



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής  
Πανεπιστήμιο Αιγαίου (Λήμνος)

# Βιοχημεία Τροφίμων

## Μέρος Ι: Ενζυμολογία

Ακαδημαϊκό Έτος 2014 - 2015

Ενότητα 3<sup>η</sup>  
Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



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



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

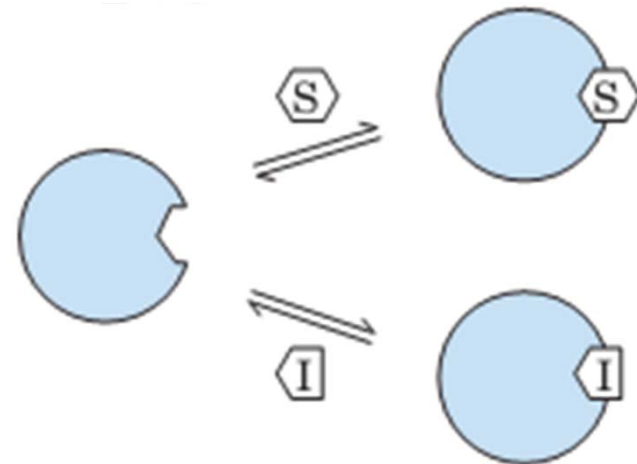
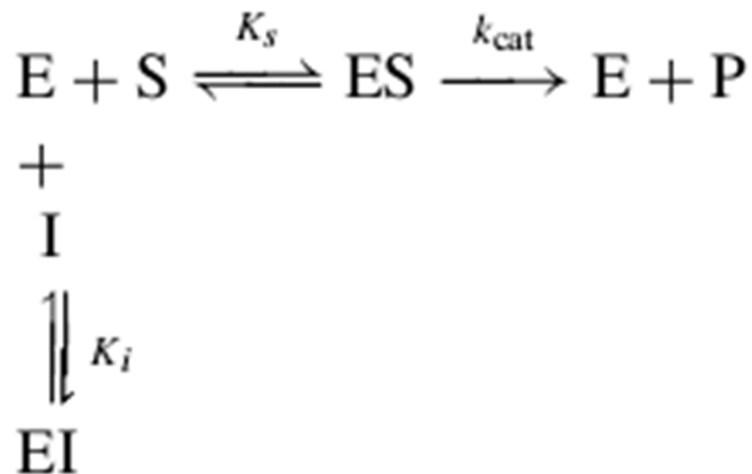


ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## Αντιστρεπτή Αναστολή

### Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

Σ' αυτόν τον τύπο αναστολής, μια ένωση συναγωνίζεται με το υπόστρωμα του ενζύμου για την δέσμευση στο ενεργό κέντρο.



Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια φαινομενική αύξηση στην σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES, χωρίς να επηρεάζεται η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$ .

## Αντιστρεπτή Αναστολή

Η εξίσωση ταχύτητας για τον σχηματισμό προϊόντος, οι σταθερές διάστασης για τα σύμπλοκα ένζυμο - υπόστρωμα (ES) και ένζυμο - αναστολέας (EI) και της ισορροπίας μάζας ενζύμου έχουν, αντίστοιχα, ως εξής:

$$v = k_{\text{cat}} [\text{ES}]$$
$$K_s = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$$
$$[\text{E}_T] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] = [\text{E}] + \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{E}][\text{I}]}{K_i}$$

