

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

Ενζυμικές μονάδες (Enzyme Units)

- Η ποσότητα του ενζύμου συνήθως δεν μετριέται σε βάρος
- Το ακριβές βάρος δεν είναι σχεδόν ποτέ ακριβώς γνωστό.
- Οι παρασκευές ενζύμων περιέχουν πάντα προσμίξεις πρωτεϊνών αντί για καθαρά μόρια ενζύμων.
- Γι' αυτό η ποσότητα μετριέται σε ενζυμικές μονάδες (Units)
- Δλδ στην ποσότητα του ενζύμου που αντιστοιχεί σε δεδομένη καταλυτική δράση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.
- Π.χ. Μία ενζυμική μονάδα γλυκοαμυλάσης ορίζεται ως η ποσότητα που παράγει 1 μmol γλυκόζης ανά λεπτό σε ένα διάλυμα 4% αμύλου για pH 4.5 και θερμοκρασία 60°C.

Μοντέλα για πιο Σύνθετες Ενζυμικές Κινητικές

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)

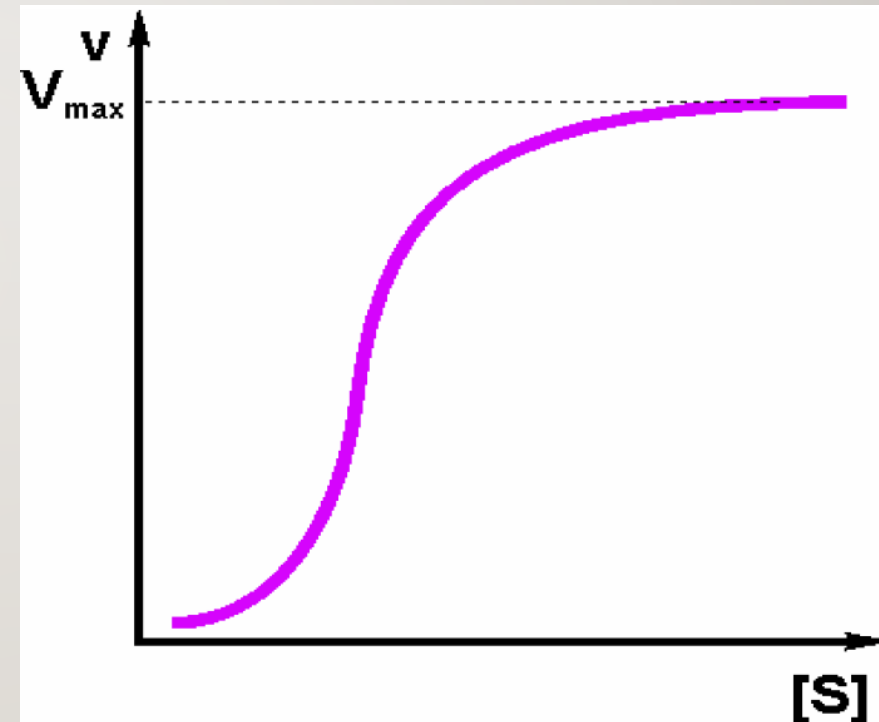
- Στην περίπτωση αυτή η έκφραση του ρυθμού είναι:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_m[S]^n}{K_m'' + [S]^n}$$

- Όπου n είναι ο συντελεστής συνεργατικότητας
- Για $n > 1$ σημαίνει θετική συνεργατικότητα

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.

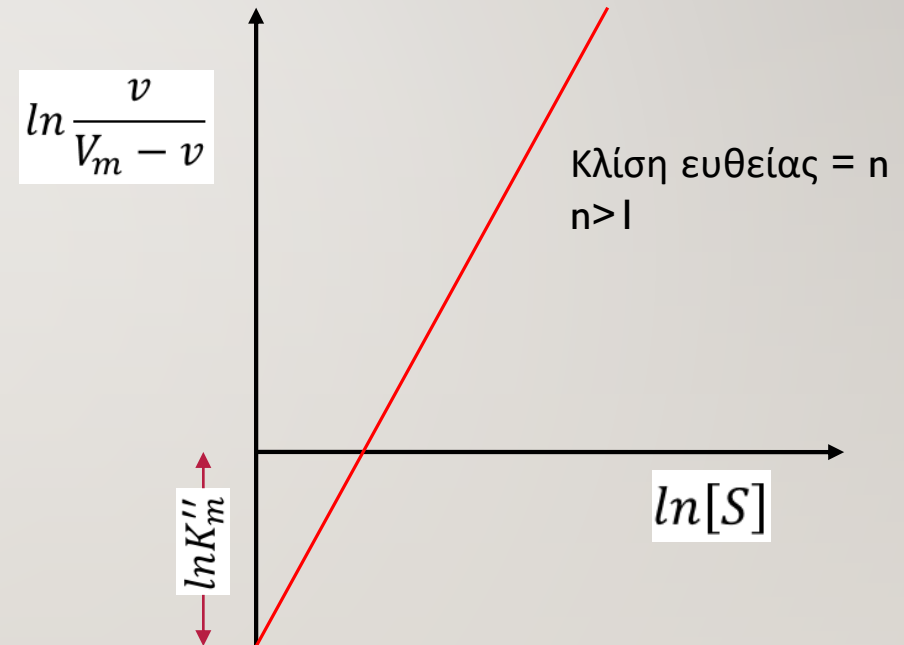


Αλλοστερικά ένζυμα (συνέχεια)

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_m [S]^n}{K_m'' + [S]^n}$$

- Ο συντελεστής συνεργατικότητας μπορεί να προσδιοριστεί από την παρακάτω εξίσωση και τη γραφική παράσταση:

$$\ln \frac{v}{V_m - v} = n \ln [S] - \ln K_m''$$



Κινητική ενζυμικής αναστολής

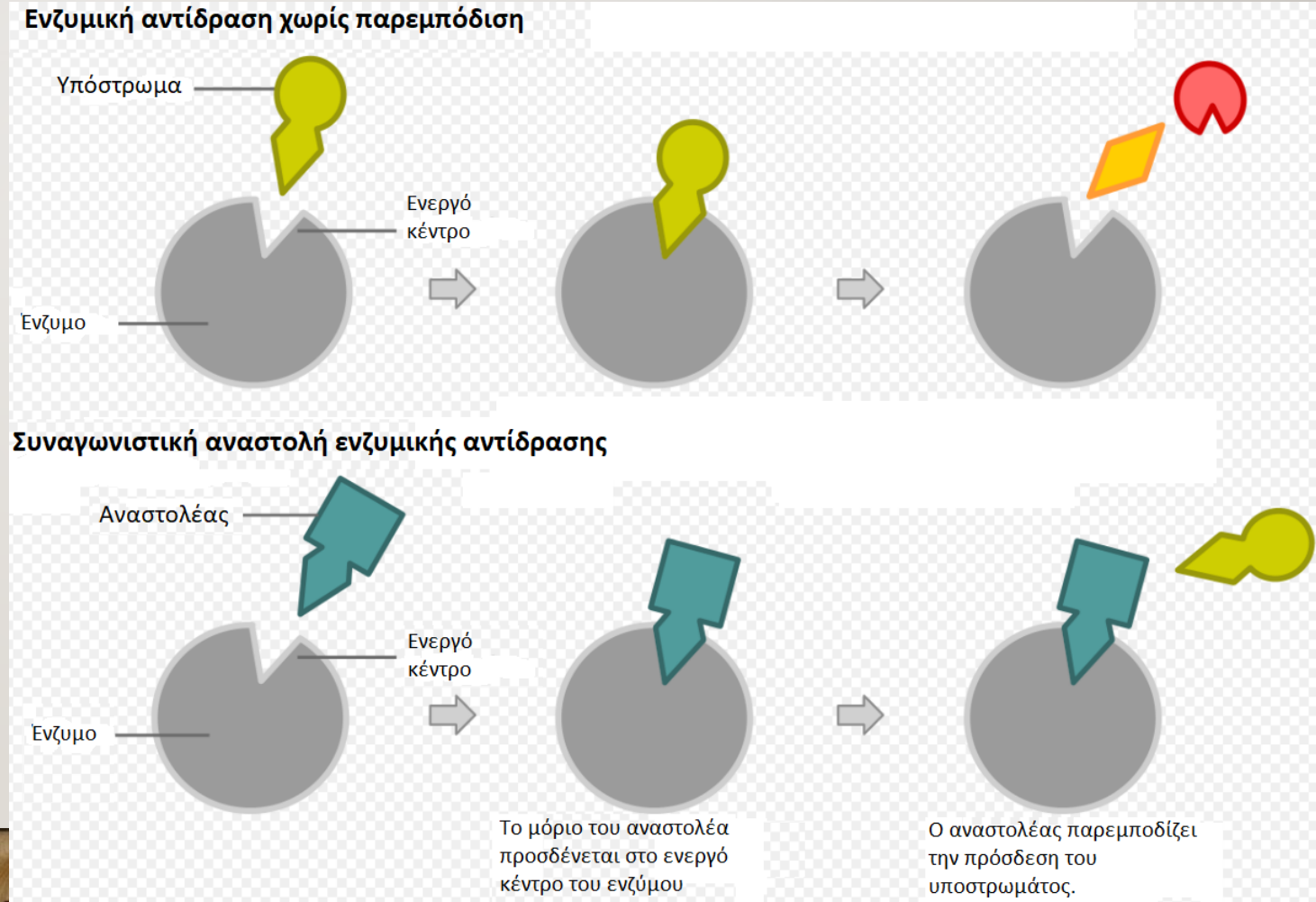
Κινητική ενζυμικής αναστολής

- Ορισμένες ενώσεις προσδένονται στα ένζυμα και μειώνουν την δραστηκότητά 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)

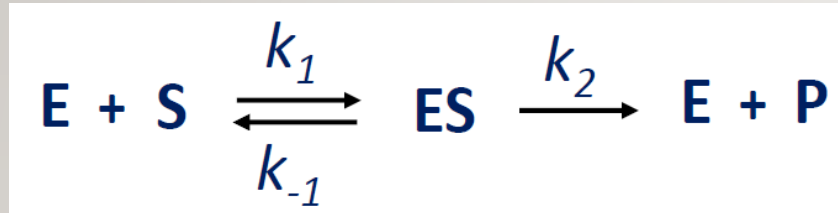
**Αντιστρεπτοί αναστολείς:
Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive
inhibitors)**

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.



