

Μάθημα Βιοχημικές Διεργασίες (ENE.2070)

Ένζυμα και Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων (Μέρος Β)

Δρ. ΑΝΕΣΤΗΣ ΒΛΥΣΙΔΗΣ

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Πατρών



Τι μάθαμε στην προηγούμενη διάλεξη (Διάλεξη 3α)

- Τι είναι τα ένζυμα και πως λειτουργούν
- Πληροφορίες σχετικά με τη Βιοτεχνολογία Ενζύμων και βιομηχανική τους παραγωγή
- Πως η συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$ επηρεάζει την κινητική των ενζύμων
- Προσέγγιση της εξίσωσης Michaelis-Menten
 - 1. Η προσέγγιση της γρήγορης ισορροπίας
 - 2. Η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης
- Ερμηνεία και υπολογισμό των σταθερών K_m και V_{max}
- Άλλοι παράγοντες (εκτός του $[S]$) που επηρεάζουν την κινητική μίας ενζυμικής αντίδρασης
 - Η θερμοκρασία
 - Το pH και
 - Η συγκέντρωση του $[E]$

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Περιγραφή Σημερινής Διάλεξης (Διάλεξη 3β)

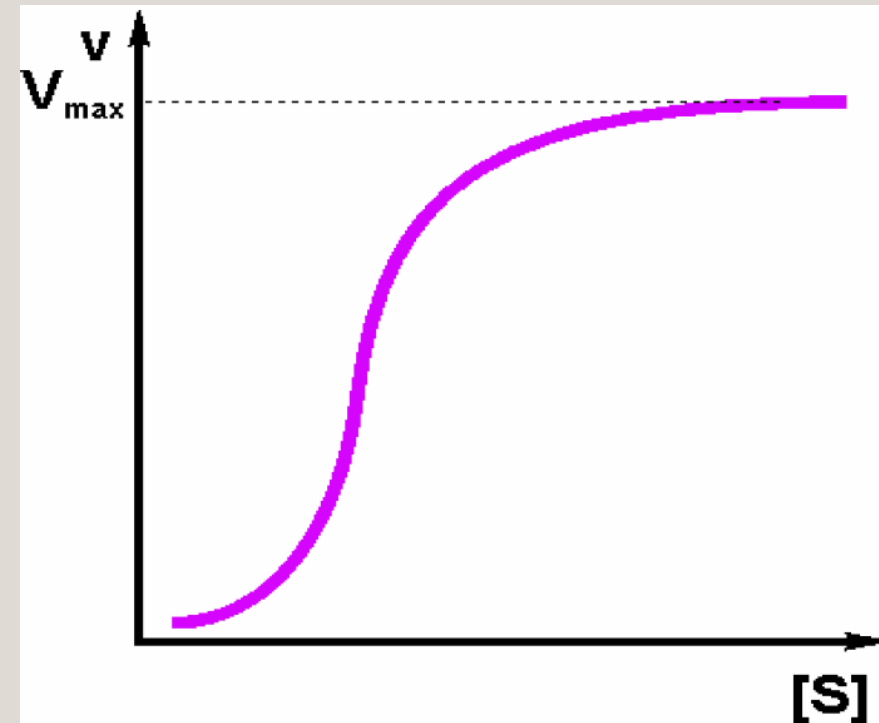
- Εξέταση μοντέλων για πιο Σύνθετες Ενζυμικές Κινητικές
- Κινητική αλλοστερικών ενζύμων
- Κινητική ενζυμικής αναστολής
 - Α) Συναγωνιστικούς αναστολείς (competitive inhibitors)
 - Β) Μη-συναγωνιστικούς αναστολείς (non competitive inhibitors)
 - Γ) Ασυναγώνιστους αναστολείς (uncompetitive inhibitors)
- Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος
- Παραδείγματα πάνω στην κινητική των ενζύμων
- Συστήματα ακινητοποιημένων Ενζύμων
 - Παγιδευμένα σε μήτρα ή μεμβράνη
 - Προσδεμένα

Αλλοστερικά ένζυμα

- Μερικά ένζυμα έχουν διαθέσιμες περισσότερες από μία θέσεις πρόσδεσης υποστρώματος
- Η πρόσδεση του ενός υποστρώματος στο ένζυμο διευκολύνει την πρόσδεση και άλλων μορίων υποστρωμάτων.
- Η συμπεριφορά αυτή είναι γνωστή ως αλλοστερισμός (allostery) ή συνεργατική πρόσδεση (cooperative binding).

Αλλοστερικά ένζυμα (συνέχεια)

- Έχουμε σιγμοειδή μορφή στο διάγραμμα v με τη $[S]$ για τα αλλοστερικά ένζυμα.
- Η ταχύτητα της αντίδρασης (με την αύξηση της $[S]$) αυξάνεται
 - πολύ γρήγορα και
 - με μη σταθερό ρυθμό.



