



Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής
Βιοτεχνολογίας
Καθηγητής Νικόλαος Καλογεράκης

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ

ΤΕΧΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

2. ENZYMA

Lab of Biochemical Engineering



& Environmental Biotechnology

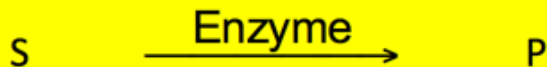
ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΠΛΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Τα **ένζυμα είναι πρωτεΐνες** που δρουν ως καταλύτες σε βιοχημικές αντιδράσεις. Γενικά η παρουσία του καταλύτη αλλάζει τον μηχανισμό της αντίδρασης με αποτέλεσμα να *αυξηθεί ο ρυθμός της αντίδρασης μειώνοντας σημαντικά την ενέργεια ενεργοποίησης*.

Πειραματικά Αποτελέσματα:

Ένα κλασσικό πείραμα μελέτης της κινητικής μιας ενζυματικής αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη γνώστης ποσότητας ενζύμου, E, σε υδατικό διάλυμα υποστρώματος, S (substrate), εντός ενός αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (batch) που διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία (με την βοήθεια εναλλάκτη θερμότητας) και σταθερό pH (με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος – buffer solution).

Στην συνέχεια γίνονται συχνές μετρήσεις της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή/και του προϊόντος, P (product) συναρτήσει του χρόνου. Η συνολική αντίδραση είναι της μορφής:



Από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης του υποστρώματος, [S], κατά τα χρονικά διαστήματα, t_i , $i=0,1,\dots$, μπορούμε να υπολογίσουμε τον ρυθμό της αντίδρασης για το συγκεκριμένο ποσό ενζύμου (E_0) που έχει χρησιμοποιηθεί:

$$r = (-r_s) = -d[S]/dt = r_p = d[P]/dt \quad (\text{π.χ., } r \approx \frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{S_n - S_{n-1}}{t_n - t_{n-1}})$$

ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Εδώ οφείλουμε να σημειώσουμε ότι η συγκέντρωση του ενζύμου σπάνια μετράται σε βάρος (mg/L) ή moles (mmol/L). Επειδή γενικά μας ενδιαφέρει το «βιολογικά ενεργό» ένζυμο, ο συνήθης τρόπος μέτρησης της ποσότητας οποιουδήποτε ενζύμου είναι σε ενζυμικές μονάδες (U).

Μία **ενζυμική μονάδα (U)** ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που έχει συγκεκριμένη καταλυτική δράση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Π.χ., ως 1 U γλυκοαμυλάσης ορίζεται η ποσότητα που παράγει 1 μmol γλυκόζης ανά min σε ένα διάλυμα 4% αμύλου σε pH=4,5 και T=60 °C.

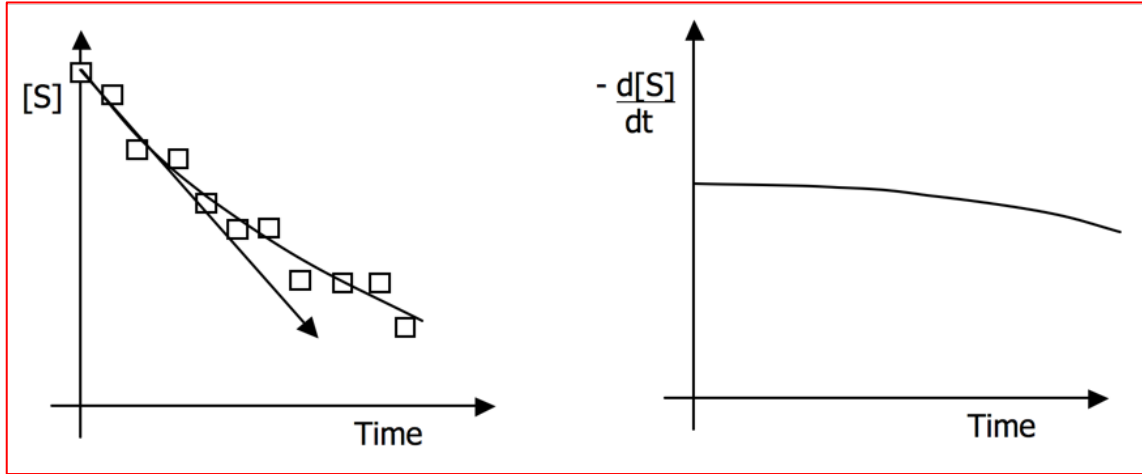
Η **ενζυμική ενεργότητα (kat)** ορίζεται το ποσό του ενζύμου που μετατρέπει 1 mol υποστρώματος ανά sec κάτω από συνθήκες κορεσμού.

Η **ειδική ενζυμική ενεργότητα (kat/mg)** ορίζεται ως η ενζυμική ενεργότητα ανά mg ενζύμου και αποτελεί ένα δείκτη της καθαρότητας και ενεργότητας του ενζύμου.

Η **μοριακή ενεργότητα** (ή αριθμός μετατροπής) ορίζεται ως ο αριθμός των moles υποστρώματος που μετατρέπονται από ένα mol ενζύμου ανά sec κάτω από συνθήκες κορεσμού.

Ρυθμός ενζυμικών αντιδράσεων

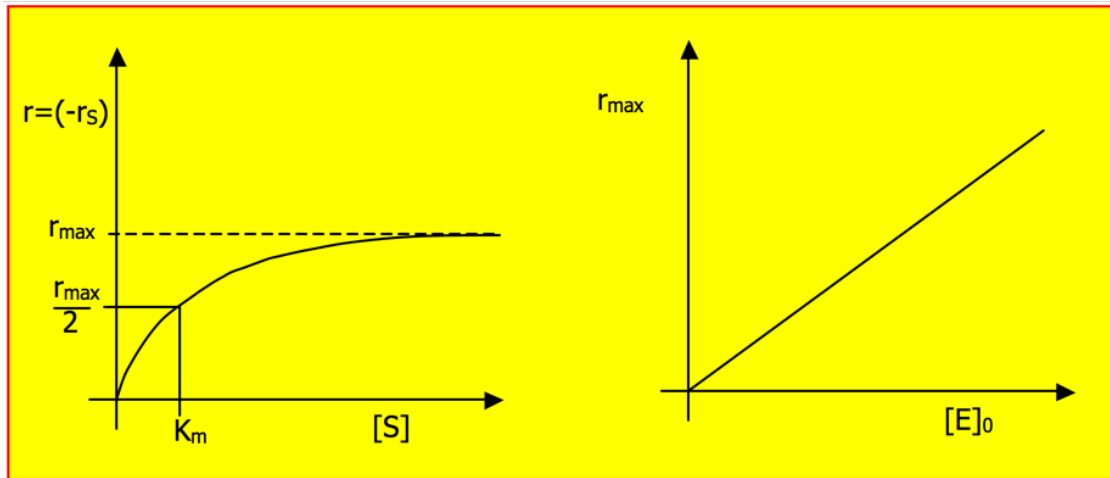
Από τις πειραματικές μετρήσεις της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$ συναρτήσει του χρόνου, η παράγωγος $d[S]/dt$ μπορεί να υπολογισθεί με αριθμητική ανάλυση (πιθανόν να χρειάζεται πρώτα να γίνει κάποιο «φιλτράρισμα» του πειραματικού λάθους).



Γι' αυτό το λόγο πολύ συχνά καταφεύγουμε στον υπολογισμό μόνον των **αρχικών ρυθμών της αντίδρασης** (δηλ. πολύ κοντά στο $t=0$) όπου η συγκέντρωση του υποστρώματος και του ένζυμου είναι γνωστή με μεγαλύτερη ακρίβεια. Ο αρχικός ρυθμός συμβολίζεται στο παραπάνω γράφημα με την εφαπτομένη της καμπύλης S προς t στην αρχή των μετρήσεων (δηλ. σε χρόνο $t=0^+$).

Εμπειρική εξίσωση Henri (1902)

Από μία σειρά τέτοιων πειραμάτων διαπιστώθηκε η παρακάτω ποιοτική συσχέτιση:



Πρώτος ο Henri (1902) διαπίστωσε ότι: **Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι πρώτης τάξης ως προς $[S]$ σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μηδενικής τάξης σε υψηλές συγκεντρώσεις του $[S]$.** Κλασσική συμπεριφορά αντίδρασης που παρουσιάζει το **φαινόμενο του κορεσμού**. Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ανάλογος της αρχικής συγκέντρωσης του ένζυμου $[E]_0$.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές ο Henri (1902) πρότεινε την εμπειρική έκφραση:

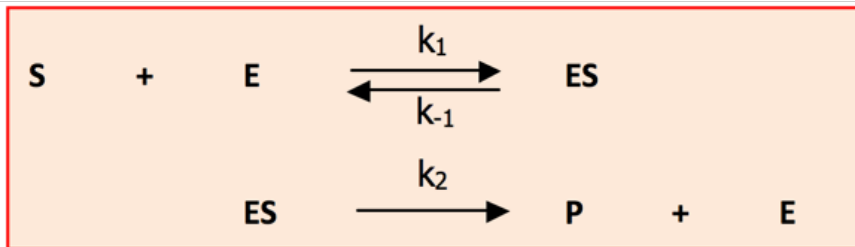
$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{όπου} \quad r_{\max} \sim [E]_0$$

Η **σταθερά κορεσμού, K_m** , δηλώνει την συγκέντρωση του υποστρώματος που απαιτείται για να μειωθεί ο ρυθμός της αντίδρασης στο 50%. Δηλ.

όταν $[S]=K_m$, τότε έχουμε $r = r_{\max}/2$.

Κινητική Michaelis-Menten (1)

Οι Michaelis & Menten ήταν οι πρώτοι που πρότειναν ένα μηχανισμό για μία απλή ενζυμική αντίδραση που είναι συμβατός με την παραπάνω συσχέτιση. Θεώρησαν τις παρακάτω απλές αντιδράσεις:



Οι Michaelis και Menten θεώρησαν ότι η πρώτη αντίδραση *βρίσκεται πάντα σε ισορροπία (rapid equilibrium assumption)*. Επομένως οι συγκεντρώσεις πρέπει ανά πάσα στιγμή να ικανοποιούν την σχέση:

$$\frac{[\text{S}][\text{E}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_1 \quad \Rightarrow \quad [\text{ES}] = \frac{[\text{S}][\text{E}]}{K_1}$$

όπου K_1 είναι η σταθερά ισορροπίας της πρώτης αντίδρασης.

Εάν E_0 είναι η συνολική συγκέντρωση του ενεργού ένζυμου από το ισοζύγιο μάζας έχουμε

$$[\text{E}] + [\text{ES}] = E_0 \quad \Rightarrow \quad [\text{E}] + \frac{[\text{S}][\text{E}]}{K_1} = E_0 \quad \Rightarrow \quad [\text{E}] = \frac{E_0}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_1}} = \frac{K_1 E_0}{K_1 + [\text{S}]}$$

Κινητική Michaelis-Menten (2)

Η ρυθμός παραγωγής του προϊόντος είναι:

$$r_p = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \Rightarrow r_p = \frac{k_2[S][E]}{K_1} = \frac{k_2[S]}{K_1} \frac{K_1 E_0}{K_1 + [S]} \Rightarrow r_p = \frac{k_2 E_0 [S]}{K_1 + [S]}$$

που μπορεί να γραφτεί σαν

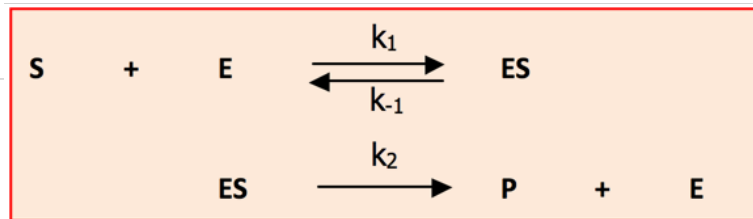
$$r_p = \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

όπου

$$r_{\max} = k_2 E_0$$

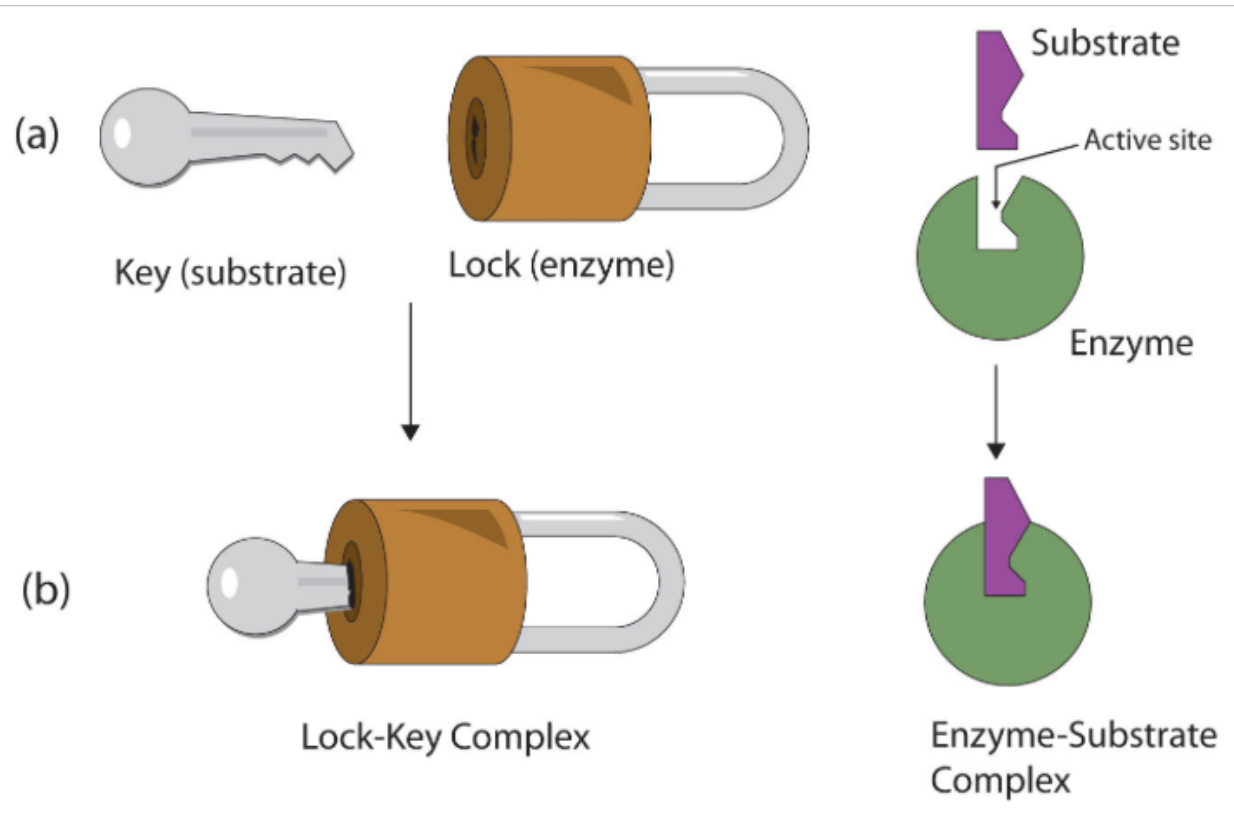
και

$$K_m = K_1 = k_{-1}/k_1$$



Η δεύτερη αντίδραση θεωρείται ότι καθορίζει τον ρυθμό της συνολικής αντίδρασης. Προφανώς η θεώρηση των Michaelis & Menten είναι σε θέση να εξηγήσει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα που συνοψίζονται στην σχέση του Henri.

