

Μάθημα Βιοχημικές Διεργασίες (ENE.2070)

Ένζυμα και Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων (Μέρος Α)

Δρ. ΑΝΕΣΤΗΣ ΒΛΥΣΙΔΗΣ

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Πατρών

Τι μάθαμε στην προηγούμενη διάλεξη (Διάλεξη 2)

- Πως είναι μια γενική διάταξη στις βιοχημικές διεργασίες.
- Τι πρέπει να έχει ένα θρεπτικό μέσο.
- Πως μπορούμε να υπολογίσουμε τους συντελεστές μίας βιοαντίδρασης.
 - Ισοζύγια μάζας (Συνολικό ισοζύγιο μάζας)
 - Ισοζύγια στοιχείων (C, N, H, O ...)
 - Ισοζυγία ηλεκτρονίων
- Ποια είναι τα κύρια Μεταβολικά Μονοπάτια σε ένα κύτταρο.
- Ποιοι είναι οι πιο σημαντικοί παρατηρούμενοι συντελεστές απόδοσης.

Περιγραφή Σημερινής Διάλεξης (Διάλεξη 3)

- Τι είναι τα ένζυμα
 - Βιοτεχνολογία Ενζύμων
 - Η Λειτουργία των Ενζύμων
- Κινητική των Ενζύμων
 - Γενικά περί κινητικής βιοχημικών αντιδράσεων
 - Ενζυμική κινητική
 - 1. Η προσέγγιση της γρήγορης ισορροπίας
 - 2. Η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης
 - Ερμηνεία και υπολογισμό των K_m και V_{max}
 - Επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης του [E]

Τι είναι τα ένζυμα

Τι είναι τα ένζυμα

- Από τις ελληνικές λέξεις *εν* και *ζύμη* τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες (ή πρωτεϊνικής βάσης πολύπλοκες οργανικές ενώσεις) μεγάλου μοριακού βάρους ($15000 < MB$).
- Δρουν ως καταλύτες (βιο-καταλύτες) στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των οργανισμών.
- Η πλειονότητα των κυτταρικών αντιδράσεων καταλύεται από πρωτεΐνες.
- Υπάρχουν και τα ριβοένζυμα. Μόρια RNA με καταλυτικές ιδιότητες.
- Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένοι πολύπλευρης χρήσης και πολύ αποτελεσματικοί βιολογικοί καταλύτες
- Αποδίδουν πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς αντίδρασης σε σχέση με τις χημικά καταλυόμενες αντιδράσεις σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Ένζυμα: τα εργαλεία του κυττάρου

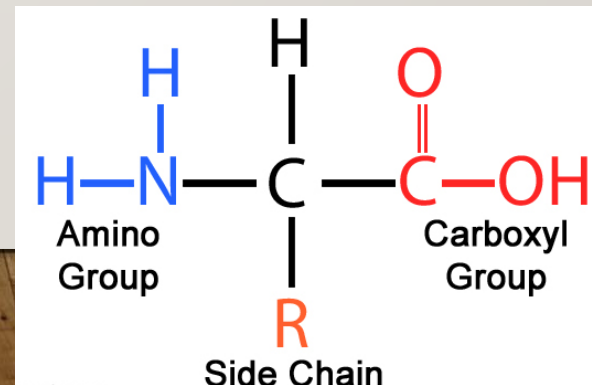
- Καταλύουν χημικές αντιδράσεις ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης τους με αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης $10^6 - 10^{12}$ φορές.
- Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό εξειδίκευσης αναφορικά με το υπόστρωμα στο οποίο δρουν.
- Ένα ένζυμο καταλύει την αντίδραση μόνο μιας χημικής ένωσης ή ομάδας στενά συγγενών χημικών ενώσεων (παρουσιάζουν μεγάλη **εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα**).
- Έχουν μηδαμινές ενεργειακές απαιτήσεις.
- Μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.
- Είναι βιοαποικοδομήσιμα και δεν ρυπαίνουν το περιβάλλον.

Ένζυμα: τα εργαλεία του κυττάρου (συνέχ')

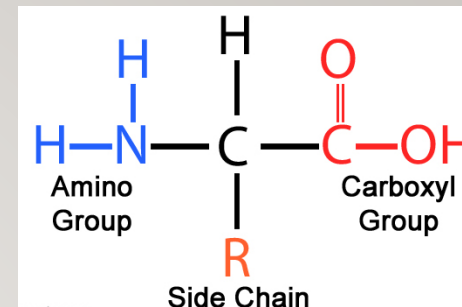
- Τα **ένζυμα** είναι **βιοκαταλύτες** και δεν συμμετέχουν στα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύουν.
- Η ποσότητά τους παραμένει σταθερή.
- Το ίδιο μόριο ενζύμου μπορεί να καταλύσει την ενζυμική μετατροπή χιλιάδων νέων μορίων υποστρώματος (αντιδρώντος) σε προϊόν.
- Τα ένζυμα βρίσκονται υπό μορφή διαλύματος μέσα (**ενδοκυτταρικά**) ή έξω (**εξωκυτταρικά**) από τα κύτταρα ή **καθηλωμένα** σε κάποιες **μεμβράνες**.
- Τα ίδια ένζυμα δεν χρησιμοποιούνται σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου αλλά ανανεώνονται.
- Τα ένζυμα παράγονται και καταστρέφονται από το κύτταρο ανάλογα με τις ανάγκες του.

Χημική Σύσταση των Κυττάρων – Αμινοξέα & Πρωτεΐνες

- Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο άφθονα οργανικά μόρια του ζωντανού κυττάρου και κατέχουν το 40-70% του ξηρού βάρους ενός ζωντανού κυττάρου.
- Πολυμερή που χτίζονται από **μονομερή αμινοξέα (δομικές μονάδες)**
 - Αμινομάδα
 - Καρβοξυλομάδα
 - Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή των ομάδων R
 - Είναι οπτικώς ενεργά και εμφανίζονται με δύο ισομερείς μορφές (L- & D- αμινοξέα)
 - **Παρόλο που στη φύση υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικά αμινοξέα, στις πρωτεΐνες των ζωντανών οργανισμών απαντούν μόνον είκοσι.**
- Έχουν διαφορετικές λειτουργίες οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 σημαντικές κατηγορίες:
 - Δομικές πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες, κολλαγόνο και κερατίνη)
 - **Καταλυτικές πρωτεΐνες: οι βιολογικοί καταλύτες (τα ένζυμα) που ρυθμίζουν όλες τις λειτουργίες του κυττάρου.**
 - Πρωτεΐνες μεταφοράς: αιμοσφαιρίνη
 - Ρυθμιστικές πρωτεΐνες: ορμόνες
 - Προστατευτικές πρωτεΐνες: αντισώματα, θρομβίνη



Πρωτεϊνικά αμινοξέα



Έχουν κοινά δομικά στοιχεία και ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες, ανάλογα με τις ιδιότητες της πλευρικής τους αλυσίδας

Υδρόφοβα

- Γλυκίνη (Gly, G)
- Αλανίνη (Ala, A)
- Βαλίνη (Val, V)
- Λευκίνη (Leu, L)
- Ισολευκίνη (Ile, I)
- Φαινυλαλανίνη (Phe, F)
- Προλίνη (Pro, P)
- Τρυπτοφάνη (Trp, W)
- Μεθειονίνη (Met, M)

Υδρόφιλα

Πολικά, ουδέτερα

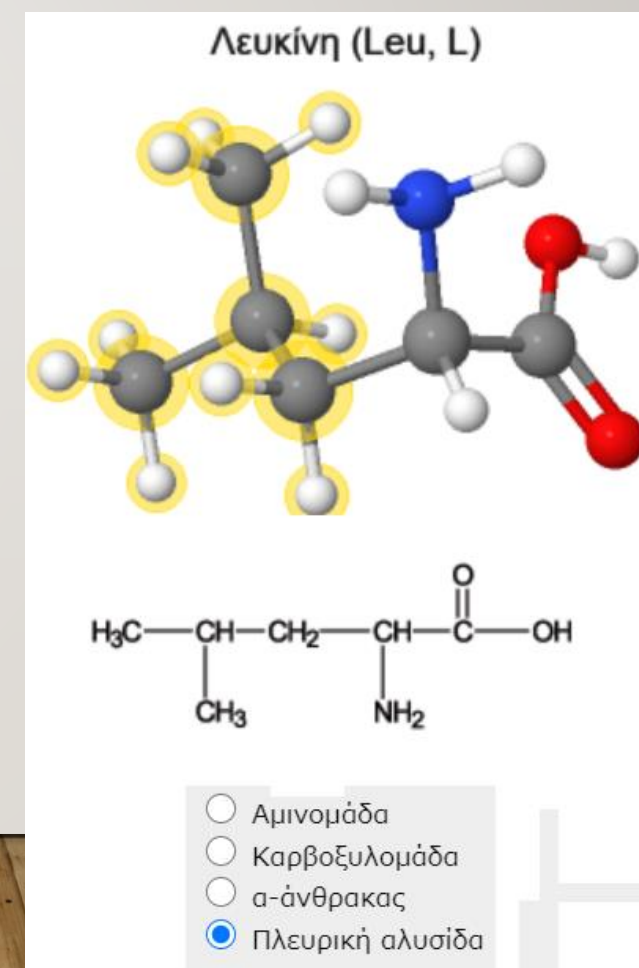
- Σερίνη (Ser, S)
- Θρεονίνη (Thr, T)
- Τυροσίνη (Tyr, Y)
- Κυστεΐνη (Cys, C)
- Ασπαραγίνη (Asn, N)
- Γλουταμίνη (Gln, Q)

Αρνητικά Φορτισμένα

- Ασπαραγινικό (Asp, D)
- Γλουταμικό (Glu, E)

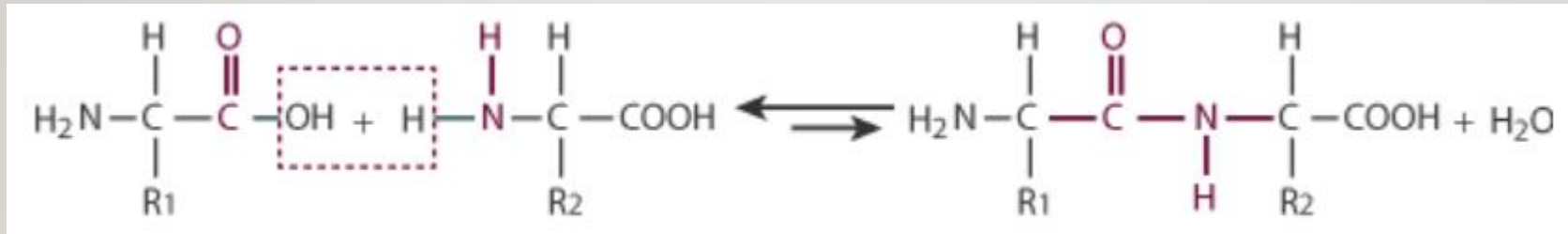
Θετικά Φορτισμένα

- Λυσίνη (Lys, K)
- Αργινίνη (Arg, R)
- Ιστιδίνη (His, H)

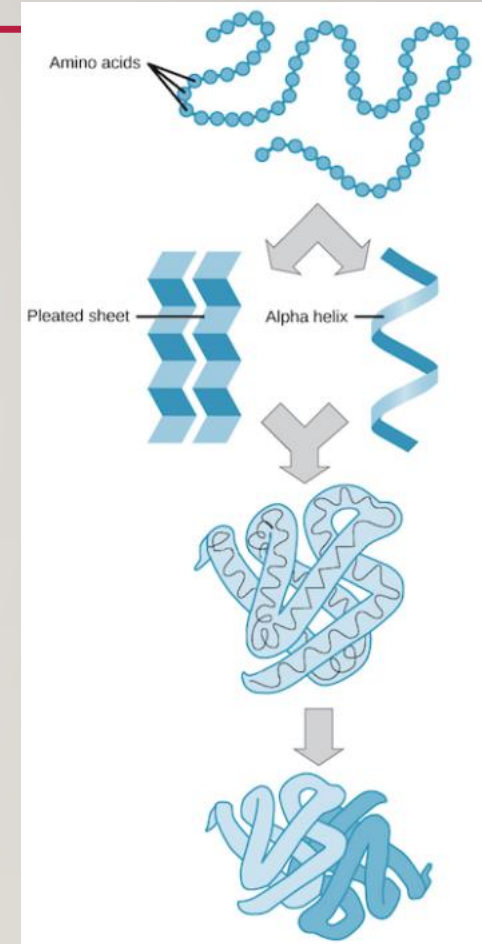


Χημική Σύσταση των Κυττάρων – Αμινοξέα & Πρωτεΐνες

- Οι πρωτεΐνες είναι αλυσίδες αμινοξέων. Η αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ 2 αμινοξέων οδηγεί στο σχηματισμό ενός **πεπτιδικού δεσμού**. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι ένας ομοιοπολικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ της όξινης καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του επόμενου.



- 2 ή περισσότερα αμινοξέα → πεπτίδιο ; Πολυπεπτίδια < 50 αμινοξέα < πρωτεΐνες
- Η δομή των πρωτεϊνών περιγράφεται σε τέσσερα επίπεδα
 - Σειρά των αμινοξέων → πρωτοταγής δομή
 - Οι αδύνατες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων → δευτεροταγής και τριτοταγής δομή
 - Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων → τεταρτοταγής δομή
- Η τελική τρισδιάστατη μορφή είναι αποφασιστική για την βιολογική δράση των πρωτεϊνών.