Κινητική ενζυμικής αναστολής

Κινητική ενζυμικής αναστολής

- Ορισμένες ενώσεις προσδένονται στα ένζυμα και μειώνουν την δραστηότητά τους: **αναστολείς (ή παρεμποδιστές)**
- Έχουμε **αντιστρεπτή** ή **αναντίστρεπτη** αναστολή.
- Στην **αναντίστρεπτη** αναστολή έχουμε τον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου του αναστολέα(π.χ. βαρέα μέταλλα - μόλυβδος, υδράργυρος, κάδμιο) με το ένζυμο
- Ενώ στην **αντιστρεπτή** αναστολή οι ενώσεις που τις προκαλούν διαχωρίζονται ευκολότερα από το ένζυμο μετά την πρόσδεση.
- Οι **αντιστρεπτοί αναστολείς** μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:
 - Α) Συναγωνιστικούς αναστολείς (competitive inhibitors)
 - Β) Μη-συναγωνιστικούς αναστολείς (non-competitive inhibitors)
 - Γ) Ασυναγώνιστους αναστολείς (uncompetitive inhibitors)

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)

Αντιστρεπτοί αναστολείς:

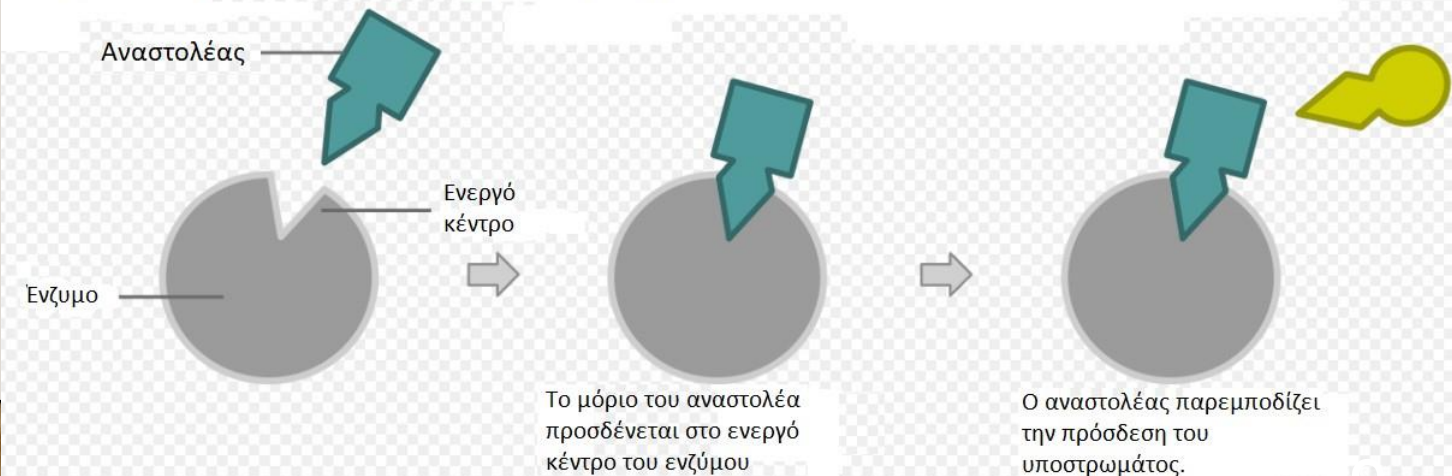
Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)

- Ο συναγωνιστικός αναστολέας (I) παρουσιάζει ομοιότητες δομής με το υπόστρωμα (S) και συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο του ενζύμου.
- Συνδέεται αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.
- Δλδ το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηρότητά του μετά την απομάκρυνση του αναστολέα.

Ενζυμική αντίδραση χωρίς παρεμπόδιση



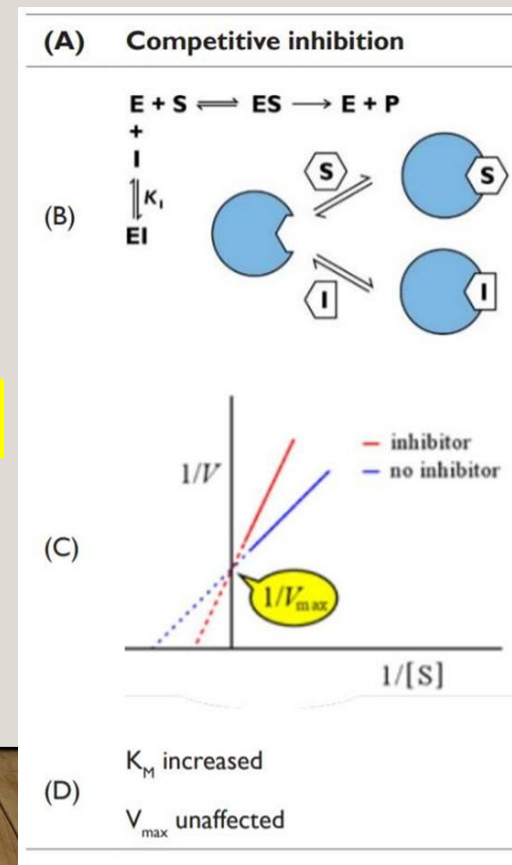
Συναγωνιστική αναστολή ενζυμικής αντίδρασης



Αντιστρεπτοί αναστολείς: Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)

