendo l'equilibrio complessivo fra le parti che lo

costituiscono. In altri termini, l'organismo è un sistema dinamico costituito da più sottosistemi (organi, tessuti, cellule, ecc.) interagenti (o in relazione funzionale) tra loro.

L'uomo, l'organismo vivente più complesso presente sul Pianeta, è costituito da circa cento miliardi di cellule differenziate tra loro dal punto di vista morfologico e funzionale. Le varie cellule sono organizzate in tessuti che formano gli organi. Gli organi costituiscono gli apparati e questi, a loro volta, s'integrano per formare l'organismo vivente. Negli organismi viventi si hanno tipicamente dei comportamenti collettivi emergenti che derivano dall'interazione non lineare tra le parti che li compongono. Da tali sistemi scaturiscono delle proprietà macroscopiche difficilmente predicibili dalle leggi che governano le singole componenti. Tuttavia, non è soltanto il numero delle relazioni tra le singole componenti a favorire la comparsa di comportamenti emergenti ma anche la loro organizzazione strutturale. Esso scaturisce dunque dalle interazioni lineari e non-lineari tra le varie componenti (Figura 1) [3,4]. Le strutture emergenti sono il risultato delle interazioni di ogni parte con il suo intorno, favorendo così la comparsa di un ordine nel sistema. Appare difficile descrivere e prevedere il comportamento dei sistemi biologici, ovvero di sistemi in cui siano presenti più organismi interagenti tra loro. Tuttavia, fanno ovviamente parte dei sistemi biologici anche tutte le componenti degli organismi, ovvero gli organi, i tessuti, le cellule, i nuclei, il DNA, le proteine, ecc.). La forma e il comportamento di una colonia batterica, di uno stormo di uccelli o di un branco di pesci sono esempi di proprietà collettive emergenti in sistemi biologici.

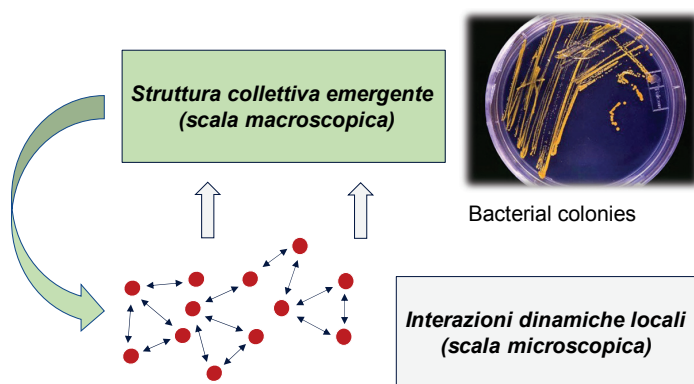


Figura 1. Interdipendenza dinamica tra elementi a livello microscopico e struttura globale emergente a livello macroscopico. Adattata da [4].

Un sistema biologico manifesta delle leggi proprie che derivano dall'interazione non lineare di più componenti e che costituiscono un'unica entità dinamica, organizzata e capace di adattarsi all'ambiente. Già Wheeler nel 1911 osservò come organismi apparentemente indipendenti possano collaborare così strettamente da divenire indistinguibili da un unico organismo, che egli definì “super-organismo” [5].

I sistemi biologici presentano proprietà adattative. Infatti, sono reattivi a stimoli esterni e tendono ad adattarsi all'ambiente [6,7]. Un'altra importante proprietà dei sistemi biologici è che mostrano fenomeni auto-organizzanti, in cui si ha la tendenza spontanea ad organizzarsi in strutture via via più ordinate, differenziate e complesse.

Una proteina, per esempio, è una molecola in cui vengono convenzionalmente distinti vari livelli di autorganizzazione, che derivano dalla natura stessa della proteina (Figura 2). Similmente, nel corso dell'evoluzione, le specie viventi si sono progressivamente differenziate tra loro, quindi autorganizzate.