Ας θυμηθούμε την κινητική απλής ενζυμικής αντίδρασης



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

[S] συγκέντρωση υποστρώματος

[E] συγκέντρωση ελεύθερου ενζύμου

[ES] συγκέντρωση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος

[P] συγκέντρωση προϊόντος

k_1, k_{-1}, k_2 σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

- Ο ρυθμός μεταβολής του συμπλόκου ES είναι:

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

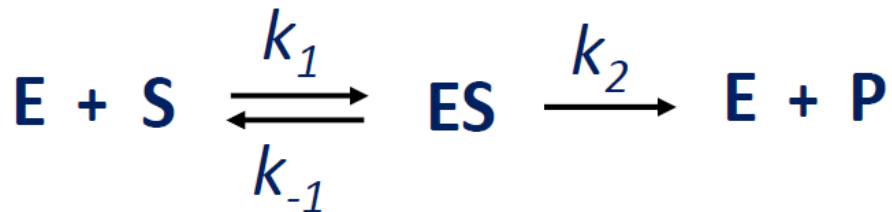
- Η ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης δίνεται από τον τύπο

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

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

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)



Πάμε να βρούμε την εξίσωση που εκφράζει τον μηχανισμό της συναγωνιστικής αναστολής

+
|
↑↓ K_i
EI

- Για $\frac{d(ES)}{dt} \approx 0$ (υπόθεση ημισταθερής κατάστασης) προκύπτει:

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

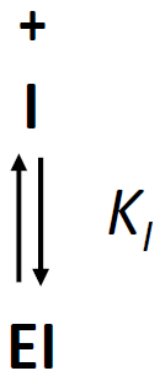
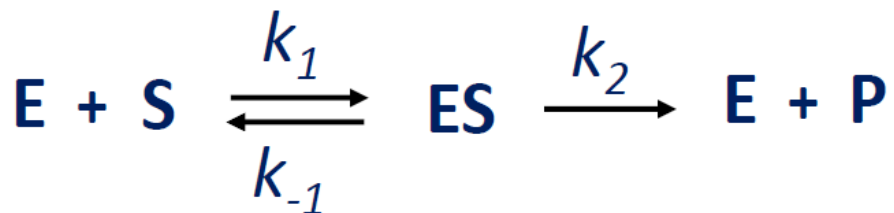
$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

- $[ES] = \frac{k_1 [E][S]}{k_{-1} + k_2}$, αντικαθιστώντας $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$ έχουμε: $[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$ ή $[E] = K_m \frac{[ES]}{[S]}$

K_i είναι η σταθερά αναστολής

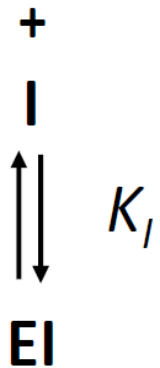
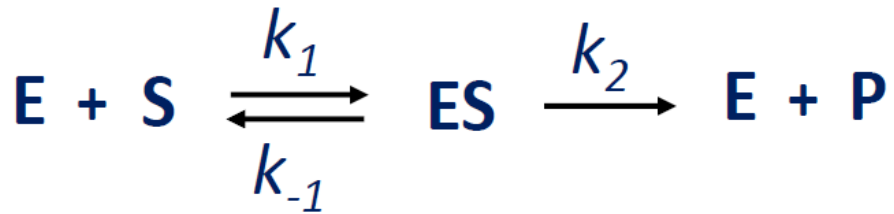
Σταθερά ισορροπίας ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)



- Από την αρχή διατήρησης της συγκέντρωσης του ολικού ενζύμου έχουμε:
 - $[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$
- K_I είναι η σταθερά αναστολής ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI, και ισούται:
- $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$, λύνοντας ως προς [EI] και αντικαθιστώντας το [E] από πριν έχουμε:
- $[EI] = \frac{K_m}{K_I} \frac{[I]}{[S]} [ES]$

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)



- Χρησιμοποιώντας τις προηγούμενες εξισώσεις, στην αρχή διατήρησης της συγκέντρωσης του ολικού ενζύμου αντικαθιστώ τα $[E]$ και $[EI]$ και λύνω ως προς $[ES]$:

- $[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$

$$[ES] = \frac{[E_0]}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{K_m}{K_I} \frac{[I]}{[S]}}$$

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

$$v_{\max} = k_2[E_0]$$

$$v = \frac{V_m[S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

$$K'_{m,app} = K'_m \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

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.

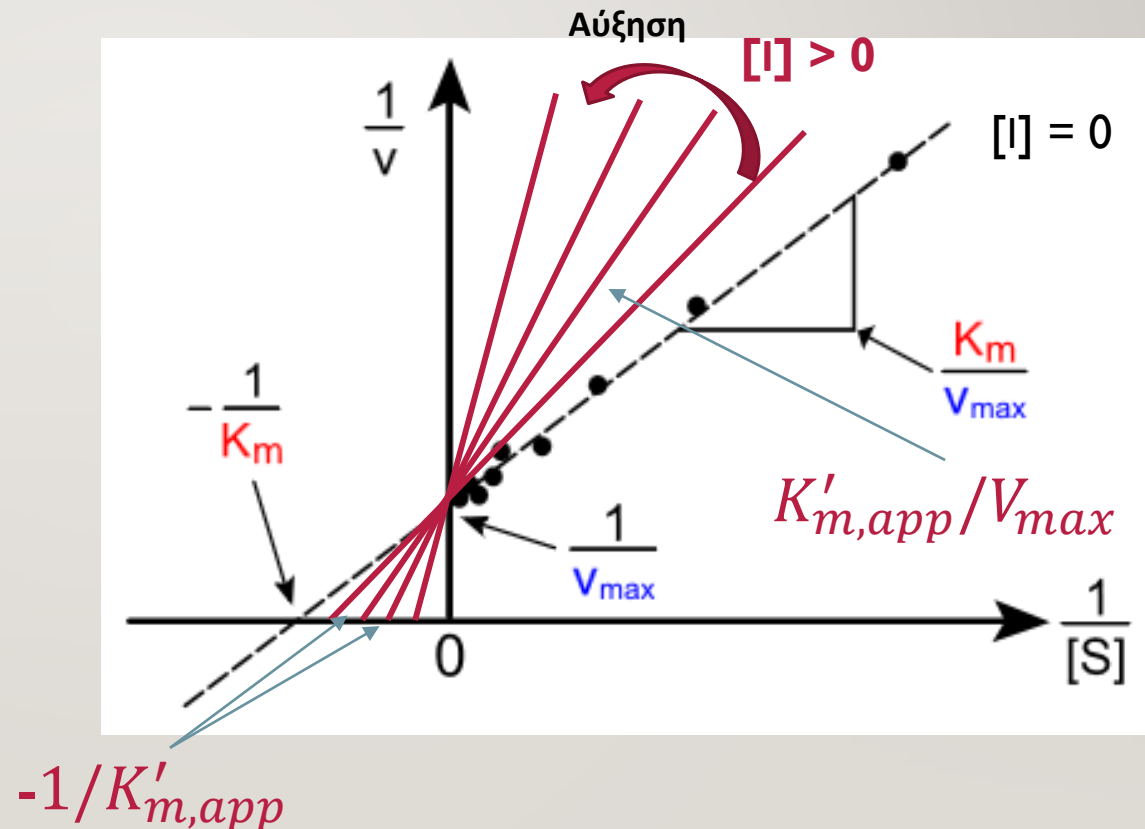
$$K'_{m,app} = K'_m \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου) Συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors)

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

Ίδιο V_{max} , διαφορετικό K_m

$$K'_{m,app} = K'_m \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$



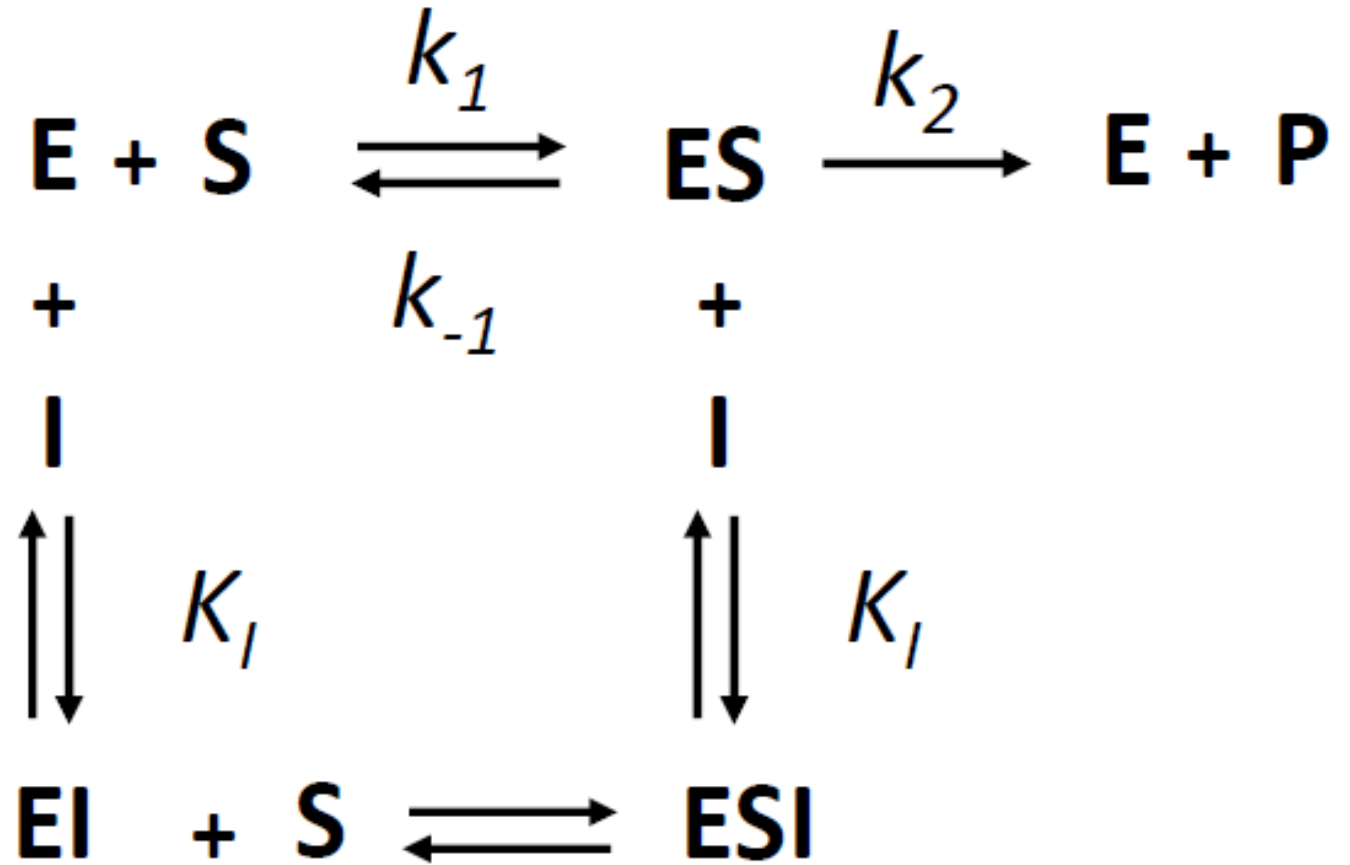
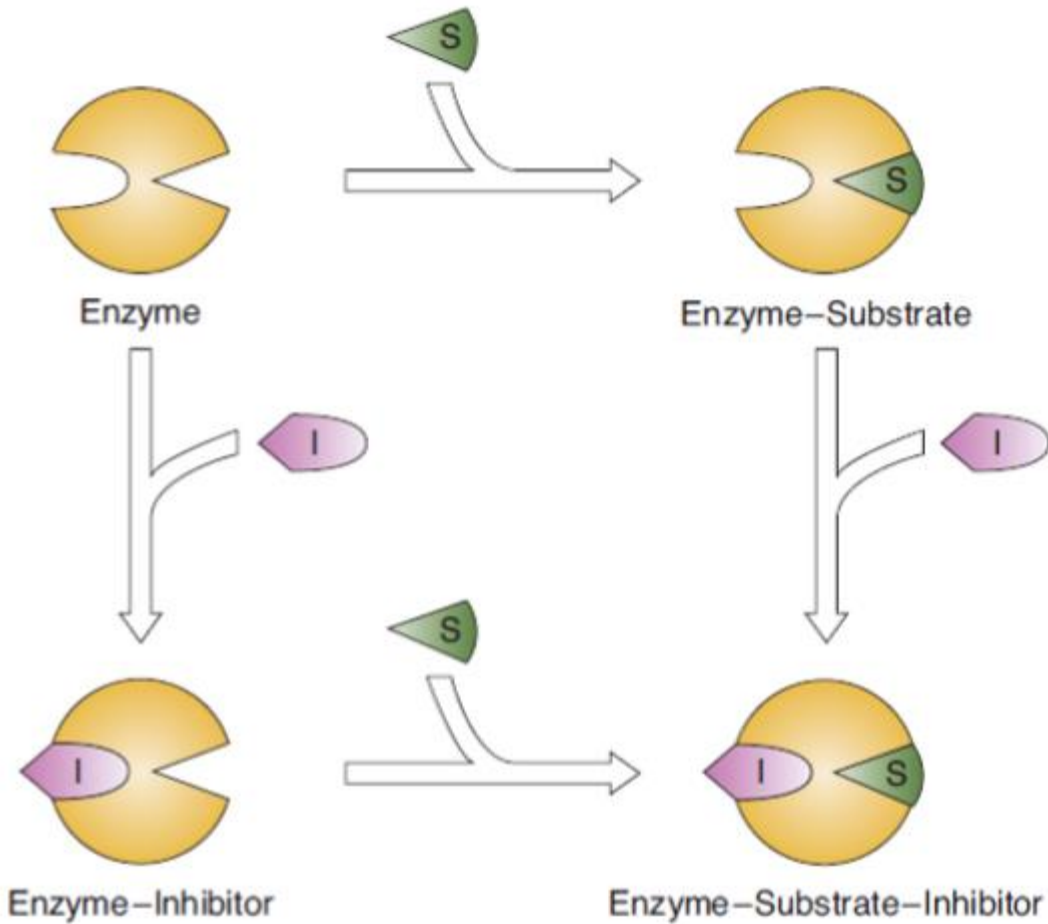
**Αντιστρεπτοί αναστολείς:
Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-
competitive inhibitors)**