- Το αποτέλεσμα της συναγωνιστικής αναστολής είναι μία αυξημένη τιμή της $K_{m,app}$
- Ουσιαστικά αυξάνει την K_m κατά $[1 + ([I] / K_I)]$, ενώ το V_m παραμένει αμετάβλητο.
- Ως συνέπεια, έχουμε μειωμένο ρυθμό αντίδρασης.
- Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση αυξημένων συγκεντρώσεων υποστρώματος.

$$K_{m,app} = K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$



**Αντιστρεπτοί αναστολείς:
Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-
competitive inhibitors)**

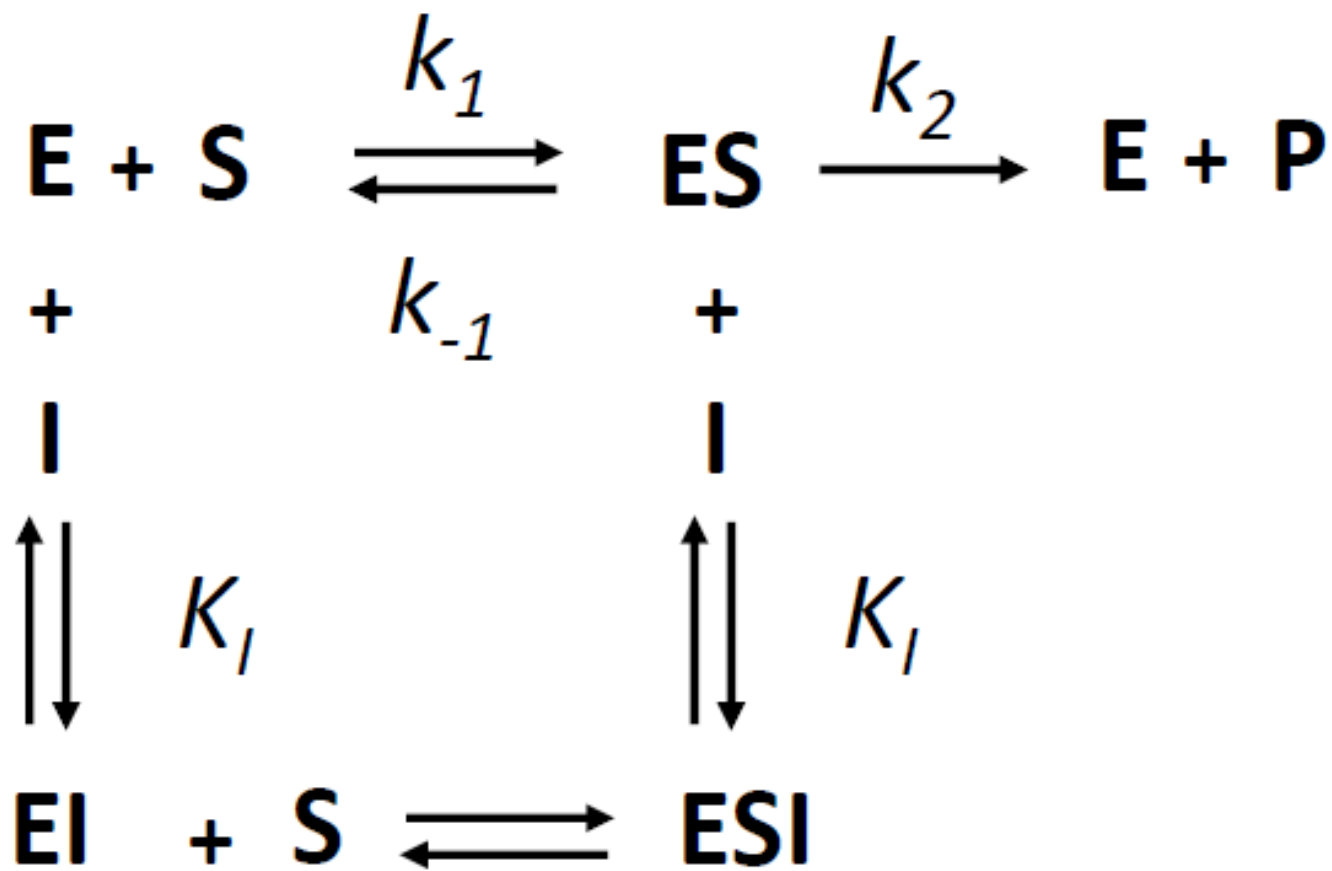
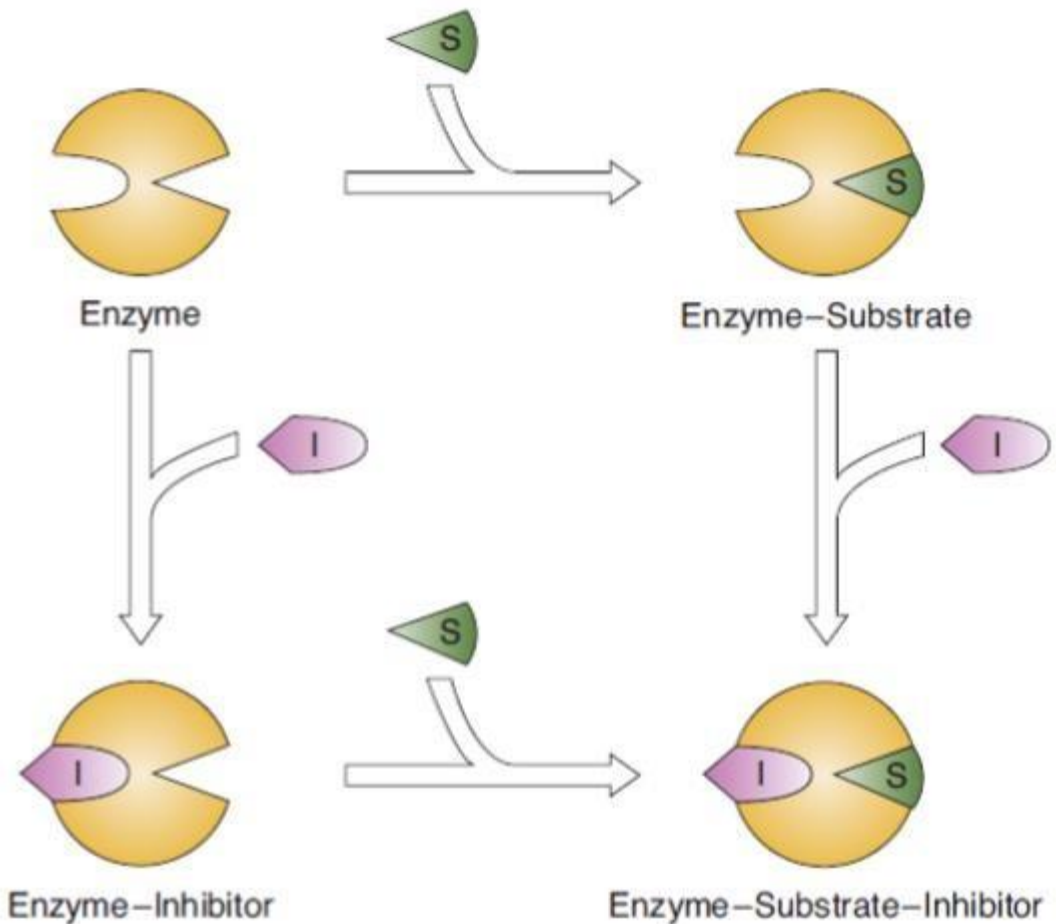
Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)