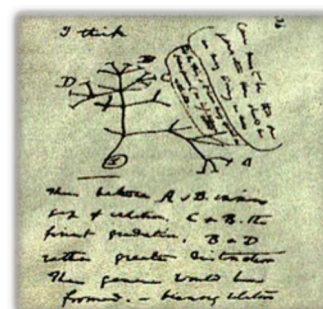
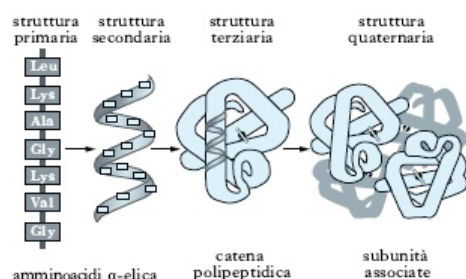


Figura 2. Autorganizzazione di una proteina (sinistra) Fonte: Treccani (www.treccani.it). Schematizzazione di Charles Darwin rappresentante “l'albero della vita”, l'organizzazione delle specie viventi in strutture sempre più complesse e differenziate tra loro come risultato dell'evoluzione.

Un'importante struttura collettiva emergente dei sistemi biologici, aventi proprietà autorganizzanti ed adattative, è l'intelligenza collettiva. Quest'ultima, infatti, deriva dalla presenza di un elevato numero di organismi che interagiscono tra loro e si autorganizzano per meglio adattarsi all'ambiente.

3. La biologia dei sistemi

La biologia dei sistemi considera gli organismi viventi come dei sistemi dinamici interagenti con l'ambiente e che evolvono nel tempo. Tali sistemi possono essere descritti con leggi matematiche e specifiche caratteristiche fisiche in quanto devono mantenere le condizioni di equilibrio dinamico. Diverse strutture biologiche, come le macromolecole, le cellule, i tessuti, gli organi e gli apparati possono interagire tra di loro in modo da svolgere e funzioni vitali per un organismo vivente che singolarmente non riuscirebbero ad eseguire, generando un sistema più complesso, avente un'organizzazione gerarchica multi-scala. Ciascuna struttura (sottosistema) fornisce il proprio contributo per la finalità del sistema stesso.

Il grado di ordine intrinseco a un organismo vivente è significativamente più elevato di quello di un cristallo. In questo ordine strutturale “quasi perfetto” gli enzimi, i catalizzatori biologici per eccellenza, consentono di far avvenire le reazioni metaboliche a temperature compatibili con la vita. Senza la presenza degli enzimi la vita, così per come la conosciamo, non sarebbe possibile.

Il funzionamento di un qualunque organismo vivente deve soggiacere alle leggi fisiche. La vita sembra dipendere da un comportamento ordinato e retto da rigorose leggi della materia, non basato esclusivamente dalla tendenza di quest'ultima di passare dall'ordine al disordine (aumento dell'entropia) ma sulla conservazione dell'ordine esistente. Ciò è possibile, dal punto di vista termodinamico, in quanto gli organismi viventi sono dei sistemi aperti che scambiano energia e materia con l'ambiente [8].

Gli organismi, inoltre, sono delle strutture dissipative cioè sistemi termodinamicamente aperti che lavorano in uno stato lontano dall'equilibrio termodinamico scambiando con l'ambiente energia, materia e/o entropia. I sistemi dissipativi sono caratterizzati dalla formazione spontanea di anisotropia, ossia di strutture ordinate e complesse [9].

Il metabolismo di una cellula è il risultato dell'accoppiamento dei processi “spontanei” del catabolismo ed i processi “non spontanei” dell'anabolismo. Nei termini della termodinamica del non equilibrio, il metabolismo mantiene l'ordine, creando disordine.

D'altro canto, le leggi della fisica e della chimica sono inaccurate con un errore relativo dell'ordine di $1/\sqrt{n}$ dove n rappresenta il numero degli elementi coinvolti. Ciò significa che un organismo vivente

deve avere un elevatissimo numero di componenti (molecole, ioni, ...) per poter beneficiare di leggi accurate che garantiscano la sua sopravvivenza [8].