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.
- Μειώνουν την ενζυμική συγγένεια μεταξύ υποστρώματος και ενζύμου.
- Ο αναστολέας μπορεί να ενωθεί με το ελεύθερο Ένζυμο καθώς και με το σύμπλοκο ES και να δώσει μορφές του ES που δεν διασπώνται 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.

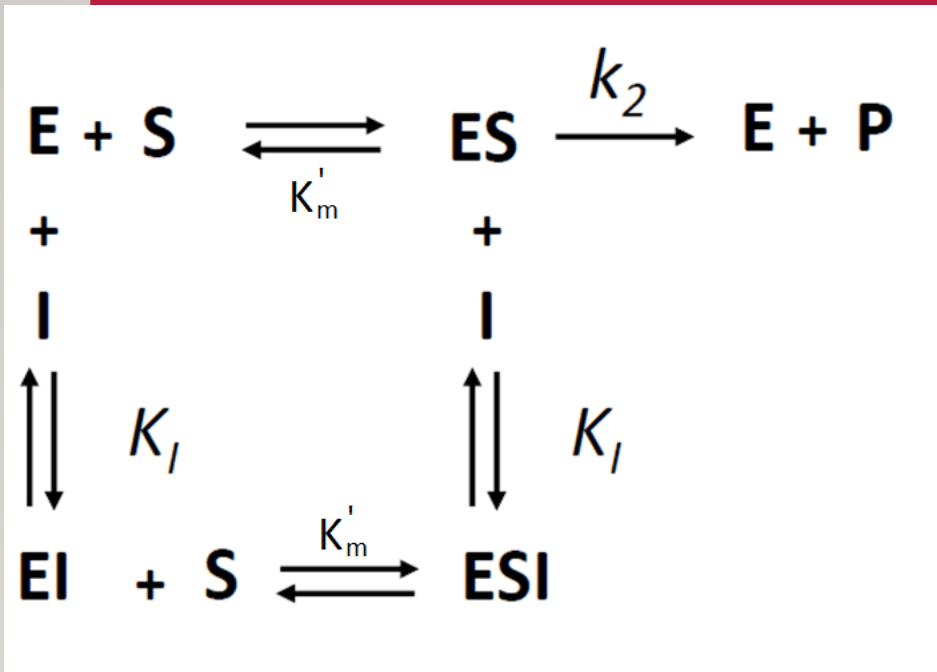
Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)



Αντιστρεπτοί αναστολείς:

Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)



- Ορίζουμε:

$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

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

Κείναι οι σταθερές αναστολής ή οι σταθερές διαστάσεως των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, EI , και ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος, ESI , και ισούνται προς $[E][I]/[EI]$ και $[ES][I]/[ESI]$, αντίστοιχα, είναι δε μεταξύ τους ίσες.

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

- Με παρόμοιο τρόπο μπορούμε να αναπτύξουμε την παρακάτω εξίσωση για το ρυθμό:

$$v = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\left(1 + \frac{K'_m}{[S]}\right)} \quad \longrightarrow \quad v = \frac{V_{m,app}}{\left(1 + \frac{K'_m}{[S]}\right)} \quad \text{όπου,} \quad V_{m,app} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

- 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.

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου)

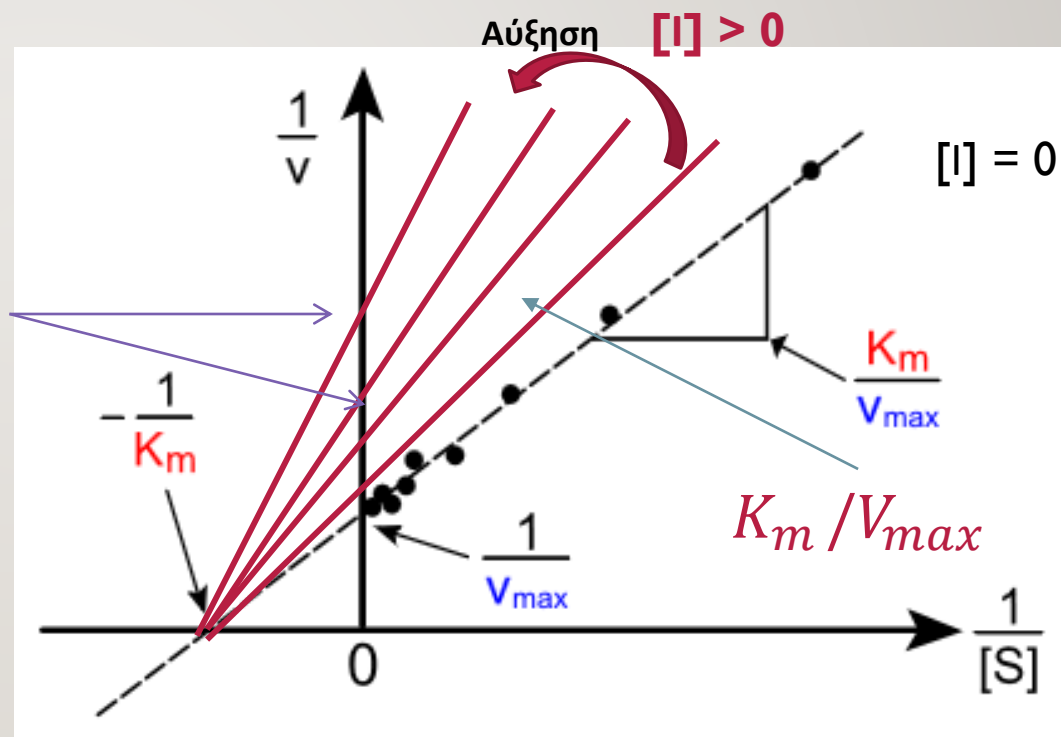
Μη-συναγωνιστικοί αναστολείς (non-competitive inhibitors)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Αποκλείουσα: $\frac{1}{V_{m,app}}$

Ίδιο K_m διαφορετικό V_{max}

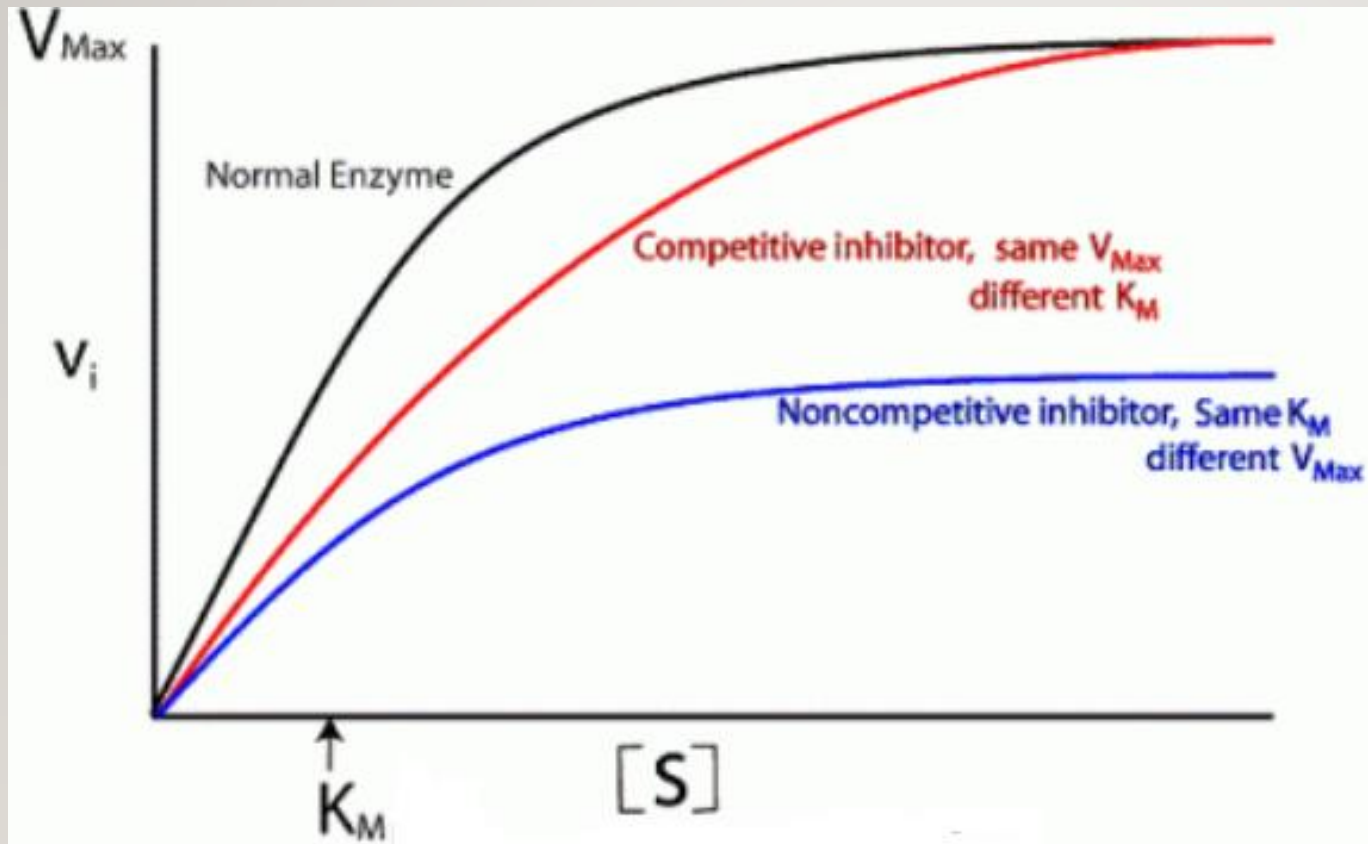
$$V_{m,app} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$



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.

