

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.

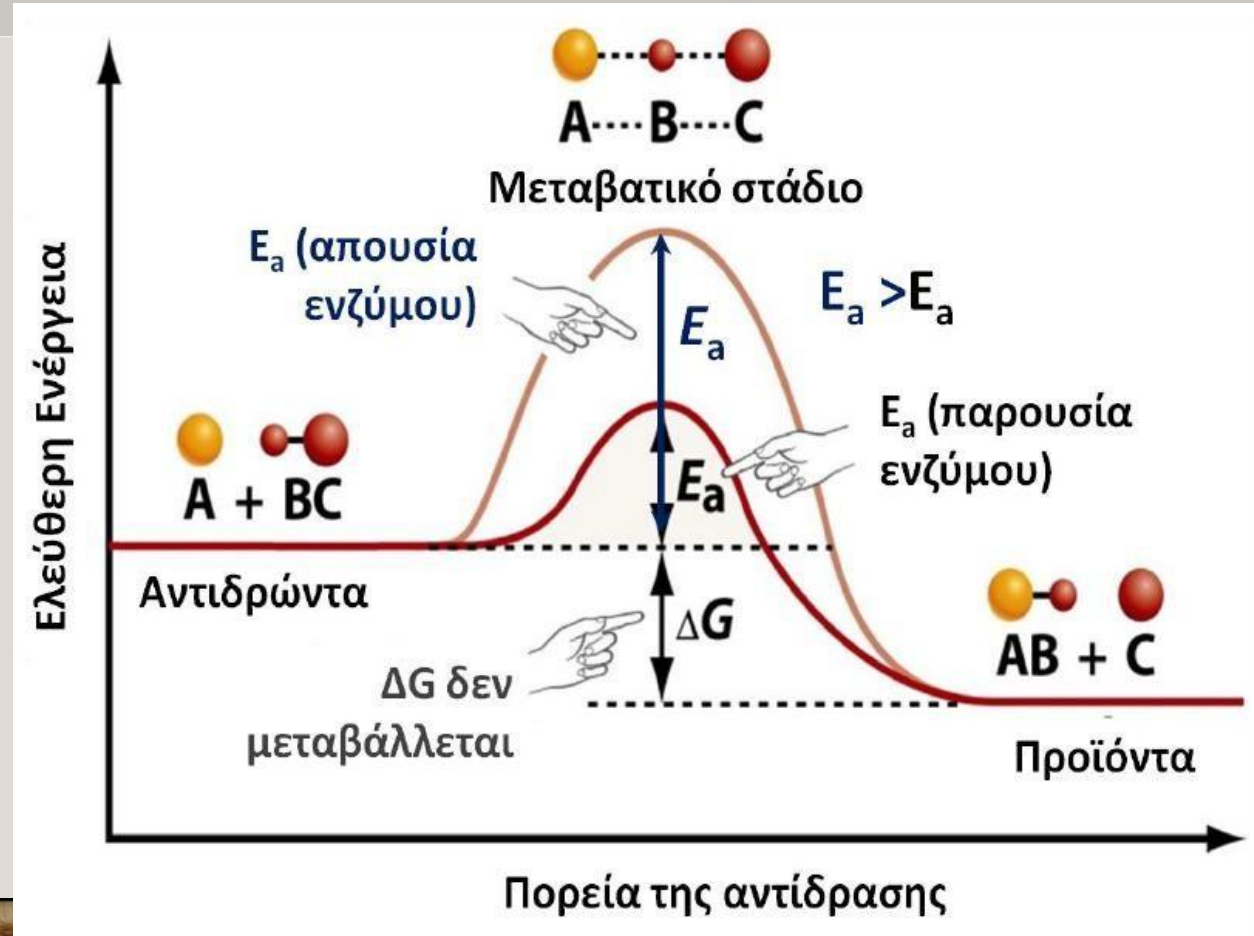
Η Λειτουργία των Ενζύμων

Πως τα ένζυμα επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις

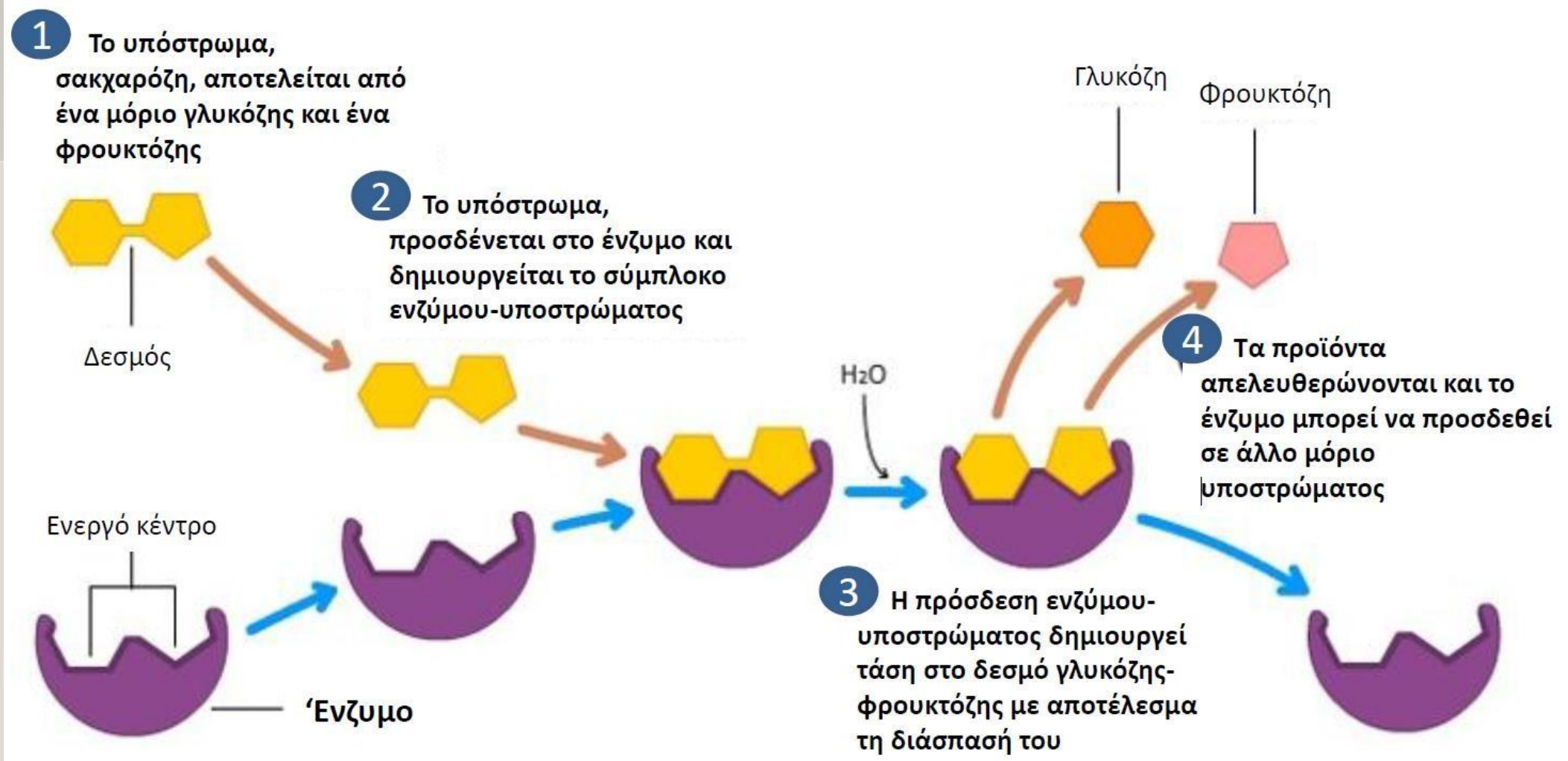
Τα ένζυμα:

(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

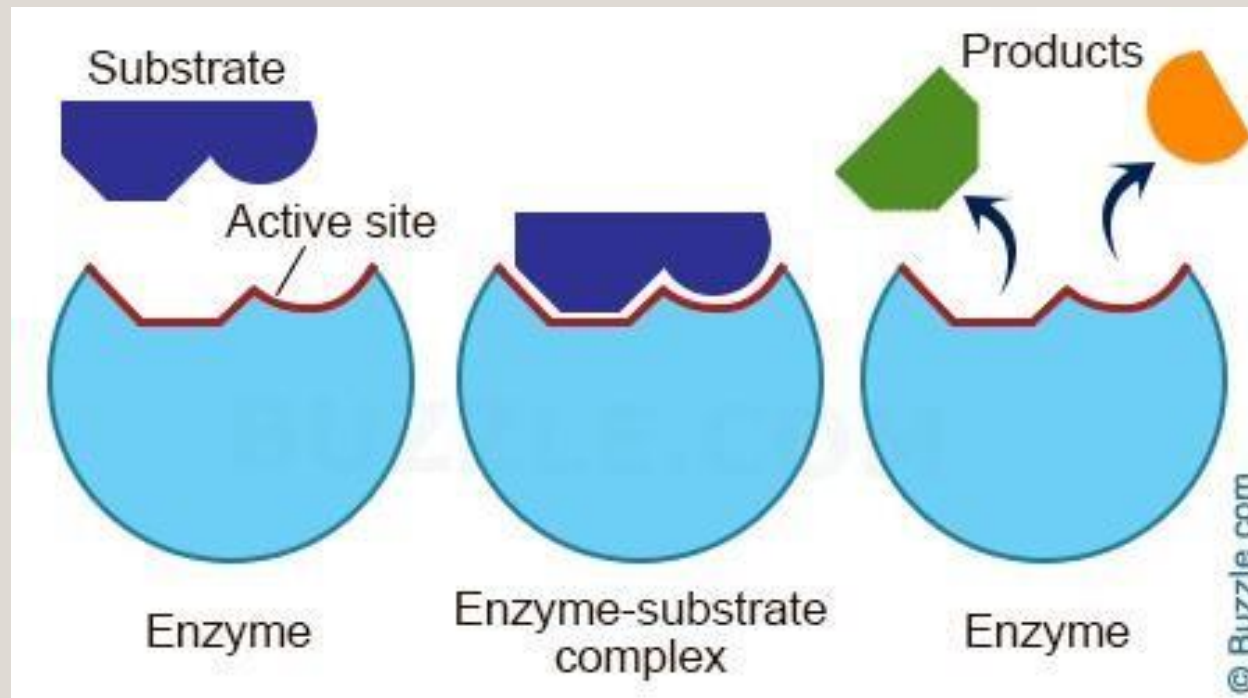


Η λειτουργία των ενζύμων

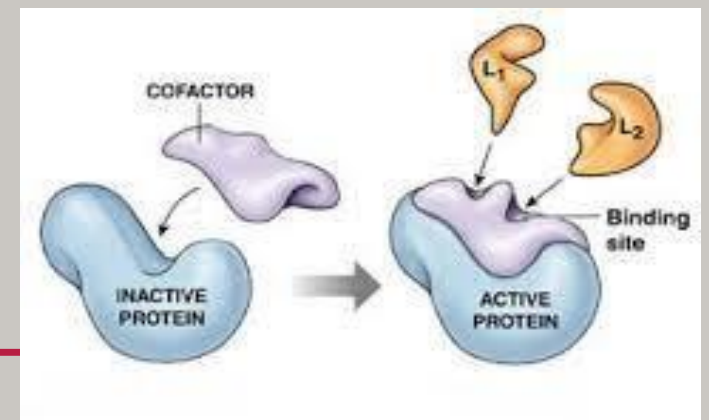


Η περιοχή του ενζύμου όπου καταλύεται η αντίδραση λέγεται ενεργό κέντρο.

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).

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

- 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:
 - $A \rightarrow B$
 - $A \rightarrow C$
- Θεωρώντας ότι:
 - Αρχικά έχουμε μόνο **A** με συγκέντρωση c_{A0} ,
 - Οι ρυθμοί αντίδρασης των επί μέρους αντιδράσεων είναι k_1c_A και k_2c_A αντίστοιχα
 - Μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση του A ολοκληρώνοντας την κανονική διαφορική εξίσωση (ισοζύγιο):

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

Έτσι η συγκέντρωση του A είναι:

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

Παράδειγμα (συνέχ')

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

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

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

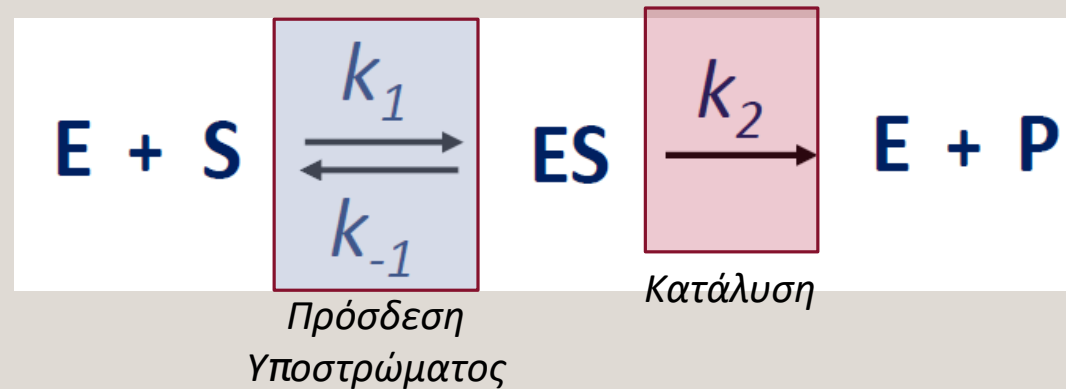
- Αυτές οι σχέσεις ουσιαστικά μας λένε ότι για κάθε mol του A που καταναλώνεται, οι ποσότητες των B και C που παράγονται δεν είναι σταθερές αλλά εξαρτώνται από την **κινητική των επί μέρους αντιδράσεων**.

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

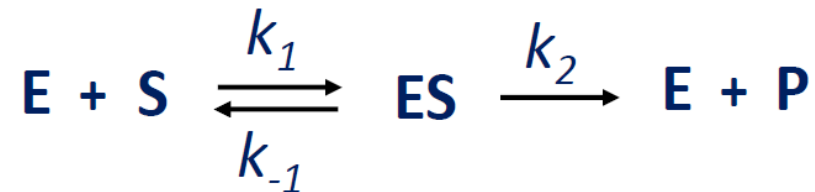
- Η έναρξη κάθε ενζυμικής αντιδράσεως σηματοδοτεί τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (Brown, 1902 και Henri, 1903), το οποίο ακολούθως διασπάται σε προϊόν και σε αρχικό ένζυμο, σύμφωνα με το πρότυπο ισοροπίας:



$$v_1 = k_1 [E] [S]$$
$$v_2 = k_{-1} [ES]$$
$$v_3 = k_2 [ES]$$

- $[S]$ 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

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:

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

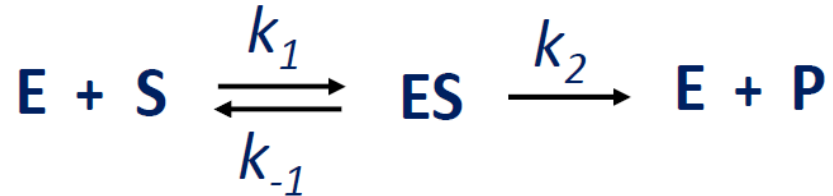
- Ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος P είναι (μάζα (ή moles) / όγκο / χρόνο) (π.χ. moles / L / min):

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

- Κάθε χρονική στιγμή η ποσότητα 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 μιας έκφρασης ρυθμού για τον μηχανισμό της αντίδρασης.

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

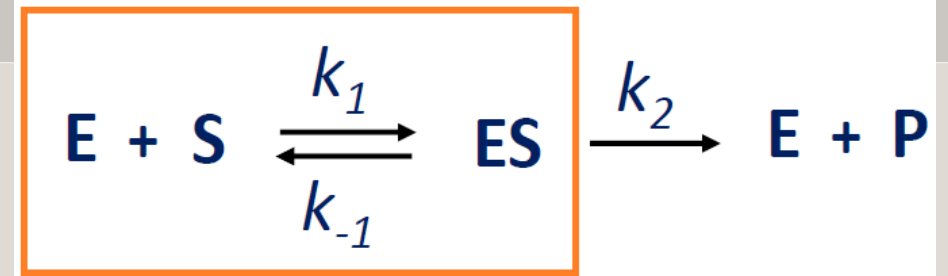
Το 1913, οι Michaelis – Menten απέδωσαν με μαθηματικό τρόπο το μηχανισμό δράσης των ενζύμων, στηριζόμενοι στην ιδέα της δημιουργίας του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και στην υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας

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

Η υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας

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

- 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].
- Κάθε χρονική στιγμή η ποσότητα του ενζύμου 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)

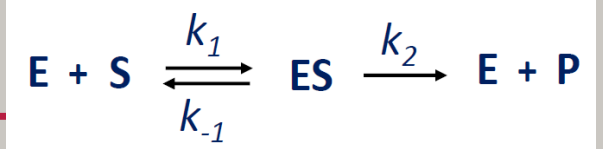
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \Rightarrow K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

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

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

$$v_3 = k_2 [ES]$$

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

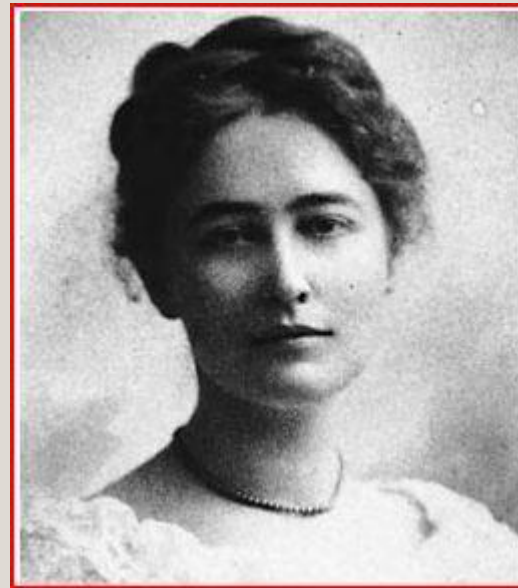
v	Ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης
v_{\max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης
[S]	Συγκέντρωση υποστρώματος
K'_m	Σταθερά ισορροπίας ($K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$)

- Η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης είναι V_{\max} η οποία **αυξάνεται αν αυξηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου**

