

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, αφενός με το να δεσμεύουν το υπόστρωμα σε μία καταλυτικά κρίσιμη για κάθε ένζυμο κοιλότητα που ονομάζεται *ενεργός περιοχή* (*active site*) ή *ενεργό κέντρο* (*active centre*), και αφετέρου, συνήθως, να μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια που αντιστοιχεί στη μεταβατική κατάσταση του συμπλόκου ενζύμου-υπόστρωματος (*ES*), γεγονός που οδηγεί σε μείωση και την αντίστοιχη ενέργεια ενεργοποίησης (ΔG^{++}), συγκριτικά με την απαιτούμενη ενέργεια απουσία ενζύμου.

Για τη μελέτη και 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:

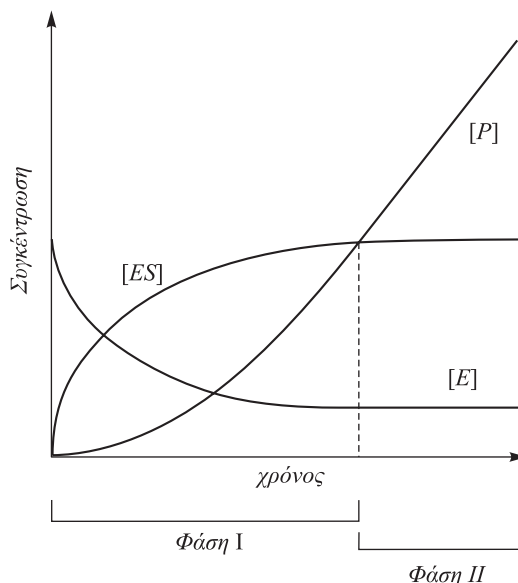
- ταχύτητα αντιδράσεως (δραστικότητα και ποσότητα ενζύμου),
- έκταση αντιδράσεως (σταθερά ισορροπίας),
- διάρκεια ενζυμικής δραστικότητας (σταθερότητα ενζύμου).

Η διάρκεια βιομηχανικών βιοκαταλυτικών αντιδράσεων κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως μερικές ημέρες. Ενώ θεωρητικά ως κύριος στόχος θεωρείται η μεγιστοποίηση της ποσότητας του προϊόντος εις βάρος του παράγοντα χρόνου 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 ολικής αντιδράσεως.

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

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

Φάση II: *φάση σταθεροποιημένης καταστάσεως* (*steady-state*), στην οποία



ΣΧΗΜΑ 2.1

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

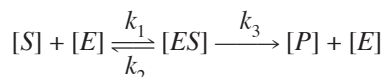
αντιστοιχεί η αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης v_0 (initial reaction rate) (Σχήμα 2.1).

Φάση III: *Μη γραμμική φάση (non-linear phase)*, η οποία αποτελεί το κύριο τμήμα της ενζυμικής αντίδρασης 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 ως μία φάση, απλούστευση η οποία προφανώς δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Η *φάση II* είναι χρήσιμη για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας, καθώς 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 αντίδρασεως

Η έναρξη κάθε ενζυμικής αντίδρασης 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 , χαρακτηριστικό της φάσης I, θεωρείται ως αντιστρεπτή διαδικασία, επειδή αυτό βρίσκεται σε παρόμοιο ενεργεια-

κό επίπεδο με τα συστατικά S και E . Αργότερα, το σύμπλοκο ES διασπάται σε προϊόν P και σε ελεύθερο ένζυμο E , διαδικασία εξώθερμη και, γενικά, μη αντι-στρεπτή. Το στάδιο διασπάσεως του ES σε P και E θεωρείται ότι ελέγχει την ταχύτητα της ολικής 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 $[E]$, που συνήθως είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, ελαττώνεται γρήγορα και προσεγγίζει το μηδέν, ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση και σταθεροποίηση της συγκεντρώσεως του συμπλόκου $[ES]$. Το τελευταίο γεγονός οφείλεται στο ότι σταδιακά αποκαθίσταται δυναμική ισορροπία, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη της φάσης II (σταθεροποιημένης $[ES]$).

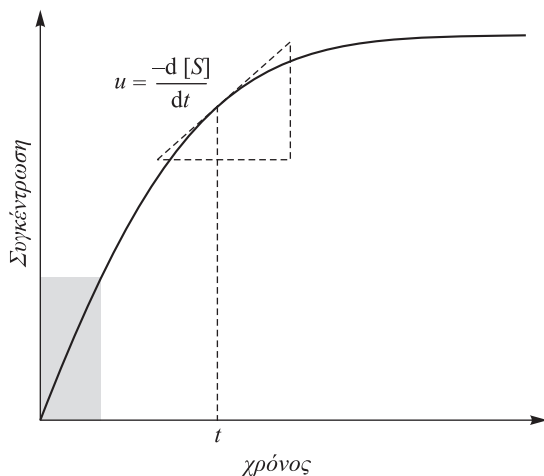
2.1.2 Φάση II : σταθεροποιημένη κατάσταση

