

ENZYMA - KINHHTIKH ENZYMΩN

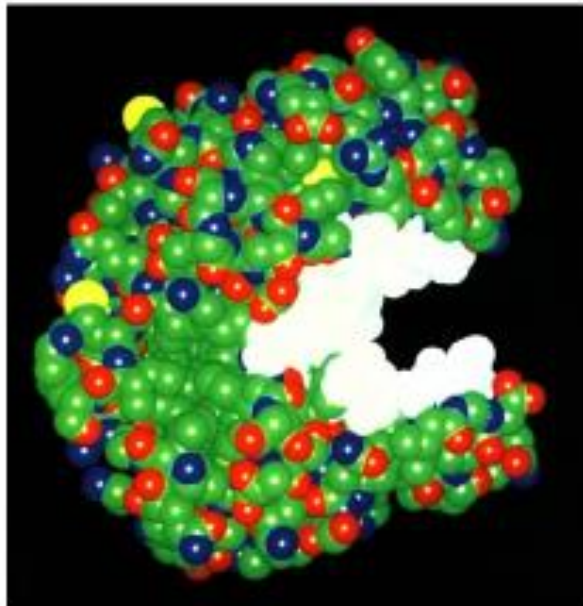
BIOXHMEIA II

ΓΙΩΡΓΟΣ ΛΑΓΟΥΜΙΝΤΖΗΣ

Τα ένζυμα είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσεως τα οποία αποτελούν τους καταλύτες βιολογικών λειτουργιών

Χαρακτηρίζονται από:

- καταλυτική ισχύ και
- Εξειδίκευση



- ✓ Επιταχύνουν τις αντιδράσεις κατά ένα εκατομμύριο φορές ή και περισσότερο.
- ✓ Έχουν **υψηλό βαθμό ειδίκευσης** τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων που ονομάζονται υποστρώματα.
- ✓ Η εξειδίκευση ενός ενζύμου οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου. Η ακρίβεια αυτή είναι αποτέλεσμα της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής της ενζυμικής πρωτεΐνης.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

Οι 6 βασικές ενζυμικές κατηγορίες:

1. **Οξειδορεδουκτάσες ή οξειδοαναγωγάσες, oxidoreductases** (καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής)
2. **Τρανσφεράσες, transferases** (καταλύουν τη μεταφορά ενεργών ομάδων)
3. **Υδρολάσες, hydrolases** (καταλύουν την υδρόλυση εστέρων, αιθέρων...)
4. **Λυάσες, lyases** (καταλύουν την προσθήκη ή την αφαίρεση νερού)
5. **Ισομεράσες, isomerases** (καταλύουν με ενδομοριακή μετάθεση την ισομερείωση οπτικών και γεωμετρικών ισομερών ή ισομερών σε θέσεις)
6. **Λιγάσες, ligases** (καταλύουν αντιδράσεις σύνδεσης παρουσία ATP)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
Οξειδοαναγωγάσες	Οξείδωση-Αναγωγή
Μεταφοράσες	Μεταφορά ομάδας
Υδρολάσες	Υδρολυτική διάσπαση δεσμών και μεταφορά ομάδων στο νερό
Λυάσες	Μή υδρολυτική διάσπαση δεσμών και δημιουργία διπλών δεσμών στα προϊόντα
Ισομεράσες	Ισομερίωση (ενδομοριακή μεταφορά ομάδων)
Λιγάσες	Δημιουργία δεσμών C-C, C-N, C-S, C-O μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων με δαπάνη ATP

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η ουσία της κατάλυσης είναι η ελάττωση της απαιτούμενης ενέργειας ενεργοποίησης με την διευκόλυνση του σχηματισμού της μεταβατικής κατάστασης

- Χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης σημαίνει ότι περισσότερα μόρια έχουν την απαιτούμενη ενέργεια να φθάσουν στη μεταβατική κατάσταση

Βασικοί όροι της ενζυμολογίας

Ένζυμο E (Enzyme)

Υπόστρωμα S (Substrate)

Σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος ES
(Enzyme-Substrate Complex)

Προϊόν P (Product)

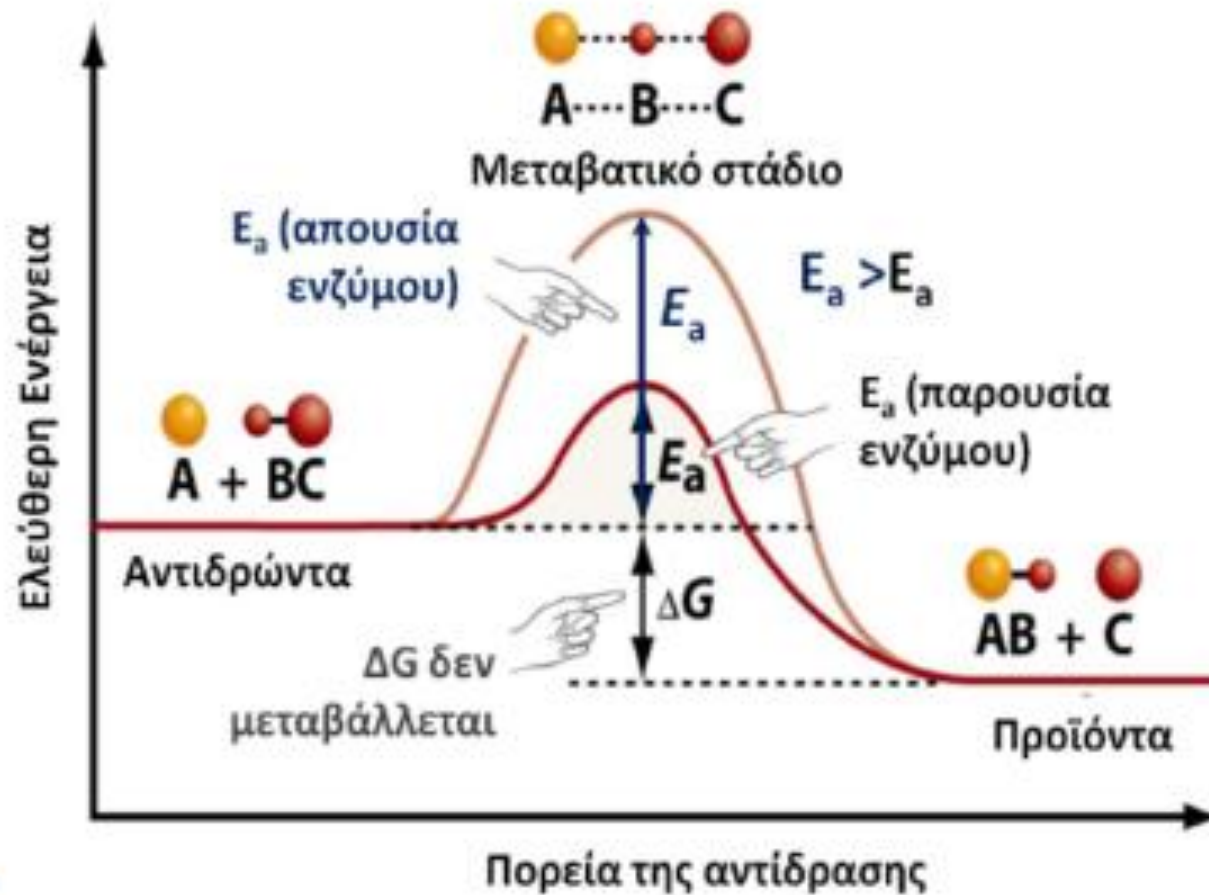
Αναστολέας I (Inhibitor)