Οι επιστήμονες που ανακάλυψαν την ομώνυμη εξίσωση το 1913

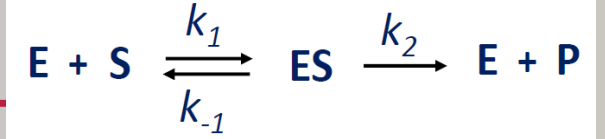


Leonor Michaelis
1875 - 1949

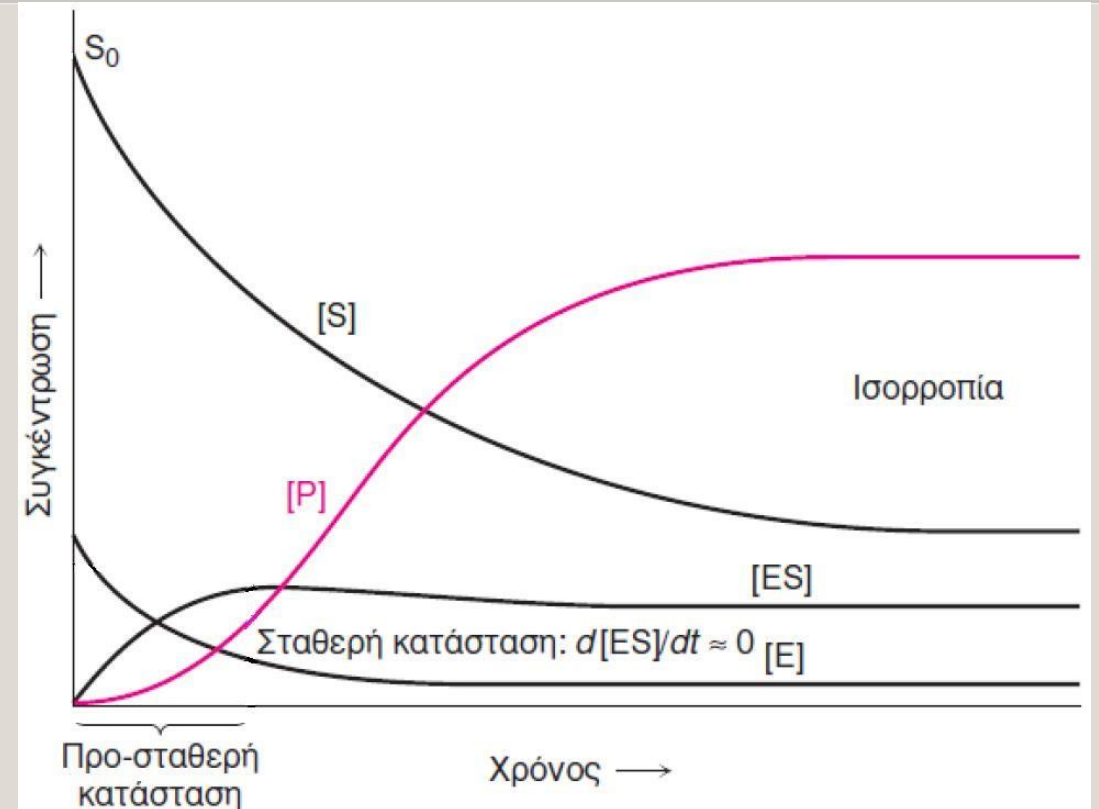


Maud Menten
1879 - 1960

Υπόθεση “Ημισταθερής” κατάστασης



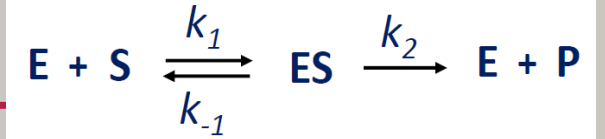
- Θεωρούμε μία ημισταθερή κατάσταση όπου η συγκέντρωση του συμπλόκου [ES] παραμένει πρακτικά σταθερή.
- Δλδ Ο ρυθμός σχηματισμού του συμπλόκου [ES] είναι σχεδόν ίσος με το ρυθμό διάσπασής του.
- Όταν αναμιγνύεται το ένζυμο με το υπόστρωμα και ξεκινά η αντίδραση αυξάνεται η συγκέντρωση του [ES] (προ-σταθερή κατάσταση), αλλά ταχύτατα φτάνει σε σταθερή κατάσταση όπου η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή.



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

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

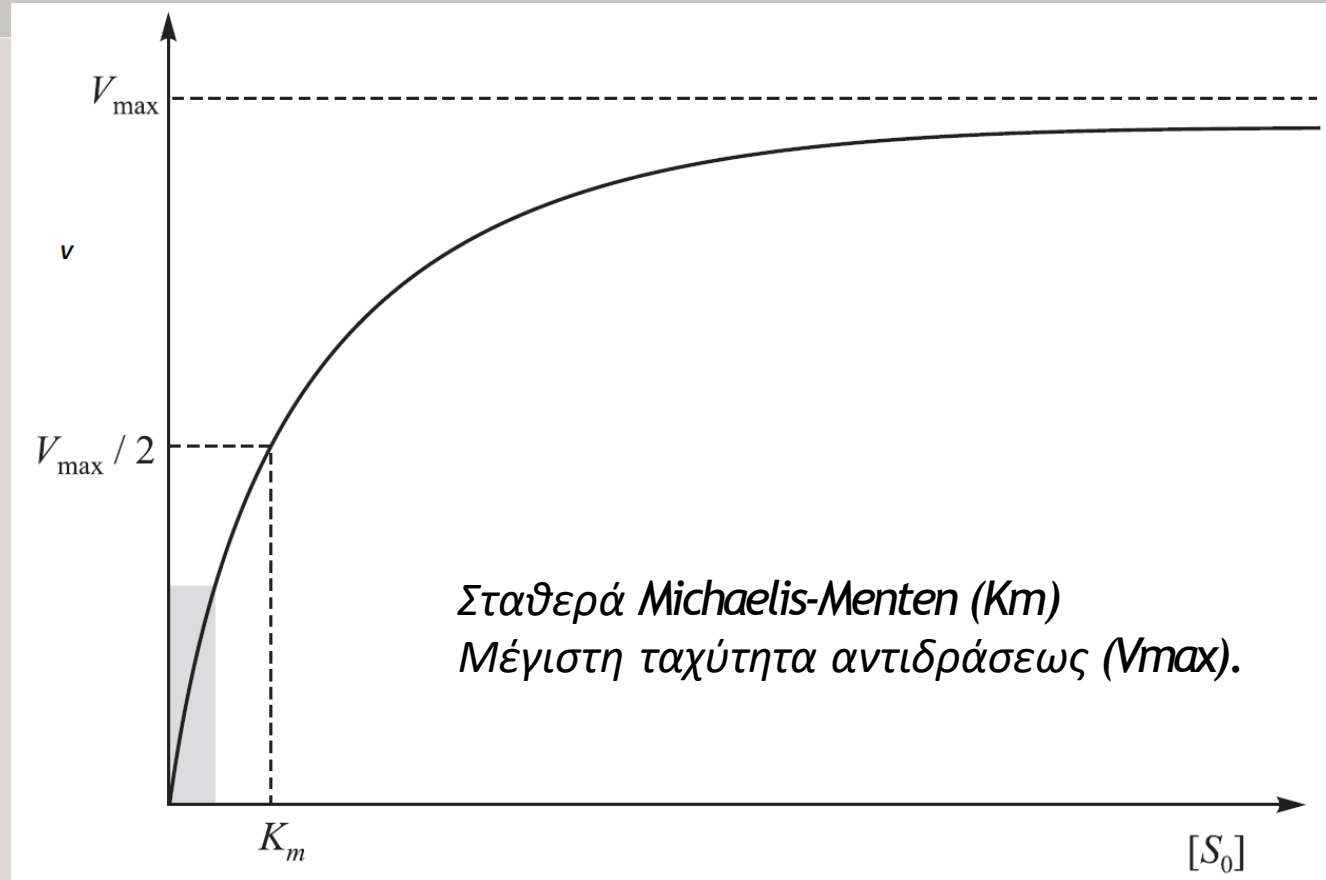
- Από $v = \frac{dP}{dt} = k_2[ES]$ προκύπτει $v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$ όπου

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

Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως (v) vs. της συγκεντρώσεως υποστρώματος ($[S]$)

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

- Σε χαμηλή $[S]$ (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.



