



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής
Πανεπιστήμιο Αιγαίου (Λήμνος)

Βιοχημεία Τροφίμων

Μέρος Ι: Ενζυμολογία

Ακαδημαϊκό Έτος 2014 - 2015

Ενότητα 2^η
Ενζυμική Κινητική



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*
Επικουρος Καθηγητής

Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό διατίθεται με τους όρους χρήσης Creative Commons (CC) - Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Όχι Παράγωγα Έργα.

Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, διαγράμματα, κείμενα, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.

Το έργο «Ανοιχτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αιγαίου» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.

Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

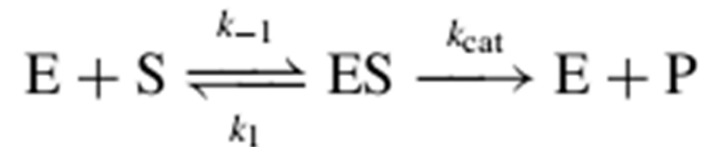
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Μοντέλα Κατάλυσης: Ισορροπία και Σταθεροποιημένη Κατάσταση

Μια ενζυμική αντίδραση μοντελοποιείται συνήθως ως μια διεργασία δύο βημάτων· δέσμευση του υποστρώματος (S) από το ένζυμο (E), δημιουργία συμπλόκου ενζύμου - υποστρώματος (ES) και μη-αντιστρεπτή διάσπαση αυτού του συμπλόκου που απελευθερώνει το ένζυμο και το προϊόν (P):



Η κύρια υπόθεση που γίνεται στο **μοντέλο σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state model)** είναι ότι η συγκέντρωση του συμπλόκου ένζυμο - υπόστρωμα παραμένει σταθερή με το χρόνο (δηλαδή $d[ES]/dt = 0$).

Μοντέλα Κατάλυσης: Ισορροπία και Σταθεροποιημένη Κατάσταση

Έτσι, η διαφορική εξίσωση που περιγράφει τις μεταβολές της συγκέντρωσης του συμπλόκου ES σε σχέση με το χρόνο, ισούται με 0:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

Η διασκευή της παραπάνω εξίσωσης δίνει την έκφραση της σταθεράς Michaelis, K_m :

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

Η K_m είναι ισοδύναμη με τη σταθερά διάστασης K_S του συμπλόκου ES, μόνο στην περίπτωση όπου $k_{-1} \gg k_2$, οπότε $K_m = k_{-1}/k_1$. Η σταθερά Michaelis K_m αντιστοιχεί σε συγκέντρωση υποστρώματος για $V_{max}/2$.

Μοντέλα Κατάλυσης: Ισορροπία και Σταθεροποιημένη Κατάσταση

Το περιοριστικό βήμα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι η διάσπαση του συμπλόκου ES. Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί συνεπώς να εκφραστεί ως:

$$v = k_{\text{cat}}[\text{ES}]$$

Η αντικατάσταση της $[\text{ES}]$ με $[\text{E}][\text{S}]/K_m$ και η εισαγωγή στην εξίσωση ταχύτητας της συνολικής συγκέντρωσης του ενζύμου $[\text{E}_T] = [\text{E}] + [\text{ES}]$, δίνει:

$$\frac{v}{[\text{E}_T]} = \frac{k_{\text{cat}}([\text{E}][\text{S}]/K_m)}{[\text{E}] + [\text{E}][\text{S}]/K_m}$$

Διαιρώντας αμφότερους τον αριθμητή και τον παρονομαστή με $[\text{E}]$ και πολλαπλασιάζοντας με K_m , καθώς και αντικαθιστώντας $k_{\text{cat}}[\text{E}_T]$ με V_{max} , λαμβάνεται η έκφραση:

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

Διαγράμματα Ταχύτητας (v) συναρτήσει Συγκέντρωσης Υποστρώματος [S]

Το γενικό σχήμα μιας καμπύλης ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος είναι αυτό μιας ορθογώνιας υπερβολής.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σ' αυτήν την περιοχή, η ενζυμική ταχύτητα είναι 1^{ης} τάξεως σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος.

Στην περίπτωση όπου $[S] \ll K_m$, ισχύει ότι:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E_T][S] = \frac{V_{max}}{K_m} [S]$$

Όπου k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$) είναι η σταθερά 2^{ης} τάξεως για την αντίδραση, ενώ V_{max}/K_m (s^{-1}) είναι η σταθερά 1^{ης} τάξεως για την αντίδραση. Ο λόγος k_{cat}/K_m για πολλά ένζυμα κυμαίνεται μεταξύ 10^8 έως $10^9 M^{-1} s^{-1}$.