- Οι μη-συναγωνιστικοί αναστολείς δεν είναι χημικά ανάλογα των υποστρωμάτων.
- Προσδένονται σε κέντρα διαφορετικά από το ενεργό κέντρο του ενζύμου.
- Ο αναστολέας μπορεί να ενωθεί με το ελεύθερο Ένζυμο καθώς και με το σύμπλοκο ES και να δώσει μορφές του ES που δεν οδηγούν σε προϊόν.
- Δλδ ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε θέση διαφορετική από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο.

Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)



Αντιστρεπτοί αναστολείς: Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)

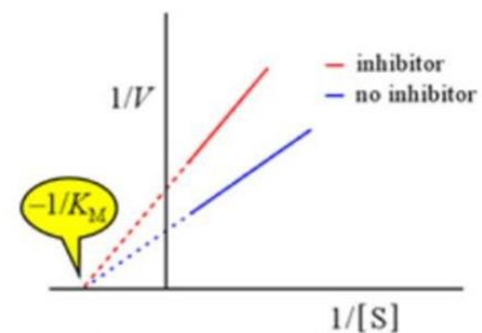
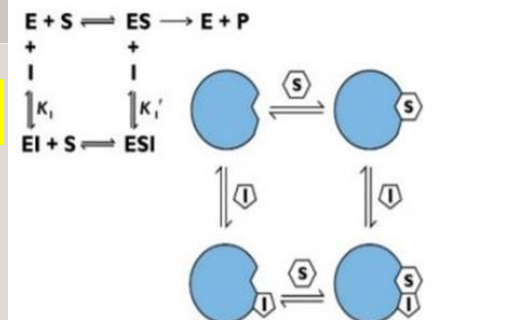
- Το αποτέλεσμα της μη-συναγωνιστικής αναστολής είναι η μείωση της V_m .
- Η υψηλή $[S]$ δεν μπορεί να αναστείλει τη μη-συναγωνιστική αναστολή.
- Προκειμένου να εμποδιστεί η πρόσδεση του αναστολέα στο ένζυμο, πρέπει να προστεθούν επιπλέον αντιδραστήρια.

Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)

- Είναι εμφανές ότι η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη-συναγωνιστική αναστολή δεν θα φθάσει ποτέ την τιμή $V_{\max}$ της αντιδράσεως χωρίς αναστολή.
- Η διαφορά της κινητικής χωρίς αναστολή και της μη-συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι η παρουσία αναστολέα συγκεντρώσεως $[I]$
 - Μειώνει τη μέγιστη ταχύτητα $V_{\max}$ κατά $1 + ([I]/K_i)$ ενώ
 - Η K_m παραμένει αμετάβλητη.
- Έχει βρεθεί ότι αυτός ο τύπος αναστολής χρησιμοποιείται αρκετά ως μηχανισμός ελέγχου στα βιοχημικά μονοπατια όπως η γλυκόλυση και ο κύκλος Krebs.