Γενική Παρουσίαση της Πρωτεϊνικής Δομής

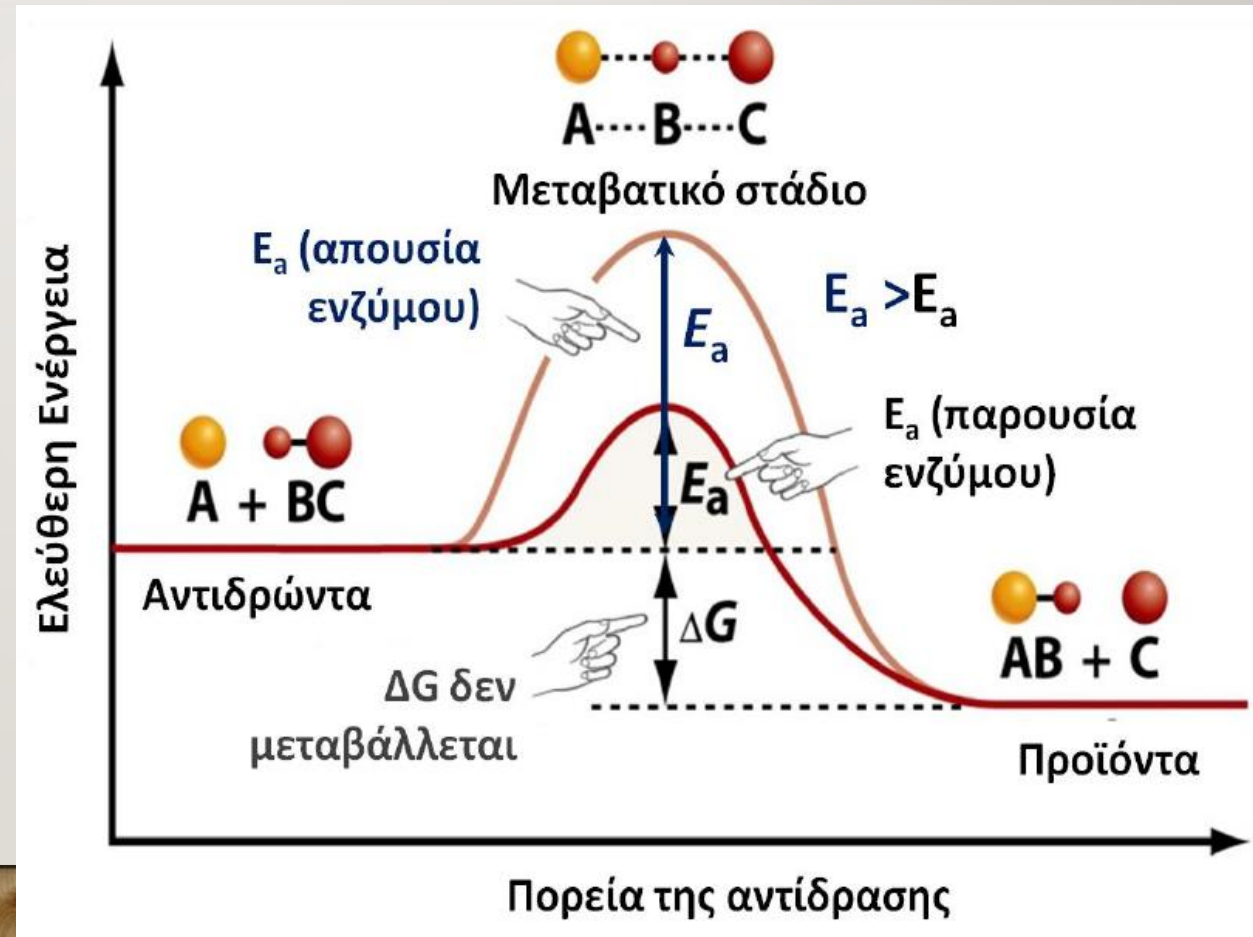
Η Λειτουργία των Ενζύμων

Πως τα ένζυμα επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις

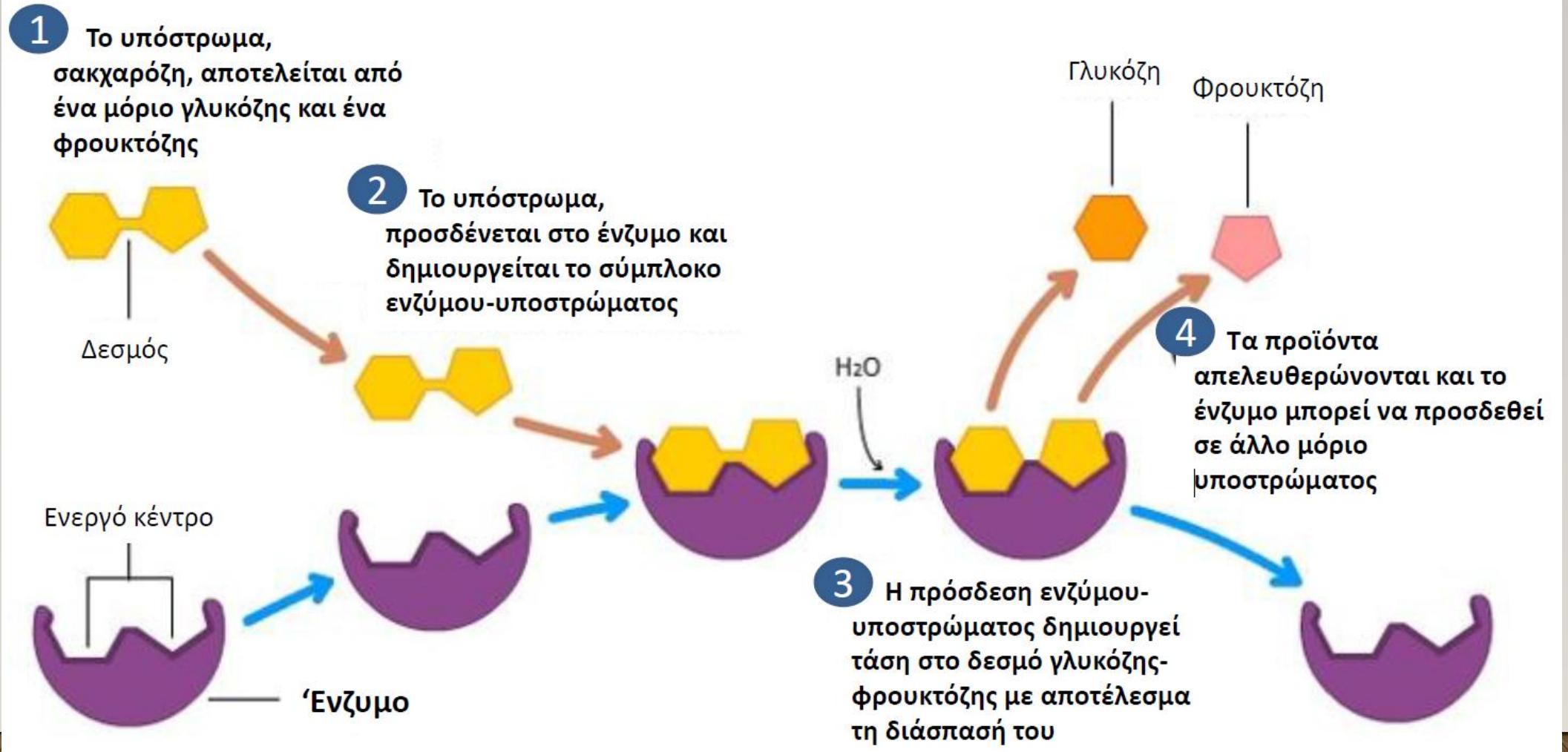
Τα ένζυμα:

(α) μειώνουν την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης (E_a)* χωρίς όμως να μεταβάλλουν τις άλλες παραμέτρους της αντίδρασης.

(β) αυξάνουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης από ένα εκατομμύριο (10^6) έως και ένα τρισεκατομμύριο (10^{12}) φορές

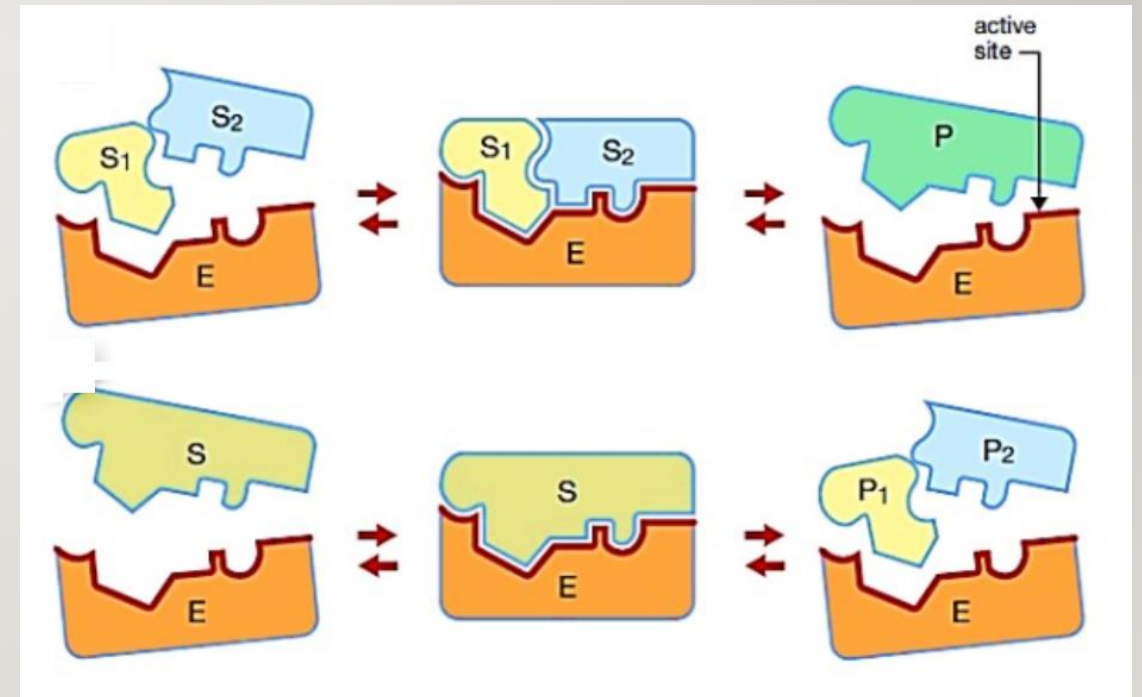
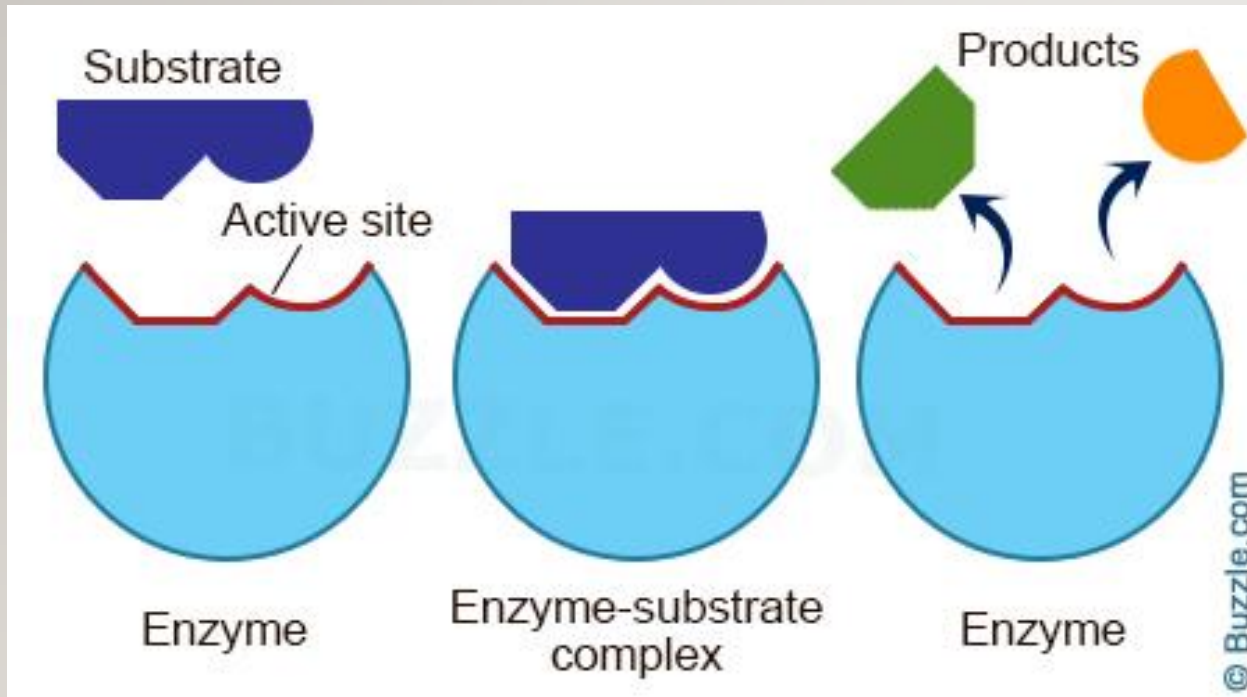


Η λειτουργία των ενζύμων

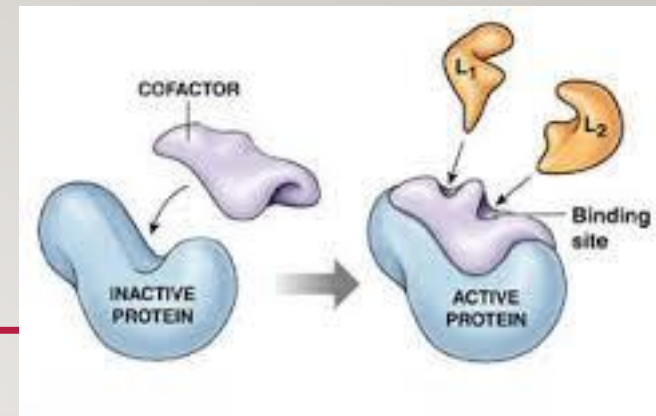


Η περιοχή του ενζύμου όπου καταλύεται η αντίδραση λέγεται ενεργό κέντρο.

Η λειτουργία των ενζύμων



Η δράση των συνενζύμων



- Πολλές φορές οι δραστικές ομάδες που διαθέτουν οι πεπτιδικές αλυσίδες των ενζύμων δεν αρκούν για να καταλύσουν την αντίδραση παρά μόνον αν συνδεθούν με μικρά οργανικά μόρια που ονομάζονται συνένζυμα.
- Τα συνένζυμα δημιουργούν σύμπλεγμα με το ένζυμο διευκολύνοντας έτσι την σύνδεση με τα υποστρώματα.
- Με τα δεδομένα αυτά η ενεργός μορφή ενός τέτοιου ενζύμου ονομάζεται ολο-ένζυμο και το πρωτεϊνικό της τμήμα από-ένζυμο.
 - ολο-ένζυμο = από-ένζυμο + συνένζυμο
- Τα ένζυμα που απαντώνται σε αρκετές διαφορετικές μοριακές μορφές, αλλά καταλύουν την ίδια αντίδραση ονομάζονται ισοένζυμα (isoenzymes).

Ταξινόμηση Ενζύμων

- Τα ένζυμα κατατάσσονται σε 6 γενικές ομάδες σύμφωνα με την ταξινόμηση της επιτροπής για τα Ένζυμα της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και αυτές είναι:
- 1. Οξειδοαναγωγάσες, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
- 2. Τρανσφεράσες, που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ομάδων
- 3. Υδρολάσες, που καταλύουν υδρολυτικές αντιδράσεις
- 4. Λυάσες, που καταλύουν την προσθήκη ή αφαίρεση ομάδων σε διπλούς δεσμούς
- 5. Ισομεράσες, που καταλύουν ισομεριώσεις
- 6. Λιγάσες, που καταλύουν τη συμπύκνωση δύο μορίων με τη σύγχρονη διάσπαση ενός πυροφωσφορικού δεσμού

Κινητική των Ενζύμων

Γενικά Περί Κινητικής

- Για να εκφράσουμε τους ρυθμούς κατανάλωσης και δημιουργίας των διαφόρων αντιδρώντων και προϊόντων χρειαζόμαστε να καθορίσουμε την **κινητική** των βιοαντιδράσεων και (για μη ομοιογενείς αντιδραστήρες, π.χ. ζύμωση στερεής κατάστασης) τα **φαινόμενα μεταφοράς** στα σημεία αντίδρασης.

