



Βιοχημεία Τροφίμων

Ενότητα 2^η: Ενζυμική Κινητική

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*
Αναπληρωτής Καθηγητής

Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

Ένας παράγοντας – κλειδί που επηρεάζει την ταχύτητα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένα ένζυμο, είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$.

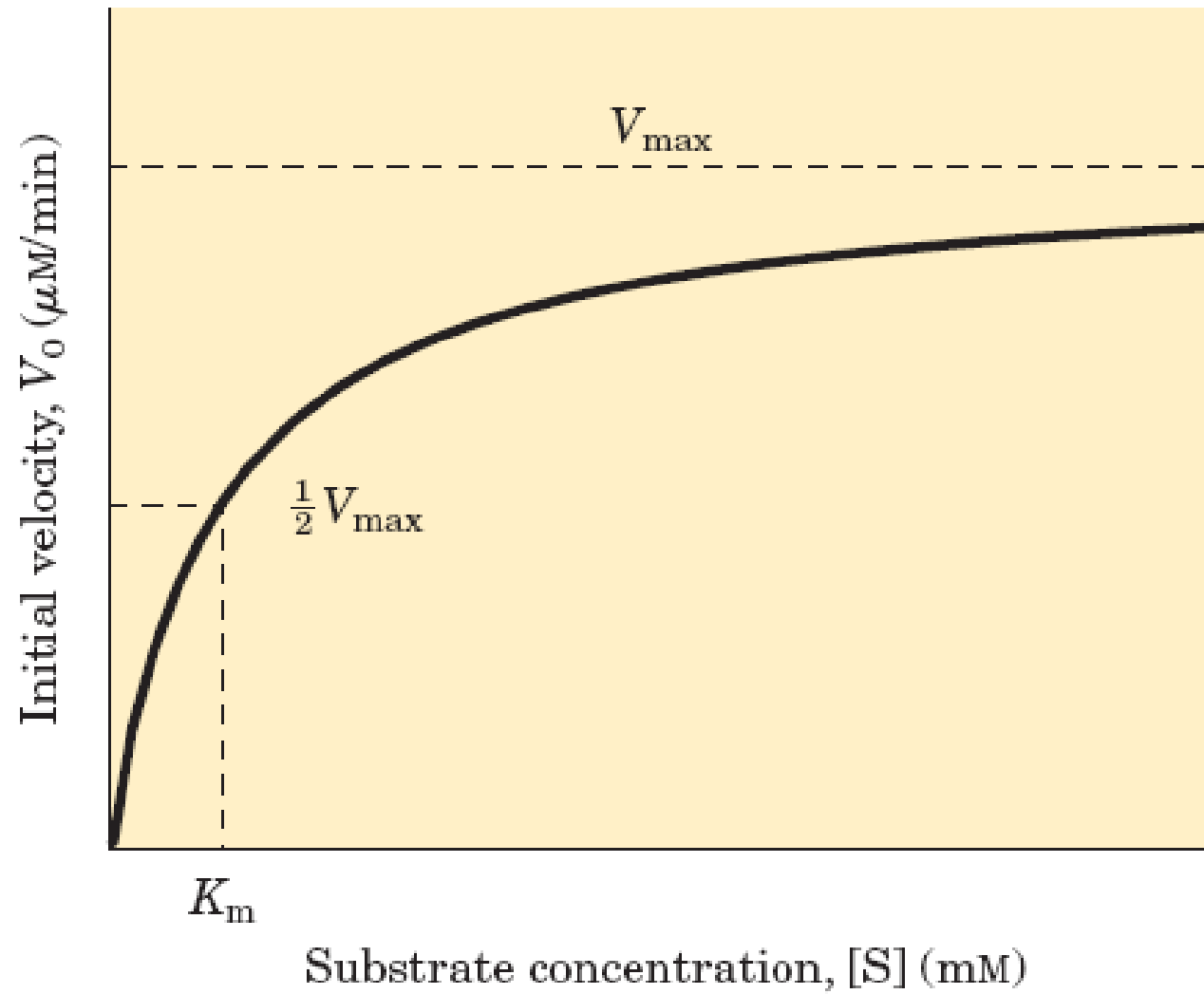
Μια απλοποιημένη προσέγγιση σε πειράματα κινητικής είναι η μέτρηση της **αρχικής ταχύτητας (V_0)**, όταν η $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του ενζύμου $[E]$.