Non-competitive inhibition



K_M unaffected

$V_{\max}$ reduced

**Αντιστρεπτοί αναστολείς:
Ασυναγώνιστοι αναστολείς
(uncompetitive inhibitors)**

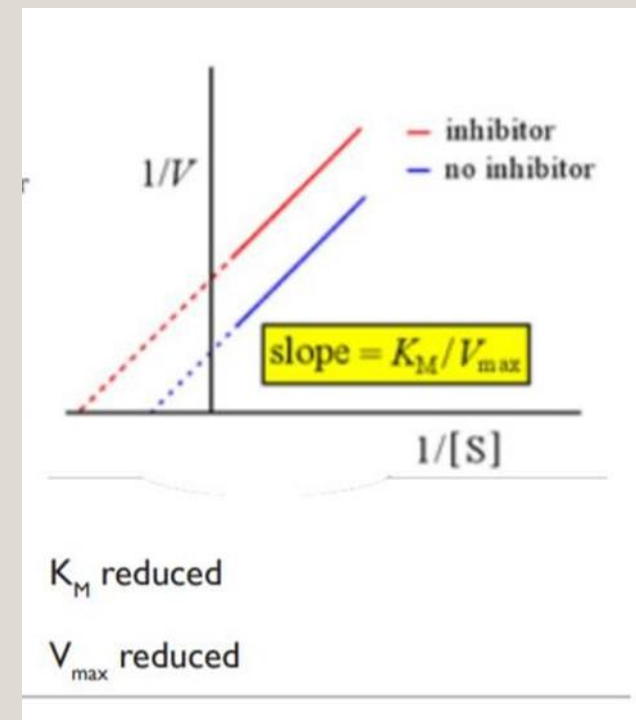
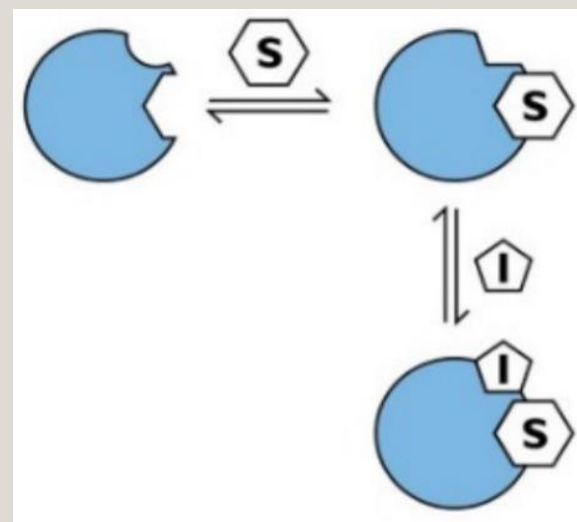
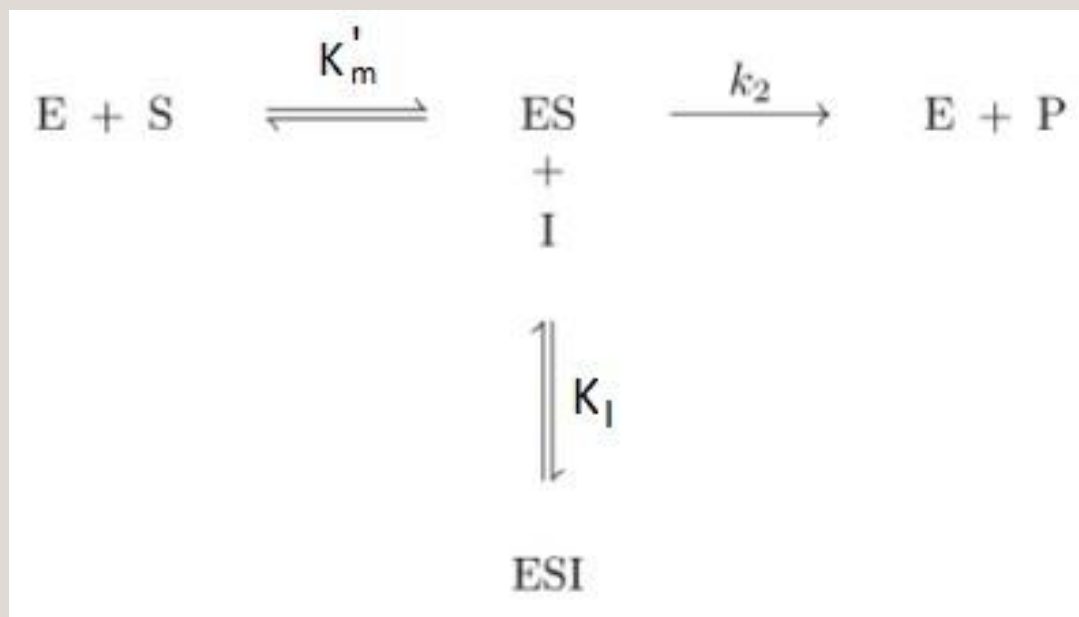
Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors)