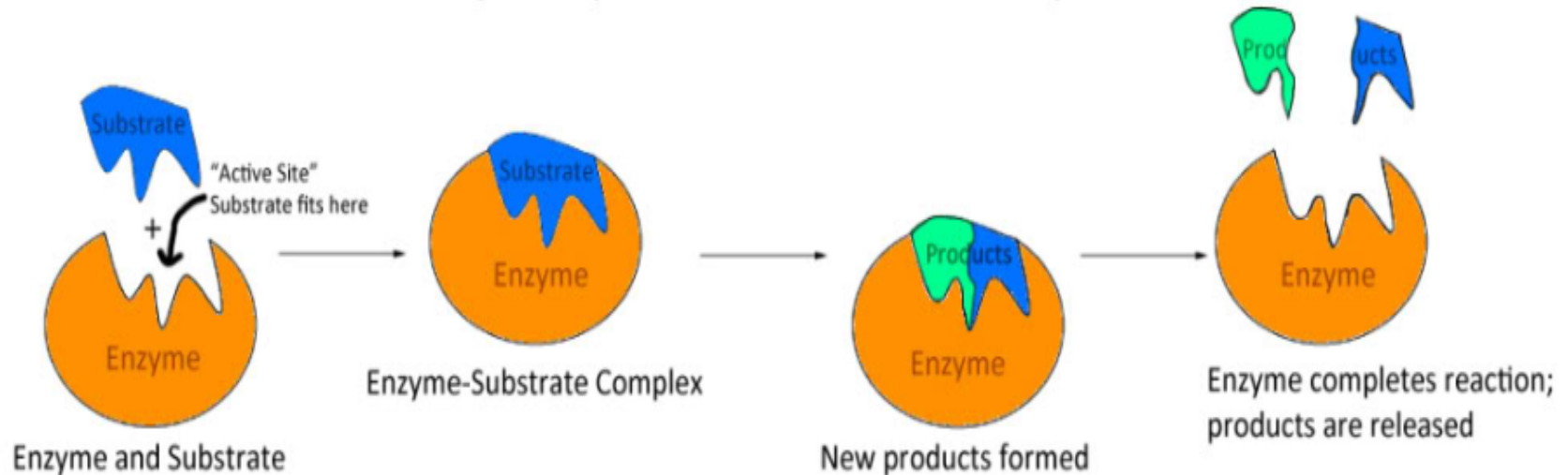
“Lock – Key system”



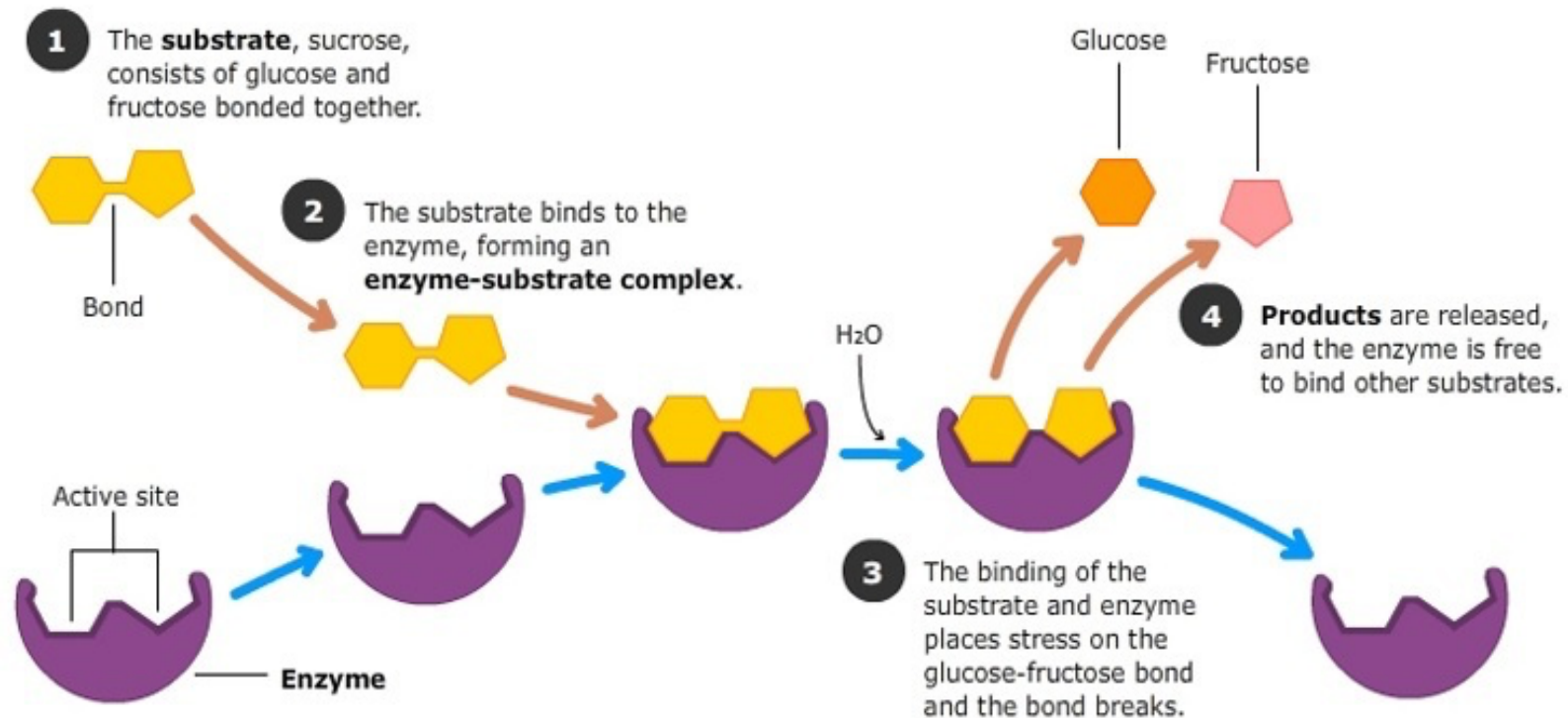
Οι αντιδράσεις του Lock – Key system

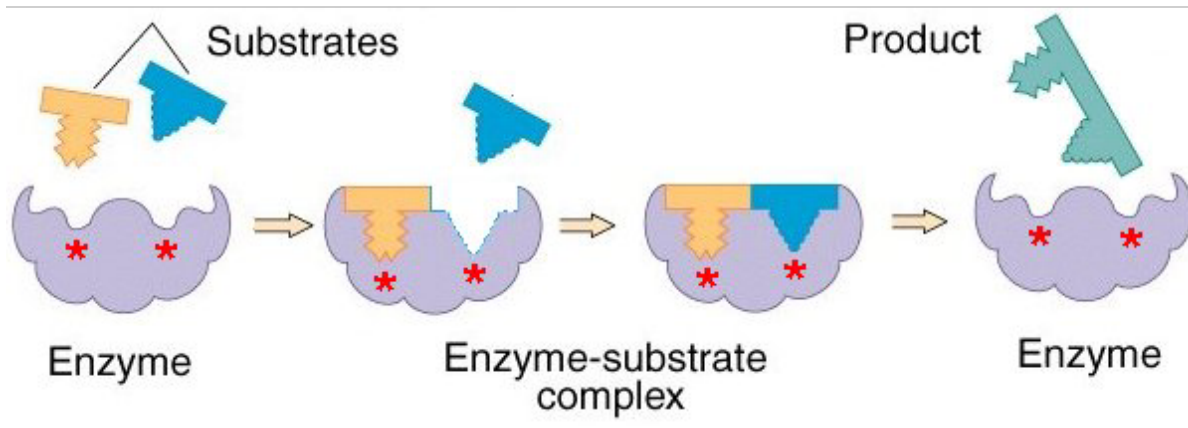
The Lock and Key Theory of Enzymes and Substrates

Substrate= "Key" Enzyme= "Lock" Active Site= "Key hole"

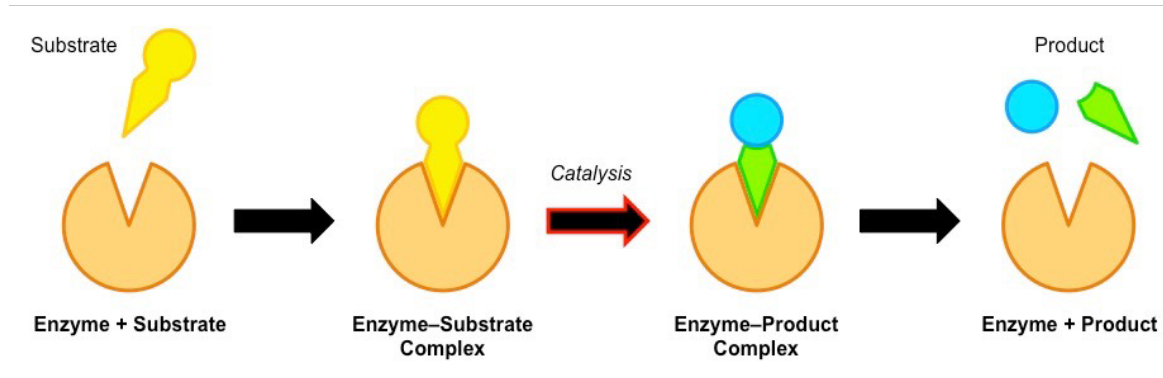


Παράδειγμα (σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη)



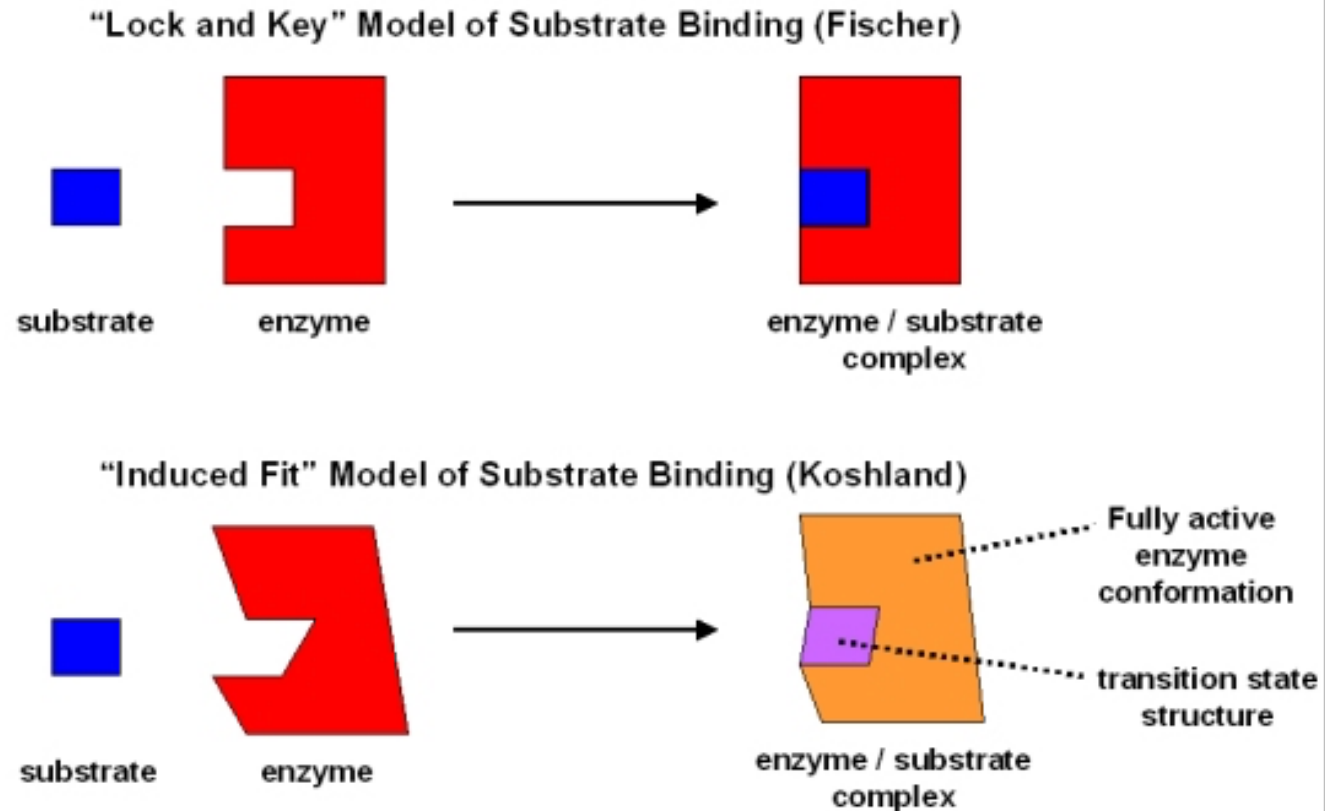


Σύνθεση

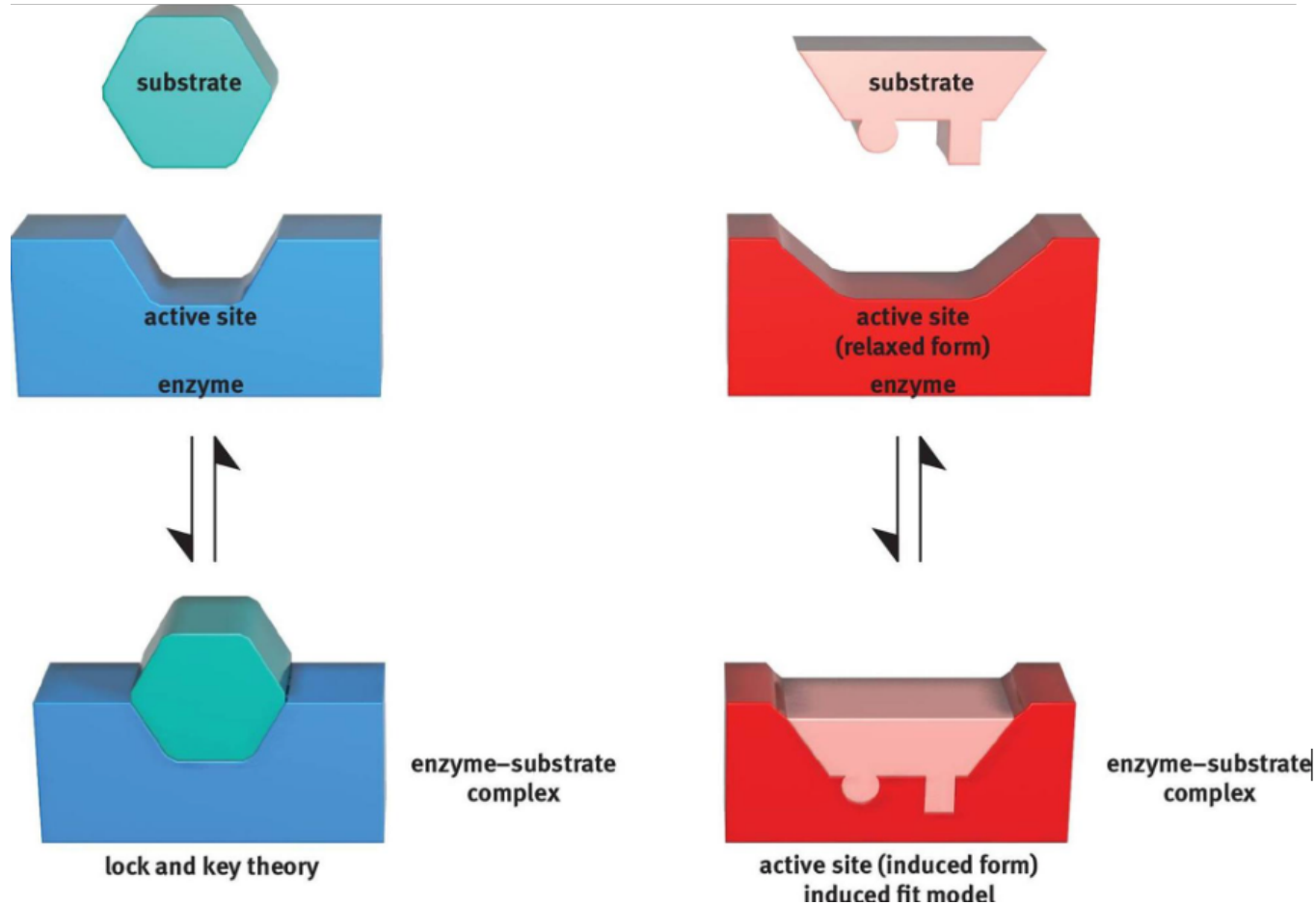


Διάσπαση

Induced Fit Model



Lock-Key model vs. Induced Fit Model

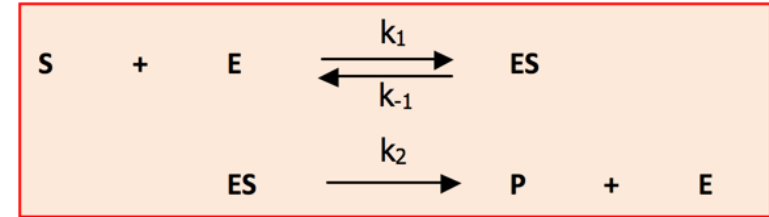


Δυναμική Συμπεριφορά Ενζυμικών Αντιδράσεων (Exact Enzyme Reaction Dynamics)

