

Ενζυμική

Κινητική

- Ως **ενζυμική μονάδα** ορίζεται η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για να μετατραπεί 1 μmol συγκεκριμένου υποστρώματος/min υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες (συνήθως 25°C).
- Ο παραπάνω ορισμός είναι αποδεκτός σε εργαστηριακή κλίμακα, δεν ικανοποιεί, όμως, πλήρως τη βιομηχανία, καθώς:
 1. Πολλές φορές, σε βιομηχανικές εφαρμογές δεν είναι πλήρως καθορισμένες η συγκέντρωση και η δομή του υποστρώματος,
 2. Η θερμοκρασία της διεργασίας είναι υψηλότερη των 25°C (επίτευξη καλύτερης διαλυτότητας υποστρώματος, θερμοανθεκτικά ένζυμα, κλπ).
 3. Το βέλτιστο pH της ενζυμικής αντίδρασης πολλές φορές διαφέρει σε υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με τους 25°C .
- Ως **παραγωγικότητα** ορίζεται η ποσότητα προϊόντος, η οποία παράγεται υπό καθορισμένες συνθήκες/μονάδα βάρους ενζυμικού παρασκευάσματος.

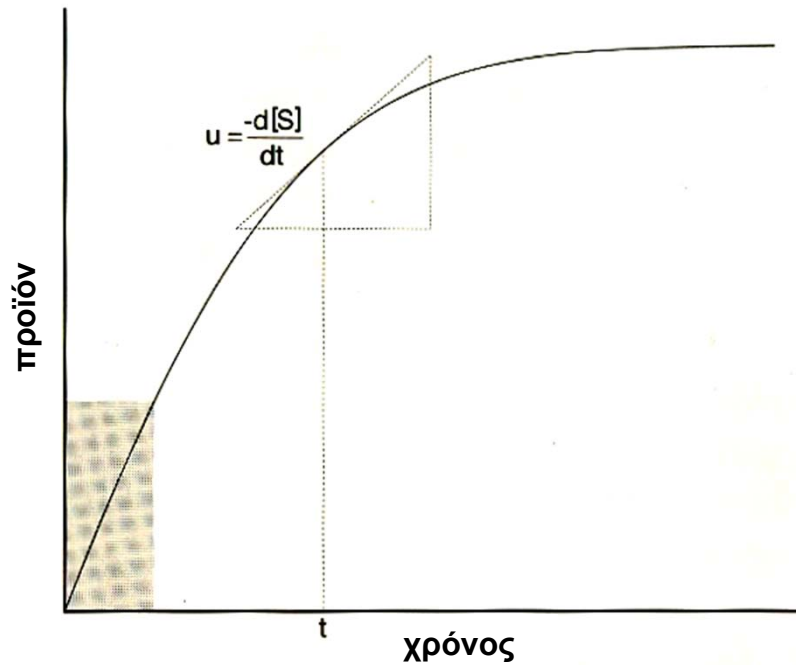
- Ως **ενζυμική δόση** ορίζεται η ποσότητα του απαιτούμενου ενζυμικού παρασκευάσματος/μονάδα βάρους υποστρώματος για την πραγματοποίηση συγκεκριμένης μετατροπής.

- Κατά την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης διακρίνονται 3 φάσεις:

1. **Φάση 1.** Είναι η φάση έναρξης, η οποία διαρκεί από δέκατα του δευτερολέπτου έως λίγα δευτερόλεπτα.

2. **Φάση 2.** Φάση δυναμικής ισορροπίας (steady state), στην οποία αντιστοιχεί η αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως,

3. **Φάση 3.** Μη γραμμική φάση, η οποία αποτελεί το κύριο τμήμα της ενζυμικής αντίδρασης και διαρκεί μέχρι τη λήξη της.



Σχ. 22. Εξέλιξη ενζυμικής αντίδρασης. Οι φάσεις 1 και 2 αντιστοιχούν στο σκιασμένο τμήμα της καμπύλης. Η κλίση της εφαπτομένης σε οποιοδήποτε σημείο της καμπύλης ισούται με την ταχύτητα αντίδρασης.