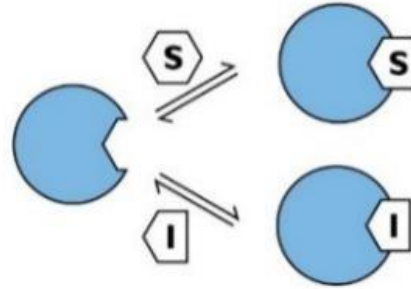
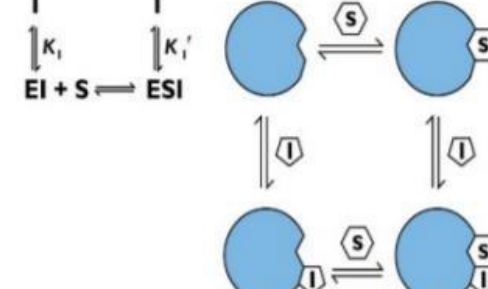
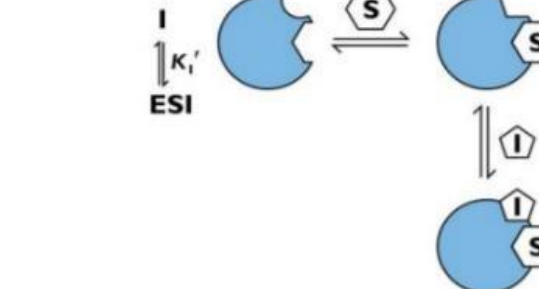
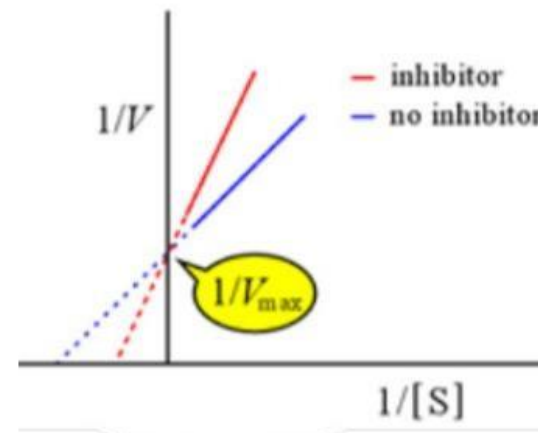
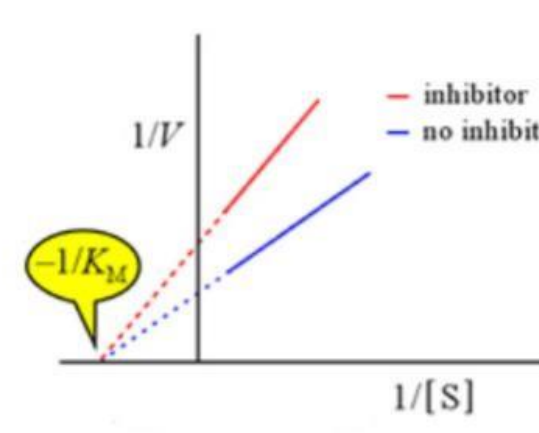
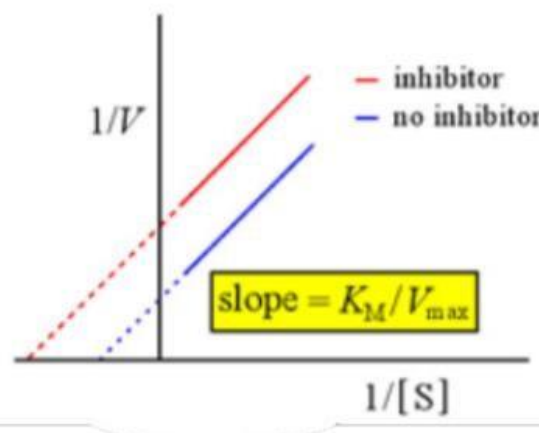
- Οι ασυναγώνιστοι αναστολείς προσδένονται μόνο στο σύμπλοκο ES και όχι και με το ελεύθερο ένζυμο.
- **Η ασυναγώνιστη αναστολή απαιτεί την ύπαρξη του συμπλόκου ES**
- Η ασυναγώνιστη αναστολή διακρίνεται από την συναγωνιστική αναστολή από δύο παρατηρήσεις:
 - 1) η ασυναγώνιστη αναστολή δεν μπορεί να αντιστραφεί αυξάνοντας το $[S]$ και
 - 2) Το διάγραμμα Lineweaver - Burk δίνει παράλληλες παρά διασταυρούμενες γραμμές.