Με βάση τις απλές αντιδράσεις,
μπορούμε να υπολογίσουμε

τον συνολικό ρυθμό παραγωγής

(r_{Ti} , $i=1,\dots,4$) κάθε ουσίας από τις δύο αντιδράσεις:



$$r_S = k_{-1}[\text{ES}] - k_1[\text{S}][\text{E}]$$

$$r_{\text{ES}} = k_1[\text{S}][\text{E}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_2[\text{ES}]$$

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

$$r_P = k_2[\text{ES}]$$

Για ένα κλειστό σύστημα (batch reactor) σταθερού όγκου το ισοζύγιο μάζας για κάθε ουσία έχει είναι: $dC_i/dt = r_{Ti}$, $i=1,\dots,4$ και έχουμε τις τέσσερις διαφορικές εξισώσεις:

$$d[\text{S}]/dt = k_{-1}[\text{ES}] - k_1[\text{S}][\text{E}]$$

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

$$d[\text{E}]/dt = k_{-1}[\text{ES}] - k_1[\text{S}][\text{E}] + k_2[\text{ES}]$$

$$d[\text{P}]/dt = k_2[\text{ES}]$$

Οι αρχικές συνθήκες ($t=0$) είναι:
 $[\text{P}]_0 = 0$, $[\text{ES}]_0 = 0$, $[\text{S}]_0 = S_0$ και $[\text{E}]_0 = E_0$

Απλοποίηση Εξισώσεων (time invariants)

Εφόσον έχουμε 2 ανεξάρτητες χημικές αντιδράσεις και 4 χημικές ουσίες, θα πρέπει να έχουμε $4-2 = 2$ γραμμικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων που παραμένουν σταθεροί (time invariant expressions).

Παραδείγματος χάρη, εποπτικά μπορούμε εύκολα να διαπιστώσουμε ότι:

$$d[ES]/dt + d[E]/dt = 0 \Rightarrow d([ES] + [E])/dt = 0 \Rightarrow [ES] + [E] = \text{const.}$$

Η σταθερά μπορεί άμεσα να υπολογιστεί από τις αρχικές συνθήκες, επομένως

$$[ES] + [E] = [ES]_0 + [E]_0 = 0 + E_0 \Rightarrow [ES] + [E] = E_0$$

Επίσης εποπτικά διαπιστώνουμε ότι:

$$d[S]/dt + d[ES]/dt + d[P]/dt = 0 \Rightarrow [S] + [ES] + [P] = S_0$$

Επίσης, διαπιστώνουμε ότι $d[S]/dt + d[P]/dt - d[E]/dt = 0 \Rightarrow [S] + [P] - [E] = S_0 - E_0 \quad ??$

Απλοποίηση Εξισώσεων (2)

Με το να «ανακαλύψουμε» τους δύο συνδυασμούς των ενώσεων που παραμένουν σταθεροί, διαπιστώνουμε ότι δεν χρειάζεται να επιλύσουμε 4 διαφορικές εξισώσεις για να υπολογίσουμε την δυναμική συμπεριφορά του συστήματος. **Δύο από τις διαφορικές εξισώσεις μπορούν να αντικατασταθούν με αλγεβρικές εξισώσεις:**

$$[E] = E_0 - [ES]$$

$$[P] = S_0 - [S] - [ES]$$

$$d[S]/dt = k_{-1}[ES] - k_1[S](E_0 - [ES])$$

$$d[ES]/dt = k_1[S](E_0 - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

με αρχικές συνθήκες ($t=0$) είναι: $[ES]_0 = 0$ και $[S]_0 = S_0$

Η επίλυση των εξισώσεων αυτών γίνεται πολύ εύκολα με το λογισμικό της MATLAB.

Αριθμητική επίλυση εξισώσεων με MATLAB

global Rmax Kss

C0 = 5; % g/L = kg/m³

Rmax = 0.45; % 1/h

Kss = 0.1; % g/L

% To solve the ODE defined in batch1ode.m over
% the interval $0 < t < 15$, we invoke ODE45:

t0 = 0;

tfinal = 15;

tspan = [t0 tfinal];

Cinit = C0; % Define initial conditions.

options = odeset('RelTol',1E-5);

[t,c] = ode15s(@batch1ode,tspan,Cinit,options);

% Open a new window for the figure

figure(figure);

plot(t,c), title('Substrate consumption'),xlabel('time [h]'),...
ylabel('C(t) [g/L]'), pause

% Hit <CR> to continue.

% Use T and C as different variables to see the
% effect of Changing the reaction rate
% Increase Rmax by a factor of 5

Rmax = 5*Rmax;

[T,C] = ode15s(@batch1ode,tspan,Cinit,options);

% All previously obtained results are in memory
% and can be used to plot things together!

% Open a new window for the figure

figure(figure);

plot(t,c(:,1),T,C(:,1)), ...

title('Effect of Reaction Rate (Rmax is 5 times higher)'),...

xlabel('time [h]'), ylabel('C(t) [g/L]'), pause

% Hit <CR> to continue.

File batch1ode.m

function dcdt = batch1ode(t,c);

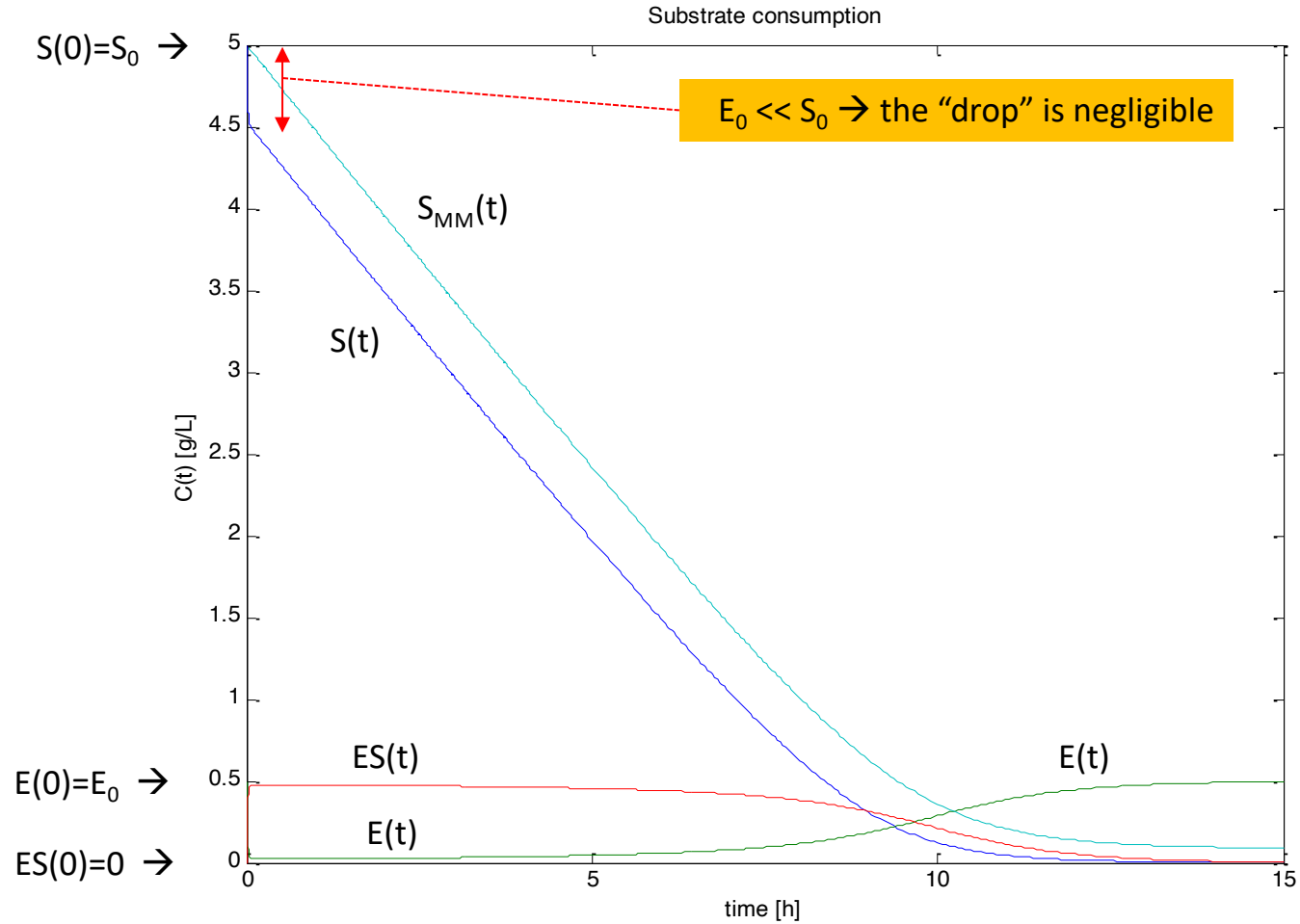
% Returns derivative for integration of C

global Rmax Kss

rs = Rmax*c / (Kss + c);

dcdt = - rs;

MATLAB output



Απλοποίηση θεωρώντας «ψευδομόνιμες συνθήκες» (Quasi-Steady State Assumption)

Εξετάζοντας την δυναμική συμπεριφορά του ένζυμου [E] και του συμπλόκου [ES] σε σχέση με αυτή του υποστρώματος [S] και του προϊόντος [P], διαπιστώνουμε την ύπαρξη «οιονεί στατικών συνθηκών» ή ότι έχουμε «ψευδομόνιμες συνθήκες». Δηλαδή, η συγκέντρωση του συμπλόκου [ES] μεταβάλλεται πού αργά και επομένως έχουμε

$$d[ES]/dt \approx 0 \Rightarrow k_1[S](E_0 - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \approx 0 \Rightarrow [ES] = \frac{E_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{E_0[S]}{K_m + [S]} \quad \text{όπου} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Επομένως με την παραδοχή «οιονεί στατικών συνθηκών» η δυναμική συμπεριφορά μπορεί να περιγραφεί από τις παρακάτω εξισώσεις (3 αλγεβρικές και μία διαφορική):

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{k_2 E_0 [S]}{K_m + [S]} \quad \text{με} \quad [S]_0 = S_0$$

$$[E] = \frac{K_m E_0}{K_m + [S]}$$

$$[P] = \frac{K_m S_0 + (K_m - E_0) S_0}{K_m + [S]}$$

$$[ES] = \frac{E_0 [S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Ήτοι, έχουμε πάλι } (-r_s) = r_p = \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{όπου} \quad r_{\max} = k_2 E_0 \quad \text{και} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Αναλυτική επίλυση

Επομένως είτε με την παραδοχή της σύντομης ισορροπίας είτε με την παραδοχή των ψευδομόνιμων συνθηκών, καταλήγουμε στην διαφορική εξίσωση

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{με} \quad [S]_0 = S_0$$

Η επίλυση της οποίας μπορεί να γίνει αριθμητικά (π.χ., με MATLAB) ή αναλυτικά. Η αναλυτική λύση έχει την μορφή:

$$r_{\max} t = S_0 - [S] + K_m \ln \left(\frac{S_0}{[S]} \right)$$

Implicit versus
explicit solution!

Εκτίμηση παραμέτρων: $r_{\max}$ & K_m

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε συγκεντρώσει τις μετρήσεις $\{t_i, [S]_i, i=1,2,\dots,N\}$ με βάση τις οποίες υπολογίζουμε τις αντίστοιχες τιμές $r_i, i=1,\dots,N$.

Οι τιμές r_i που εξ ορισμού είναι: $r_i = -d[S]/dt$ όταν $t=t_i$,

Ας θεωρήσουμε ότι έχουμε στην διάθεση μας τις "φιλτραρισμένες" μετρήσεις: $\{t_i, r_i, [S]_i, i=1,2,\dots,N\}$

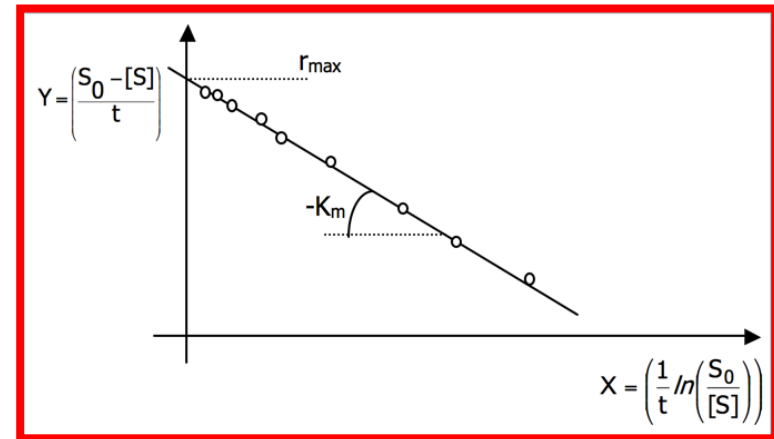
Διάγραμμα Walker

Η αναλυτική επίλυση της διαφορικής εξίσωσης που περιγράφει την κινητική Michaelis-Menten σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου είναι: $r_{\max} t = S_0 - [S] + K_m \ln(S_0/[S])$

$$\Rightarrow \left(\frac{S_0 - [S]}{t} \right) = -K_m \left(\frac{1}{t} \ln \left(\frac{S_0}{[S]} \right) \right) + r_{\max}$$

η οποία είναι της μορφής $Y = \alpha X + \beta$

$$\text{Όπου } Y = \left(\frac{S_0 - [S]}{t} \right) \quad \& \quad X = \left(\frac{1}{t} \ln \left(\frac{S_0}{[S]} \right) \right)$$



Η μέθοδος αυτή έχει το προτέρημα ότι δεν απαιτεί τον υπολογισμό του ρυθμού της αντίδρασης r_i ($i=1,\dots,N$) από τις μετρήσεις του $[S]$ με αριθμητική εκτίμηση της παραγώγου $-d[S]/dt$.