Η σταθερά ισορροπίας K_m

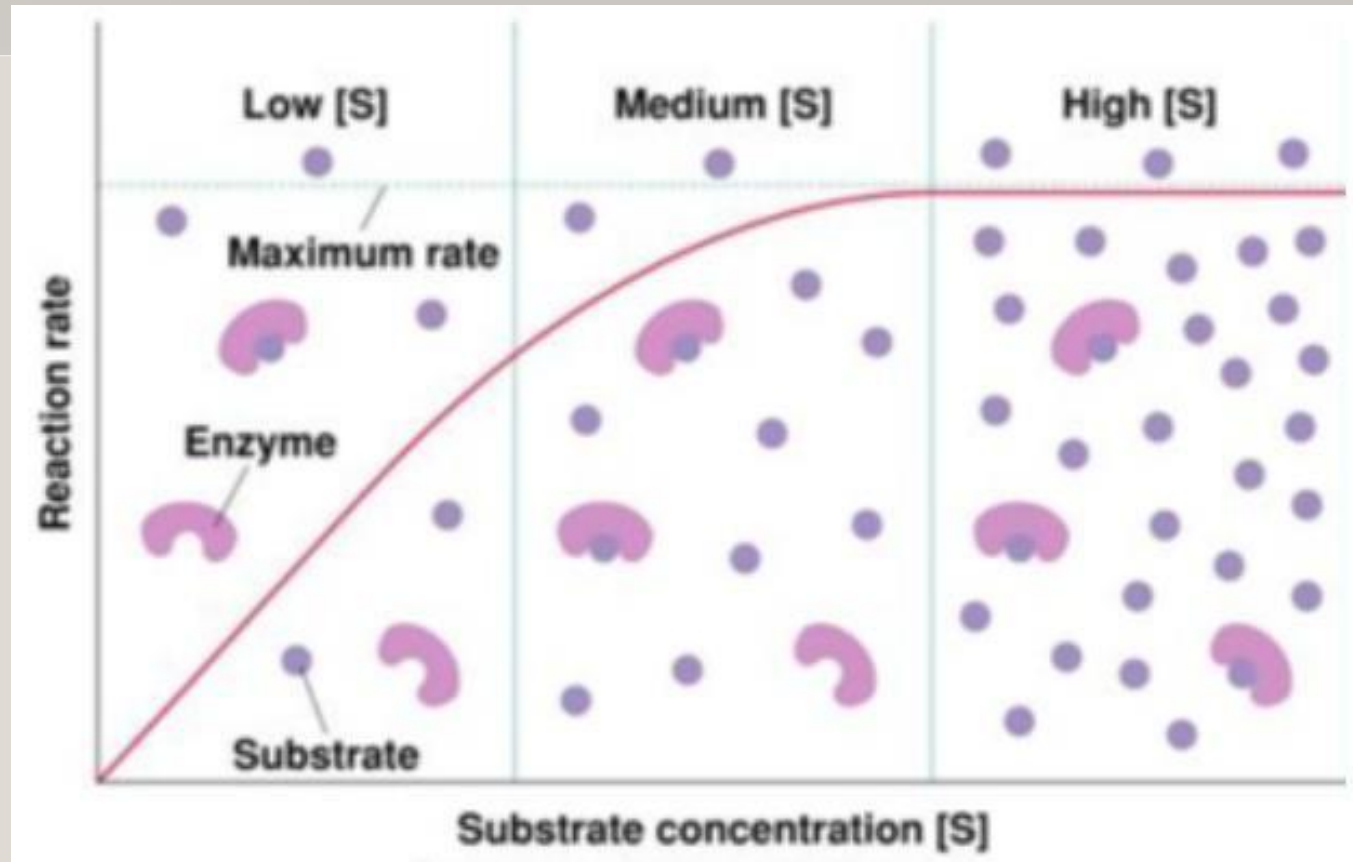
Αν η ταχύτητα είναι το μισό της μέγιστης $v = V_{max}/2$

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

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

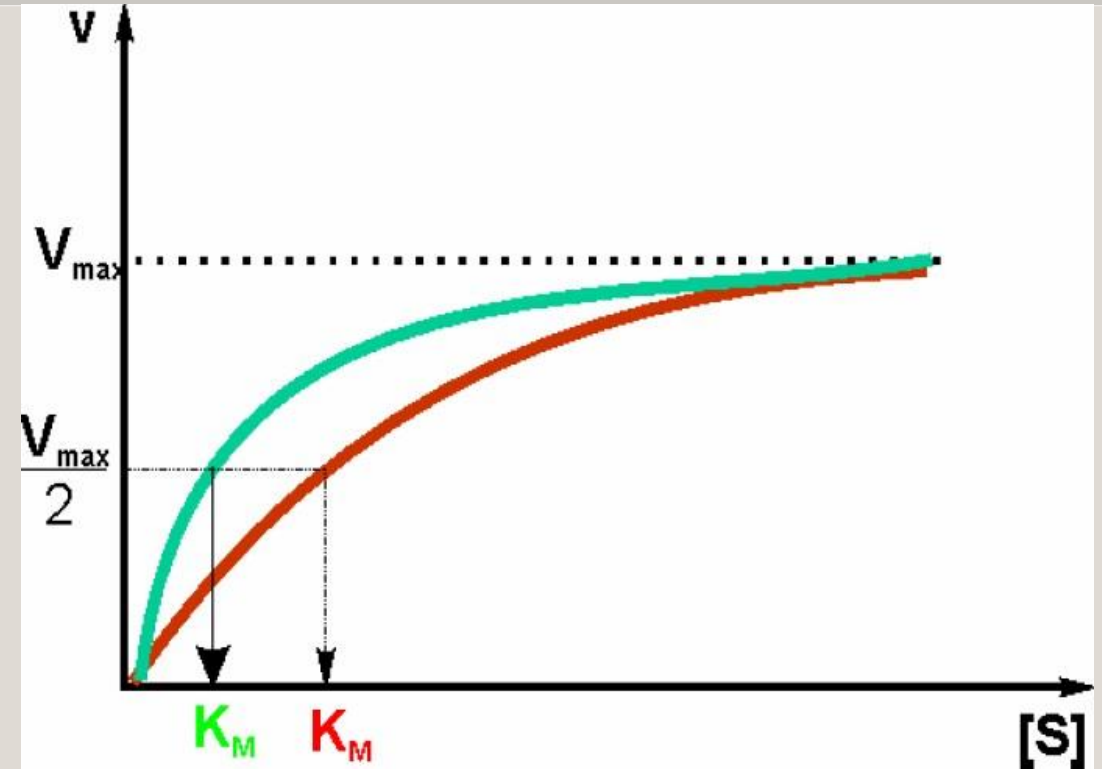
$$\Leftrightarrow [S] + k_m = 2[S] \Leftrightarrow k_m = [S]$$

Επίδραση της συγκέντρωσής του υποστρώματος στην ταχύτητα αντιδράσεως



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.



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.

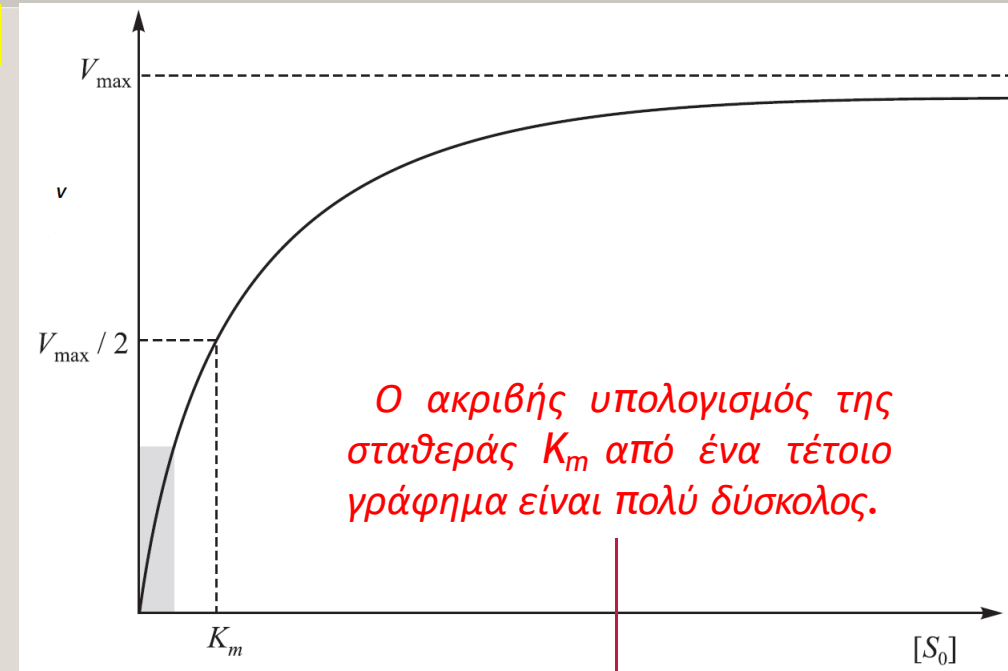
Ερμηνεία των K_m και V_{max} (συνέχ')

- V_{max}
 - Είναι ο θεωρητικά μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης.
 - 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 $[S_0]$.

Διάγραμμα Michaelis-Menten



Ο ακριβής υπολογισμός της σταθεράς K_m από ένα τέτοιο γράφημα είναι πολύ δύσκολος.

Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί άλλες μέθοδοι υπολογισμού.