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors)

- Ο μηχανισμός της ασυναγώνιστης αναστολής



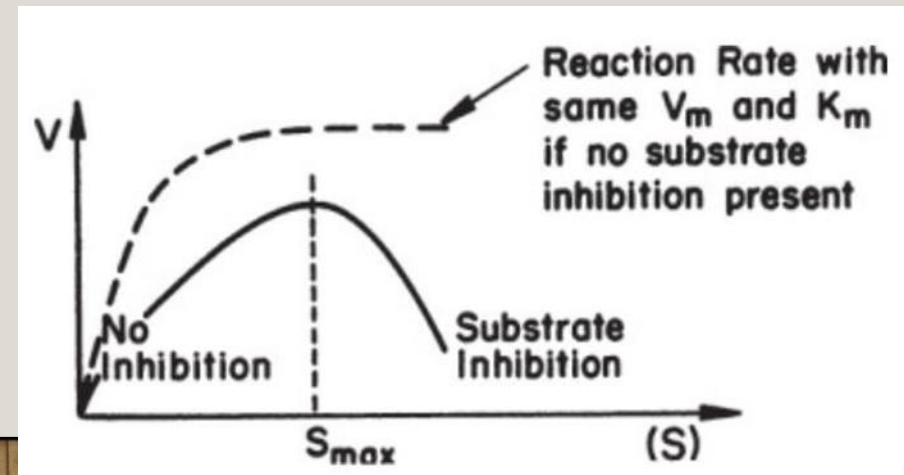
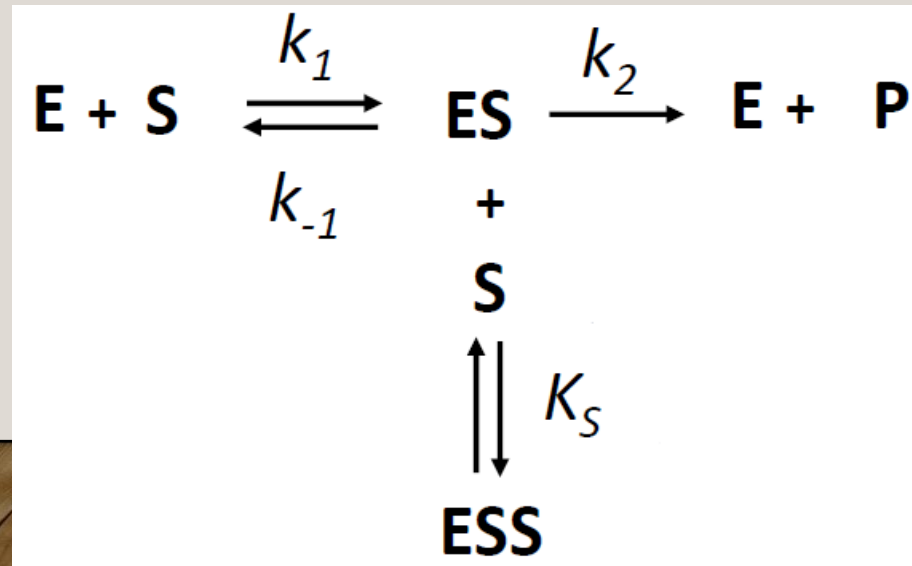
Σύνοψη της αντιστρεπτής αναστολής

	Συναγωνιστική	Μη-Συναγωνιστική	Ασυναγώνιστη
(A)	Competitive inhibition	Non-competitive inhibition	Uncompetitive inhibition
(B)	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ K_i 	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ K_i K_i' $EI + S \rightleftharpoons ESI$ 	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ K_i' ESI 
(C)			
(D)	K_M increased V_{max} unaffected	K_M unaffected V_{max} reduced	K_M reduced V_{max} reduced

Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος

Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος

- Σε κάποιες ενζυμικές αντιδράσεις η υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή
- Η αναστολή αυτή είναι γνωστή ως αναστολή (ή παρεμπόδιση) υποστρώματος (substrate inhibition).
- Σε αυτή την περίπτωση η σχηματική αναπαράσταση μιας αντίδρασης είναι:



Ενζυμικές μονάδες (Enzyme Units)

- Ενζυμικές μονάδες (Units, U)
- Δλδ στην ποσότητα του ενζύμου που αντιστοιχεί σε δεδομένη καταλυτική δράση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

το ποσό του ενζύμου που προκαλεί την μετατροπή ενός μmole υποστρώματος στο λεπτό

Παραγωγή ενζύμων σε μεγάλη κλίμακα

- Μεταξύ των διαφόρων ενζύμων που παράγονται σε μεγάλη κλίμακα είναι οι:
 - πρωτεάσες (σουμπτιλίσίνη, πυτιά) οι οποίες υδρολύουν πρωτεΐνες σε μικρότερες πεπτιδικές μονάδες
 - υδρολάσες (πηκτινάση, λιπάση (υδρολύουν λιπίδια σε λιπαρά οξέα), λακτάση),
 - ισομεράσες (ισομεράση της γλυκόζης) και
 - οξειδάσες (οξειδάση της γλυκόζης).
- Αυτά τα ένζυμα παράγονται χρησιμοποιώντας στελέχη υπερπαραγωγής ορισμένων οργανισμών.
- Ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός ενός ενζύμου από έναν οργανισμό απαιτεί:
 - διάσπαση των κυττάρων,
 - απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων και νουκλεϊκών οξέων,
 - καταβύθιση πρωτεϊνών,
 - υπερδιήθηση του επιθυμητού ενζύμου,
 - χρωματογραφικούς διαχωρισμούς (προαιρετικά),
 - κρυστάλλωση και ξήρανση.
- Η διεργασία διαχωρισμού και καθαρισμού διαφέρει ανάλογα με το εάν το ένζυμο είναι ενδοκυτταρικό ή εξωκυτταρικό.