Ταχύτητα αντίδρασης V vs συγκέντρωση υποστρώματος



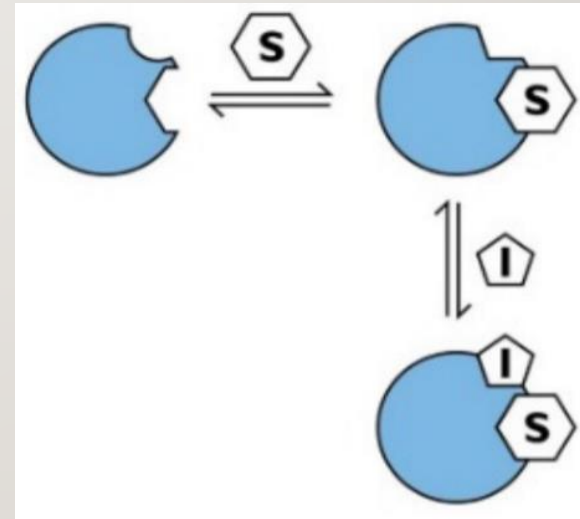
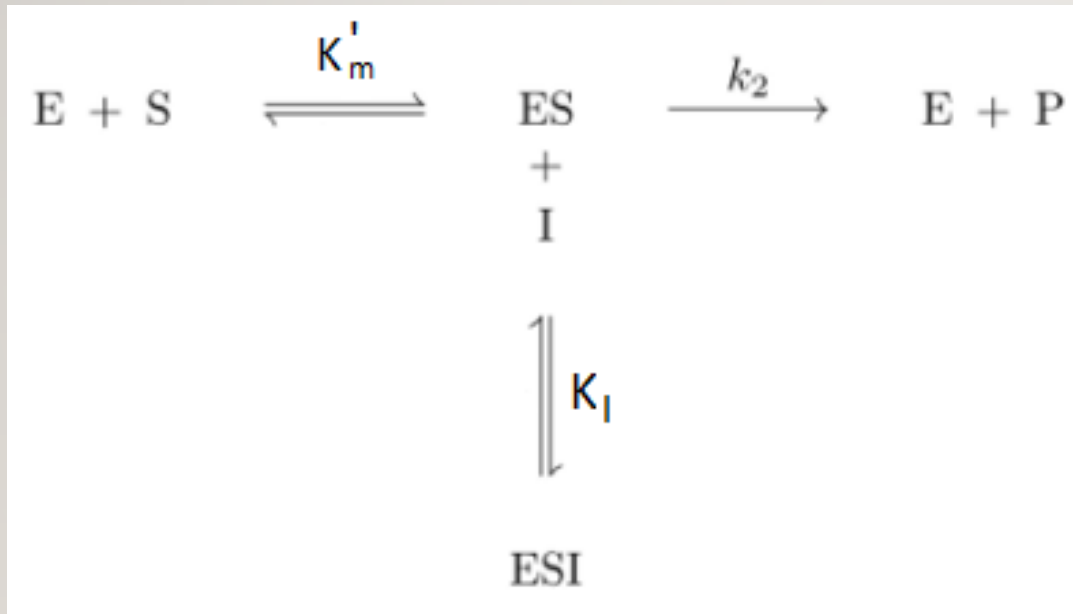
**Αντιστρεπτοί αναστολείς:
Ασυναγώνιστοι αναστολείς
(uncompetitive inhibitors)**

Αντιστρεπτοί αναστολείς: Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors)

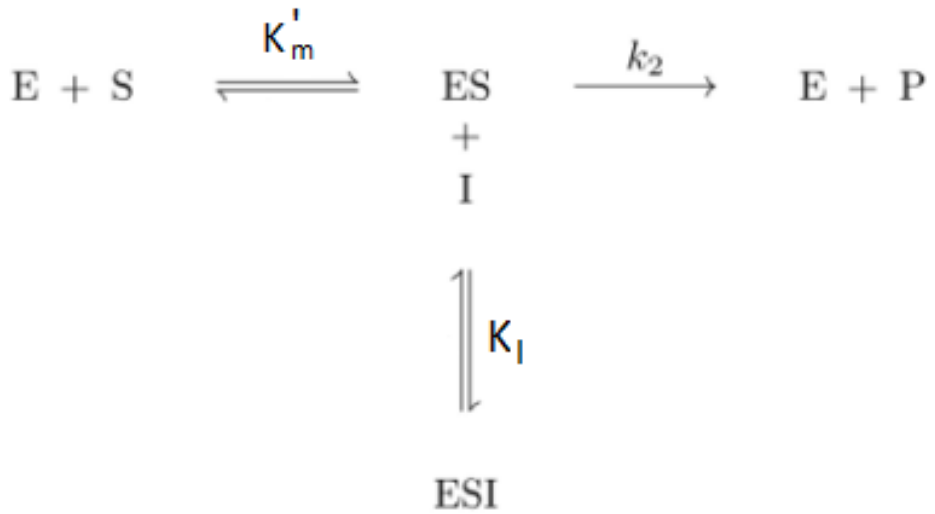
- Οι ασυναγώνιστοι αναστολείς προσδένονται μόνο στο σύμπλοκο ES και όχι και με το ελεύθερο ένζυμο.
- Είδαμε ότι η μη-συναγωνιστική αναστολή μπορεί να συμβεί με ή χωρίς την παρουσία του υποστρώματος ενώ η **ασυναγώνιστη αναστολή απαιτεί την ύπαρξη του συμπλόκου ES**
- Η ασυναγώνιστη αναστολή διακρίνεται 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



Αντιστρεπτοί αναστολείς: Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors)



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

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESI]$$

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

$$v = \frac{V_{m,app}[S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

$$V_{m,app} = \frac{V_m}{[1 + \frac{[I]}{K_I}]}$$

$$K'_{m,app} = \frac{K'_m}{[1 + \frac{[I]}{K_I}]}$$

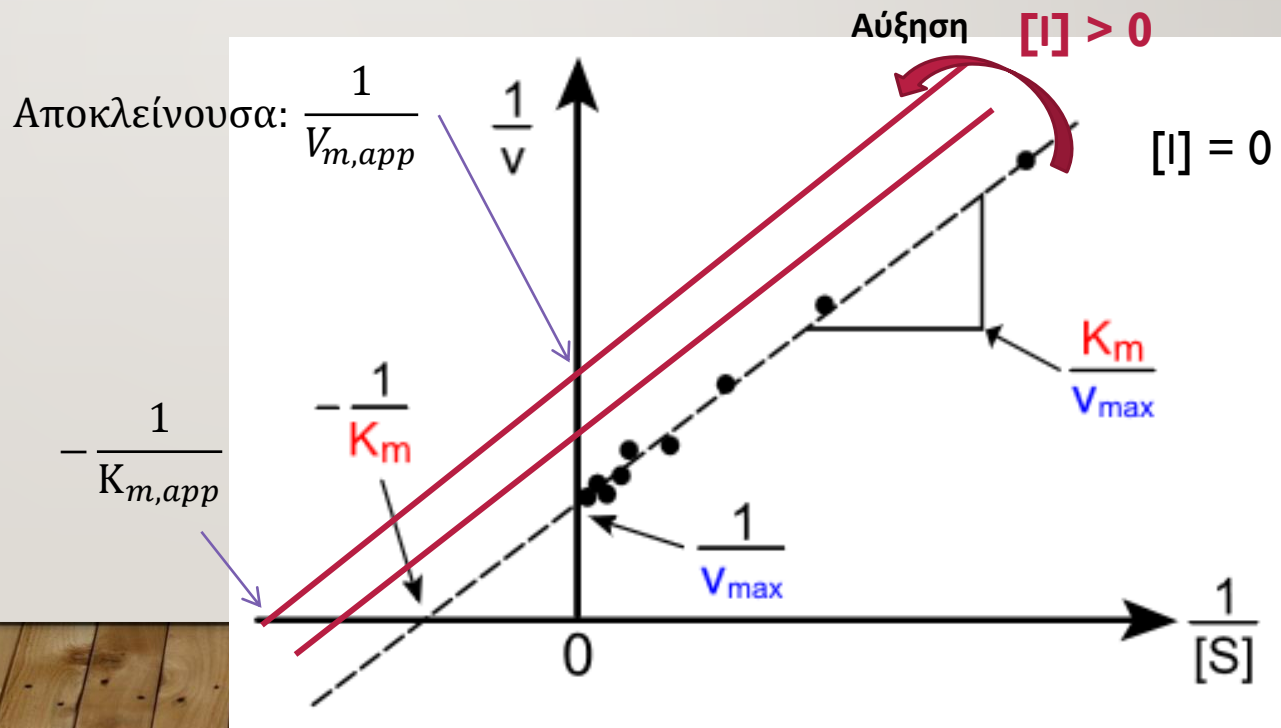
Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου) Ασυναγώνιστοι αναστολείς (uncompetitive inhibitors)

- Το αποτέλεσμα της ασυναγώνιστης αναστολής είναι η μείωση τόσο του V_m όσο και του K'_m .
- Η μείωση του πρώτου (V_m) έχει σημαντικότερη επίδραση απ'ότι η μείωση του δεύτερου (K'_m) με αποτέλεσμα τελικά να έχουμε μείωση του ρυθμού της αντίδρασης.

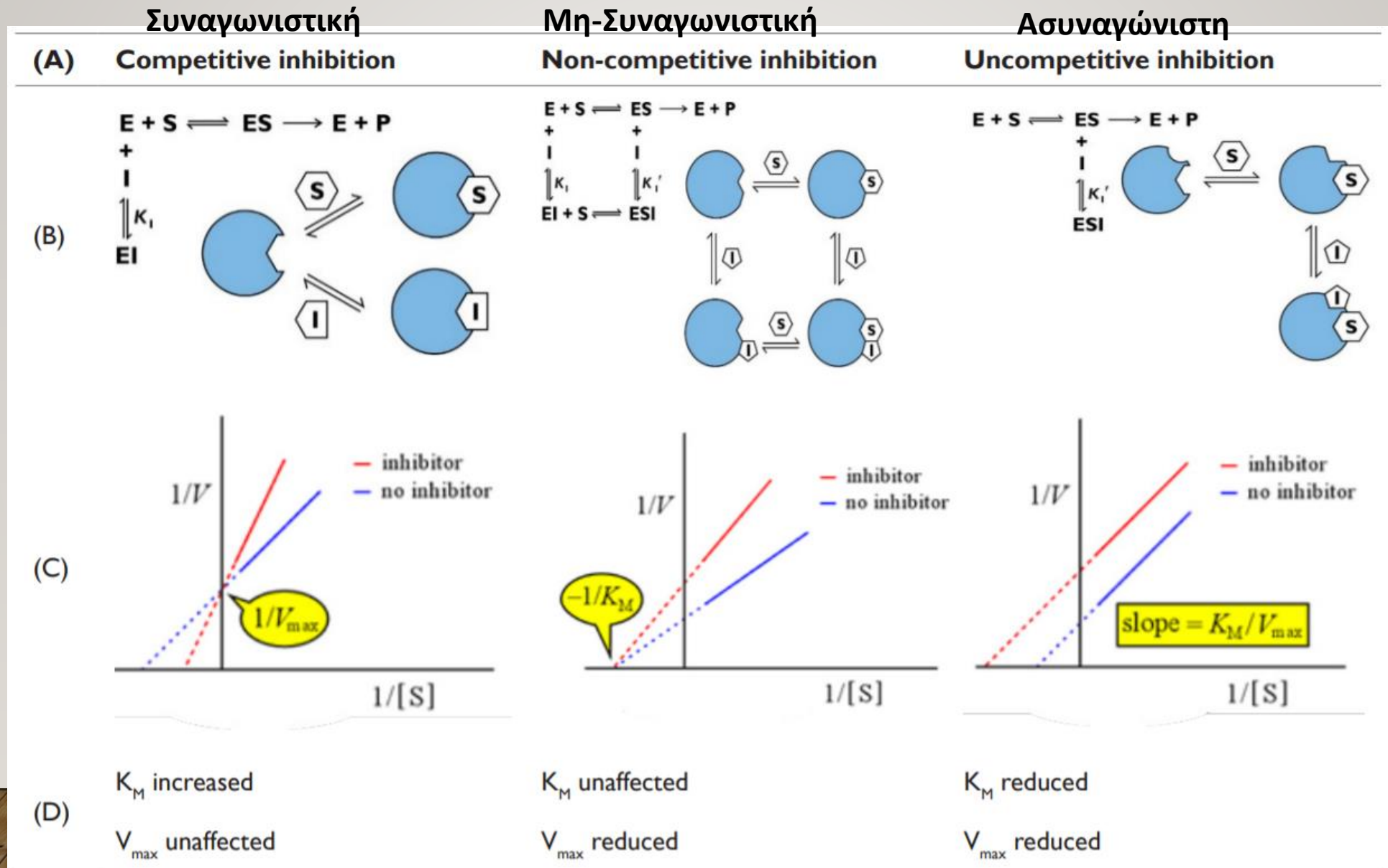
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