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου)

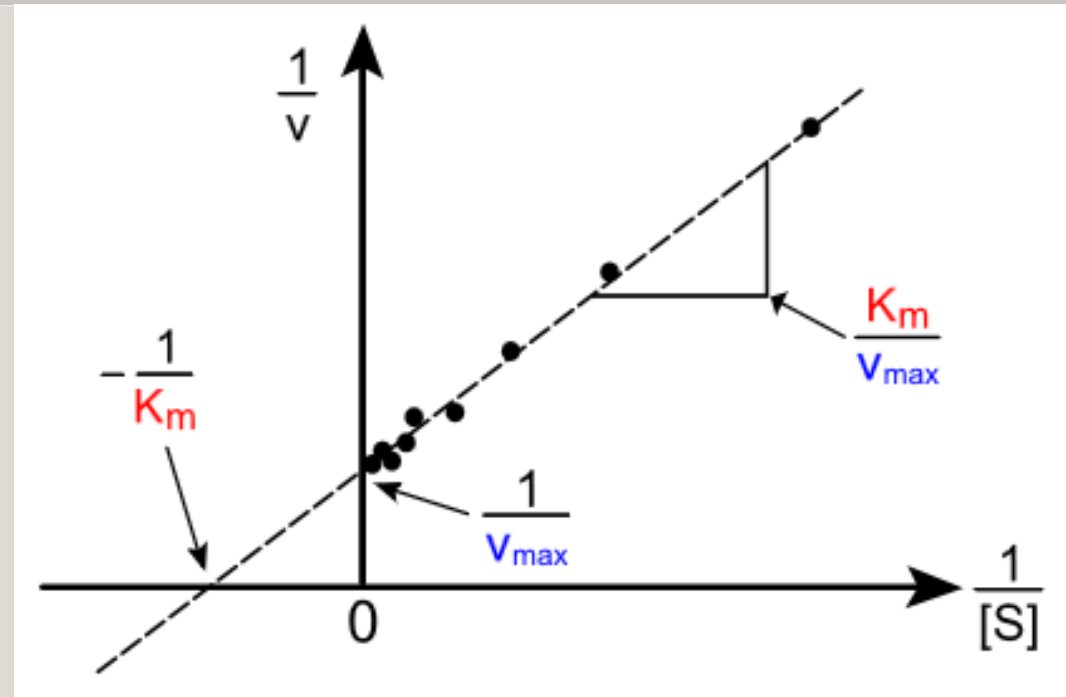
- Η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να αντιστραφεί:

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

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

Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου)

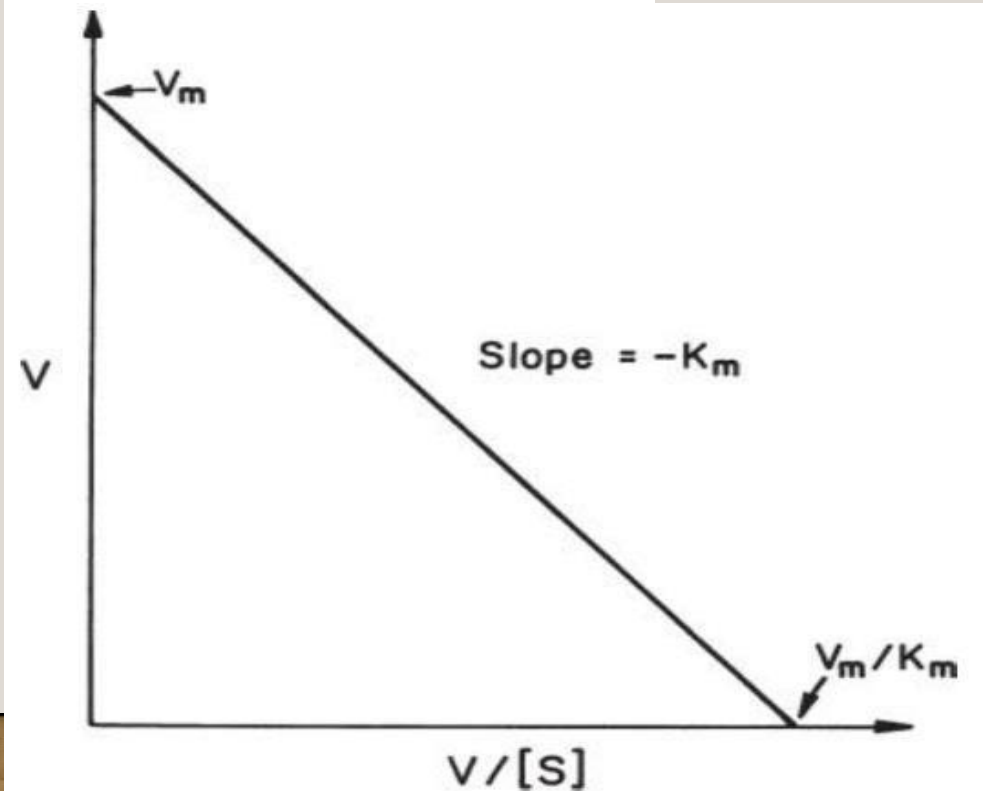
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$



ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΑΔΙΕ-ΗΟFSTΕΕ

Προκύπτει από την εξίσωση Michaelis-Menten πολλαπλασιάζοντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης επί $v_{max} \cdot v/[S]$