- Παλαιότερα οι φάσεις 1 και 2 δεν ήταν αντιληπτές λόγω έλλειψης κατάλληλων τεχνικών μετρήσεως και θεωρούνταν ως μία φάση.
- Η απλούστευση αυτή ισχύει ακόμα στη βιομηχανία.

Φάση 1: Έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης

- Κατά την έναρξη κάθε ενζυμικής αντίδρασης σχηματίζεται σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια διασπάται σε προϊόν και σε αρχικό ένζυμο:



Σχ. 23. Ενζυμική αντίδραση. Όπου: [S] συγκέντρωση υποστρώματος,
[E] συγκέντρωση ενζύμου,
[ES] συγκέντρωση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος
[P] συγκέντρωση προϊόντος,
 k_1, k_2, k_3 , σταθερές ταχύτητας αντίστοιχων αντιδράσεων.

- Τα ένζυμα ως καταλύτες ελαττώνουν δραστικά τον απαιτούμενο χρόνο για την επίτευξη της αντίδρασης, χωρίς, όμως, να μεταβάλλουν τη θέση της ισορροπίας.
- Η δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου συνεπάγεται μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης του μεταβατικού σταδίου (σύμπλοκο ES).
- Η διάσπαση του συμπλόκου ES καθορίζει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης (καθορίζον την ταχύτητα στάδιο).

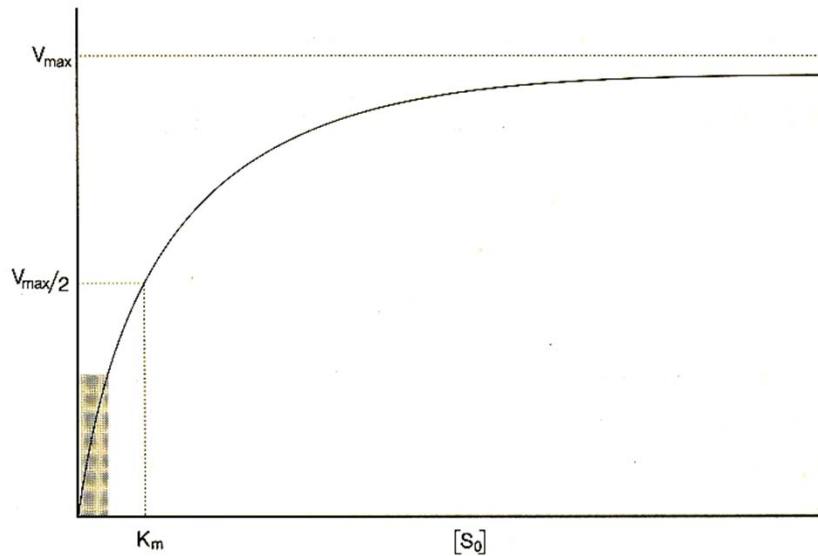
Φάση 2: Κατάσταση δυναμικής ισορροπίας ή σταθερής κατάστασης (steady state)

- Το σύστημα βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία (steady state) και λειτουργεί με τη μέγιστη αποδοτικότητα.
- Η ταχύτητα της αντίδρασης (u) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή ισούται με την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης του Σχ. 22, στο αντίστοιχο σημείο, δηλαδή:

$$u = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

- Στη φάση 2 υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ συγκεντρώσεως υποστρώματος [S] και χρόνου t και η κλίση της καμπύλης (Σχ. 21) είναι μέγιστη (αρχική ταχύτητα αντιδράσεως u_0).
- Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται και το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν, η μείωση της συγκέντρωσης υποστρώματος τελικά περιορίζει την ταχύτητα αντίδρασης, με αποτέλεσμα την είσοδο του συστήματος στη φάση 3.

- Η σχέση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος $[S_0]$ επί της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης v_0 , για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου περιγράφεται στο Σχ. 24.



Σχ. 24. Γραφική παράσταση αρχικής ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης vs αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος.