Γενικά περί Κινητικής

- **Κινητική** είναι η μελέτη της εξάρτησης κάποιου ρυθμού αντίδρασης από διάφορους παράγοντες όπως:
 - Συγκεντρώσεις αντιδρώντων
 - Συγκεντρώσεις προϊόντων
 - Συγκεντρώσεις άλλων ουσιών (π.χ. παρεμποδιστές)
 - Θερμοκρασία
 - Πίεση
 - pH
 - Ανάδευση κ.α.

Απλές ή στοιχειώδεις αντιδράσεις

- **Απλές ή στοιχειώδεις αντιδράσεις** ονομάζουμε αυτές που αντικατοπτρίζουν απλά μοριακά γεγονότα.
- Για παράδειγμα η γενική ενζυμική αντίδραση συμπλοκοποίησης μπορεί να γραφεί ως:
 - **$E + S \rightarrow ES$**
- όπου E είναι το ένζυμο, S το υπόστρωμα και ES το σύμπλοκο που σχηματίζεται κατά την αντίδραση.
- Για τις απλές (ή στοιχειώδεις) βιοαντιδράσεις και μόνο οι ρυθμοί κατανάλωσης είναι πάντοτε ανάλογοι (σταθερά πολλαπλάσια) των ρυθμών δημιουργίας.
- Έτσι π.χ. για την ανωτέρω αντίδραση έχουμε:

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

Συνολικές αντιδράσεις

- Βιοχημικές αντιδράσεις που αντιστοιχούν σε ολόκληρα μεταβολικά δίκτυα, όπως η αντίδραση από το μονοπάτι της γλυκόλυσης:
- **γλυκόζη → 2 πυροσταφυλικά**
- Προκύπτουν από την άθροιση πολλών απλών αντιδράσεων.
- Για τις συνολικές αντιδράσεις δεν ισχύει σταθερή αναλογία ανάμεσα σε αντιδρώντα και προϊόντα ανά πάσα στιγμή.
- **Οι ρυθμοί των επί μέρους απλών αντιδράσεων καθορίζουν και την σχέση ανάμεσα στους ρυθμούς μεταβολής των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων και των προϊόντων.**

Παράδειγμα

- Ας θεωρήσουμε τις παράλληλες αντιδράσεις πρώτης τάξης που λαμβάνουν χώρα σε έναν κλειστό καλώς αναδευόμενο χώρο:
 - $\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{B}$
 - $\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{C}$
- Θεωρώντας ότι:
 - Αρχικά έχουμε μόνο \mathbf{A} με συγκέντρωση \mathbf{c}_{A0} ,
 - Οι ρυθμοί αντίδρασης των επί μέρους αντιδράσεων είναι $\mathbf{k}_1\mathbf{c}_A$ και $\mathbf{k}_2\mathbf{c}_A$ αντίστοιχα
 - Μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση του \mathbf{A} ολοκληρώνοντας την κανονική διαφορική εξίσωση (ισοζύγιο):

$$\frac{dc_A}{dt} = -k_1c_A - k_2c_A$$

Έτσι η συγκέντρωση του \mathbf{A} είναι:

$$c_A(t) = c_{A0} e^{[-(k_1+k_2)t]}$$

Παράδειγμα (συνέχ')

Από τα ισοζύγια μάζας για τα B και C:

$$\frac{dc_B}{dt} = k_1 c_A \quad \frac{dc_C}{dt} = k_2 c_A \quad \begin{array}{l} \mathbf{A \rightarrow B} \\ \mathbf{A \rightarrow C} \end{array}$$

Αντικαθιστώντας για την συγκέντρωση c_A και ολοκληρώνοντας μπορούμε να φτάσουμε στις παρακάτω εξισώσεις:

$$\Delta c_B(t) = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \Delta c_A(t) \quad \Delta c_C(t) = \frac{k_2}{k_1 + k_2} \Delta c_A(t)$$

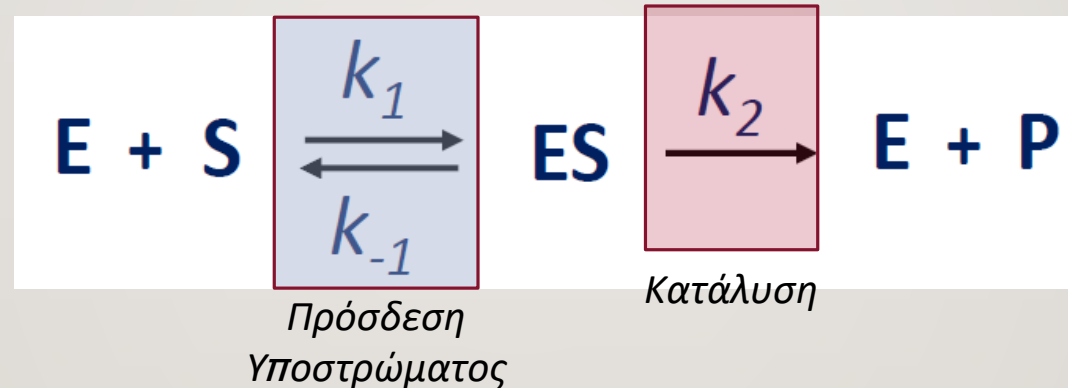
- Αυτές οι σχέσεις ουσιαστικά μας λένε ότι για κάθε mol του A που καταναλώνεται, οι ποσότητες των B και C που παράγονται δεν είναι σταθερές αλλά εξαρτώνται από την **κινητική των επί μέρους αντιδράσεων**.

Ρυθμός ενζυμικών αντιδράσεων

- Οι ρυθμοί των ενζυμικών αντιδράσεων γενικά εξαρτώνται από:
- Την συγκέντρωση του ενζύμου, $[E]$
- Την συγκέντρωση των αντιδρώντων (υποστρώματος), $[S]$
- Την συγκέντρωση διαφόρων ουσιών που ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν την κατάλυση και
- Από φυσικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς του μίγματος.

Κινητική απλής ενζυμικής αντίδρασης

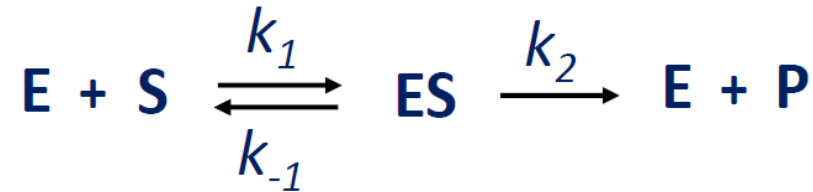
- Η έναρξη κάθε ενζυμικής αντιδράσεως σηματοδοτεί τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (Brown, 1902 και Henri, 1903), το οποίο ακολούθως διασπάται σε προϊόν και σε αρχικό ένζυμο, σύμφωνα με το πρότυπο ισοροπίας:



$$\begin{aligned}v_1 &= k_1 [\text{E}] [\text{S}] \\v_2 &= k_{-1} [\text{ES}] \\v_3 &= k_2 [\text{ES}]\end{aligned}$$

- $[\text{S}]$ συγκέντρωση υποστρώματος
- $[\text{E}]$ συγκέντρωση ελεύθερου ενζύμου
- $[\text{ES}]$ συγκέντρωση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος
- $[\text{P}]$ συγκέντρωση προϊόντος
- k_1, k_{-1}, k_2 σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

Κινητική απλής ενζυμικής αντίδρασης



$$\begin{aligned}v_1 &= k_1 [\text{E}] [\text{S}] \\v_2 &= k_{-1} [\text{ES}] \\v_3 &= k_2 [\text{ES}]\end{aligned}$$

- Ο ρυθμός μεταβολής του συμπλόκου ES είναι:

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 \Leftrightarrow \frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1 [\text{E}] [\text{S}] - k_{-1} [\text{ES}] - k_2 [\text{ES}]$$

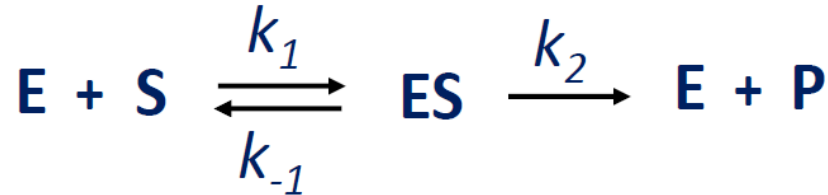
- Ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος P είναι (μάζα (ή moles) / όγκο / χρόνο) (π.χ. moles / L / min):

$$v_3 = \frac{dP}{dt} = k_2 [\text{ES}]$$

- Εφόσον το ένζυμο δεν καταναλώνεται η εξίσωση της διατήρησης του ενζύμου είναι:

$$[\text{E}] = [\text{E}_0] - [\text{ES}]$$

Κινητική απλής ενζυμικής αντίδρασης



- Συχνά, θεωρείται ότι το σύμπλοκο ES δημιουργείται σχετικά γρήγορα και ότι ο ρυθμός της αντιστρεπτής αντίδρασης του δεύτερου βήματος είναι αμελητέος.
- Χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις για την ανάπτυξη της **έκφρασης** του **ρυθμού** μιας ενζυμικής αντίδρασης.
 - **1. Η προσέγγιση της γρήγορης ισορροπίας**
 - **2. Η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης**
- Τόσο η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης όσο και η υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας έχουν τα ίδια αρχικά στάδια στην παραγωγή μίας έκφρασης ρυθμού για τον μηχανισμό της αντίδρασης.

-
- 1. Η προσέγγιση της γρήγορης ισορροπίας**
 - 2. Η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης**

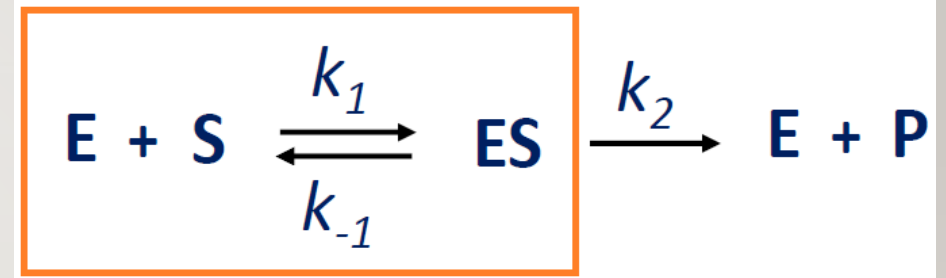
Η υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας

$$v_1 = k_1 [E][S]$$

$$v_2 = k_{-1} [ES]$$

$$v_3 = k_2 [ES]$$

- Αν θεωρήσουμε μία γρήγορη ισορροπία μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος για το σχηματισμό του συμπλόκου [ES]
- Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη **σταθερά ισορροπίας K_m** προκειμένου να εκφράσουμε το [ES] σε όρους [S].
- Το ένζυμο δεν καταναλώνεται οπότε η εξίσωση της διατήρησής του είναι $[E] = [E_0] - [ES]$
- Αντικαθιστώντας στην σταθερά ισορροπίας την εξίσωση διατήρησης του ενζύμου και λύνοντας ως προς [ES] έχουμε:



$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES]$$

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Σταθερά ισορροπίας ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]}$$

Υπόθεση γρήγορης ισορροπίας

Όταν $k_{-1} \gg k_2$ (το σύμπλοκο ES διασπάται σε E και S πολύ πιο γρήγορα από ό,τι σχηματίζεται το προϊόν)

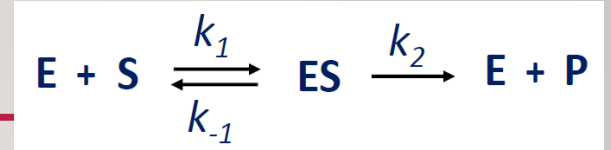
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \Rightarrow K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_2 = k_{-1} [ES]$$

$$v_3 = k_2 [ES]$$

Η υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας



$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]}$$

$$v_3 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

- Αντικαθιστώντας στην εξίσωση του ρυθμού σχηματισμού του προϊόντος [P] το [ES]

$$v = k_2 \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]}$$

$$\xrightarrow{v_{\max} = k_2 [E_0]} v = \frac{v_{\max} [S]}{K'_m + [S]}$$

Εξίσωση Michaelis-Menten
 K_m καλείται συχνά σταθερά
Michaelis-Menten

v Ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης
 v_{\max} Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
 $[S]$ Συγκέντρωση υποστρώματος
 K'_m Σταθερά ισορροπίας ($K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$)

- Η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης είναι V_{\max} η οποία αυξάνεται αν αυξηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου ενώ δεν επηρεάζεται από την προσθήκη του υποστρώματος.

