

Εφαρμοσμένη ενζυμική κινητική

2.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΣ

Τα ένζυμα, ως καταλύτες, ελαττώνουν δραστικά τον απαιτούμενο χρόνο για την επίτευξη του σημείου ισορροπίας της αντιδράσεως, χωρίς να μεταβάλλουν τη θέση της και χωρίς να τροποποιούνται τα ίδια κατά τρόπο μη αντιστρέψιμο. Αυτό επιτυγχάνεται αφ' ενός με το να δεσμεύουν το υπόστρωμα σε μια καταλυτικά κρίσιμη για κάθε ένζυμο περιοχή η οποία ονομάζεται *ενεργός περιοχή* ή *ενεργό κέντρο*, και αφ' ετέρου, συνήθως, να μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια η οποία αντιστοιχεί στη μεταβατική κατάσταση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (*ES*) κατά την αντίδραση. Το τελευταίο οδηγεί σε μείωση την αντίστοιχη ενέργεια ενεργοποίησης (ΔG^{++}), συγκριτικά με την απαιτούμενη ενέργεια απουσία ενζύμου.

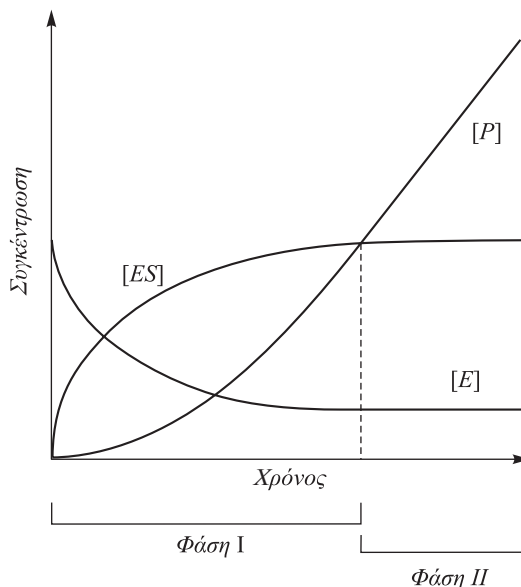
Για τη μελέτη και την κατανόηση της ενζυμικής αντιδράσεως βοηθάει η γνώση των κατωτέρω κριτηρίων (τα αντίστοιχα μέτρα των οποίων εμφανίζονται σε παρένθεση), η σημασία των οποίων εξαρτάται από τη συγκεκριμένη ενζυμική εφαρμογή:

- ταχύτητα αντιδράσεως (δραστηκότητα και ποσότητα ενζύμου),
- έκταση αντιδράσεως (σταθερά ισορροπίας),
- διάρκεια ενζυμικής δραστηκότητας (σταθερότητα ενζύμου).

Η διάρκεια βιομηχανικών βιοκαταλυτικών αντιδράσεων κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως μερικές ημέρες. Ενώ θεωρητικά κύριος στόχος είναι η μεγιστοποίηση της ποσότητας του προϊόντος εις βάρος του παράγοντα «χρόνος αντιδράσεως», στην πράξη η βιομηχανία ενδιαφέρεται ο συνολικός χρόνος της ενζυμικής αντιδράσεως να είναι ρεαλιστικός και η διεργασία να ολοκληρώνεται γρήγορα. Αυτό, αναγκαστικά, συνεπάγεται τον σχεδιασμό ταχύτερης συνολικής αντιδράσεως.

Η συνολική ενζυμική αντίδραση, γενικά, διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

Φάση I: *φάση ενάρξεως*, η οποία διαρκεί από δέκατα του δευτερολέπτου έως λίγα δευτερόλεπτα (Σχήμα 2.1).



ΣΧΗΜΑ 2.1

Εξέλιξη ενζυμικής αντιδράσεως, κατά την οποία χρησιμοποιείται ως μέτρο η συγκέντρωση σε συνάρτηση με τον χρόνο. Διακρίνονται η φάση έναρξεως (I) και η φάση σταθεροποιημένης καταστάσεως (II). E = ένζυμο, ES = σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, P = προϊόν.

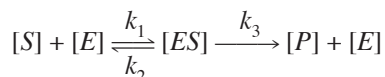
Φάση II: φάση σταθεροποιημένης καταστάσεως, στην οποία αντιστοιχεί η αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως v_0 (Σχήμα 2.1).

Φάση III: μη γραμμική φάση, η οποία αποτελεί το κύριο τμήμα της ενζυμικής αντιδράσεως και διαρκεί μέχρι τη λήξη της (Σχήμα 2.2), τυπικά, την επίτευξη του σημείου ισορροπίας.

Στη βιομηχανική ενζυμική τεχνολογία, οι φάσεις I και II θεωρούνται μία φάση, απλούστευση η οποία προφανώς δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Η φάση II είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας και για τον σχεδιασμό νέων ενζυμικών διεργασιών, ενώ η φάση III συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των ενζυμικών βιομηχανικών εφαρμογών.

2.1.1 Φάση I: έναρξη της ενζυμικής αντιδράσεως

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 ισορροπίας



όπου

- [S] συγκέντρωση υποστρώματος,
- [E] συγκέντρωση ελεύθερου ενζύμου,
- [ES] συγκέντρωση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος,
- [P] συγκέντρωση προϊόντος,
- k_1, k_2, k_3 σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ES , χαρακτηριστικού της φάσης I, θεωρείται αντιστρεπτή διαδικασία, επειδή αυτό βρίσκεται σε παρόμοιο ενεργειακό

επίπεδο με τα συστατικά S και E . Το σύμπλοκο ES διασπάται σε προϊόν P και σε ελεύθερο ένζυμο E , διαδικασία εξώθερμη και, γενικά, μη αντιστρεπτή στην αρχή της αντιδράσεως. Το στάδιο διασπάσεως του ES σε P και E θεωρείται ότι ελέγχει την ταχύτητα της συνολικής αντιδράσεως (αποτελεί, δηλαδή, το λεγόμενο rate-limiting step). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1, κατά την έναρξη της αντιδράσεως (φάση I), η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου $[E]$, η οποία είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, ελαττώνεται γρήγορα και προσεγγίζει το μηδέν, ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση και σταθεροποίηση της συγκέντρωσεως του συμπλόκου $[ES]$. Το τελευταίο οφείλεται στο ότι σταδιακά αποκαθίσταται δυναμική ισορροπία, γεγονός το οποίο σηματοδοτεί την έναρξη της φάσης II (σταθεροποιημένης $[ES]$).

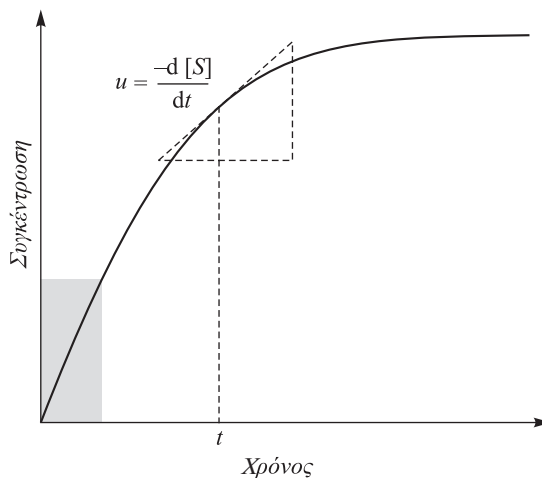
2.1.2 Φάση II: σταθεροποιημένη κατάσταση

Αρχική ταχύτητα αντιδράσεως (u_0). Τα αντιδρώντα συστατικά βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και το σύστημα λειτουργεί σε σταθεροποιημένη κατάσταση. Αυτή θεωρείται η απλούστερη περίπτωση με βάση την οποία είναι δυνατόν να κατασκευαστεί ένα πρότυπο (μοντέλο) ενζυμικής κινητικής. Αυτό, ακολούθως, μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα, ώστε να εφαρμοσθεί και στη φάση III. Το εν λόγω κινητικό πρότυπο θα περιγράψει τη συνολική ενζυμική αντίδραση και θα επιτρέπει, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, τον ποσοτικό υπολογισμό του παραγόμενου προϊόντος ή του καταναλισκόμενου υποστρώματος.

Η ταχύτητα (u) της αντιδράσεως, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, ισούται με την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης του Σχήματος 2.2 κατά την αντίστοιχη χρονική στιγμή, δηλαδή

$$u = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

Χαρακτηριστικό της φάσης II είναι η γραμμική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσεως υποστρώματος και χρόνου, γεγονός το οποίο οδηγεί στη μέγιστη κλίση της καμπύλης του Σχήματος 2.2 (ευθεία, ως στο σκιασμένο τμήμα). Η κλίση αυτή ισούται με την *αρχική ταχύτητα αντιδράσεως* u_0 , η οποία παραμένει στα-



ΣΧΗΜΑ 2.2

Εξέλιξη ενζυμικής αντιδράσεως. Οι φάσεις I και II αντιστοιχούν στο σκιασμένο τμήμα της καμπύλης, ενώ η φάση III στο μη γραμμικό. Η κλίση της εφαπτομένης σε οποιοδήποτε σημείο της καμπύλης ισούται με την ταχύτητα της αντιδράσεως στο σημείο αυτό. S = υπόστρωμα, t = χρόνος.

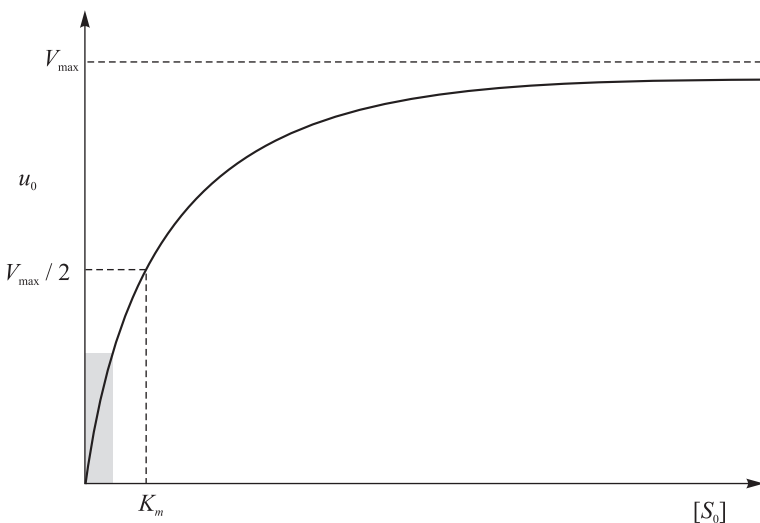
θερή ως προς τον χρόνο, για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου. Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται και το υποστρώμα μετατρέπεται σε προϊόν (Σχήμα 2.2), η μείωση της συγκέντρωσής του υποστρώματος και η αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσής του προϊόντος, τελικά, περιορίζουν την ταχύτητα αντιδράσεως, με αποτέλεσμα την είσοδο του συστήματος στη φάση ΙΙΙ. Η ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως εκφράζεται ποσοτικά τόσο με απόλυτες χημικές μονάδες (π.χ. $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) όσο και με φυσικές μονάδες (π.χ. μεταβολή οπτικής απορροφήσεως ανά μονάδα χρόνου).

Επίδραση της συγκέντρωσής υποστρώματος στην αρχική ταχύτητα αντιδράσεως, σταθερά Michaelis-Menten (K_m) και μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως (V_{max}). Πειραματικά διαπιστώνεται ότι η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσής υποστρώματος $[S_0]$ επί της αρχικής ταχύτητας αντιδράσεως u_0 , για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου, περιγράφεται από ορθογώνια υπερβολή (Σχήμα 2.3) η οποία ακολουθεί τη γενική εξίσωση $(\alpha - u_0)(S + \beta) = \text{σταθερό}$ (α και β σταθερές). Σημειώνεται πως, επειδή προσδιορίζεται η u_0 και $[S_0] \gg [E]$, έπεται ότι $[S_0] = [S]$. Η κινητική συμπεριφορά του συστήματος ποικίλλει ανάλογα με την τιμή της συγκέντρωσής του υποστρώματος ως κατωτέρω.

- (α) Χαμηλή τιμή $[S]$. Η u_0 εμπίπτει στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης (Σχήμα 2.3, σκιασμένο) και είναι ευθέως ανάλογη προς τη $[S]$, οπότε η κινητική είναι πρώτης τάξεως. Αυτό έχει πρακτική σημασία αφού, υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής υποστρωμάτων του ενζύμου σε δείγματα. Επίσης, η κινητική των ενζύμων σε χαμηλή $[S]$ είναι χρήσιμη για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αποδοτικότητα των ενζύμων στον μεταβολισμό του κυττάρου.
- (β) Υψηλή τιμή $[S]$. Η u_0 είναι ανεξάρτητη από τη $[S]$ (Σχήμα 2.3, τμήμα καμπύλης σχεδόν παράλληλο του άξονα των τιμών $[S]$), οπότε η κινητική είναι μηδενικής τάξεως. Στην περίπτωση αυτή, επειδή $[S] \gg [E]$ ($[E]$ είναι η συνολική συγκέντρωση ενζύμου και ίση προς $[E] + [ES]$), η ισορροπία ευνοεί τον σχηματισμό του συμπλόκου ES , οπότε η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου $[E] \approx 0$ και συνεπώς $[E_f] = [ES]$. Αυτό, όπως θα δια-

ΣΧΗΜΑ 2.3

Γραφική παράσταση της αρχικής ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως u_0 έναντι της αρχικής συγκέντρωσής υποστρώματος $[S_0]$. K_m = σταθερά Michaelis-Menten, V_{max} = μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως.



πιστωθεί αργότερα, οδηγεί στην εξίσωση $u_0 = V_{\max} = k_3[E_t]$ (V_{\max} = μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως) (εξίσωση 2.6), χρήσιμη για τον σχεδιασμό και τη λειτουργία βιομηχανικών ενζυμικών αντιδράσεων. Επίσης, σε συνθήκες κορεσμού του ενζύμου από υπόστρωμα, ώστε $[S] \gg [E_t]$ και κινητικής μηδενικής τάξεως, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των ενζυμικών μονάδων σε δείγματα.

(γ) Ενδιάμεση τιμή $[S]$. Η κινητική μεταπίπτει σταδιακά από πρώτη σε μηδενική τάξη. Με δεδομένο ότι λαμβάνουμε τιμές u_0 , το σύστημα λειτουργεί σε $[S] \gg [E_t]$ (ισχύει για τις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές ενζύμων), και με $[P] \approx 0$ είναι δυνατόν να υποθέσουμε είτε ότι περιοριστικός παράγον της συνολικής αντιδράσεως είναι η διάσπαση του ES σε $P + E$ ($k_3 < k_2$) είτε ότι $[ES] = \text{σταθερή}$. Η πρώτη υπόθεση έγινε από τους Michaelis και Menten (1913), ενώ η δεύτερη από τους Briggs και Haldane (1925), οι οποίοι διατύπωσαν τη θεωρία της *σταθεροποιημένης καταστάσεως*. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, σε κάθε χρονική στιγμή η ταχύτητα (ρυθμός) σχηματισμού του συμπλόκου ES είναι ίση προς την ταχύτητα (ρυθμό) διασπάσεώς του προς S, E και P , δηλαδή $d[ES]/dt = 0$, οπότε η $[ES]$ παραμένει σταθερή. Συνεπώς, σύμφωνα με τα ανωτέρω και το πρότυπο ισορροπίας της ενότητας 2.1.1, έπεται ότι

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (2.1)$$

και, εάν συμβολίσουμε τον παράγοντα $(k_2 + k_3)/k_1$ με K_m , ισχύει ότι:

$$[E] = \frac{[ES]K_m}{[S]} \quad (2.2)$$

Εάν υποτεθεί ότι η ενζυμική δραστικότητα παραμένει σταθερή, για τις συγκεντρώσεις του συνολικού ενζύμου $[E_t]$, του ελεύθερου ενζύμου $[E]$ και του συμπλοκοποιημένου ενζύμου $[ES]$, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, ισχύει

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad (2.3)$$

Από τις εξισώσεις (2.2) και (2.3) έπεται ότι

$$[ES] = \frac{[E_t]}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2.4)$$

Σύμφωνα με το ίδιο πρότυπο ισορροπίας (ενότητα 2.1.1), η αρχική ταχύτητα αντιδράσεως είναι

$$u_0 = k_3[ES] \quad (2.5)$$

η δε μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως στην οποία μπορεί να οδηγηθεί ($[S] \gg [E_t] \Rightarrow [ES] = [E_t]$) είναι

$$V_{\max} = k_3[E_t] \quad (2.6)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2.4) στην (2.5), λαμβάνουμε την εξίσωση

$$u_0 = \frac{k_3[E_t]}{1 + \frac{K_m}{[S]}} = \frac{k_3[E_t][S]}{[S] + K_m} \quad (2.7)$$

η οποία, εάν ληφθεί υπ' όψιν η εξίσωση (2.6), διαμορφώνεται ως εξής:

$$u_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.8)$$

Η εξίσωση (2.8) περιγράφει την ενζυμική κινητική της φάσης II, και είναι η ίδια με εκείνη των Michaelis και Menten, με τη διαφορά ότι προκύπτει χωρίς να γίνεται η παραδοχή $k_3 \ll k_2$, κάτι το οποίο δεν ισχύει πάντα.

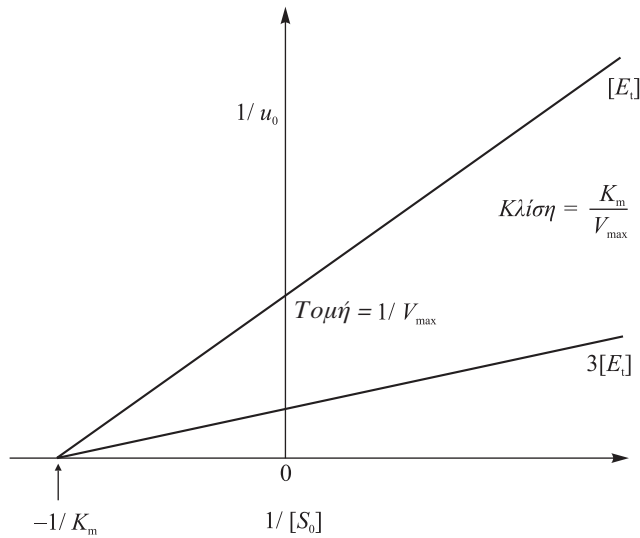
Εάν στην εξίσωση (2.8) αντικατασταθεί το u_0 με $V_{\max}/2$, η K_m εξισώνεται προς $[S]$. Δηλαδή, αριθμητικά η K_m ισούται με εκείνη την (αρχική) συγκέντρωση υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα αντιδράσεως είναι ίση προς το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) για τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα κυμαίνεται μεταξύ 10^{-1} και 10^{-5} M. Η φυσική σημασία της σταθεράς K_m φαίνεται από την εξίσωση $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ και με συνήθως να ισχύει $k_3 \ll k_2$, οπότε γίνεται η παραδοχή ότι $K_m = k_2/k_1$. Συνεπώς, όταν $k_3 \ll k_2$, η K_m ισούται με τη σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES) και αποτελεί μέτρο της συγγένειας η οποία αναπτύσσεται μεταξύ τους, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_m τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μεταξύ των συστατικών του συμπλόκου.

Οι τιμές τις οποίες λαμβάνει η K_m αποτελούν χρήσιμη πληροφορία για την εφαρμοσμένη ενζυμολογία και, κατ' επέκταση, τη βιομηχανία που χρησιμοποιεί βιοκαταλύτες. Λόγου χάριν, στην περίπτωση κατά την οποία σε μια εφαρμογή εμφανίζεται πρόβλημα χαμηλής διαλυτότητας του υποστρώματος, ώστε η μέγιστη εφικτή συγκέντρωσή του να περιορίζεται σε $0,1 K_m$, και, παράλληλα, παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια με το ένζυμο (άρα υψηλή K_m), η ενζυμική αντίδραση θα πραγματοποιηθεί μόνο με $0,09 V_{\max}$. Δύο πρακτικές λύσεις για να μειωθεί ο χρόνος καταλύσεως θα ήταν η χρησιμοποίηση του ίδιου ενζύμου από άλλη, καταλληλότερη πηγή, ώστε αυτό να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το συγκεκριμένο υπόστρωμα (χαμηλότερη K_m), καθώς και η αύξηση της $[E_t]$ στην αντίδραση (Σχήμα 2.4, από $[E_t]$ σε $3[E_t]$).

Υπολογισμός των K_m και V_{\max} . Εάν η εξίσωση (2.8) γραφεί με τη μορφή διπλού αντιστρόφου, λαμβάνεται η (2.9), η οποία είναι χρήσιμη για τον υπολογισμό των K_m και V_{\max} :

$$\frac{1}{u_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.9)$$

Η ανωτέρω εξίσωση περιγράφει την ευθεία η οποία προκύπτει εάν παρστήσουμε γραφικά τις τιμές $1/u_0$ στον άξονα των τεταγμένων και $1/[S]$ στον άξονα των τετμημένων (Σχήμα 2.4)· είναι μια γραφική παράσταση γνωστή ως παράσταση των *Lineweaver* και *Burk* (1934). Η κλίση της ευθείας είναι ίση προς K_m/V_{\max} , ενώ το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων είναι $1/V_{\max}$ και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων $-1/K_m$.



ΣΧΗΜΑ 2.4

Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk ή των διπλών αντιστρόφων της αρχικής ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (u_0) έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος ($[S_0]$). E_0 = ολική συγκέντρωση ενζύμου, K_m = σταθερά Michaelis-Menten, V_{max} = μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης.

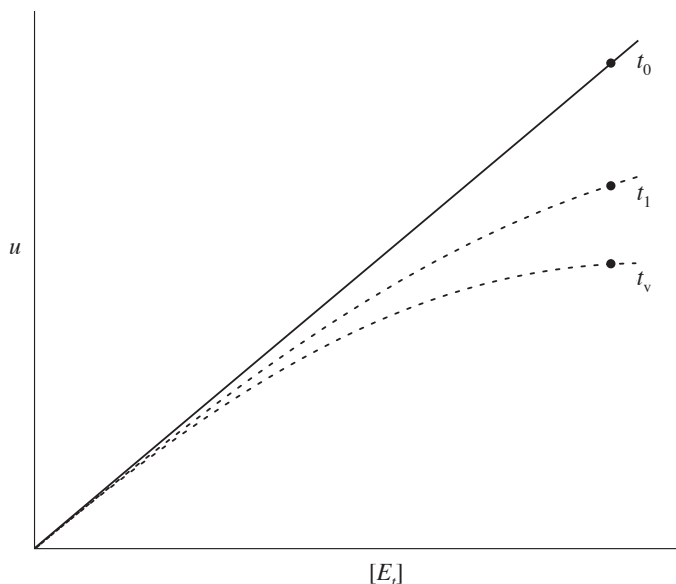
Οι τιμές u_0 προσδιορίζονται πειραματικά, ενώ οι τιμές $[S_0]$ είναι δεδομένες· άρα, μέσω της γραφικής παραστάσεως υπολογίζονται οι τιμές των K_m και V_{max} . Η ακρίβεια των τιμών K_m και V_{max} που προκύπτουν από τη γραφική παράσταση των διπλών αντιστρόφων είναι συζητήσιμη. (α). Λογισμικά πακέτα χάραξης ευθειών δίνουν μεγαλύτερο βάρος σε σημεία ζευγών ($u_0, [S]$) τα οποία αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές $[S]$, οι οποίες έχουν μεγαλύτερο πειραματικό σφάλμα (δυσκολότερος ο ακριβής υπολογισμός χαμηλών αρχικών ταχυτήτων). (β). Τυχόν πειραματικά σφάλματα μεγεθύνονται ανισόροπα, λόγω των χρησιμοποιούμενων αντίστροφων τιμών. (γ). Απόκλιση από τη γραμμικότητα είναι δυσκολότερα αντιληπτή, συγκριτικά με άλλες γραφικές παραστάσεις (π.χ. $[S]/u$ έναντι $[S]$ των Hanes & Wolff, και u έναντι $u/[S]$ των Eadie & Hofstee). Εν τούτοις, αυτή είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη γραφική παράσταση υπολογισμού των K_m και V_{max} .

Επίδραση της συγκέντρωσης ενζύμου στην ταχύτητα αντίδρασης. Στις περισσότερες ενζυμικές βιομηχανικές εφαρμογές, η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία καλείται να δράσει το ένζυμο είναι, για διάφορους λόγους, δεδομένη και συνήθως υψηλή. Συνεπώς, η συγκέντρωση του ενζύμου είναι εκείνη η οποία τελικά πρέπει να ρυθμισθεί κατάλληλα ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ταχύτητα αντίδρασης επί δεδομένης συγκέντρωσης υποστρώματος. Με βάση τα ανωτέρω, η παρούσα ενότητα εστιάζει στην επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου επί της ταχύτητας αντίδρασης για σταθερή και γνωστή συγκέντρωση υποστρώματος.

Κατ' αρχάς, θα πρέπει να καθοριστούν οι συμφέρουσες συνθήκες προσδιορισμού του ενζύμου (δραστηριότητας). Ειδικότερα, ο προσδιορισμός πρέπει να πραγματοποιείται σε υψηλή (ως προς K_m) συγκέντρωση υποστρώματος (άρα, είναι χρήσιμη η γνώση της K_m) και να βασίζεται σε αρχική ταχύτητα αντίδρασης (u_0). Αυτές οι συνθήκες είναι απαραίτητες προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγιστο αποτέλεσμα το οποίο θα μπορούσε να επιφέρει το ένζυμο, εξασφαλίζοντας τον ορθό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας του ενζύμου στο δείγμα. Τούτο εξηγείται στο Σχήμα 2.5, στο οποίο περιγράφεται η εξάρτηση

ΣΧΗΜΑ 2.5

Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως έναντι της ολικής συγκεντρώσεως ενζύμου $[E_t]$ για σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος. Οι μετρήσεις της ταχύτητας πραγματοποιούνται σε χρόνους t_0, t_1, \dots, t_v .



μεταξύ ταχύτητας (u) της ενζυμικής αντιδράσεως και της συνολικής συγκεντρώσεως ενζύμου (E_t), υπό σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος και τιμές της ταχύτητας σε διάφορους χρόνους αντιδράσεως. Υψηλότερη $[E_t]$ οδηγεί σε υψηλότερη u . Επιπλέον, οι τιμές των μετρήσεων οι οποίες έγιναν σε χρόνο πλησίον του t_0 , δηλαδή αμέσως με την έναρξη της αντιδράσεως, αντιστοιχούν στην αρχική ταχύτητα u_0 και η συνάρτησή τους με την $[E_t]$ είναι γραμμική. Συνεπώς, μόνον οι μετρήσεις ταχύτητας σε χρόνους t_0 παρέχουν ορθό ποσοτικό προσδιορισμό (των μονάδων) του ενζύμου, ενώ μετρήσεις οι οποίες γίνονται σε άλλους χρόνους υποτιμούν την ταχύτητα και τις ενζυμικές μονάδες οι οποίες αντιστοιχούν στην ίδια συγκέντρωση ενζύμου.

Η εξίσωση (2.7) είναι χρήσιμη διότι συνδέει τη συνολική συγκέντρωση ενζύμου $[E_t]$ με την αρχική ταχύτητα αντιδράσεως u_0 παρουσία οποιασδήποτε συγκεντρώσεως υποστρώματος $[S]$ και περιέχει τις σταθερές K_m και k_3 . (α) Εάν υποθέσουμε ότι $[S] \gg K_m$, η εξίσωση (2.7) γίνεται $u_0 = k_3[E_t] = V_{max}$. Συνεπώς, η u_0 σχετίζεται γραμμικά με τη $[E_t]$ με σταθερά αναλογίας ίση προς k_3 : είναι δε ανεξάρτητη από τη $[S]$. Στην περίπτωση αυτή, η σταθερά ταχύτητας αντιδράσεως k_3 ελέγχει την ταχύτητα της συνολικής αντιδράσεως, οπότε ονομάζεται και σταθερά καταλύσεως (k_{cat}): έχει δε φυσική σημασία και αποτελεί σταθερά του ενζύμου υπό συγκεκριμένες συνθήκες καταλύσεως. Ειδικότερα, η k_{cat} εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος τα οποία καταλύονται ανά μονάδα χρόνου (συνήθως δευτερόλεπτα) από ποσότητα ενζύμου η οποία αντιστοιχεί σε μια ενεργό περιοχή, δηλαδή ισούται με τον ονομαζόμενο αριθμό μετατροπής ή ανακυκλήσεως του ενζύμου. Οι τιμές του αριθμού μετατροπής είναι ενδεικτικές της ικανότητας της ενεργού περιοχής να λειτουργεί με χαμηλή (π.χ. $0,5 \text{ s}^{-1}$ για τη λυσοζύμη) ή υψηλή (π.χ. 600.000 s^{-1} για την καρβονική ανυδράση) ταχύτητα καταλύσεως. Ωστόσο, το εάν ένα ένζυμο λειτουργήσει με την όποια k_{cat} , τελικά, εξαρτάται από τις τιμές των K_m και $[S]$ (βλέπε κατωτέρω). (β) Όταν η $[S]$ λαμβάνει ενδιάμεσες τιμές, σύμφωνα με την (2.7), η u_0 σχετίζεται επίσης ευθέως με τη $[E_t]$, με σταθερά αναλογίας η οποία εξαρτάται από τις k_3 , $[S]$ και K_m . (γ) Τέλος, όταν $[S] \ll K_m$, τότε $[ES] \approx 0$, οπότε $[E_t] \approx [E]$ και η ταχύτητα αντιδράσεως περιγράφεται από την εξίσωση (2.10), η οποία αποτελεί απλοποιημένη μορφή της (2.7)

$$u_0 = [E_t][S] \frac{k_3}{k_m} \quad (2.10)$$

Συνεπώς, και στην περίπτωση αυτή, η u_0 σχετίζεται ευθέως με τη συγκέντρωση του ενζύμου, με σταθερά αναλογίας η οποία εξαρτάται από την $[S]$ και τον λόγο k_3/K_m (ονομάζεται *σταθερά εξειδικεύσεως* k_A του ενζύμου).

Με βάση τα ανωτέρω, συμπερασματικά, ισχύουν τα εξής:

- (i) Η ταχύτητα αντιδράσεως u_0 σχετίζεται ευθέως με τη συγκέντρωση του ενζύμου. Η σταθερά αναλογίας εξαρτάται από τη σταθερά k_3 .
- (ii) Σε υψηλές τιμές $[S]$, η k_3 (ή k_{cat}) δεν επηρεάζεται από τις $[S]$ και K_m .
- (iii) Σε ενδιάμεσες τιμές $[S]$, η k_3 επηρεάζεται από τις $[S]$ και K_m , και η επίδραση στη συνάρτηση u_0 vs $[E_t]$ παρέχεται από την εξίσωση (2.7).
- (iv) Σε χαμηλές τιμές $[S]$, η k_3 επίσης επηρεάζεται από τις $[S]$ και K_m , ωστόσο το ένζυμο βρίσκεται κυρίως σε ελεύθερη μορφή και η επίδραση στη συνάρτηση u_0 vs $[E]$ παρέχεται από την εξίσωση (2.10).
- (v) Παρότι k_3 και K_m αποτελούν σταθερές κάθε ενζύμου υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, η V_{max} δεν αποτελεί σταθερά, αλλά εξαρτάται από τη συγκέντρωση $[E_t]$ του ενζύμου.

Φυσιολογική αποδοτικότητα (PE) ενζύμου. Στο πλαίσιο της βιομηχανικής ενζυμικής καταλύσεως, επιθυμούμε τη χρησιμοποίηση ενζύμου που να εξασφαλίζει υψηλή ταχύτητα καταλύσεως για συγκεκριμένη δόση ενζύμου, στοχεύοντας στην επίτευξη του μέγιστου αποτελέσματος με την όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα ενζύμου. Προφανώς, στην περίπτωση κατά την οποία η λειτουργούσα $[S] > K_m$, ταχύτερη διεργασία αντιδράσεως επιτυγχάνεται από ένζυμο μεγαλύτερης k_3 (k_{cat}) (εξίσωση 2.5), σταθερά η οποία, στην περίπτωση αυτή, αποτελεί το κριτήριο επιλογής του ενζύμου μεταξύ διαφόρων υποψηφίων βιοκαταλυτών. Ωστόσο, σε βιομηχανικές εφαρμογές καταλύσεως συγκεκριμένων υποστρωμάτων, συχνά είτε το ένζυμο καλείται να λειτουργήσει σε ενδιάμεσες τιμές συγκεντρώσεως υποστρώματος, είτε τα διαθέσιμα ένζυμα για τη συγκεκριμένη εφαρμογή εμφανίζουν μέτρια συγγένεια για το υπόστρωμα (χαμηλός λόγος $[S]/K_m$). Στην περίπτωση αυτή, η επιλογή του καταλληλότερου ενζύμου γίνεται με βάση την εξίσωση 2.10 και την εξ αυτής απορρέουσα *φυσιολογική αποδοτικότητα* (*physiological efficiency, PE*) του ενζύμου. Αυτή ορίζεται ως ο λόγος V_{max}/K_m (και, κατ' επέκταση, k_{cat}/K_m) για κάθε ένζυμο, και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη ποσότητα αραιού ενζυμικού δείγματος/εκχυλίσματος. Η *PE*, περιέχοντας τη V_{max} , επηρεάζεται από τις τιμές των k_3 και $[E_0]$ είναι δε χρήσιμη στην επιλογή ενζύμου για βιομηχανική εφαρμογή. Υψηλότερη τιμή *PE* υποδηλώνει αποδοτικότερο ένζυμο με το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Πίνακας 2.1). Από τον πίνακα καθίσταται εμφανές ότι ταχύτερα ένζυμα είναι τα Θ, Ζ, Δ, Β με τις υψηλότερες τιμές $k_{cat}(V_{max})$. Ωστόσο, εκ των τεσσάρων, το πλέον *αποδοτικό* είναι το ένζυμο Θ, το οποίο διαθέτει και τη χαμηλότερη τιμή K_m , άρα την υψηλότερη συγγένεια για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, οδηγώντας στις υψηλότερες σχετικές τιμές *PE* ($200[S]$) και u_0 ($9,52[E_t]$). Ωστόσο, εάν για οιονδήποτε λόγο το ένζυμο Θ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, η ίδια ταχύτητα καταλύσεως θα μπορούσε να

επιτευχθεί χρησιμοποιώντας, λόγου χάριν, κάποιο από τα ένζυμα Δ ή Ζ σε ποσότητα $9,52/6,67 = 1,43[E_t]$ και $9,52/8,0 = 1,19[E_t]$, αντιστοίχως.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. Επιλογή ενζύμου για βιομηχανική εφαρμογή καταλύσεως χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τη *φυσιολογική αποδοτικότητα* ($PE = V_{max}/K_m$) και τον ισοδύναμο λόγο k_{cat}/K_m του ενζύμου. Οι τιμές K_m αποδίδονται σχετικά ως προς την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$, και οι τιμές k_{cat} αποδίδονται ως προς την k_{cat} του ενζύμου Α. Η σχετική τιμή της u_0 υπολογίζεται από την εξίσωση 2.7.

| Ένζυμο | $k_{cat}(k_3)$ | K_m | k_{cat}/K_m | u_0 |
|--------|----------------|-----------|---------------|-------------|
| A | 1 | $[S]$ | $1/[S]$ | $0,5[E_t]$ |
| B | 10 | $[S]$ | $10/[S]$ | $5[E_t]$ |
| Γ | 2 | $0,5[S]$ | $4/[S]$ | $1,33[E_t]$ |
| Δ | 10 | $0,5[S]$ | $20/[S]$ | $6,67[E_t]$ |
| E | 1 | $0,25[S]$ | $4/[S]$ | $0,8[E_t]$ |
| Z | 10 | $0,25[S]$ | $40/[S]$ | $8[E_t]$ |
| H | 2 | $0,05[S]$ | $40/[S]$ | $1,90[E_t]$ |
| Θ | 10 | $0,05[S]$ | $200/[S]$ | $9,52[E_t]$ |

2.1.3 Φάση III: μη γραμμικό και κύριο τμήμα της ενζυμικής αντιδράσεως

Γενικευμένη εξίσωση της ταχύτητας αντιδράσεως και κλάσμα μετατροπής. Κατά τη φάση III, η αρχική ταχύτητα ελαττώνεται σταδιακά, άρα και ο λόγος $d[S]/dt$ λαμβάνει συνεχώς μικρότερες τιμές. Τούτο συμβαίνει ακόμη και όταν διατηρείται πλήρως η ενζυμική δραστηριότητα: είναι δε ενδεικτικό της μείωσης της συγκεντρώσεως του υποστρώματος, της προσέγγισης του σημείου ισορροπίας και της λειτουργίας της αντίστροφης αντιδράσεως. Όπως έχει ήδη επισημανθεί, τα ένζυμα, ως καταλύτες, αδυνατούν να επέμβουν και να μεταποτίσουν το σημείο ισορροπίας της αντιδράσεως. Μπορούν, όμως, να επιταχύνουν τη διαδικασία επιτεύξεως της ισορροπίας.

Στη βιομηχανία, συνήθως, η ενζυμική αντίδραση οδηγείται σε μέγιστη μετατροπή, ώστε να μεγιστοποιείται η απόδοση σε προϊόν ή, γενικότερα, να ελέγχεται και να εξασφαλίζεται το εκάστοτε επιθυμητό ποσοστό μετατροπής. Προς τούτο πρέπει να είναι γνωστοί η συγκέντρωση του ενζύμου και ο απαιτούμενος χρόνος, προκειμένου υπόστρωμα γνωστής αρχικής συγκεντρώσεως $[S_0]$ να μετατραπεί κατά συγκεκριμένη ποσότητα. Ας υποθεθεί ότι η $[S_0]$ μεταβάλλεται ύστερα από χρόνο t σε $[S]$. Από τις γνωστές εξισώσεις $u = d[S]/dt$ και (2.7) έπεται η εξίσωση

$$k_3[E_t] dt = \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) d[S] \quad (2.11)$$

και ολοκληρώνοντας

$$k_3[E_t] \int dt = K_m \int (1/S) d[S] + \int d[S] \quad (2.12)$$

στα διαστήματα t_0, t και $[S_0], [S]$ λαμβάνονται διαδοχικά οι εξισώσεις

$$k_3[E_t]t = K_m \ln([S_0]/[S]) + ([S_0] - [S]) \quad (2.13)$$

$$t = \frac{([S_0] - [S]) + K_m \ln\left(\frac{[S_0]}{[S]}\right)}{k_3[E_t]} \quad (2.14)$$

Από την εξίσωση (2.14) φαίνεται ότι ο απαιτούμενος χρόνος προκειμένου να μετατραπεί υπόστρωμα συγκεντρώσεως $[S_0]$ σε $[S]$, για δεδομένη και σταθερή συνολική συγκέντρωση ενζύμου $[E_t]$, εξαρτάται από τις σταθερές K_m και k_3 . Ο λόγος $([S_0] - [S])/[S_0]$ ορίζεται ως *μετατροπή* ή *κλάσμα μετατροπής* X (< 1), οπότε λαμβάνεται η εξίσωση (2.15)

$$t = \frac{([S_0]X + K_m \ln\left(\frac{1}{1-X}\right))}{k_3[E_t]} \quad (2.15)$$

Η εξίσωση (2.15), επίσης, είναι χρήσιμη επειδή επιτρέπει τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας (δόσης) λειτουργικού ενζύμου ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένη μετατροπή X εντός επιθυμητού χρόνου t από γνωστή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος $[S_0]$.

Σύγκριση αποδοτικότητας ενζύμων και λόγος K_m/V_{max} ($1/PE$). Αν στην εξίσωση (2.14) υποθεθεί ότι $[S] = [S_0]/2$ και $k_3[E_t] = V_{max}$, τότε $t = t_{1/2}$, οπότε

$$t_{1/2} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \ln 2 + \frac{[S]}{2V_{max}} \quad (2.16)$$

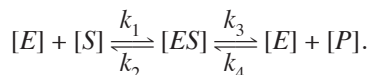
όπου $t_{1/2}$ είναι ο *χρόνος υποδιπλασιασμού* ή *ημιζωής* ενός συγκεκριμένου υποστρώματος παρουσία ενζύμου. Για να γίνει σύγκριση μεταξύ ενζύμων γνωστής συγκεντρώσεως, προκειμένου να επιλεγεί το αποδοτικότερο με συγκεκριμένο υπόστρωμα, θα πρέπει κατά τους προσδιορισμούς να χρησιμοποιηθεί *χαμηλή* (ως προς K_m) συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$, ώστε προσεγγιστικά να ισχύει $[S]/2V_{max} \approx 0$. Τότε η (2.16) λαμβάνει τη μορφή

$$t_{1/2} = 0,7 \frac{K_m}{V_{max}} \approx \frac{1}{PE} \quad (2.17)$$

όπου ο λόγος K_m/V_{max} αποτελεί το *αντίστροφο* της φυσιολογικής αποδοτικότητας ($1/PE$) του ενζύμου. Η εξίσωση (2.17) εφαρμόζεται στην κατά προσέγγιση σύγκριση της αποδοτικότητας ενζύμων με κάποιο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Όσο μικρότερος είναι ο χρόνος ημιζωής του συγκεκριμένου υποστρώματος παρουσία ενζύμου, τόσο μεγαλύτερη είναι η αποδοτικότητα του ενζύμου με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Χαρακτηριστικό του απλουστευμένου και εύκολου αυτού τρόπου συγκρίσεως ενζύμων μέσω του $t_{1/2}$ είναι ότι δεν προϋποθέτει τη γνώση των K_m και V_{max} . Συνεπώς, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τον $t_{1/2}$ είναι δυνατή μια πρώτη εκτίμηση της καταλληλότητας ενός ενζύμου, μεταξύ πολλών υποψηφίων, για κάποια συγκεκριμένη βιομηχανική εφαρμογή.

2.2 ΕΚΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ (K_{eq}).

Πολλές ενζυμικές αντιδράσεις είναι και πρακτικά αντιστρέψιμες, συνεπώς έχει νόημα ο προσδιορισμός της σταθεράς ισορροπίας K_{eq} της αντιδράσεως. Στην περίπτωση αυτή, το πρότυπο ισορροπίας της ενότητας 2.1.1 λαμβάνει τη μορφή



Σε κατάσταση ισορροπίας, οι ταχύτητες προς τις δύο κατευθύνσεις είναι ίσες, οπότε ισχύει ότι $k_1[E][S] = k_2[ES]$ και $k_4[E][P] = k_3[ES]$. είναι δε

$$K_{eq} = \frac{k_1 k_3}{k_2 k_4} \quad (2.18)$$

Επειδή οι σταθερές ταχύτητας k_{1-4} δύσκολα προσδιορίζονται, η K_{eq} εκφράζεται μέσω των K_m και V_{max} , όπως αυτές αντιστοιχούν στις δύο κατευθύνσεις αντιδράσεως ($r =$ προς τα δεξιά και $\ell =$ προς τα αριστερά)

$$\frac{V_{max(r)}}{V_{max(\ell)}} = \frac{k_3[E_t]}{k_2[E_t]} = \frac{k_3}{k_2} \quad (2.19)$$

επίσης $K_{m(r)} = (k_2 + k_3)/k_1$ και $K_{m(\ell)} = (k_2 + k_3)/k_4$, άρα

$$\frac{K_{m(\ell)}}{K_{m(r)}} = \frac{k_1}{k_4} \quad (2.20)$$

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις (2.19) και (2.20) στην εξίσωση (2.18), έπεται η εξίσωση (2.21) του Haldane, η οποία παρέχει τη σταθερά ισορροπίας μέσω των K_m και V_{max} :

$$K_{eq} = \frac{V_{max(r)} K_{m(\ell)}}{V_{max(\ell)} K_{m(r)}} \quad (2.21)$$

Από αυτή καθίστανται εφικτοί ο υπολογισμός της ποσοστιαίας συστάσεως και η αναλογία των προϊόντων στο σημείο ισορροπίας, γεγονός σημαντικό σε βιομηχανικές βιομετατροπές στις οποίες εμπλέκονται ένζυμα.

2.3 ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Γενικά, είναι αποδεκτό ότι μόνο μία μικρή περιοχή (*ενεργός περιοχή*) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία· ένας δε κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές, ώστε να δεσμεύει και να

δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια τούτου είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία η οποία αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά, καθώς και μία η οποία αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστικότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή. Οι δύο άριστες συνθήκες συνήθως δεν συμπίπτουν· μάλιστα δε οι άριστες σταθερότητας παρουσιάζουν πλατύτερο εύρος τιμών συγκριτικά με τις άριστες δραστικότητας.

Η σταθερότητα ενός ενζύμου έχει μεγάλη σημασία για τη βιομηχανική ενζυμολογία. Εκτός από τη δυνατότητα ακινητοποιήσεως (καθηλώσεως) του ενζύμου σε στερεή φάση (κεφάλαιο 5), σταθεροποίηση είναι δυνατόν να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας το ένζυμο σε περιβάλλον με αυξημένη συγκέντρωση υποστρώματος. Αυτό, συχνά, παρέχει τη δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής του ενζύμου σε διεργασίες αυξημένης θερμοκρασίας, εάν παράλληλα χρησιμοποιηθεί υψηλή $[S]$. Επίσης, ορισμένα μεταλλοϊόντα είναι δυνατόν να δράσουν, εκτός από *ενεργοποιητές* (ουσίες απαραίτητες για ενεργοποίηση του ενζύμου, ώστε να δρα καταλυτικά), και ως *σταθεροποιητές*. Λόγου χάριν, η *α-αμυλάση* από διαφορετικά βακτήρια εμφανίζει αυξανόμενη σταθερότητα για αυξανόμενη $[Ca^{2+}]$ συναρτήσει του χρόνου επώασεως.

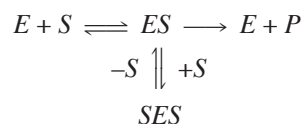
Αναστολείς (παρεμποδιστές) θεωρούνται ενώσεις οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δεσμεύσεως επί του ενζυμικού μορίου. Οι αναστολείς διακρίνονται σε *αντιστρεπτούς* και *μη αντιστρεπτούς*. Οι *αντιστρεπτοί αναστολείς* δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστικότητά του όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντιδράσεως παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντιδράσεως και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις *αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος*. Αντίθετα, οι *μη αντιστρεπτοί αναστολείς* δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (π.χ. σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά.

Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, π.χ. *συναγωνιστική, ασυναγωνιστική (ανταγωνιστική), μεικτή, μη συναγωνιστική, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική*. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης η οποία βασίζεται στην αρχική αντίδραση (για αναλυτική παρουσίαση της κινητικής και αναστολής των ενζύμων ως και της αλληλεπιδράσεώς τους με ενώσεις-στόχους, σε μοριακό επίπεδο, βλέπε το βιβλίο του συγγραφέα με τίτλο *Ενζυμολογία*, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, 2018). Αντίθετα, στην εφαρμοσμένη ενζυμολογία το ενδιαφέρον εστιάζεται στη συνολική αντίδραση και την επίδραση του αναστολέα σε αυτή, πολύ λιγότερο δε στον μηχανισμό αναστολής. Τα πλέον ενδιαφέροντα είδη αντιστρεπτής αναστολής για την εφαρμοσμένη ενζυμολογία είναι τα εξεταζόμενα στη συνέχεια. Σημειώνεται ότι, στις περισσότερες ενζυμικές τεχνολογικές εφαρμογές, οι ενώσεις οι οποίες προκαλούν αναστολή είναι δυνατόν να ελεγχθούν και να απομακρυνθούν από το ενζυμικό περιβάλλον – ή, τουλάχιστον, να μειωθεί δραστικά η παρεμπόδιση την οποίαν προξενούν στην αντίδραση.

2.3.1 Υπόστρωμα και προϊόν ως αναστολείς του ενζύμου

Δύο περιπτώσεις αναστολής του ενζύμου οφείλονται στην υψηλή συγκέντρωση είτε υποστρώματος, S , είτε προϊόντος, P .

Αναστολή του ενζύμου από υπόστρωμα. Η περίπτωση της ενζυμικής αναστολής από υπόστρωμα είναι αντίστοιχη της ονομαζόμενης *ασυναγωνιστικής αναστολής* (ο αναστολέας δεσμεύεται μόνον στο σύμπλοκο ES και όχι στο ελεύθερο ένζυμο) ως προς το ότι υψηλή $[S]$ οδηγεί σε δέσμευση και δεύτερου μορίου υποστρώματος στο ενζυμικό μόριο, σύμφωνα με το ακόλουθο πρότυπο ισορροπίας



K_s είναι η σταθερά αναστολής ή σταθερά διασάσεως του συμπλόκου υποστρώματος-ενζύμου και υποστρώματος, SES : ισούται δε προς $[ES][S]/[SES]$ και υπολογίζεται από τη γραφική παράσταση $1/u_s$ προς $[S]$ (Σχήμα 2.6α), της οποίας το γραμμικό τμήμα, προεκτεινόμενο, τέμνει τον άξονα των τετμημένων ($[S]$) στο σημείο $-K_s$. Η ταχύτητα u_s της ενζυμικής αντιδράσεως σε αναστολή από υπόστρωμα δίδεται από την εξίσωση

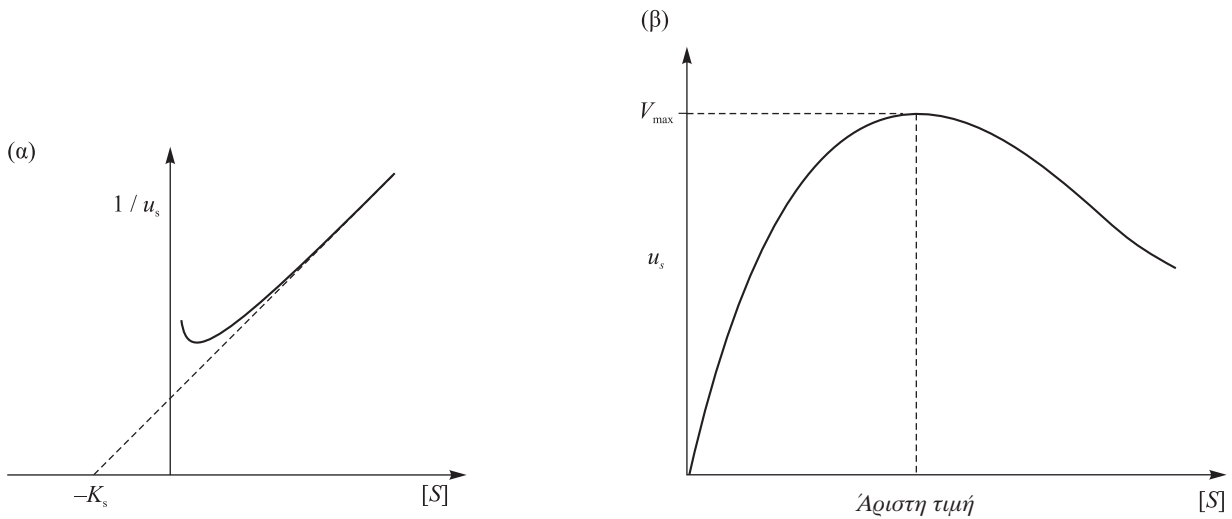
$$u_s = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_s} \right)} \quad (2.22)$$

Όταν η $[S]$ λαμβάνει χαμηλές τιμές, το φαινόμενο της αναστολής δεν εμφανίζεται, ο δε παράγων $[S]$ είναι αμελητέος και η εξίσωση (2.22) λαμβάνει τη συνηθισμένη μορφή (2.8). Αντίθετα, όταν η $[S]$ είναι υψηλή συγκριτικά με την K_m , τότε αμελητέος καθίσταται ο παράγων K_m και η εξίσωση (2.22) γίνεται

$$u_s = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (2.23)$$

από την οποία έπεται ότι η ταχύτητα αντιδράσεως ελαττώνεται καθώς αυξάνεται η $[S]$. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται στο Σχήμα 2.6β, σύμφωνα με το οποίο παρατηρείται σταδιακή ελάττωση της ταχύτητας αντιδράσεως καθώς η συγκέντρωση υποστρώματος αυξάνεται πέρα από την *άριστη τιμή* στην οποία αντιστοιχεί η μέγιστη ταχύτητα V_{\max} , άρα αυξάνεται και ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος μετατροπής του υποστρώματος. Για τιμές $[S]$ μεγαλύτερες από την άριστη, το υπόστρωμα αρχίζει να συμπεριφέρεται ως αναστολέας της ενζυμικής δραστηριότητας, ενώ για τιμές μικρότερες από την άριστη εμφανίζει κανονική συμπεριφορά. Από μια τέτοια απλή γραφική παράσταση προσδιορίζεται η άριστη τιμή της συγκεντρώσεως υποστρώματος για αντίδραση ενζύμου το οποίο εμφανίζει το φαινόμενο αναστολής από υπόστρωμα.

Ο απαιτούμενος χρόνος t ώστε γνωστή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος-αναστολέα $[S_0]$ να μετατραπεί σε $[S]$ παρουσία ενζύμου συγκεντρώσεως $[E_0]$ υπολογίζεται από την εξίσωση (2.24)

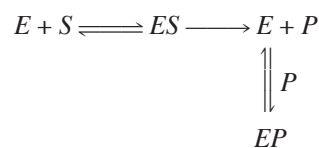


$$t = \frac{([S_0] - [S]) + \frac{[S_0]^2 - [S]^2}{2K_s} + K_m \ln\left(\frac{[S_0]}{[S]}\right)}{k_3 [E_t]} \quad (2.24)$$

Αν η αρχική συγκέντρωση $[S_0]$ είναι ίση με την άριστη τιμή (Σχήμα 2.6β), τότε ο υπολογιζόμενος χρόνος t θα είναι ο ελάχιστος.

Ένα παράδειγμα το οποίο καταδεικνύει την πρακτική σημασία της ενζυμικής αναστολής από υπόστρωμα είναι η περίπτωση του αντιβιοτικού καρβοξυβενζυλο-πενικιλίνης. Αν και υδρολύεται από το ένζυμο β-λακταμάση (πενικιλινάση) και αδρανοποιείται ως αντιβιοτικό, τελικά, κατέστη το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο έναντι μολύνσεων από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*. Όταν χορηγείται με ένεση στις απαιτούμενες δόσεις, επιτυγχάνεται υψηλή συγκέντρωση στο αίμα. Τότε, λόγω του φαινομένου αναστολής από υπόστρωμα επί της β-λακταμάσης του μικροοργανισμού, επέρχεται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να παραμένει στον οργανισμό του ασθενούς δραστικό επί μακρόν κατά του βακτηρίου. Ωστόσο, στη βιομηχανία, η ενζυμική αναστολή από υπόστρωμα συχνά αποτελεί σημαντικό πρόβλημα το οποίο απαγορεύει την εφαρμογή κατά το δυνατόν υψηλής $[S_0]$, συνθήκη επιθυμητή σε πολλές περιπτώσεις αντιδράσεων βιομηχανικών βιομετατροπών.

Αναστολή του ενζύμου από προϊόν. Η περίπτωση της ενζυμικής αναστολής από προϊόν δεν αποτελεί πρόβλημα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες σε κινητικές μελέτες λαμβάνεται η αρχική ταχύτητα· περιγράφεται δε από το εξής πρότυπο ισορροπίας



ΣΧΗΜΑ 2.6

(α) Γραφική παράσταση του αντιστρόφου της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης ($1/u_s$) έναντι της συγκέντρωσης υποστρώματος ($[S]$) για αντίδραση ευρισκόμενη σε αναστολή από υπόστρωμα (β) Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης (u_s) έναντι της συγκέντρωσης υποστρώματος ($[S]$) για αντίδραση ευρισκόμενη σε αναστολή από υπόστρωμα. V_{\max} = μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης, K_s = σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου SES.

K_p είναι η σταθερά αναστολής ή σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ενζύμου και προϊόντος, EP , και ισούται προς $[E][P]/[EP]$ · η δε ταχύτητα u_p τής ενζυμικής αντιδράσεως σε αναστολή από προϊόν δίδεται από την εξίσωση

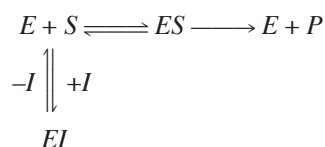
$$u_p = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_p} \right)} \quad (2.25)$$

Η ενζυμική αναστολή από το προϊόν αποτελεί εκλεκτική παρεμπόδιση της προς τα εμπρός (δεξιά) αντιδράσεως λόγω συσσωρεύσεως προϊόντος και δεν σχετίζεται με τη μετακίνηση της ισορροπίας μεταξύ υποστρώματος και προϊόντος λόγω αυξήσεως της αντίστροφης αντιδράσεως. Το ανωτέρω φαινόμενο ενδέχεται να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα βιομηχανικών ενζυμικών εφαρμογών στις οποίες απαιτείται υψηλή βιομετατροπή. Λόγου χάριν, η ενζυμική υδρόλυση του δισακχαρίτη του γάλακτος λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο *λακτάση* (*β-γαλακτοζιτάση*) βρίσκεται σε αναστολή από το προϊόν γαλακτόζη.

2.3.2 Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή του ενζύμου

Οι εν λόγω περιπτώσεις αφορούν σε μόρια-αναστολείς τα οποία δεσμεύονται κατά τρόπο *αντιστρέψιμο* με το ένζυμο και παρεμποδίζουν την καταλυτική του αντίδραση. Ωστόσο, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστικότητά του μετά την απομάκρυνση του αναστολέα. Αν στην αντίδραση είναι παρών ένας αναστολέας I , τότε η ταχύτητα της υπό αναστολή ενζυμικής αντιδράσεως δίδεται από τις εξισώσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια, ανάλογα με τον τύπο της αναστολής.

Συναγωνιστική αναστολή. Η περίπτωση της *συναγωνιστικής αναστολής* περιγράφεται από το εξής πρότυπο ισορροπίας



K_i είναι η σταθερά αναστολής ή σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI , και ισούται προς $[E][I]/[EI]$ · η δε ταχύτητα της αντιδράσεως δίδεται από την εξίσωση

$$u_i = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (2.26)$$

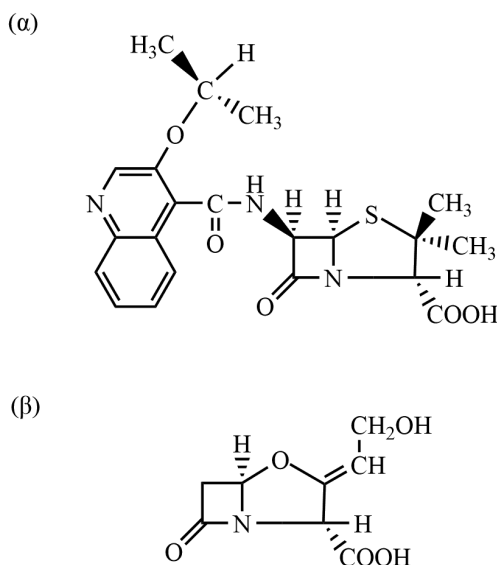
Ο αναστολέας έχει δομή παρόμοια με εκείνην του υποστρώματος και δεσμεύεται στο ένζυμο στη θέση του υποστρώματος, δηλαδή αναστολέας και υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση του ενζύμου. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η βιομηχανική βιομετατροπή του σιροπιού γλυκόζης σε εκείνο της φρουκτόζης από το ένζυμο *ισομεράση γλυκόζης*. Το αρχικό υπό-

στρώμα γλυκόζης περιέχει και λίγη σορβιτόλη (προέρχεται ως πρόσμειξη του ενζύμου *γλυκοαμυλάσης* που χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκόζης από άμυλο) η οποία συμπεριφέρεται ως συναγωνιστικός αναστολέας της ισομεράσης γλυκόζης έναντι της γλυκόζης με την οποία έχει παρόμοια δομή. Εάν χρησιμοποιηθεί υψηλή συγκέντρωση γλυκοαμυλάσης, προκειμένου να ολοκληρωθεί η παραγωγή γλυκόζης σύντομα (< 12 ώρες), η συγκέντρωση σορβιτόλης στο σιρόπι γλυκόζης θα είναι αρκούτως υψηλή ώστε να παρεμποδίζεται η αντίδραση της ισομεράσης γλυκόζης.

Η μόνη διαφορά μεταξύ της εξίσωσης (2.8), η οποία περιγράφει κινητική χωρίς αναστολή, και της (2.26) είναι ότι *στη συναγωνιστική αναστολή η παρουσία αναστολέα συγκεντρώσεως [I] αυξάνει την K_m κατά $1 + ([I]/K_i)$, ενώ η V_{max} παραμένει αμετάβλητη*. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι $u = d[S]/dt$, τελικά, προκύπτει η εξίσωση (2.27) ως γενικευμένη μορφή της (2.26). Η γενικευμένη εξίσωση επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου αντιδράσεως t_i παρουσία αναστολέα συγκεντρώσεως [I]:

$$t_i = \frac{([S_0] - [S]) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \ln\left(\frac{[S_0]}{[S]}\right)}{k_3 [E_t]} \quad (2.27)$$

Η ανωτέρω εξίσωση είναι χρήσιμη, π.χ. για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας νέων ημισυνθετικών πενικιλινικών αναλόγων να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου *β-λακταμάσης*, τα οποία ομοιάζουν δομικά της φυσικής πενικιλίνης, υποστρώματος του ενζύμου (π.χ. Σχήμα 2.7α). Το ένζυμο παράγεται φυσικά από τον μικροοργανισμό και υδρολύει τον β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού. Συνεπώς, θεωρείται ότι σε αυτό οφείλεται η αναποτελεσματικότητα της φυσικής πενικιλίνης έναντι ορισμένων βακτηρίων. Η εκτίμηση νέων ημισυνθετικών πενικιλινικών αναλόγων γίνεται με κριτήριο τη σταθερά αναστολής K_i του συμπλόκου τους με τη β-λακταμάση. Ημισυνθετικό πενικιλινικό ανάλογο (π.χ. Σχήμα 2.7α) με συγκριτικά χαμηλότερη K_i εμφανίζεται συγκριτικά αποτελεσματικότερο ως αναστολέας I της β-λακταμάσης,



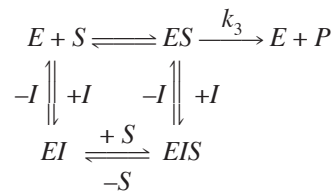
ΣΧΗΜΑ 2.7

Δομές ημισυνθετικών πενικιλινικών αναλόγων, αναστολέων της β-λακταμάσης.

(α) Συναγωνιστικός (αντιστρεπτός) αναστολέας BRL-1437 και (β) μη αντιστρεπτός αναστολέας (αδρανοποιητής) κλαβουλανικό οξύ.

διότι, ευρισκόμενο ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση, οδηγεί σε αύξηση της K_m του συμπλόκου β -λακταμάσης-πενικιλίνης, ίσης προς $(1 + [I]/K_i)$, ικανής να επιμηκύνει τον χρόνο ο οποίος απαιτείται για να ελαττωθεί στο αίμα μια τυπική αρχική συγκέντρωση πενικιλίνης $[S_0]$ σε $[S]$ (η $[S]$ θα πρέπει να είναι λίγο μεγαλύτερη από την ελάχιστη δόση για αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση). Ο χρόνος t_i θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον χρόνο διπλασιασμού του βακτηρίου, με αποτέλεσμα η πενικιλίνη να προλάβει να δράσει ανασταλτικά στο ένζυμο *καρβοξυπεπτιδάση D-αλανίνης* που μετέχει στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαιρέσεως.

Μη συναγωνιστική αναστολή. Η περίπτωση της *μη συναγωνιστικής αναστολής* περιγράφεται από το εξής πρότυπο ισορροπίας:



K_i είναι οι σταθερές αναστολής ή οι σταθερές διαστάσεως των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, EI , και ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος, EIS , και ισούνται προς $[E][I]/[EI]$ και $[ES][I]/[EIS]$, αντίστοιχα: είναι δε μεταξύ τους ίσες. Η μη συναγωνιστική αναστολή αποτελεί υποπερίπτωση της ονομαζόμενης *μεικτής αναστολής* στην οποία τα δύο ενζυμικά σύμπλοκα, γενικά, έχουν διαφορετικές σταθερές K_i . Η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη συναγωνιστική αναστολή δίδεται από την εξίσωση

$$u_i = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \cdot \frac{[S]}{(K_m + [S])} \quad (2.28)$$

Ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε θέση διαφορετική από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο. Αυτό συνεπάγεται ότι το σύμπλοκο ES σχηματίζεται μέσω διαφορετικών ισορροπιών και δεν ισχύει η υπόθεση ότι το στάδιο ελέγχου (περιορισμού) της αντιδράσεως καθορίζεται από τη σταθερά k_3 . Είναι εμφανές ότι η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη συναγωνιστική αναστολή ούδέποτε θα φθάσει την τιμή V_{\max} της αντιδράσεως χωρίς αναστολή. Η διαφορά μεταξύ της εξίσωσής (2.8), η οποία περιγράφει κινητική χωρίς αναστολή, και της (2.28) είναι ότι *στη μη συναγωνιστική αναστολή η παρουσία αναστολέα συγκεντρώσεως $[I]$ μειώνει τη μέγιστη ταχύτητα V_{\max} κατά $1 + ([I]/K_i)$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη*. Επειδή στη συναγωνιστική αναστολή η σταθερά K_m αυξάνεται κατά την ίδια ποσότητα, $1 + ([I]/K_i)$, η γενικευμένη εξίσωση για τη μη συναγωνιστική αναστολή είναι επίσης η (2.27), όπως και προηγουμένως. Συνεπώς, είναι αδύνατον να αποκαλυφθεί το είδος της αναστολής βάσει της συνολικής αντιδράσεως (εξίσωση 2.27), κάτι το οποίο είναι εφικτό εάν εφαρμοσθεί κινητική μελέτη χρησιμοποιώντας αρχική ταχύτητα αντιδράσεως. Σημειώνεται ότι είναι σχετικά σπάνιες οι περιπτώσεις ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ενός υπο-

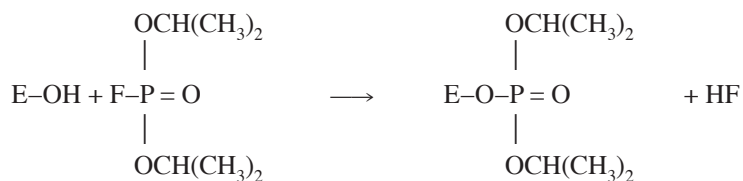
στρώματος και επιδεικνύουν μη συναγωνιστική αναστολή. Αν και η δέσμευση μεταλλοκατιόντων σε ορισμένα ένζυμα εμφανίζεται να ακολουθεί τέτοιο είδος αναστολής, ενδεχομένως σε κάποιες περιπτώσεις να πρόκειται περί *μη αντιστρεπτής αναστολής* (ενότητα 2.3.3), αφού αυτά τα δύο είδη αναστολής συχνά σχεδόν συμπίπτουν στα κινητικά τους δεδομένα.

2.3.3 Μη αντιστρεπτή αναστολή (αδρανοποίηση) του ενζύμου

Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας-αδρανοποιητής δεσμεύεται στο ένζυμο με ομοιοπολικό (χημικό) δεσμό κατά τρόπο πρακτικά μη αντιστρέψιμο. Λόγου χάριν, αλκυλιωτικά αντιδραστήρια (π.χ. ιωδοξικό οξύ, ιωδοακεταμίδιο), αντιδρούν με τη σουλφυδρυλομάδα (ως θειολοανιών) κυστεϊνών του ενζύμου (E) ως ακολούθως:



ενώ διάφορες δραστικές οργανοφωσφορικές ενώσεις (π.χ. δισοπροπυλο-φθοριοφωσφορικό οξύ, DFP) αντιδρούν με την υδροξυλομάδα της σερίνης, οδηγώντας το ένζυμο (E = ένζυμο) σε αδρανοποίηση, με την προϋπόθεση ότι τα εν λόγω αμινοξέα είναι απαραίτητα για την καταλυτική λειτουργία



Εάν ο αναστολέας βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση $[I_i]$ μικρότερη από τη συνολική συγκέντρωση του ενζύμου $[E_t]$, τότε η διαφορά $[E_t] - [I_i]$ θα ισούται με τη συγκέντρωση του ενζύμου $[E]$ το οποίο παραμένει δραστικό και, φυσικά, αντιδρά με το υπόστρωμα χωρίς να επηρεάζεται η K_m . Εάν η αναστολή γίνεται παρουσία υποστρώματος, τότε η μέγιστη ταχύτητα V_{max} θα ελαττωθεί σε V_{max_i} , σύμφωνα με την εξίσωση (2.29)

$$V_{max_i} = V_{max} [E_t] \left(1 - \frac{[I]}{[E_t]} \right) \quad (2.29)$$

Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του δραστικού ενζύμου. Η ποιοτική διαφορά μεταξύ *μη αντιστρεπτής* και *μη συναγωνιστικής* αναστολής είναι η μη αντιστρεψιμότητα της ελάττωσης της ενζυμικής δραστηριότητας (συγκεντρώσεως δραστικού ενζύμου) στην πρώτη περίπτωση, σε αντίθεση με τη δεύτερη. Ποσοτικές διαφορές μεταξύ *μη συναγωνιστικής* και *μη αντιστρεπτής* αναστολής είναι οι εξής: (α) κάθε αντιστρεπτή αναστολή εμφανίζεται γρήγορα από την αρχική φάση *I* της αντιδράσεως κατά την ισορροπία μεταξύ *E*, *S* και *I*, ενώ η μη αντιστρεπτή αναστολή εξελίσσεται αργά και σταδιακά, εκτείνεται στη φάση *II* της αντιδράσεως και ολοκληρώνεται εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί όλη η ποσότητα αδρανοποιητή ή ενζύμου· και (β) η ποσότητα κατά την οποία ελαττώνεται στις δύο περιπτώσεις η V_{max} είναι διαφορετική (εξισώσεις 2.28 και 2.29), αντίστοιχα κατά $1 + ([I]/K_i)$ και $[E_t]\{1 - ([I]/[E_t])\}$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη.

Ένα σημαντικό παράδειγμα μη αντιστρεπτού αναστολέα (αδρανοποιητή) της β-λακταμάσης είναι το κλαβουλανικό οξύ (Σχήμα 2.7β). Προκειμένου να αξιολογηθούν συνθετικές πρόδρομες ενώσεις οι οποίες, τελικά, οδήγησαν στο κλαβουλανικό οξύ, εξετάστηκαν διάφορες αραιώσεις κάθε προδρόμου ενώσεως η οποία είχε προστεθεί στο υγρό μέσο βακτηριακής καλλιέργειας (περιείχε και το ένζυμο β-λακταμάση), συναρτήσει του χρόνου υδρολύσεως σταθερής συγκεντρώσεως φυσικής βενζυλο-πενικιλίνης από το ένζυμο. Μικρότερες αραιώσεις της προδρόμου ενώσεως (αδρανοποιητή του ενζύμου) οδηγούσαν σε επιμήκυνση του χρόνου υδρολύσεως της βενζυλο-πενικιλίνης. Συνεπώς, για $[I] > [E_i]$, δοθέντος ικανού χρόνου, επιτυγχάνεται πάντα πλήρης αδρανοποίηση της β-λακταμάσης. Ωστόσο, ο απαιτούμενος χρόνος για αδρανοποίηση του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκεντρώσεως του αδρανοποιητή.

2.4 ΦΥΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ENZYMΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

2.4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως. Μια απλή προσέγγιση για τη μελέτη επιδράσεως της θερμοκρασίας είναι μέσω της εξισώσεως του Arrhenius (2.30), η οποία περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας (T) στη σταθερά ταχύτητας διασπάσεως (k_3) του ES σε προϊόν και ελεύθερο ένζυμο, έχει δε ως εξής:

$$k_3 = A \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (2.30)$$

και από την οποία προκύπτει ότι

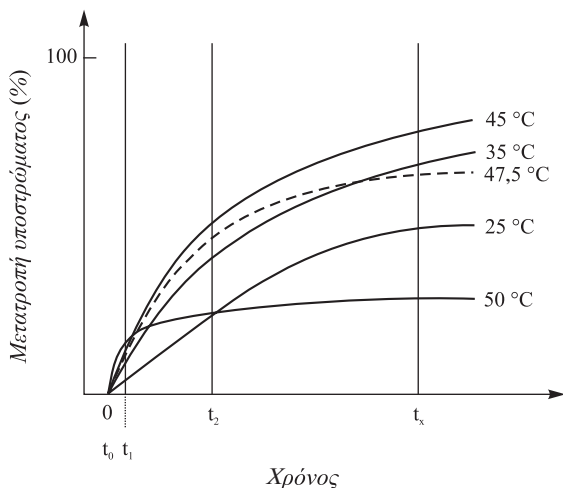
$$\log k_3 = \log A - \frac{E_a}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.31)$$

όπου

- A παράγων συχνότητας ή προεκθετικός παράγων,
- k_3 σταθερά ταχύτητας αντιδράσεως,
- R σταθερά αερίων,
- T απόλυτη θερμοκρασία,
- E_a ενέργεια ενεργοποιήσεως.

Τα A και E_a υπολογίζονται πειραματικά, χρησιμοποιώντας τη γραφική παράσταση $\log k_3$ έναντι $1/T$, με κλίση ίση προς $-E_a/2,303R$ και σημείο τομής με τον άξονα των τετμημένων ίσο προς $\log A$. Επειδή για τα περισσότερα ένζυμα η τιμή της E_a κυμαίνεται από 4 έως 20 kcal · mol⁻¹, εξάγεται (εξίσωση 2.31) ότι για καθέναν βαθμό αυξήσεως της θερμοκρασίας η ταχύτητα καταλύσεως αυξάνεται κατά 10% περίπου. Τα περισσότερα ένζυμα όταν είναι διαλυτοποιημένα in vitro δεν είναι ιδιαίτερος σταθερά με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός το οποίο διαπιστώνεται με την προοδευτική αδρανοποίησή τους συναρτήσει της αυξήσεως της θερμοκρασίας.

Τα ένζυμα είναι αρκετά σταθερά τόσο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον όσο και απομονωμένα σε καθαρή και κρυσταλλική μορφή. Μάλιστα, ορισμένα



ΣΧΗΜΑ 2.8

Επίδραση της θερμοκρασίας στην καταλυτική αντίδραση β-γαλακτοζιτάσης (λακτάσης). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται τυρόγαλα με 5% λακτόζη.

πρωτεολυτικά ένζυμα, ευρισκόμενα σε καθαρή μορφή και σε 4°C, διατηρούν τη δραστηριότητά τους κατά 90% έως και 10 έτη. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές σε αυξημένη θερμοκρασία και σε συνθήκες πολύ διαφορετικές από τις in vivo. Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντιδράσεως, συναρτήσει της αύξησεως της θερμοκρασίας, λειτουργούν ταυτόχρονα δύο γεγονότα: αφ' ενός η αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας η οποία οδηγεί σε αύξηση της αρχικής ταχύτητας της ενζυμικής αντιδράσεως (Σχήμα 2.8, αρχικό χρονικό διάστημα αντιδράσεως, $t_0 - t_1$) και αφ' ετέρου η αδρανοποίηση της καταλυτικής δραστηριότητας, λόγω της πρωτεϊνικής φύσης του ενζύμου και της ευαισθησίας του στην αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός το οποίο γίνεται σταδιακά εμφανέστερο όσο εκτείνεται ο χρόνος αντιδράσεως (Σχήμα 2.8 χρονικό διάστημα $t_1 - t_2$). Ειδικά, για χρόνους μετά τον t_x , οπότε η καμπύλη τείνει να καταστεί παράλληλη προς τον οριζόντιο άξονα, παρατηρείται ολική αδρανοποίηση της καταλυτικής δραστηριότητας, και ο χρόνος $t_x - t_0$ είναι ο απαιτούμενος για ολική θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου. Ο μηχανισμός της θερμικής αδρανοποιήσεως του ενζύμου (π.χ. α-αμυλάσης) ακολουθεί προσεγγιστικά πρότυπο φθοράς πρώτης τάξης, το οποίο, τελικά, οδηγεί στην εξίσωση

$$\ln \left[\frac{dDE}{dt} / f(DE) \right] = \ln(\alpha \cdot E_t) - t \cdot \ln \left(\frac{2}{t_{1/2}} \right) \quad (2.32)$$

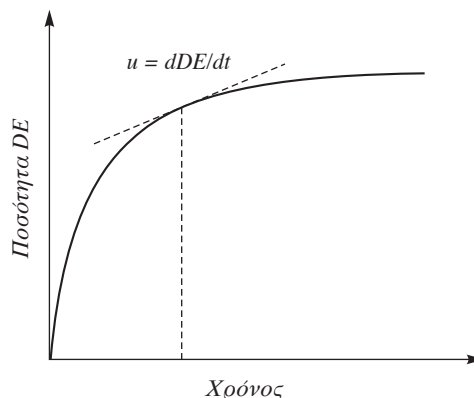
όπου,

- α ενζυμική δραστηριότητα,
- DE ισοδύναμα δεξτρώσεως (προϊόν υδρολύσεως του υποστρώματος αμύλου από την α-αμυλάση),
- E_t ολική συγκέντρωση ενζύμου,
- $f(DE)$ συντελεστής διορθώσεως (≈ 1 για $DE \leq 12$),
- t χρόνος αντιδράσεως,
- $t_{1/2}$ χρόνος ημιζωής (υποδιπλασιασμού) δραστηριότητας ενζύμου.