• Σε σταθερή κατάσταση, ο ρυθμός σχηματισμός του συμπλόκου ES ισούται με το ρυθμό διάσπασής του προς S, E και P, οπότε η [ES] παραμένει σταθερή. Έτσι:

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (1)$$

Και αν

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad (2) \quad K_m: \text{σταθερά } Michaelis$$

Τότε:

$$[E] = \frac{[ES]K_m}{[S]} \quad (3)$$

Επειδή:

$$[E_o] = [E] + [ES] \quad (4), \text{ όπου } [E_o] \text{ η ποσότητα}$$

του συνολικού ενζύμου, έχουμε:

$$[ES] = \frac{[E_o]}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (5)$$

- Η ταχύτητα κατάλυσης δίνεται από την εξίσωση

$$u = k_3 [ES] \quad (6)$$

- Όταν όλα τα ενεργά κέντρα των μορίων του ενζύμου είναι κορεσμένα με υπόστρωμα, δηλαδή έχουμε μεγάλη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, τότε

$$V_{\max} = k_3 [ES] = k_3 [E_0] \quad (7)$$

- Από τις εξισώσεις (5), (6) και (7) τελικά έχουμε:

$$u_o = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad (8) \text{ Εξίσωση } \mathbf{Michaelis-Menten} \text{ (Σχ. 23).}$$

- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, δηλαδή όταν $[S] \ll K_m$, τότε

$$u_o = V_{\max} [S] / K_m.$$

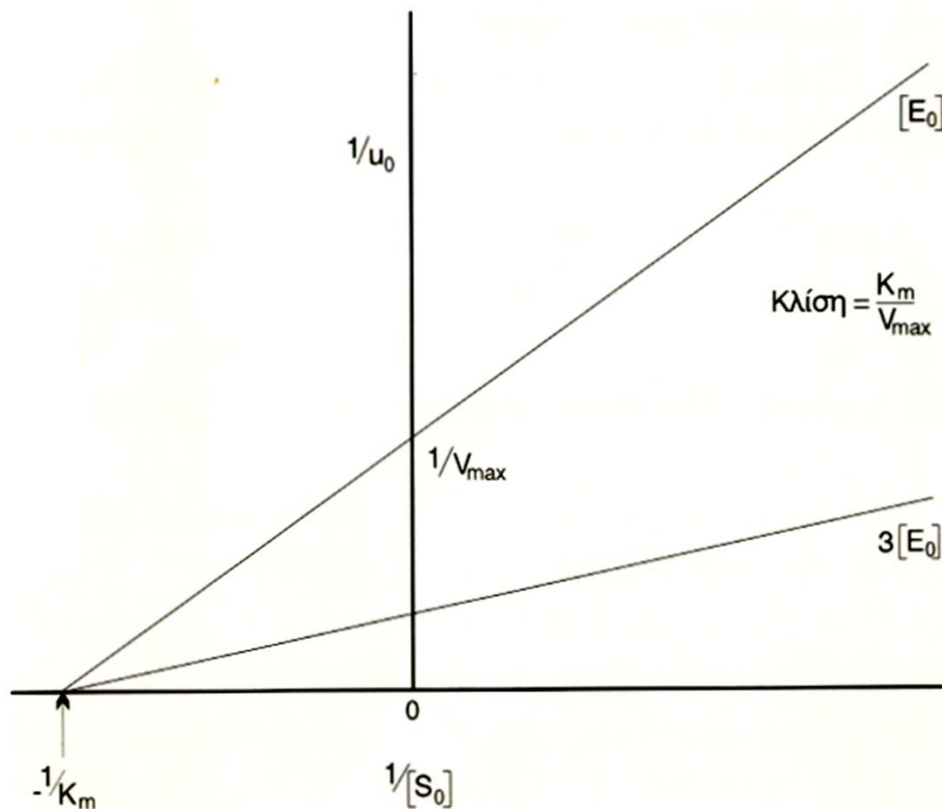
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, δηλαδή όταν $[S] \gg K_m$, τότε $u_o = V_{\max}$, δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση υποστρώματος.

- Όταν $K_m = [S]$, τότε $u_o = V_{\max} / 2$.