Οι επιστήμονες που ανακάλυψαν την ομώνυμη εξίσωση το 1913

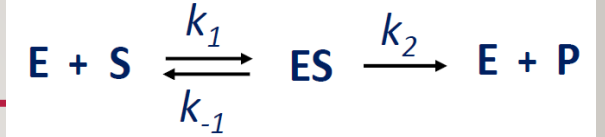


Leonor Michaelis
1875 - 1949

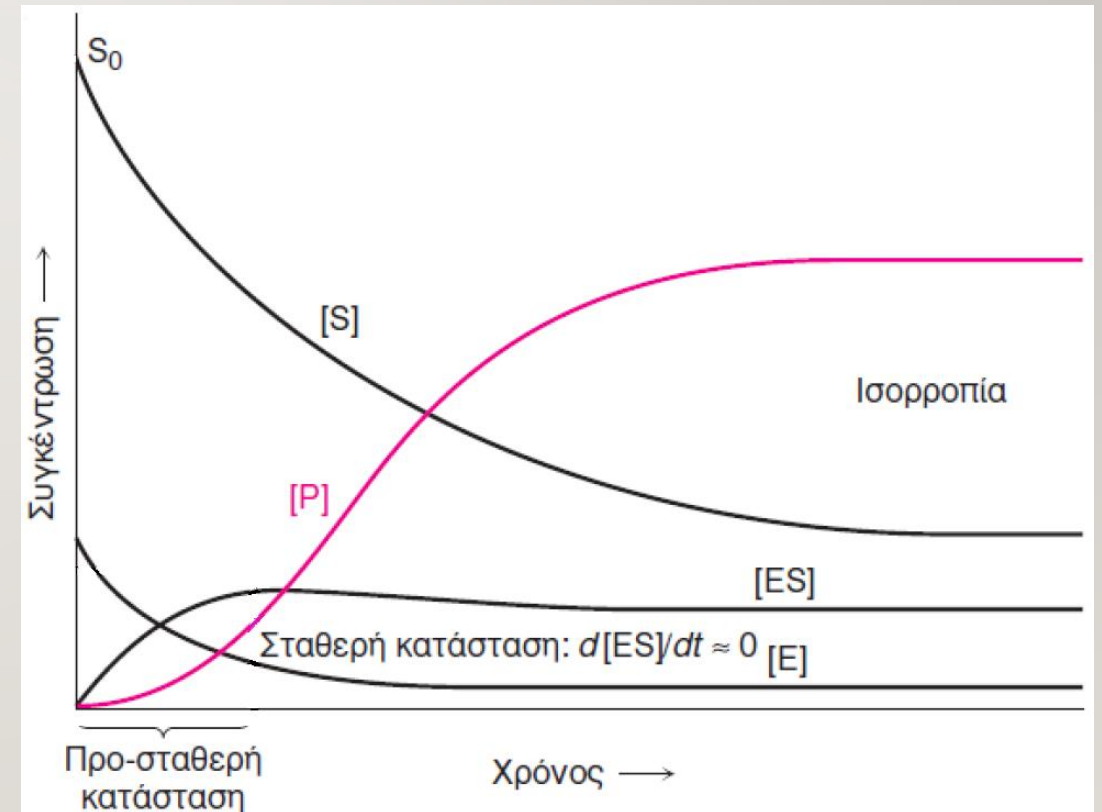


Maud Menten
1879 - 1960

Υπόθεση “Ημισταθερής” κατάστασης



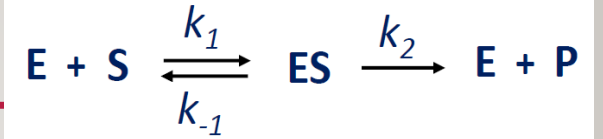
- Θεωρούμε μία ημισταθερή κατάσταση όπου η συγκέντρωση του συμπλόκου [ES] παραμένει πρακτικά σταθερή.
- Δλδ Ο ρυθμός σχηματισμού του συμπλόκου [ES] είναι σχεδόν ίσος με το ρυθμό διάσπασής του.
- Ισχύει στην περίπτωση, μετά από μία σύντομη μετάβαση (προ-σταθερή κατάσταση) κατά την οποία η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ μικρότερη από αυτή του υποστρώματος **[(E)≪(S)]**, όπως συμβαίνει στα περισσότερα από τα βιολογικά συστήματα



$$\frac{d(ES)}{dt} \approx 0$$

Ταχύτητα σχηματισμού του ES = Ταχύτητα διάσπασης του ES

Υπόθεση “Ημισταθερής” κατάστασης



- Εφαρμόζοντας την υπόθεση της ημισταθερής κατάστασης στην εξίσωση:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

- Και για $\frac{d(ES)}{dt} \approx 0$ προκύπτει $[ES] = \frac{k_1 [E][S]}{k_{-1} + k_2}$
- Αντικαθιστούμε το $[E]$ από την Εξ.Δ.Ενζ. ($[E] = [E_0] - [ES]$) και λύνουμε ως προς $[ES]$.

- Προκύπτει: $[ES] = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$

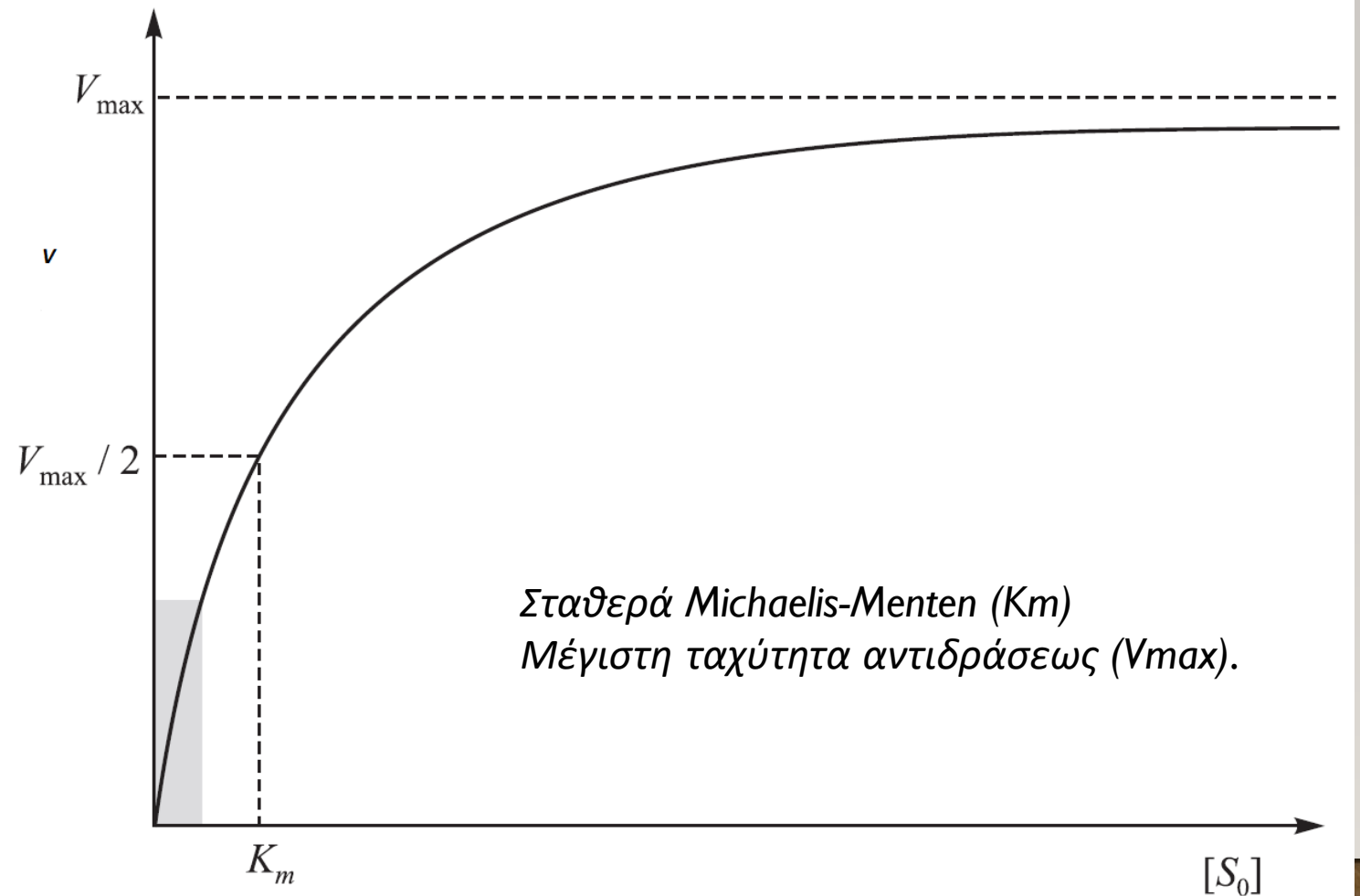
- Από $v = \frac{dP}{dt} = k_2[ES]$ προκύπτει $v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$ όπου

$$v_{\max} = k_2 [E_0]$$
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

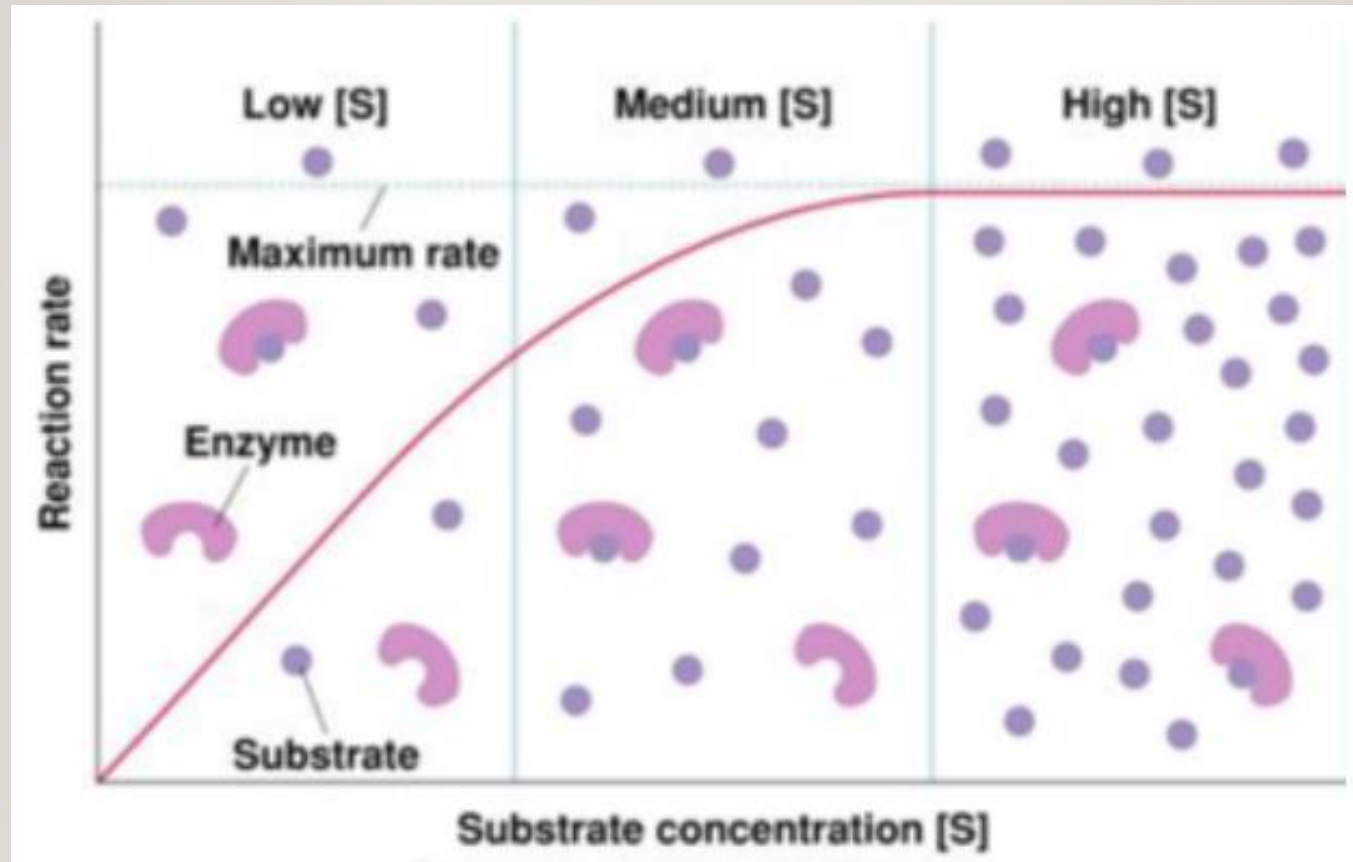
Επίδραση της συγκεντρώσεως του υποστρώματος στην ταχύτητα αντιδράσεως

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_2 [E_0] [S]}{K_m + [S]}$$

- Σε χαμηλή $[S]$ ($K_m \gg [S]$) η ταχύτητα της αντίδρασης είναι πρώτης τάξης (ανάλογη της $[S]$)
- Σε υψηλή τιμή $[S]$. Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ανεξάρτητος από την $[S]$, οπότε η κινητική είναι μηδενικής τάξεως.



Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα αντιδράσεως



Η σταθερά ισορροπίας K_m

Αν η ταχύτητα είναι το μισό της μέγιστης $v = V_{max}/2$

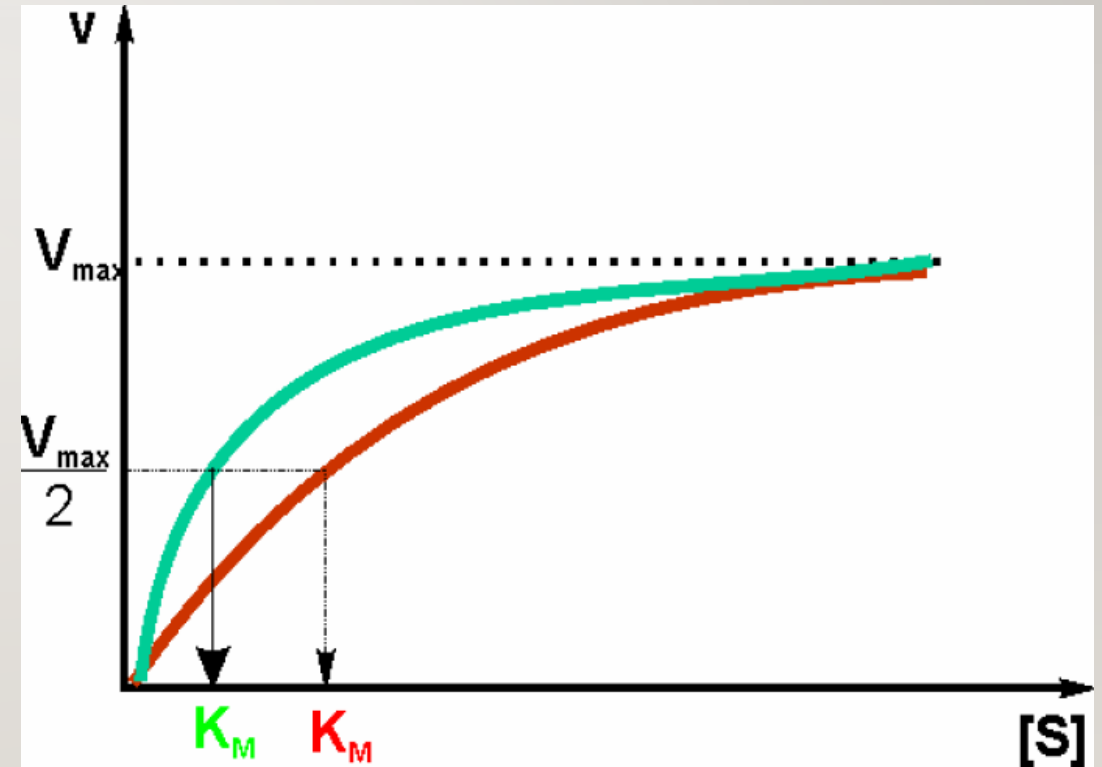
Τότε η εξίσωση $v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + k_m}$ γίνεται:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + k_m} \Leftrightarrow \frac{1}{2} = \frac{[S]}{[S] + k_m} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow [S] + k_m = 2[S] \Leftrightarrow k_m = [S]$$

Η σταθερά ισορροπίας K_m

- Η σταθερά K_m όπως φαίνεται έχει μονάδες συγκέντρωσης και αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά του ενζύμου για συγκεκριμένο υπόστρωμα.
- Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της K_m , δηλαδή (όσο περισσότερη ποσότητα υποστρώματος απαιτείται για να αποκτήσει η αντίδραση $v = V_{max}/2$) τόσο μικρότερη είναι η τάση σύνδεσης (χημική συγγένεια) μεταξύ **E** και **S** και αντίστροφα.