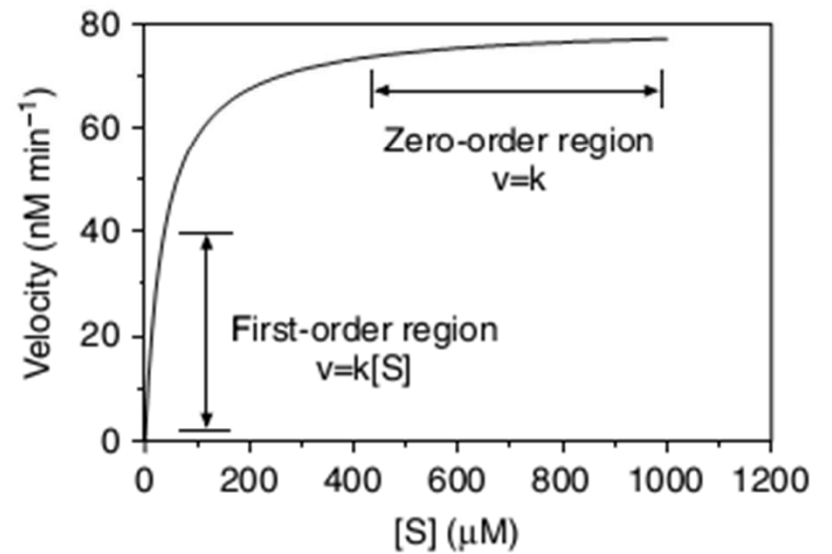
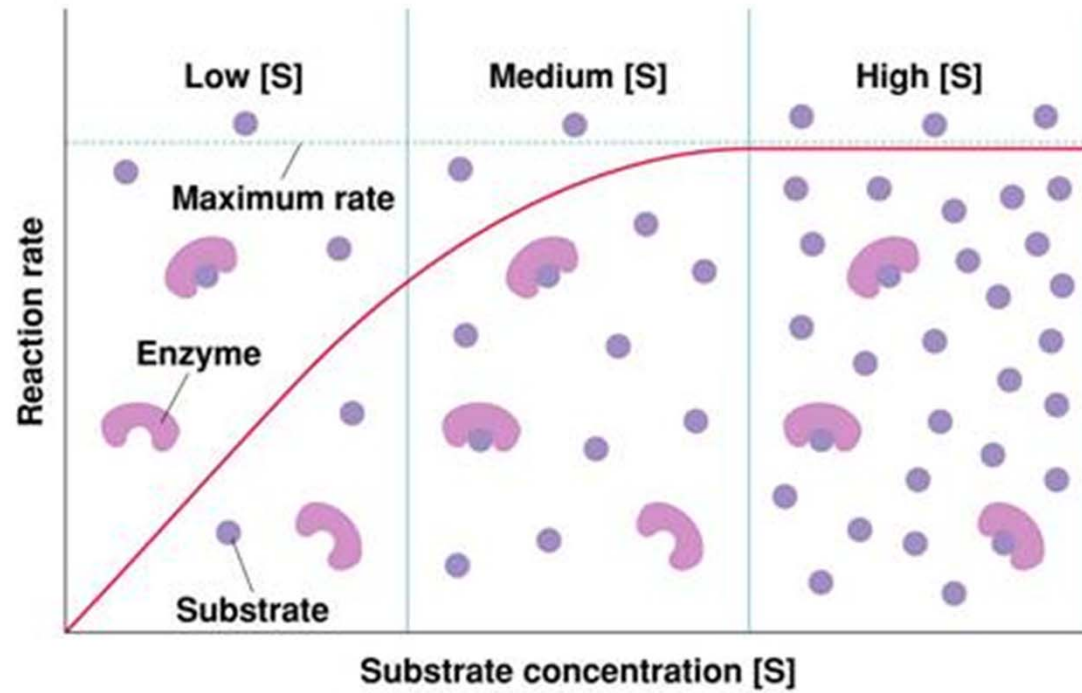
Διαγράμματα Ταχύτητας (v) Συναρτήσεως Συγκέντρωσης Υποστρώματος $[S]$

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα της αντίδρασης παραμένει πρακτικά σταθερή και ουσιαστικά ανεπηρέαστη από μεταβολές στη συγκέντρωση.

Σ' αυτήν την περιοχή η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μηδενικής τάξεως σε σχέση με το υπόστρωμα. Σε περίπτωση που $[S] \gg K_m$, τότε ισχύει ότι:

$$v = k_{\text{cat}}[E_T] = V_{\text{max}}$$

Η τιμή της K_m κυμαίνεται ευρέως για τα περισσότερα ένζυμα, αλλά βρίσκεται συνήθως μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} M. Η τιμή της K_m εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος και περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH, η θερμοκρασία, ή ιοντική ισχύς και η πολικότητα.