Σε μια τυπική αντίδραση, η συγκέντρωση του ενζύμου είναι συνήθως μερικά nmoles, ενώ η συγκέντρωση του υποστρώματος μπορεί να είναι 5 – 6 τάξεις μεγέθους υψηλότερη.

Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

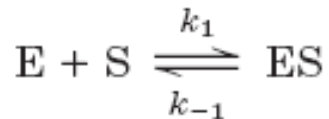
Εάν γίνει παρακολούθηση της αντίδρασης στο αρχικό στάδιο (περίπου τα πρώτα 60 s), η αλλαγή της συγκέντρωσης είναι αμελητέα κι έτσι το $[S]$ μπορεί να θεωρηθεί πρακτικά σταθερό. Τότε, η V_0 μπορεί να μελετηθεί συναρτήσει του $[S]$.

Σε σχετικά μικρές $[S]$, η V_0 αυξάνει σχεδόν γραμμικά με την αύξηση του $[S]$. Σε υψηλότερες $[S]$, η V_0 αυξάνει με όλο και πιο αργό ρυθμό καθώς αυξάνει η $[S]$. Τελικά, από ένα σημείο και μετά η αύξηση της V_0 είναι ανεπαίσθητη με την αύξηση της $[S]$. Η περιοχή αυτή του plateau της V_0 προσεγγίζει τη **μέγιστη ταχύτητα, $V_{\max}$** .

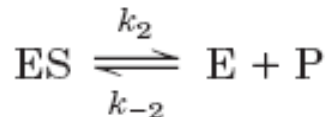


Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

Το θεωρητικό υπόβαθρο που επεξηγεί αυτή τη συμπεριφορά προϋποθέτει ότι το ένζυμο αρχικά συνδυάζεται αντιστρεπτά με το υπόστρωμα, προς τον σχηματισμό ενός συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος, σ' ένα σχετικά ταχύ, αντιστρεπτό στάδιο:



Τότε, το σύμπλοκο ES διασπάται σ' ένα δεύτερο, αργό στάδιο για να δώσει το ελεύθερο ένζυμο E και το προϊόν P:



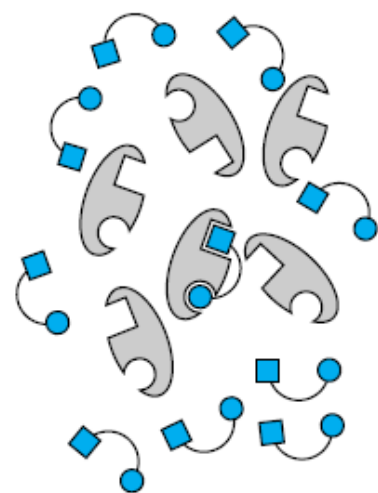
Επειδή η δεύτερη αργή αντίδραση περιορίζει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης, η συνολική ταχύτητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δεύτερου αντιδρώντος, δηλαδή του ES.

Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

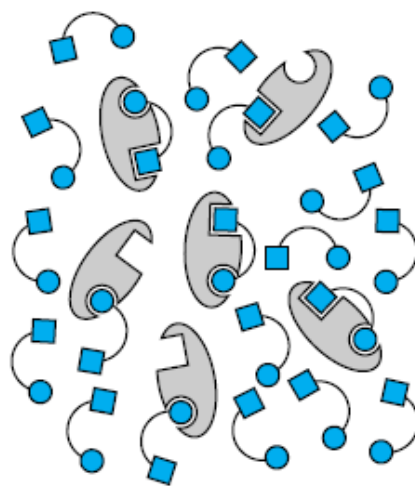
Σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, το ένζυμο υπάρχει σε δύο μορφές· μια ελεύθερη μορφή E και μια συνδυασμένη μορφή ES.