Τι ισχύει όταν το [S] είναι μικρό

Τότε έχουμε **κινητική πρώτης τάξης**:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S]+k_m} \Leftrightarrow v = \frac{V_{max}[S]}{k_m} = \frac{V_{max}}{k_m}[S]$$

ή απλούστερα $v = k [S]$

Δηλαδή όταν η [S] είναι πολύ μικρή η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της [S]

Ισχύει τότε $k = V_{max}/K_m$

Τι ισχύει όταν το $[S]$ είναι μεγάλο

Όταν $[S] > 10 K_m$ ισχύει:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + k_m} \text{ ή } \frac{V_{max}[S]}{[S]} \text{ ή } V_{max}$$

Τότε έχουμε **κινητική μηδενικής τάξης**

Ερμηνεία των K_m και V_{max}

- K_m
- έχει μονάδες συγκέντρωσης.
- Ισούται με τη συγκέντρωση $[S]$ για την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με $v_{max}/2$ (δλδ έχουν καταληφθεί τα μισά από τα ενεργά κέντρα).
- Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της K_m , (δηλαδή όσο περισσότερο υποστρώμα απαιτείται για να αποκτήσει η αντίδραση $v = v_{max}/2$) τόσο μικρότερη είναι η τάση σύνδεσης (χημική συγγένεια) μεταξύ E και S και αντίστροφα.
- όταν η K_m είναι γνωστή, το κλάσμα των κέντρων που έχουν καταληφθεί, f_{ES} , σε οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο.

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

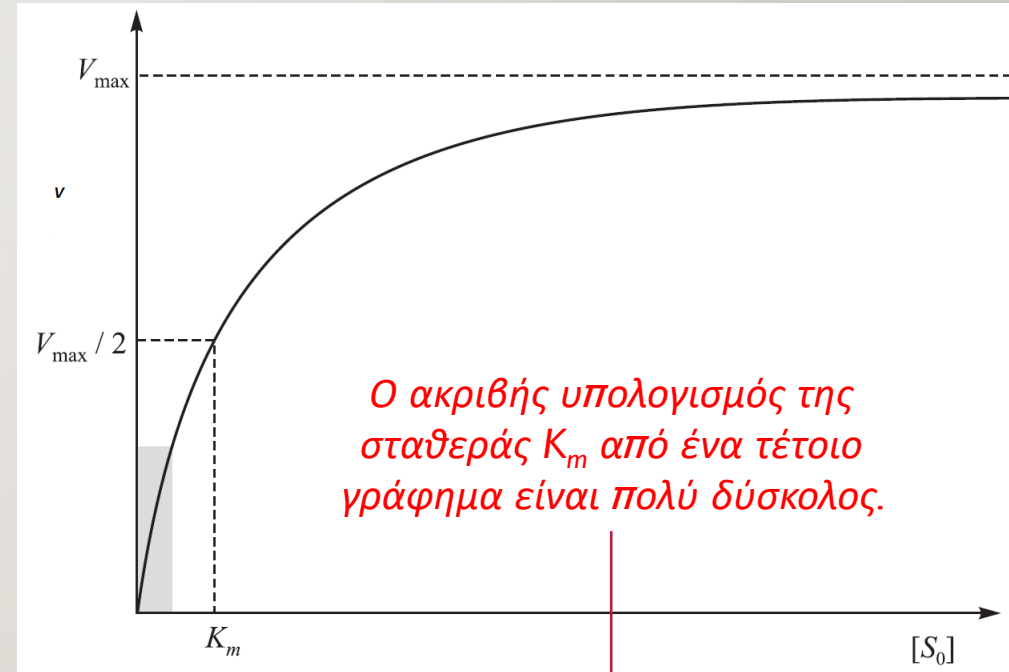
- η K_m αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά ενός ενζύμου για δεδομένο υπόστρωμα και εξαρτάται επίσης από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύ.

Ερμηνεία των K_m και V_{max} (συνέχ')

- V_{max}
 - Είναι ο θεωρητικά μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης.
 - Είναι μια συνάρτηση της παραμέτρου k_2 του ρυθμού και της αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου $[E_0]$
 - Όσο μεταβάλλεται το $[E_0]$ τόσο μεταβάλλεται και το V_{max}

Υπολογισμός των K_m και V_{max}

- Για τον υπολογισμό των K_m και V_{max} χρησιμοποιούμε πειραματικά δεδομένα τα οποία λαμβάνονται συνήθως από πειραματικά αρχικού ρυθμού αντίδρασης.
- Ένας αντιδραστήρας διαλείποντος έργου τροφοδοτείται με γνωστή ποσότητα υποστρώματος $[S_0]$ και ενζύμου $[E_0]$.
- Το προϊόν ή το υπόστρωμα αναπαριστάται γραφικά συναρτήσει του χρόνου και
- Υπολογίζεται η κλίση της καμπύλης που είναι το $v = d[P]/dt = -d[S]/dt$
- Η τιμή του v εξαρτάται από τις τιμές των $[S_0]$ και $[E_0]$.
- Πολλά παρόμοια πειράματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία ζευγαριών τιμών v και $[S_0]$.



Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί άλλες μέθοδοι υπολογισμού.

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου)

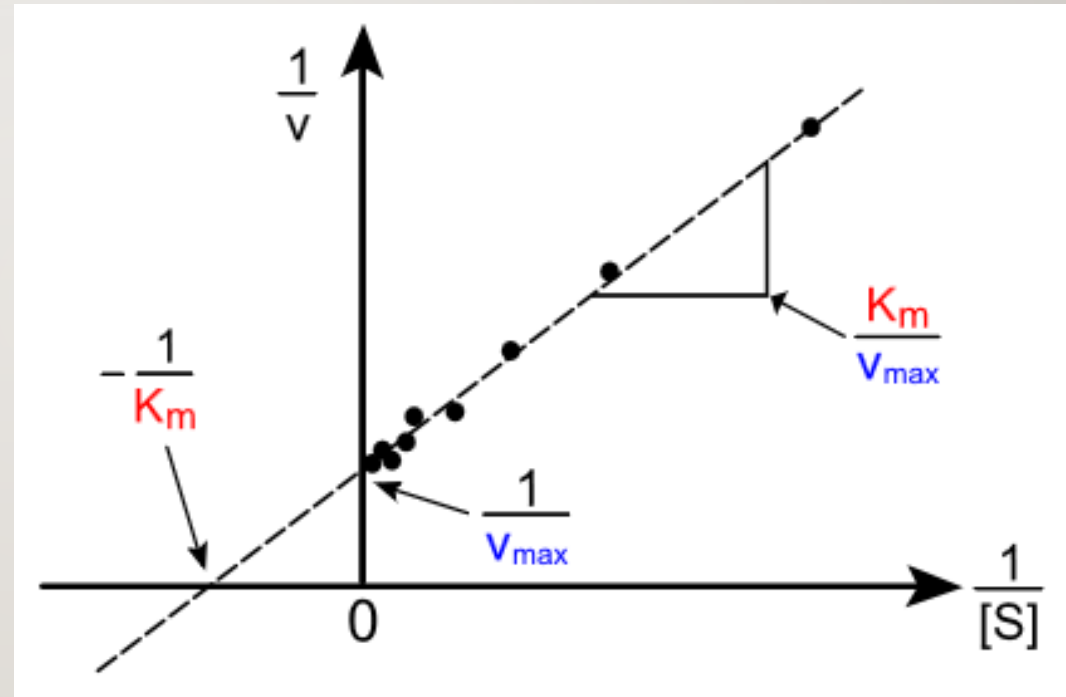
- Η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να αντιστραφεί:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + k_m} \Leftrightarrow \frac{1}{v} = \frac{[S] + k_m}{V_{max} [S]} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{v} = \frac{[S]}{V_{max} [S]} + \frac{k_m}{V_{max} [S]} \Leftrightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου)

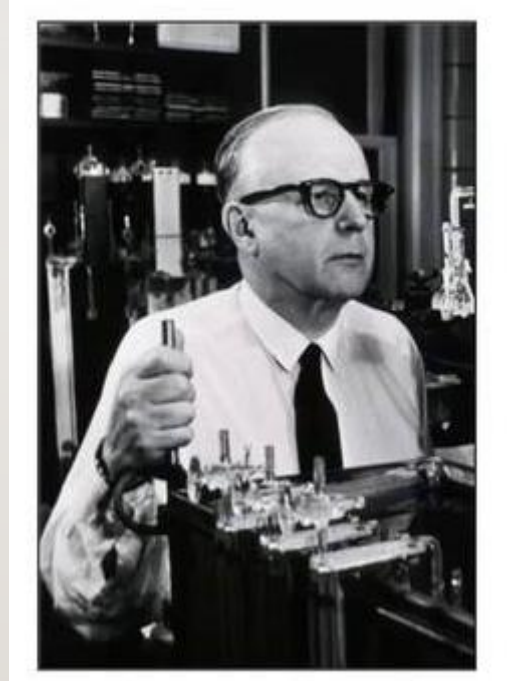
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$



Οι επιστήμονες που ανακάλυψαν την ομώνυμη εξίσωση το 1934



Hans Lineweaver
1907 - 2009

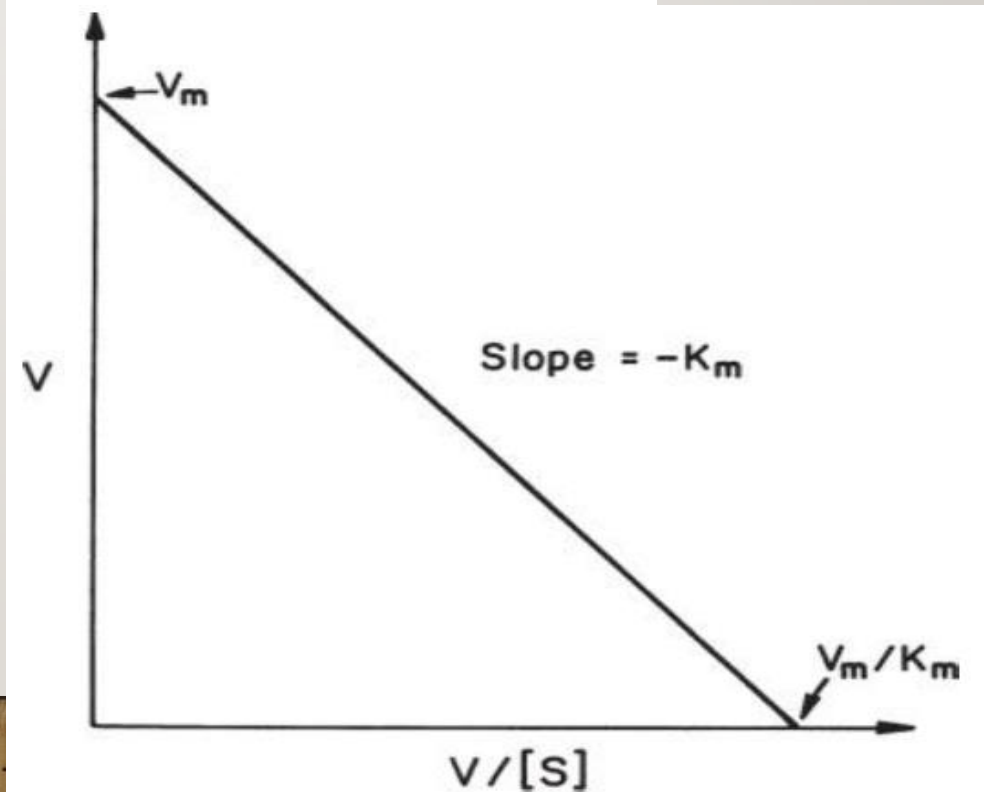


Dean Burk
1904 - 1988

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ EADIE-HOFSTEE

- Η εξίσωση Michaelis Menten μπορεί να γραφτεί ως εξής:
- Από τα γραφήματα αυτά μπορούν να δημιουργηθούν σημαντικά σφάλματα καθώς και οι δύο συνιστώσες περιέχουν το v
- Όμως υπάρχει μικρότερο συστηματικό σφάλμα στα σημεία με χαμηλό $[S]$.

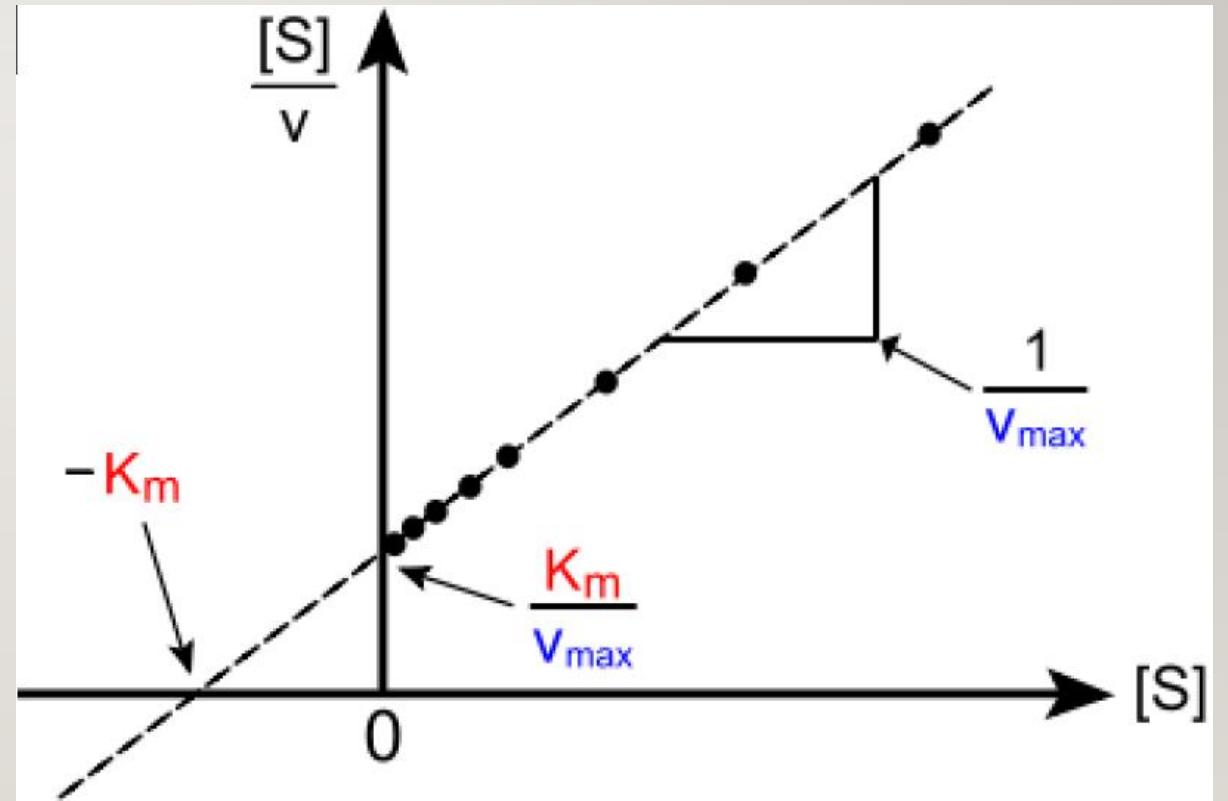
$$v = V_{max} - K_m \frac{v}{[S]}$$



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ HANES-WOOLF

- Προκύπτει από την εξίσωση Lineweaver- Burk πολλαπλασιάζοντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης επί $[S]$.
- Το γράφημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον πιο ακριβή προσδιορισμό του V_{\max}