Διάγραμμα Lineweaver-Burk

Το γράφημα αυτό αποτελεί το πιο διαδεδομένο τρόπο υπολογισμού των κινητικών παραμέτρων όταν έχουμε κινητική Michaelis-Menten. Στην περίπτωση αυτή η εξίσωση του ρυθμού της αντίδρασης γράφεται ως:

$$r_p = \frac{r_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

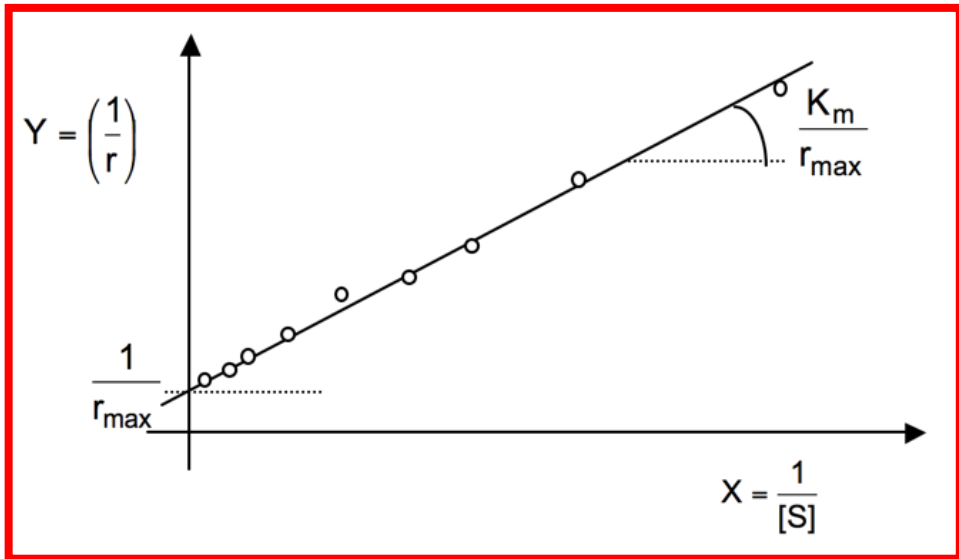
=>

$$\left(\frac{1}{r}\right) = \frac{K_m}{r_{\max}} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{r_{\max}}$$

η οποία είναι της μορφής $Y = \alpha X + \beta$

$$\text{με } Y = \left(\frac{1}{r}\right) \quad \& \quad X = \left(\frac{1}{[S]}\right)$$

Επειδή οι μετρήσεις γίνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις του υποστρώματος έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με αυτές σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με το διάγραμμα αυτό μπορούμε να υπολογίσουμε το $r_{\max}$ με σχετική ακρίβεια, ενώ αυτό δεν ισχύει για την σταθερά κορεσμού, K_m .



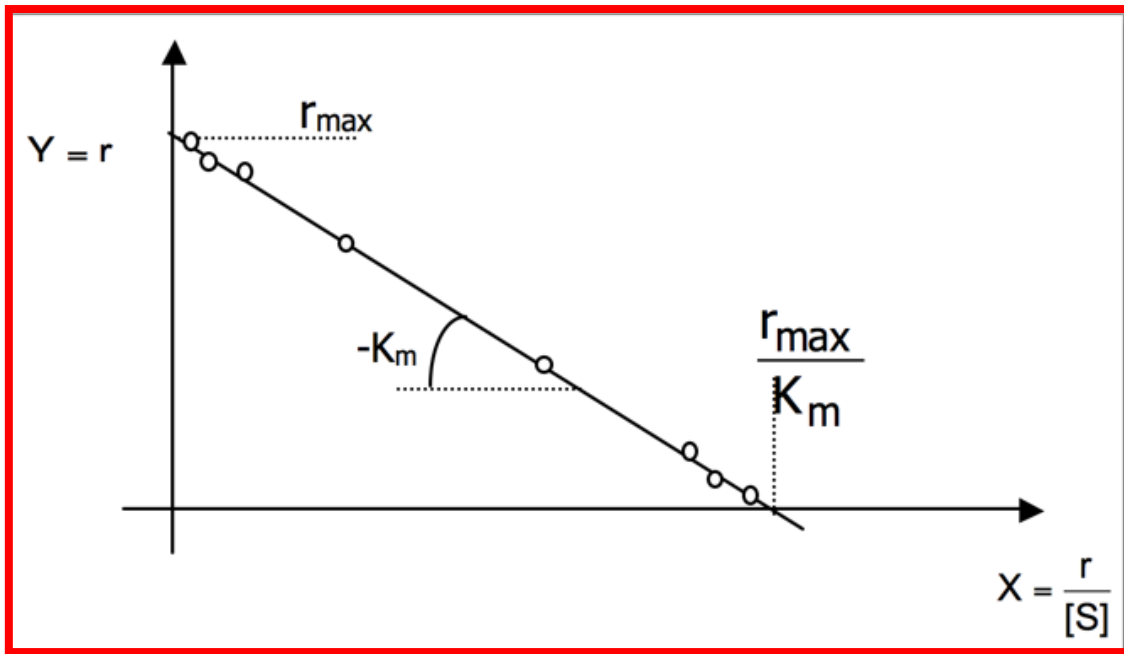
Διάγραμμα Eadie-Hofstee

Το διάγραμμα αυτό δεν έχει το πρόβλημα του διαγράμματος Lineweaver-Burk. Προκύπτει από την βασική σχέση του ρυθμού της αντίδρασης ως εξής:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S]} \Rightarrow \frac{r(K_m + [S])}{[S]} = r_{\max} \Rightarrow \frac{rK_m}{[S]} + r = r_{\max} \Rightarrow$$

$$r = r_{\max} - K_m \left(\frac{r}{[S]} \right)$$

με $Y = r$ και $X = \left(\frac{r}{[S]} \right)$



Διάγραμμα Hanes

Το διάγραμμα αυτό δεν έχει επίσης το πρόβλημα του διαγράμματος Lineweaver-Burk. Προκύπτει από την σχέση Lineweaver-Burk πολλαπλασιάζοντας με $[S]$:

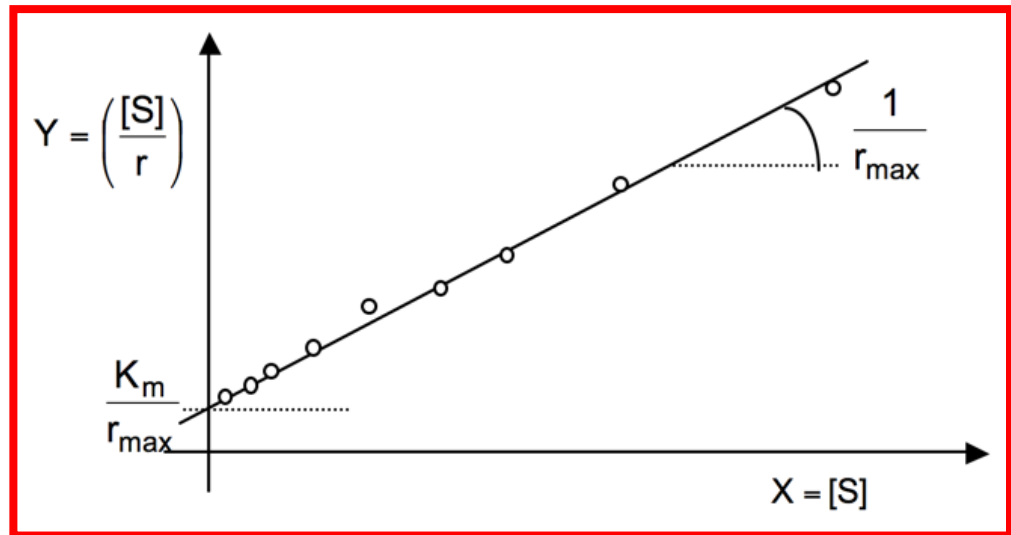
$$\left(\frac{1}{r}\right) = \frac{K_m}{r_{\max}} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{r_{\max}}$$

=>

$$\left(\frac{[S]}{r}\right) = \frac{1}{r_{\max}} [S] + \frac{K_m}{r_{\max}}$$

η οποία είναι της μορφής $Y = \alpha X + \beta$

με $Y = \left(\frac{[S]}{r}\right)$ και $X = [S]$



Μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression)

Όταν απαιτείται η στατιστικά καλύτερη εκτίμηση των παραμέτρων $r_{\max}$ και K_m , ο υπολογισμός τους πρέπει να γίνει με μη γραμμική παλινδρόμηση. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων βρίσκονται με την ελαχιστοποίηση του αθροίσματος (SSE):

$$\min_{r_{\max}, K_m} \left\{ \sum_{i=1}^N w_i \left[r_i - \frac{r_{\max} [S]_i}{K_m + [S]_i} \right]^2 \right\} \quad \text{δηλ.} \quad \min_{r_{\max}, K_m} \left\{ \sum_{i=1}^N w_i e_i^2 \right\}$$

Συντελεστής
βαρύτητας
($=1/\sigma_i^2$)

Πειραματική
«μέτρηση».

Τιμή του r_i υπολογισμένη από
το μαθηματικό μοντέλο.

Επίλυση του προβλήματος με αυτό τον τρόπο μας επιτρέπει επίσης τον άμεσο υπολογισμό της εκτιμώμενης διακύμανσης των παραμέτρων. Είναι πολύ σημαντικό να έχουμε κάποια εκτίμηση του λάθους (αβεβαιότητα) που περιέχουν οι εκτιμήσεις των παραμέτρων.

Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων με Παρεμπόδιση

Η δραστηριότητα ενός ενζύμου μπορεί να μειωθεί με πολλούς τρόπους. Ένα δομικό ανάλογο (structural analog) μπορεί να καταλάβει την καταλυτική (ενεργό) θέση (active site) του ενζύμου (με αντιστρεπτό ή μη τρόπο). Με διαφορετικό μηχανισμό, κάποιος αναστολέας (inhibitor) ενώνεται σε ένα άλλο σημείο του ενζύμου και προκαλεί δομικές παραμορφώσεις του ενζύμου που πλέον αυτό δεν μπορεί να αντιδράσει με το υπόστρωμα.

Γενικά έχουμε «**αντιστρεπτή**» και «**μη αντιστρεπτή**» αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου. Προφανώς αυτό μπορεί να διαπιστωθεί αμέσως με το να δούμε την μεταβολή στον ρυθμό μετατροπής του υποστρώματος όταν αφαιρούμε ή αραιώνουμε την συγκέντρωση του αναστολέα.

Μη Αντιστρεπτή Αναστολή / Παρεμπόδιση (Irreversible Inhibition):

Η δραστηριότητα ενός ενζύμου μπορεί να μειωθεί μη αντιστρεπτά όταν ο αναστολέας δημιουργεί ένα ισχυρό ομοιοπολικό δεσμό (covalent bond) με την ενεργό θέση του ενζύμου. Δηλαδή έχουμε παραγωγή του σταθερού συμπλόκου **EI (dead-end product)**:



Γενικά οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς μειώνουν την συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου χωρίς να αλλάζουν την κινητική της ενζυμικής αντίδρασης. Γι' αυτό συχνά χρησιμοποιούνται για κινητικές μελέτες πολύπλοκων ενζυμικών αντιδράσεων.

Αντιστρεπτή Αναστολή /Παρεμπόδιση (Reversible Inhibition)

Η μειωμένη δραστηριότητα ενός ενζύμου μπορεί να αποκατασταθεί όταν απομακρυνθεί ή μειωθεί η συγκέντρωση του αντιστρεπτού αναστολέα. Γενικά η μείωση / απομάκρυνση του αναστολέα επιτυγχάνεται με διάλυση ή με προσθήκη κάποιας άλλης ένωσης που αντιδρά με τον αναστολέα και αναστέλλει την δράση του.

Διακρίνουμε 4 κατηγορίες παρεμπόδισης ενζυμικών αντιδράσεων (με ένα υπόστρωμα):

- 1. Ανταγωνιστική Παρεμπόδιση (Competitive Inhibition)**
- 2. Μη Ανταγωνιστική Παρεμπόδιση (Noncompetitive Inhibition)**
- 3. Ανανταγωνιστική (Συνεργατική) Παρεμπόδιση (Uncompetitive Inhibition)**
- 4. Παρεμπόδιση Υποστρώματος (Substrate Inhibition)**

Ανταγωνιστική Παρεμπόδιση (Competitive Inhibition)

Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς είναι συνήθως δομικά ανάλογα που ανταγωνίζονται με το υπόστρωμα για την ενεργό θέση του ενζύμου. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος είναι:



και



Δεχόμενοι την παραδοχή της γρήγορης ισορροπίας μεταξύ ενζύμου και συμπλόκων έχουμε

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad \text{και} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Θεωρώντας το ισοζύγιο του ενζύμου εντός του βιοαντιδραστήρα έχουμε επίσης:

$$[E] + [ES] + [EI] = E_0 \Rightarrow [E] + \frac{[E][S]}{K_M} + \frac{[E][I]}{K_I} = E_0 \Rightarrow [E] = \frac{E_0}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I}}$$

Ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος είναι:

$$r = dP/dt = k_2[ES] = k_2 \frac{[E][S]}{K_M} = k_2 \frac{E_0}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I}} \frac{[S]}{K_M} \Rightarrow$$

Ανταγωνιστική Παρεμπόδιση (Competitive Inhibition)

Ο ρυθμός της αντίδρασης γίνεται

$$r = \frac{k_2 E_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

που είναι της μορφής

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_m^{\text{app}} + [S]}$$

με $r_{\max} = k_2 E_0$ και

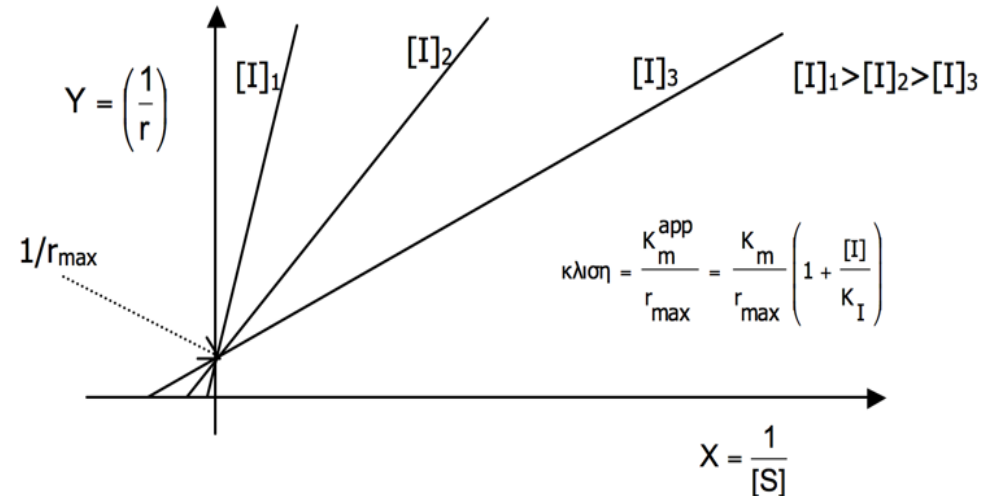
$$K_m^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι με την προσθήκη του αναστολέα:

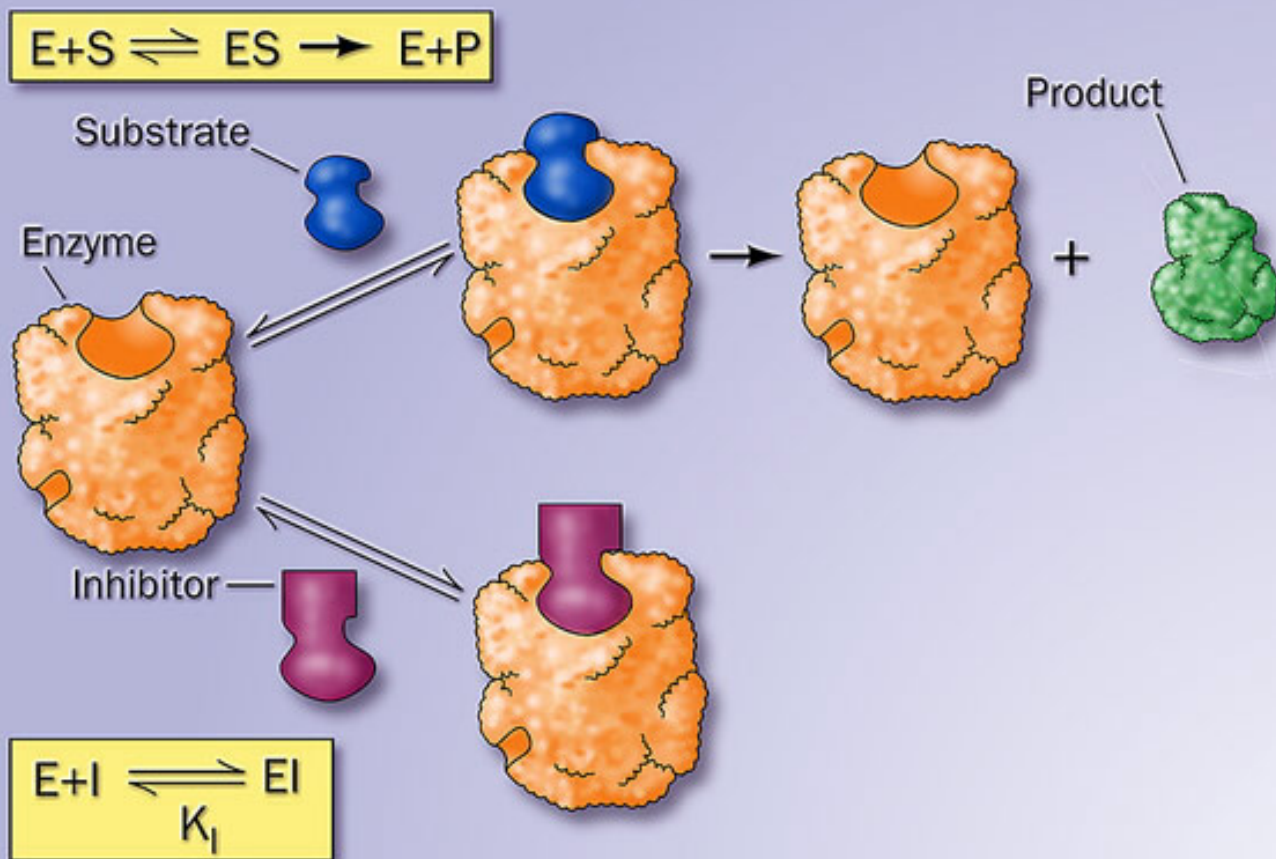
- Ο μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης παραμένει σταθερός, και
- Η σταθερά κορεσμού μεγαλώνει και επομένως η συγγένεια (affinity) του υποστρώματος μειώνεται.

Η μείωση του ρυθμού μπορεί να επανακτηθεί με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Διάγραμμα Lineweaver-Burk



Competitive Inhibition



Ανανταγωνιστική (Συνεργατική) Παρεμπόδιση (Uncompetitive Inhibition)

Οι ανανταγωνιστικοί (συνεργατικοί) αναστολείς είναι ενώσεις που αντιδρούν μόνο με το σύμπλοκο [ES] και όχι με το ένζυμο. Οι αντιδράσεις είναι:



Δεχόμενοι την παραδοχή της γρήγορης ισορροπίας καταλήγουμε στην έκφραση

$$r = \frac{\left(\frac{k_2 E_0}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \right) [S]}{\left(\frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \right) + [S]}$$

της μορφής

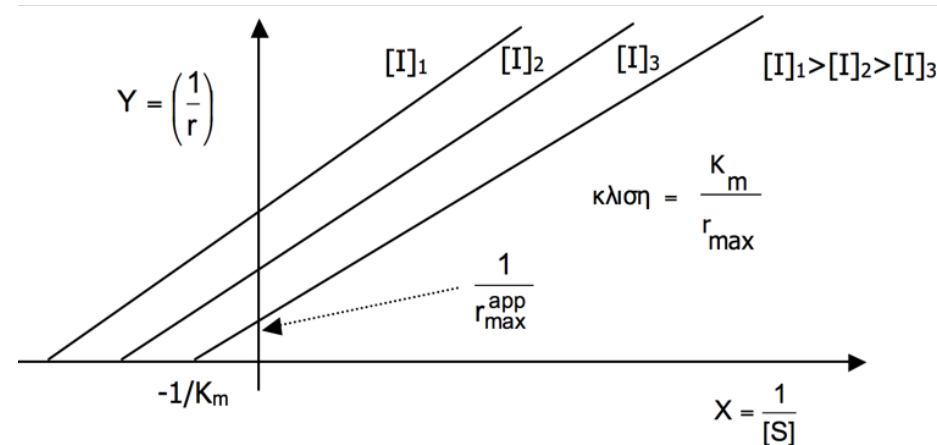
$$r = \frac{r_{\max}^{\text{app}} [S]}{K_m^{\text{app}} + [S]}$$

όπου

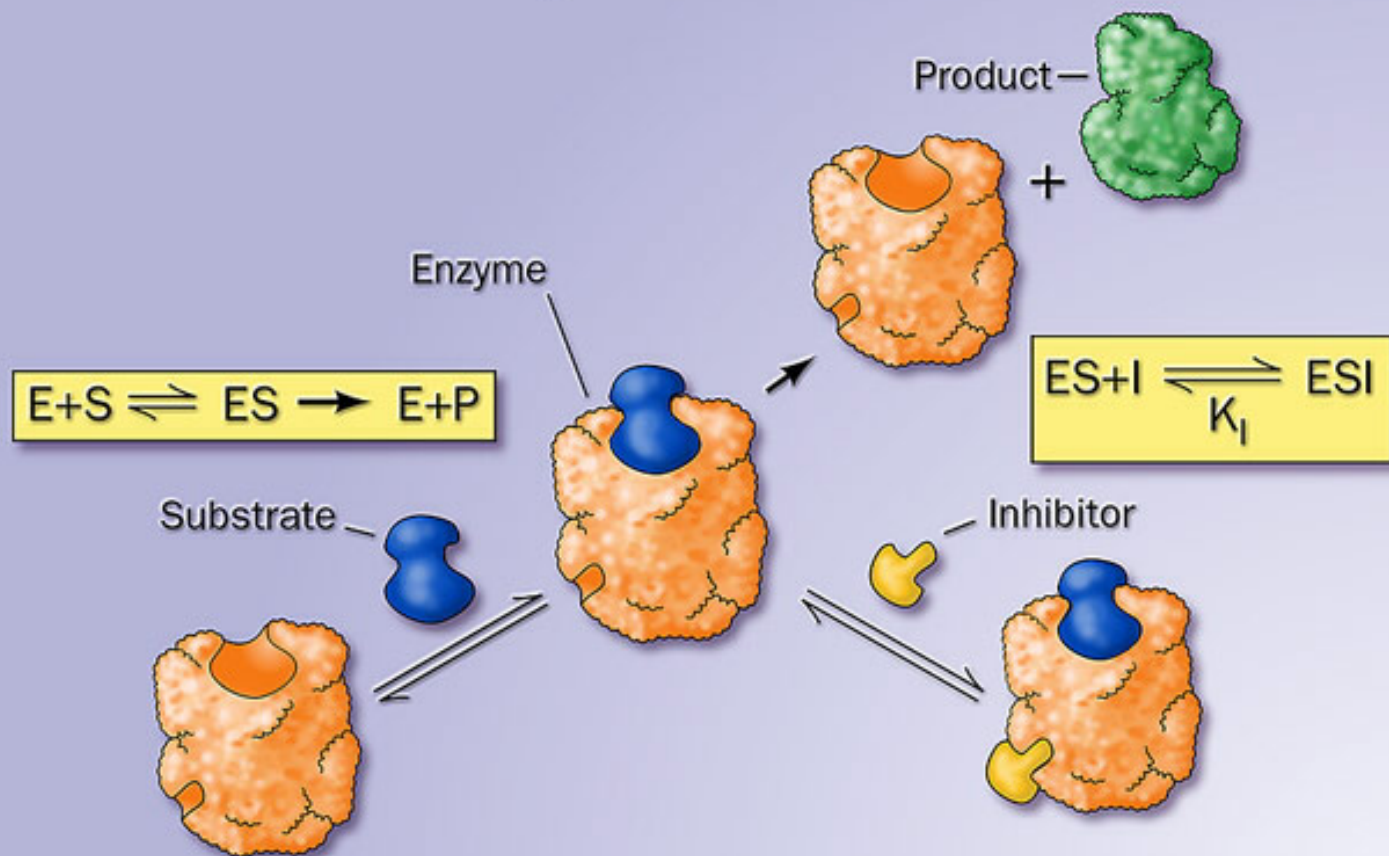
$$r_{\max}^{\text{app}} = \frac{k_2 E_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$$K_m^{\text{app}} = \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

Διάγραμμα Lineweaver-Burk

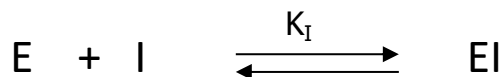
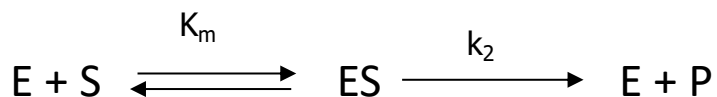


Uncompetitive Inhibition



Μη Ανταγωνιστική Παρεμπόδιση (Noncompetitive Inhibition)

Μη ανταγωνιστικοί αναστολείς είναι συνήθως ενώσεις που αντιδρούν σε άλλο σημείο του ενζύμου μειώνοντας έτσι την συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος είναι:



Με την ίδια διαδικασία καταλήγουμε

$$r = \frac{k_2 E_0 [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) ([S] + K_m)}$$

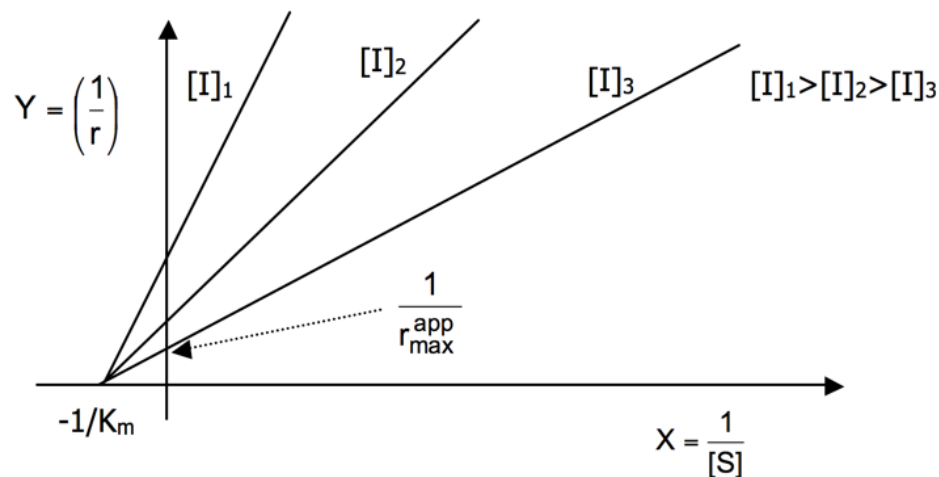
που είναι της μορφής

$$r = \frac{r_{\max}^{\text{app}} [S]}{K_m + [S]}$$

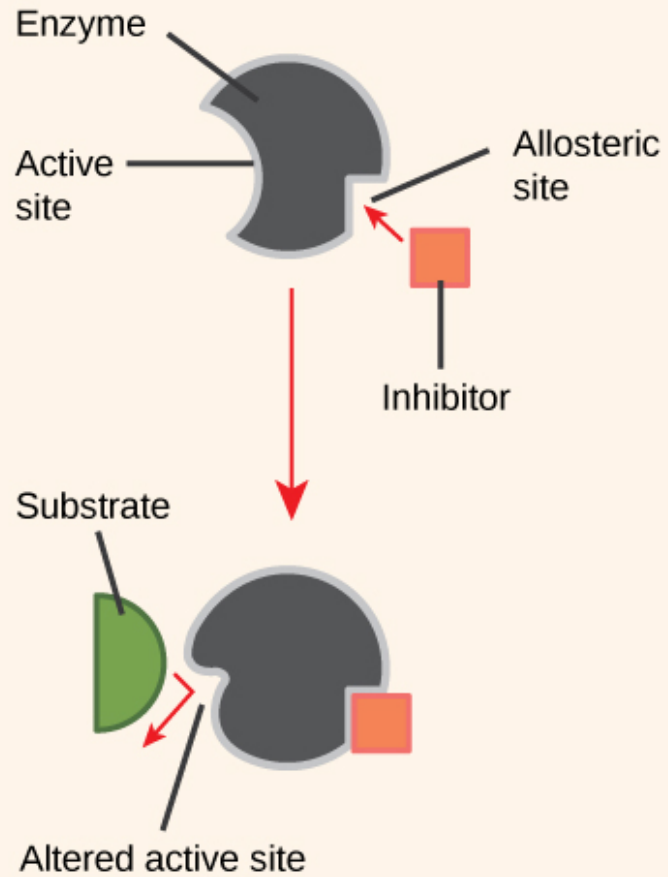
με

$$r_{\max}^{\text{app}} = \frac{k_2 E_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