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

$$K'_{m,app} = \frac{K'_m}{\left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]}$$

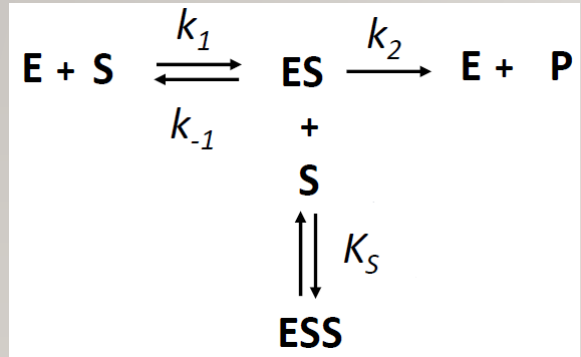


Σύνοψη της αντιστρεπτής αναστολής



Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος

Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος



- Από την αρχή διατήρησης της συγκέντρωσης του ολικού ενζύμου έχουμε:
 - $[E_0] = [E] + [ES] + [ESS]$
- K_S είναι η σταθερά ισορροπίας της αναστολής υποστρώματος
- $K_S = \frac{[ES][S]}{[ESS]}$, λύνοντας ως προς $[ESS]$ και αντικαθιστώντας το $[E]$ από πριν έχουμε την παρακάτω εξίσωση:

$$[ES] = \frac{[E_0]}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_S}}$$

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

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_S}}$$

$V_m = k_2[E_0]$

Ενζυμική αντίδραση από αναστολή υποστρώματος

- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, δηλ όταν $[S]^2/K_s \ll 1$, δεν παρατηρείται παρεμπόδιση. Τότε ο ρυθμός της αντίδρασης είναι:

$$v = \frac{V_m}{\left[1 + \frac{K'_m}{[S]}\right]}$$

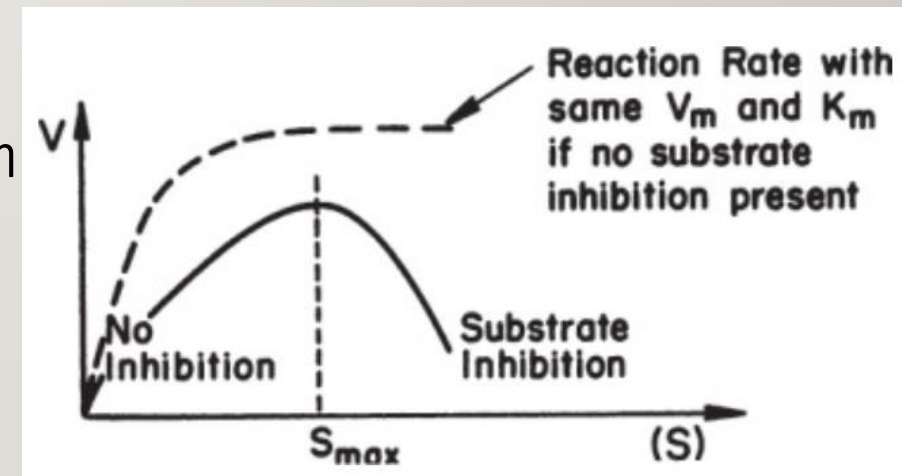
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, δηλ $K_m/[S] \ll 1$, η παρεμπόδιση κυριαρχεί στο ρυθμό της αντίδρασης ο οποίος παίρνει την μορφή:

$$v = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[S]}{K_{s1}}\right)}$$

- Η συγκέντρωση του υποστρώματος η οποία δίνει το μέγιστο ρυθμό της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί θέτοντας $dv/d[S] = 0$.

$$[S]_{max} = \sqrt{K_m K_s}$$

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}}$$



Παραδείγματα Ασκήσεων

Άσκηση 1) Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος

- Τα ακόλουθα δεδομένα έχουν ληφθεί για δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμων για μια αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο.

$v([E_0] = 0.015 \text{ g/l})$ (g/l-min)	[S] (g/l)	$v([E_0] = 0.00875 \text{ g/l})$ (g/l-min)
1.14	20.0	0.67
0.87	10.0	0.51
0.70	6.7	0.41
0.59	5.0	0.34
0.50	4.0	0.29
0.44	3.3	
0.39	2.9	
0.35	2.5	

Βρείτε τα:

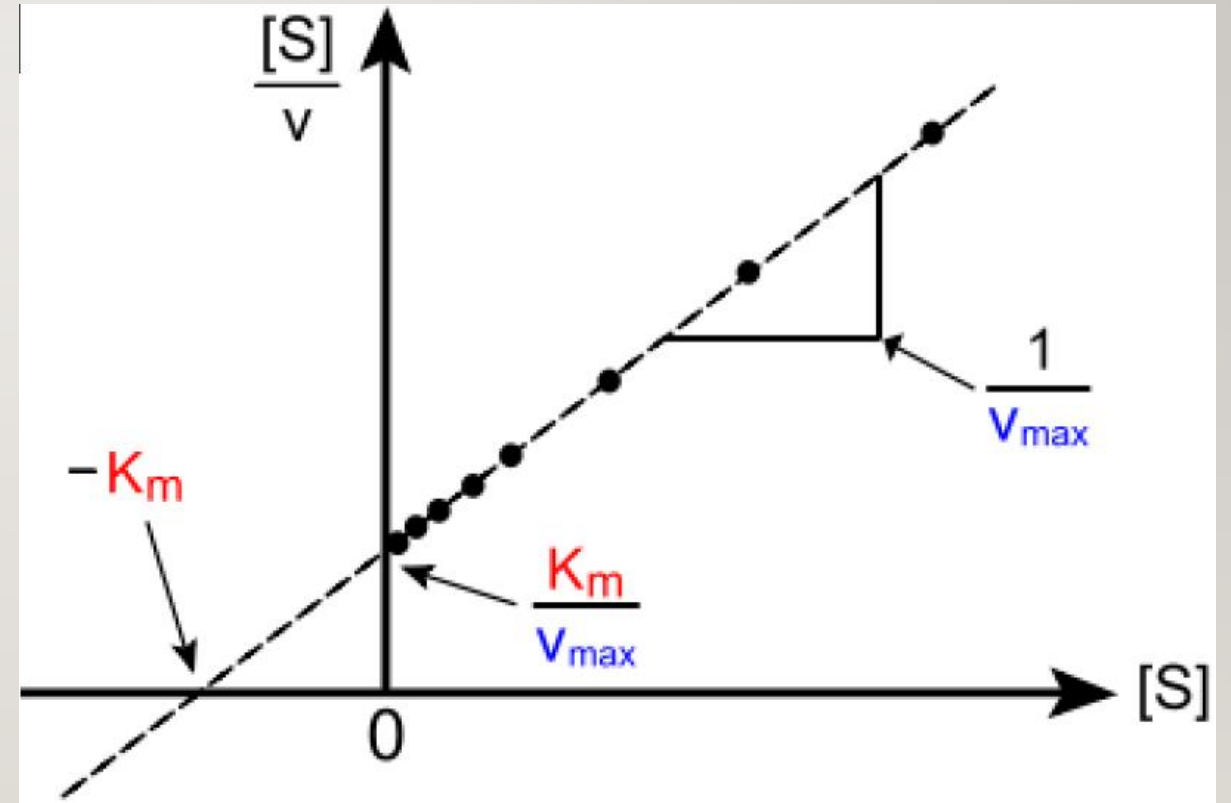
- α. το K_m της αντίδρασης (σταθερά ισορροπίας του συμπλόκου ES)
- β. το V_m της αντίδρασης για $[E_0] = 0.015 \text{ g/L}$
- γ. το V_m της αντίδρασης για $[E_0] = 0.00875 \text{ g/L}$
- δ. το k_2 που είναι η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης παραγωγής του προϊόντος

Υπόδειξη: Χρησιμοποιήστε το γράφημα Hanes-Woolf

Επανάληψη: Διάγραμμα 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}

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



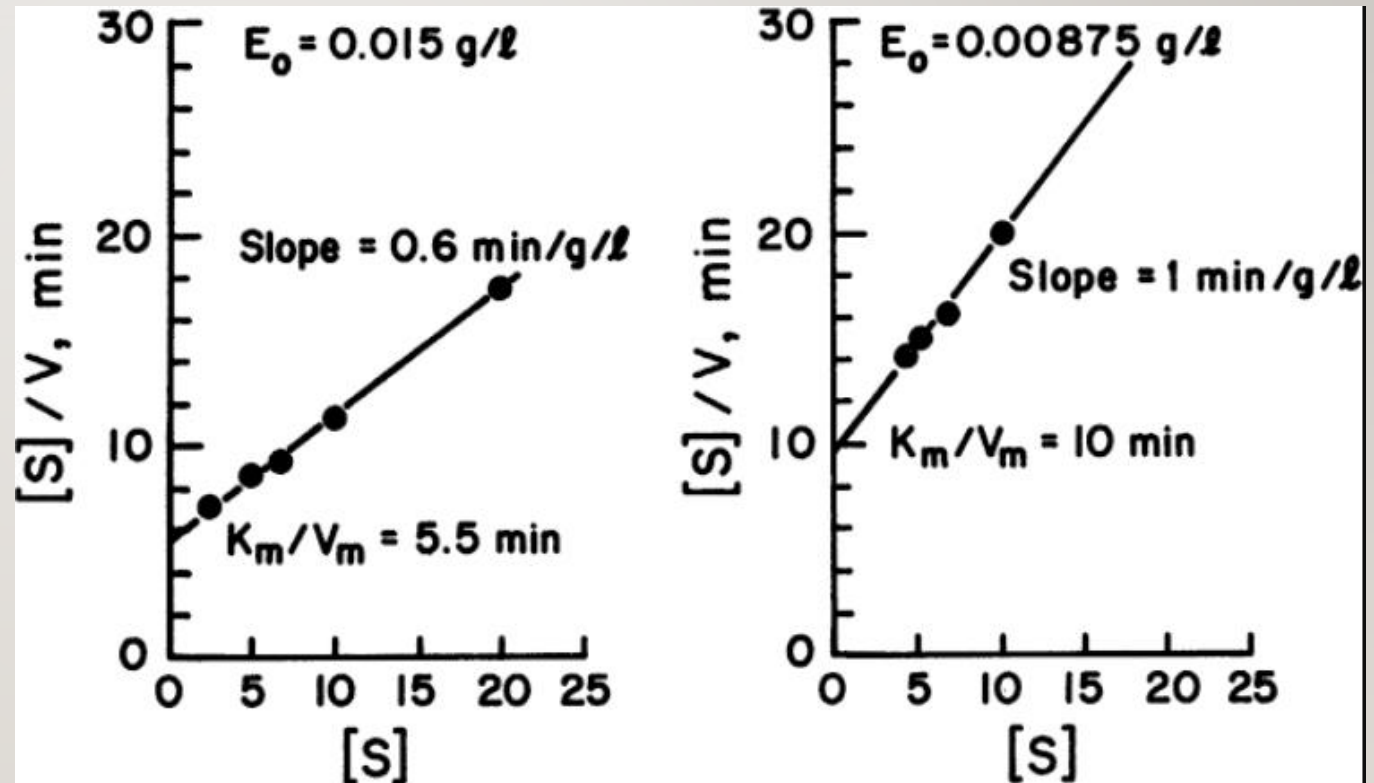
Λύση άσκησης I

- Το πρώτο βήμα είναι να φτιάξουμε τις στήλες με τα δεδομένα του γραφήματος Hanes-Woolf.
- Δλδ θέλουμε τον υπολογισμό των $[S]/v$ για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμου και το $[S]$.