Αρχική ταχύτητα αντιδράσεως (u_0). Τα αντιδρώντα συστατικά βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και το σύστημα λειτουργεί σε σταθεροποιημένη μορφή. 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 περιγράφει την ολική 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 σχέση μεταξύ συγκεντρώσεως υποστρώματος και χρόνου, γεγονός που οδηγεί στη μέγιστη κλίση της καμπύλης του Σχήματος 2.2 (ευθεία που αντιστοιχεί στο σκιασμένο τμήμα). Η κλίση αυτή ισούται με την *αρχική ταχύτητα αντιδράσεως u_0* (*initial reaction rate*), η



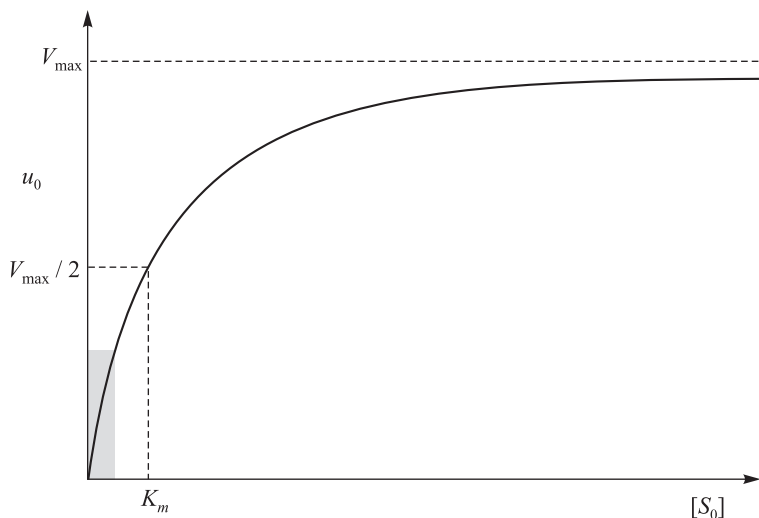
ΣΧΗΜΑ 2.2

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 αντίδρασης στο σημείο αυτό. S = υπόστρωμα, t = χρόνος.

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

Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην αρχική ταχύτητα αντιδράσεως, σταθερά Michaelis-Menten (K_m) και μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως (V_{max}). Πειραματικά διαπιστώνεται ότι η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης 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 σχέση $(\alpha - u_0) \cdot (S + \beta) = \text{σταθερό}$ (α και β σταθερές). Σημειώνεται ότι επειδή προσδιορίζεται η u_0 και $[S_0] \gg [E]$, έπεται ότι $[S_0] = [S]$. Η κινητική συμπεριφορά του συστήματος ποικίλει ανάλογα με την τιμή της συγκέντρωσης 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 την $[S]$, οπότε η κινητική είναι πρώτης τάξεως. Αυτό έχει πρακτική σημασία αφού, υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρωμάτων του ενζύμου σε δείγματα. Επίσης, η κινητική των ενζύμων σε χαμηλή $[S]$ είναι χρήσιμη για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αποδοτικότητα των ενζύμων στο μεταβολισμό του κυττάρου.
- (β) Υψηλή τιμή $[S]$. Η u_0 είναι ανεξάρτητη από την $[S]$ (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 το σχηματισμό του συμπλόκου ES , οπότε η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου $[E] \approx 0$ και συνεπώς $[E_f] = [ES]$. Αυτό, όπως θα διαπιστω-



ΣΧΗΜΑ 2.3

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

θεί αργότερα οδηγεί στη σχέση $u_0 = V_{\max} = k_3[E_t]$ (V_{\max} = μέγιστη ταχύτητα αντιδράσεως) (σχέση 2.6), χρήσιμη για το 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 $[S_0]$. Η κινητική μεταλλάσσει σταδιακά από πρώτη σε μηδενική τάξη. Με δεδομένο ότι μετράμε u_0 , το σύστημα λειτουργεί σε $[S] \gg [E_t]$ (ισχύει για τις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές ενζύμων), και $[P] \approx 0$, είναι δυνατόν να υποθέσουμε είτε ότι περιοριστικός παράγων της ολικής 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 και διατύπωσαν τη θεωρία της *σταθεροποιημένης καταστάσεως* (*steady-state*). 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 υποθεθεί ότι η ενζυμική δραστηριότητα παραμένει σταθερή, οι συγκεντρώσεις του συνολικού ενζύμου $[E_t]$, του ελεύθερου ενζύμου $[E]$ και του συμπλοκοποιημένου ενζύμου $[ES]$ συνδέονται, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, με τη σχέση

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

Από τις σχέσεις (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 τη σχέση (2.4) στη σχέση (2.5), λαμβάνουμε τη σχέση

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

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

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

Η σχέση (2.8) είναι χρήσιμη για να περιγράψει 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 $k_3 \ll k_2$, που δεν ισχύει πάντα.