4. L'azione del caso e della necessità

Nel 1970 Jacques Monod introduce il concetto di teleonomia che prevede il finalismo insito negli organismi viventi per effetto della selezione naturale [10]. Per Monod, infatti, una delle proprietà fondamentali di tutti gli organismi viventi è quella di essere dotati di un progetto, la teleonomia, rappresentato nelle loro strutture e realizzato attraverso le loro prestazioni. Tale progetto consiste nella conservazione e moltiplicazione della specie, attraverso la trasmissione da una generazione all'altra del contenuto genetico. Ciascuna struttura teleonomica rappresenta una quantità data di informazione che viene trasmessa identica ad un'altra struttura. Tale caratteristica, essenziale degli organismi, si chiama riproduzione invariante o invarianza riproduttiva. L'invarianza riproduttiva conserva e genera strutture ordinate. Tuttavia, nonostante le proprietà di teleonomia e invarianza riproduttiva le specie evolvono. Ciò avviene principalmente per effetto di mutazioni fortuite, accidentali, su strutture teleonomiche dotate di invarianza, in grado cioè di conservare le mutazioni del DNA e quindi di inscrivere ciò che è opera del caso nella propria struttura genetica.

Il caso spiega le alterazioni accidentali delle sequenze di polinucleotidi che formano il codice genetico. D'altra parte, le alterazioni casuali possono essere conservate, riprodotte e moltiplicate dall'organismo secondo la necessità della teleonomia e dell'invarianza riproduttiva. Ciò significa che quando una mutazione viene acquisita dalla struttura genetica negli organismi, diviene una necessità. L'evoluzione è il risultato dell'effetto combinato del caso e della necessità: il caso delle variazioni e la necessità delle leggi della selezione naturale che agiscono su scala macroscopica, ovvero considerando l'organismo interagente con l'ambiente.

La selezione naturale agisce attraverso le mutazioni per favorire lo sviluppo di organismi integrati nell'ambiente: ogni nuova mutazione tende ad alterare questo equilibrio e quindi ha più probabilità di essere dannosa, anziché utile. Le mutazioni utili consentono tuttavia l'evoluzione delle specie. Pertanto, nel corso del tempo, ciascuna specie ha progressi-

vamente perfezionato il proprio corredo genetico altamente specializzato. Ogni organismo vivente costituisce l'ultimo anello di una catena di avvenimenti avvenuti per circa quattro miliardi d'anni di evoluzione. Se si considera un batterio che si riproduce circa ogni 20 minuti, così come avviene per *Escherichia coli*, si osserva che la crescita della popolazione batterica seguirà una legge di tipo esponenziale 2^n , dove n rappresenta il numero di generazioni. Ciò significa che in un giorno la popolazione sarà composta da circa 10^{21} nuovi batteri, equivalenti a 72 generazioni. Considerando che statisticamente si manifesta una mutazione ogni 10 milioni di batteri per generazione (10^{-7} mutazioni per replicazione cellulare), si hanno circa 10^{14} batteri con mutazioni in un giorno. I batteri possono quindi facilmente adattarsi all'ambiente. Questo spiega, almeno in parte, il fenomeno dell'elevata resistenza agli antibiotici da parte dei batteri, uno dei più grandi problemi di sanità pubblica nel mondo. L'uso spropositato degli antibiotici, soprattutto nei paesi occidentali, ha favorito la selezione di alcuni ceppi di batteri resistenti ai trattamenti, alcuni dei quali addirittura tolleranti alla maggior parte di antibiotici attualmente a disposizione.