$[S]/v$ ($E_0 = 0.015$) (min)	$[S]/v$ ($E_0 = 0.00875$) (min)	$[S]$ (g/l)
17.5	30	20.0
11.5	20	10.0
9.6	16	6.7
8.5	15	5.0
8.0	14	4.0
7.6		3.3
7.3		2.9
7.1		2.5

Λύση άσκησης I

- Τα διαγράμματα Hanes–Woolf για $E_0 = 0.015 \text{ g/L}$ and $E_0 = 0.00875 \text{ g/L}$
- Η κλίση ισούται με $1/V_m$ ενώ η αποτέμνουσα με K_m/V_m .
 - $K_m = 9.2 \text{ g-S/L}$, $V_m = 1.7 \text{ g/L min}$ για $E_0 = 0.015 \text{ g/L}$
 - $K_m = 10 \text{ g-S/L}$, $V_m = 1.0 \text{ g/L min}$ για $E_0 = 0.00875 \text{ g/L}$
- Η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης παραγωγής του προϊόντος, k_2 , υπολογίζεται από την εξίσωση $V_m = k_2 [E_0]$ σε μονάδες g-P/g-E min



Άσκηση 2) Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος

- Η υδρόλυση της ουρίας από την ουρεάση είναι μια μερικώς κατανοητή αντίδραση και εμφανίζει αναστολή (παρεμπόδιση). Δεδομένα από την αντίδραση αυτή:

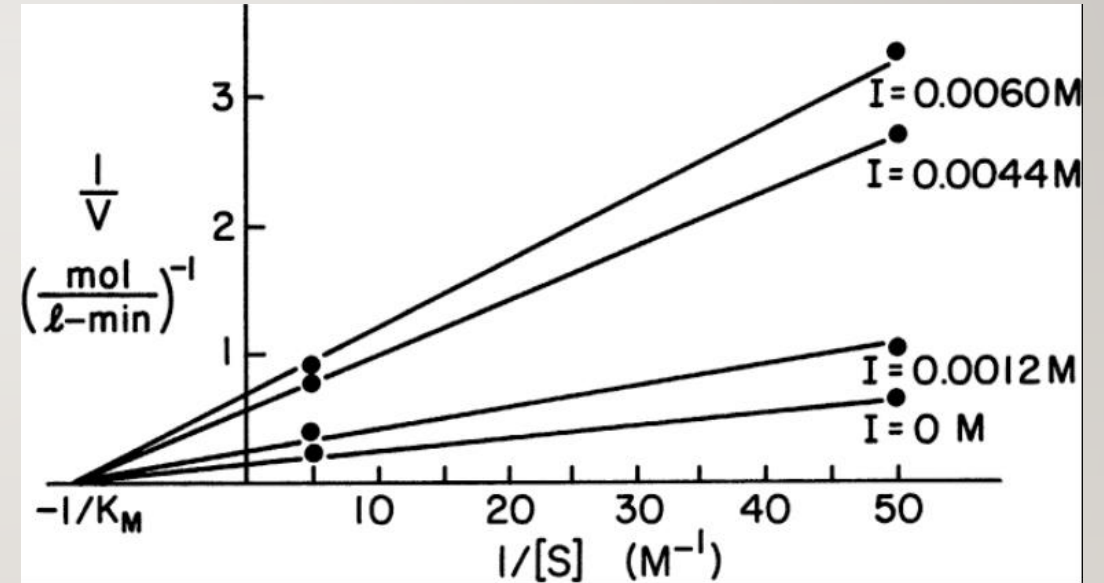
Συγκέντρωση υποστρώματος	0.2 M		0.2 M	
	1/v	I	1/v	I
Όπου: v = moles/L min και I είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση του αναστολέα	0.22	0	0.68	0
	0.33	0.0012	1.02	0.0012
	0.51	0.0027	1.50	0.0022
	0.76	0.0044	1.83	0.0032
	0.88	0.0061	2.04	0.0037
	1.10	0.0080	2.72	0.0044
	1.15	0.0093	3.46	0.0059

1. Προσδιορίστε τη σταθερά Michaelis-Menten (K'_m) της αντίδρασης.
2. Τι τύπο αναστολής έχουμε; Δικαιολογήστε την απάντησή σας.
3. Ποια είναι η τιμή της K_i ;

Υπόδειξη: Χρησιμοποιήστε το Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου).

Λύση άσκησης 2

- Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου) για διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα μας δείχνει ότι πρόκειται για μη-συναγωνιστική αναστολή.
- Το K'_m το βρίσκω από το διάγραμμα για ($1/V = 0$)
- Το K_i το βρίσκω υπολογίζοντας πρώτα το V_m για $I=0$ από το γράφημα.
- $1/V_m = 0.2$; $V_m = 5.0$ moles/L min.
- Χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε δεδομένα από τον προηγούμενο πίνακα αντικαθιστούμε στην δίπλα σχέση και λύνουμε ως προς K_i .



$$v = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(1 + \frac{K'_m}{[S]}\right)}$$

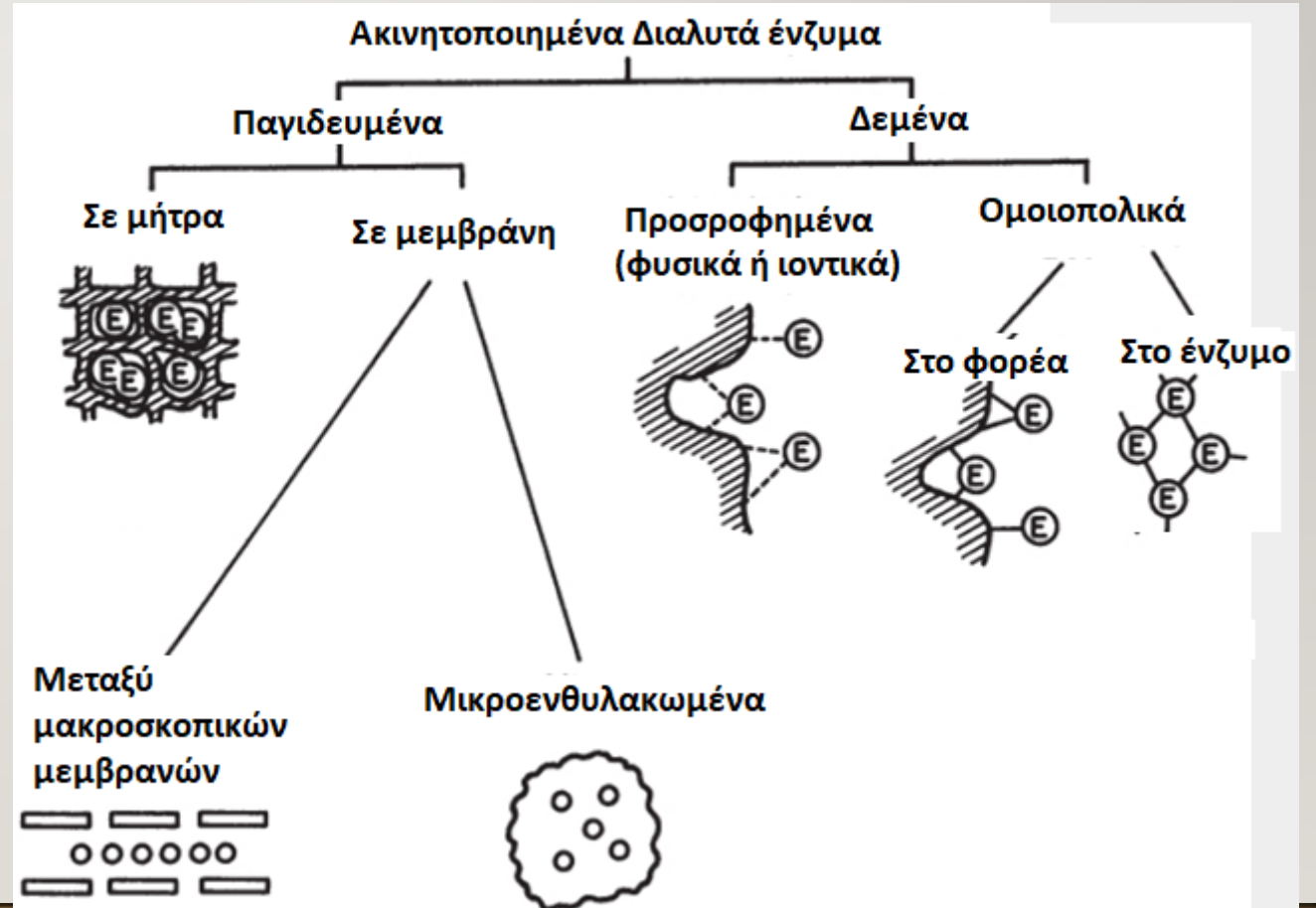
Συστήματα ακινητοποιήμενων Ενζύμων

Ενζυμική Ακίνητοποίηση

- Ο περιορισμός της κινητικότητας ενός ενζύμου σε ένα συγκεκριμένο χώρο είναι γνωστός ως ενζυμική ακίνητοποίηση (enzyme immobilization).
- Πλεονεκτήματα κατά την ακίνητοποίηση
 - 1) Επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου και εξάλειψη των διαδικασιών ανάκτησης και καθαρισμού
 - 2) Καλύτερο περιβάλλον δράσης του ενζύμου (σε ορισμένες περιπτώσεις)
 - 3) Βελτίωση στην καθαρότητα των προϊόντων και
 - 4) Ελαχιστοποίηση των προβλημάτων χειρισμού του υγρού εκροής