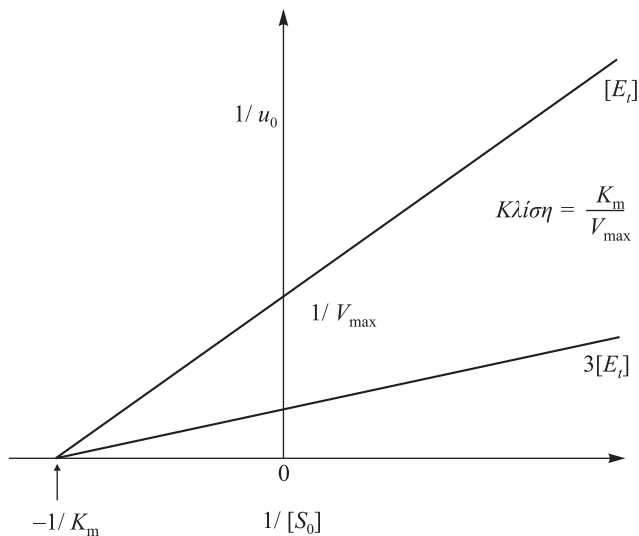
Εάν αντικατασταθεί στη σχέση (2.8) το u_0 με $V_{\max}/2$, η K_m εξισώνεται προς $[S]$. Δηλαδή, αριθμητικά η K_m ισούται με εκείνη την (αρχική) συγκέντρωση υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα αντιδράσεως είναι ίση προς το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) για τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα κυμαίνεται μεταξύ 10^{-1} και 10^{-5} M. Η φυσική σημασία της σταθεράς K_m φαίνεται από τη σχέση $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ και επειδή συνήθως $k_3 \ll k_2$, 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 που αναπτύσσεται μεταξύ τους, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_m τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μεταξύ των συστατικών του συμπλόκου και αντιστρόφως.

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, ώστε 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 γραφεί η σχέση (2.8) με τη μορφή διπλού αντιστρόφου, λαμβάνεται η σχέση (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 σχέση περιγράφει την ευθεία η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε 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 $-1/K_m$. Οι τι-



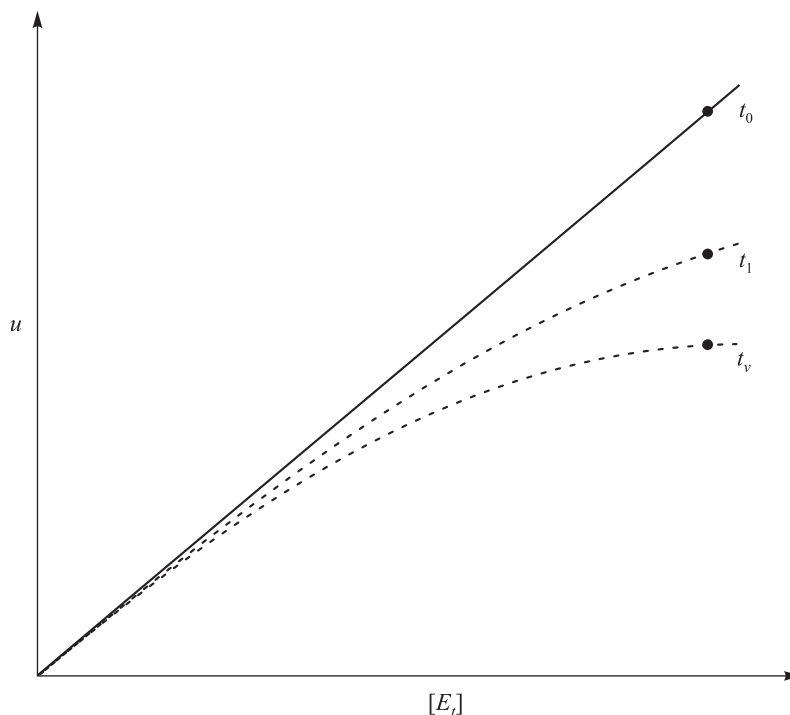
ΣΧΗΜΑ 2.4

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.

μέσ u_0 προσδιορίζονται πειραματικά, ενώ οι τιμές $[S_0]$ είναι δεδομένες· άρα, μέσω της γραφικής παράστασης 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 ξευγών ($u_0, [S]$) που 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. Hanes, Hofstee). Εντούτοις, αυτή είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη γραφική παράσταση υπολογισμού των K_m και V_{max} .

Επίδραση της συγκεντρώσεως 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 συγκεντρώσεως υποστρώματος. Με βάση τα ανωτέρω, η παρούσα ενότητα εστιάζει στην επίδραση της συγκεντρώσεως του ενζύμου επί της ταχύτητας αντίδρασης για σταθερή και γνωστή συγκέντρωση υποστρώματος.