Διαγράμματα Ταχύτητας (v) Συναρτήσεως Συγκέντρωσης Υποστρώματος [S]

Η K_m αντιστοιχεί σε συγκέντρωση υποστρώματος που δίνει ταχύτητα αντίδρασης ίσης με $V_{max}/2$. Όμως, όπως έχει ήδη ειπωθεί, η K_m ισούται με την σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ES, μόνο όταν η διάσπαση του συμπλόκου ES συμβαίνει σε πολύ χαμηλότερη ταχύτητα απ' ό,τι η δέσμευση του υποστρώματος από το ένζυμο.

Δηλαδή, όταν $k_{-1} \gg k_2$, τότε ισχύει:

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

Υπό αυτές τις συνθήκες, η K_m είναι ένα μέτρο της ισχύος του συμπλόκου ES ή αλλιώς ένα μέτρο συνάφειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα.

Η k_{cat} ονομάζεται και **μοριακή δραστηριότητα (molecular activity)** ή **αριθμός μετατροπής (turnover number)** και αντιπροσωπεύει στον αριθμό των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν από ένα μόριο ενζύμου, ανά μονάδα χρόνου, όταν το ένζυμο βρίσκεται σε συνθήκες κορεσμού.

Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου

Η εξίσωση Michaelis - Menten μπορεί να τροποποιηθεί αλγεβρικά σε εξισώσεις που είναι πιο εύχρηστες στην επεξεργασία των δεδομένων. Μια κοινή τροποποίηση προέρχεται από την αντιστροφή και των δύο μελών της εξίσωσης:

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

Ο διαχωρισμός των συντελεστών στον αριθμητή δίνει:

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

Αυτή η εξίσωση απλοποιείται ως εξής:

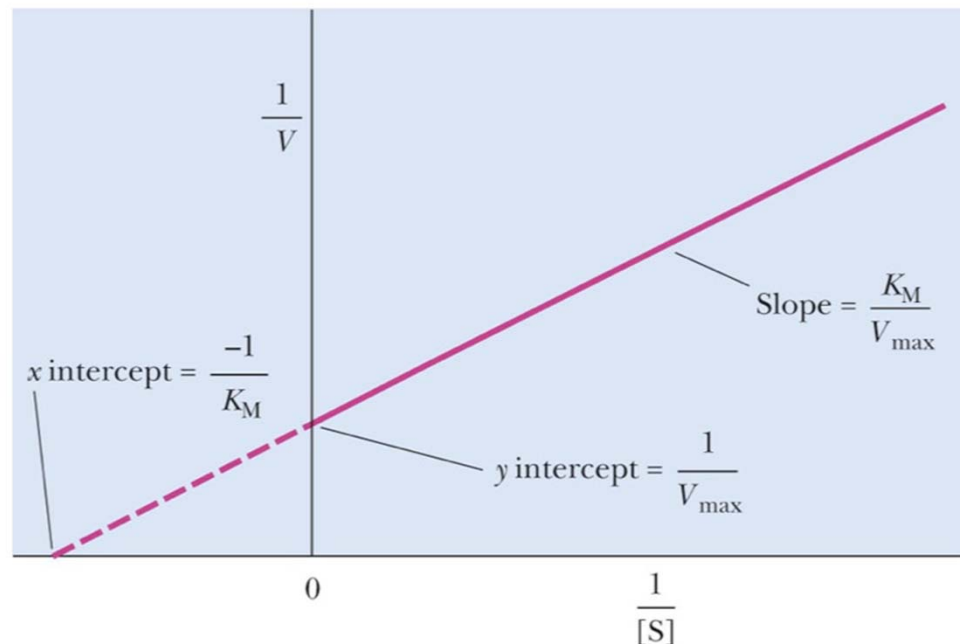
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Αυτή η μορφή της εξίσωσης ονομάζεται **εξίσωση Lineweaver - Burk**.

Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Για τα ένζυμα που ακολουθούν κινητική Michaelis - Menten, ένα διάγραμμα $1/v_0$ συναρτήσει $1/[S]$ δίνει ευθεία γραμμή. Η κλίση της ευθείας ισούται με K_m/V_{max} , το σημείο τομής στον άξονα $1/v_0$ ισούται με $1/V_{max}$ και το σημείο τομής στον άξονα $1/[S]$ ισούται με $-1/K_m$.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$



Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Η ολοκληρωμένη μορφή Michaelis - Menten

Θεωρητικώς, είναι εφικτό να υπολογιστούν οι τιμές K_m και V_{max} ενός ενζύμου από μια απλή καμπύλη εξέλιξης. Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί από την εξαφάνιση του υποστρώματος ($-d[S]/dt$) ή την εμφάνιση του προϊόντος ($-d[P]/dt$), συναρτήσει του χρόνου.