Μέθοδοι Ακίνητοποίησης Παγίδευση

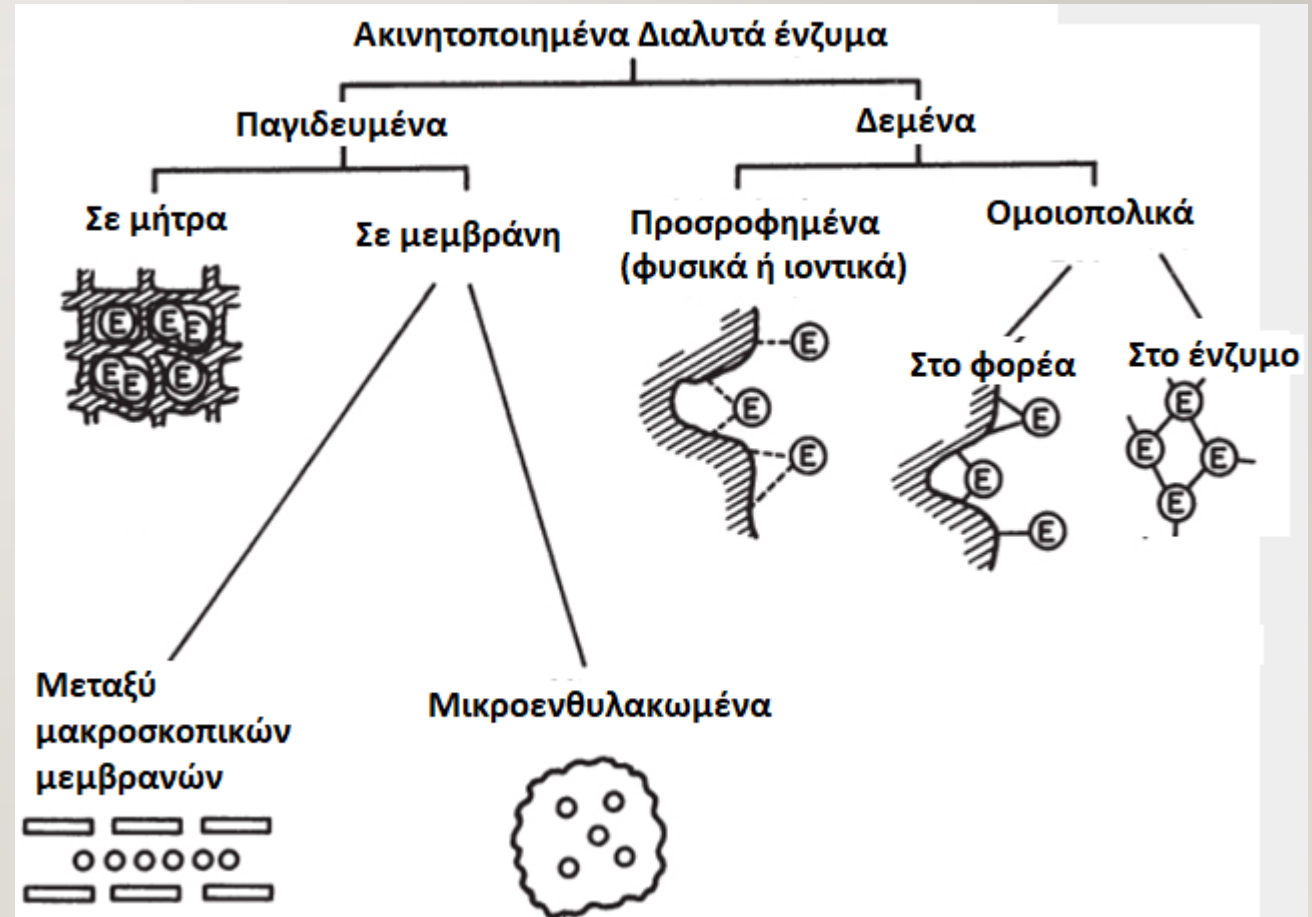
- Η παγίδευση είναι ο φυσικός εγκλεισμός των ενζύμων σε μικρό χώρο
- Η παγίδευση σε μήτρα και η παγίδευση σε μεμβράνη είναι οι δύο βασικές μέθοδοι παγίδευσης.
- Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παγίδευση είναι πολυμερή υλικά όπως το αλγινικό ασβέστιο, το άγαρ, το πολυακρυλαμίδιο και το κολλαγόνο.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στερεά υλικά όπως ενεργός άνθρακας, πορώδη κεραμικά.



Μέθοδοι Ακίνητοποίησης

Επιφανειακή ακίνητοποίηση

- Οι δύο κυριότεροι τύποι ακίνητοποίησης ενζύμων σε επιφάνειες υλικών στήριξης είναι η προσρόφηση και η ομοιοπολική σύνδεση.
- Η προσρόφηση είναι η πρόσδεση των ενζύμων σε επιφάνειες σωματιδίων στήριξης λόγω ασθενών φυσικών δυνάμεων (π.χ. δυνάμεις Van der Waals).
- Η ομοιοπολική πρόσδεση (covalent binding) είναι η συγκράτηση των ενζύμων στις επιφάνειες στήριξης με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών.
- Εδώ τα μόρια του ενζύμου συνδέονται με το υλικό στήριξης μέσω ορισμένων λειτουργικών ομάδων όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες.



Περιορισμοί διάχυσης στα ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα

- Στα ακινητοποιημένα συστήματα παρατηρούνται διάφορα επίπεδα αντίστασης λόγω διάχυσης.
- Η επίπτωση της διάχυσης στο ρυθμό της ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τον παρακάτω λόγο:
- $Da = \frac{\text{μεγιστος ρυθμος αντιδρασης}}{\text{μεγιστος ρυθμος διαχυσης}} = \frac{V_m}{k_L[S_b]}$ (αριθμός Damkohler)
- Όπου $[S_b]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος στο υγρό ζύμωσης (g/cm^3) και k_L είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (cm/s)

Περιορισμοί διάχυσης στα ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα

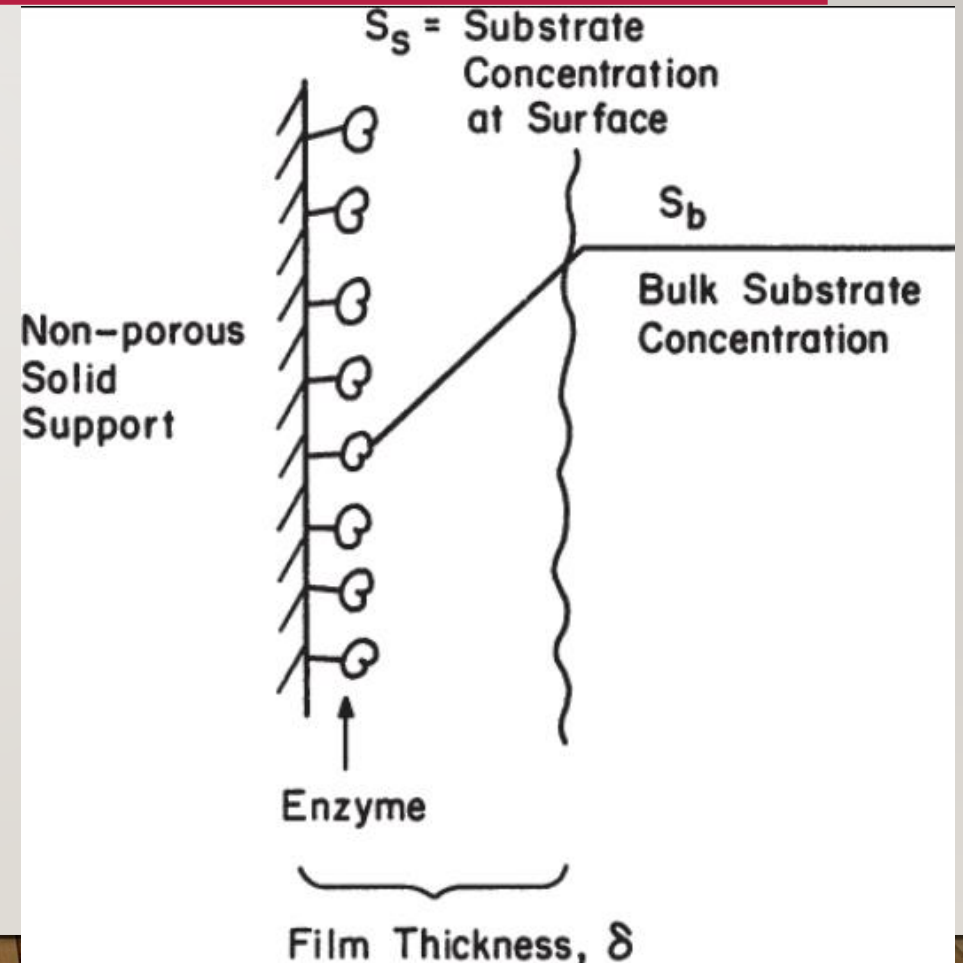
$$Da = \frac{\text{μεγιστος ρυθμός αντιδρασης}}{\text{μεγιστος ρυθμός διαχυσης}} = \frac{V_m}{k_L[S_b]} \quad (\text{αριθμός Damkohler})$$

- Για $Da \gg 1$, ο ρυθμός της διάχυσης είναι περιοριστικός
- Για $Da \ll 1$, ο ρυθμός της αντίδρασης είναι περιοριστικός
- Για $Da \sim 1$, οι αντιστάσεις της διάχυσης και της αντίδρασης είναι συγκρίσιμες.
- Στα ένζυμα που είναι παγιδευμένα σε μήτρα, η διάχυση και η ενζυμική αντίδραση γίνονται συνήθως ταυτόχρονα.
- Στα ένζυμα που είναι προσροφημένα η διάχυση και η αντίδραση είναι δύο διαδοχικά φαινόμενα.

Ακίνητοποίηση σε μη-πορώδη υλικά

Προφίλ του $[S]$ σε ένα υγρό φιλμ γύρω από προσροφημένα ένζυμα

- Ας υποθέσουμε ότι τα ένζυμα είναι δεσμευμένα και ομοιόμορφα κατανομημένα στην επιφάνεια ενός **μη πορώδους** υλικού υποστήριξης.
- Το υπόστρωμα διαχέεται μέσω ενός λεπτού υγρού φιλμ που περιβάλλει την επιφάνεια υποστήριξης για να φθάσει στις αντιδρούσες επιφάνειες.
- Αν υποθέσουμε ότι η διαδικασία ακίνητοποίησης δεν έχει αλλάξει τη πρωτεϊνική δομή και οι εγγενείς κινητικές παράμετροι (V_m, K_m) είναι αμετάβλητες.
- Στη σταθερή κατάσταση ο ρυθμός της αντίδρασης ισούται με το ρυθμό της μεταφοράς μάζας.