5. Il metabolismo e le strutture enzimatiche

Gli organismi viventi sono macchine chimiche molto sofisticate. Per la loro crescita e riproduzione sono necessarie delle reazioni biochimiche in grado di fornire i costituenti essenziali per le cellule. Il metabolismo di una singola cellula include, infatti, una complessa rete di reazioni ed è strutturato secondo un gran numero di vie metaboliche (divergenti, convergenti o cicliche) coinvolte in processi di anabolismo o catabolismo (Figura 3).

I singoli step della via metabolica sono caratterizzati da reazioni che avvengono, nella maggior parte dei casi, in presenza di enzimi in grado di convertire il substrato (reagente) in prodotto, utilizzato a sua volta come substrato dall'enzima coinvolto nello step successivo.

Si può avere una catena metabolica nel caso in cui ci siano delle reazioni in sequenza, ovvero il prodotto della prima reazione diventa reagente della seconda, il cui prodotto è reagente della terza, e così via. Se il prodotto dell'ultima reazione del processo costituisce il reagente della prima reazione, allora la via metabolica prende il nome di ciclo metabolico.

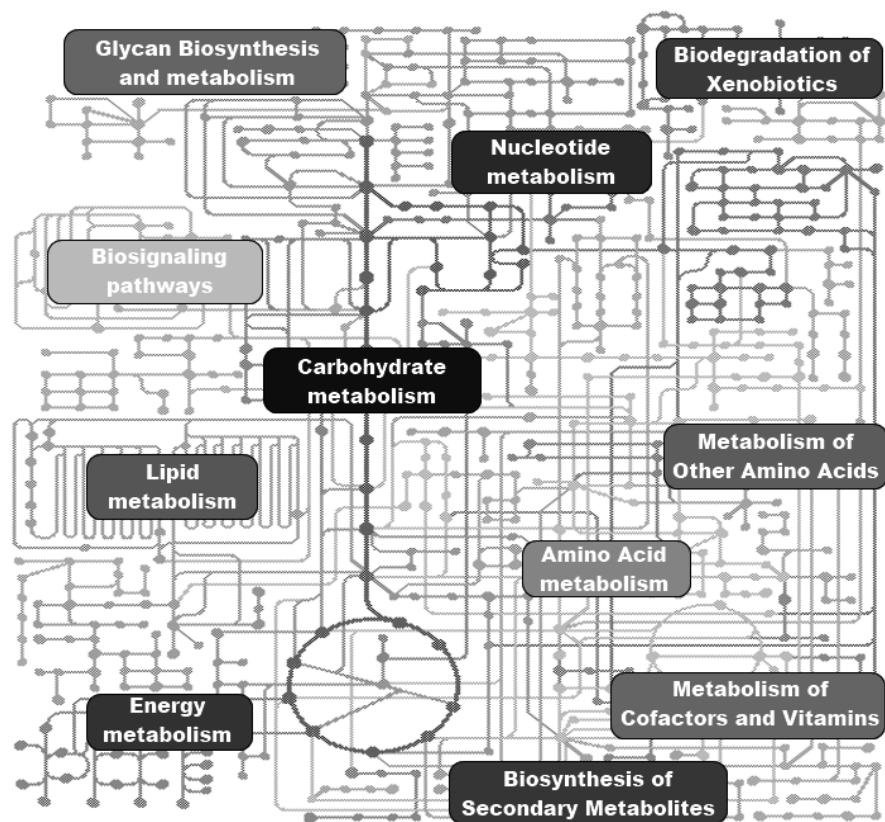


Figura 3. Schematizzazione della complessità del metabolismo cellulare. Fonte: KEGG.

L'efficienza del metabolismo di un organismo è garantita da una particolare classe di proteine, gli enzimi, in grado di agire da catalizzatori biologici sulla maggior parte dei processi metabolici: non solo instaurano delle interazioni ioniche ed elettrostatiche con il substrato abbassando l'energia di attivazione di una reazione, ma riconoscono anche il substrato al quale legarsi, grazie alla stereo-specificità del sito catalitico (Figura 4). L'enzima incrementa la cinetica delle reazioni biochimiche senza intervenire sulla termodinamica, consentendo unicamente di ridurre l'energia di attivazione. Inoltre, così come avviene per un catalizzatore “di sintesi” utilizzato nell'industria chimica, l'enzima non viene consumato durante il corso della reazione.