Κατ' αρχή, θα πρέπει να καθοριστούν οι συμφέρουσες συνθήκες προσδιορισμού του ενζύμου (δραστηκότητας). 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 μεταξύ ταχύτητας (u) της ενζυμικής αντίδρασης και της ολικής συγκεντρώ-



ΣΧΗΜΑ 2.5

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

σεως ενζύμου (E_t), υπό σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος και για μετρήσεις της ταχύτητας σε διάφορους χρόνους αντιδράσεως. Οι τιμές των μετρήσεων οι οποίες έγιναν σε χρόνο πλησίον του t_0 , δηλαδή αμέσως μετά την έναρξη της αντιδράσεως, αντιστοιχούν στην αρχική ταχύτητα u_0 και η συνάρτησή τους με την $[E_t]$ της αντιδράσεως είναι γραμμική. Συνεπώς, μόνον οι μετρήσεις ταχύτητας σε χρόνους αντιδράσεως πλησίον του χρόνου t_0 παρέχουν ορθή και μέγιστη ποσοτική εκτίμηση του ενζύμου, ενώ μετρήσεις που γίνονται σε άλλους χρόνους υποτιμούν την $[E_t]$.

Η σχέση (2.7) είναι χρήσιμη διότι συνδέει την συνολική συγκέντρωση ενζύμου $[E_t]$ με την αρχική ταχύτητα αντιδράσεως u_0 με παρουσία οποιασδήποτε συγκεντρώσεως υποστρώματος $[S]$ και περιέχει τις σταθερές K_m και k_3 . (α) Εάν υποθέσουμε ότι $[S] \gg K_m$, η σχέση (2.7) γίνεται $u_0 = k_3[E_t] = V_{\max}$. Συνεπώς, η u_0 σχετίζεται γραμμικά με την $[E_t]$ με σταθερά αναλογίας ίση προς k_3 , είναι δε ανεξάρτητη από την $[S]$. Στην περίπτωση αυτή, η σταθερά ταχύτητας αντιδράσεως k_3 ελέγχει την ταχύτητα της ολικής αντιδράσεως, οπότε στην περίπτωση αυτή 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 που καταλύονται ανά μονάδα χρόνου (συνήθως δευτερόλεπτα) από ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε μια ενεργό περιοχή, δηλαδή ισούται με τον λεγόμενο αριθμό μετατροπής ή ανακυκλώσεως (turnover number) 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 το 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 τη σχέση (2.7), η u_0 σχετίζεται επίσης ευθέως με την $[E_t]$, με σταθερά αναλογί-

ας 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 τη σχέση (2.10) που 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 την 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 τη σχέση (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 τη σχέση (2.10).
- (v) ενώ k_3 και K_m αποτελούν σταθερές κάθε ενζύμου υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, η V_{max} δεν αποτελεί σταθερά, αλλά εξαρτάται από την συγκέντρωση $[E_t]$ του ενζύμου.

Φυσιολογική αποδοτικότητα (PE) ενζύμου. Στα πλαίσια της βιομηχανικής ενζυμικής καταλύσεως, επιθυμούμε τη χρησιμοποίηση ενζύμου που να εξασφαλίζει υψηλή ταχύτητα καταλύσεως για μια συγκεκριμένη δόση ενζύμου, οπότε έτσι επιτυγχάνεται το μέγιστο αποτέλεσμα με τη δυνατόν μικρότερη ποσότητα ενζύμου. Προφανώς, στην περίπτωση κατά την οποία η λειτουργούσα $[S] \equiv K_m$, ταχύτερη διεργασία αντιδράσεως επιτυγχάνεται από ένζυμο μεγαλύτερης k_3 (k_{cat}), 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 ένζυμα που υπάρχουν διαθέσιμα για τη συγκεκριμένη εφαρμογή εμφανίζουν μέτρια συγγένεια για το υπόστρωμα (χαμηλός λόγος $[S]/K_m$). Στη περίπτωση αυτή, η επιλογή του καταλληλότερου ενζύμου γίνεται με βάση την *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 $[E_0]$, οπότε αποτελεί χρήσιμο πρότυπο επιλογής 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 Z, Δ, Β με τις υψηλότερες τιμές k_{cat} . Ωστόσο, εκ των τριών, το πλέον *αποδοτικό* είναι το ένζυμο Z που διαθέτει τη χαμηλότερη τιμή K_m , άρα την υψηλότερη συγγένεια για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, οδηγώντας στις υψηλότερες σχετικές τιμές *PE* ($200x[S]$) και u_0 ($9,52x[E_0]$).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. Επιλογή ενζύμου για βιομηχανική εφαρμογή καταλύσεως χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τη *φυσιολογική αποδοτικότητα* ($PE = k_{cat}/K_m$) 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 τη σχέση 2.7.

Ένζυμο	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	u_0
A	x	0,50[S]	2x[S]	0,67x[E ₀]
B	10x	0,50[S]	20x[S]	6,67x[E ₀]
Γ	2x	0,25[S]	8x[S]	1,6x[E ₀]
Δ	10x	0,25[S]	40x[S]	8,0x[E ₀]
E	2x	0,05[S]	40x[S]	1,91x[E ₀]
Z	10x	0,05[S]	200x[S]	9,52x[E ₀]

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 έναρξης λειτουργίας της αντίστροφης αντιδράσεως. Όπως έχει ήδη επισημανθεί, τα ένζυμα, ως καταλύτες, αδυνατούν να επέμβουν και να μετατοπίσουν το σημείο ισορροπίας της αντιδράσεως. Μπορούν όμως να επιταχύνουν την 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 γνωστά 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 μετά χρόνο t σε $[S]$. Από τις γνωστές σχέσεις $u = d[S]/dt$ και (2.7) έπεται η σχέση