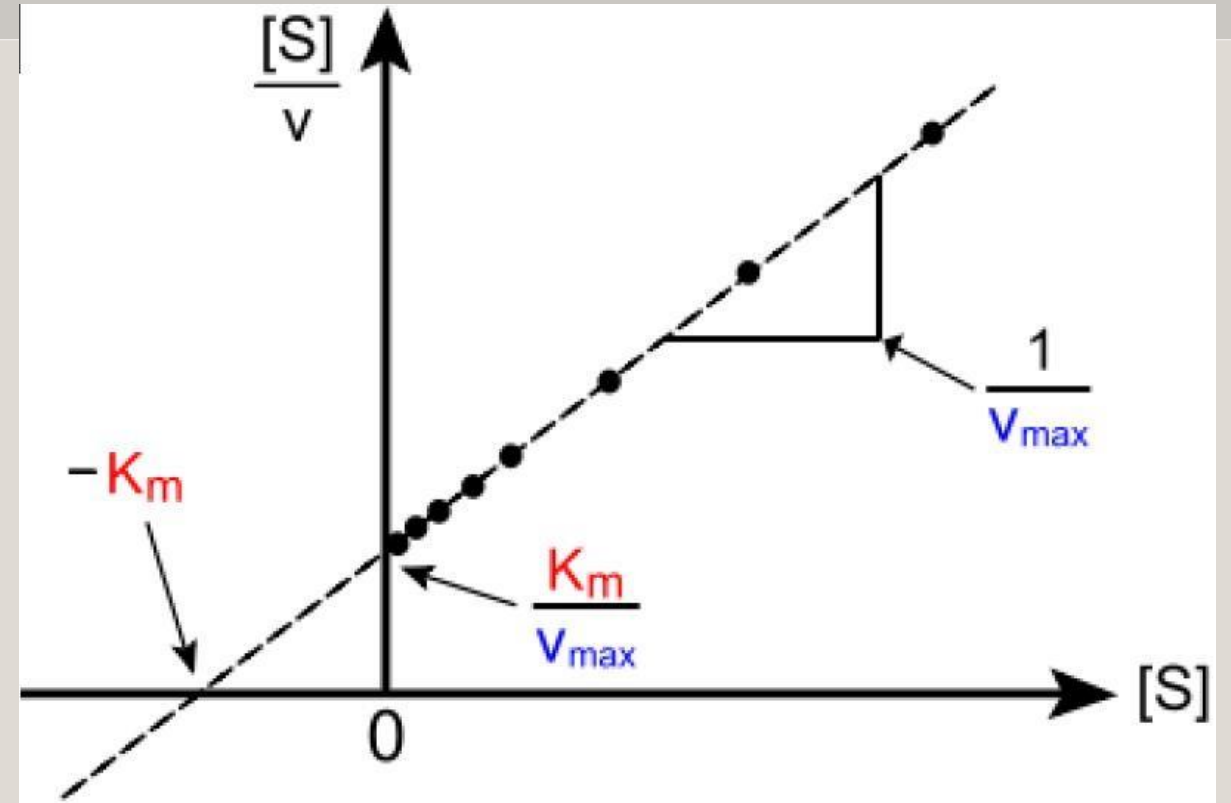
$$v = V_{max} - K_m \frac{v}{[S]}$$



ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ HANES-WOOLF

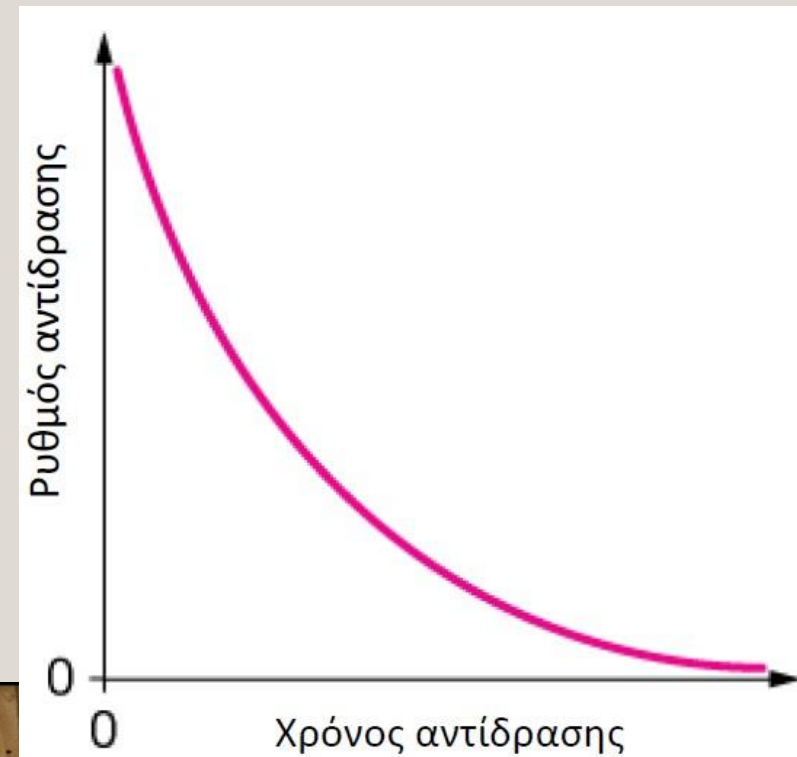
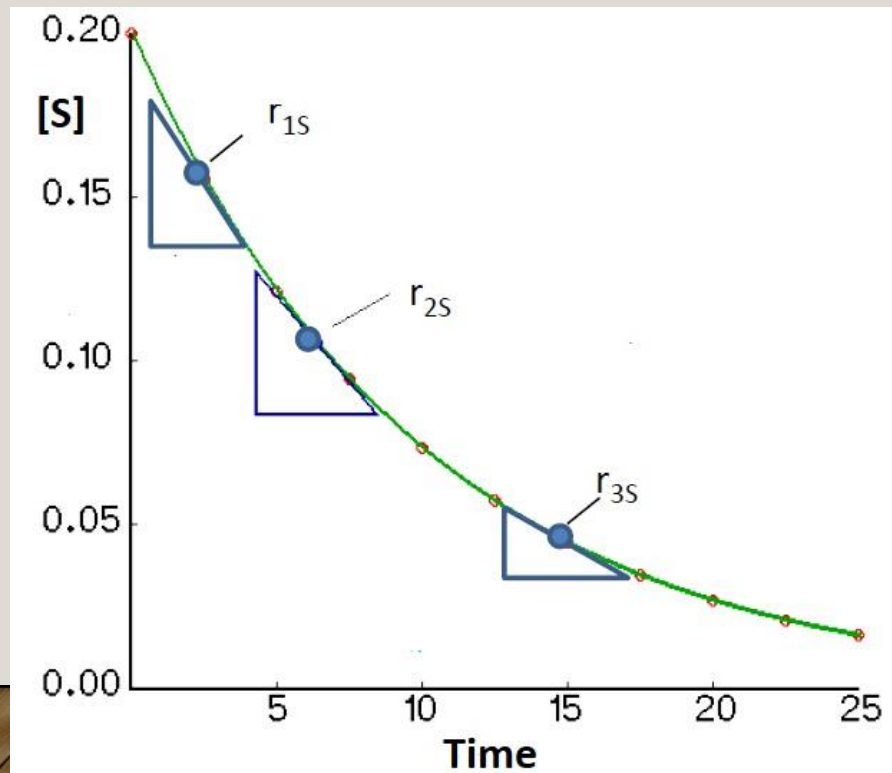
- Προκύπτει από την εξίσωση Lineweaver- Burk πολλαπλασιάζοντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης επί $[S]$.

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



Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S) vs. χρόνου αντίδρασης (t)

- 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

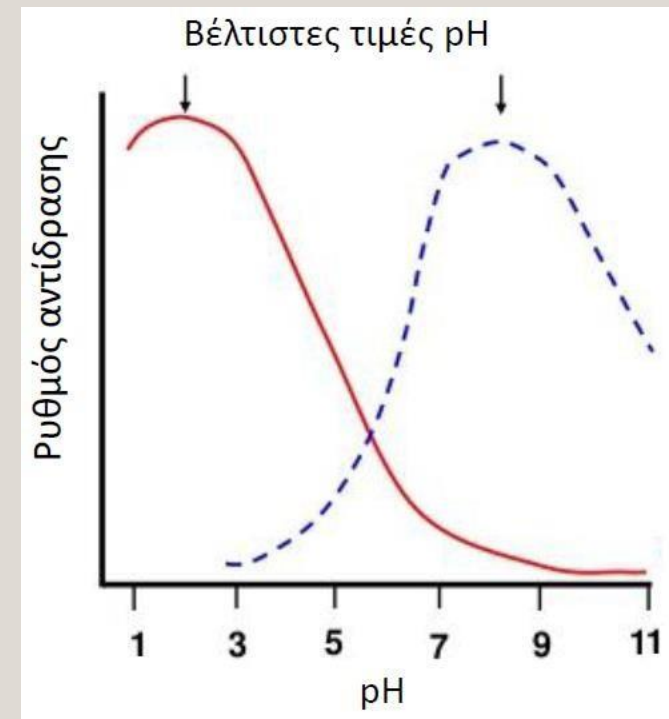
- Οι ρυθμοί των ενζυμικών αντιδράσεων γενικά εξαρτώνται από:
- Την συγκέντρωση του ενζύμου, $[E]$
- Την συγκέντρωση των αντιδρώντων (υποστρώματος), $[S]$
- Την συγκέντρωση διαφόρων ουσιών που ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν την κατάλυση - Αναστολείς (πιο σύνθετες ενζυμικές κινητικές) και
- Από φυσικούς 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.

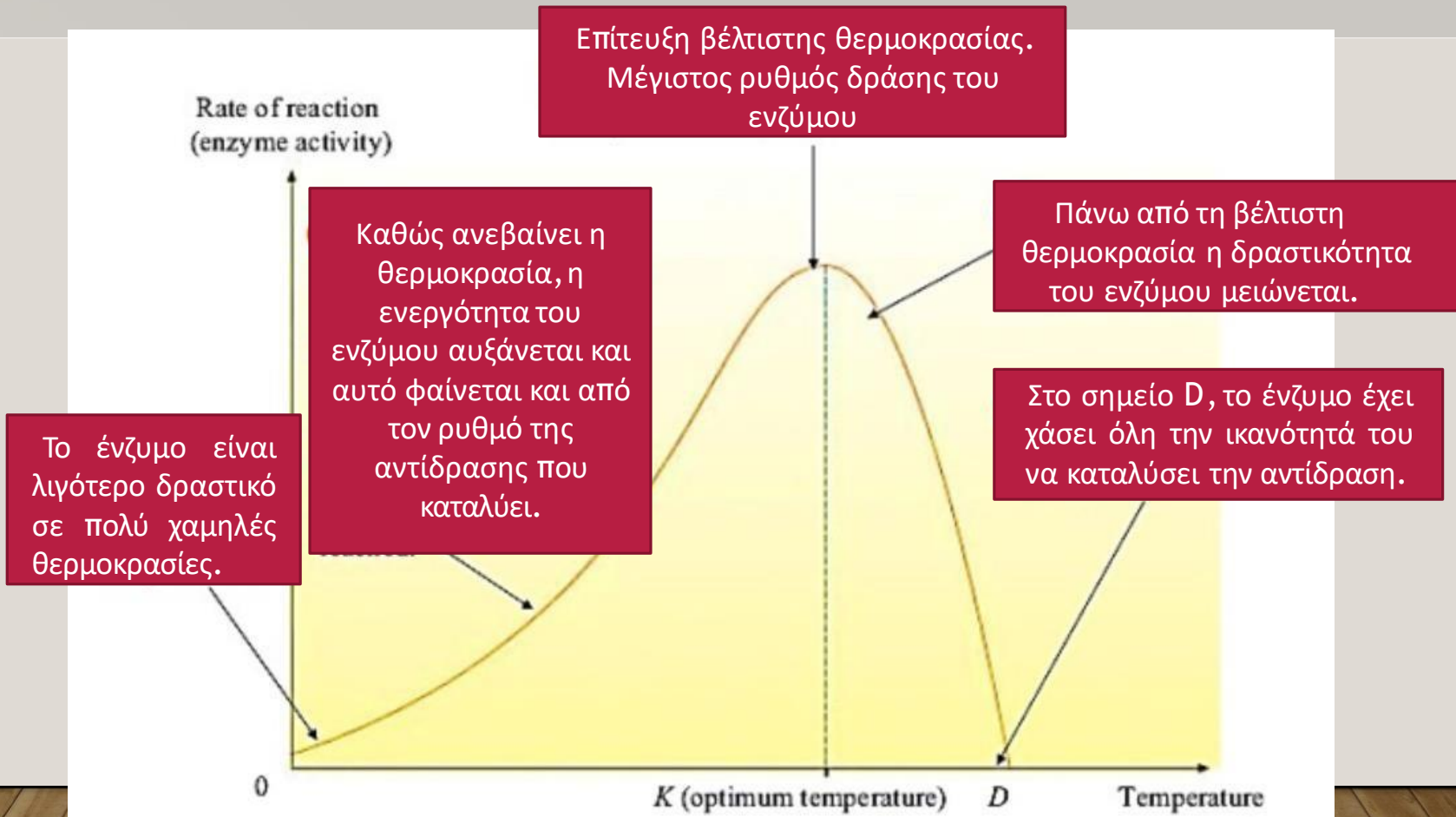


Επίδραση της θερμοκρασίας

Χαμηλή T ο ρυθμός της αντίδρασης είναι χαμηλός λόγω της χαμηλής κινητικής ενέργειας των μορίων → χαμηλή συχνότητα συγκρούσεων μεταξύ των μορίων ενζύμου και του υποστρώματος.