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{v_{\max}}$$



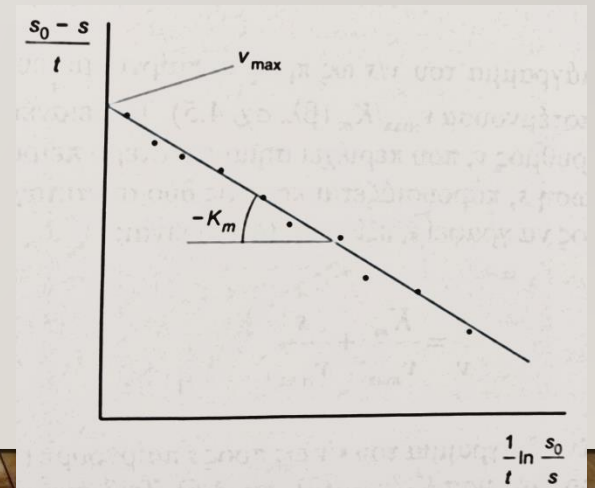
Κινητικές Διαλείποντος έργου

- Ο ρυθμός μεταβολής του $[S]$ σε μία ενζυμική αντίδραση διαλείποντος έργου μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \Rightarrow v_{\max} dt = \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) dS$$

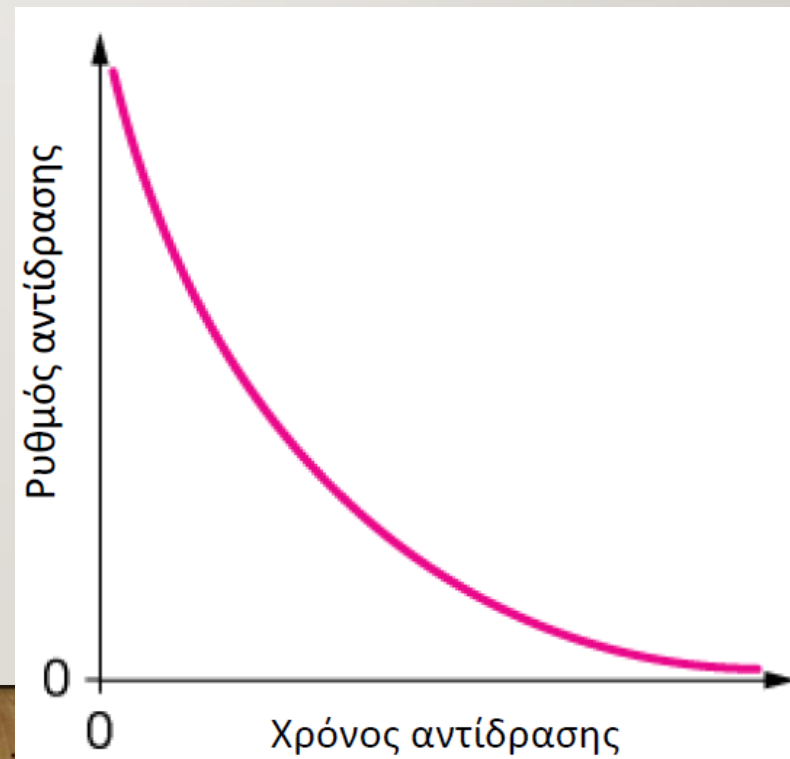
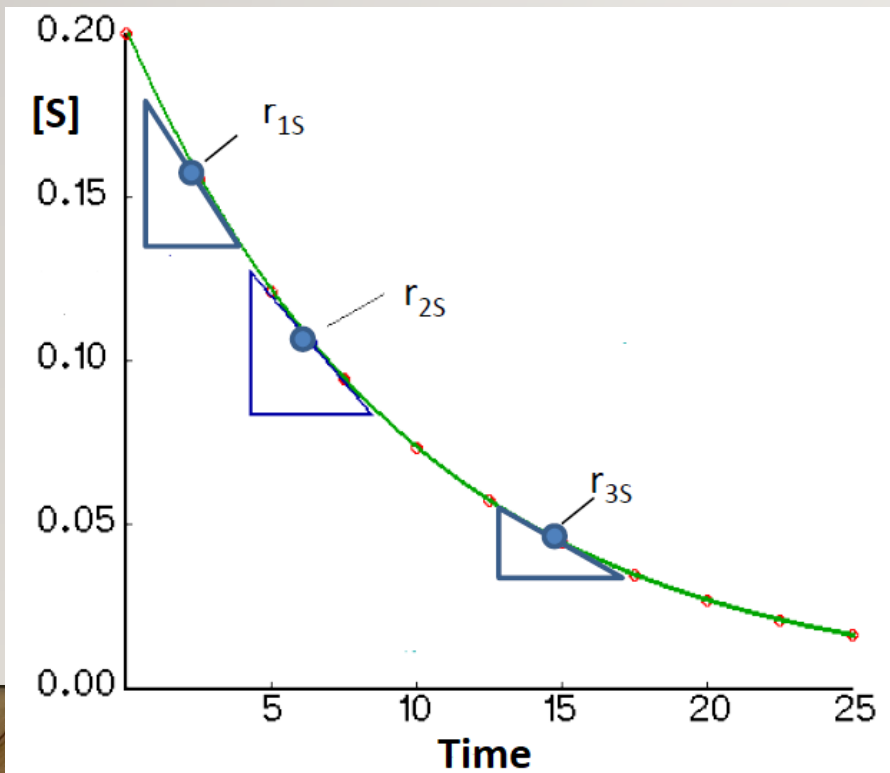
- Ολοκληρώνοντας την παραπάνω σχέση προκύπτει η παρακάτω εξίσωση όπου το γράφημα του $1/t \ln([S_0]/[S])$ συναρτήσει του $([S_0]-[S])/t$ είναι γραμμικό με κλίση $(-1/K_m)$ και αποτέμνουσα V_{\max}/K_m .

$$V_{\max} - \frac{[S_0] - [S]}{t} = \frac{K_m}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]}$$



Γραφική παράσταση του $[S]$ και του v

- Ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος S είναι ίσος με την κλίση της ευθείας.
- Ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης μειώνεται με το χρόνο.



Παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων

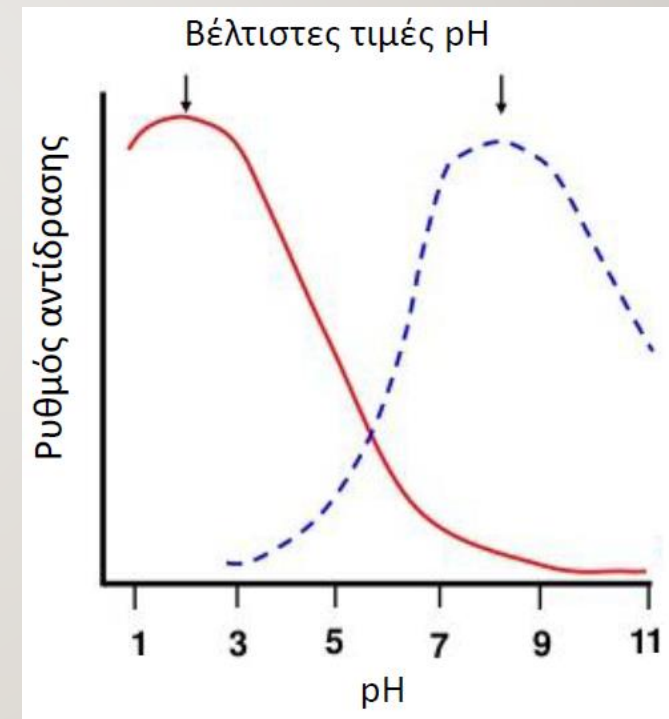
- Οι ρυθμοί των ενζυμικών αντιδράσεων γενικά εξαρτώνται από:
- Την **συγκέντρωση του ενζύμου**, [E]
- Την συγκέντρωση των αντιδρώντων (υποστρώματος), [S]
- Την συγκέντρωση διαφόρων ουσιών που ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν την κατάλυση - Αναστολείς (πιο σύνθετες ενζυμικές κινητικές) και
- Από φυσικούς παράγοντες όπως το **pH**, η **θερμοκρασία** και η ιοντική ισχύς του μίγματος.

Επίδραση του pH

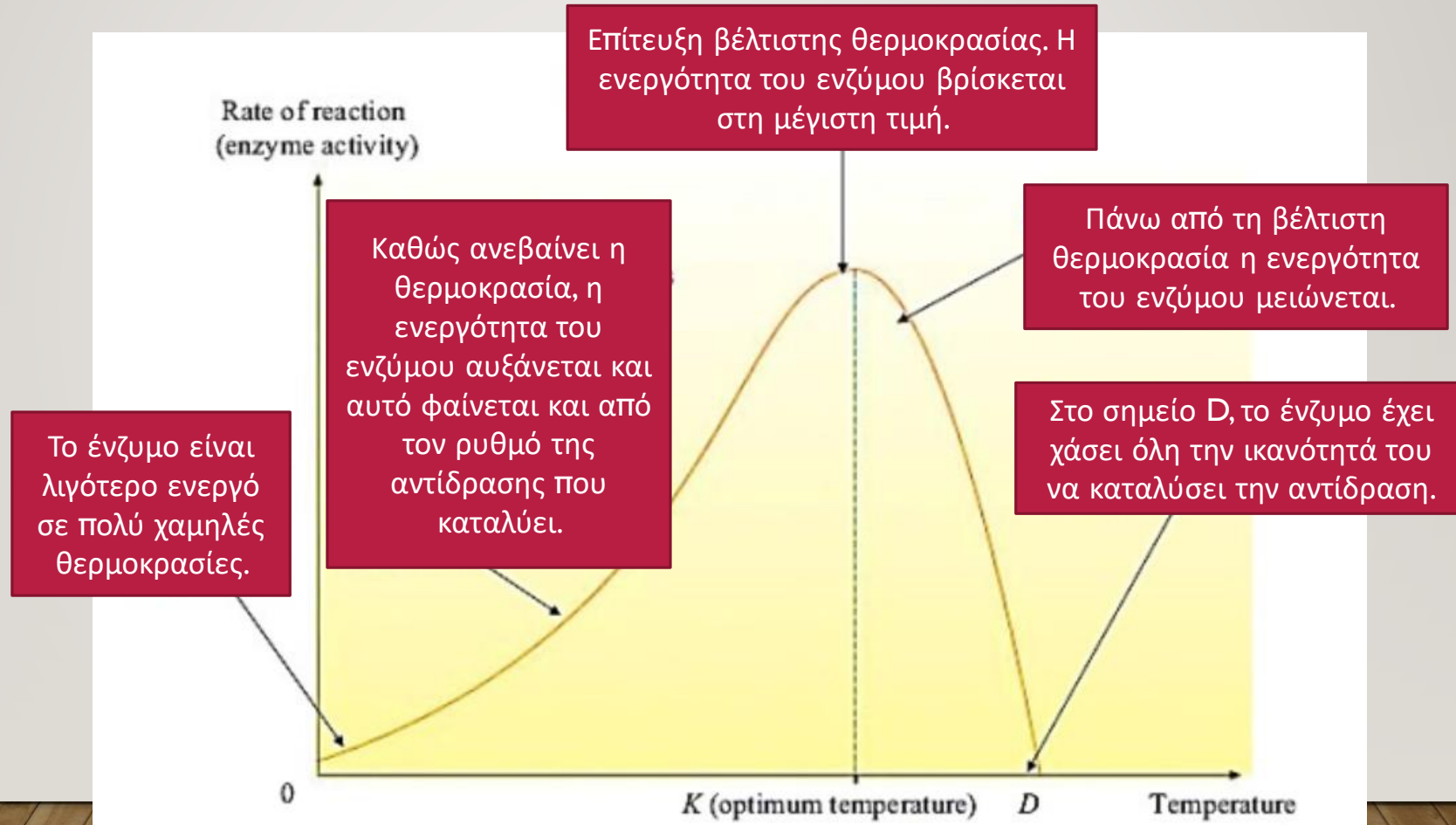
- Τα ένζυμα είναι ενεργά μόνο σε ορισμένο εύρος τιμών του pH.
- Οι μεταβολές στο pH του μέσου έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές της ιοντικής μορφής του ενεργού κέντρου και μεταβολές στη δραστικότητα του ενζύμου.
- Έχουμε μεταβολή στη συγγένεια δέσμευσης μεταξύ υποστρώματος και ενζύμου.
- Οι μεταβολές του pH μπορούν ακόμα να μεταβάλλουν την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου (μετουσίωση, που συμβαίνει για ακραίες τιμές του pH, είτε πολύ μεγαλύτερες είτε πολύ μικρότερες από το βέλτιστο).
- Μεταβολές στο pH μπορούν να επηρεάσουν το V_{\max} (μέγιστο ρυθμό της αντίδρασης), το K_m και τη σταθερότητα του ενζύμου.

Επίδραση του pH (συνέχ')

- Η θεωρητική πρόβλεψη του βέλτιστου pH ενός ενζύμου απαιτεί γνώση των χαρακτηριστικών του ενεργού του κέντρου (η οποία είναι πολύ δύσκολη).
- Για το λόγο αυτό το βέλτιστο pH ενός ενζύμου συνήθως προσδιορίζεται πειραματικά.