Υπολογισμός των K_m και V_{max}

- Το αντίστροφο και των δυο μελών της εξίσωσης (8) μας δίνει:

$$\frac{1}{u_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} [S]} \quad (9)$$



Σχ. 25. Γραφική παράσταση διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk).

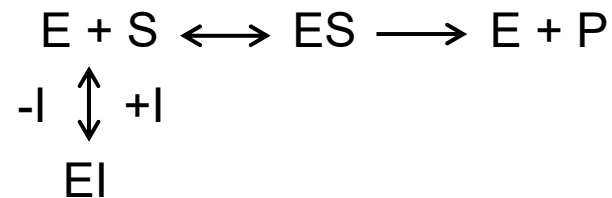
Αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας

- Οι αναστολείς διακρίνονται σε **αντιστρεπτούς** (το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει τη δραστηκότητά του) και σε **μη αντιστρεπτούς** (δεσμεύονται κατά μόνιμο τρόπο, π.χ. ομοιοπολικά).

Αντιστρεπτή αναστολή

Συναγωνιστική αναστολή

- Περιγράφεται από την ισορροπία:

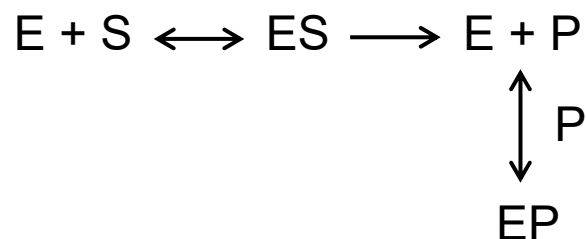


Σχ. 26. Συναγωνιστική αναστολή.

- Οπότε έχουμε:

$$u_i = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (10), \text{ όπου } K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}.$$

- Η V_{max} παραμένει αμετάβλητη, ενώ η K_m αυξάνεται κατά $[1 + ([I]/K_i)]$.
- Αντιμετωπίζεται από υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος.
- Περίπτωση συναγωνιστικής αναστολής αποτελεί η αναστολή από το προϊόν.



Σχ. 27. Συναγωνιστική αναστολή από το προϊόν.

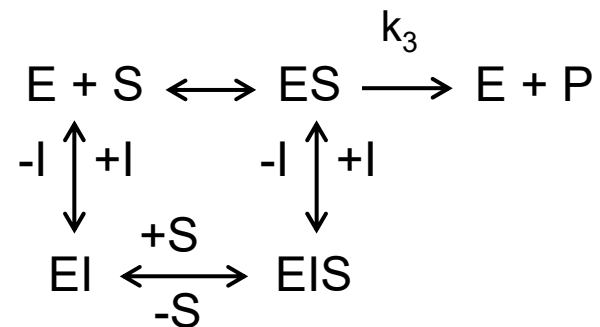
- Οπότε έχουμε:

$$u_p = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_p} \right)} \quad (11), \text{ όπου } K_p = \frac{[E][P]}{[EP]}.$$

- Η αναστολή από το προϊόν ενδέχεται να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα σε βιομηχανικές εφαρμογές, το οποίο αντιμετωπίζεται με συνεχή απομάκρυνση του προϊόντος από τον βιοαντιδραστήρα.

Μη συναγωνιστική αναστολή

- Περιγράφεται από την ισορροπία:



Σχ. 28. Μη συναγωνιστική αναστολή.

- Οπότε έχουμε:

$$u_i = \frac{V_{\max}[S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (12), \text{ όπου}$$

$$K_i = [E][I]/[EI] = [ES][I]/[EIS].$$

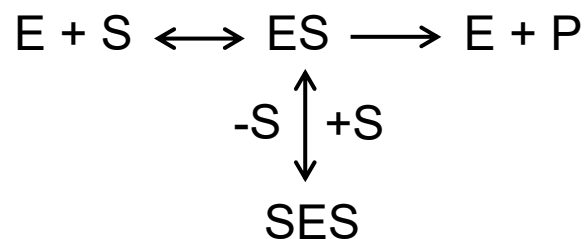
- Η V_{\max} μειώνεται κατά $[1 + ([I]/K_i)]$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη.
- Δεν αντιμετωπίζεται με υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος.