Όταν η [S] είναι χαμηλή, τα περισσότερα μόρια του ενζύμου βρίσκονται υπό τη μορφή E. Τότε, η ταχύτητα είναι ανάλογη της [S] γιατί η πρώτη προαναφερθήσα ισορροπία μετατοπίζεται προς το σχηματισμό ES καθώς αυξάνει η [S].

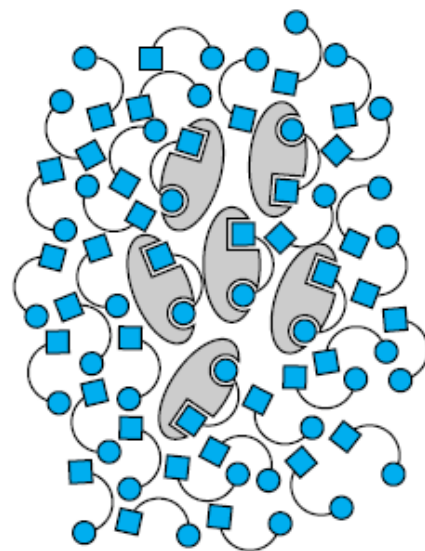
Η μέγιστη αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, V_{max} , παρατηρείται όταν ουσιαστικά όλα τα μόρια του ενζύμου έχουν σχηματίσει σύμπλοκο ES και η [E] είναι εξαιρετικά μικρή. Υπό αυτές τις συνθήκες, το ένζυμο είναι «κορεσμένο» με υπόστρωμα κι έτσι περαιτέρω αύξηση στην [S] δεν έχει καμιά επίδραση στην ταχύτητα.



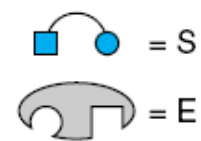
A



B



C



Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

Αυτή η κατάσταση επιτυγχάνεται όταν η $[S]$ είναι επαρκώς υψηλή, έτσι ώστε ουσιαστικά όλα τα μόρια του ενζύμου βρίσκονται υπό τη μορφή ES .

Όταν το σύμπλοκο ES διασπαστεί για να δημιουργηθεί το προϊόν P , το ένζυμο είναι ελεύθερο να καταλύσει την αντίδραση μ' ένα άλλο μόριο του υποστρώματος.

Το φαινόμενο του κορεσμού είναι ένα διακριτό χαρακτηριστικό της ενζυμικής κατάλυσης, και σ' αυτό οφείλεται το plateau που παρατηρείται στην αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης.

Ταχύτητα Ενζυμικών Αντιδράσεων: Η Επίδραση Υποστρώματος

Όταν το ένζυμο αρχικά αναμιγνύεται με μεγάλη περίσσεια υποστρώματος, υπάρχει μια αρχική περίοδος που ονομάζεται «**pre-steady state**», κατά τη διάρκεια της οποίας αυξάνει η συγκέντρωση του ES. Αυτή η περίοδος είναι πολύ μικρή για να παρατηρηθεί και διαρκεί μερικά μs .

Η αντίδραση γρήγορα επέρχεται σε κατάσταση που αναφέρεται ως «**steady state**», κατά την οποία η συγκέντρωση [ES] παραμένει σταθερή με το χρόνο.

Η μέτρηση της V_0 γενικά αντανakλά τη steady state και η μέτρηση αυτών των αρχικών ταχυτήτων αναφέρεται ως κινητική steady state.

Ποσοτικές Σχέσεις Ταχύτητας – Συγκέντρωσης Υποστρώματος

Η καμπύλη που εκφράζει τη σχέση μεταξύ $[S]$ και V_0 έχει το ίδιο γενικό σχήμα σχεδόν για όλα τα ένζυμα. Η αλγεβρική έκφραση αυτής της καμπύλης δίνεται από την **εξίσωση Michaelis – Menten**. Η εξίσωση έχει ως εξής:

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

Όλες οι παραπάνω τιμές, συμπεριλαμβανομένης και της **σταθεράς Michaelis, K_m** , μπορούν εύκολα να υπολογιστούν πειραματικά. Η εξίσωση Michaelis – Menten είναι η εξίσωση της ταχύτητας για ενζυμικές αντιδράσεις όπου το ένζυμο έχει ένα μόνο υπόστρωμα.