Εάν γίνει μέτρηση εξαφάνισης υποστρώματος, το μοντέλο Michaelis - Menten μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Εάν πολλαπλασιαστεί ο αριθμητής και ο παρονομαστής και στις δύο πλευρές της εξίσωσης με τον συντελεστή $K_m + [S]$ και διαιρεθεί με $[S]$ και γίνει ολοκλήρωση με συνθήκες $[S] = [S_0]$ σε χρόνο $t = 0$ και $[S] = [S_t]$ σε χρόνο t , τότε λαμβάνεται:

$$-K_m \int_{S_0}^S \frac{d[S]}{[S]} - \int_{S_0}^S d[S] = V_{\max} \int_0^t dt$$

Η ολοκληρωμένη μορφή του μοντέλου Michaelis - Menten είναι:

$$K_m \ln \frac{[S_0]}{[S_t]} + [S_0 - S_t] = V_{\max} t$$

Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Εάν η παραπάνω σχέση διαιρεθεί και στις δύο πλευρές με t και K_m και διασκευαστεί, λαμβάνεται:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S_t]} = -\frac{[S_0 - S_t]}{K_m t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

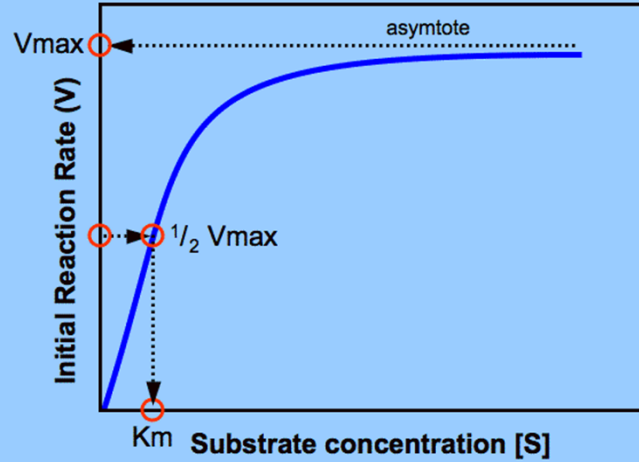
Ένα διάγραμμα $\{\ln([S_0]/[S_t])\}/t$ συναρτήσει $[S_0 - S_t]/t$ δίνει ευθεία γραμμή με κλίση ίση με $-1/K_m$, τομή στον άξονα των x ίση με V_{\max} και τομή στον άξονα των y ίση με V_{\max}/K_m .

Το κύριο πρόβλημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι θα πρέπει να υπάρχουν οι εξής συνθήκες:

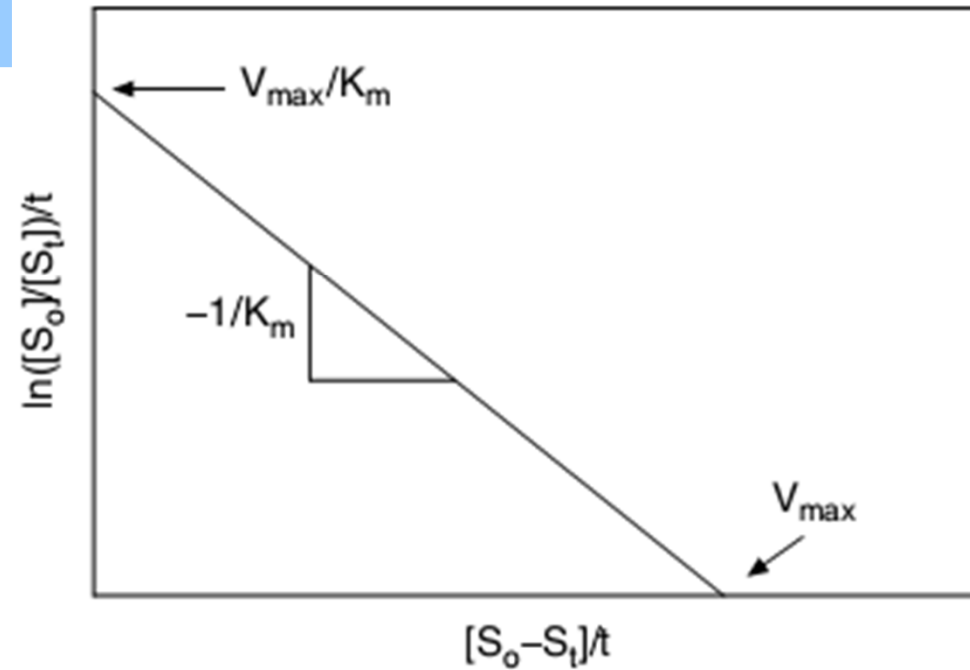
1. Το ένζυμο είναι σταθερό κατά τη διάρκεια των μετρήσεων όπου προσδιορίζονται οι ταχύτητες της αντίδρασης.
2. Η αντίστροφη αντίδραση (προϊόν σε υπόστρωμα) θα πρέπει να είναι αμελητέα.
3. Το προϊόν δεν πρέπει να προκαλεί αναστολή του ενζύμου.