Αύξηση της T αυξάνει την κινητική ενέργεια των μορίων

↓
Αύξηση της συχνότητας συγκρούσεων των μορίων ενζύμου-υποστρώματος με αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης



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)

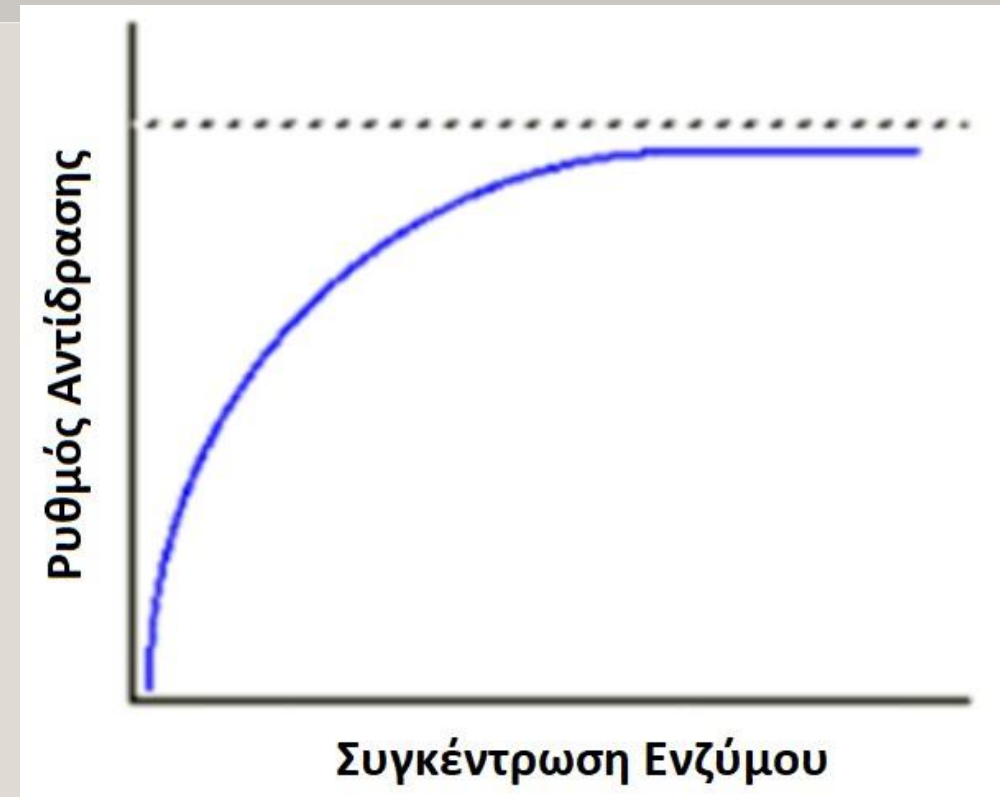
v σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης σε διάφορες θερμοκρασίες

T απόλυτη θερμοκρασία (K)

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

Επίδραση της 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.



Παραδείγματα Ασκήσεων

Άσκηση 1

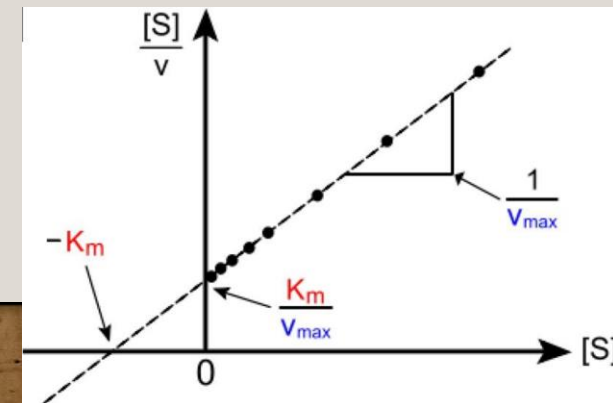
- Τα ακόλουθα δεδομένα έχουν ληφθεί για δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμων για μια αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο.

$v([E_0] = 0.015 \text{ g/l})$ (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 :

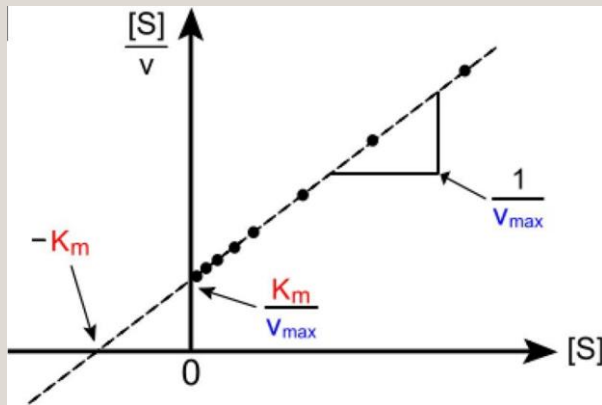
- το V_m της αντίδρασης για $[E_0] = 0.015 \text{ g/L}$
- το V_m της αντίδρασης για $[E_0] = 0.00875 \text{ g/L}$
- το K_m της αντίδρασης (σταθερά ισορροπίας του συμπλόκου ES)

Υπόδειξη: χρησιμοποιήστε το γράφημα Hanes-Woolf



Λύση άσκησης 1

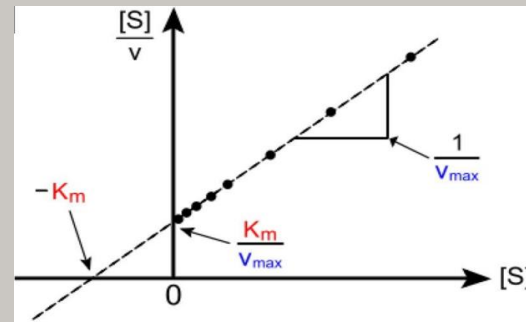
- Το πρώτο βήμα είναι να φτιάξουμε τις στήλες με τα δεδομένα του γραφήματος Hanes-Woolf.
- Δλδ θέλουμε τον υπολογισμό των $[S]/v$ για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμου και το $[S]$.



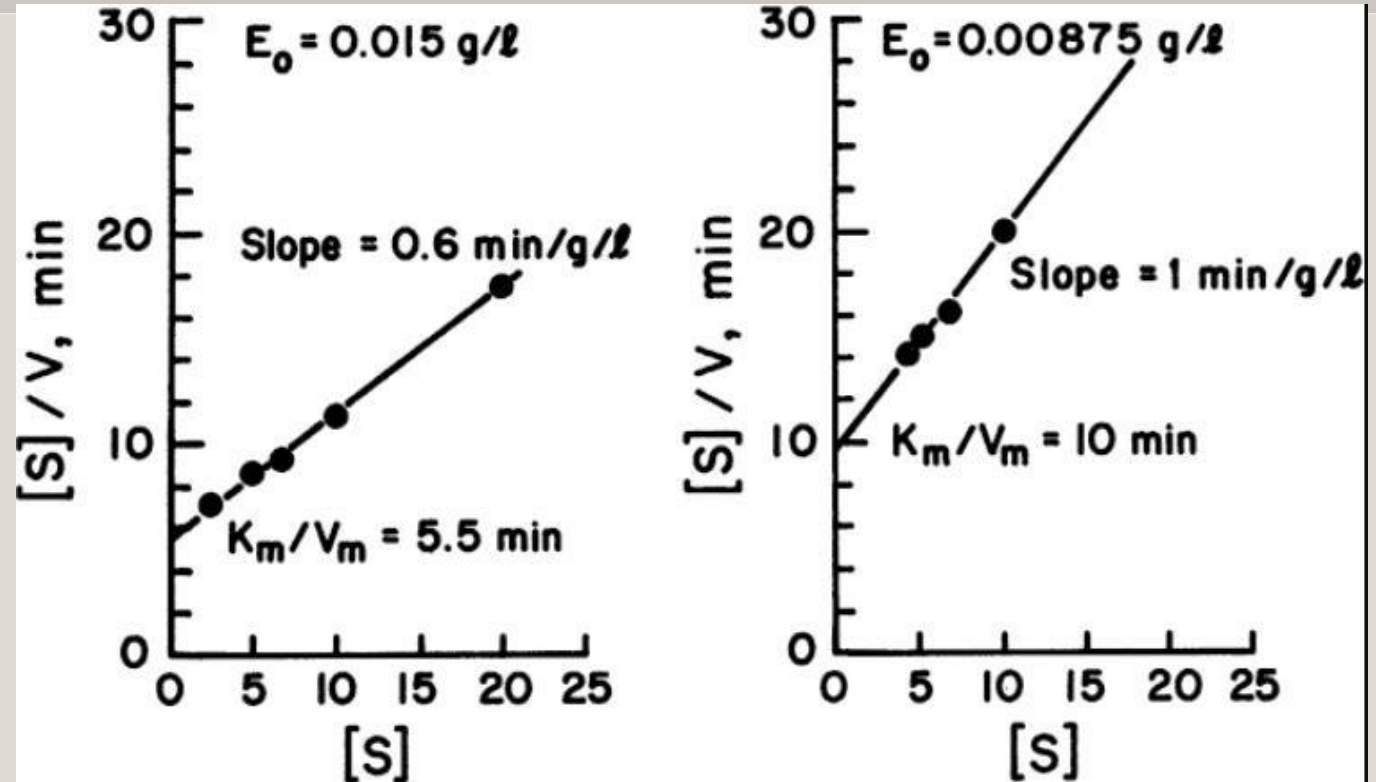
v ($E_0 = 0.015$ g/l)	$[S]$ (g/l)	v ($E_0 = 0.00875$ g/l)
1.14	20.0	0.67
0.87	10.0	0.51
0.70	6.7	0.41
0.59	5.0	0.34
0.50	4.0	0.29
0.44	3.3	
0.39	2.9	
0.35	2.5	