Επίδραση της θερμοκρασίας



Επίδραση της θερμοκρασίας

- Το ανοδικό τμήμα του διαγράμματος είναι γνωστό ως **θερμοκρασιακή ενεργοποίηση** (temperature activation).
- Στην περιοχή αυτή ο ρυθμός της αντίδρασης μεταβάλλεται σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius που περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας (T) στη σταθερά ταχύτητας διασπάσεως (k_2) του ES σε προϊόν και ελεύθερο ένζυμο.

$$v = Ae^{-E_a/RT}$$

Όπου

E_a, η ενέργεια ενεργοποίησης

A παράγοντας συχνότητας (σχετίζεται με τον αριθμό των συγκρούσεων των μορίων που έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση)

v σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης σε διάφορες θερμοκρασίες

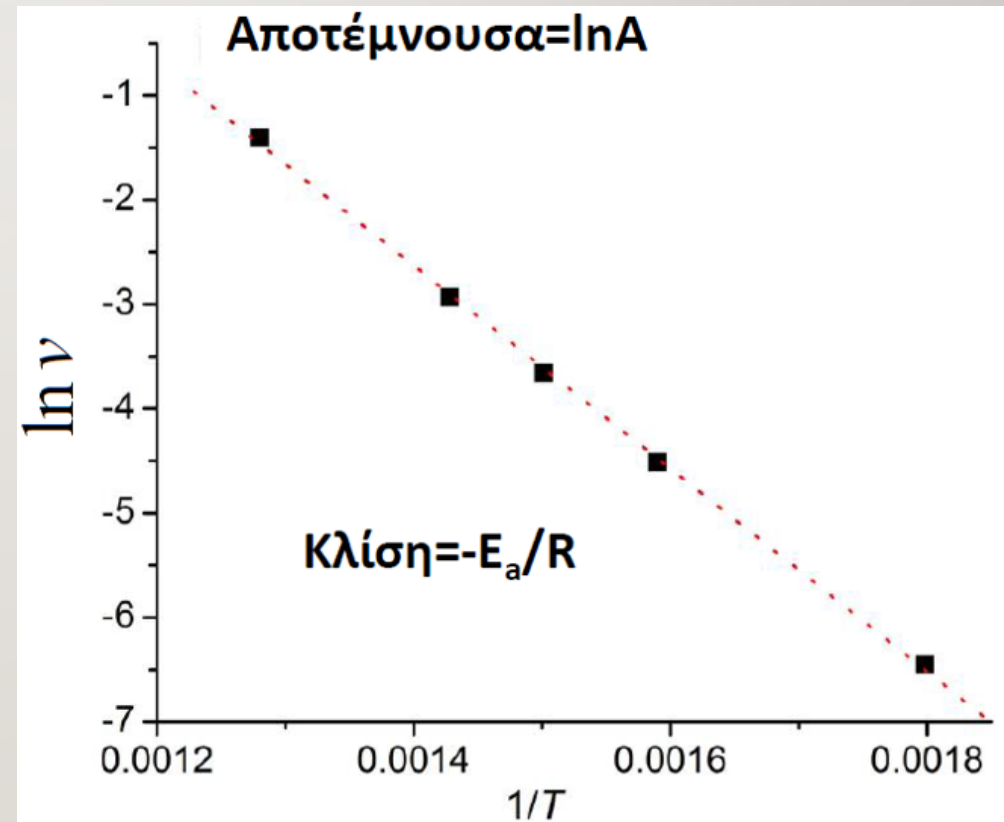
T απόλυτη θερμοκρασία (K)

R παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.31451 J·mol⁻¹·K⁻¹)

Επίδραση της θερμοκρασίας

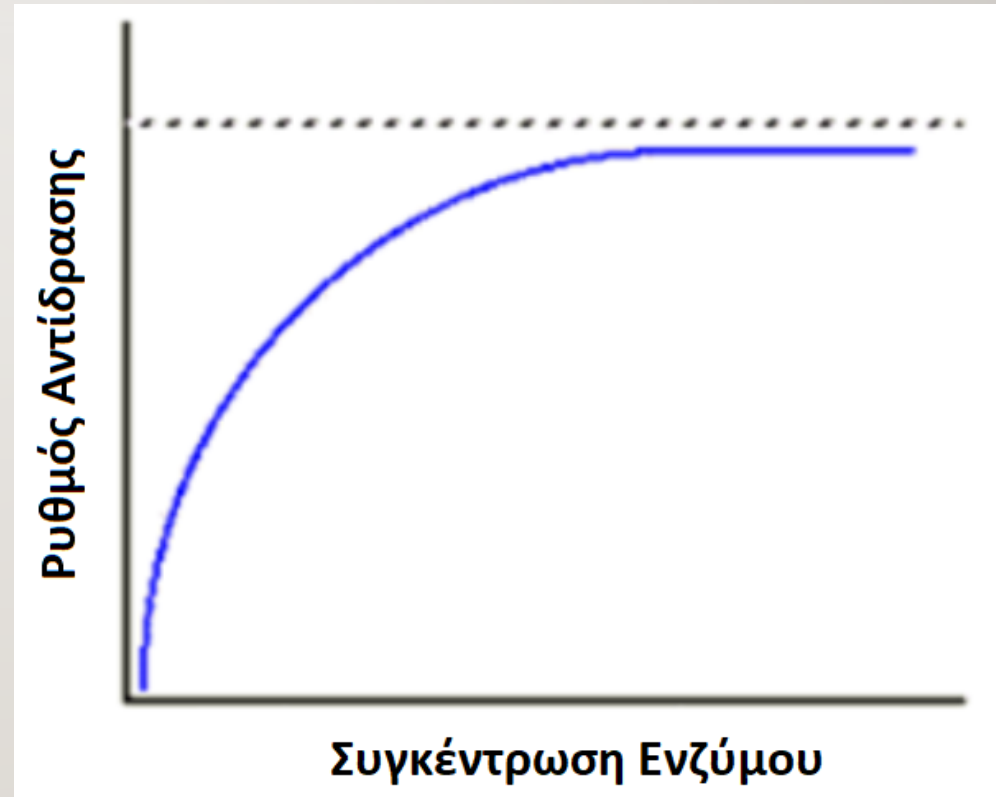
- Το γράφημα του $\ln v$ συναρτήσει του $1/T$ είναι γραμμικό με κλίση $-E_a/R$

$$\ln v = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} \right)$$



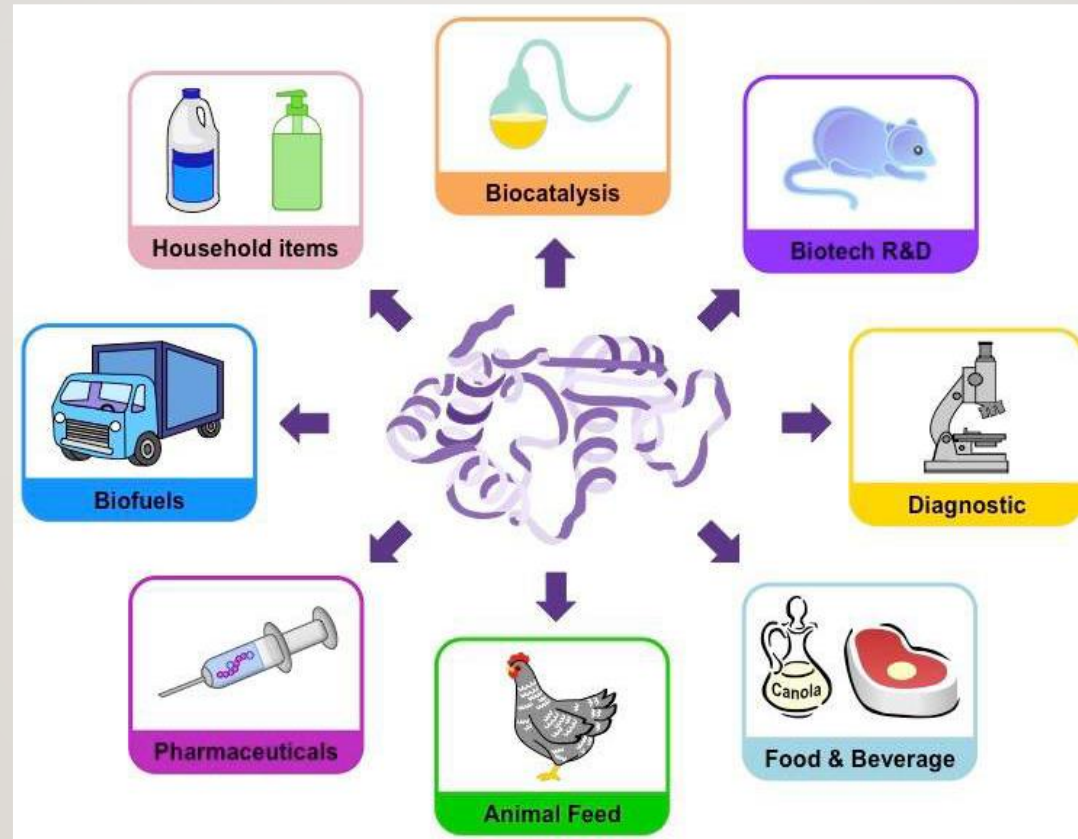
Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

- Η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου αυξάνει επίσης τη συχνότητα με την οποία συγκρούονται το ένζυμο και το υπόστρωμα. Ως αποτέλεσμα σχηματίζονται ταχύτερα σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος και ο ρυθμός αντίδρασης αυξάνεται.
- Ωστόσο, υπάρχει ένα όριο, καθώς αυξάνεται το $[E]$ θα υπάρχουν περισσότερα μόρια ενζύμου από μόρια υποστρώματος.
- Οπότε και ορισμένα ένζυμα δεν θα έχουν κανένα υπόστρωμα για σύνδεση.
- Οποιαδήποτε περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης ενζύμου δεν έχει περαιτέρω επίδραση στον ρυθμό αντίδρασης.
- Σημειώστε ότι εάν υπάρχει περίσσεια υποστρώματος (το πρώτο μέρος του γραφήματος) η γραμμή μπορεί να προσεγγιστεί σε ευθεία γραμμή.



Βιοτεχνολογία Ενζύμων

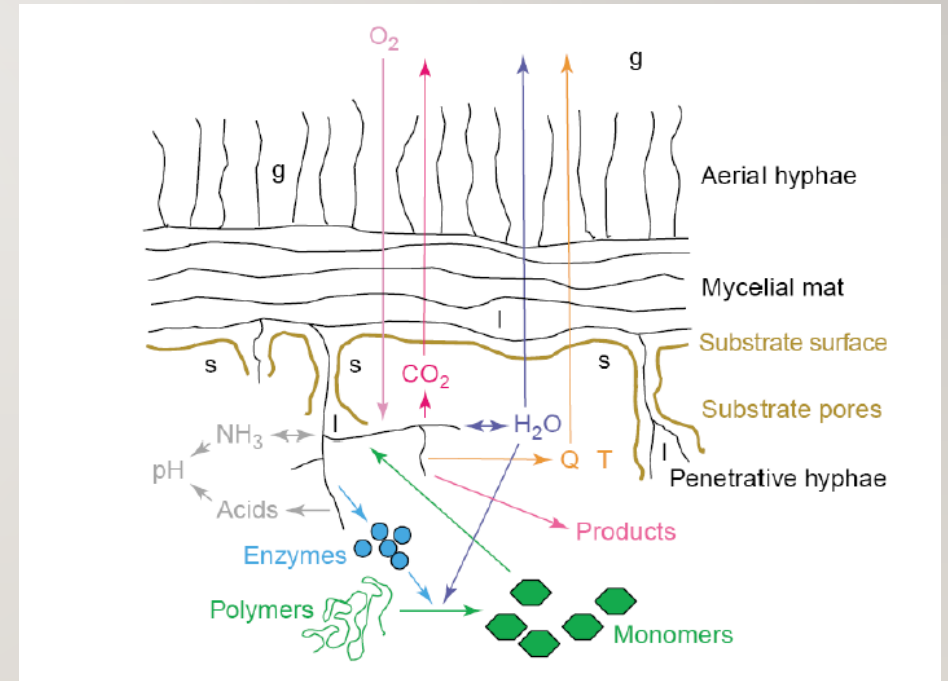
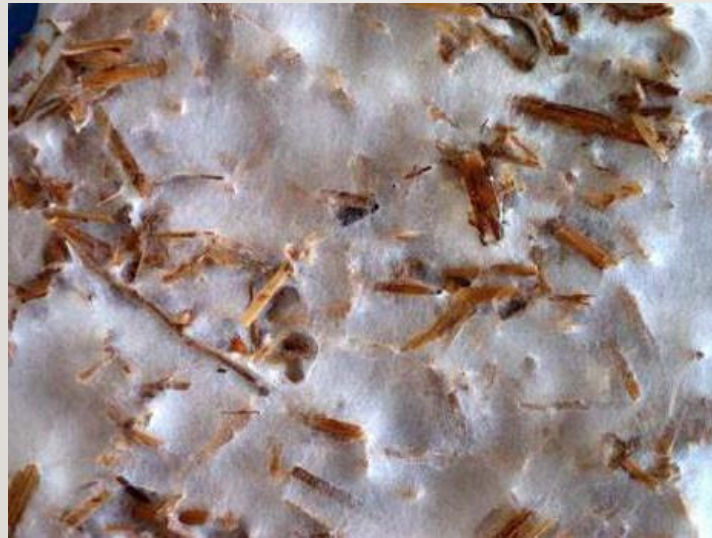
Βιοτεχνολογία ενζύμων



Βιοτεχνολογία ενζύμων

- Αρχικά, εκτός από ορισμένα ζωικής και φυτικής προέλευσης η μέγιστη πλειοψηφία των ενζύμων **παράγεται από μικροοργανισμούς**. Οι λόγοι είναι ότι:
- Η παραγωγή είναι πιο οικονομική λόγω γρήγορων ρυθμών ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό ελεγχόμενες συνθήκες (βιοαντιδραστήρες) σε φθηνά θρεπτικά υποστρώματα.
- Με γενετικούς χειρισμούς οι αποδόσεις μπορούν να αυξηθούν από μερικές εκατοντάδες μέχρι μερικές χιλιάδες φορές.
- Στελέχη με επιθυμητές ιδιότητες μπορούν να επιλεγούν από μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών με σχετικά μεγάλη ευκολία.
- Τα μικροβιακά ένζυμα είναι **εσωκυτταρικά** και **εξωκυτταρικά** όταν βρίσκονται μέσα ή έξω από το κύτταρο, αντίστοιχα.
- Τα εξωκυτταρικά πλεονεκτούν των εσωκυτταρικών ενζύμων γιατί έχουν μεγαλύτερες αποδόσεις, απομονώνονται ευκολότερα σε καθαρή μορφή, είναι πιο σταθερά και γενικά η παραγωγή τους είναι οικονομικότερη.