Μικτή αναστολή

- Στους αναστολείς μικτού τύπου η σταθερά διάστασης του I από το EI διαφέρει από αυτήν του I από το EIS.
- Κατά συνέπεια, τόσο η K_m όσο και η V_{\max} μεταβάλλονται.

Ανταγωνιστική αναστολή

- Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται **αποκλειστικά** στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος.
- Παράδειγμα αποτελεί η αναστολή από το υπόστρωμα:



Σχ. 29. Ανταγωνιστική αναστολή από το υπόστρωμα.

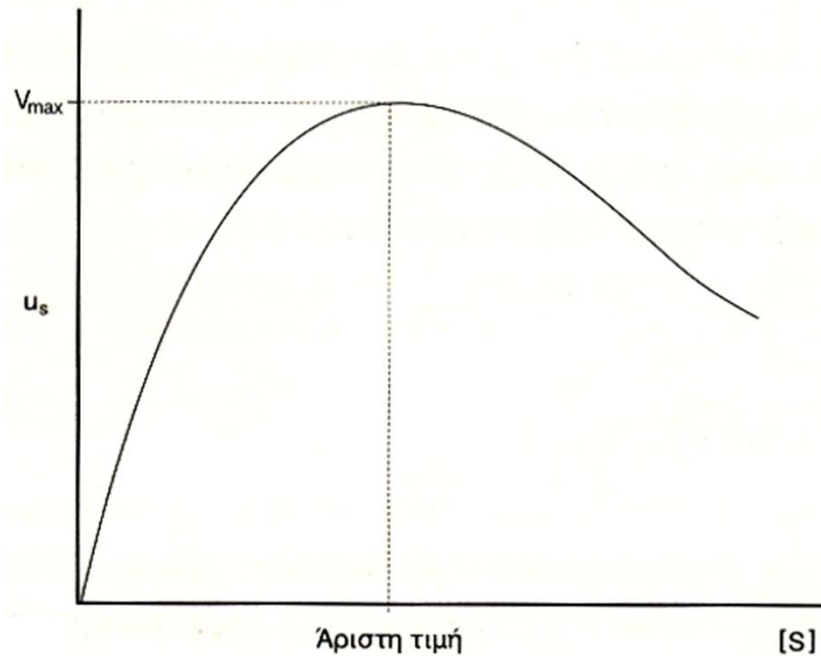
- Οπότε έχουμε:

$$u_s = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_s} \right)} \quad (13), \text{ όπου } K_s = \frac{[ES][S]}{[SES]}.$$

- Όταν η $[S]$ έχει χαμηλές τιμές, το φαινόμενο της αναστολής δεν εμφανίζεται και η σχέση (13) έχει τη μορφή της (8).
- Αντίθετα, όταν η $[S]$ είναι υψηλή συγκριτικά με την K_m , τότε ο παράγοντας K_m είναι αμελητέος, οπότε έχουμε:

$$u_s = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (14)$$

- Από την (14) φαίνεται ότι η ταχύτητα αντιδράσεως ελαττώνεται με την αύξηση του υποστρώματος.



Σχ. 30. Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης vs συγκέντρωσης υποστρώματος σε αντίδραση υπό αναστολή από υπόστρωμα.

Επίδραση της θερμοκρασίας

- Η απλούστερη προσέγγιση είναι η εξίσωση *Arrhenius*, η οποία περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά ταχύτητας διάσπασης k_3 του ES σε προϊόν και ελεύθερο ένζυμο:

$$k_3 = A \exp(-\varepsilon/RT) \quad (15)$$

- όπου A : σταθερά *Arrhenius*,
- k_3 : σταθερά ταχύτητας αντιδράσεως,

R: σταθερά αερίων,

T: θερμοκρασία,

ε : ενέργεια ενεργοποίησης.