Michaelis Menten Plot

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



$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S_t]} = -\frac{[S_0 - S_t]}{K_m t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$



Μετατροπές της Εξίσωσης Michaelis - Menten

Η μέθοδος Eadie - Hofstee

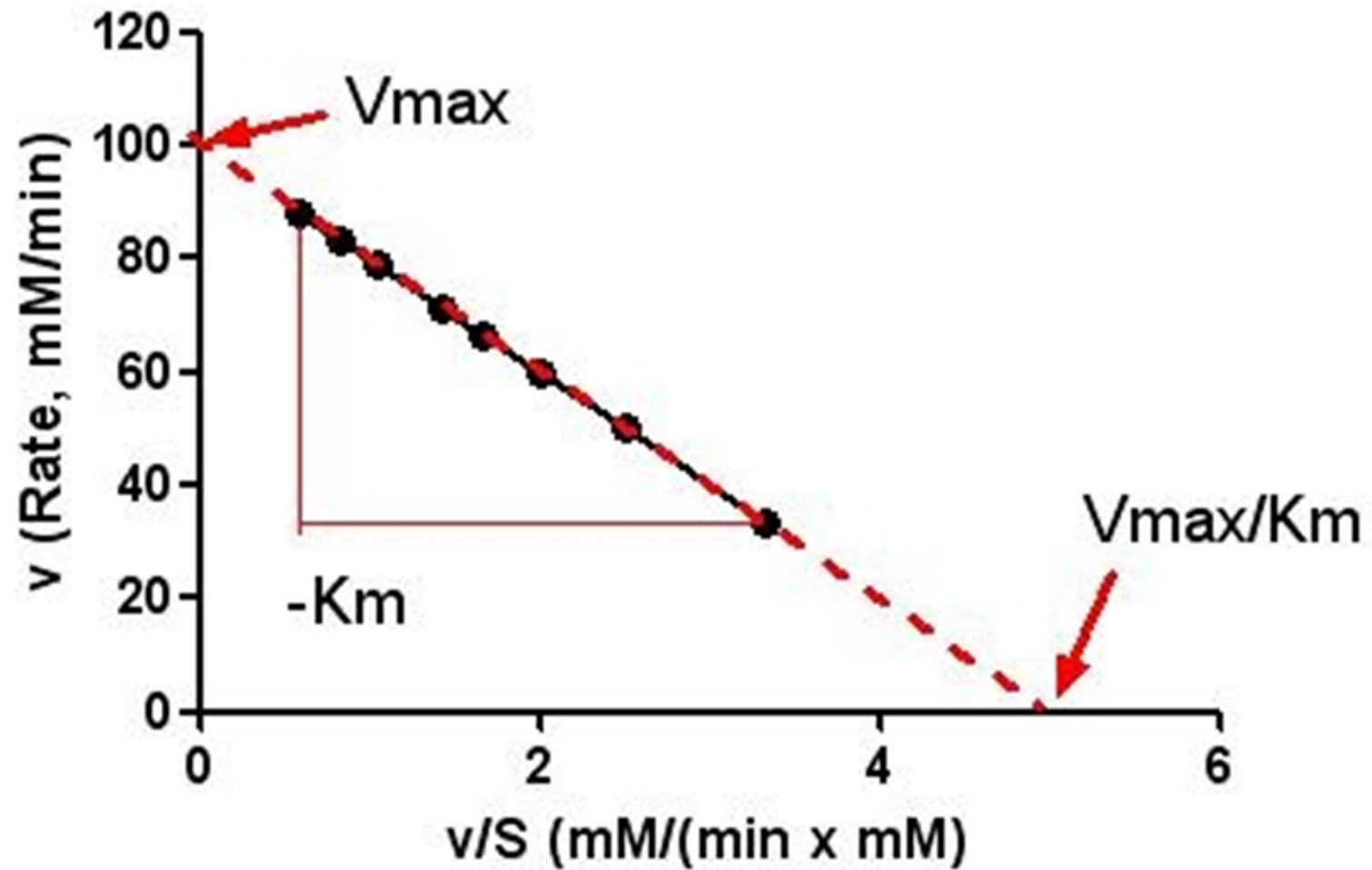
Η εξίσωση Michaelis - Menten μπορεί να τροποποιηθεί αλγεβρικά στην έκφραση:

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

Με βάση αυτήν την εξίσωση μπορεί να δημιουργηθεί ένα διάγραμμα που θα έχει στον άξονα των ψ τις τιμές αρχικής ταχύτητας (v) και στον άξονα των χ τις τιμές $v/[S]$.

Αυτό το διάγραμμα δίνει ευθεία γραμμή με σημείο τομής στον άξονα των ψ ίσο με V_{\max} και κλίση ίση με $-K_m$.

Eadie-Hofstee Plot



Ενζυμικές Αντιδράσεις με Δύο ή Περισσότερα Υποστρώματα

Στις περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις, δύο ή περισσότερα υποστρώματα δεσμεύονται από το ένζυμο και συμμετέχουν στην αντίδραση. Για παράδειγμα, στην αντίδραση που καταλύεται από την εξοκινάση, ATP και γλυκόζη είναι τα υποστρώματα και ADP και 6-φωσφορική γλυκόζη τα προϊόντα:



Οι ταχύτητες αυτών των αντιδράσεων δύο υποστρωμάτων μπορούν επίσης ν' αναλυθούν με την προσέγγιση Michaelis - Menten. Η εξοκινάση έχει χαρακτηριστικές K_m για το καθένα από τα υποστρώματά της.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις δύο υποστρωμάτων συνήθως εμπλέκουν μεταφορά ενός ατόμου ή μιας λειτουργικής ομάδας από το ένα υπόστρωμα στο άλλο. Αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω διαφόρων οδών.

Ενζυμικές Αντιδράσεις με Δύο ή Περισσότερα Υποστρώματα

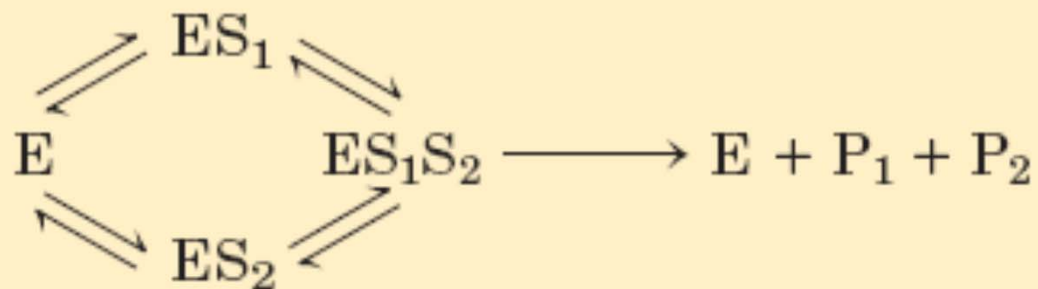
Σε μερικές περιπτώσεις και τα δύο υποστρώματα ενώνονται με το ένζυμο ταυτόχρονα σε κάποιο χρονικό σημείο της αντίδρασης, σχηματίζοντας ένα μη-ομοιοπολικό τριπλό σύμπλοκο.

Τα υποστρώματα μπορεί να ενώνονται με το ένζυμο σε τυχαία ή διατεταγμένη σειρά. Σε άλλες περιπτώσεις, το πρώτο υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν και απελευθερώνεται πριν ενωθεί το δεύτερο υπόστρωμα.

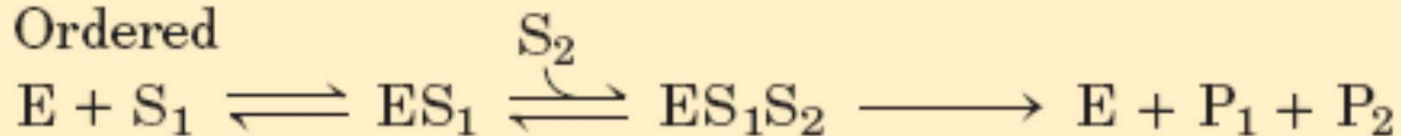
Έτσι, δεν σχηματίζεται τριπλό σύμπλοκο. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο μηχανισμός «ping - pong» ή αλλιώς «μηχανισμός διπλής εκτόπισης».

(a) Enzyme reaction involving a ternary complex

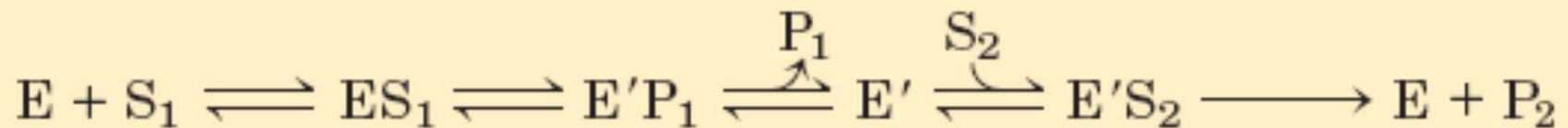
Random order



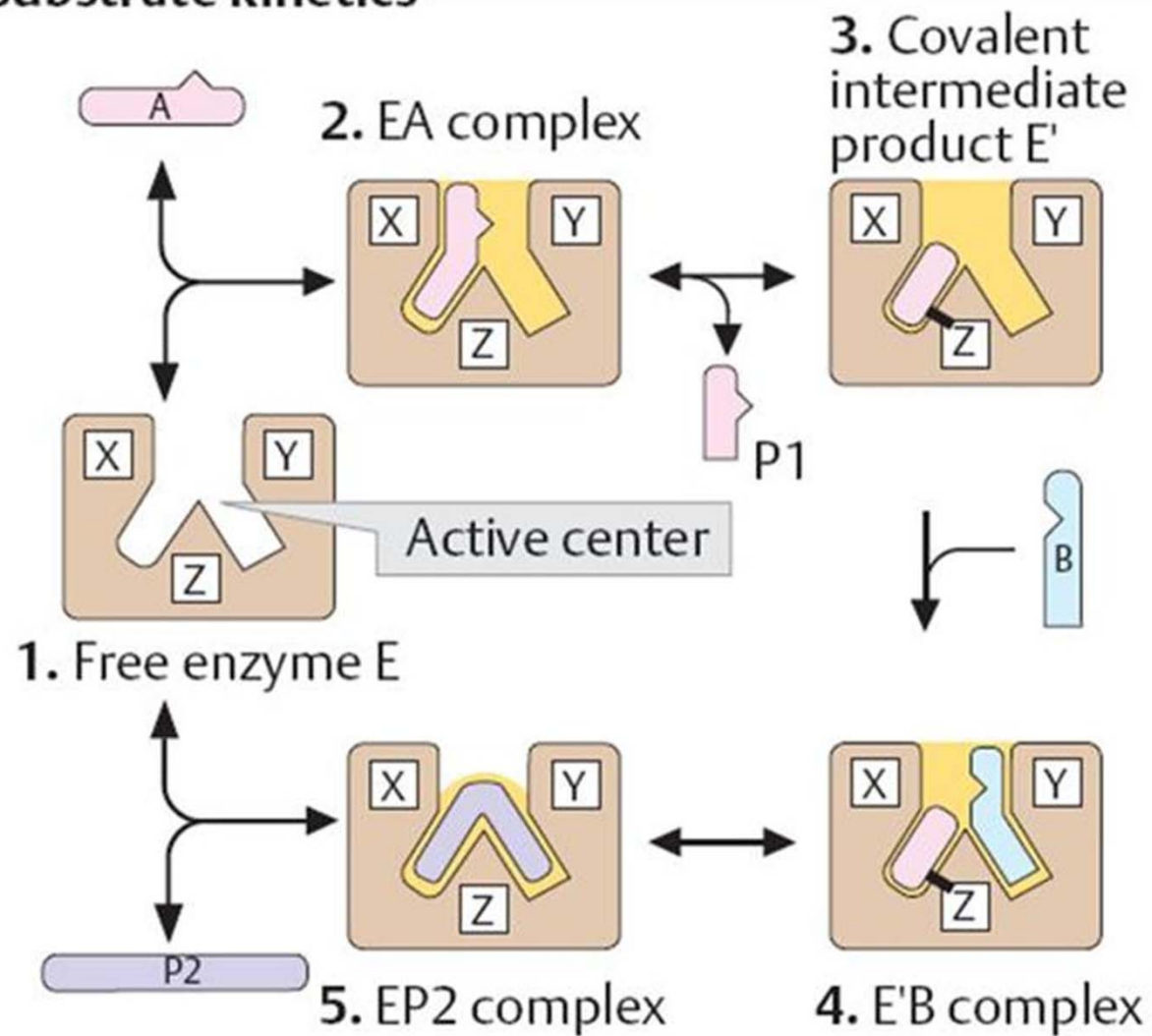
Ordered



(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed



Bisubstrate kinetics



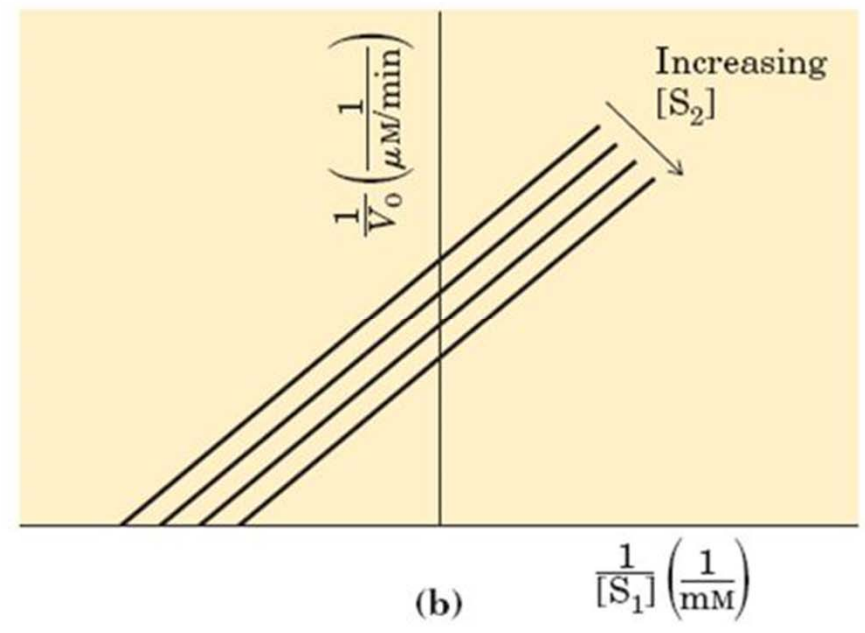
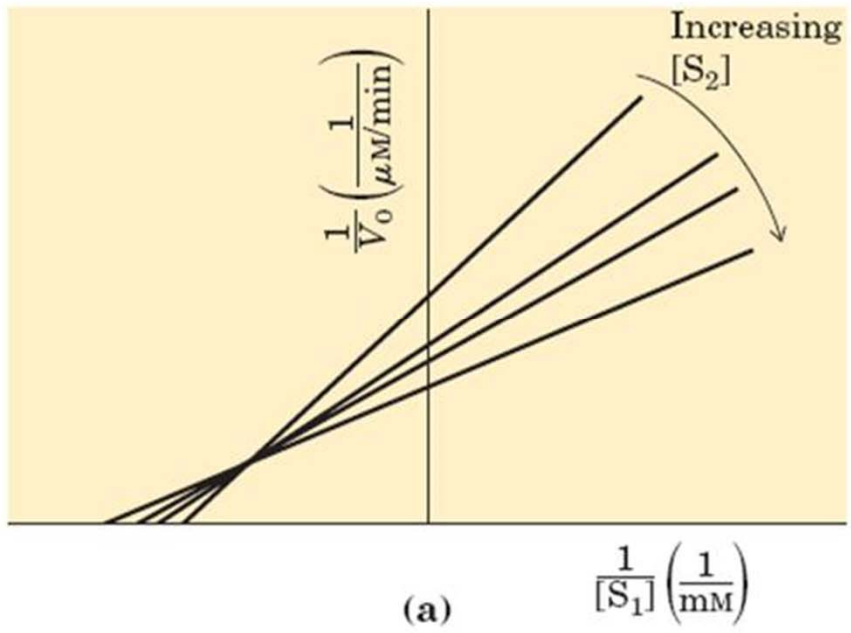
Κινητική και Μηχανισμός Αντίδρασης Bi - Bi

Οι ενζυμικές αντιδράσεις που εμπλέκουν δύο υποστρώματα και αποφέρουν δύο προϊόντα αναφέρονται ως «Bi - Bi». Οι περισσότερες αντιδράσεις Bi - Bi ακολουθούν την κινητική Michaelis - Menten σε λίγο πιο πολύπλοκη μορφή, στην οποία η V_{\max} αντιπροσωπεύει τη μέγιστη ταχύτητα όταν το ένζυμο βρίσκεται σε συνθήκες κορεσμού και από τα δύο υποστρώματα.

Κάθε υπόστρωμα έχει τη δική του χαρακτηριστική K_m , που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που αποδίδει το μισό της μέγιστης ταχύτητας, όταν το δεύτερο υπόστρωμα βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού για το ένζυμο.