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

και ολοκληρώνοντας τη σχέση

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

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

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

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

Από τη σχέση (2.14) φαίνεται ότι ο χρόνος που απαιτείται για να μετατραπεί ένα υπόστρωμα συγκεντρώσεως $[S_0]$ σε $[S]$, για δεδομένη και σταθερή ολική 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 σχέση (2.15)

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

Η σχέση (2.15), επίσης, επιτρέπει τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας 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 στη σχέση (2.14) υποθεθεί ότι $[S] = [S_0]/2$ και $k_3[E_t] = V_{max}$, τότε $t = t_{1/2}$ οπότε

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

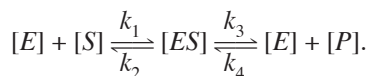
όπου $t_{1/2}$ είναι ο χρόνος υποδιπλασιασμού ή ημιζωής ενός συγκεκριμένου υποστρώματος με παρουσία ενζύμου. Για να γίνει σύγκριση μεταξύ ενζύμων γνωστής συγκεντρώσεως, προκειμένου να επιλεγεί το αποδοτικότερο με συγκεκριμένο υπόστρωμα, θα πρέπει κατά τους προσδιορισμούς να χρησιμοποιηθεί χαμηλή (ως προς K_m) συγκέντρωση υποστρώματος $[S]$, ώστε προσεγγιστικά να ισχύει $[S]/2V_{max} \approx 0$. Τότε η σχέση (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 σχέση (2.17) εφαρμόζεται στην κατά προσέγγιση σύγκριση της αποδοτικότητας ενζύμων με κάποιο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Όσο μικρότερος είναι ο χρόνος ημιζωής του συγκεκριμένου υποστρώματος με 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} .

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

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

Επειδή οι ταχύτητες προς κάθε κατεύθυνση δύσκολα προσδιορίζονται, η K_{eq} εκφράζεται μέσω των K_m και V_{max} , όπως αυτές αντιστοιχούν στις δύο κατευθύνσεις αντιδράσεως ($r = \text{προς τα δεξιά και } \ell = \text{προς τα αριστερά}$)

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

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 σχέσεις (2.19) και (2.20) στη σχέση (2.18), έπεται η σχέση (2.21) του Haldane, η οποία παρέχει τη σταθερά ισορροπίας μέσω των K_m και V_{max} :

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

Από αυτή καθίσταται εφικτός ο υπολογισμός της ποσοστιαίας συστάσεως και η αναλογία των προϊόντων στο σημείο ισορροπίας, γεγονός σημαντικό σε βιομηχανικές βιομετατροπές που εμπλέκονται ένζυμα.

2.3 ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ 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 δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια τούτου είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία που αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά, και μια που αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστηκότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή. Οι δύο άριστες συνθήκες συνήθως δεν συμπίπτουν, μάλιστα δε, οι άριστες σταθερότητας παρουσιάζει πλατύτερο εύρος τιμών συγκριτικά με τις άριστες δραστηκότητας.

Η σταθερότητα ενός ενζύμου έχει μεγάλη σημασία για τη βιομηχανική ενζυμολογία. Εκτός από τη δυνατότητα ακινητοποίησης (καθηλώσεως) του ενζύμου σε στερεά 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* (*activators*) (ουσίες απαραίτητες για ενεργοποίηση του ενζύμου, ώστε να δρα καταλυτικά), και ως *σταθεροποιητές* (*stabilizers*). Λόγου χάριν, η α -αμυλάση από διαφορετικά βακτήρια εμφανίζει αυξανόμενη σταθερότητα για αυξανόμενη $[Ca^{2+}]$ συναρτήσει του χρόνου επώασεως.