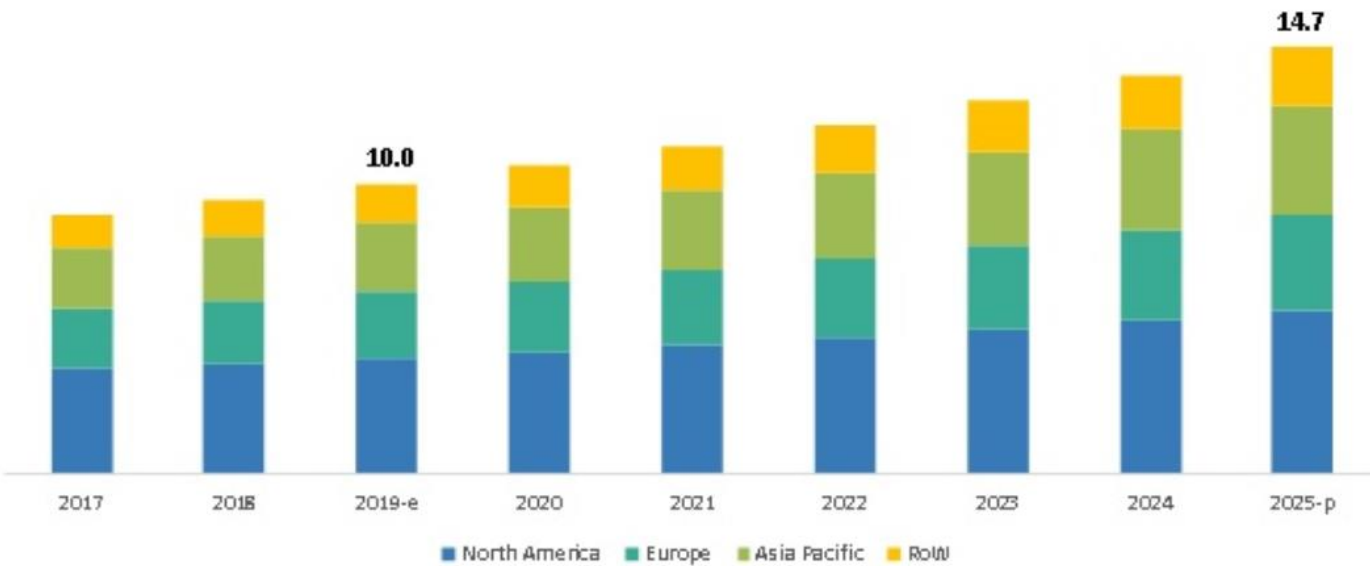
Παραγωγή Εξωκυτταρικών Ενζύμων



Micro-scale phenomena in a SSF system (Holker and Lenz, 2005)

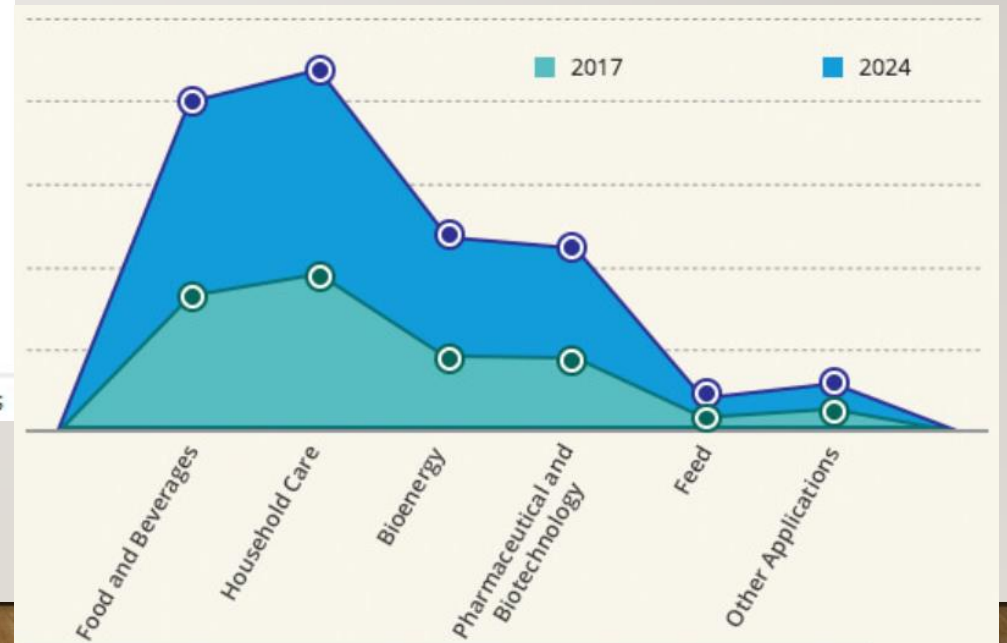
Η Αγορά των ενζύμων

GLOBAL ENZYMES MARKET, BY REGION (USD BILLION)

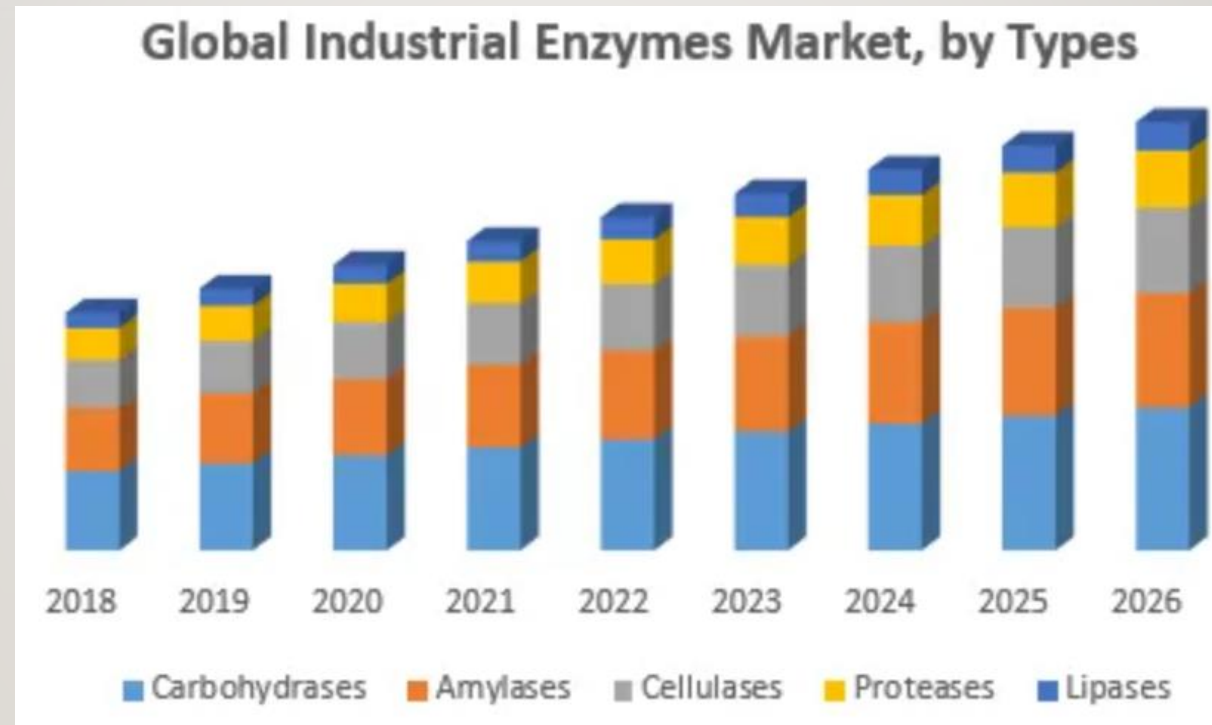


e - Estimated; p - Projected Source: Secondary Sources, Publications, Articles, and MarketsandMarkets Analysis

<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>



Η Αγορά των ενζύμων (συνέχ')



<https://thearticlesdirectory.co.uk/global-industrial-enzymes-market-industry-analysis-and-forecast-2019-2026/>

Νομικό καθεστώς χρήσης των Ενζύμων

- Η χρησιμοποίηση ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών ελέγχεται από εθνικούς και διεθνείς νόμους καταλληλότητας.
- Η εισαγωγή ενός νέου ενζύμου ή ενός ενζύμου που παράγεται από μη αβλαβή οργανισμό προϋποθέτει μακροχρόνιες και δαπανηρές δοκιμές τοξικότητας, καρκινογένεσης, κλπ.
- Μεταξύ των αβλαβών μικροοργανισμών παραγωγής ενζύμων της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών θεωρούνται:
 - ΖΥΜΕΣ: *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*
 - ΒΑΚΤΗΡΙΑ: *Bacillus subtilis* (*B. mesentericus*, *B. natto*, *B. amyloliquefaciens*), *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc oenos*
 - ΜΥΚΗΤΕΣ: *Aspergillus niger* (*A. awamori*, *A. foetidus*, *A. phoenicis*, *A. saitoi*, *A. usumii*), *A. oryzae* (*A. sojae*, *A. effusus*) *Mucor japonicus*, *Rhizopus arrhizus*, *R. oligosporus*, *R. oryzae*

Μέθοδοι παραγωγής ενζύμων

- Όλα τα μικροβιακά ένζυμα παράγονται με ζύμωση. Η διεργασία αυτή επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι:
- **1. Μικροοργανισμός**
- Είναι ίσως ο σπουδαιότερος παράγων. Το στέλεχος που θα επιλεγεί πρέπει:
 - Να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση στο μικρότερο χρόνο
 - Να μην παράγει τοξικές και άλλες ανεπιθύμητες ουσίες (χρωστικές, βλεννώδη προϊόντα, κ.α.)
 - Να χρησιμοποιεί φθηνές οργανικές και ανόργανες πηγές θρεπτικών στοιχείων
- **2. Θρεπτικά στοιχεία**
- Αποτελούνται από συνθετικές και φυσικές ουσίες που περιέχουν πηγές C, N, ενέργειας, απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία και παράγοντες ανάπτυξης για τα αυξότροφα μικροβιακά στελέχη
- Οι φυσικές πηγές C περιλαμβάνουν μελάσα, υποπροϊόντα της βιομηχανίας δημητριακών και τροφίμων, άμυλο πατάτας, κ.ά.
- Οι φυσικές πηγές N περιλαμβάνουν καζεΐνη, πεπτόνη, ζελατίνη εκχύλισμα ζύμης, υγρά επεξεργασίας αραβόσιτου και φυτικά έλαια.

Δομή Μαθήματος

Ισοζύγια μάζας
& Στοιχειομετρία

Κινητική Ενζυμικών
αντιδράσεων

Κινητική ανάπτυξης
μικροβίων & παραγωγή
Μεταβολικών προϊόντων

Εισαγωγικό
Μάθημα

Ανάντι και κατάντι
διεργασίες σε
συστήματα
βιοδιεργασιών



Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

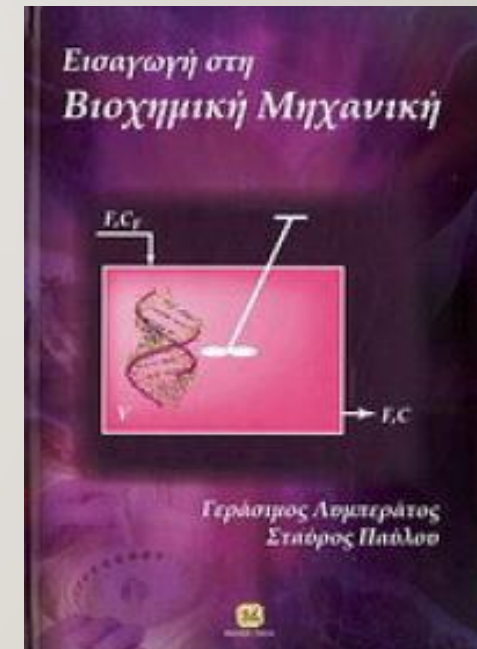
Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

Βιβλιογραφία



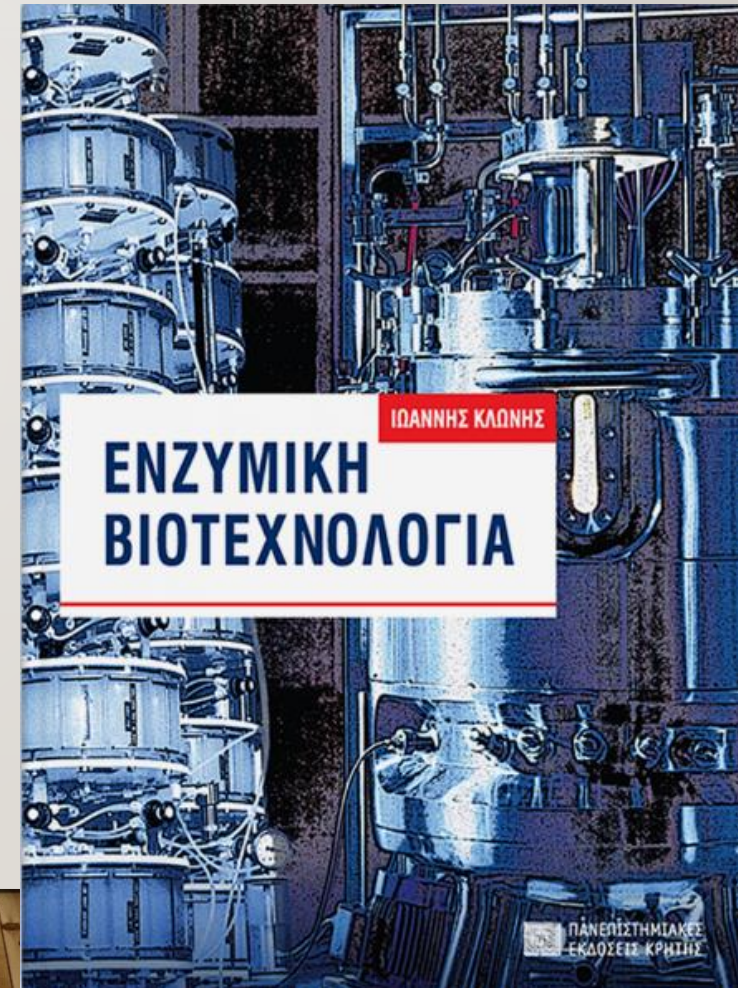
Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

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



Επιπλέον Βιβλιογραφία

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



Τι μάθαμε σήμερα

- Τι είναι τα ένζυμα και πως λειτουργούν
- Πληροφορίες στη Βιοτεχνολογία Ενζύμων και την αγορά τους
- Πως η $[S]$ επηρεάζει την κινητική των Ενζύμων
- Χρήση της εξίσωσης Michaelis-Menten
 - 1. Η προσέγγιση της γρήγορης ισορροπίας
 - 2. Η προσέγγιση της ημισταθερής κατάστασης
- Τι σημαίνουν τα K_m και V_{max}
- Πως επιδρά η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του $[E]$ στο ρυθμό της αντίδρασης.