



Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



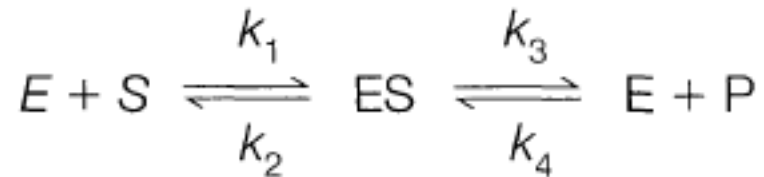
Βιοχημεία Τροφίμων (Εργαστήριο)

Ενζυμική Κινητική - Πρακτικές Εφαρμογές

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*
Αναπληρωτής Καθηγητής

Κινητικές Ιδιότητες των Ενζύμων

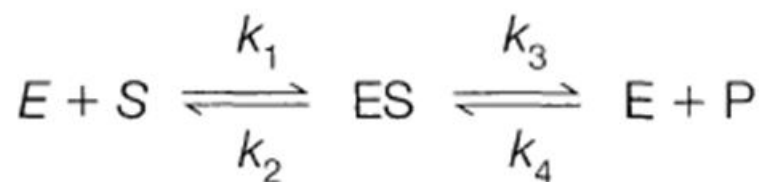
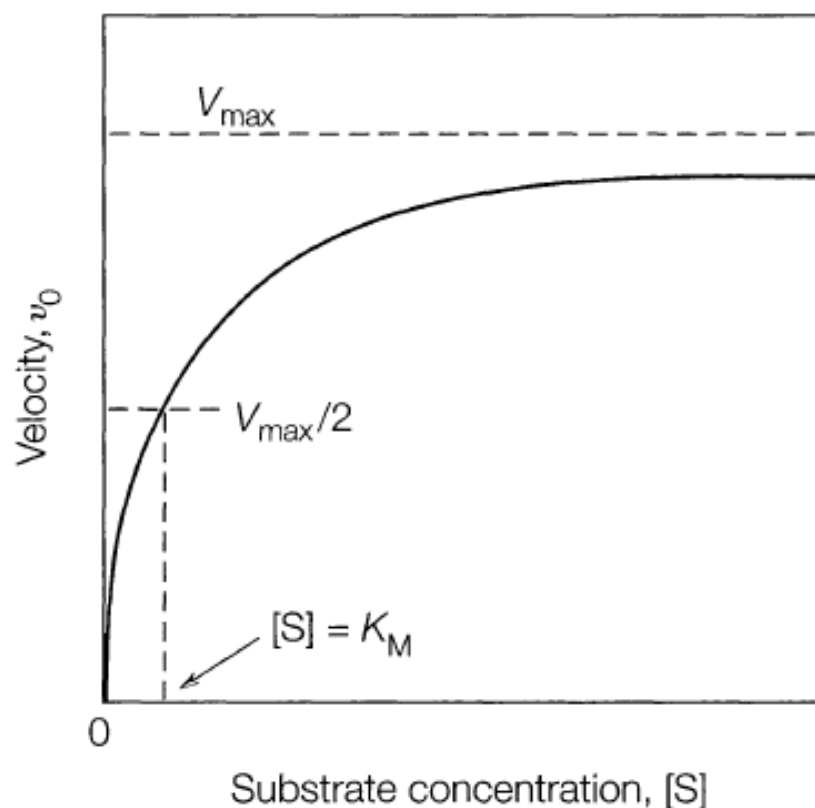
Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου ES:



Το E αντιπροσωπεύει το ένζυμο, το S το υπόστρωμα και το P το προϊόν.

Η αρχική ταχύτητα v_0 της ενζυμικής αντίδρασης κυμαίνεται με τη συγκέντρωση [S]. Η εξίσωση Michaelis – Menten περιγράφει τις κινητικές ιδιότητες των ενζύμων και η πλέον κοινή της μορφή έχει ως εξής:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$



where

v_0 = initial reaction velocity

$V_{\max}$ = maximal reaction velocity; attained when all enzyme active sites are filled with substrate molecules

$[S]$ = substrate concentration

K_M = Michaelis constant = $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Κινητικές Ιδιότητες των Ενζύμων