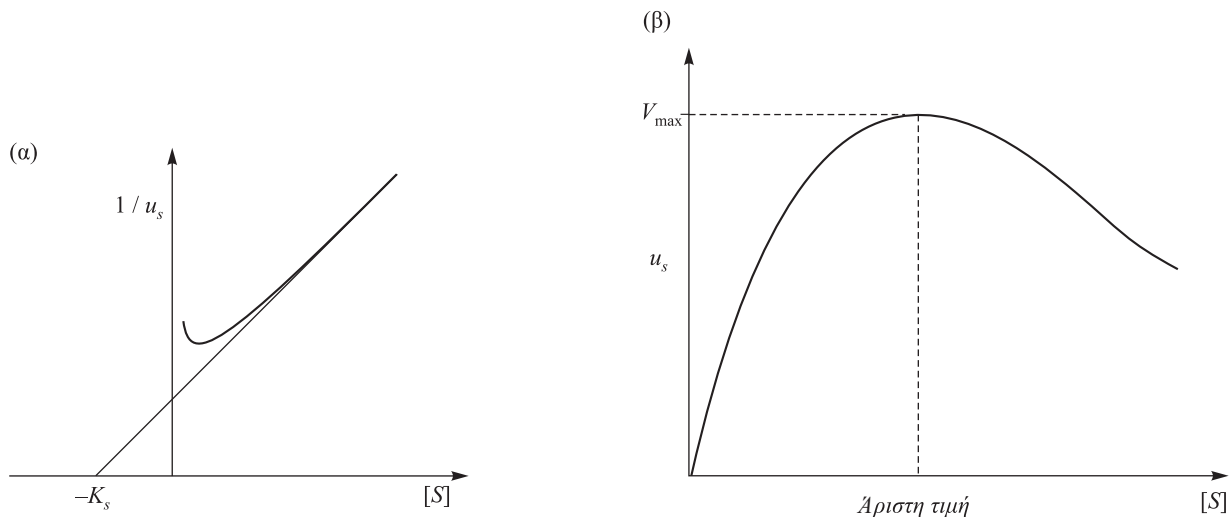
Ως *αναστολείς* (*παρεμποδιστές*, *inhibitors*) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν της ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου. Οι αναστολείς διακρίνονται σε *αντιστρεπτούς* (*reversible*) και *μη αντιστρεπτούς* (*irreversible*). Οι *αντιστρεπτοί αναστολείς* δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά 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*, *ανταγωνιστική*, *μκτική*, *μη συναγωνιστική*, *μερική*, *υποστρώματος*, *προϊόντος* και *αλλοστερική*. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση. Αντίθετα, στην εφαρμοσμένη ενζυμολογία το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στην ολική αντίδραση και την επίδραση του αναστολέα σε αυτή, πολύ λιγότερο δε στο μηχανισμό αναστολής. Τα πλέον ενδιαφέροντα είδη αντιστρεπτής αναστολής για την εφαρμοσμένη ενζυμολογία είναι αυτά που εξετάζονται στη συνέχεια. Σημειώνεται ότι στις περισσότερες ενζυμικές τεχνολογικές εφαρμογές, οι ουσίες που προκαλούν αναστολή είναι δυνατόν να ελεγχθούν και να απομακρυνθούν από το ενζυμικό περιβάλλον ή τουλάχιστον να μειωθεί δραστικά η παρεμπόδιση που προξενούν στην αντίδραση.

2.3.1 Υπόστρωμα και προϊόν ως αναστολείς του ενζύμου

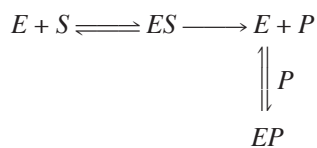
Δύο περιπτώσεις αναστολής του ενζύμου είναι αυτές που οφείλονται στην υψηλή συγκέντρωση είτε υποστρώματος, S , είτε προϊόντος, P .

Αναστολή του ενζύμου από υπόστρωμα. Η περίπτωση της *ενζυμικής αναστολής από υπόστρωμα* (*substrate inhibition*) είναι αντίστοιχη της ονομαζόμενης *ανταγωνιστικής αναστολής* (*uncompetitive inhibition*) ως προς το ότι υψηλή $[S]$ οδηγεί σε δέσμευση και δεύτερου μορίου υποστρώματος στο ενζυμικό μόριο, σύμφωνα με το ακόλουθο πρότυπο ισορροπίας



(πενικιλιλίνη) και αδρανοποιείται ως αντιβιοτικό, τελικά, κατέστη το πρώτο αποτελεσματικό έναντι μολύνσεων από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*. Όταν χορηγείται με ένεση σε ικανές 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 που 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 (*product inhibition*) δεν αποτελεί πρόβλημα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες σε κινητικές μελέτες λαμβάνεται η αρχική ταχύτητα, περιγράφεται δε από το εξής πρότυπο ισορροπίας



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 της ενζυμικής αντιδράσεως σε αναστολή από προϊόν δίδεται από τη σχέση

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

Η ενζυμική αναστολή από το προϊόν αποτελεί εκλεκτική παρεμπόδιση της προς τα εμπρός (δεξιά) αντιδράσεως λόγω συσσώρευσης προϊόντος, και δεν

ΣΧΗΜΑ 2.6

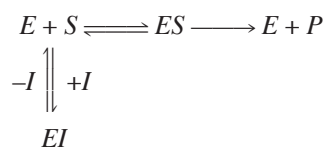
(α) Γραφική παράσταση του αντιστρόφου της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως ($1/u_s$) έναντι της συγκεντρώσεως υποστρώματος ($[S]$) για αντίδραση ευρισκόμενη σε αναστολή από υπόστρωμα (β) Γραφική παράσταση της ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως (u_s) έναντι της συγκεντρώσεως υποστρώματος ($[S]$) για αντίδραση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

σχετίζεται με την μετακίνηση της θερμοδυναμικής ισορροπίας μεταξύ υποστρώματος και προϊόντος λόγω αυξήσεως της αντίθετης 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 που δεσμεύονται κατά τρόπο *αντιστρέψιμο* με το ένζυμο και παρεμποδίζουν την καταλυτική του αντίδραση. Ωστόσο, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά 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 σχέσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια, ανάλογα με τον τύπο της αναστολής.