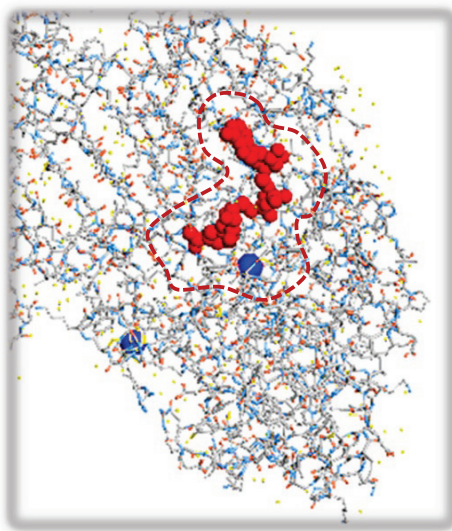


Figura 4. Schematizzazione del sito catalitico di un enzima.

La differenza principale degli enzimi dai catalizzatori di sintesi è la loro elevata specificità verso il substrato. Gli enzimi, infatti, sono in grado di catalizzare solo una reazione, o pochissime reazioni simili, poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico ed è sensibile anche a piccole differenze strutturali di tipo geometrico ed elettronico. L'energia del legame che si instaura deriva non solo da eventuali legami covalenti, ma anche da una fitta rete di interazioni deboli, ioniche o elettrostatiche. Inoltre, gli enzimi presentano delle strutture relativamente flessibili, in cui il sito attivo può continuamente modificarsi ed adattarsi all'ambiente ed alla presenza o meno del substrato. Il substrato interagisce con un sito attivo flessibile, che si adatta durante l'interazione con il substrato secondo modello dell'adattamento indotto proposto da Koshland [11].

6. Conclusioni

I sistemi biologici mostrano tipicamente dei comportamenti collettivi emergenti che derivano dall'interazione non-lineare tra i singoli organismi. Tali sistemi hanno proprietà autorganizzanti in quanto diverse parti tendono spontaneamente ad organizzarsi in strutture via via più ordinate e differenziate tra loro. Presentano, inoltre, proprietà adattative in quan-

to possono facilmente adattarsi all'ambiente. Ciò significa i sistemi biologici, dalle colonie batteriche agli organismi più evoluti, possiedono un'intelligenza collettiva, una forma di intelligenza distribuita, presente sin dagli esordi della vita sul Pianeta.

Riferimenti bibliografici

- [1] HINE RS., *A dictionary of biology* (6th ed.). Oxford: Oxford University Press. p. 461, 2008.
- [2] HELMREICH E.J.M. *The Biochemistry of Cell Signalling*, Oxford University Press, p. 368 2001.
- [3] ANDERSON P. W., *More is different*, Science, New Series, 177, 4047, 1972.
- [4] WALLEZCEK J., *Self-organized biological dynamics & nonlinear control*, Cambridge University Press, p. 428, 2000.
- [5] WHEELER W.M., The ant-colony as an organism, J. Morphol., 2012, 22, pp. 307-325.
- [6] MILLER, J.H., SCOTT E. *Complex adaptive systems: an introduction to computational models of social life*, Princeton University Press, 2007.
- [7] LANSING S. *Complex Adaptive Systems*, Annual Review of Anthropology, 32, 183-204, 2003.
- [8] SCHRODINGER E. *What is life*, Cambridge University Press 1944.
- [9] NICOLIS G., PRIGOGINE I., *Self-Organization in non-equilibrium systems*, Wiley-VCH, New York, 1977.
- [10] MONOD J., *Il caso e la necessità*, Milano, Mondadori, 2001.
- [11] KOSHLAND D. *The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory*, Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33, pp. 2375-237.