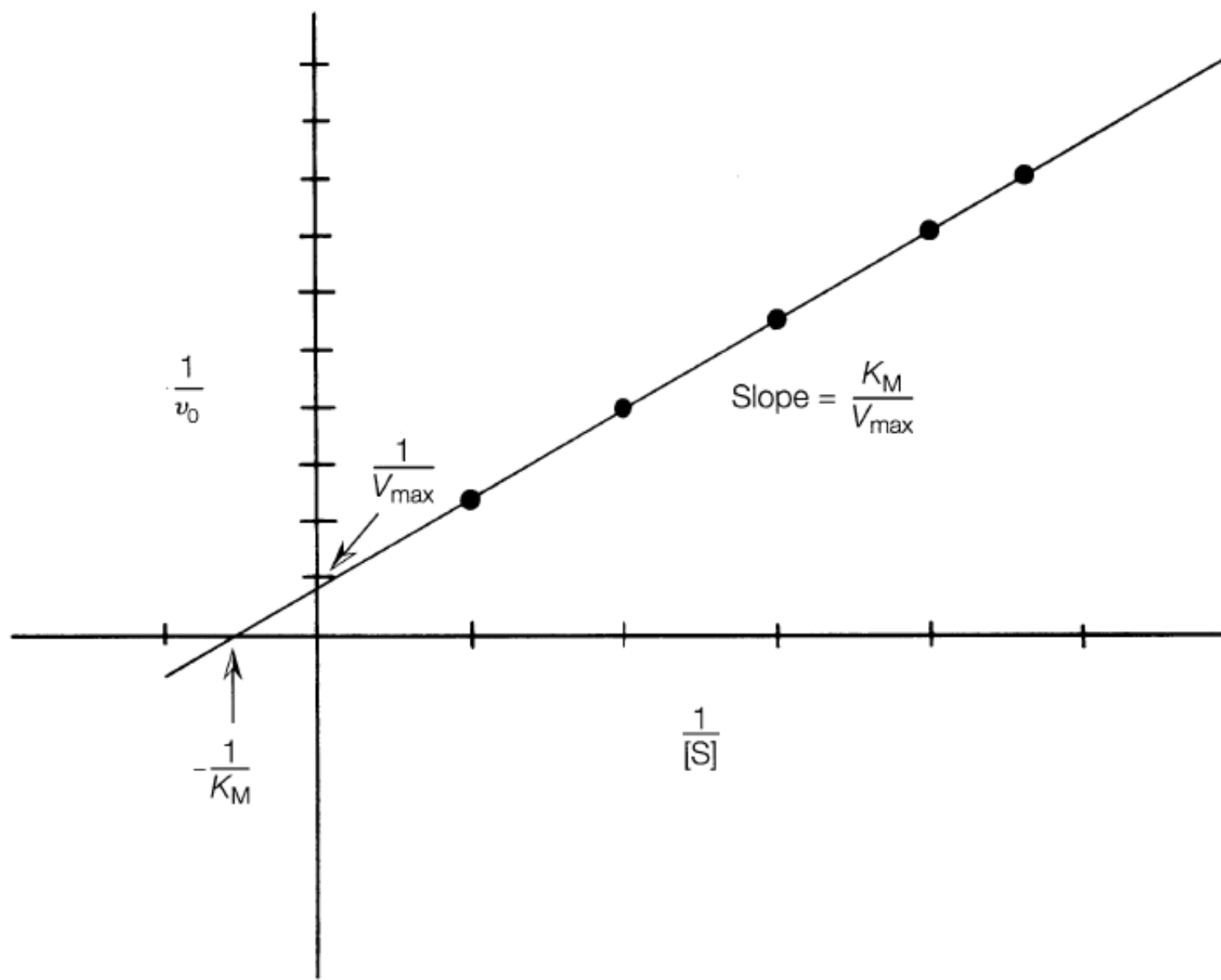
Οι σημαντικές κινητικές παράμετροι $V_{\max}$ και K_M μπορούν να προσδιοριστούν γραφικά. Η τιμή της παραμέτρου K_M αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει ταχύτητα αντίδρασης ίση με $V_{\max}/2$.

Λαμβάνοντας την αντίστροφη εξίσωση Michaelis - Menten, εξάγεται η εξίσωση Lineweaver - Burk:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Η εξίσωση αυτή είναι του τύπου $y = ax + b$ και δίνει μια ευθεία γραμμή όταν η αντίστροφες τιμές της αρχικής ταχύτητας ($1/v_0$) παρασταθούν συναρτήσει των αντίστροφων τιμών της συγκέντρωσης του υποστρώματος ($1/[S]$).

Το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα $1/v_0$ είναι η τιμή $1/V_{\max}$, ενώ η τομή στον άξονα $1/[S]$ ισούται με $-1/K_M$.