- Αν τα A και ε είναι γνωστά, υπολογίζεται η k_3 για οποιαδήποτε θερμοκρασία T.
- Έχοντας υπόψιν την (7) και λογαριθμίζοντας, η (15) μετατρέπεται:

$$\ln \frac{V_{\max}}{[E_o]} = \ln A - \frac{\varepsilon}{RT} \quad (16)$$

- Αφαιρώντας κατά μέλη τις σχέσεις που προκύπτουν από την (16) για δύο θερμοκρασίες T_1 και T_2 , έχουμε:

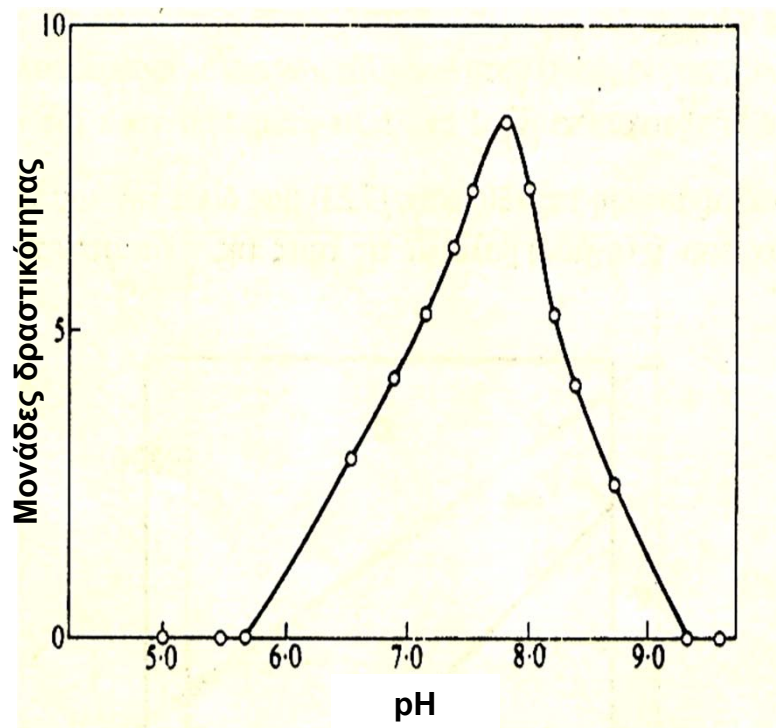
$$\ln \frac{V_{\max 2}}{V_{\max 1}} = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \frac{\varepsilon}{R} \quad (17)$$

- Μεγαλύτερη ακρίβεια στους υπολογισμούς των A και ε έχουμε με την εκτέλεση σειράς πειραμάτων υπολογισμού της V_{\max} σε διαφορετικές θερμοκρασίες (για εύρος θερμοκρασιών όπου η ενζυμική δραστηριότητα παραμένει σταθερή).
- Η κλίση της ευθείας της γραφικής παράστασης $\ln k_3$ vs $1/T$ ισούται με $-\varepsilon/R$.
- Η ταχύτητα αντιδράσεως συνήθως αυξάνεται κατά 10% για κάθε αύξηση θερμοκρασίας κατά 1°C .

Επίδραση του pH

- Το pH είναι δυνατόν να μεταβάλλει:
 1. Τη στερεοδιάταξη του ενζυμικού μορίου,
 2. Τη δέσμευση του υποστρώματος,
 3. Τη δραστηριότητα των ομάδων της ενεργού περιοχής, και
 4. Τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