Η εξίσωση αυτή είναι μια ποσοτική έκφραση μεταξύ της αρχικής ταχύτητας, V_0 , της μέγιστης ταχύτητας, $V_{\max}$, και της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος, $[S]$, που σχετίζονται μέσω της σταθεράς K_m .

Ποσοτικές Σχέσεις Ταχύτητας – Συγκέντρωσης Υποστρώματος

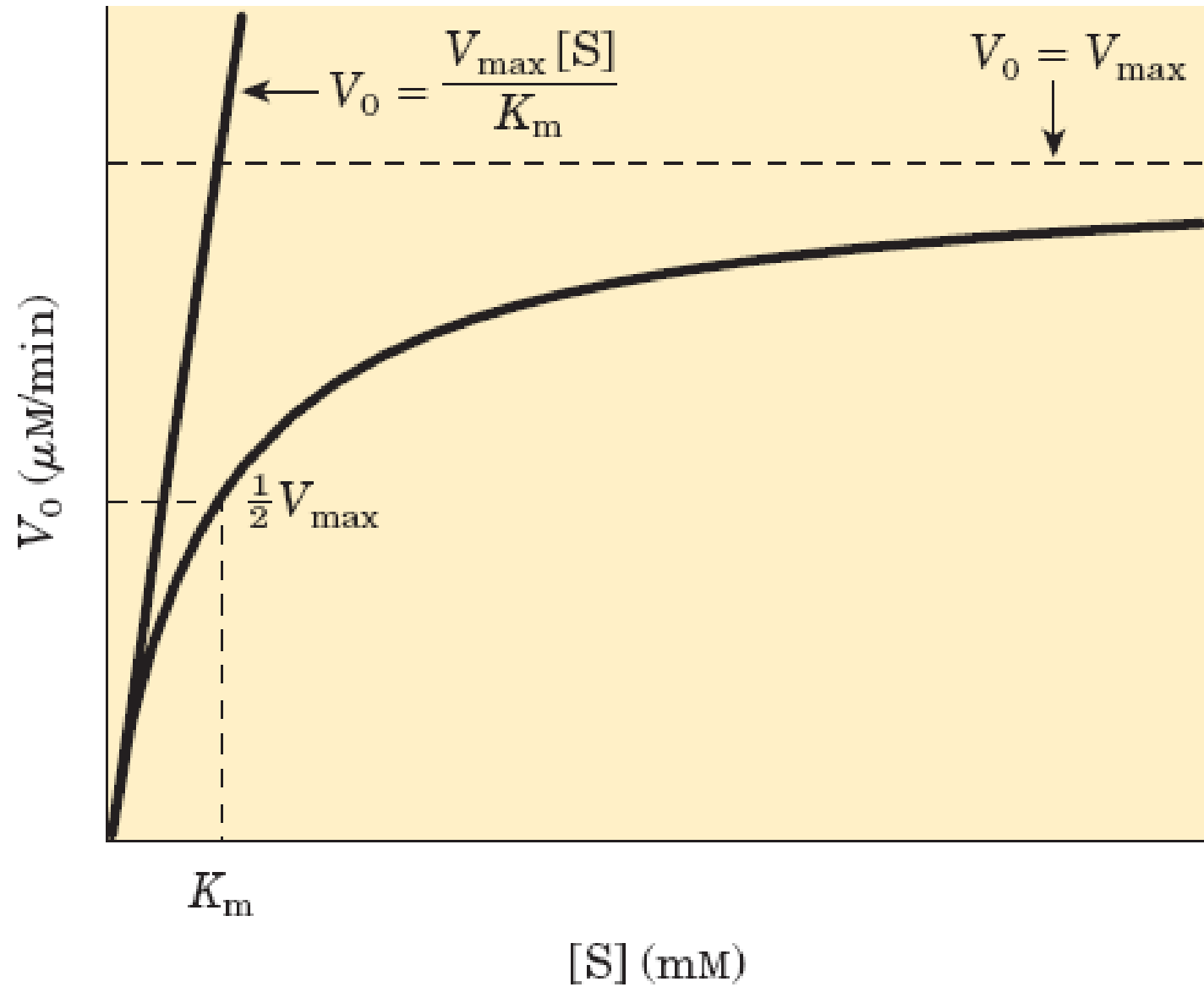
Μια σημαντική μαθηματική σχέση προκύπτει από την εξίσωση Michaelis – Menten, στη συγκεκριμένη περίπτωση που η V_0 ισούται με το μισό της $V_{\max}$. Τότε ισχύει ότι:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Η επίλυση αυτής της εξίσωσης δίνει ότι:

$$K_m = [S], \text{ when } V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$$