Δομή Μαθήματος

Ισοζύγια μάζας
& Στοιχειομετρία

Κινητική Ενζυμικών
αντιδράσεων

Κινητική ανάπτυξης
μικροβίων & παραγωγή
Μεταβολικών προϊόντων

Εισαγωγικό
Μάθημα

Ανάντι και κατάντι
διεργασίες σε
συστήματα
βιοδιεργασιών

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

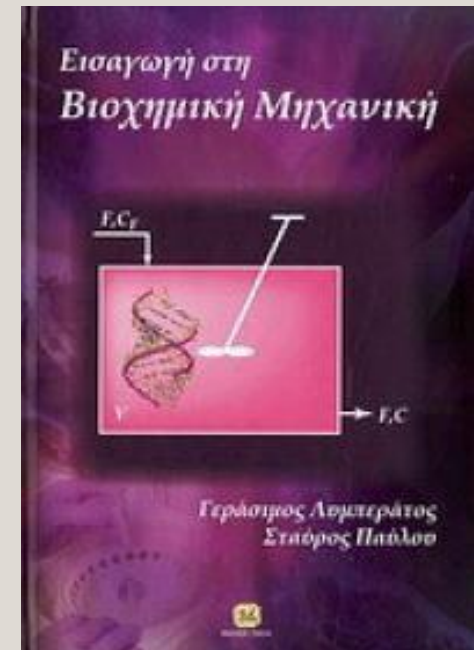


Βιβλιογραφία



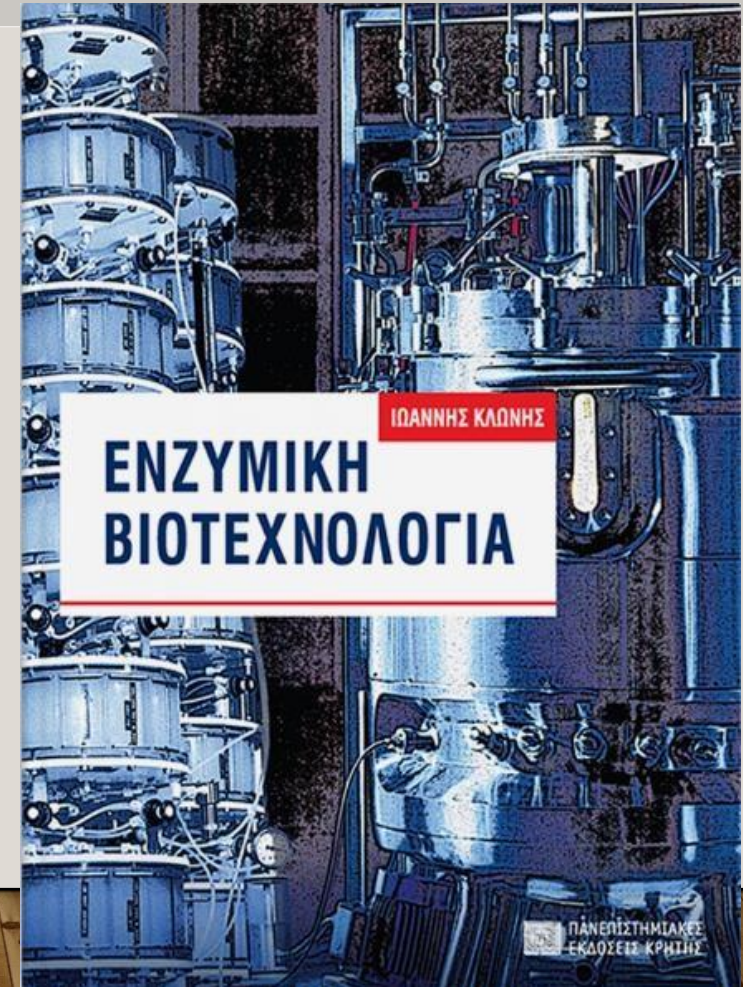
Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

Λυμπεράτος Γ., Παύλου Στ., Εισαγωγή στη ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ, Εκδόσεις Τζιόλα, 2011



Επιπλέον Βιβλιογραφία

- Ιωάννης Κλώνης (2017). Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης



Τι μάθαμε σήμερα

- Πως επηρεάζουν διάφοροι αναστολείς την κινητική μίας ενζυμικής αντίδρασης
 - Α) Συναγωνιστικούς αναστολείς (competitive inhibitors)
 - Β) Μη-συναγωνιστικούς αναστολείς (non competitive inhibitors)
 - Γ) Ασυναγώνιστους αναστολείς (uncompetitive inhibitors)
- Είδαμε τον μηχανισμό της ενζυμική αντίδραση όταν υπάρχει αναστολή υποστρώματος
- Παραδείγματα πάνω στην κινητική των ενζύμων με τη χρήση διαγραμμάτων
- Τι συστήματα υπάρχουν για την ακινητοποίηση Ενζύμων
 - Παγιδευμένα σε μήτρα ή μεμβράνη
 - Προσδεμένα