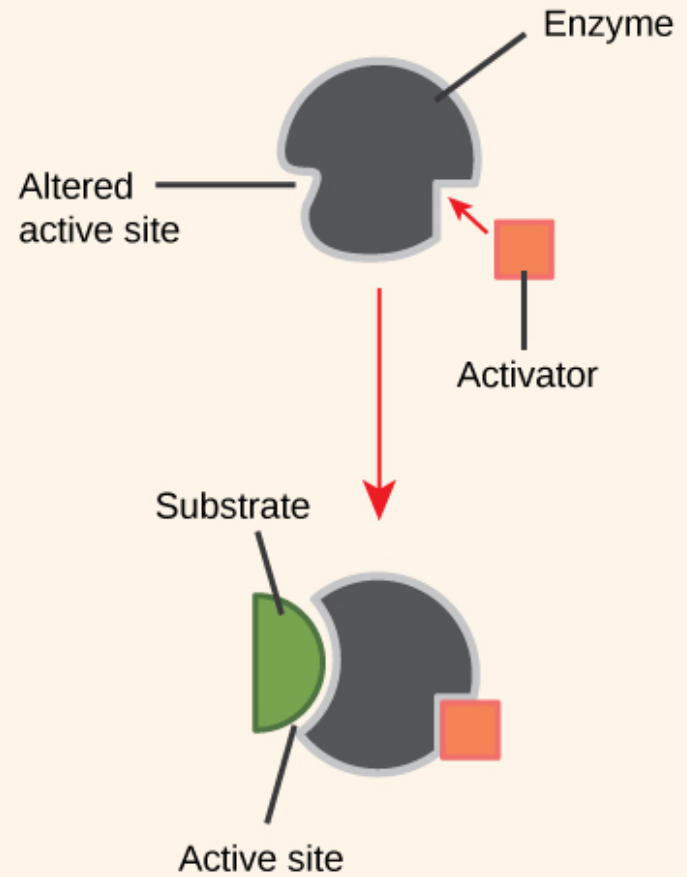
Διάγραμμα Lineweaver-Burk

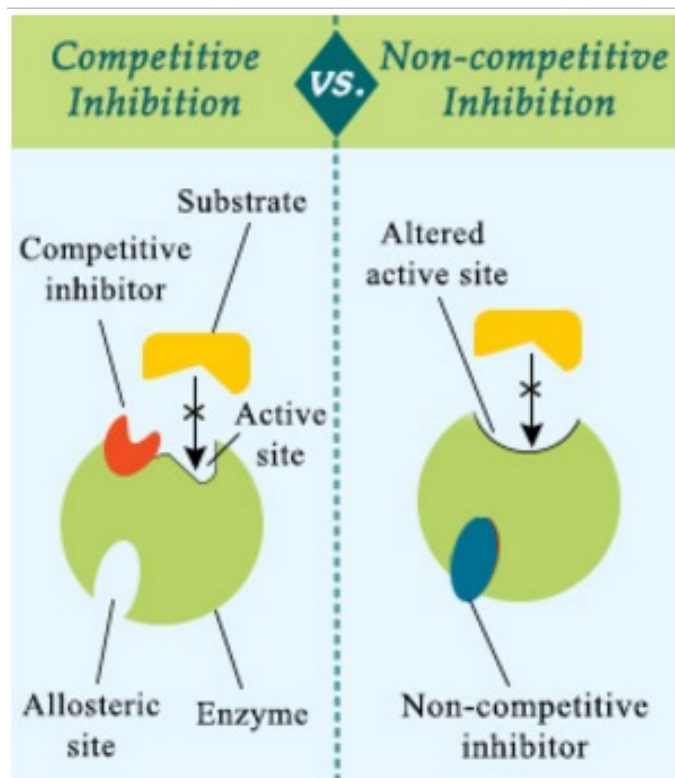


Allosteric Inhibition



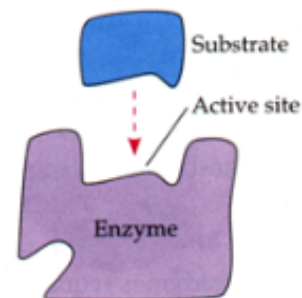
Allosteric Activation



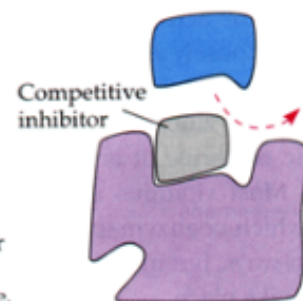


Enzyme Inhibition

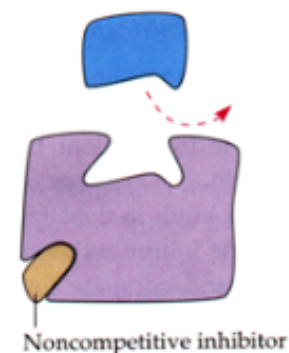
(a) A substrate can normally bind to the active site of an enzyme.



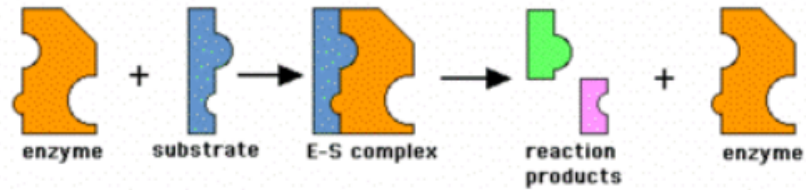
(b) A competitive inhibitor mimics the substrate and competes for the active site.



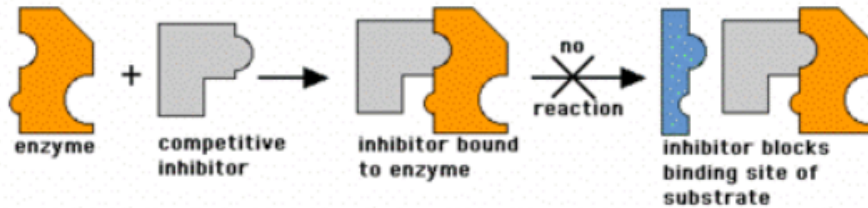
(c) A noncompetitive inhibitor binds to the enzyme at a location away from the active site, but alters the conformation of the enzyme so that the active site is no longer fully functional.



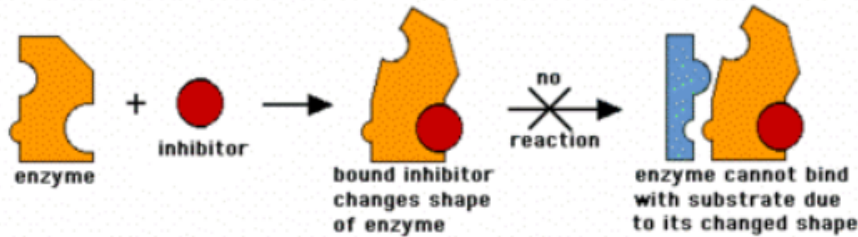
A) Normal reaction of enzyme and substrate to form products:



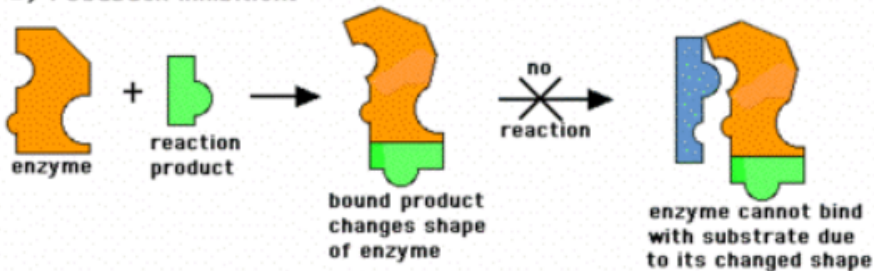
B) Competitive inhibition:

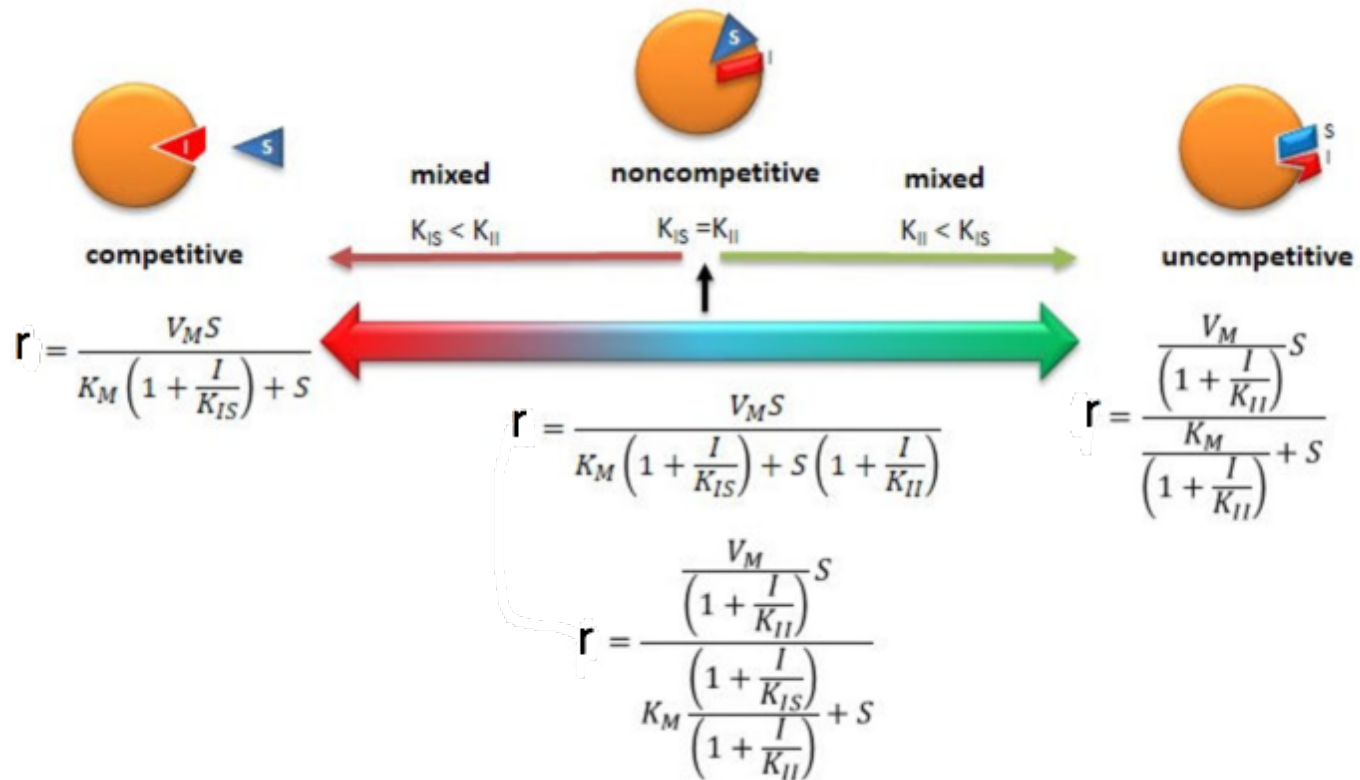


C) Allosteric (non-competitive) inhibition:



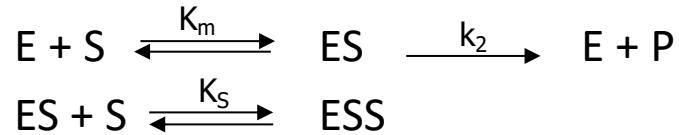
D) Feedback inhibition:





Παρεμπόδιση Υποστρώματος (Substrate Inhibition)

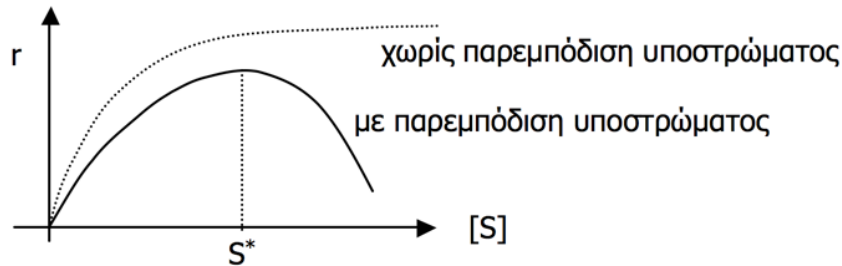
Σε ορισμένες ενζυματικές αντιδράσεις υψηλές συγκεντρώσεις του υποστρώματος δρουν ανασταλτικά και μειώνουν τον ρυθμό της αντίδρασης με το σχηματισμό ενός αδρανούς συμπλόκου [ESS]. Οι αντιδράσεις είναι



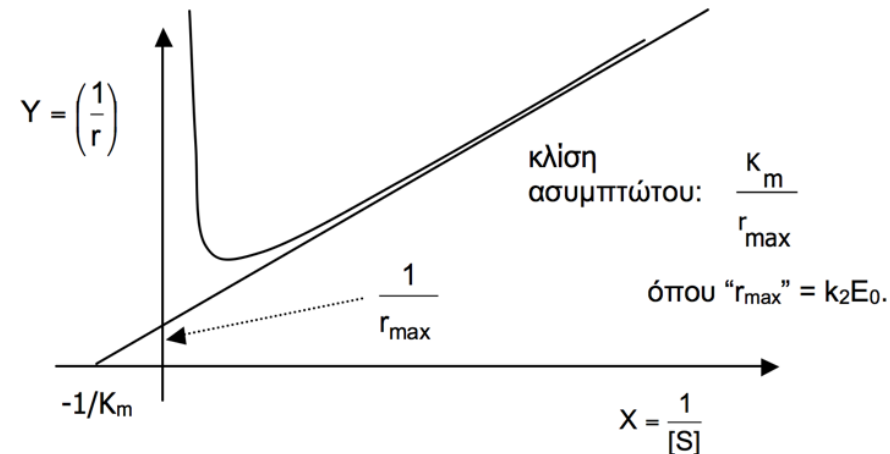
Ο ρυθμός της αντίδρασης σε αυτή την περίπτωση είναι:

$$r = \frac{k_2 E_0 [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}} \quad \text{που γίνεται μέγιστος όταν}$$

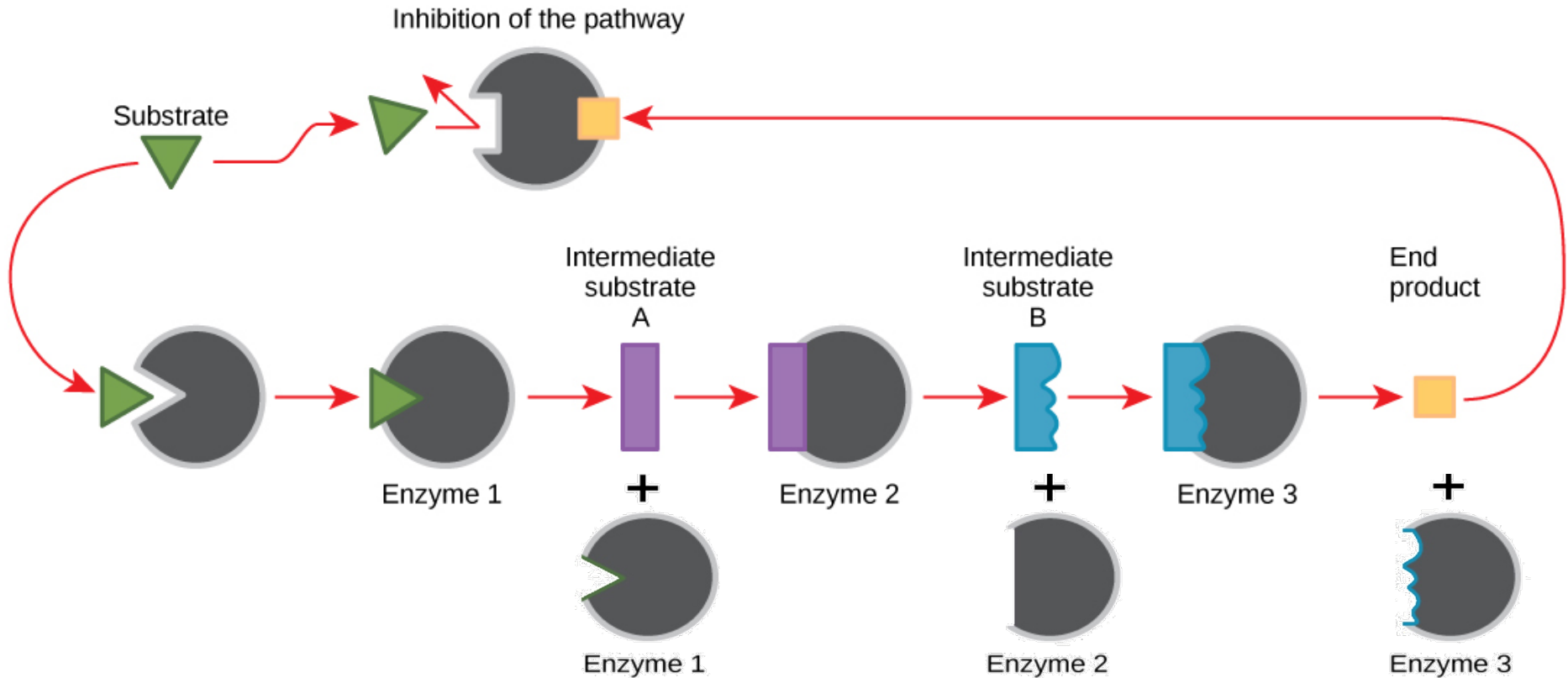
$$S^* = \sqrt{K_m K_s}$$



Διάγραμμα Lineweaver-Burk



Παρεμπόδιση Υποστρώματος (Product Inhibition)