Η παραπάνω έκφραση είναι ένας χρήσιμος, πρακτικός ορισμός της K_m , η οποία ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όταν η V_0 ισούται με το μισό της $V_{\max}$.



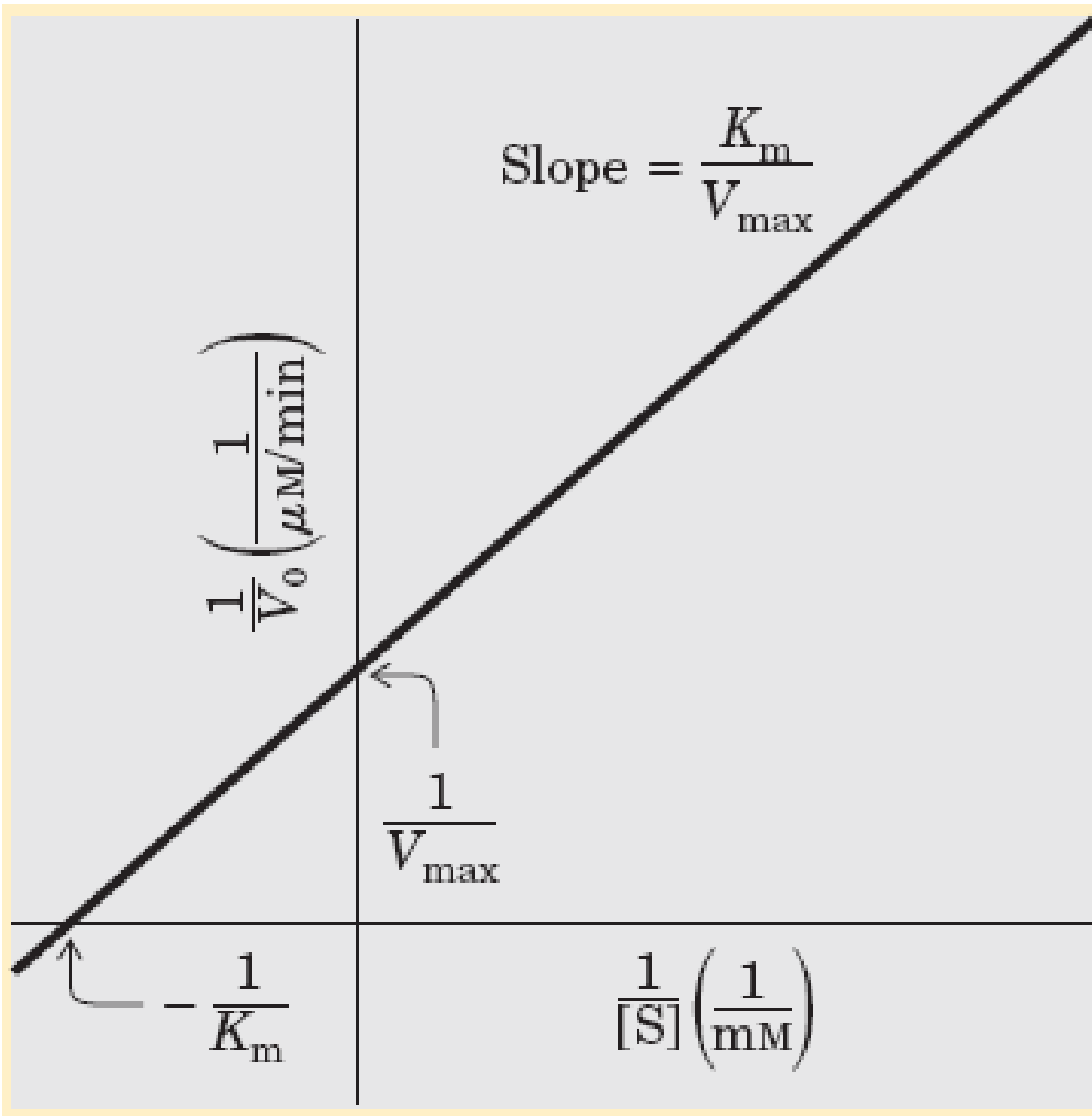
Κινητικές Παράμετροι: Εργαλεία Σύγκρισης Ενζυμικής Δραστικότητας