Με βάση την εξίσωση (2.32) υπολογίζεται ο $t_{1/2}$ του ενζύμου (π.χ. α-αμυλάσης) συναρτήσει του χρόνου αντιδράσεως, αρχίζοντας την αντίδραση με γνωστή συγκέντρωση υποστρώματος S (π.χ. άμυλο). Ειδικότερα, αρχικά υπολογίζονται οι κλίσεις dDE/dt που αντιστοιχούν σε διάφορους χρόνους αντιδράσεως

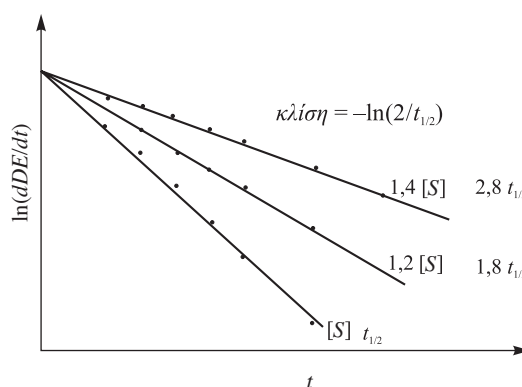
ΣΧΗΜΑ 2.9

Ταχύτητα υδρολύσεως αμύλου από α -αμυλάση. Ως ταχύτητα αντιδράσεως εννοείται η κλίση της εφαπτομένης στην καμπύλη σε κάποια χρονική στιγμή ($u = dDE/dt$). Η αντίδραση πραγματοποιείται με 26,5% άμυλο, παρουσία 25 ppm ιόντων ασβεστίου και σε 102°C.



ΣΧΗΜΑ 2.10

Ημι-λογαριθμική γραφική παράσταση για τον προσδιορισμό της ημιζωής ($t_{1/2}$) της α -αμυλάσης (σε συγκεκριμένη θερμοκρασία) για τρεις αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος αμύλου [S], 1,2 [S] και 1,4 [S].



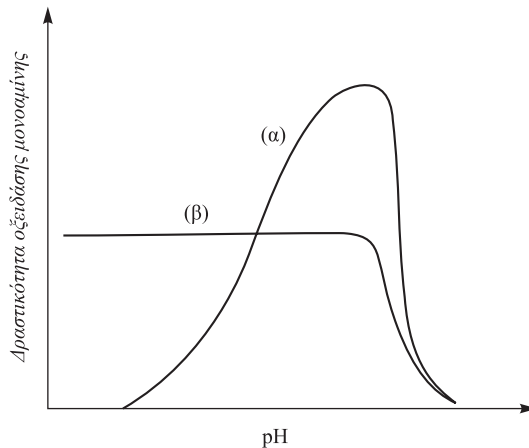
t (Σχήμα 2.9) και ακολούθως σχηματίζεται η ημι-λογαριθμική γραφική παράσταση $\ln(dDE/dt)$ συναρτήσει t (Σχήμα 2.10, το πείραμα πραγματοποιείται σε τρεις συγκεντρώσεις αμύλου που για καθεμία προκύπτει διαφορετικός $t_{1/2}$), η οποία δίδει ευθεία κλίσης ίσης με $-\ln(2/t_{1/2})$ από την οποία προσδιορίζεται ο $t_{1/2}$ για αρχική συγκέντρωση E_i . Οι τιμές $t_{1/2}$ που προκύπτουν από διάφορες θερμοκρασίες αντιδράσεως (σταθερές οι τιμές των E_i και [S]) προσφέρουν ένα μέτρο της θερμοανθεκτικότητας του ενζύμου σε αληθινές συνθήκες εφαρμοσμένης κατάλυσης.

2.4.2 Επίδραση του pH

Τα ένζυμα, όπως οι πρωτεΐνες γενικότερα, φέρουν ιοντιζόμενες ομάδες, οπότε το pH είναι δυνατόν να μεταβάλλει:

- τον ιοντισμό φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων τα οποία επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του μορίου,
- τη δέσμευση του υποστρώματος, και
- τη δραστηριότητα ομάδων της ενεργού περιοχής.

Αποτέλεσμα της επίδρασης του pH είναι η μεταβολή της ταχύτητας αντιδράσεως (π.χ. k_{cat} και V_{max}), της συγγένειας προς το υπόστρωμα (K_m) και της σταθερότητας του ενζυμικού μορίου, η οποία εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής του στο συγκεκριμένο pH.

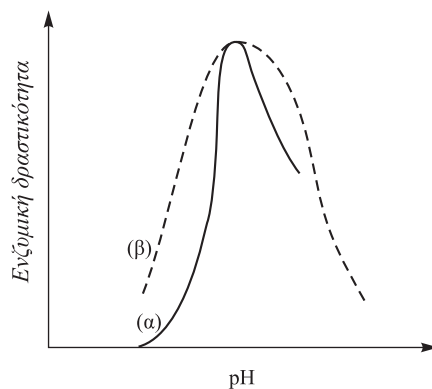


ΣΧΗΜΑ 2.11

Επίδραση του pH στο ένζυμο οξειδάση μονοαμίνης. (α) Καμπύλη pH δραστικότητας (προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας σε διαφορετικές τιμές pH, οπότε βρίσκεται το άριστο pH δραστικότητας, π.χ. 7,3)· (β) καμπύλη pH σταθερότητας (πριν προσδιοριστεί η ενζυμική δραστικότητα σε άριστο pH, π.χ. pH 7,3, αρχικά το ένζυμο είχε εκτεθεί για 5 min σε διαφορετικές τιμές pH).

Επίσης, το pH είναι δυνατόν να επηρεάσει ιοντιζόμενες ομάδες του υποστρώματος, συνεπώς και τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος *ES*. Λόγου χάριν, το γεγονός ότι η σακχαρόζη (ζάχαρη) δεν ιοντίζεται είναι, πιθανώς, μία αιτία που το ένζυμο *ινβερτάση*, το οποίο την υδρολύει σε γλυκόζη και φρουκτόζη, παρουσιάζει μεγάλο εύρος άριστου pH.

Το άριστο pH ενός ενζύμου αφορά σε δύο παράγοντες οι οποίοι στην πράξη συχνά συνδυάζονται: τη δραστικότητα του ενζύμου και τη σταθερότητα του ενζύμου. Το *άριστο pH δραστικότητας* προκύπτει από μελέτη του pH για αναστρέψιμη επίδραση στη V_{max} , στη συγγένεια του υποστρώματος για την ενεργό περιοχή (οπότε παρατηρείται φαινομενική μεταβολή της K_m συναρτήσει του pH) ή και στα δύο. Για τον σχηματισμό της *καμπύλης pH δραστικότητας*, προσδιορίζεται η δραστικότητα του ενζύμου σε διάφορες τιμές pH ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο πραγματοποιείται ο προσδιορισμός (Σχήμα 2.11α και Σχήμα 2.12α). Αντίθετα, το *άριστο pH σταθερότητας* (εύρος τιμών pH) προκύπτει από μελέτη του pH για μη αναστρέψιμη επίδραση, η οποία οδηγεί σε μετουσίωση της πρωτεϊνικής δομής, επηρεάζοντας τη σταθερότητα του ενζυμικού μορίου, άρα και τη δραστικότητά του. Τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγούν σε οριστική απώλεια της καταλυτικής δραστικότητας. Για τον σχηματισμό της *καμπύλης pH σταθερότητας*, προσδιορίζεται η δραστικότητα του ενζύμου πάντα στο ίδιο pH προσδιορισμού (άριστο pH δραστικότητας), σε δείγματα ενζύμου τα οποία προηγουμένως είχαν εκτεθεί, για τον ίδιο χρόνο, σε διάφορες τιμές pH (Σχήμα 2.11β και Σχήμα 2.12β).



ΣΧΗΜΑ 2.12

Επίδραση του pH στην ουδέτερη πρωτεΐνάση από *Bacillus subtilis* σε 25 °C. (α) Καμπύλη pH δραστικότητας· (β) καμπύλη pH σταθερότητας (πριν προσδιοριστεί η ενζυμική δραστικότητα, αρχικά το ένζυμο είχε εκτεθεί για 21 ώρες σε διάφορες τιμές pH).

Οι δύο ανωτέρω παράγοντες συνυπάρχουν και λειτουργούν ταυτόχρονα, χωρίς το ένζυμο να επιδεικνύει υποχρεωτικά παρόμοια συμπεριφορά και μορφή καμπύλης. Λόγου χάριν, το ένζυμο *οξειδάση μονοαμίνης* που ελκύει το ενδιαφέρον της φαρμακο/χημικής βιομηχανίας παρουσιάζει πτώση της καμπύλης pH δραστηριότητας αριστερά της άριστης τιμής pH (Σχήμα 2.11α) λόγω μείωσης της συγγένειας με το υπόστρωμα, ενώ η πτώση της καμπύλης σταθερότητας δεξιά της άριστης τιμής pH (Σχήμα 2.11β) οφείλεται στην αστάθεια του ενζύμου. Αντίθετα, το ένζυμο παραμένει σταθερό σε τιμές pH αριστερά της άριστης τιμής (Σχήμα 2.11β), ενώ σε αντίστοιχες τιμές pH η δραστηριότητά του μειώνεται (Σχήμα 2.11α). Ωστόσο, το ένζυμο *συνδέτηρη πρωτεΐνάση* από *Bacillus subtilis* παρουσιάζει παρόμοια μορφή καμπυλών pH δραστηριότητας (Σχήμα 2.12α) και pH σταθερότητας (Σχήμα 2.12β), αφού είναι ασταθές τόσο σε όξινο όσο και σε αλκαλικό pH.