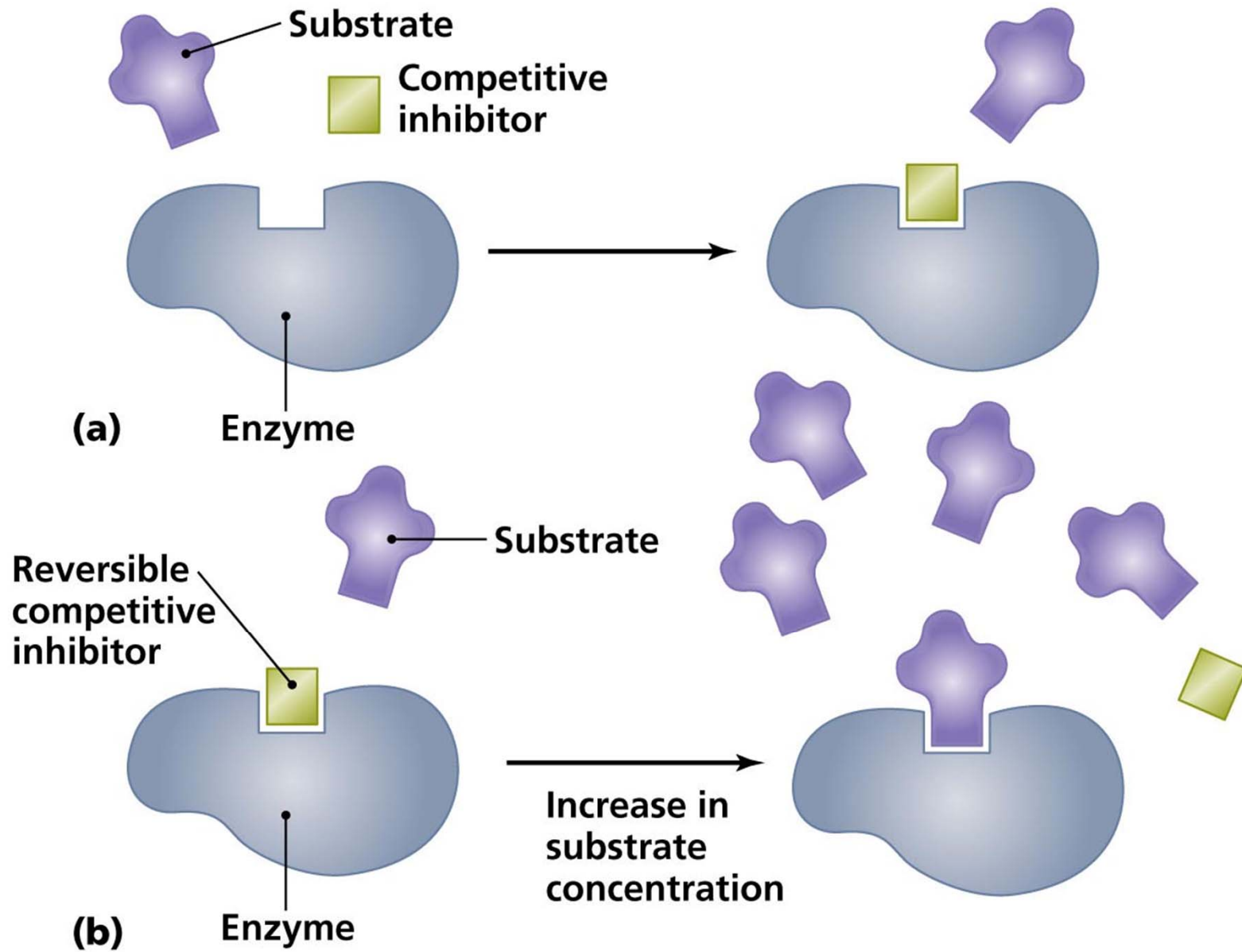
## Αντιστρεπτή Αναστολή

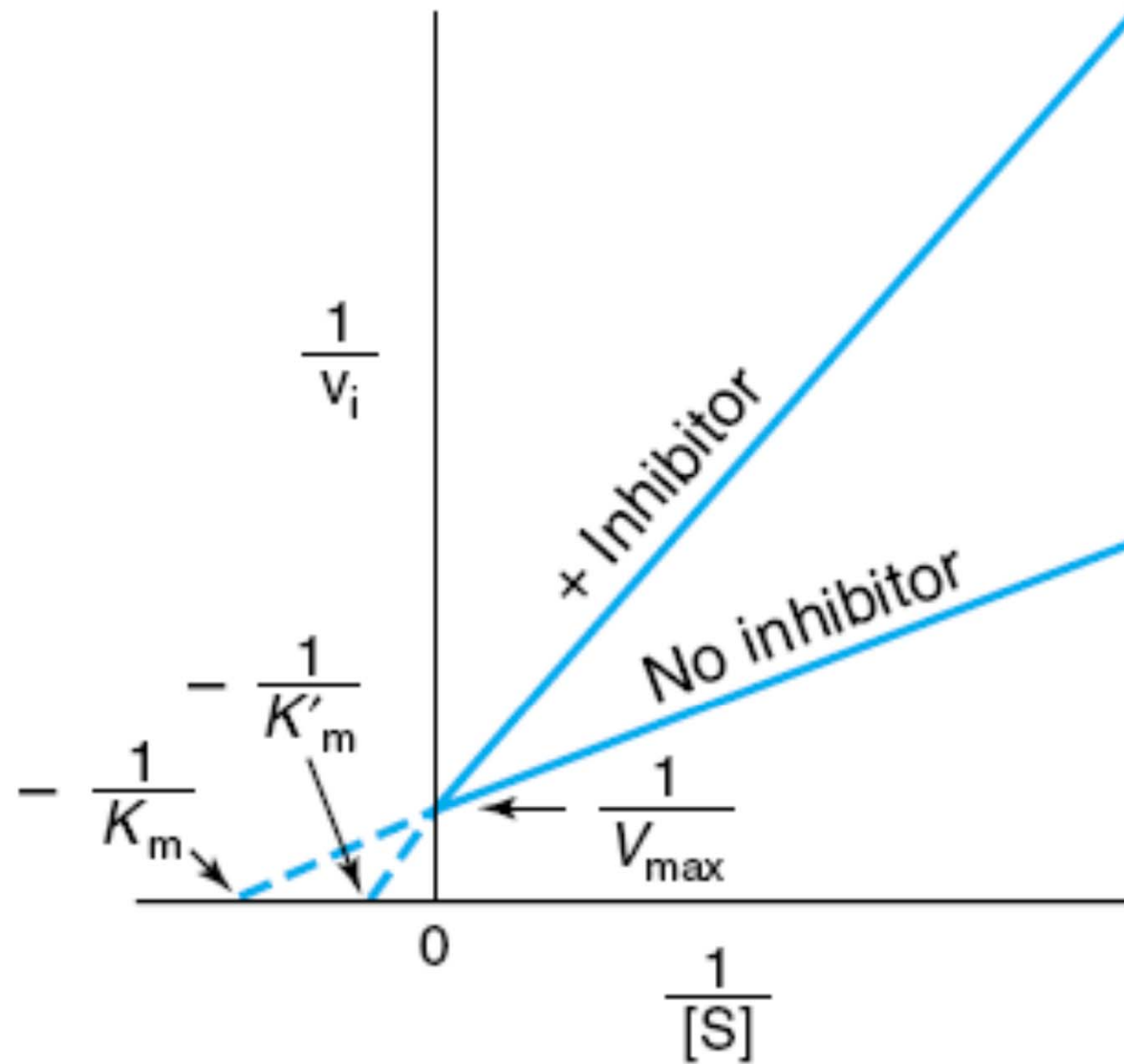
Εμπλοκή της συνολικής συγκέντρωσης ενζύμου ( $v/[E_T]$ ) στην εξίσωση ταχύτητας και αναδιάταξη της εξίσωσης, δίνει τις ακόλουθες εκφράσεις για την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, υπό την παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s^* + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_s + [S]}$$

Όπου  $K_s^*$  αντιστοιχεί στην φαινομενική σταθερά διάστασης του ES υπό την παρουσία αναστολέα. Στην περίπτωση της συναγωνιστικής αναστολής ισχύει  $K_s^* = \alpha K_s$ , όπου:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$



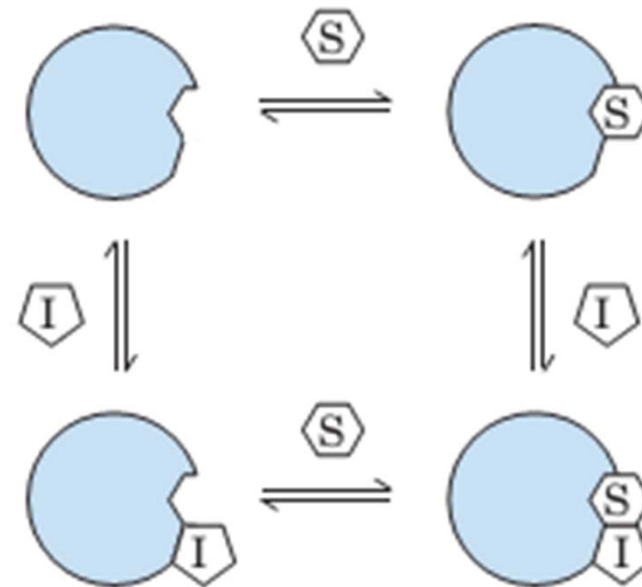
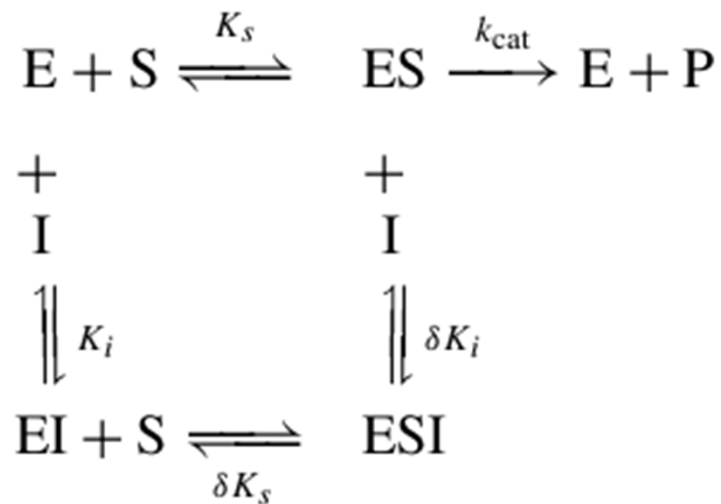




## Αντιστρεπτή Αναστολή

### Γραμμική μικτή αναστολή (linear mixed inhibition)

Σ' αυτόν τον τύπο αναστολής, μια ένωση μπορεί ν' αλληλεπιδρά με αμφότερα το ελεύθερο ένζυμο και το σύμπλοκο ES, σε μια περιοχή διαφορετική του ενεργού κέντρου:



## Αντιστρεπτή Αναστολή

Αυτό έχει ως συνέπεια μια φαινομενική μείωση στη  $V_{\max}$  και μια φαινομενική αύξηση στην  $K_s$ .

Η εξίσωση ταχύτητας για τον σχηματισμό προϊόντος, οι σταθερές διάστασης για τα σύμπλοκα ένζυμο - υπόστρωμα (ES και ESI) και ένζυμο - αναστολέας (EI και ESI) και της ισορροπίας μάζας ενζύμου έχουν, αντίστοιχα, ως εξής:

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

$$K_s = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad \delta K_s = \frac{[\text{EI}][\text{S}]}{[\text{ESI}]} \quad K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad \delta K_i = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

$$[\text{E}_T] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{ESI}] = [\text{E}] + \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{E}][\text{I}]}{K_i} + \frac{[\text{E}][\text{S}][\text{I}]}{K_s \delta K_i}$$

## Αντιστρεπτή Αναστολή

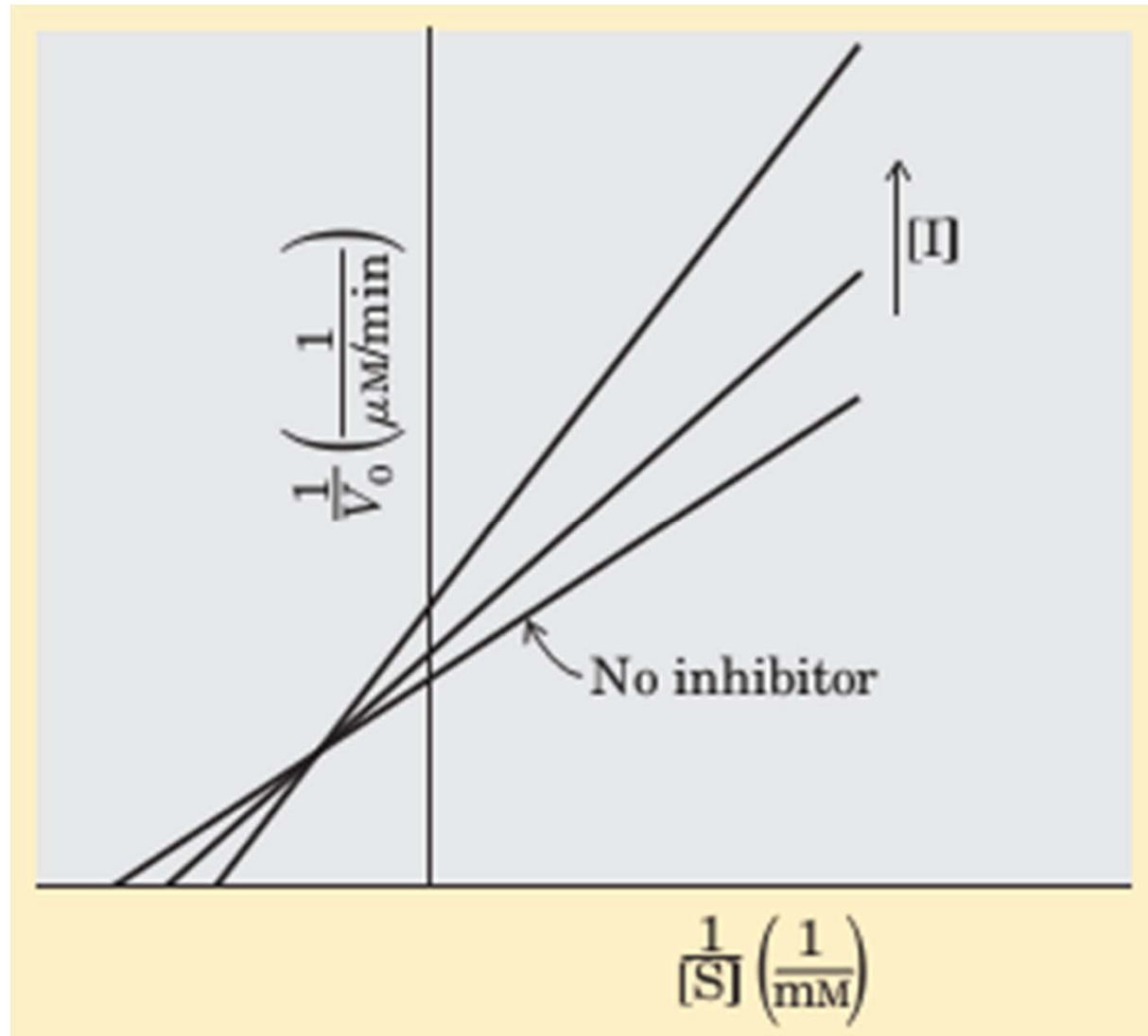
Λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική συγκέντρωση ενζύμου ( $v/[E_T]$ ) στην εξίσωση ταχύτητας με και αναδιάταξη, εξάγονται οι ακόλουθες εκφράσεις για την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, υπό την παρουσία ενός γραμμικού, μικτού τύπου αναστολέα:

$$v = \frac{V_{\max}^*(S)}{K_s^* + (S)} = \frac{(V_{\max}/\beta)[S]}{(\alpha/\beta)K_s + [S]}$$

Όπου  $V_{\max}^*$  και  $K_s^*$  αντιστοιχούν στην φαινομενική μέγιστη ταχύτητα του ενζύμου και στην φαινομενική σταθερά διάστασης του ES υπό την παρουσία αναστολέα. Στην περίπτωση της γραμμικής μικτής αναστολής ισχύει  $V_{\max}^* = V_{\max}/\beta$  και  $K_s^* = (\alpha/\beta)K_s$ , όπου:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\beta = 1 + \frac{[I]}{\delta K_i}$$



## Αντιστρεπτή Αναστολή

### Μη-συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)

Είναι μια ειδική περίπτωση γραμμικής μικτής αναστολής, όπου  $\delta = 1$  και  $a = \beta$ . Έτσι, η έκφραση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης υπό την παρουσία ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα γίνεται:

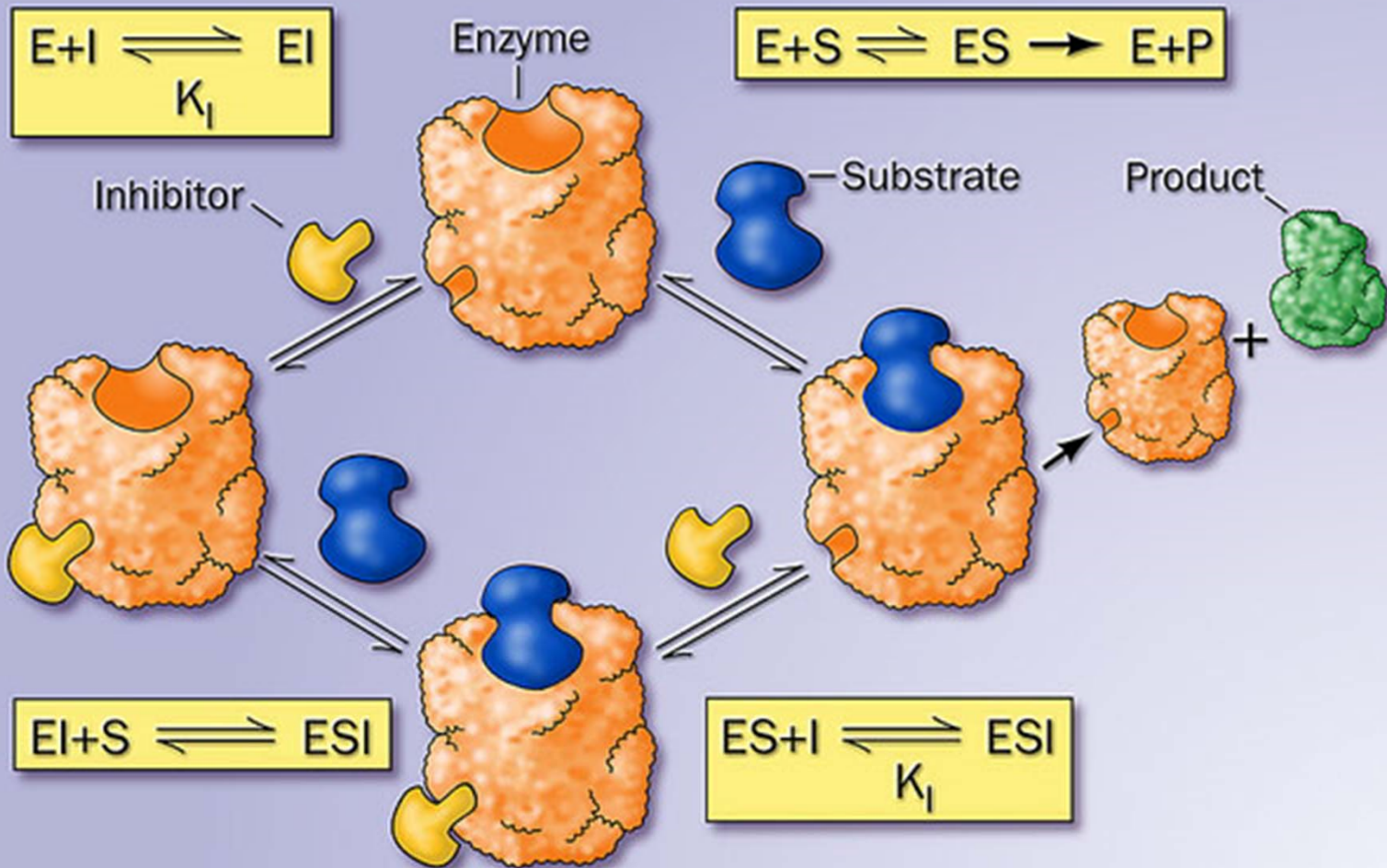
$$v = \frac{V_{\max}^*(S)}{K_s + (S)} = \frac{(V_{\max}/\alpha)[S]}{K_s + [S]}$$

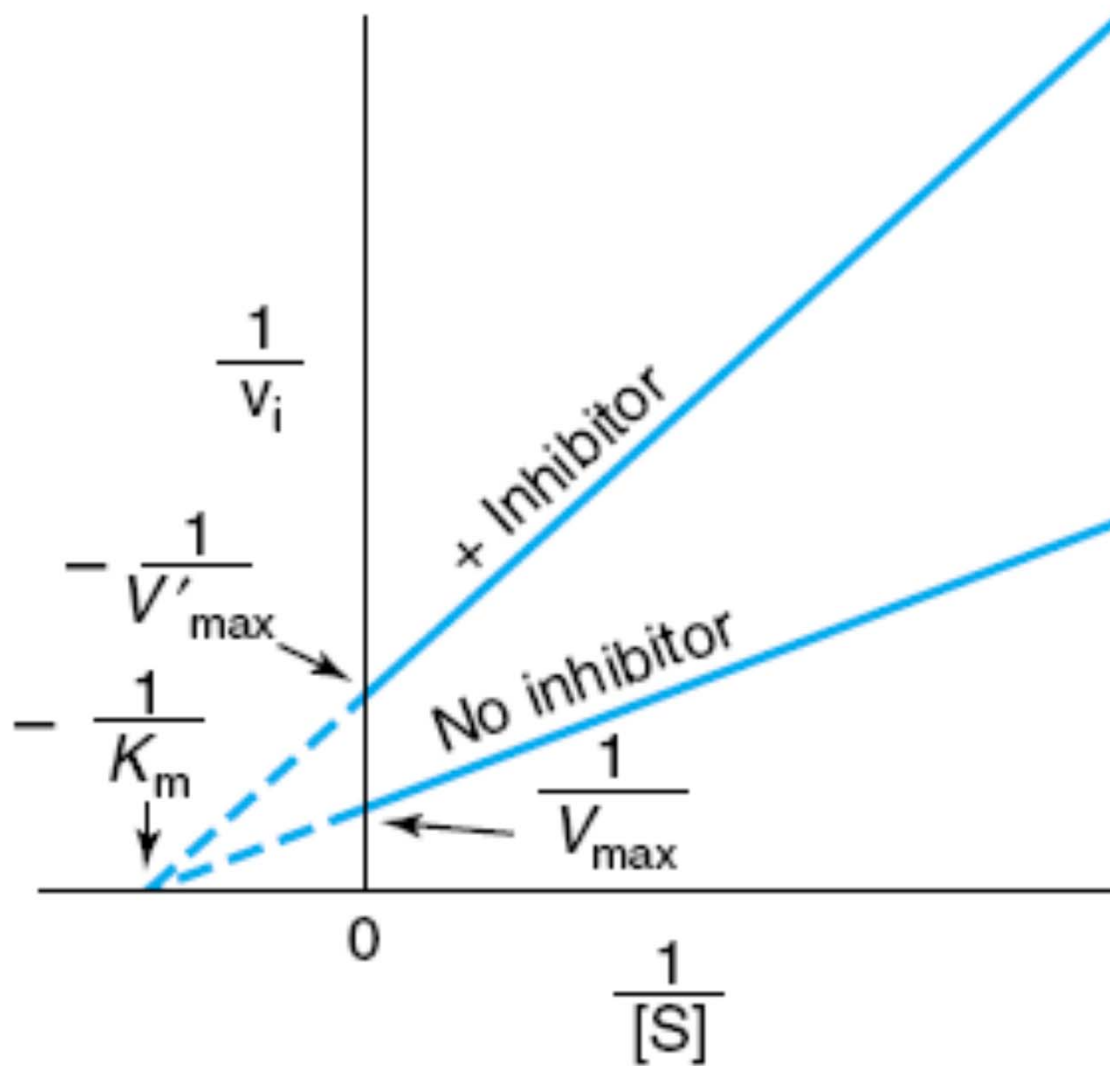
Όπου  $V_{\max}^*$  η φαινομενική μέγιστη ταχύτητα του ενζύμου υπό την παρουσία αναστολέα. Στην περίπτωση της γραμμικής μικτής αναστολής ισχύει  $V_{\max}^* = V_{\max}/\alpha$ , όπου:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

Δηλαδή, σε μια μη-συναγωνιστική αναστολή, παρατηρείται μια φαινομενική μείωση της  $V_{\max}$ , αλλά δεν επηρεάζεται η  $K_s$ .

## Noncompetitive Inhibition

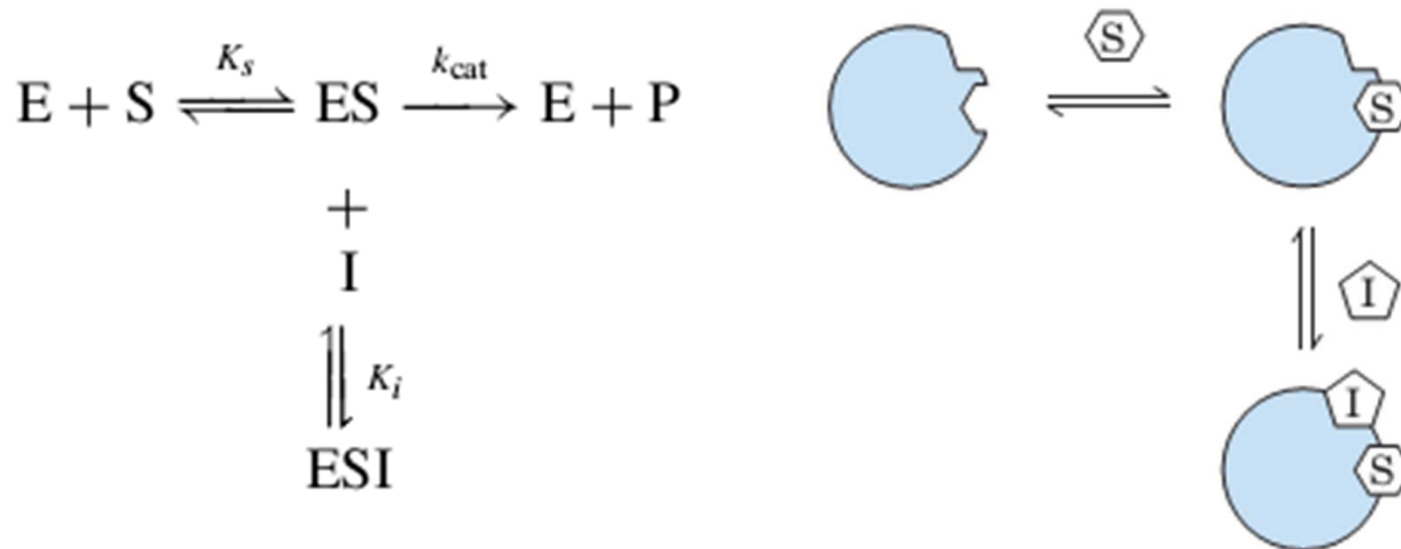




## Αντιστρεπτή Αναστολή

### Ασυναγώνιστη αναστολή (uncompetitive inhibition)

Σ' αυτήν την περίπτωση, μια ουσία αλληλεπιδρά μόνο με το σύμπλοκο ES, σε μια περιοχή διαφορετική του ενεργού κέντρου.





## Αντιστρεπτή Αναστολή

Αυτό έχει ως συνέπεια μια φαινομενική μείωση σε αμφότερες τη  $V_{\max}$  και την  $K_S$ . Η φαινομενική αύξηση στη συνάφεια του ενζύμου για το υπόστρωμα (μείωση της  $K_S$ ) οφείλεται σε μη-παραγωγική δέσμευση του υποστρώματος, που έχει ως αποτέλεσμα μείωση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ενζύμου.

Επομένως, η  $V_{\max}/2$  θα επιτευχθεί σε σχετικά χαμηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος. Η εξίσωση ταχύτητας για τον σχηματισμό προϊόντος, οι σταθερές διάστασης για τα σύμπλοκα ένζυμο - υπόστρωμα (ES) και ES - αναστολέας (ESI) και της ισορροπίας μάζας ενζύμου έχουν, αντίστοιχα, ως εξής:

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

$$K_s = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad K_i = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

$$[\text{E}_T] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}] = [\text{E}] + \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{E}][\text{S}][\text{I}]}{K_s K_i}$$

## Αντιστρεπτή Αναστολή

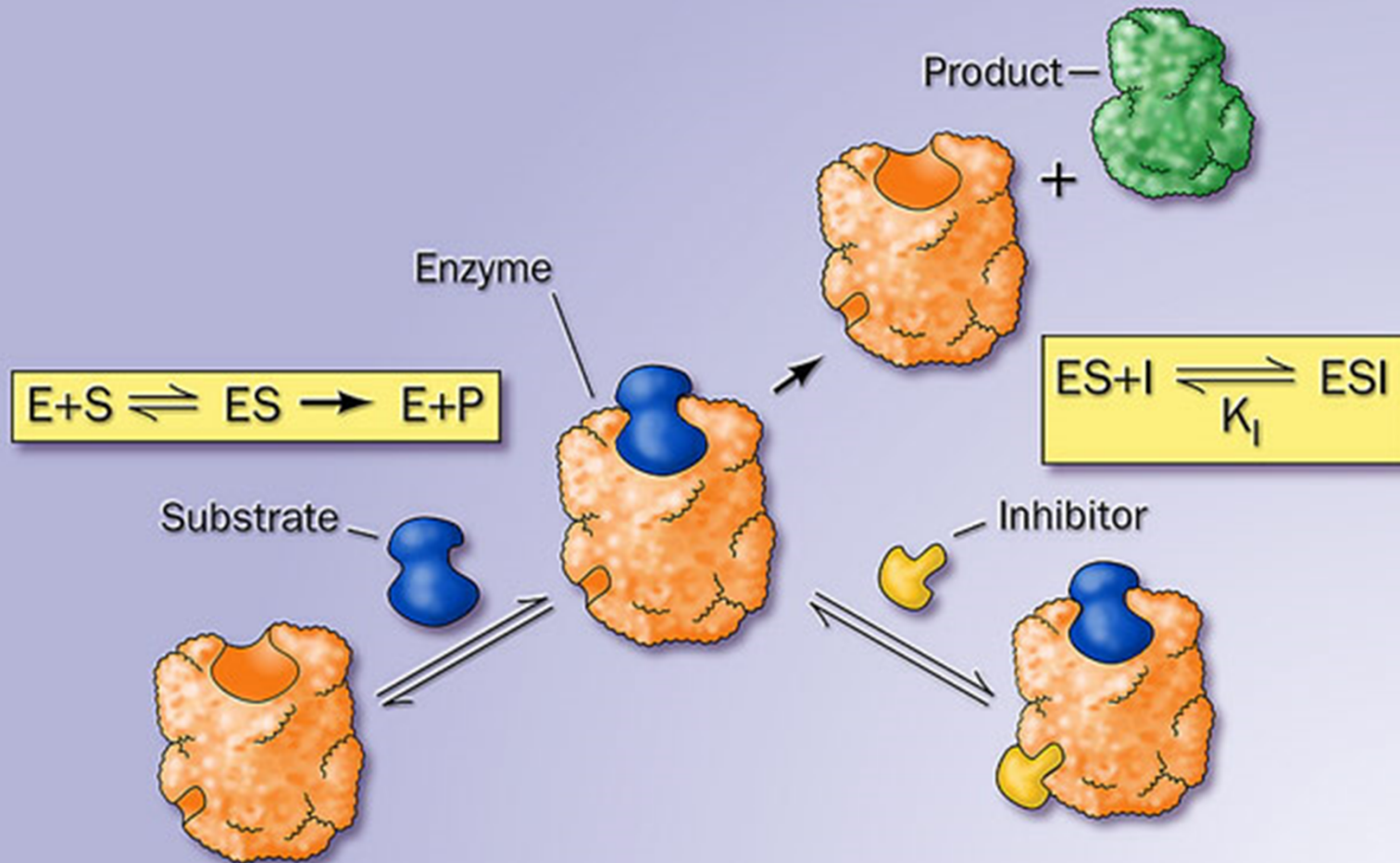
Εμπλοκή της συνολικής συγκέντρωσης του ενζύμου ( $v/[E_T]$ ) στην εξίσωση ταχύτητας και αναδιάταξη, δίνει τις ακόλουθες εκφράσεις για την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, υπό την παρουσία ενός ασυναγώνιστου αναστολέα:

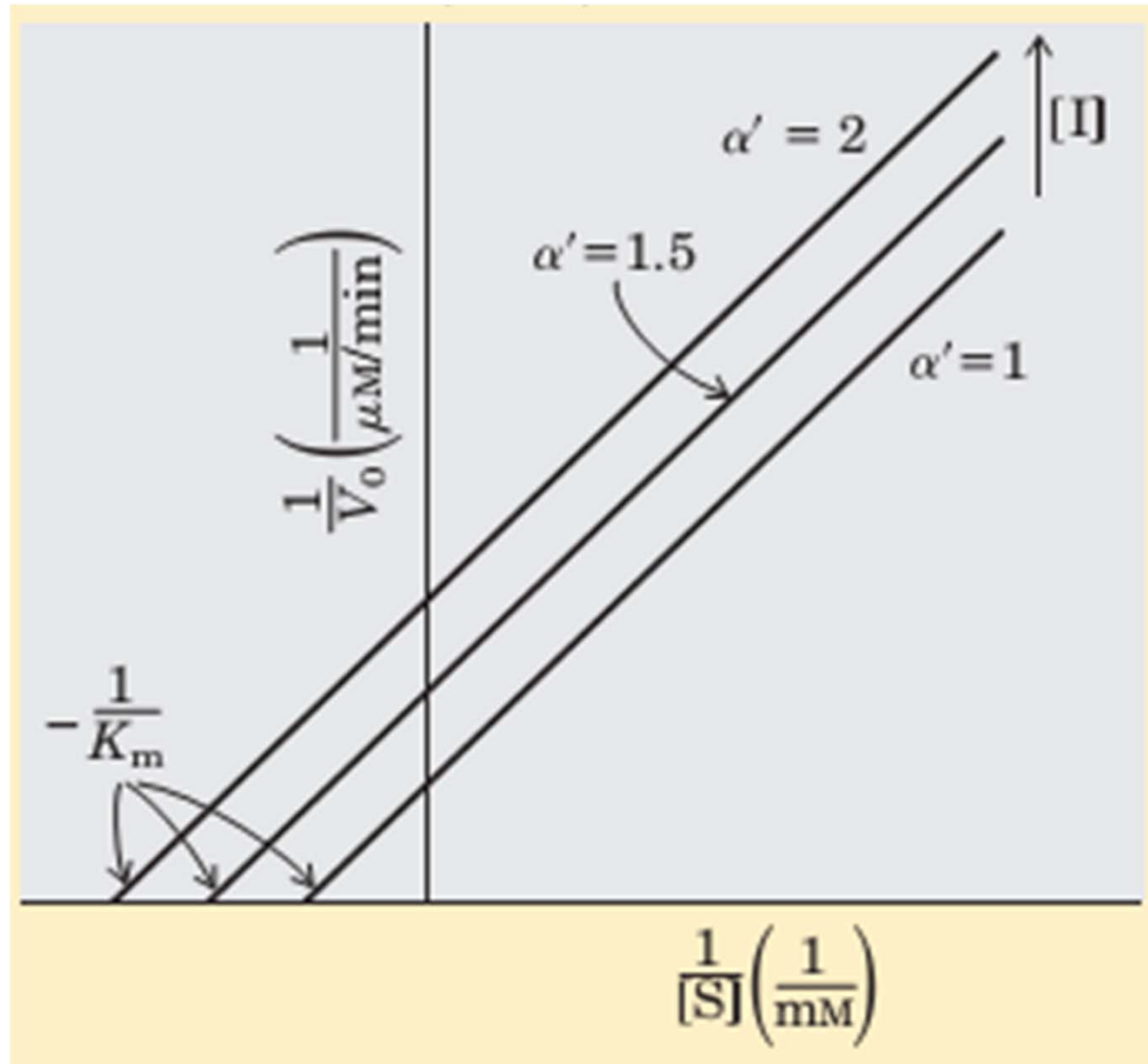
$$v = \frac{V_{\max}^*(S)}{K_s^* + (S)} = \frac{(V_{\max}/\alpha)[S]}{(K_s/\alpha) + [S]}$$

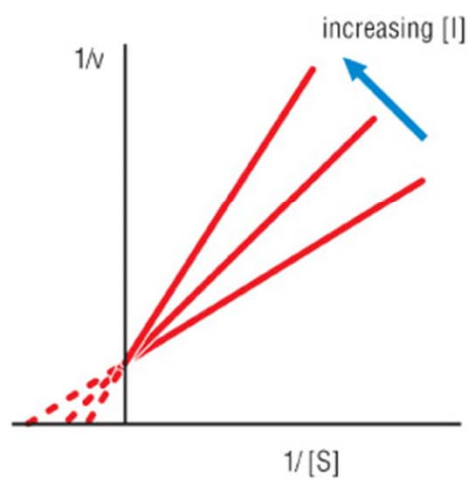
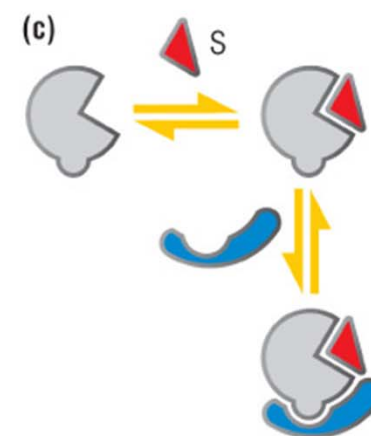
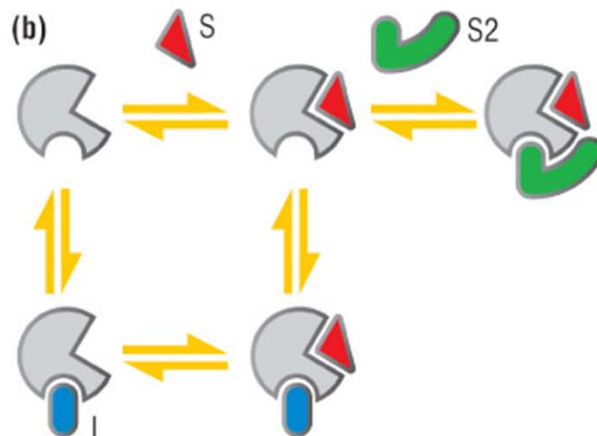
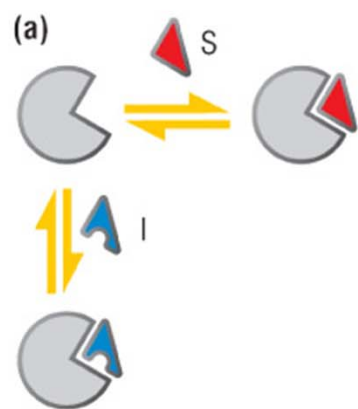
Όπου  $V_{\max}^*$  και  $K_s^*$  αντιστοιχούν στην φαινομενική μέγιστη ταχύτητα του ενζύμου και στην φαινομενική σταθερά διάστασης του ES υπό την παρουσία αναστολέα. Στην περίπτωση της ασυναγώνιστης αναστολής ισχύει  $V_{\max}^* = V_{\max}/a$  και  $K_s^* = K_s/a$ , όπου:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

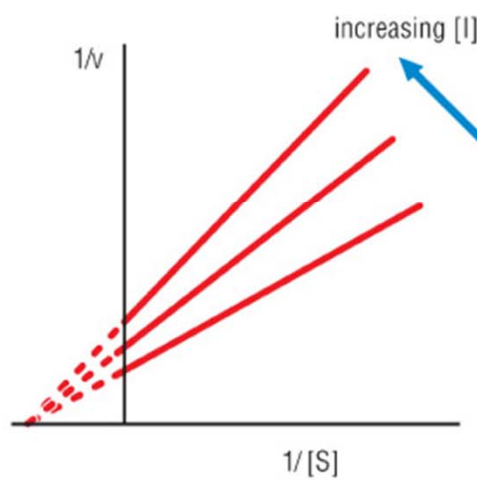
## Uncompetitive Inhibition



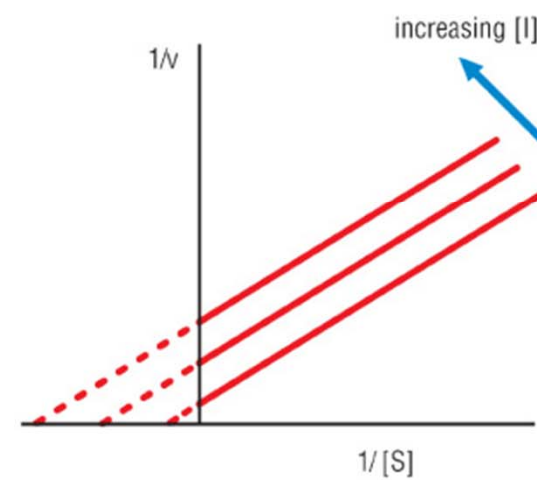




competitive



noncompetitive



uncompetitive

**Summary of the Effects of Reversible Inhibitors on Apparent Enzyme Catalytic Parameters  $V_{\max}^*$  and  $K_s^*$**

	Competitive	Uncompetitive	Linear Mixed	Noncompetitive
$V_{\max}^*$	No effect (–) $V_{\max}$	Decrease (↓) $V_{\max}/\alpha$	Decrease (↓) $V_{\max}/\beta$	Decrease (↓) $V_{\max}/\alpha$
$K_s^*$	Increase (↑) $\alpha K_s$	Decrease (↓) $K_s/\alpha$	Increase (↑) $(\alpha/\beta)K_s$	No effect (–) $K_s$

## Μη-Αντιστρεπτή Αναστολή

Οι μη-αντιστρεπτοί αναστολείς ενώνονται ομοιοπολικά ή καταστρέφουν μια λειτουργική ομάδα πάνω στο ένζυμο που είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του ενζύμου, ή δημιουργούν μια εξαιρετικά σταθερή σύνδεση. Ο σχηματισμός ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός μη-αντιστρεπτού αναστολέα και ενός ενζύμου είναι κοινός.

Μια ειδική τάξη μη-αντιστρεπτών αναστολέων είναι οι **αυτοκτονικοί απενεργοποιητές (suicide inactivators)**. Αυτές οι ουσίες είναι σχετικά αδρανείς μέχρι να συνδεθούν στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου. Ένας αυτοκτονικός απενεργοποιητής υπόκειται στις πρώτες μεταβολές μιας κανονικής ενζυμικής αντίδρασης, αλλά αντί να μετατραπεί σε προϊόν μετατρέπεται σε μια πολύ δραστική ένωση, η οποία συνδυάζεται μη-αντιστρεπτά με το ένζυμο.

Αυτές οι ουσίες ονομάζονται επίσης και **απενεργοποιητές βάσει μηχανισμού** γιατί εκμεταλλεύονται τον κανονικό μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης για να απενεργοποιήσουν το ένζυμο.

## Εξάρτηση Ενζυμικής Δραστικότητας από το pH

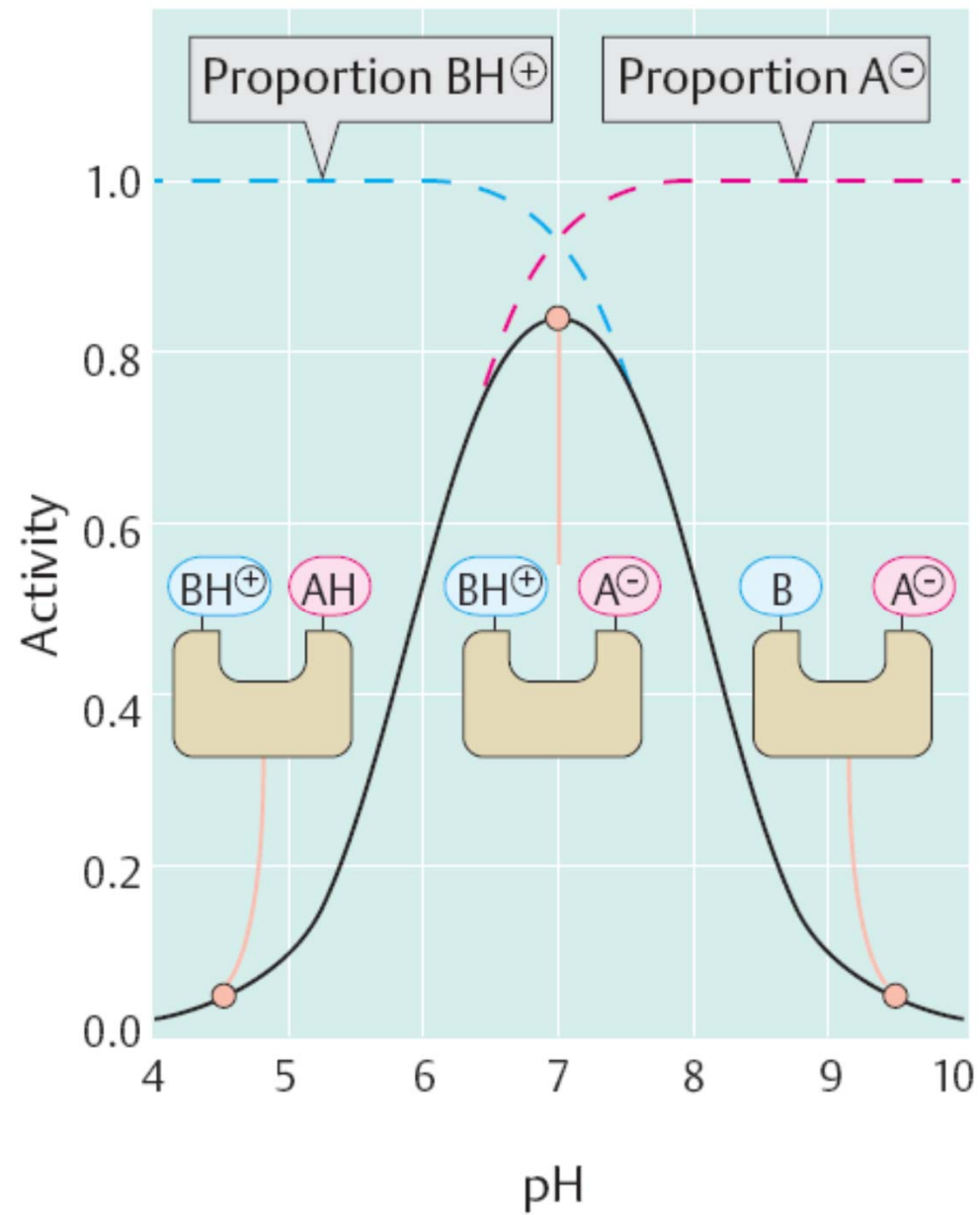
Τα ένζυμα έχουν ένα βέλτιστο pH (ή εύρος pH) όπου η δραστικότητά τους μεγιστοποιείται· σε χαμηλότερα ή υψηλότερα pH η δραστικότητα μειώνεται. Αυτό συμβαίνει γιατί τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο δρουν ως ασθενή οξέα / ασθενείς βάσεις και κρίσιμες ιδιότητές τους εξαρτώνται από την κατάσταση ιονισμού τους.

Επίσης, αμινοξέα σε άλλα σημεία πάνω στο μόριο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιονισμένων πλευρικών αλυσίδων παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης.

Το εύρος του pH μέσα στο οποίο το ένζυμο υπόκειται σε αλλαγές στη δραστικότητα μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον τύπου του κατάλοιπου του αμινοξέως που εμπλέκεται στο μηχανισμό.

Για παράδειγμα, μια αλλαγή σε pH γύρω στο 7 αντανακλά αλλαγές στο ιονισμό ενός κατάλοιπου ιστιδίνης.



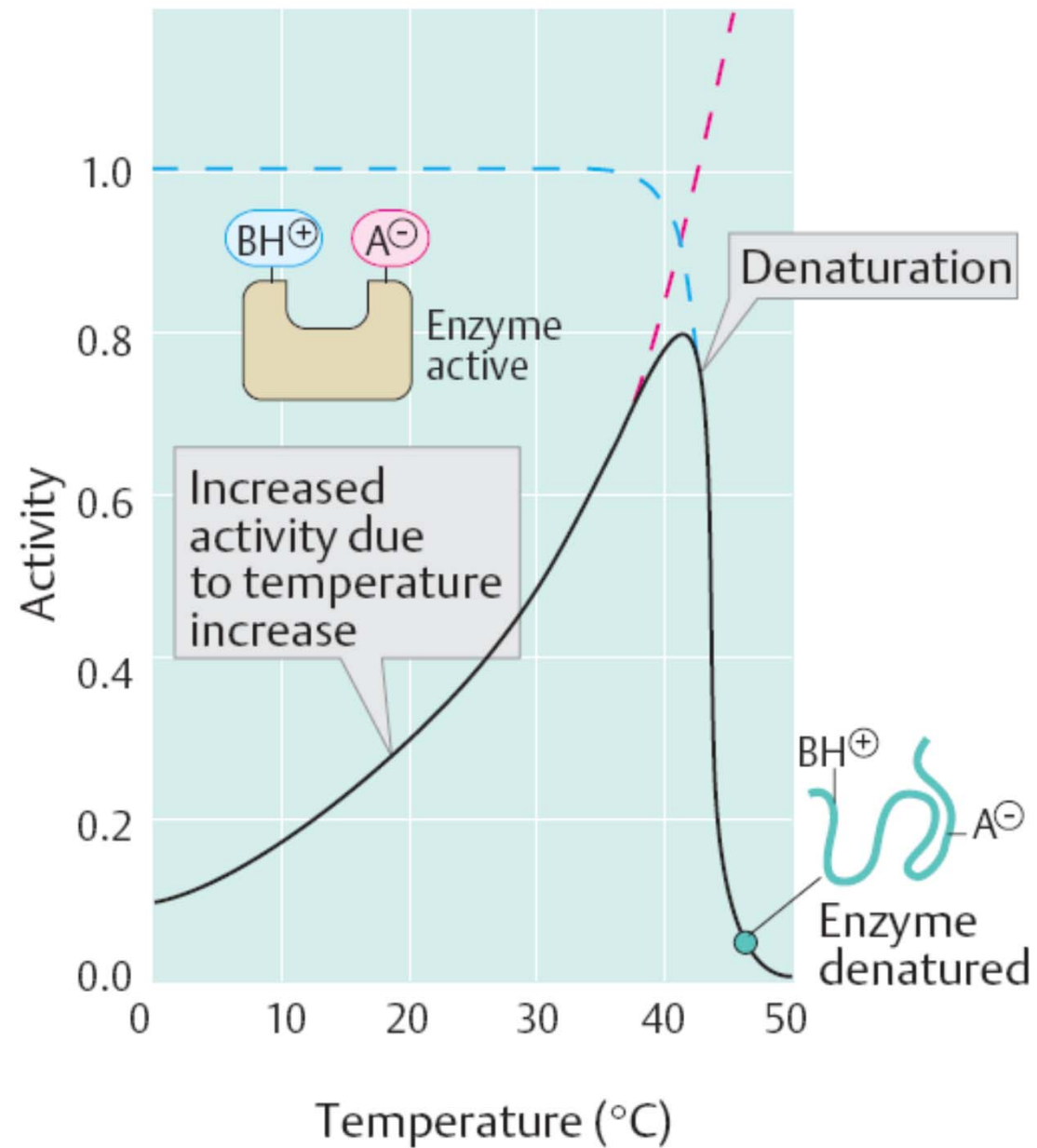


## Εξάρτηση Ενζυμικής Δραστικότητας από τη Θερμοκρασία

Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της ταχύτητας αμφοτέρων των μη-καταλυόμενων και των ενζυμικών αντιδράσεων, αυξάνοντας την κινητική ενέργεια και τη συχνότητα των συγκρούσεων των αντιδρώντων.

Εντούτοις, η θερμική ενέργεια μπορεί ν' αυξήσει την κινητική ενέργεια του ενζύμου σε σημείο που γίνεται υπέρβαση του ενεργειακού φράγματος που απαιτείται για τη διάρρηξη των μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που διατηρούν την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης.

Τότε η πολυπεπτιδική αλυσίδα αρχίζει να ξεδιπλώνει, να μετουσιώνεται, και αυτό συνοδεύεται από δραστική απώλεια καταλυτικής ενεργότητας. Το εύρος των θερμοκρασιών μέσα στο οποίο το ένζυμο διατηρεί μιά σταθερή, καταλυτικώς επαρκή διαμόρφωση εξαρτάται από - και τυπικά υπερβαίνει ελαφρώς - την κανονική θερμοκρασία των κυττάρων μέσα στα οποία βρίσκεται.



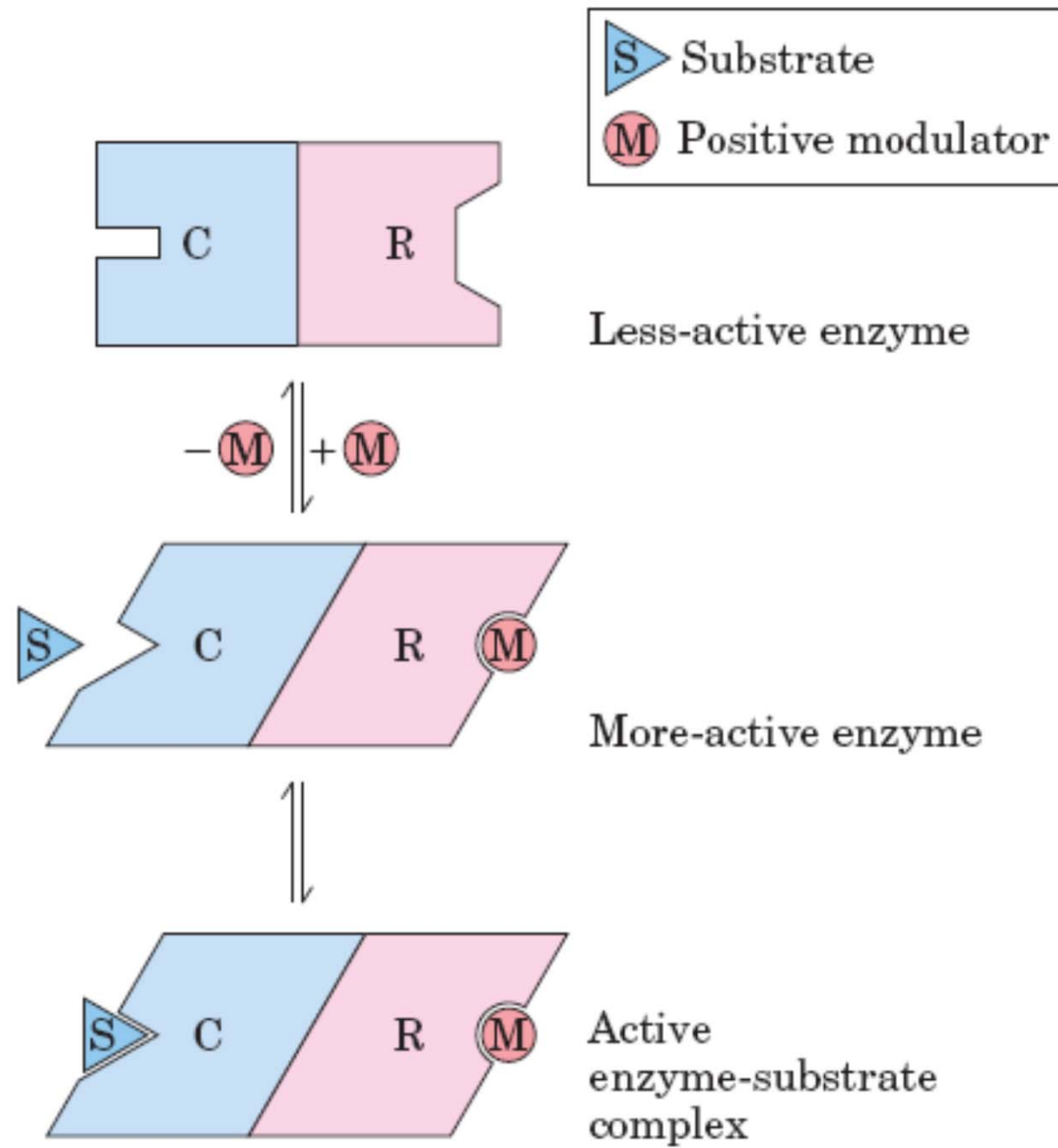
## Αλλοστερικά Ένζυμα

Τα αλλοστερικά ένζυμα λειτουργούν μέσω μιας αντιστρεπτής, μη-ομοιοπολικής σύνδεσης με ρυθμιστικές ουσίες που ονομάζονται αλλοστερικοί ρυθμιστές (allosteric modulators) και είναι συνήθως μικροί μεταβολίτες ή συμπαραγοντες.

Τα αλλοστερικά ένζυμα αλλάζουν διαμόρφωση όταν σ' αυτά συνδεθεί ο ρυθμιστής. Αυτά τα ένζυμα αποτελούνται συνήθως από περισσότερες από μία υπομονάδες και πολλές φορές το ενεργό κέντρο και το κέντρο ρύθμισης βρίσκονται σε ξεχωριστές υπομονάδες.

Οι ρυθμιστές στα αλλοστερικά ένζυμα μπορεί να είναι διεγερτικοί (stimulatory) ή ανασταλτικοί (inhibitory). Συχνά ρυθμιστής είναι το ίδιο το υπόστρωμα.

Αν ο ρυθμιστής είναι το ίδιο το υπόστρωμα, το ένζυμο ονομάζεται ομοτροπικό. Αν ο ρυθμιστής είναι διαφορετικής φύσεως, το ένζυμο είναι ετεροτροπικό.



## Αλλοστερικά Ένζυμα

Οι αλλοστερικοί ρυθμιστές δεν θα πρέπει να συγχέονται με τους μικτούς αναστολείς. Αν και οι δευτέροι συνδέονται σε ξεχωριστό σημείο στο ένζυμο, δεν προκαλούν απαραίτητα αλλαγές στη διαμόρφωση μεταξύ ενεργών και ανενεργών μορφών του ενζύμου και η κινητική είναι διακριτή.

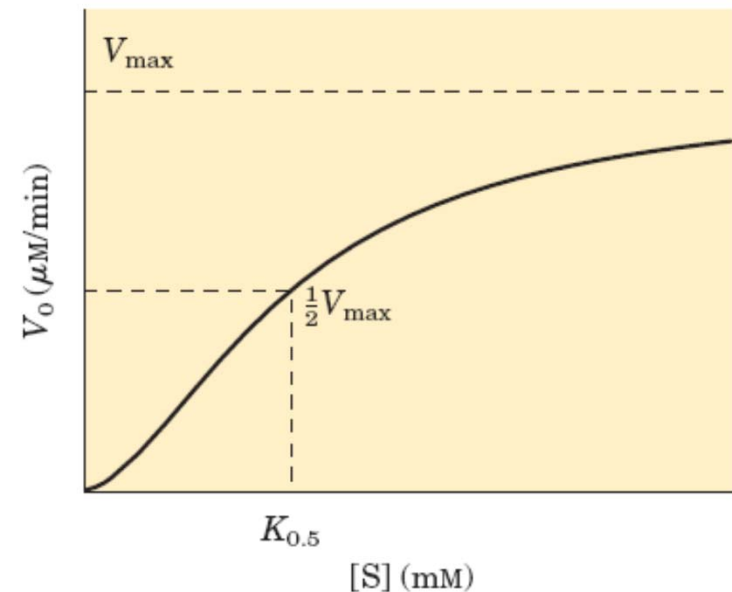
Τα αλλοστερικά ένζυμα έχουν ένα ή περισσότερα σημεία σύνδεσης των ρυθμιστών. Όπως ακριβώς το ενεργό κέντρο είναι εξειδικευμένο στην υποδοχή του υποστρώματος, κάθε σημείο (περιοχή) ρύθμισης είναι εξειδικευμένη για τον ρυθμιστή του. Στα ομοτροπικά ένζυμα, το ενεργό κέντρο και το κέντρο ρύθμισης είναι το ίδιο.

Τα αλλοστερικά ένζυμα επιδεικνύουν σχέσεις μεταξύ  $V_0$  και  $[S]$  που διαφέρουν από την κινητική Michaelis - Menten. Επιδεικνύουν κορεσμό όταν η  $[S]$  είναι επαρκώς υψηλή αλλά για μερικά αλλοστερικά ένζυμα τα διαγράμματα  $V_0$  σε σχέση με τη  $[S]$  παράγουν μια σιγμοειδή καμπύλη, αντί της υπερβολής που είναι τυπική των μη-ρυθμιστικών ενζύμων.

## Αλλοστερικά Ένζυμα

Πάνω στη σιγμοειδή καμπύλη μπορεί να βρεθεί η  $[S]$  που δίνει  $V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$ , αλλά δεν αναφέρεται με τον προσδιορισμό  $K_m$ , γιατί η κινητική δεν ακολουθεί τη σχέση υπερβολής Michaelis - Menten.

Αντ'αυτού, το σύμβολο  $[S]_{0.5}$  ή  $K_{0.5}$  χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει τη συγκέντρωση υποστρώματος που δίνει το μισό της μέγιστης ταχύτητας μιας αντίδρασης που καταλύεται από αλλοστερικό ένζυμο.



## Βιβλιογραφία

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

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