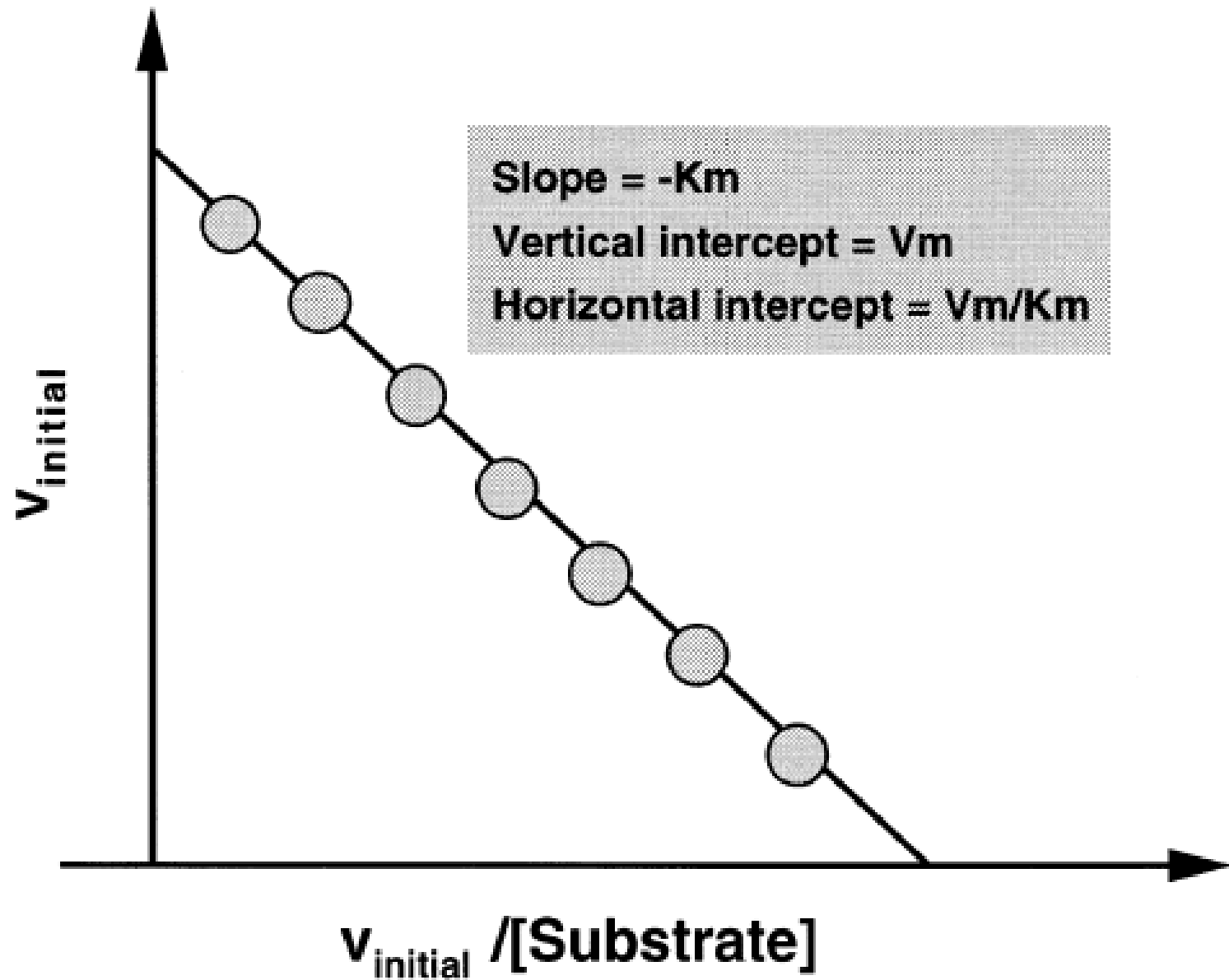
Το Διάγραμμα Eadie - Hofstee

Μετασχηματίζοντας την εξίσωση Michaelis – Menten, λαμβάνεται:

$$v = -K_m(v/[S]) + V_{\max}$$

Η προσέγγιση Eadie – Hofstee είναι μια γραφική διαδικασία, όπου η αρχική ταχύτητα ενός ενζύμου v_0 δίνεται συνάρτησε του παράγοντα $v_0/[S]$. Η v_0 τοποθετείται στον άξονα των ψ και ο παράγοντας $v_0/[S]$ στον άξονα των χ .

Το σημείο όπου η ευθεία που προκύπτει τέμνει τον άξονα των ψ είναι η $V_{\max}$ ενώ το σημείο τομής με τον άξονα των χ είναι $V_{\max}/K_m$.



Η Σημασία των Κινητικών Σταθερών

Η σταθερά Michaelis (K_M) για την αλληλεπίδραση ενζύμου – υποστρώματος έχει δύο έννοιες:

1. Η K_M είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που δίνει τιμή αρχικής ταχύτητας ίση με $V_{\max}/2$. Με άλλα λόγια, είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που καλύπτει τα μισά από τα ενεργά κέντρα των ενζυμικών μορίων.
2. Ισχύει η σχέση $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$. Αυτός ο ορισμός της K_M έχει ιδιαίτερη σημασία σε μερικές περιπτώσεις. Όταν $k_2 \gg k_3$, τότε πρακτικά $K_M = k_2/k_1$. Δηλαδή, η K_M είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES.

Όταν $k_2 \gg k_3$, τότε μεγάλη τιμή της K_M σημαίνει ασθενή αλληλεπίδραση μεταξύ E και S. Αντιθέτως, μικρή K_M υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση μεταξύ E και S.

Η Σημασία των Κινητικών Σταθερών

Η $V_{\max}$ είναι σημαντική γιατί χρησιμοποιείται στον ορισμό μιας άλλης κινητικής παραμέτρου, k_3 , η οποία ονομάζεται **αριθμός μετατροπής (turnover number)**.

Η ανάλυση της k_3 ξεκινάει με το βασικό νόμο της ταχύτητας για μια ενζυμικώς καταλυόμενη αντίδραση:

$$v_0 = k_3[ES]$$

Αν όλα τα ενεργά κέντρα των ενζυμικών μορίων είναι κορεσμένα με μόρια υποστρώματος, τότε η $[ES]$ ισοδυναμεί με την $[E]_T$, δηλαδή τη συνολική συγκέντρωση του ενζύμου και η v_0 γίνεται $V_{\max}$. Οπότε:

$$V_{\max} = k_3[E_T] \quad \text{or} \quad k_3 = \frac{V_{\max}}{[E_T]}$$

Για ένα ένζυμο ο αριθμός μετατροπής k_3 είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν από ένα μόριο ενζύμου ανά μονάδα χρόνου (συνήθως λεπτά ή δευτερόλεπτα). Ο αριθμός μετατροπής είναι ένα μέτρο της αποδοτικότητας ενός ενζύμου.

Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας

Μόρια τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματα μπορούν ν' αλληλεπιδράσουν με ένζυμα, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ενζυμική δραστικότητα.

Η μελέτη της ενζυμικής αναστολής παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί συχνά φανερώνει σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης ενός ενζύμου.

Η διαδικασία της αντιστρεπτής αναστολής μπορεί να περιγραφεί από μια αλληλεπίδραση ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα.

Οι περισσότερες διαδικασίες αναστολής μπορούν να καταταγούν είτε ως **συναγωνιστικές** ή **μη-συναγωνιστικές**, ανάλογα με το πώς ο αναστολέας αλλοιώνει την ενζυμική δράση.

Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας

Ένας **συναγωνιστικός αναστολέας** είναι συνήθως παρόμοιας δομής με το υπόστρωμα και έχει την ικανότητα της αντιστρεπτής σύνδεσης με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Εν αντιθέσει με το υπόστρωμα, το μόριο του αναστολέα δεν υπόκειται σε χημική μετατροπή σε προϊόν. Εντούτοις, παρεμβάλλεται στη σύνδεση του υποστρώματος.

Ένας **μη-συναγωνιστικός αναστολέας** δεν συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά σε κάποιο άλλο σημείο του ενζυμικού μορίου.

Αμα τη συνδέσει του μη-συναγωνιστικού αναστολέα, το ένζυμο μετατρέπεται αντιστρεπτά σε μια μη-λειτουργική διαμόρφωση και το υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να συνδεθεί στο ενεργό κέντρο, δεν μετατρέπεται σε προϊόν.

Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας

Οποιαδήποτε πλήρης μελέτη αναστολής απαιτεί την πειραματική διάκριση μεταξύ συναγωνιστικής και μη-συναγωνιστικής αναστολής. Αυτές οι δύο αναστολές είναι κινητικά διακριτές με εφαρμογή γραφήματος Lineweaver – Burk.

Για τη μελέτη της κάθε αναστολής, απαιτούνται τουλάχιστον δύο ομάδες πειραμάτων κινητικής. Σε όλες τις ομάδες, η συγκέντρωση του ενζύμου πρέπει να διατηρείται σταθερή.

Στην πρώτη ομάδα, κυμαίνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος χωρίς προσθήκη αναστολέα. Στη δεύτερη ομάδα, χρησιμοποιούνται οι ίδιες διακυμάνσεις συγκέντρωσης υποστρώματος όπως στην πρώτη ομάδα και μια σταθερή συγκέντρωση αναστολέα προστίθεται σε κάθε πείραμα.

Αυτά τα δεδομένα όταν παρασταθούν σε διάγραμμα Lineweaver – Burk οδηγούν σε ένα σύνολο ευθειών.

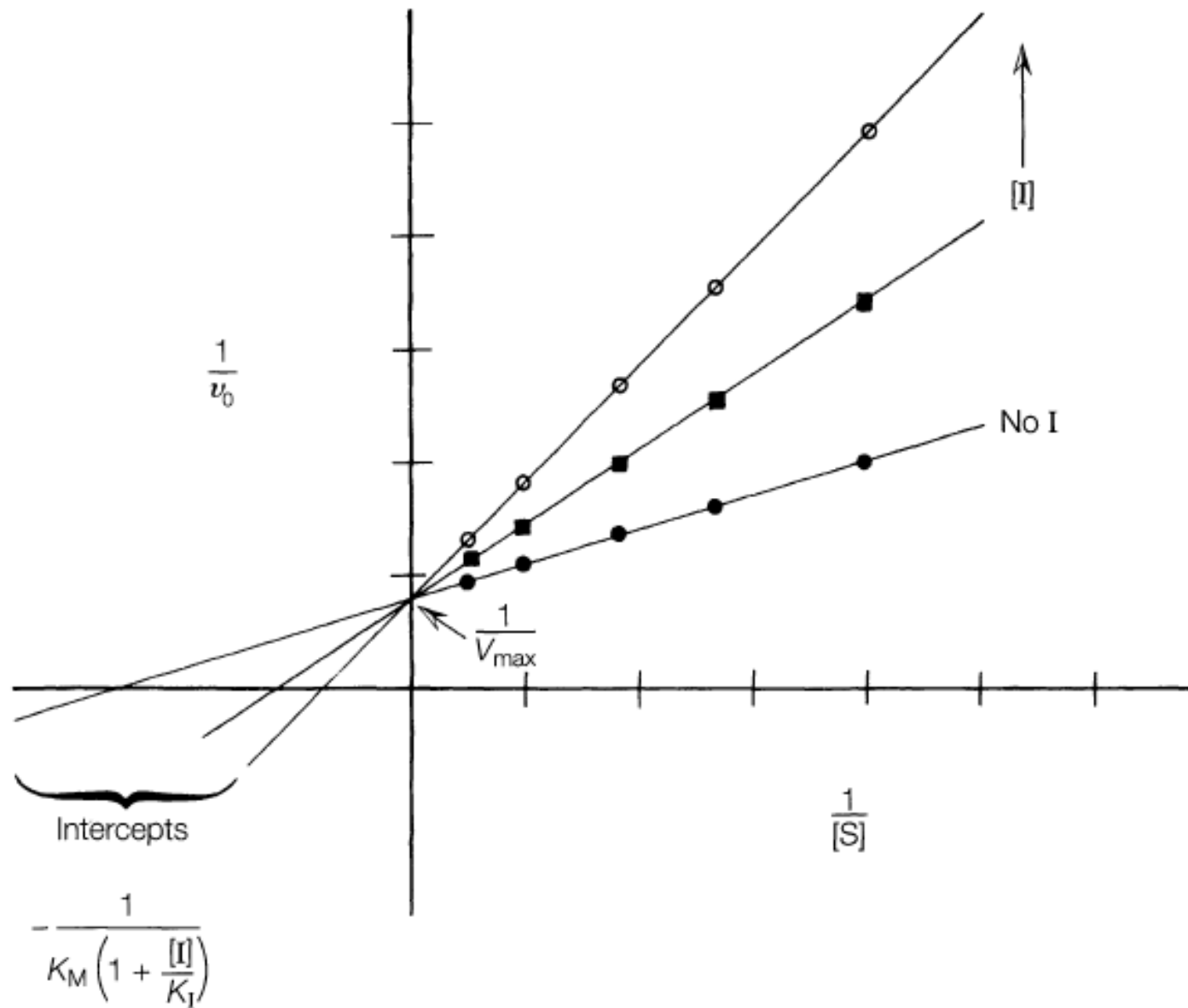
Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας

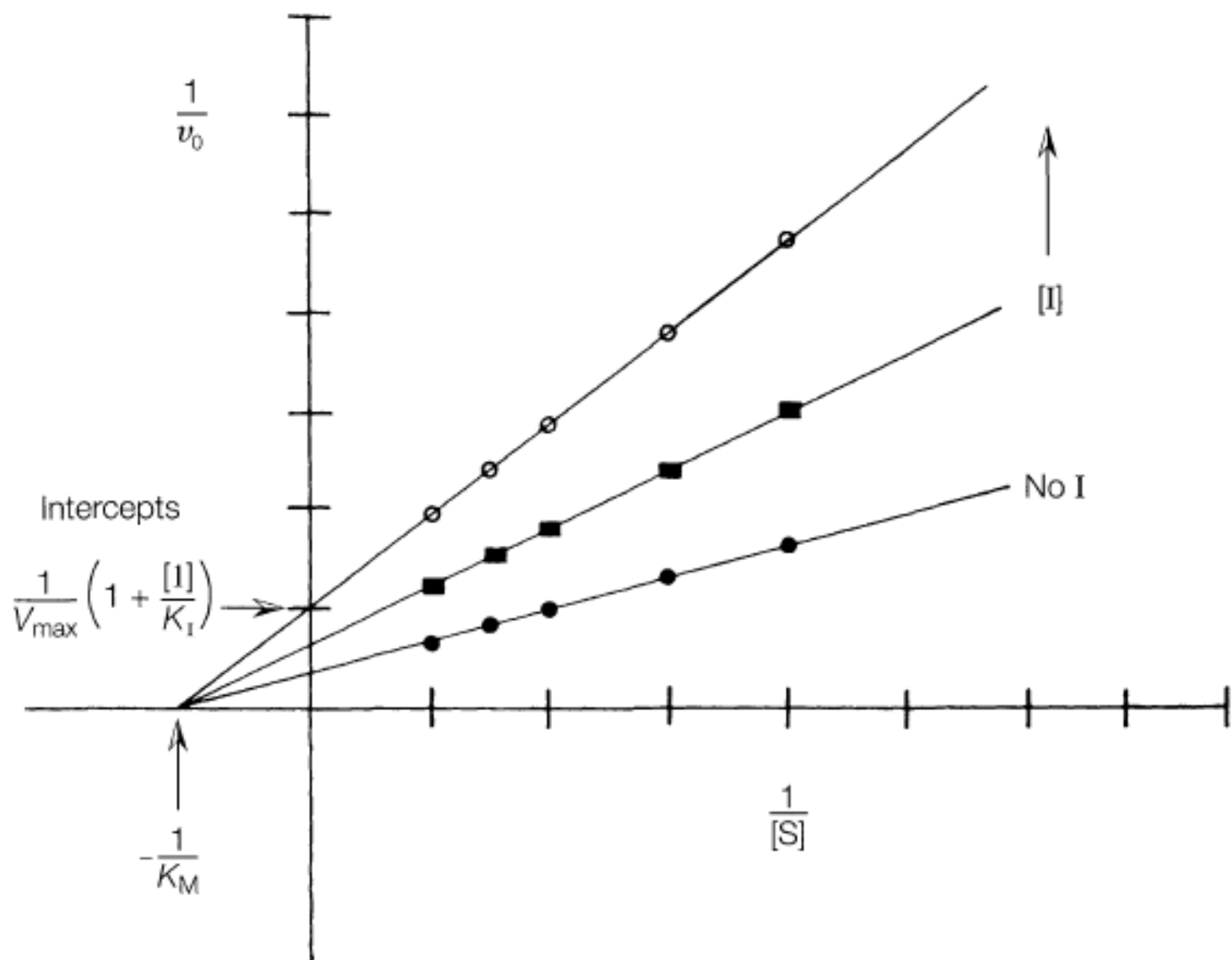
Σ' ένα διάγραμμα Lineweaver – Burk που αναπαριστά συναγωνιστική αναστολή όλες οι ευθείες τέμνονται στο ίδιο σημείο, πάνω στον άξονα $1/v_0$. Συνεπώς, η $V_{\max}$ δεν επηρεάζεται από αυτό το είδος αναστολής.

Εάν υπάρχει περίσσεια υποστρώματος, τότε η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να υπερκεραστεί. Η φαινομενική K_M (η τιμή της οποίας βρίσκεται στον άξονα $1/[S]$) μεταβάλλεται με κάθε αλλαγή στη συγκέντρωση του αναστολέα.

Η τιμή K_I είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου EI και η τιμή της είναι ενδεικτική της ισχύος με την οποία συνδέονται ένζυμο και αναστολέας. Μεγάλη τιμή K_I υποδεικνύει ασθενή αλληλεπίδραση μεταξύ E και I.

Αντιθέτως, υπό την παρουσία ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα παρατηρείται μείωση της $V_{\max}$ αλλά δεν υπάρχει μεταβολή της K_M .





Μονάδες Ενζυμικής Δραστικότητας

Η πραγματική μοριακή συγκέντρωση ενός ενζύμου σ' ένα ακατέργαστο ή μερικώς καθαρό εκχύλισμα είναι σπανίως γνωστή. Μόνο εάν το ένζυμο είναι διαθέσιμο σε καθαρή κρυσταλλική μορφή και γίνει προσεκτική παρασκευή συγκεκριμένου διαλύματος μπορεί να είναι γνωστή η συγκέντρωση.

Εντούτοις, είναι δυνατή η ανάπτυξη μιας ακριβούς και ορθής μεθοδολογίας για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας.

Η ποσότητα ενός συγκεκριμένου ενζύμου που υπάρχει σ' ένα διάλυμα εκφράζεται συχνά ως μονάδες δραστικότητας (activity units). Τρεις μονάδες χρησιμοποιούνται κοινώς· η διεθνής μονάδα (*international unit – IU*), το *katal* και η ειδική δραστικότητα (*specific activity*).

Μονάδες Ενζυμικής Δραστικότητας

Η **IU** αντιστοιχεί στην ποσότητα ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmole υποστρώματος σε προϊόν ανά min υπό καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, ιοντικής ισχύος και συγκέντρωσης υποστρώματος.

Για παράδειγμα, εάν ένα διάλυμα που περιέχει ένα ένζυμο μετατρέπει 10 μmoles υποστρώματος σε προϊόν σε 5 min, το διάλυμα περιέχει 2 ενζυμικές μονάδες (IU).

Το ένα **katal** ενζυμικής δραστικότητας αντιπροσωπεύει τη μετατροπή 1 mole υποστρώματος σε προϊόν ανά s. Μια IU είναι ισοδύναμη με $1/60 \mu\text{katal}$ ή 0.0167 μkatal . Ένα katal συνεπώς, ισοδυναμεί με 6×10^7 IU.

Είναι βολικό να εκφράζονται μικρές ποσότητες ενζύμου σε mkatals, μkatals ή nkatal. Στο παραπάνω παράδειγμα η ενζυμική δραστικότητα ήταν 2 IU και μπορεί να μετατραπεί ως εξής: αφού $1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$, τότε 2 IU ισούνται με $2/6 \times 10^7$ ή 33 nkatal ή 0.033 μkatal . Εάν το ένζυμο είναι ένα ακατέργαστο εκχύλισμα σε διάλυμα, η δραστικότητα εκφράζεται συνήθως σε μονάδες/mL (units/mL) ή katals/mL.

Μονάδες Ενζυμικής Δραστικότητας

Η ειδική δραστικότητα ενός ενζύμου είναι ο αριθμός των IU ή katals ανά mg πρωτεΐνης.

Αυτό αποτελεί ένα μέτρο καθαρότητας ενός ενζύμου. Για παράδειγμα, εάν ένα διάλυμα περιέχει 20 mg πρωτεΐνης που δίνουν 2 units (33 nkatals), η ειδική δραστικότητα του ενζύμου είναι $2 \text{ units}/20 \text{ mg} = 0.1 \text{ units/mg}$ ή $33 \text{ nkatals}/20 \text{ mg} = 1.65 \text{ nkatals / mg}$.

Όταν αυξάνει η καθαρότητα ενός ενζύμου, αυξάνει και η ειδική δραστικότητά του. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά τη διάρκεια του καθαρισμού αυξάνει η συγκέντρωση του ενζύμου σε σχέση με την ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Η μέγιστη ειδική δραστικότητα επιτυγχάνεται όταν το ένζυμο είναι στην καθαρή του μορφή.

Η δραστικότητα ενός ενζύμου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση υποστρώματος, η συγκέντρωση συμπαραγόντων, το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Οι συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται μέτρηση της δραστικότητας είναι σημαντικές και θα πρέπει να συγκεκριμενοποιούνται όταν γίνεται αναφορά σε δραστικότητα.

Πειραματικός Σχεδιασμός Μέτρησης Δραστικότητας

Είτε ένα ένζυμο λαμβάνεται σε καθαρή μορφή, είτε γίνεται καθαρισμός του από ακατέργαστο εκχύλισμα, θα πρέπει να δημιουργηθεί μια πειραματική μέθοδος για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της δραστικότητάς του.

Κατά τη διάρκεια της απομόνωσης και του καθαρισμού ενός ενζύμου, οι πειραματικές μετρήσεις είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του ενζύμου, αλλά και για τον προσδιορισμό των κινητικών του ιδιοτήτων. Όλα αυτά μπορούν επιπλέον να είναι σημαντικά και για τη μελέτη του μηχανισμού κατάλυσης.

Ο πειραματικός σχεδιασμός μέτρησης της δραστικότητας απαιτεί τη γνώση κάποιων παραμέτρων της αντίδρασης:

1. Την πλήρη στοιχειομετρία.
2. Τι ουσίες απαιτούνται (υπόστρωμα, μεταλλικά ιόντα, συμπράγοντες κτλ.) και την κινητική τους εξάρτηση.
3. Την επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος.

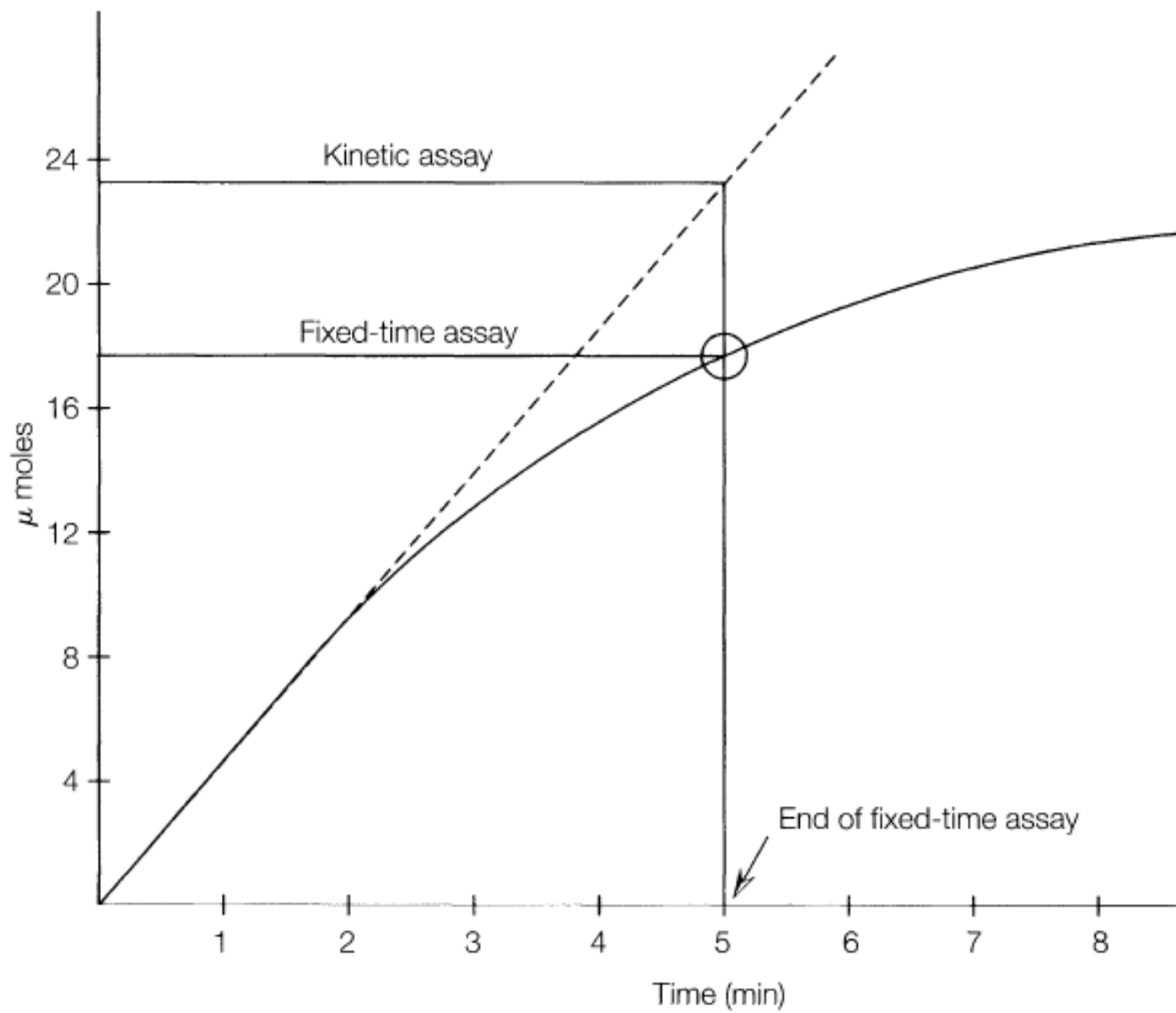
Πειραματικός Σχεδιασμός Μέτρησης Δραστικότητας

Η πλέον άμεση προσέγγιση στο σχεδιασμό μιας πειραματικής διαδικασίας μέτρησης της δραστικότητας είναι η μέτρηση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Εάν ένας πειραματικός σχεδιασμός βασίζεται σε συνεχή μέτρηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή του προϊόντος, τότε ονομάζεται **πειραματικός σχεδιασμός κινητικής (kinetic assay)**.

Εάν πραγματοποιείται μια μέτρηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή του προϊόντος μετά από ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, τότε προκύπτει **πειραματικός σχεδιασμός καθορισμένου χρόνου (fixed-time assay)**.

Ο πειραματικός σχεδιασμός κινητικής είναι πιο επιθυμητός, επειδή παρατηρείται απ' ευθείας η πορεία της αντίδρασης και μπορεί να διαπιστωθεί άμεσα οποιαδήποτε απόκλιση από τη γραμμικότητα.



Πειραματικός Σχεδιασμός Μέτρησης Δραστικότητας

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος μειώνεται με το χρόνο. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας ενός συνδυασμού παραγόντων, όπως η μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η μετουσίωση του ενζύμου ή η αναστολή του ενζύμου από το προϊόν της αντίδρασης.

Η συμπαγής γραμμή στο γράφημα αντιπροσωπεύει τη συνεχή καταγραφή της πορείας της αντίδρασης (κινητική). Η πραγματική ταχύτητα της αντίδρασης προσδιορίζεται από την κλίση της διακεκομμένης γραμμής, η οποία είναι η εφαπτομένη της συμπαγούς (πειραματικώς ληφθείσας) γραμμής. Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι η ταχύτητα είναι $5 \mu\text{moles προϊόντος}/\text{min}$.

Στο γράφημα παρουσιάζονται επίσης δεδομένα από πειραματική μέτρηση καθορισμένου χρόνου. Υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει προϊόν κατά την έναρξη της αντίδρασης, τότε αρκεί μια μέτρηση μετά από ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτή η μέτρηση φαίνεται μέσα στον κύκλο πάνω στο γράφημα. Από τη μέτρηση προκύπτει ότι η ταχύτητα είναι $16 \mu\text{moles προϊόντος}/5 \text{ min}$, δηλαδή περίπου $3 \mu\text{moles}/\text{min}$. Αυτή η ταχύτητα είναι σημαντικά μικρότερη από την προηγούμενη.

Πειραματικός Σχεδιασμός Μέτρησης Δραστικότητας

Προφανώς, ο κινητικός προσδιορισμός δίνει την πραγματική τιμή της ταχύτητας γιατί δεν εμπεριέχει το λάθος που προκύπτει εξαιτίας της απόκλισης από τη γραμμικότητα.

Το πείραμα καθορισμένου χρόνου μπορεί να βελτιωθεί αλλάζοντας τη χρονική στιγμή που λαμβάνεται η μέτρηση. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η μέτρηση μπορεί να γίνει μετά από 2 min, όταν η μεταβολή της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου είναι γραμμική.

Μόνο μετρήσεις των αρχικών ταχυτήτων δίνουν πραγματικές τιμές ταχύτητας της αντίδρασης. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν από μετουσίωση ενζύμου, μείωση της [S], αναστολή προϊόντος και μετατροπή του προϊόντος σε υπόστρωμα.

Εφαρμογές Μέτρησης Δραστικότητας

Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται σε μια μέτρηση δραστικότητας εξαρτώνται από το σκοπό της μέτρησης. Υπάρχουν δύο κύριες εφαρμογές μιας διαδικασίας μέτρησης της δραστικότητας:

- Μέτρηση της συγκέντρωσης του ενεργού ενζύμου – Σ' αυτήν την περίπτωση η μετρούμενη ταχύτητα της αντίδρασης θα πρέπει να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Δηλαδή, θα πρέπει να υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της αρχικής ταχύτητας και της συγκέντρωσης του ενζύμου (η αντίδραση είναι 1^{ης} τάξεως σε σχέση με τη συγκέντρωση του ενζύμου).

Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να υπάρχουν οι εξής προϋποθέσεις:

1. Η συγκέντρωση του υποστρώματος και των συμπαραγόντων θα πρέπει να είναι σε περίσσεια.
2. Δεν θα πρέπει να υπάρχουν αναστολείς.
3. Το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς θα πρέπει να είναι ρυθμισμένα.

Εφαρμογές Μέτρησης Δραστικότητας

Υπό αυτές τις συνθήκες, ένα γράφημα της ενζυμικής δραστικότητας (μmoles παραγόμενου προϊόντος/ min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενζύμου δίνει ευθεία γραμμή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του ενεργού ενζύμου.

- Μέτρηση των κινητικών παραμέτρων V_{max} , K_M και χαρακτηριστικών αναστολής
– Σ' αυτήν την περίπτωση πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Εάν πρέπει να προσδιοριστεί η K_M για ένα υπόστρωμα, θα πρέπει οι πειραματικές συνθήκες να είναι τέτοιες, ώστε η μετρούμενη αρχική ταχύτητα να είναι 1^{ης} τάξεως σε σχέση με το υπόστρωμα.

Για να προσδιοριστεί η K_M , σταθερές συγκεντρώσεις ενζύμου επωάζονται με κυμαινόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Με βάση τις μετρήσεις που θα προκύψουν, δημιουργείται ένα γράφημα Lineweaver – Burk ($1/v_0$ συναρτήσει $1/[S]$) και υπολογίζονται γραφικά οι τιμές K_M και V_{max} .

Εφαρμογές Μέτρησης Δραστικότητας

Εάν η αντίδραση εμπλέκει δύο ή περισσότερα υποστρώματα, το καθένα θα πρέπει να εξεταστεί ξεχωριστά. Σ' αυτήν την περίπτωση κυμαίνεται η συγκέντρωση του ενός υποστρώματος, ενώ η συγκέντρωση του άλλου ή των άλλων υποστρωμάτων διατηρείται σταθερή σε συνθήκες κορεσμού.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και στην περίπτωση μελέτης της κινητικής εξάρτησης από συμπαράγοντες. Δηλαδή, η συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος διατηρείται σταθερή και μεταβάλλεται μόνο η συγκέντρωση του συμπαράγοντα.

Όσον αφορά στη μελέτη αναστολής, για τον προσδιορισμό της K_I χρησιμοποιούνται επίσης ίδιες συνθήκες, όπως και στην περίπτωση προσδιορισμού των παραμέτρων K_M και V_{max} . Ένα σταθερό επίπεδο αναστολέα χρησιμοποιείται σε κάθε πείραμα, αλλά μεταβάλλεται η συγκέντρωση υποστρώματος, όπως και για τον προσδιορισμό της K_M .

Εν κατακλείδι, η μελέτη της ενζυμικής κινητικής προσεγγίζεται μετρώντας αρχικές ταχύτητες υπό συνθήκες όπου μόνο ένας παράγοντας (υπόστρωμα, ένζυμο, συμπαράγοντας κτλ) μεταβάλλεται, ενώ όλοι οι άλλοι παραμένουν σταθεροί.