Όπως και για τις αντιδράσεις μ' ένα υπόστρωμα, οι τιμές K_m και V_{\max} ή k_{cat} μπορούν να προσδιοριστούν πειραματικά από διαγράμματα διπλού αντιστρόφου. Οι μετρήσεις γίνονται μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του ενός υποστρώματος, ενώ η συγκέντρωση του άλλου υποστρώματος διατηρείται σταθερή.

Εάν οι ευθείες που θα ληφθούν μ' αυτή τη διαδικασία τοποθετηθούν στο ίδιο διάγραμμα, τότε είναι δυνατόν να διακριθούν οι διαφορετικοί μηχανισμοί. Αν οι ευθείες είναι παράλληλες, αυτό φανερώνει ένα μηχανισμό ping - pong, ενώ αν οι ευθείες τέμνονται, η αντίδραση ακολουθεί ένα διαδοχικό μηχανισμό.



Βιβλιογραφία

Marangoni A.G. (2003) Characterisation of enzyme activity. In *“Enzyme Kinetics. A Modern Approach”*, Wiley-Interscience.

Mikkelsen S.R., Cortón E. (2004) Enzymes. In *“Bioanalytical Chemistry”*, Wiley - Interscience.

Nelson D.L., Cox M.M. (2004) Enzymes. In *“Lehninger Principles of Biochemistry”*, 4th ed.