Τα ένζυμα ως βιολογικοί καταλύτες

Τα ένζυμα:

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

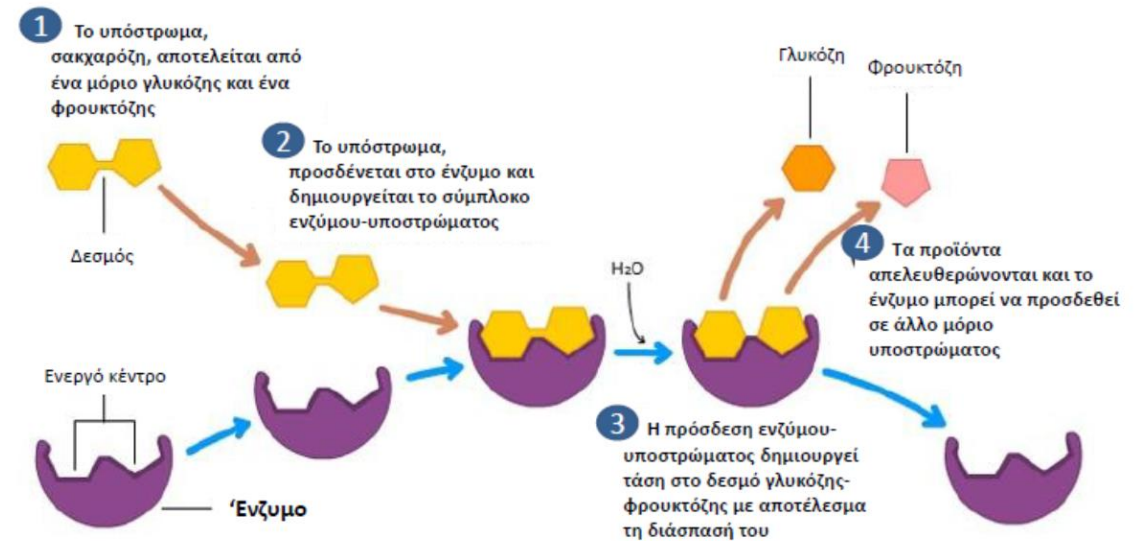
(β) **αυξάνουν** την **ταχύτητα** μιας αντίδρασης από ένα εκατομμύριο (10^6) έως και ένα τρισεκατομμύριο (10^{12}) φορές



Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος είναι το πρώτο βήμα στην ενζυμική κατάλυση

- Το πρώτο βήμα στην κατάλυση είναι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου *ενζύμου-υποστρώματος (ES)*.
- Τα ένζυμα προσδένονται στο υπόστρωμα και μεταβάλλουν τη δομή του για να προαγάγουν τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης.
- Τα υποστρώματα προσδένονται σε μια ειδική περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται *ενεργό κέντρο*.
- Τα περισσότερα ένζυμα είναι πολύ επιλεκτικά με τα υποστρώματα που προσδένουν. Η καταλυτική εξειδίκευση των ενζύμων εξαρτάται από την εξειδίκευση αυτής της πρόσδεσης.

Πώς λειτουργούν τα ένζυμα



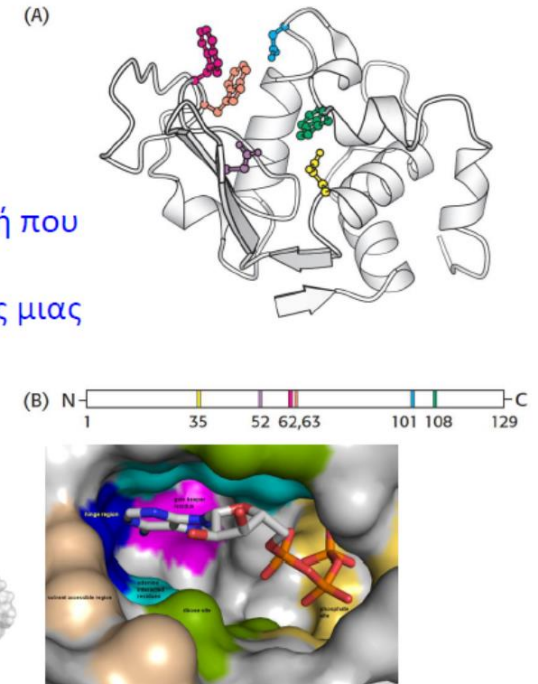
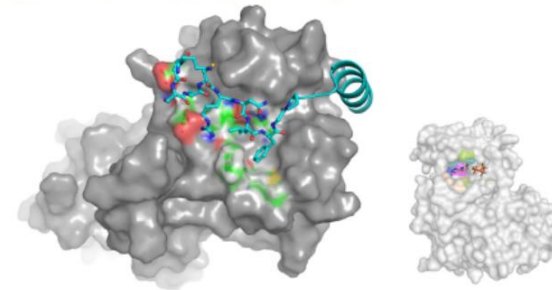
ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Ενεργό κέντρο των ενζύμων

- Η αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος δεν γίνεται σε τυχαίες περιοχές του ενζύμου αλλά σε συγκεκριμένη περιοχή, η οποία στα περισσότερα ένζυμα έχει τη μορφή ρωγμής ή σχισμής, που σχηματίζεται από τις αναδιπλώσεις της πολυπετιδικής αλυσίδας. Η περιοχή αυτή ονομάζεται **ενεργό κέντρο (καταλυτικό κέντρο)** του ενζύμου.
- Ο ρόλος του ενεργού κέντρου είναι να αναγνωρίζει το υπόστρωμα, να το προσανατολίζει στην κατάλληλη θέση σε σχέση με το ένζυμο και να του προσδίδει την κατάλληλη στεreoδιαμόρφωση.

Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής ισχύος των ενζύμων πηγάζει από το ότι φέρνουν τα υποστρώματά τους κοντά σε ευνοϊκό προσανατολισμό για να προάγουν το σχηματισμό των μεταβατικών καταστάσεων μέσα σε σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος (ES)

Το ενεργό κέντρο είναι μια τριδιάστατη εσοχή που έχει σχηματιστεί από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές μιας γραμμικής αλληλουχίας αμινοξέων



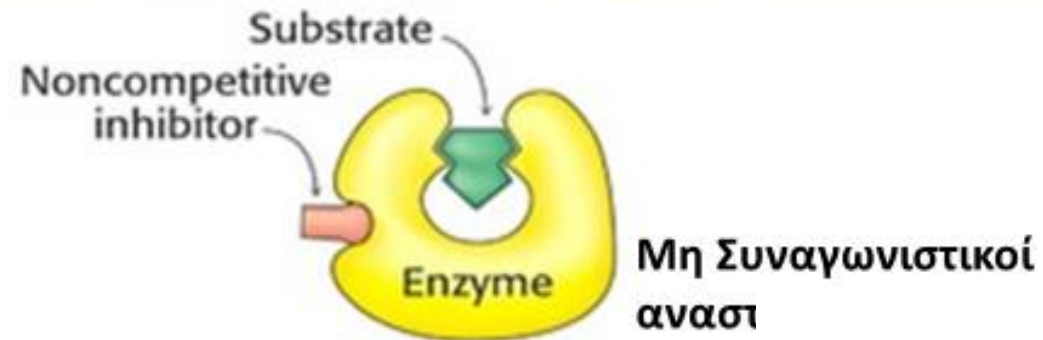
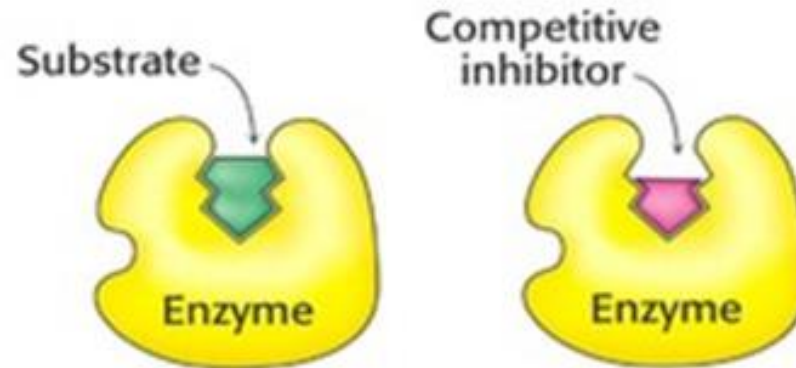
ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής ενζύμων.



ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Συναγωνιστικοί αναστολείς



ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η **δραστικότητα** (ή **ενεργότητα**) ενός ενζύμου εκφράζεται συνήθως με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο. Ως ταχύτητα, ορίζεται η ποσότητα του υποστρώματος που μετατρέπεται στη μονάδα του χρόνου.

Με βάση αυτό, η **διεθνής μονάδα, (International Unit, IU)**, μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας εκφράζει την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή ενός μικρογραμμομορίου (μmol) υποστρώματος ανά λεπτό (min), σε καθορισμένες συνθήκες διεξαγωγής της ενζυμικής αντίδρασης.

$$\text{IU} = 1 \mu\text{mol} / \text{min}$$

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι:

- ☐ συγκέντρωση υποστρώματος [S]

- ☐ συγκέντρωση ενζύμου [E]

- ☐ pH διαλύματος

- ☐ θερμοκρασία

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστικότητα των ενζύμων είναι:

- ♦ pH
- ♦ Συγκέντρωση υποστρώματος και
- ♦ Θερμοκρασία

Η δράση των ενζύμων είναι μέγιστη σε ένα συγκεκριμένο pH (άριστο pH), που εξαρτάται από το είδος του ενζύμου

Επίδραση pH

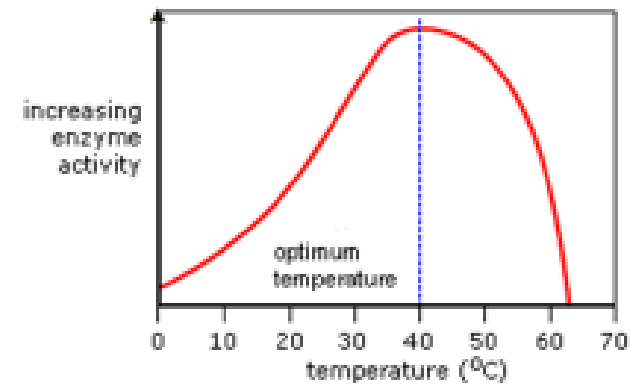
- ✓ Η μέγιστη δραστικότητα στο βέλτιστο pH
- ✓ Τα περισσότερα ένζυμα χάνουν τη δραστικότητά τους σε υψηλές ή χαμηλές τιμές pH



ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Επίδραση θερμοκρασίας

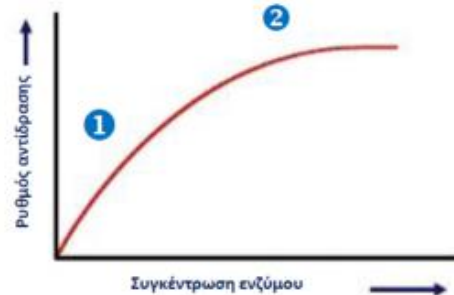
- ✓ Παρουσιάζουν μικρή δραστικότητα σε χαμηλή θερμοκρασία
- ✓ Τα περισσότερα ένζυμα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστικότητα στη βέλτιστη θερμοκρασία (συνήθως 37°C)
- ✓ Σε υψηλές θερμοκρασίες μετουσιώνονται και χάνουν τη δραστικότητά τους



Η ενεργότητα ενός ενζύμου αυξάνει με τη θερμοκρασία μέχρι ενός ορίου (άριστη θερμοκρασία), πέρα από το οποίο ελαττώνεται.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου



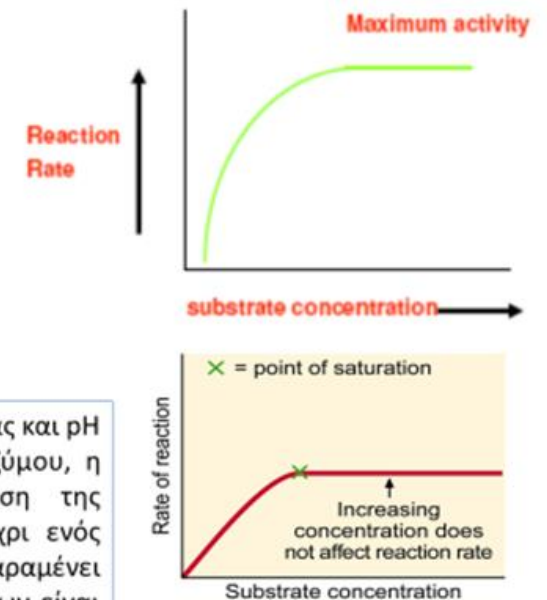
Αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης (1) περισσότερα μόρια ενζύμου περισσότερες ενεργές συγκρούσεις με το υπόστρωμα

Μείωση του ρυθμού της αντίδρασης (2) το υπόστρωμα γίνεται ο περιοριστικός παράγοντας δεν βρίσκουν όλα τα μόρια ενζύμου μόρια υποστρώματος

Συγκέντρωση υποστρώματος

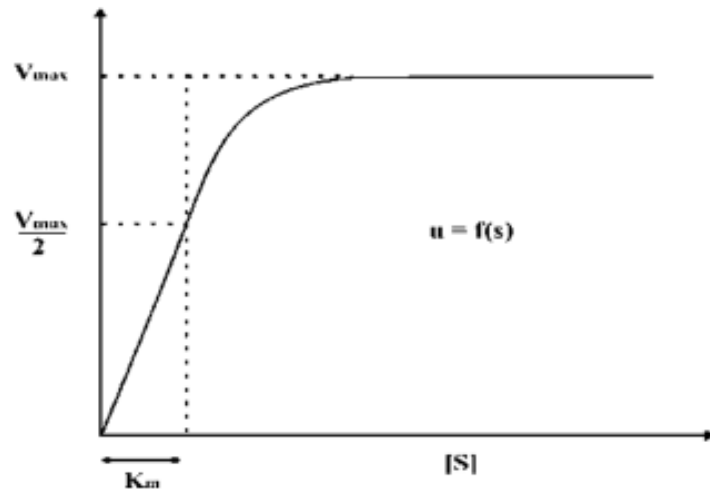
- ✓ αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης
- ✓ η μεγαλύτερη δραστηριότητα επιτυγχάνεται όταν όλα τα ένζυμα συνδέονται με τα αντίστοιχα υποστρώματα

Σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH και για συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου, η δράση του αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, μέχρι ενός μέγιστου, πέρα από το οποίο παραμένει σταθερή, γιατί όλα τα μόρια των ενζύμων είναι συνδεδεμένα με υπόστρωμα. **ΚΟΡΕΣΜΟΣ!!**



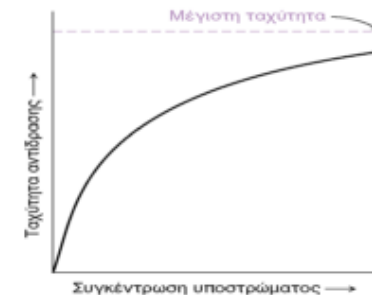
ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η γραφική παράσταση της μεταβολής της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος, είναι μία **υπερβολική καμπύλη**.



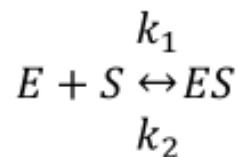
Η μέγιστη ταχύτητα υποδηλώνει τον πλήρη σχηματισμό του συμπλόκου ES.

- Σε υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος, οι καταλυτικές περιοχές του ενζύμου (ενεργά κέντρα) είναι κατειλημμένες (**κορεσμένες**) και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης δεν μπορεί πλέον να αυξηθεί με επιπλέον αύξηση του υποστρώματος.



ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

- Το 1913 οι **Leonor Michaelis** και **Maud Menten** κατέληξαν στη διατύπωση της υπόθεσης ότι το ένζυμο με το υπόστρωμα δίνουν ένα **σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES)** σύμφωνα με την αντίδραση:

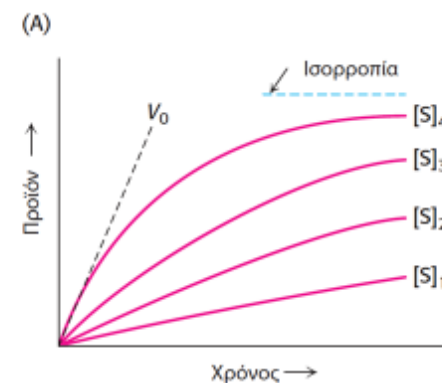


Leonor Michaelis, 1875-1949

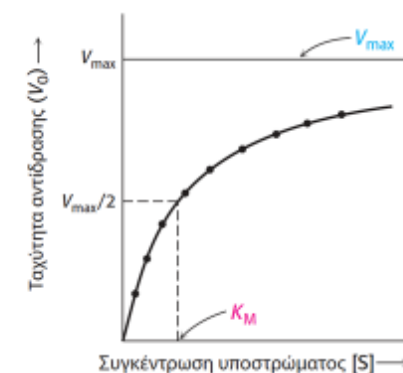


Maud Menten, 1879-1960

Κινητική - Μοντέλο Michaelis-Menten



ποσότητα προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος



αρχική ταχύτητα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης υποστρώματος

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

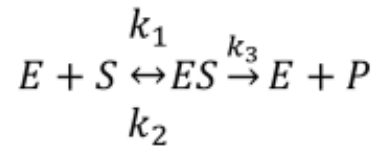
Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης ορίζεται ως το ποσό του υποστρώματος που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων που δημιουργούνται στη μονάδα του χρόνου. Ανάλογα με την επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, τα ένζυμα διακρίνονται σε ένζυμα Michaelis- Menten και αλλοστερικά ένζυμα.

Το μοντέλο μιας ενζυμικής αντίδρασης Michaelis- Menten φαίνεται παρακάτω:



όπου, E: Ένζυμο, S: Υπόστρωμα, ES: Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος, P: Προϊόντα, K_1 : Σταθερά ταχύτητας δημιουργίας του συμπλόκου ES, K_{-1} : Σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES και K_2 : Σταθερά ταχύτητας δημιουργίας των προϊόντων.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYΜΩΝ



- Για τη διαμόρφωση της σχέσης μεταξύ ταχύτητας της αντίδρασης και συγκεντρώσεων έγιναν τρεις παραδοχές:
 - Το σύμπλοκο ES είναι μία σταθερή κατάσταση και η συγκέντρωση του [ES] είναι σταθερή.
 - Στην κατάσταση του κορεσμού, όλα τα μόρια του ένζυμου μετατρέπονται σε σύμπλοκο ES.
 - Όταν όλο το ένζυμο μετατρέπεται σε σύμπλοκο ES, τότε η ταχύτητα της αντίδρασης είναι η μέγιστη και $V_{\max} = k_3[ES]$.

- Με μία σειρά παραδοχών, μετασχηματισμών και υποκαταστάσεων, η τελική μορφή της εξίσωσης Michaelis-Menten, υποστηρίζει, ότι *η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι ο λόγος της μέγιστης ταχύτητας επί την συγκέντρωση του υποστρώματος δια του αθροίσματος της K_m , μιας σταθεράς, της σταθεράς Michaelis-Menten συν την συγκέντρωση του υποστρώματος.*

$$V = V_{\max} \cdot [S] / K_m + [S]$$

- Η αντίδραση δεν ολοκληρώνεται άμεσα, άρα στην αρχή $[P] = 0$
- [ES] παραμένει σταθερό
- Η ταχύτητα καθορίζεται από το βραδύτερο στ

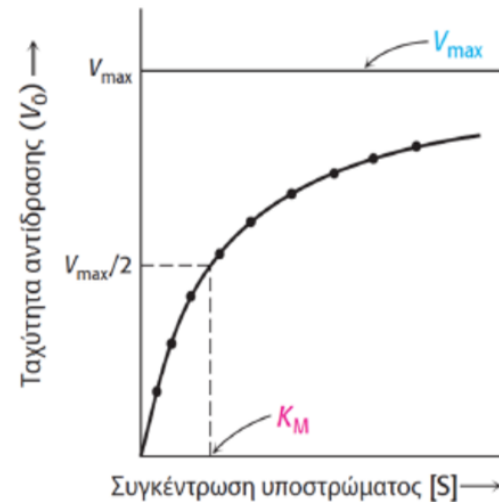
ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYΜΩΝ

□ Η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

K_m: Σταθερά Michaelis- Menten, που ισούται με το λόγο των σταθερών ταχύτητας $(K_2+K_{-1})/K_1$ και έχει μονάδες υποστρώματος, και **V_{max}** η μέγιστη ταχύτητα που θα αποκτούσε η ενζυμική ταχύτητα όταν όλο το ένζυμο βρεθεί σε μορφή συμπλόκου ES, και ισούται με $K_2 \cdot [Et]$, όπου $[Et]$ η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου.

- Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η $[S]$ είναι πολύ μικρότερη από την K_M , $V_0 = (V_{\max}/K_M)[S]$, δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος.
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_M , $V_0 = V_{\max}$, δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



Εικόνα 8.11 Κινητική Michaelis-Menten. Διάγραμμα ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten· δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ($V_{\max}$) προσεγγίζεται ασυμπτωτικά. Η σταθερά Michaelis (K_M) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{\max}/2$.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

Οι δύο σταθερές που χαρακτηρίζουν μία αντίδραση σύμφωνα με Michaelis-Menten είναι

- **K_m.** Μας πληροφορεί για το βαθμό συγγένειας ενζύμου-υποστρώματος (μικρή K_m μεγάλη συγγένεια).
- - μικρή K_m αντικατοπτρίζει μεγάλη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα
- - μεγάλη K_m αντικατοπτρίζει μικρή συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα
- **V_{max}.** Μας πληροφορεί για το πόσα μόρια υποστρώματος μετατρέπονται σε κάθε λεπτό από ένα μόριο ενζύμου

Οι τιμές K_M και V_{max} είναι σημαντικά χαρακτηριστικά του ενζύμου

- Για τα περισσότερα ένζυμα, η K_M έχει τιμές μεταξύ 10⁻¹ και 10⁻⁷ M.
- Η τιμή K_M για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.
- Η σταθερά Michaelis, K_M, ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί.
- Έτσι, η K_M παρέχει ένα μέτρο της συγκέντρωσης του υποστρώματος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί σημαντική κατάλυση.

Πίνακας 8.4 Τιμές K_M μερικών ενζύμων

Ένζυμο	Υπόστρωμα	K _M (μM)
Χυμοθρυψίνη	Ακετυλο-L-θρυποφαναμίδιο	5000
Λυσοζύμη	Εξα-N-ακετυλογλυκοζαμίνη	6
β-Γαλακτοζιδάση	Λακτόζη	4000
Απασμίνηση της θρεονίνης	Θρεονίνη	5000
Ανθρακική ανυδράση	CO ₂	8000
Πενικιλινάση	Βενζυλοπενικιλίνη	50
Πυροσταφυλική καρβοξυλάση	Πυροσταφυλικό	400
	HCO ₃ ⁻	1000
	ATP	60
Συνθετάση του αργινινο-tRNA	Αργινίνη	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Οι τιμές k_{cat} και V_{max} είναι σημαντικά χαρακτηριστικά του ενζύμου

- ❑ Η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής (turnover number) ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα.
- ❑ Η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , ισούται με την κινητική σταθερά k_2 , η οποία ονομάζεται και k_{cat} .

V_{max}

- η V_{max} είναι ο θεωρητικά μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης ο οποίος δεν επιτυγχάνεται ΠΟΤΕ
- ποσοτική έκφραση της αντίδρασης διάσπασης του [ES], εξαρτάται από τη [E]

Πίνακας 8.5 Αριθμοί μετατροπής μερικών ενζύμων

Ένζυμο	Αριθμός μετατροπής (ανά δευτερόλεπτο)
Ανθρακική ανυδράση	600.000
Ισομεράση των 3-κετοστεροειδών	280.000
Ακετυλοχολινεστεράση	25.000
Πενικιλινάση	2.000
Γαλακτική αφυδρογονάση	1.000
Χυμοθρυψίνη	100
DNA πολυμεράση I	15
Συνθετάση της θρυπτοφάνης	2
Λυσοζύμη	0,5

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

Υπολογισμός των V_{max} και K_m με την Εξίσωση Lineweaver-Burk

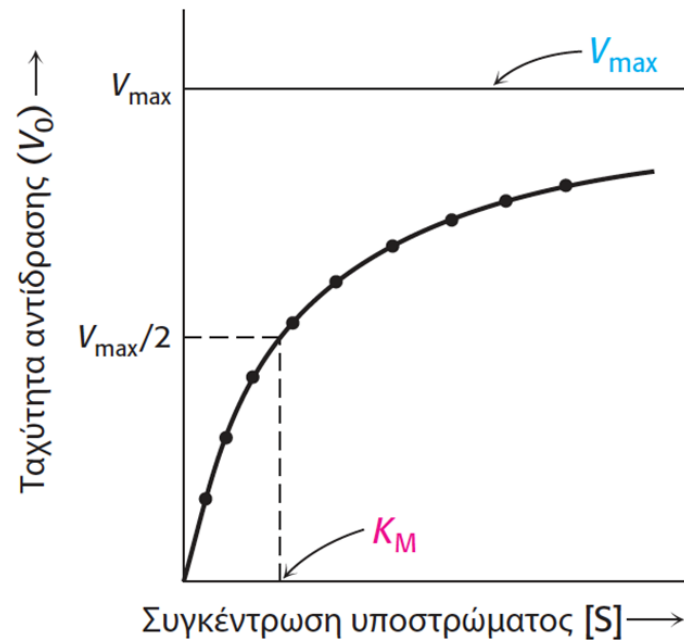
Εάν μετασχηματίσουμε την εξίσωση Michaelis-Menten, αντιστρέφοντας τους δύο όρους της εξίσωσης, μπορούμε ευκολότερα να υπολογίσουμε τα V_{max} και K_m σύμφωνα με την εξίσωση **Lineweaver-Burk**.

$$\boxed{V} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \boxed{\frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}}$$

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

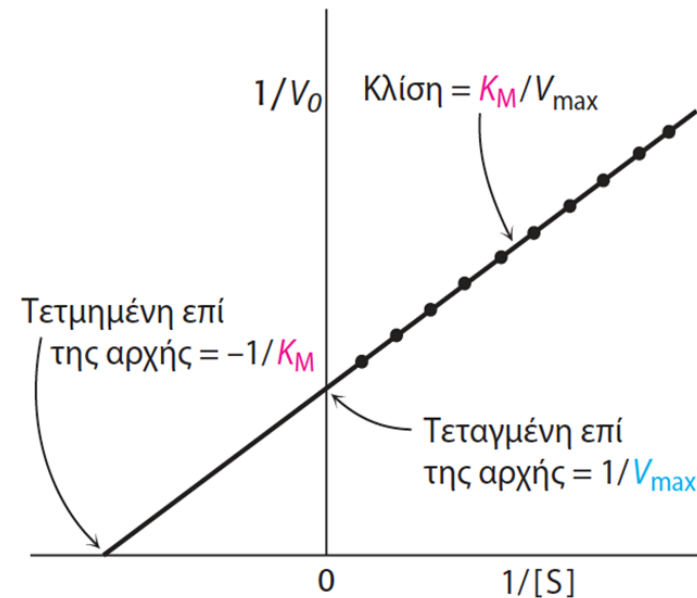
εξίσωση Michaelis-Menten

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$



διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Ενζυμική αναστολή (σύνοψη)

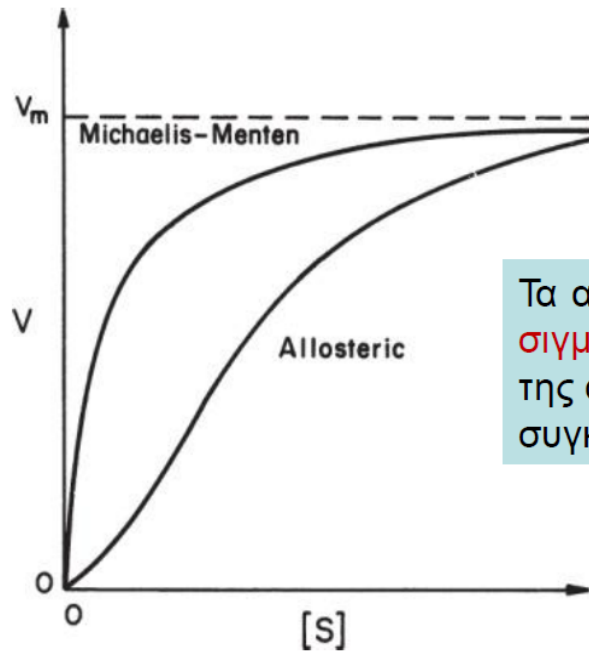
Τύπος αναστολής	Σημείο πρόσδεσης αναστολέα στο ενζυμικό μόριο	Κινητικά χαρακτηριστικά
Συναγωνιστική	Ο αναστολέας ανταγωνίζεται το υπόστρωμα για την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η παρεμπόδιση αναστέλλεται με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [S].	V_{max} αμετάβλητη K_m αυξάνεται
Μη-συναγωνιστική	Ο αναστολέας προσδένεται στο ένζυμο (E) ή στο σύμπλοκο (ES) σε θέση διαφορετική του ενεργού κέντρου. Δεν επηρεάζεται η πρόσδεση του υποστρώματος αλλά το σύμπλοκο ESI δεν δίνει προϊόν. Η παρεμπόδιση δεν αναστέλλεται με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [S].	V_{max} μειώνεται K_m αμετάβλητη
Ασυναγώνιστη	Ο αναστολέας προσδένεται στο σύμπλοκο (ES) σε θέση διαφορετική του ενεργού κέντρου. Η πρόσδεση του υποστρώματος τροποποιεί τη δομή του ενζύμου καθιστώντας τη θέση πρόσδεσης του αναστολέα διαθέσιμη. Η παρεμπόδιση δεν αναστέλλεται με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [S].	V_{max} μειώνεται K_m μειώνεται

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMΩΝ

Τα αλλοστερικά ένζυμα δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis - Menten

Μια σημαντική ομάδα ενζύμων τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten περιλαμβάνει τα αλλοστερικά ένζυμα.

Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα.



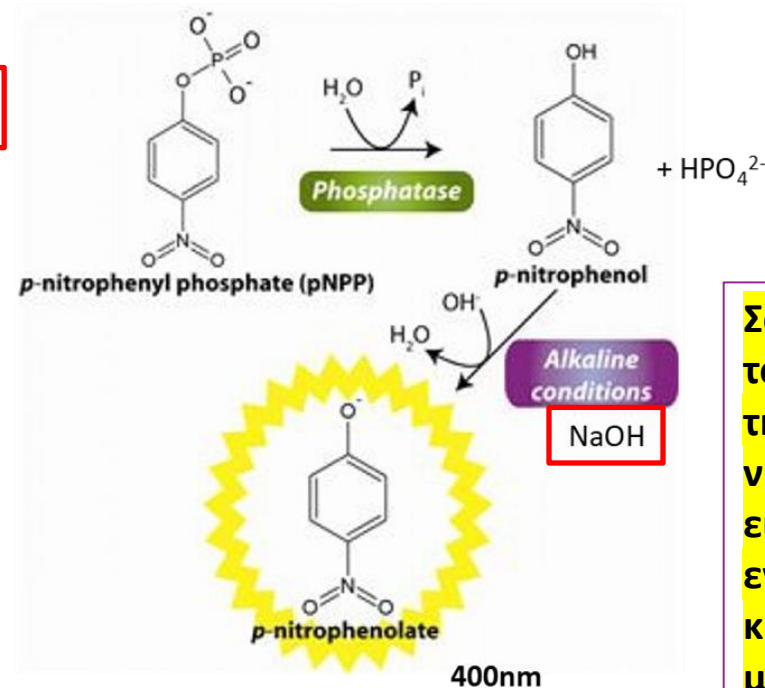
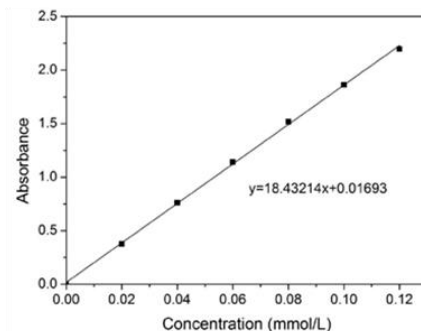
Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν **σιγμοειδή εξάρτηση** της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Όξινη Φωσφατάση

⊕ Υδρόλυση μονοεστεροποιημένων φωσφορικών ομάδων

Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο είναι η υδρόλυση μονοεστεροποιημένης φωσφορικής ομάδας, με τη γενική μορφή



Το ένζυμο καλείται όξινη φωσφατάση γιατί έχει βέλτιστο pH δράσης όξινο, σε αντιδιαστολή με κάποιο άλλο ένζυμο με την ίδια εξειδίκευση που καλείται αλκαλική φωσφατάση γιατί έχει βέλτιστο pH δράσης, αλκαλικό.

Σαν υπόστρωμα θα χρησιμοποιηθεί το π-νιτροφαινυλοφωσφορικό που με την ενζυμική υδρόλυση θα δώσει π-νιτροφαινόλη. Η π-νιτροφαινόλη είναι άχρωμη σε όξινο περιβάλλον, ενώ σε αλκαλικό μετατρέπεται σε κίτρινο παράγωγο που απορροφά σε μήκος κύματος 400nm.

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Διαλύματα – αντιδραστήρια

α. π-νιτροφαινυλοφωσφορικό, δινάτριο ($\text{X6H}_2\text{O}$) 0,004M: 1,48g μέχρι 1L H_2O .

β. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,05M, pH 4,8, pH 3,0 και pH 7,0: 4,8g κιτρικό οξύ μέχρι 500mL H_2O , ρυθμισμένο με 1N NaOH αντίστοιχα σε pH 4,8, pH 3,0 και pH 7,0.

γ. Όξινη φωσφατάση (σιταριού), 3mg/100mL: 3mg όξινη φωσφατάση μέχρι 100mL H_2O .

δ. NaOH 0,1N: 4g NaOH μέχρι 1L H_2O .

ε. π-νιτροφαινυλοφωσφορικό 0,0001M: 37mg μέχρι 1L H_2O .

στ. π-νιτροφαινυλοφωσφορικό 0,0004M: 148mg μέχρι 1L H_2O .

ζ. π-νιτροφαινυλοφωσφορικό 0,002M: 740mg μέχρι 1L H_2O .

η. π-νιτροφαινυλοφωσφορικό 0,006M: 2,22g μέχρι 1L H_2O .

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Συγκεκριμένα:

A. Προσδιορισμός της ταχύτητας της αντίδρασης: Ακριβώς ότι λέει το πρωτόκολλο.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Προσδιορισμός της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

Για να μελετήσουμε την επίδραση του υποστρώματος, παρασκευάζουμε διαλύματα υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού) διαφόρων συγκεντρώσεων και προσθέτουμε σταδιακά ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών pH 4.8 και ίση ποσότητα ενζύμου (όξινης φωσφατάσης) σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα I.

Πίνακας I: Περιέχει τις τιμές των διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού) που θα χρησιμοποιήσει η κάθε ομάδα στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ml)	ΣΩΛΗΝΕΣ									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Δ1 (0.001M)	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Δ2 (0.0008M)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
3	Δ3 (0.0006M)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
4	Δ4 (0.0004M)	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
5	Δ5 (0.0002M)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
ΟΛΕΣ	P.Δ. (ΚΙΤΡΙΚΩΝ pH 4.8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ΟΛΕΣ	H ₂ O	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1
ΟΛΕΣ	Υδατόλουτρο 37°C για 2min										
ΟΛΕΣ	E (ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
ΟΛΕΣ	Υδατόλουτρο 37°C για 10min										
ΟΛΕΣ	NaOH 0.1N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ΟΛΕΣ	Φωτομέτρηση 400nm										

3. Η κάθε ομάδα προσθέτει στους δικούς της δοκιμαστικούς σωλήνες το ένζυμο (όξινης φωσφατάσης) σύμφωνα με τον Πίνακα I.
4. Επωάζουμε τους σωλήνες στο υδατόλουτρο στο 37°C αυστηρά για 10min.
5. Η κάθε ομάδα προσθέτει στους δικούς της δοκιμαστικούς σωλήνες 3ml 0.1N NaOH.
6. Φωτομετρούμε τους σωλήνες 1,3,5,7,9 στα 400nm με τα αντίστοιχα τυφλά 2,4,6,8,10. Χρησιμοποιούμε 2ml από κάθε δείγμα.
7. Καταγράφουμε στον παρακάτω Πίνακα II τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης (O.D.).

Πίνακας II: Περιέχει τις τιμές διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού) και τις απορροφήσεις του προϊόντος (π-νιτροφαινόλης) της αντίδρασης όπως μετρήθηκαν από τους φοιτητές.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	[S]αρχική M	O.D. π-νιτροφαινόλης
1	1	0.001	
2	3	0.0008	
3	5	0.0006	
4	7	0.0004	
5	9	0.0002	



ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

8. Από την πρότυπη καμπύλη της ποσότητας π-νιτροφαινόλης έναντι της απορρόφησης στα 400nm (Σχήμα 1) υπολογίζουμε την ποσότητα της π-νιτροφαινόλης (μmol) και τις καταγράφετε τις τιμές στον Πίνακα III.
9. Υπολογίζουμε τις αντίστοιχες ταχύτητες της αντίδρασης (V) και καταγράφετε τις τιμές στον Πίνακα III.
10. Υπολογίζουμε τις αντίστοιχες τιμές των συγκεντρώσεων του υποστρώματος [S] στο τελικό διάλυμα και καταγράφετε τις τιμές στον Πίνακα III.

Πίνακας III: Περιέχει τις τιμές της ποσότητα π-νιτροφαινόλης, της ταχύτητας της αντίδρασης και τις τελικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος όπως υπολογίστηκαν από τους φοιτητές.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	π-νιτροφαινόλη (μmol)	v (μmol/mL*min)	[S]τελική (mol/mL)
1	1			
2	3			
3	5			
4	7			
5	9			

ENZYMA - ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

A. Προσδιορισμός της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος: ότι λέει ακριβώς το πρωτόκολλο.

II. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

11. Με τις τιμές του Πίνακα III κατασκευάζουμε καμπύλη “Κινητικής Michaelis-Menten” της ενζυμικής ταχύτητας αντίδρασης V έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$.

Προσοχή η καμπύλη θα γίνει σε χιλιοστομετρικό χαρτί (που φέρει τα στοιχεία σας) από την κάθε ομάδα.

B. Εύρεση K_m και V_{max} : ότι λέει ακριβώς το πρωτόκολλο.

Πίνακας IV: Περιέχει τις τιμές του λόγου $1/v$ την ταχύτητας της αντίδρασης και $1/v$ την συγκέντρωση του υποστρώματος όπως υπολογίστηκαν από τους φοιτητές.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	$1/v$ $1/(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})$	$1/[S]$ τελική $1/(\text{mol/mL})$
1	1		
2	3		
3	5		
4	7		
5	9		