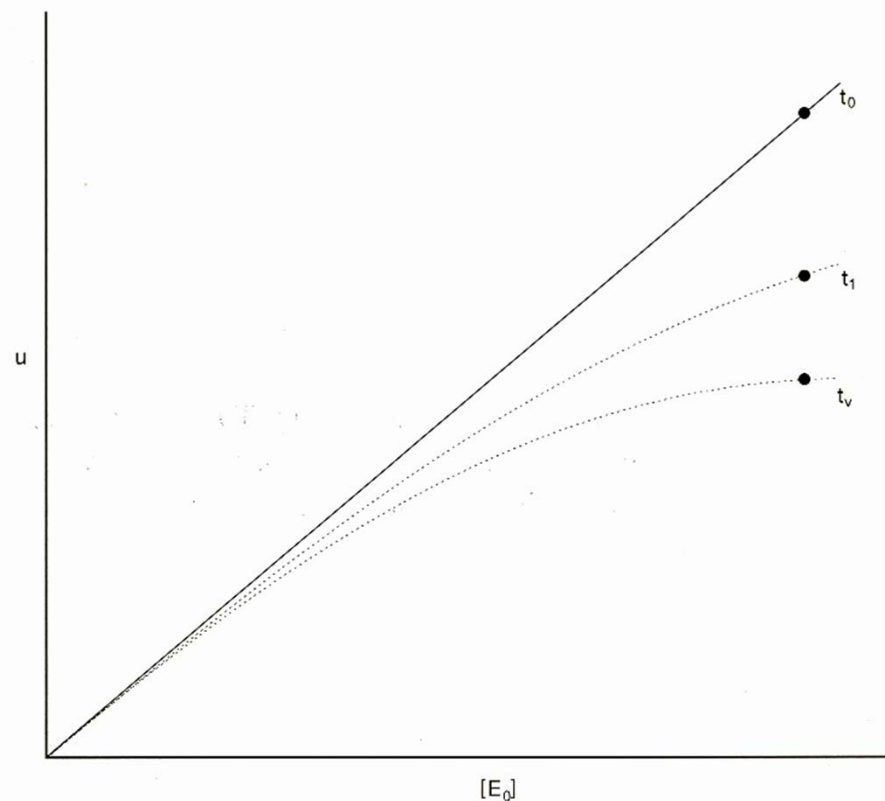
- Συνεπώς, μεταβολή του pH επηρεάζει τόσο την ταχύτητα αντίδρασης (π.χ. V_{max}), όσο και τη συγγένεια προς το υπόστρωμα (K_m).



Σχ. 31. Επίδραση του pH στην καταλυτική δραστηκότητα ενός ενζύμου.

Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

- ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ βιομηχανικές εφαρμογές, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι δεδομένη και συνήθως υψηλή.
- Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση του ενζύμου είναι αυτή που δύναται να ρυθμιστεί ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ταχύτητα αντίδρασης.



Σχ. 32. Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης vs συγκέντρωση ενζύμου $[E_0]$ για σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος σε διάφορους χρόνους.

- Μετρήσεις σε χρονική στιγμή αμέσως μετά την έναρξη της αντίδρασης έδειξαν ότι η συνάρτηση της αρχικής ταχύτητας u_o με την $[E_o]$ είναι γραμμική.
- Υπενθυμίζεται ότι:

$$u_o = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \longleftrightarrow u_o = \frac{k_3 [E_o] [S]}{[S] + K_m} \quad (8)$$

- Έστω ότι $[S] \gg K_m$, τότε η (8) γίνεται:

$$u_o = k_3 [E_o] = V_{\max} \quad (18)$$

- Δηλαδή, η u_o σχετίζεται γραμμικά με την $[E_o]$ με σταθερά αναλογίας k_3 και είναι ανεξάρτητη της $[S]$.

- Επειδή υπό αυτές τις συνθήκες η k_3 «ελέγχει» την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης, ονομάζεται και k_{cat} .
- Η k_{cat} εκφράζει με άλλα λόγια τα moles υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στη μονάδα του χρόνου από μια ενεργό περιοχή, δηλαδή ισούται με τον **αριθμό μετατροπής (turnover number)**.
- **Ο αριθμός μετατροπής (turnover number) ενός ενζύμου είναι ο αριθμός των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα.**
- Όταν η $[S]$ λαμβάνει ενδιάμεσες τιμές, η u_o είναι επίσης ανάλογη της $[E_o]$, με σταθερά που εξαρτάται από τις k_3 , $[S]$ και K_m .