Ενζυμικές Αντιδράσεις δύο Υποστρώματων

Οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις **χρησιμοποιούν δύο ή περισσότερα υποστρώματα**. Συνήθως το δεύτερο υπόστρωμα είναι ένας συμπαραγόντας (cofactor), π.χ., NAD^+ σε οξειδαναγωγικά ένζυμα, oxidoreductases) **αλλά αν βρίσκεται σε σχεδόν σταθερή συγκέντρωση, οι σχέσεις που αναπτύξαμε προηγουμένως ισχύουν.**

Γενικά οι περισσότερες αντιδράσεις με πολλαπλά υποστρώματα εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες:

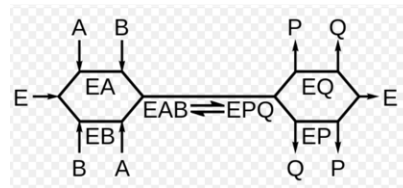
- α) Όταν όλα τα υποστρώματα πρέπει να ενωθούν με το ένζυμο προτού έχουμε καταλυτική δράση (δημιουργία ενός πολύπλοκου ενδιάμεσου) – ternary complex mechanism. $[\text{ES}_1\text{S}_2]$
- β) Όταν ένα προϊόν ελευθερώνεται προτού ένα άλλο υπόστρωμα ενώνεται με το ένζυμο – enzyme-substituted mechanism.

Και για τους δύο ανωτέρω μηχανισμούς διακρίνουμε δύο υποπεριπτώσεις όπου η σειρά των υποστρωμάτων που αντιδρούν είναι αναγκαστική (προκαθορισμένη) (compulsory order) ή τυχαία (random order).

Ternary complex mechanism

Κατόπιν σχετικής ανάλυσης των αντιδρώντων με προκαθορισμένη σειρά (compulsory order), ο Dalziel πρότεινε την παρακάτω έκφραση για τον ρυθμό της αντίδρασης, η οποία επίσης ισχύει και για τυχαία σειρά αντιδρώντων υποστρωμάτων:

$$r = \frac{E_0}{\theta_0 + \frac{\theta_1}{[S_A]} + \frac{\theta_2}{[S_B]} + \frac{\theta_3}{[S_A][S_B]}}$$

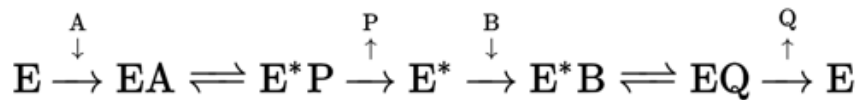


όπου θ_0 , θ_1 , θ_2 και θ_3 είναι σταθερές που εξαρτώνται από τις κινητικές σταθερές και συχνά υπολογίζονται πειραματικά.

Enzyme-substituted mechanism (ping-pong mechanism):

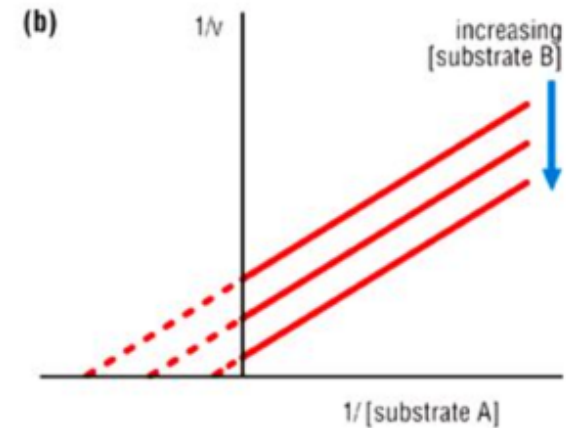
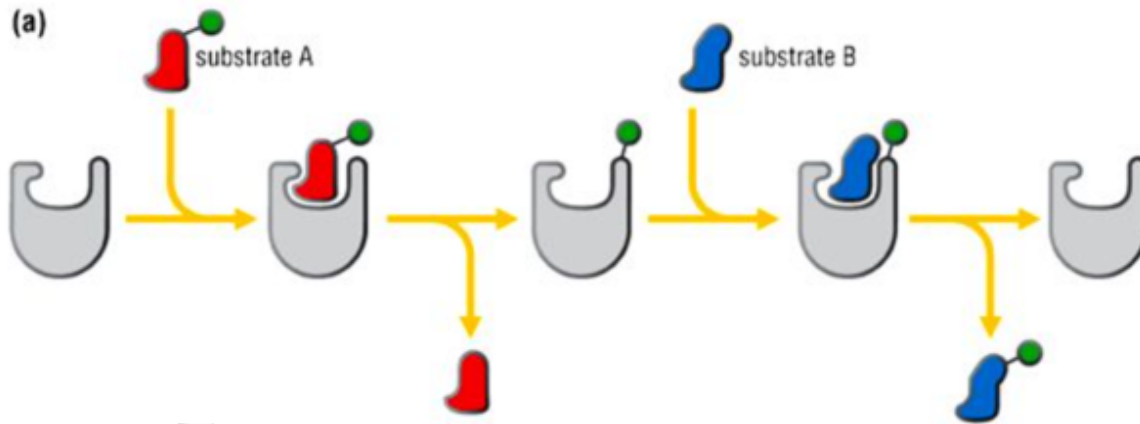
Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός της αντίδρασης είναι της μορφής

$$r = \frac{E_0}{\theta_0 + \frac{\theta_1}{[S_A]} + \frac{\theta_2}{[S_B]}}$$



Ping-pong mechanism for an enzyme reaction. Intermediates contain substrates A and B or products P and Q.

Παράδειγμα Ping-Pong αντιδράσεων



(a) In ping-pong reactions, two substrates bind sequentially to an enzyme. In this example, a chemical group (green) is transferred from substrate A (red) to substrate B (blue).

(b) A Lineweaver Burk plot of $1/v$ against $1/[\text{substrate A}]$

Επίδραση του pH

Το pH μπορεί να αλλάξει σημαντικά την δραστικότητα ενός ενζύμου. Ιδιαίτερα όταν ομάδες που υπόκεινται σε ιονισμό βρίσκονται πλησίον της ενεργού θέσης του ενζύμου. Συνήθως η μεταβολή αυτή είναι αντιστρεπτή.

Μη αντιστρεπτή μεταβολή του ενζύμου (μετουσίωση) επέρχεται όταν η μεταβολή του pH είναι εξαιρετικά μεγάλη.

Ας υποθέσουμε ότι το pH επηρεάζει σημαντικά την δραστικότητα ενός ενζύμου που μπορεί να ιονιστεί από E σε E⁻ και σε E⁻². Δηλαδή έχουμε τις αντιδράσεις:



Από τις σταθερές ισορροπίας έχουμε

$$K_1 = \frac{[H^+][E^-]}{[E]} \quad \text{και} \quad K_2 = \frac{[H^+][E^{-2}]}{[E^-]}$$

Υπενθυμίζεται ότι όταν $[E]=[E^-]$ τότε $pH = pK_1$ ($=-\log K_1$)

και αντίστοιχα όταν $[E^-]=[E^{-2}]$ τότε $pH = pK_2$

Επίδραση του pH (2)

Εάν θεωρήσουμε ότι το ένζυμο εντός του αντιδραστήρα δεν χάνεται και ότι μπορεί να βρίσκεται και υπό τις τρεις μορφές, τότε έχουμε

$$[E] + [E^-] + [E^{-2}] = E_0$$

Ας υποθέσουμε τώρα ότι η **ενεργός μορφή του ενζύμου είναι η E^-** . Μπορούμε να ορίσουμε το **ενεργό κλάσμα του ενζύμου, y^-** ως

$$y^- = \frac{[E^-]}{E_0} = \frac{[E^-]}{[E] + [E^-] + [E^{-2}]} = \frac{[E^-]}{\frac{[E^-][H^+]}{K_1} + [E^-] + \frac{K_2[E^-]}{[H^+]}}$$

και επομένως

$$y^- = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

Οι αντιδράσεις πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης (protonation & deprotonation reactions) είναι πολύ ταχείες και μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κλάσμα y^- ακόμα και όταν το ένζυμο καταλύει μία αντίδραση. Εφόσον E^- είναι το ενεργό ένζυμο, τότε

$$r_{\max} = k_2[E]_{\text{active}} \Rightarrow r_{\max} = k_2 E_0 y^-$$

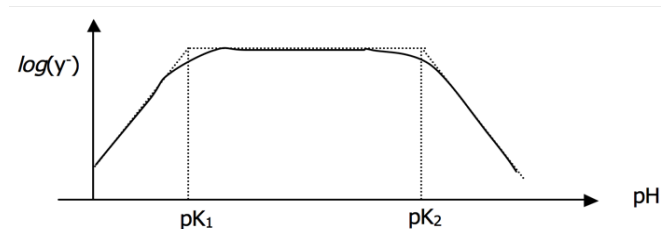
Η επίδραση του pH στο $r_{\max}$ είναι η ίδια με την επίδραση του pH στο y^- .

Michaelis συναρτήσεις του pH

Τα **κλάσματα y , y^- και y^{-2}** ονομάζονται «Michaelis συναρτήσεις του pH». Προφανώς αν το E^- είναι η ενεργός μορφή του ενζύμου, τότε το **βέλτιστο pH είναι εκείνο για το οποίο το y^- έχει την μέγιστη τιμή**.

Η συνάρτηση y^- λαμβάνει την μέγιστη τιμή της όταν $[H^+]_{\text{opt}} = \sqrt{K_1 K_2} \Rightarrow (\text{pH})_{\text{opt}} = \frac{1}{2}[pK_1 + pK_2]$

Το διάγραμμα του $\log(y^-) = -\log\left(1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}\right)$ ως προς το pH έχει την μορφή

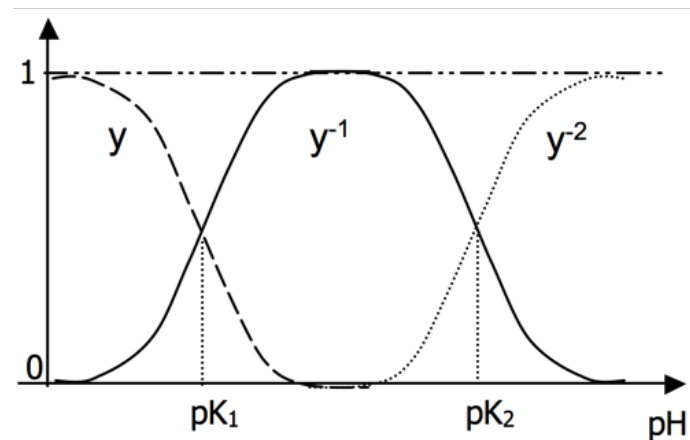


Κατά παρόμοιο τρόπο βρίσκουμε και τις άλλες δύο συναρτήσεις του Michaelis, y & y^{-2} .

$$y = \frac{[E]}{E_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}}$$

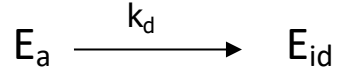
και

$$y^{-2} = \frac{[E^{-2}]}{E_0} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2}}$$



Κινητική Απενεργοποίησης του Ενζύμου

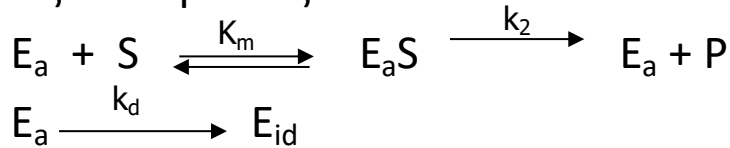
Η απενεργοποίηση (μετουσίωση) των ενζύμων γενικά ακολουθεί την αντίδραση



Η συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου $[E_a]$ μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου σύμφωνα με την δυναμική μιας αντίδρασης 1^{ης} τάξης:

$$[E_a] = [E_a]_0 e^{-k_d t}$$

Εάν όμως έχουμε την **παρουσία υποστρώματος**, τότε συνήθως το ενεργό ένζυμο που βρίσκεται υπό την μορφή συμπλόκου $[E_a S]$ δεν απενεργοποιείται. Στην περίπτωση αυτή έχουμε τις αντιδράσεις:



Και τελικά έχουμε

$$\frac{d[E_{a,tot}]}{dt} = \frac{-k_d [E_{a,tot}]}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

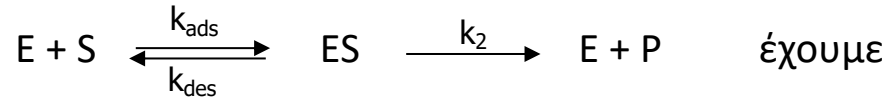
με αρχική συνθήκη: $[E_{a,tot}] = E_0$

Ενζυμικές Αντιδράσεις με Στερεά Υποστρώματα

Στην περίπτωση αυτή έχουμε το ένζυμο διαλυμένο στην υγρή φάση να αντιδρά με το υπόστρωμα στην στερεά φάση. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι έχουμε ένα **σταθερό αριθμό καταλυτικών θέσεων προσρόφησης στην επιφάνεια του υποστρώματος (S_0 , εκφρασμένο ανά μονάδα υγρού όγκου)**. Μάλιστα όταν μία θέση καταλαμβάνεται από το ένζυμο και δημιουργείται το προϊόν, υποθέτουμε ότι μία καινούργια θέση δημιουργείται στην επιφάνεια του υποστρώματος, δηλ.,

$$[S] + [ES] = [S_0]$$

Από τις αντιδράσεις

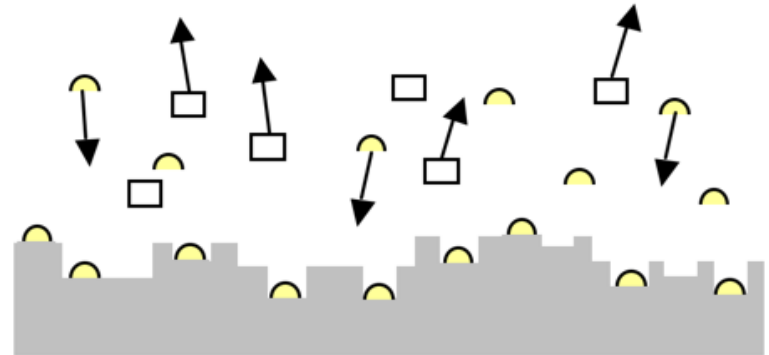


$$r_p = k_2[ES] = \frac{k_2[S_0][E]}{\left(\frac{k_{\text{des}}}{k_{\text{ads}}}\right) + [E]}$$

Στην περίπτωση των στερεών υποστρωμάτων μπορούμε να υποθέσουμε ότι το ένζυμο είναι σε περίσσεια (και επειδή δεν καταναλίσκεται)

να θέσουμε $[E] \approx E_0$, και έτσι καταλήγουμε στην έκφραση

$$r_p = \frac{k_2[S_0]E_0}{\left(\frac{k_{\text{des}}}{k_{\text{ads}}}\right) + E_0}$$



ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ (IMMOBILIZED ENZYMES)

Στην περίπτωση αυτή έχουμε το ένζυμο «υπό περιορισμό» αντί να είναι ελεύθερα διακινούμενο στην υγρή φάση.