Ακίνητοποίηση σε μη-πορώδη υλικά

$$J_s = k_L ([S_b] - [S_s]) = \frac{V'_m [S_s]}{K_m + [S_s]}$$

← Ρυθμός αντίδρασης

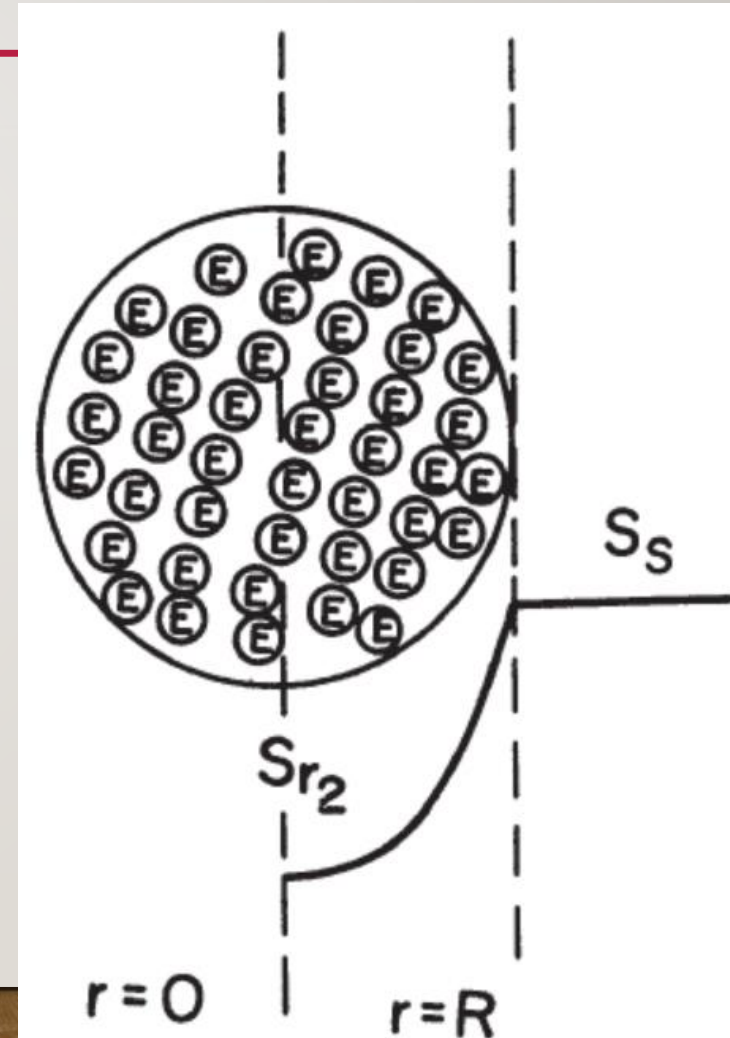
Ρυθμός μεταφοράς
μάζας

- Όπου:
 - $[S_b]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος στο υγρό ζύμωσης (g/cm^3)
 - $[S_s]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος στην επιφάνεια της αντίδρασης
 - k_L είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (cm/s)
 - V'_m είναι ο μέγιστος ρυθμός της ταχύτητας ανά μονάδα εξωτερικής επιφάνειας
- Όταν ο περιοριστικός παράγοντας ενός συστήματος είναι η μεταφορά μάζας τότε $[S_s] \approx 0$ και η αντίδραση είναι ταχεία σε σχέση με τη μεταφορά μάζας.
 - Για $Da \gg 1$, $v \approx k_L [S_b]$ οπότε το σύστημα έχει συμπεριφορά ψευδο-πρώτης αντίδρασης
- Όταν ο ρυθμός της αντίδρασης είναι περιοριστικός (δλδ $Da \ll 1$), ο ρυθμός της αντίδρασης εκφράζεται:

$$v = \frac{V'_m [S_b]}{K_{m,app} + [S_b]}$$

Ακίνητοποίηση σε πορώδη μήτρα

- Όταν τα ένζυμα ακινητοποιούνται σε εσωτερικές επιφάνειες πόρων πορώδους μήτρας, το υπόστρωμα διαχέεται μέσω ενός πολύ δύσκολου μονοπατιού μεταξύ των πόρων προκειμένου να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο ένζυμο.
- Η διάχυση και η αντίδραση συμβαίνουν ταυτόχρονα σε αυτήν την περίπτωση.



Άσκηση 3) Προσδιορισμός του κατά πόσον υπάρχουν Περιορισμοί Διάχυσης

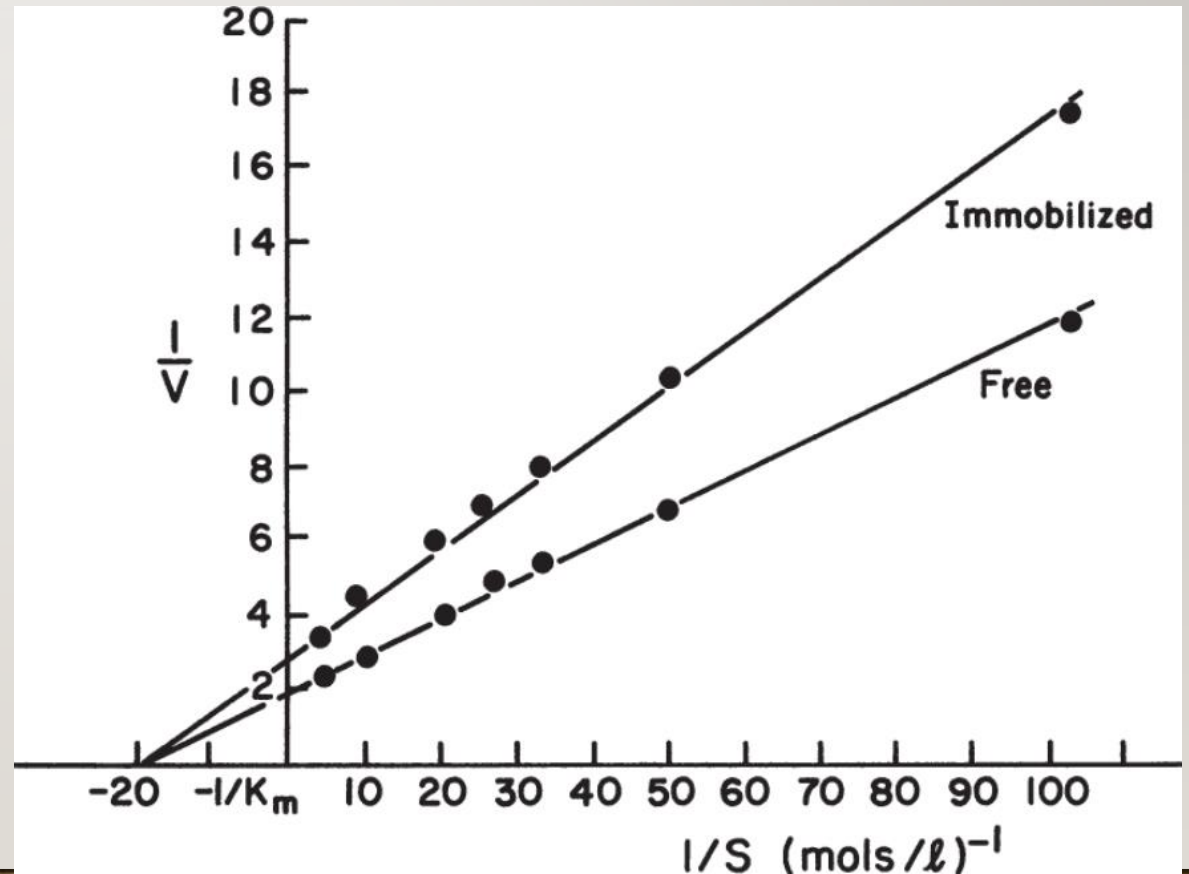
- Υδρόλυση σακχαρόζης σε pH = 4.5 και 25°C χρησιμοποιώντας ακατέργαστη ιμβερτάση από ζύμη αρτοποιίας σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή.
- Στον πίνακα έχουμε την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης με προσθήκη 408 μονάδες ακατέργαστου ενζύμου (1 μονάδα = η ποσότητα ενζύμου που υδρολύει 1 μmol σακχαρόζης / λεπτό όταν επωάζεται με 0,29 M σακχαρόζη σε pH 4.5 και 25°C).
- Προσδιορίστε τα K_m και V_m της αντίδρασης για το ελεύθερο και για το ακινητοποιημένο ένζυμο
- Υπάρχει περιορισμός της διάχυσης;

V_0 (mmol hydrolyzed/l-min)		S_0 (mol/l)
Free Enzyme	Immobilized Enzyme	
0.083	0.056	0.010
0.143	0.098	0.020
0.188	0.127	0.030
0.222	0.149	0.040
0.250	0.168	0.050
0.330	0.227	0.100
0.408	0.290	0.290

Υπόδειξη: Χρησιμοποιήστε το Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου).

Λύση άσκησης 3

- Από το διάγραμμα μπορούμε να υπολογίσουμε τα K_m και V_m τόσο για τα ελεύθερα όσο και για τα ακινητοποιημένα ένζυμα.
- Βλέπουμε ότι το K_m είναι ίδιο και για τα 2 ένζυμα.
- Οπότε δεν υπάρχει περιορισμός από τη διάχυση.



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



Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

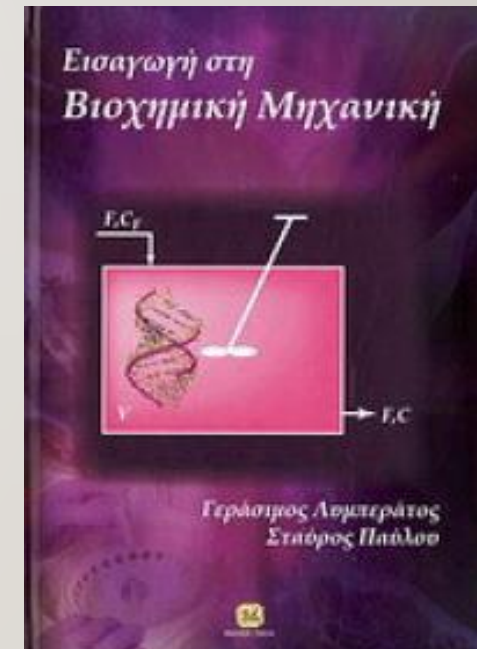
Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

Βιβλιογραφία



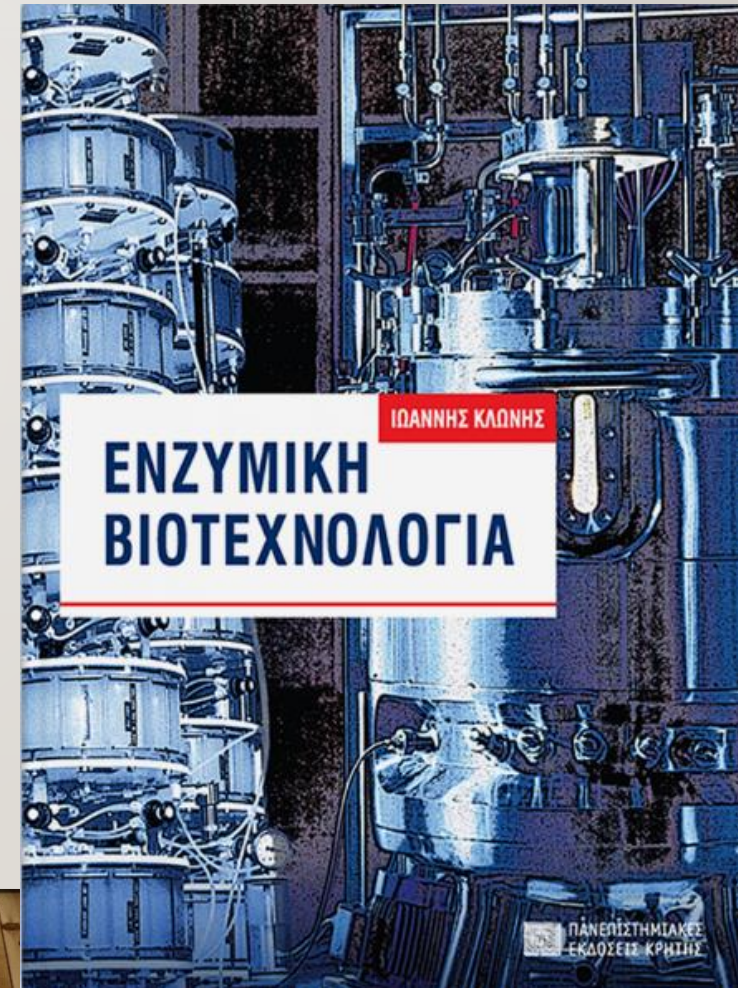
Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

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



Επιπλέον Βιβλιογραφία

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



Τι μάθαμε σήμερα

- 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