- Όταν $[S] \ll K_m$, τότε $[ES] = 0$, οπότε $[E_0] = [E]$ και η (8) μετατρέπεται σε:

$$u_o = \frac{k_3}{K_m} [E] [S] \quad (19)$$

- Και σε αυτή την περίπτωση, η u_o είναι ανάλογη με την $[E]$ με σταθερά αναλογίας που εξαρτάται από την $[S]$ και τον λόγο k_3/K_m .
- Συμπερασματικά έχουμε:
 1. Η αρχική ταχύτητα αντίδρασης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του ενζύμου,
 2. Η σταθερά αναλογίας εξαρτάται από την k_3 ,
 3. Οι K_m και k_3 είναι σταθερές κάθε ενζύμου υπό συγκεκριμένες συνθήκες,
 4. Η V_{max} δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την $[E_0]$.

- Στις βιομηχανικές διεργασίες στόχος είναι η εξασφάλιση ενζυμικών αντιδράσεων υψηλών αρχικών ταχυτήτων.
- Συνεπώς, η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου γίνεται βάση της k_{cat} σε συνθήκες $[S] \gg K_m$.
- Σε περιπτώσεις, όμως, που η $[S]$ λαμβάνει ενδιάμεσες ή χαμηλές τιμές και τα υποψήφια ένζυμα εμφανίζουν διαφορετικές K_m (διαφορετική συγγένεια προς το υπόστρωμα), τότε η επιλογή του καταλληλότερου ενζύμου βασίζεται στους λόγους V_{max}/K_m και k_{cat}/K_m .
- Είναι προφανές ότι υψηλότερη τιμή λόγου υποδηλώνει αποδοτικότερο ένζυμο.

Φάση 3: Μη γραμμικό και κύριο τμήμα της ενζυμικής αντίδρασης

- Κατά τη φάση 3 η ενζυμική ταχύτητα ελαττώνεται σταδιακά.
- Τα ένζυμα δεν μετατοπίζουν το σημείο ισορροπίας μιας αντίδρασης, αλλά επιταχύνουν τη διαδικασία επιτεύξεως της ισορροπίας.
- Στη βιομηχανία στόχος είναι η μέγιστη απόδοση σε προϊόν.
- Συνεπώς, είναι απαραίτητο να είναι γνωστά η συγκέντρωση του ενζύμου και ο χρόνος στον οποίο πραγματοποιείται η μετατροπή του υποστρώματος.
- Ολοκλήρωση της (8) μας δίνει:

$$t = \frac{([S_0] - [S]) + K_m \ln \frac{[S_0]}{[S]}}{k_3[E_0]} \quad (20)$$

- όπου $[S_0]$: αρχική συγκέντρωση υποστρώματος σε χρόνο t_0 ,

$[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος μετά από χρόνο t .

- Ο λόγος $([S_0]-[S])/[S_0] = X$ ορίζεται ως **μετατροπή** ή **κλάσμα μετατροπής** και είναι πάντα $X \leq 1$.

- Οπότε η (20) μετατρέπεται σε:

$$t = \frac{[S_0]X + K_m \ln \frac{1}{1-X}}{k_3[E_0]} \quad (21)$$

- Η (21) είναι πολύ χρήσιμη γιατί επιτρέπει τον υπολογισμό της ελάχιστης ποσότητας ενζύμου για να επιτευχθεί συγκεκριμένη μετατροπή σε χρόνο t με δεδομένη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος $[S_0]$.

- Έστω ότι $[S] = [S_0]/2$ και $k_3[E_0] = V_{\max}$, τότε $t = t_{1/2}$, οπότε:

$$t_{1/2} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \ln 2 + \frac{[S_0]}{2V_{\max}} \quad (22)$$

- Ως $t_{1/2}$ ορίζεται ο **χρόνος υποδιπλασιασμού ή ημιζωής** του υποστρώματος παρουσία ενζύμου.
- Σε χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος, ώστε να ισχύει $[S_0]/2V_{\max} = 0$, τότε η (22) μετατρέπεται σε:

$$t_{1/2} = 0.7 \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (23)$$

- Είναι προφανές ότι όσο μικρότερος είναι ο χρόνος ημιζωής του υποστρώματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η αποδοτικότητα του ενζύμου.