Οι λόγοι που πολύ συχνά προτιμάμε την ακινητοποίηση των ενζύμων είναι:

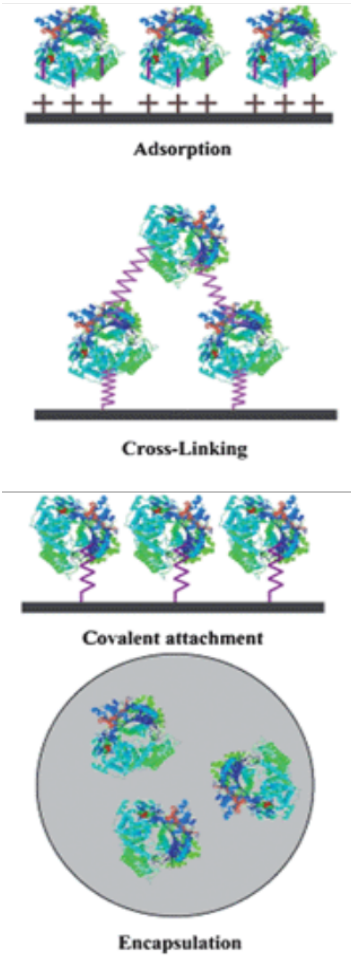
1. **Εύκολος διαχωρισμός** ενζύμου από τα προϊόντα της αντίδρασης που είναι διαλυμένα στην υγρή φάση.
2. Συχνά η **ευστάθεια** (stability) και η **ενεργότητα** (activity) του ενζύμου αυξάνεται.
3. **Δυνατότητα λειτουργίας** του αντιδραστήρα σαν **σταθερή κλίνη**.

Στην περίπτωση των ακινητοποιημένων ενζύμων, εκτός από την εγγενή κινητική (intrinsic reaction rate) οφείλουμε να λάβουμε υπόψη μας και τις επιπλέον αντιστάσεις λόγω **μεταφοράς μάζας** (mass transfer resistances).

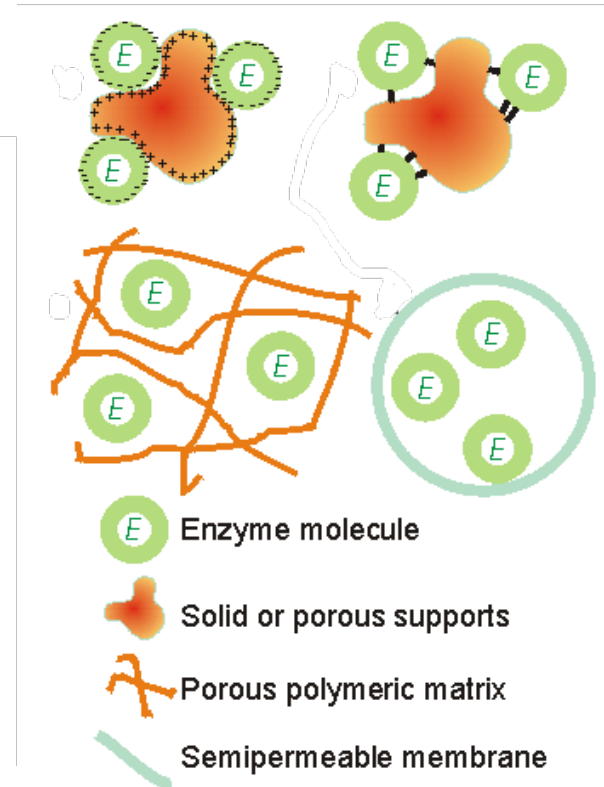
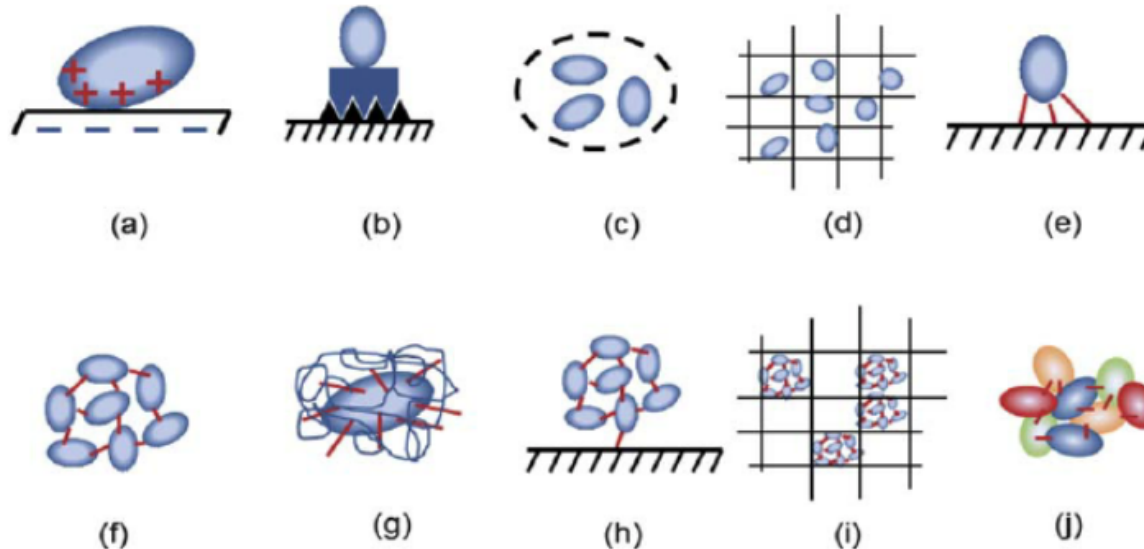
Η μεταφορά μάζας γίνεται με διάχυση από το διάλυμα στην επιφάνεια του υλικού υποστήριξης (support matrix) και στη συνέχεια με εσωτερική διάχυση (intraparticle diffusion) εάν έχουμε εγκλωβισμό του ενζύμου στο εσωτερικό του υλικού υποστήριξης.

Τα ένζυμα μπορούν να ακινητοποιηθούν με τους εξής τρόπους:

Δεσμευμένα με δεσμό (Immobilization by binding)				Παγιδευμένα (Immobilization by physical retention)			
Binding to Carriers		Cross-linking		Matrix entrapment		Membrane enclosure	
Ιοντικός δεσμός ή προσρό-φηση (Ionic or adsorptive)	Ομοιοπολικός δεσμός (Covalent bonding)	Δεσμευμένα μεταξύ τους (Cross-linking)	(Co-cross-linking)	Μικροκάψουλες (Beads, micro-carriers)	Ίνες (Fibers)	Εγκλωβισμός (Encapsulation)	Αντιδραστήρες με μεμβράνες (Membrane reactors)



Enzyme immobilization: ionic physical adsorption (a), high-affinity physical adsorption (b), **encapsulation (c)**, **entrapment (d)**, covalent binding on an insoluble support (e), **cross-linked enzymes (f)**, a single nano-gel enzyme (g), a combination of e and f (h), a combination of d and f (i), and **combi-CLEAs (j)**

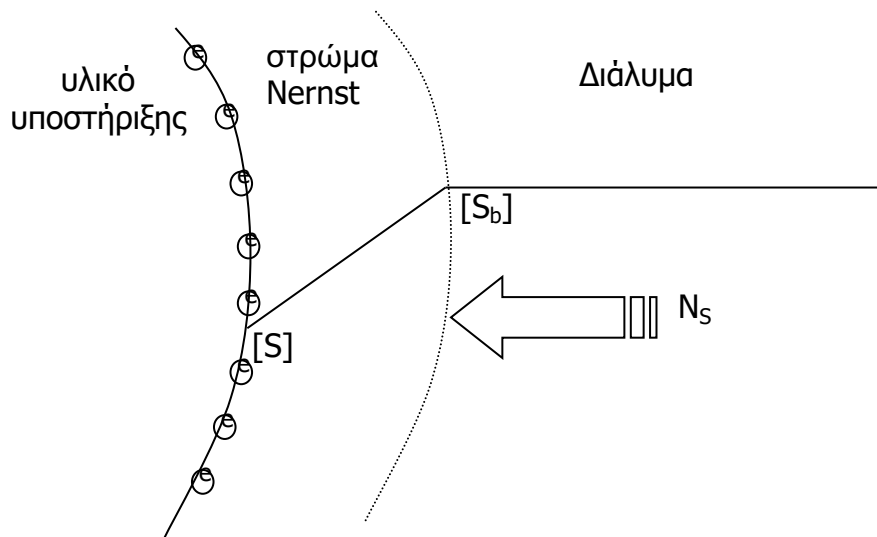


Επιφανειακή Ακινητοποίηση Ενζύμων (Surface immobilization)

Ο ρυθμός διάχυσης, N_s [$\text{mol}/(\text{m}^2\text{sec})$], του υποστρώματος από το διάλυμα (bulk) στην διεπιφάνεια (interface) του στερεού υποστήριξης (support matrix) δίνεται από την σχέση:

$$N_s = k_s([S_b] - [S])$$

όπου $[S_b]$ είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος στο διάλυμα (αυτή που μετράμε), $[S]$ είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος στην διεπιφάνεια (εκεί που γίνεται η αντίδραση) και k_s [m/sec] είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (mass transfer coefficient). Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας υπολογίζεται από συσχετίσεις (correlations) που έχουν γίνει μεταξύ k_s και των {διαμέτρου υλικού υποστήριξης, RPM, σχεδιασμού αναδευτήρα, πυκνότητας και ιξώδους της υγρής φάσης}.



Ρυθμός της αντίδρασης

Επειδή θεωρούμε ότι δεν υπάρχει συσσώρευση του υποστρώματος στο στρώμα Nernst και στην διεπιφάνεια που γίνεται η αντίδραση, ο ρυθμός διάχυσης πρέπει να ισούται με τον ρυθμό της αντίδρασης ανά μονάδα επιφανείας του υποστήριξης, δηλ.,

$$N_S = r' \quad \Rightarrow \quad k_S([S_b] - [S]) = \frac{r'_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

όπου $r'_{\max} = k_2 E'_0$, και E'_0 είναι η επιφανειακή συγκέντρωση του ενζύμου $[\text{mol}/\text{m}^2]$.

Η παραπάνω σχέση μας επιτρέπει να λύσουμε ως προς $[S]$ και να εκφράσουμε τον ρυθμό της αντίδρασης ανά μονάδα επιφανείας του υλικού υποστήριξης σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στο διάλυμα $[S_b]$. Δηλ. $[S] = f(S_b, K_m, r'_{\max}, k_S) \Rightarrow r' = \dots$

Ορίζοντας τις παρακάτω αδιάστατες μεταβλητές,

$$x = \frac{[S]}{[S_b]}, \quad \kappa = \frac{K_m}{[S_b]} \quad \text{και} \quad \text{Da} = \frac{r'_{\max}}{k_S [S_b]}$$

η προηγούμενη σχέση γίνεται:

$$\frac{1-x}{\text{Da}} = \frac{x}{\kappa + x}$$

που μπορεί να λυθεί ως προς “x”...

Ρυθμός της αντίδρασης (2)

Η εξίσωση μπορεί εύκολα να επιλυθεί ως προς x και επομένως υπολογίζουμε το r'

$$r' = k_s([S_b] - [S]) \Rightarrow r' = k_s[S_b](1 - x)$$

Έχοντας το r' (ρυθμός ανά μονάδα επιφανείας) μπορούμε να υπολογίσουμε το r (ρυθμός ανά μονάδα όγκου του αντιδραστήρα). Τούτο επιτυγχάνεται πολλαπλασιάζοντας το r' με τη φόρτιση του αντιδραστήρα ρ_b (bead loading, [g-support/m³]) και την ειδική επιφάνεια του υλικού υποστήριξης, a [m²/g-support]. Δηλ.

$$r = r' a \rho_b$$

$$\left(\frac{\text{mol}}{\text{s m}^3} = \frac{\text{mol}}{\text{s m}^2} \frac{\text{m}^2}{\text{g}} \frac{\text{g}}{\text{m}^3} \right)$$

Αριθμός του Damköhler

Η αδιάστατη παράμετρος Da ονομάζεται *αριθμός του Damköhler*

$$Da = \frac{\text{maximum reaction rate}}{\text{maximum mass flux}} = \frac{r'_{\max}}{k_s([S_b] - 0)}$$

Επομένως **εάν $Da \ll 1$** ο μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης είναι πολύ μικρότερος του μεγίστου ρυθμού μεταφοράς μάζας και **το σύστημα ευρίσκεται υπό κινητικό έλεγχο** (reaction-limited regime). Σε αυτή την περίπτωση $[S] \approx [S_b]$ (δηλ. $x=1$) και ο μετρούμενος ρυθμός της αντίδρασης (observed ή apparent reaction rate) είναι

$$r' = \frac{r'_{\max}[S_b]}{K_m + [S_b]}$$

Εάν έχουμε **$Da \gg 1$** ο ρυθμός της αντίδρασης είναι πολύ πιο γρήγορος από τον ρυθμό μεταφοράς μάζας από το διάλυμα στη διεπιφάνεια και **το σύστημα βρίσκεται υπό έλεγχο διάχυσης** (diffusion-limited regime). Σε αυτή την περίπτωση $[S] \approx 0$ (δηλ. $x=0$) και ο μετρούμενος ρυθμός της αντίδρασης (observed reaction rate) είναι

$$r' = k_s([S_b] - 0) \Rightarrow r' = k_s[S_b]$$

Δηλαδή είναι 1^{ης} τάξης ως προς το υπόστρωμα και ανεξάρτητη των κινητικών σταθερών $r'_{\max}$ και K_m .

Εσωτερική ακινητοποίηση ενζύμων / Επίδραση εσωτερικής διάχυσης (intraparticle diffusion effects)

Όταν έχουμε ένζυμα παγιδευμένα στο εσωτερικό του υλικού υποστήριξης εκτός της εξωτερικής διάχυσης από το διάλυμα στην επιφάνεια του υλικού υποστήριξης, έχουμε να λάβουμε υπόψη μας και την **εσωτερική διάχυση**.

Εξωτερική διάχυση (External diffusion) $\rightarrow k_s$

Εσωτερική διάχυση (Intraparticle diffusion) $\rightarrow D_{\text{eff}}$

Ο αριθμός Biot είναι συγκρίνει τον εξωτερικό ως προς τον εσωτερικό ρυθμό διάχυσης:

$$Bi = \frac{k_s R}{D_{\text{eff}}}$$