Συναγωνιστική αναστολή. Η περίπτωση της *συναγωνιστικής αναστολής* (*competitive inhibition*) περιγράφεται από το εξής πρότυπο ισορροπίας



K_i είναι η *σταθερά αναστολής* ή *σταθερά διάστασης* του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, *EI*, και ισούται προς $[E][I]/[EI]$, η δε ταχύτητα της αντιδράσεως δίδεται από τη σχέση

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

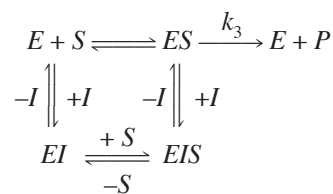
Ο αναστολέας έχει δομή παρόμοια με εκείνην του υποστρώματος και δεσμεύεται στο ένζυμο στη θέση του υποστρώματος, δηλαδή αναστολέας και υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση του ενζύμου. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η βιομηχανική βιομετατροπή του σιροπιού γλυκόζης σε εκείνο φρουκτόζης από το ένζυμο *ισομεράση γλυκόζης*. Το αρχικό υπόστρωμα γλυκόζη περιέχει και λίγη σορβιτόλη (προέρχεται ως πρόσμιξη 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 αρκούντως υψηλή ώστε να παρεμποδίζεται η αντίδραση της *ισομεράσης γλυκόζης*.

Η μόνη διαφορά μεταξύ της σχέσης (2.8), που 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 σχέση (2.27) ως γενικευμένη μορφή της σχέσης (2.26). Η γενικευμένη σχέση επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου αντιδράσεως t_i με 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 σχέση είναι χρήσιμη, π.χ. για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας νέων ημισυνθετικών πενικιλινών να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου *β-λακταμάσης*, οι οποίες ομοιάζουν δομικά της φυσικής πενικιλίνης, υποστρώματος του ενζύμου (π.χ. Σχήμα 2.6α). 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 ενζύμου-ημισυνθετικής πενικιλίνης. Ημισυνθετική πενικιλίνη (π.χ. Σχήμα 2.7α) με συγκριτικά χαμηλότερη K_i εμφανίζεται συγκριτικά αποτελεσματικότερη ως αναστολέας της *β-λακταμάσης*, διότι, ευρισκόμενη ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση, οδηγεί σε αύξηση της K_m του συμπλόκου ενζύμου-πενικιλίνης, ίσης προς $(1 + [I]/K_i)$, ικανής να επιμηκύνει τον χρόνο ο οποίος απαιτείται για να ελαττωθεί στο αίμα μία τυπική αρχική συγκέντρωση αντιβιοτικού $[S_0]$ 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 ημισυνθετική πενικιλίνη να προλάβει να δράσει ανασταλτικά στο ένζυμο *καρβοξυπεπτιδάση D-αλανίνης* που μετέχει στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης.

Μη συναγωνιστική αναστολή. Η περίπτωση της *μη συναγωνιστικής αναστολής* (*non-competitive inhibition*) 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 *μικτής αναστολής* (*mixed inhibition*) στην οποία τα δύο ενζυμικά σύμπλοκα, γενικά, έχουν διαφορετικές σταθερές K_i . Η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη συναγωνιστική αναστολή δίδεται από τη σχέση

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

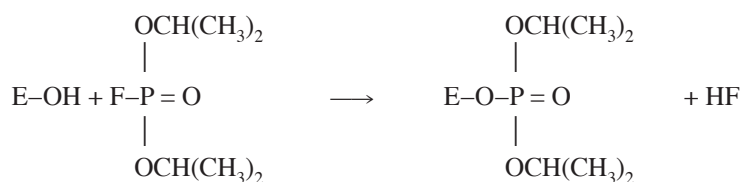
Ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε θέση διαφορετική από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο. Αυτό συνεπάγεται ότι το σύμπλοκο ES σχηματίζεται μέσω διαφορετικών οδών και δεν ισχύει η υπόθεση ότι το στάδιο ελέγχου (περιορισμού) της αντιδράσεως καθορίζεται από τη σταθερά k_3 . Είναι εμφανές ότι η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη συναγωνιστική αναστολή ουδέποτε θα φθάσει την τιμή V_{\max} της αντιδράσεως χωρίς αναστολή. Η διαφορά μεταξύ της σχέσης (2.8), που 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 σχέση που προκύπτει για τη μη συναγωνιστική αναστολή είναι επίσης η (2.27), όπως και προηγουμένως. Συνεπώς, είναι αδύνατον να φανεί το είδος της αναστολής με βάση την εικόνα της ολικής αντιδράσεως (σχέση 2.27), κάτι που είναι, ωστόσο, εφικτό εάν εφαρμοσθεί κινητική μελέτη χρησιμοποιώντας αρχική ταχύτητα αντιδράσεως. Σημειώνεται ότι είναι σχετικά σπάνιες οι περιπτώσεις ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ενός υποστρώματος 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 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 θειολοανιόν) κυστεϊνών του ενζύμου (E) ως ακολούθως:



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

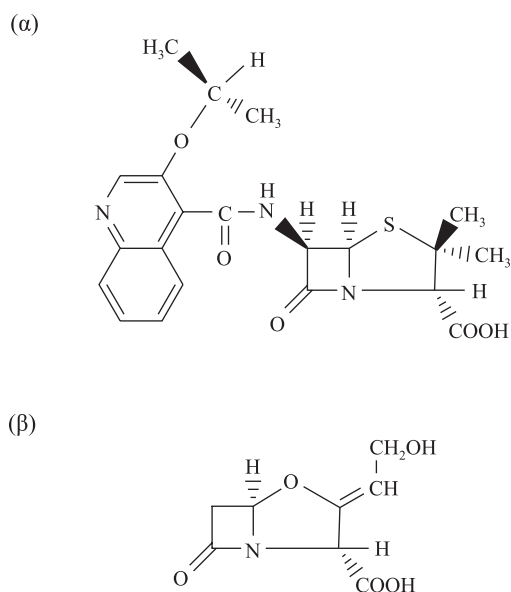


Προφανώς, αν ο αναστολέας βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση $[I_t]$ μικρότερη από τη συνολική συγκέντρωση του ενζύμου $[E_t]$, τότε η διαφορά $[E_t] - [I_t]$ θα ισούται με την συγκέντρωση του ενζύμου $[E]$ που παραμένει δραστικό και, φυσικά, αντιδρά με το υπόστρωμα χωρίς να επηρεάζεται η K_m . Αν η αναστολή γίνεται με παρουσία υποστρώματος, τότε η μέγιστη ταχύτητα V_{\max} θα ελαττωθεί σε $V_{\max i}$, σύμφωνα με τη σχέση (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 (πρακτικά της συγκεντρώσεως δραστικού ενζύμου) στην πρώτη περίπτωση, σε αντίθεση με την δεύτερη. Ποσοτικές διαφορές μεταξύ *μη συναγωνιστικής* και *μη αντιστρεπτής* αναστολής είναι, (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 (σχέσεις 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 (*clavulanic acid*) (Σχήμα 2.7β). Προκειμένου να αξιολογηθούν συνθετικές πρόδρομες ενώσεις που, τελικά, οδήγησαν στο κλαβουλανικό οξύ, εξετάστηκαν διάφορες αραιώσεις της πρόδρομης ένωσης που είχε προστεθεί στο υγρό μέσο βακτηριακής καλλιέργειας (περιείχε και το ένζυμο β-λακταμάση), ως προς τον χρόνο υδρόλυσης σταθερής συγκεντρώσεως φυσικής βενζυλο-πενικιλίνης από το ένζυμο. Μικρότερες



ΣΧΗΜΑ 2.7

Δομές ημισυνθετικών αντιβιοτικών, αναστολέων της β-λακταμάσης. (α) Συναγωνιστικός (αντιστρεπτός) αναστολέας BRL-1437 και (β) μη αντιστρεπτός αναστολέας (αδρανοποιητής) κλαβουλανικό οξύ.

αραιώσεις της πρόδρομης ένωσης (αδρανοποιητή του ενζύμου) οδηγούσαν σε επιμήκυνση του χρόνου υδρολύσεως της πενικιλίνης. Συνεπώς, για $[I] > [E]$, δοθέντος ικανού χρόνου, επιτυγχάνεται πάντα πλήρης αδρανοποίηση της β-λακταμάσης. Ωστόσο, ο χρόνος που απαιτείται για την αδρανοποίηση του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκεντρώσεως του αδρανοποιητή.

2.4 ΦΥΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

2.4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως. Μία απλή προσέγγιση για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας είναι μέσω της σχέσης του Arrhenius (2.30), που 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 σταθερά του Arrhenius
- k_3 σταθερά ταχύτητας αντιδράσεως
- R σταθερά αερίων
- T απόλυτη θερμοκρασία
- E_a ενέργεια ενεργοποίησης

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 τιμημένων ίσο προς $\log A$. Με βάση το γεγονός ότι για τα περισσότερα ένζυμα η τιμή της E_a κυμαίνεται από 4 έως 20 kcal mol⁻¹, εξάγεται (σχέση 2.31) ότι για κάθε ένα βαθμό αυξήσεως της θερμοκρασίας, η ταχύτητα καταλύσεως αυξάνει κατά 10% περίπου. Τα περισσότερα ένζυμα όταν είναι διαλυτοποιημένα in vitro δεν είναι ιδιαίτερος σταθερά με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που διαπιστώνεται με την προοδευτική αδρανοποίησή τους συναρτήσει της αύξησης της θερμοκρασίας.

Τα ένζυμα είναι αρκετά σταθερά τόσο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον όσο και απομονωμένα σε καθαρή και κρυσταλλική μορφή. Μάλιστα ορισμένα 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 αυξήσεως της θερμοκρασίας, λειτουργούν ταυτόχρονα δύο γεγονότα: αφ' ενός η αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας που οδηγεί σε αύξηση της αρχικής ταχύτητας της ενζυ-