$[S]/v$ ($E_0 = 0.015$) (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 1

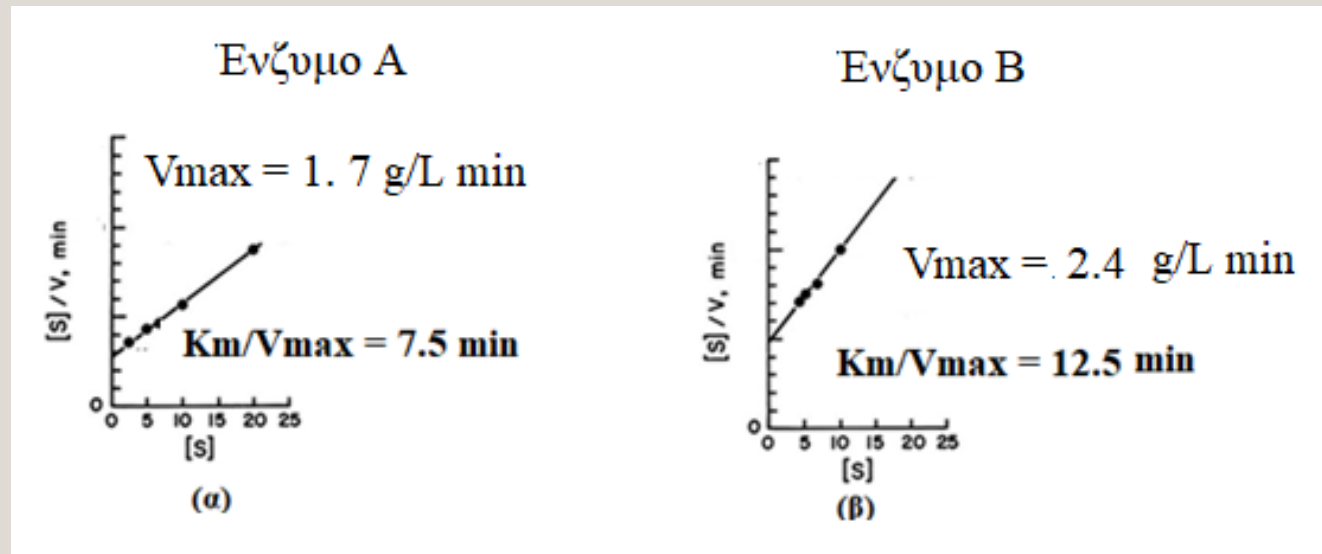


- Τα διαγράμματα Hanes-Woolf για $E_0 = 0.015 \text{ g/L}$ and $E_0 = 0.00875 \text{ g/L}$
- Η κλίση ισούται με $1/V_m$ ενώ η αποτέμνουσα με K_m/V_m .
- $K_m=9.4 \text{ g-S/L}, V_m = 1.7 \text{ g/Lmin}$ για $E_0 = 0.015 \text{ g/L}$
- $K_m=10 \text{ g-S/L}, V_m = 1.0 \text{ g/Lmin}$ για $E_0 = 0.00875 \text{ g/L}$



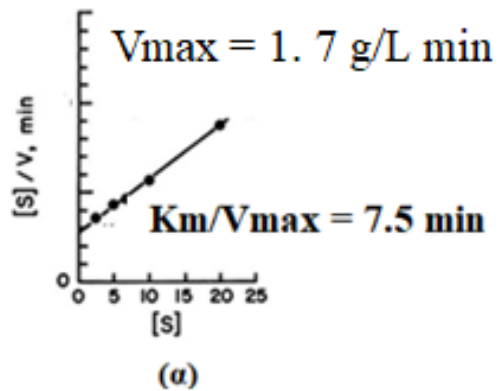
ΑΣΚΗΣΗ 2

Δίνονται τα διάγραμμα Hanes-Woolf για μια αντίδραση που καταλύεται από δύο διαφορετικά ένζυμα (A) και (B). Να υπολογίσετε το K_m και στις δύο περιπτώσεις (α) και (β). Σε ποιά περίπτωση (α) ή (β) παρουσιάζεται μικρότερη χημική συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος (S)? Εξηγήστε το λόγο. (Μον. 2)

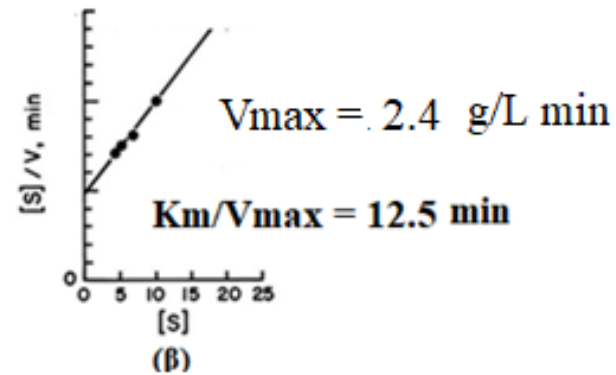


(α) $K_m = 12,75 \text{ g/L}$ (β) $K_m = 30 \text{ g/L}$

Ενζυμο Α



Ενζυμο Β



Στη (β) περίπτωση. 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

Δομή Μαθήματος

Ισοζύγια μάζας
& Στοιχειομετρία

Κινητική Ενζυμικών
αντιδράσεων

Κινητική ανάπτυξης
μικροβίων & παραγωγή
Μεταβολικών προϊόντων

Εισαγωγικό
Μάθημα



Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Ανάντι και κατάντι
διεργασίες σε
συστήματα
βιοδιεργασιών

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

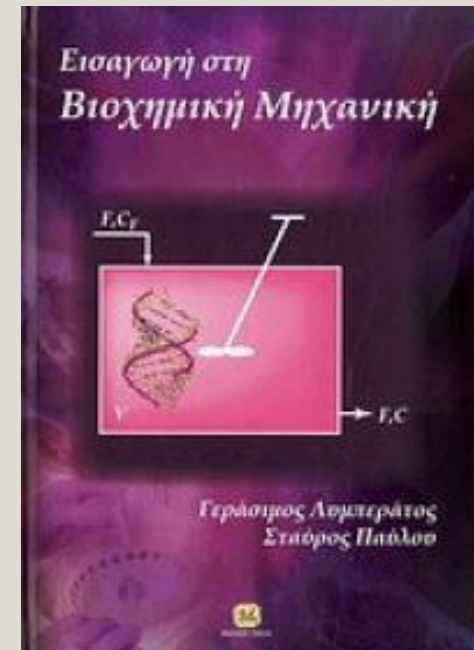
Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

Βιβλιογραφία



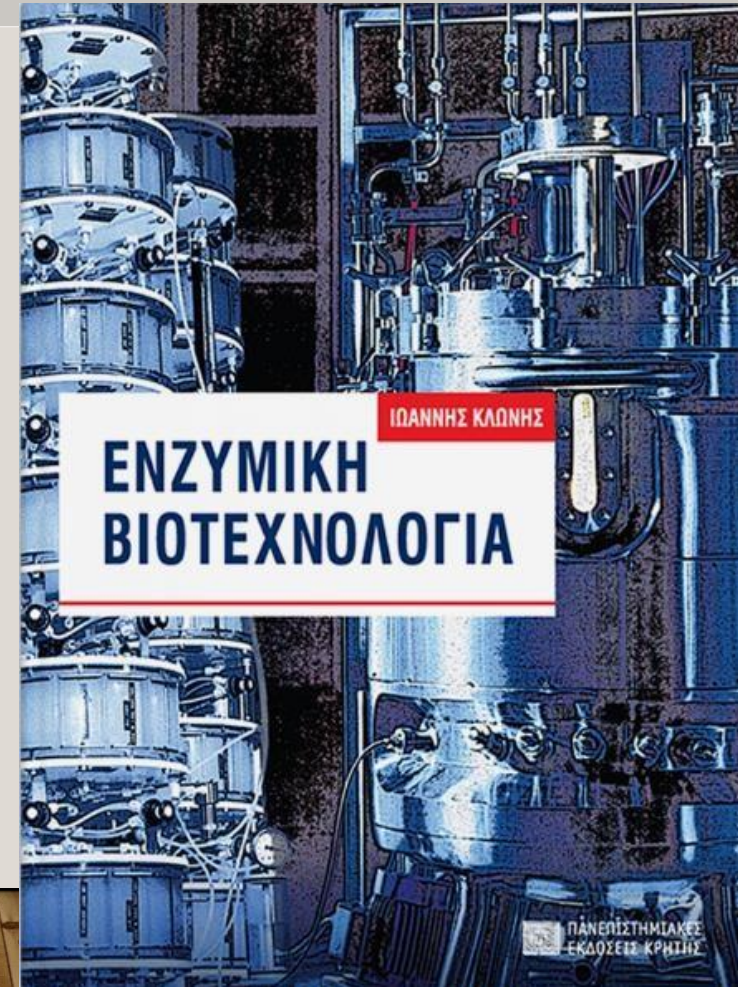
Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

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 ημισαθερής κατάστασης
- Τι σημαίνουν τα K_m και V_{max}
- Πως επιδρά η θερμοκρασίας, το pH και η συγκέντρωση του $[E]$ στο ρυθμό της αντίδρασης.