Σε όλα τα ένζυμα που η εξάρτηση της V_0 από το $[S]$ δίνει καμπύλη σχήματος υπερβολής ισχύει η κινητική Michaelis – Menten. Εντούτοις, η εξίσωση Michaelis – Menten δεν εξαρτάται από τον σχετικά απλό μηχανισμό αντίδρασης των δύο βημάτων.

Πολλά ένζυμα που επιδεικνύουν κινητική Michaelis – Menten έχουν αρκετά διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης και ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις με έξι ή οχτώ διακριτά βήματα συχνά επιδεικνύουν κινητική steady state.

Αν και η εξίσωση Michaelis – Menten ισχύει για πολλά ένζυμα, αμφότερα το μέγεθος και η σημασία των K_m και V_{max} μπορεί να διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο. Αυτός είναι ένας σημαντικός περιορισμός στην κινητική προσέγγιση steady state.

Οι παράμετροι K_m και V_{max} μπορούν να προσδιοριστούν σχετικά εύκολα πειραματικά για πολλά ένζυμα, αλλά δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για τον αριθμό, την ταχύτητα και τη χημική φύση των ενδιάμεσων αντιδράσεων.



Lineweaver-Burk equation.

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

Η Επεξήγηση των Παραμέτρων K_m και V_{max}

Η K_m κυμαίνεται ευρέως από ένζυμο σε ένζυμο και από υπόστρωμα σε υπόστρωμα για το ίδιο ένζυμο. Μερικές φορές ο όρος αναφέρεται ως ένας δείκτης συνάφειας ενός ενζύμου για ένα υπόστρωμα.

Η πραγματική σημασία της K_m εξαρτάται από συγκεκριμένες παραμέτρους του μηχανισμού μιας αντίδρασης, όπως ο αριθμός και οι σχετικές ταχύτητες των ξεχωριστών βημάτων. Για αντιδράσεις με δύο βήματα ισχύει ότι:

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

Αν η k_2 είναι το περιορίζων την αντίδραση βήμα, τότε η $k_2 \ll k_1$ και η K_m θα ισούται με k_{-1} / k_1 . Αυτό ορίζεται ως K_d και αντιπροσωπεύει τη **σταθερά διάστασης** του συμπλόκου ES. Υπό αυτές τις συνθήκες, η K_m αντιπροσωπεύει ένα μέτρο συνάφειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα.

Η Επεξήγηση των Παραμέτρων K_m και V_{max}

Οι παραπάνω συνθήκες δεν ισχύουν όμως για τα περισσότερα ένζυμα. Μερικές φορές ισχύει ότι $k_2 \gg k_{-1}$ και τότε $K_m = k_2 / k_1$.

Σε άλλες περιπτώσεις $k_2 \approx k_{-1}$, οπότε η K_m γίνεται πολύπλοκη σταθερά. Σ' αυτές τις περιπτώσεις ισχύει η εξίσωση Michaelis – Menten, αλλά η K_m δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μέτρο συνάφειας.

Η V_{max} επίσης μπορεί να κυμαίνεται από το ένα ένζυμο στο άλλο. Εάν το ένζυμο αντιδρά με το μηχανισμό δύο σταδίων Michaelis – Menten, τότε $V_{max} = k_2[E_t]$, όπου k_2 είναι το περιορίζον την αντίδραση βήμα και $[E_t]$ η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου, δηλαδή $[E] + [ES]$.

Εντούτοις, ο αριθμός των βημάτων της αντίδρασης και η ταυτότητα του περιορίζοντος την αντίδραση βήματος μπορεί να διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο.