

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 5: Υπολογισμός ΚΜ, Vmax λιπάσης**

Δρ*.* Βασίλης Ντουρτόγλου

Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών

|  |  |
| --- | --- |
| Το περιεχόμενο του μαθήματος διατίθεται με άδεια Creatiνe Cοmmοns εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά | Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους. |

Περιεχόμενα

[Περιγραφή: 2](#_Toc411593142)

[Σκοπός: 2](#_Toc411593143)

[Στόχοι: 2](#_Toc411593144)

[Περίληψη: 3](#_Toc411593145)

[Πειραματικό μέρος 5](#_Toc411593146)

[Αποτελέσματα - Υπολογισμοί 6](#_Toc411593147)

[Παραδείγματα 7](#_Toc411593148)

[Βιβλιογραφία: 7](#_Toc411593149)

# Περιγραφή:

Οι λιπάσες είναι ένζυμα που έχουν την ιδιότητα να καταλύουν την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε γλυκερίνη και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Υπάρχει κατηγορία λιπασών που υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε διγλυκερίδια καθώς και άλλη κατηγορία λιπασών που τα υδρολύει σε μονογλυκερίδια.

Η παγκρεατική λιπάση υπάρχει στο πάγκρεας του ανθρώπου και των ζώων και υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε γλυκερίνη και λιπαρά οξέα.

# Σκοπός:

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι ο πειραματικός υπολογισμός των δύο κινητικών παραμέτρων, KM και Vmax της λιπάσης και συγκεκριμένα της παγκρεατικής λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης.

# Στόχοι:

Να κατανοήσουν οι σπουδαστές τις γενικές αρχές της κινητικής των ενζύμων.

Να κατανοήσουν τη μεθοδολογία υπολογισμού των κινητικών παραμέτρων ενός ενζύμου σε μια ενζυμική αντίδραση.

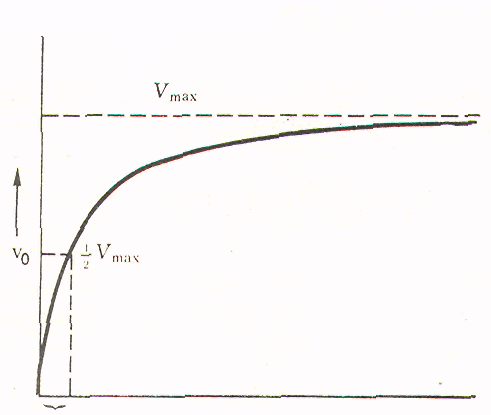
# Περίληψη:

Στην παρούσα άσκηση θα ασχοληθούμε κάπως εκτενέστερα με την ενζυμική αντίδραση και τις παραμέτρους της. Θεωρητικά αποδεικνύεται ότι στις ενζυμικές αντιδράσεις ισχύει η εξίσωση MICHAELIS-MENTEN:

Ν =Vmax  (1)

Δηλ. ανάμεσα στην ταχύτητα της ενζυμικής δράσης Ν, και την συγκέντρωση του υποστρώματος [S] υπάρχει η υπερβολική σχέση (1). Από τις δύο παραμέτρους, η Vmax έχει την φυσική έννοια της μέγιστης τιμής της Ν, ενώ η KM αντιπροσωπεύει εκείνη την τιμή του υποστρώματος για την οποία είναι Ν=Vmax/2.

Aυτό φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Σχήμα 1 Διαγραμματική αναπαράσταση ενζυμικής δράσης κατά MICHAELIS-MENTEN.

Η προφανής δυσκολία προσδιορισμού των Vmax, KM από πειραματικές μετρήσεις του Ν συναρτήσει του [S], όταν χρησιμοποιείται ο παραπάνω τύπος της διαγραμματικής αναπαράστασης, οδήγησε σε μία σειρά από πιο εύχρηστα διαγράμματα που βασίζονται σε αναδιαμόρφωση της σχέσης (1).

Η εξίσωση MICHAELIS-MENTEN μπορεί να μετασχηματισθεί σε εξισώσεις του τύπου  οι οποίες δίνουν ευθύγραμμα διαγράμματα. Μια τέτοια εξίσωση είναι η εξής:

 (2)

Αυτό σημαίνει ότι αν κάνουμε το διάγραμμα του 1/Ν προς το 1/[S] των πειραμάτων μας, τότε θα προκύψει ευθεία γραμμή που η αποτέμνουσά της θα επιτρέψει τον ακριβή προσδιορισμό του Vmax, ενώ η κλίση θα δώσει την τιμή των δύο παραμέτρων KM/Vmax. Tο KM μπορεί να βρεθεί και από το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα των (Χ) όπως φαίνεται στο Σχ2.

H γραφική αυτή παράσταση είναι γνωστή ως διάγραμμα LINEWEAΝER – BURK. Επειδή το διάγραμμα είναι 1/Ν προς 1/[S], λέγεται και διάγραμμα του διπλού αντίστροφου.

-1/KM

1/Vmax

Σχήμα 2 Διαγραμματική αναπαράσταση κατά LINEWEAVER - BURK.

Στην παρούσα άσκηση θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο του διπλού αντιστρόφου για τον προσδιορισμό των Vmax, KM.

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

Στην προηγούμενη εργαστηριακή άσκηση για τον προσδιορισμό της ειδικής ενεργότητας της λιπάσης, εκτελέσαμε τρία πειράματα στα οποία διατηρούσαμε σταθερή την ποσότητα του υποστρώματος και μεταβάλαμε την ποσότητα του ενζύμου.

Στην προκειμένη περίπτωση για τον προσδιορισμό των Vmax, KM κάνουμε ακριβώς το αντίθετο, δηλ. διατηρούμε σταθερή την ποσότητα του ενζύμου και μεταβάλουμε την συγκέντρωση του υποστρώματος, αφού μας ενδιαφέρει η μεταβολή του Ν συναρτήσει του [S].

Ισχύει η ίδια αντίδραση:

Τριακετίνη + H2Ο + λιπάση Γλυκερίνη + 3 CH3CΟΟH

Εκτελούμε τρία πειράματα Α, Β, Γ, με τριακετίνη 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M αντίστοιχα σε pΗ=7 και παγκρεατική λιπάση (Sigma) υπό μορφή διαλύματος σε pΗ=7.5 (50mg 1000μl διαλύματος).

Στο διάλυμα της τριακετίνης (10ml) προσθέτουμε την λιπάση (500μl) και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη. Υπό ανάδευση περιμένουμε 5min ώστε να προχωρήσει η υδρόλυση και ογκομετρούμε το παραγόμενο CH3CΟΟH με δ. NaΟH 0,01 N.

Εκτελούμε και τρεις τυφλούς προσδιορισμούς για κάθε διάλυμα τριακετίνης.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Πείραμα | ml NaΟH | Τυφλό |
| Α  Β  Γ | 5,6  7,7  8,6 | 0,1  0,1  0,1 |

|  |
| --- |
| Αποτελέσματα - Υπολογισμοί |

Από τα ml NaΟH που καταναλώθηκαν σε κάθε πείραμα, αφαιρούμε τα αντίστοιχα για το τυφλό, οπότε έχουμε τα ml NaΟH που καταναλώθηκαν για την εξουδετέρωση του παραγόμενου από την ενζυμική υδρόλυση CH3CΟΟH.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ml | Ντ | mοle/lt | μmοle | μmοle | [S] | 1/[S] | Ν | 1/Ν |
|  | NaΟH |  | CH3CΟΟH | CH3CΟΟH | Τριακετ. | μmοle/ml |  | μmοle/min |  |
| Α | 5,5 | 10,5 | 0,0052 | 55 | 18,3 | 0.05\*10-3 | 20\*103 | 3,7 | 0,27 |
| Β | 7,6 | 10,5 | 0,0072 | 76 | 25,3 | 0.1\*10-3 | 10\*103 | 5,1 | 0,20 |
| Γ | 8,5 | 10,5 | 0,0081 | 85 | 28,3 | 0.2\*10-3 | 5\*103 | 5,7 | 0,18 |

* Tα αποτελέσματα της 3ης στήλης προέκυψαν από την γνωστή σχέση της εξουδετέρωσης οξέος από βάση:
  + **C1Ν1 = C2Ν2**
* Τα αποτελέσματα της 4ης στήλης είναι τα μmοle CH3CΟΟH που υπάρχουν στον όγκο των 10,5 ml δηλ. τα παραγόμενα από την υδρόλυση της τρίακετίνης.
* Στην 5η στήλη είναι τα υδρολυθέντα μmοle τριακετίνης, δηλ. τα μmοle CH3CΟΟH διαιρεθέντα δια 3 (βλ. στοιχειομετρία αντιδράσης)
* Στην 8η στήλη είναι οι τιμές των αντίστοιχων ταχυτήτων Ν και προκύπτουν διαιρώντας τις τιμές της 5ης στήλης με τον χρόνο της υδρόλυσης (δηλ. 5min).

# Παραδείγματα

Μια ενζυμική αντίδραση ενός υποστρώματος έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

[S] mοles/lt Ν0 μmοles/lt.sec

** **

** **

** **

** **

** **

** **

** **

** **

** **

** **

Να προσδιοριστούν γραφικά η KM και η Vmax, από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaνer – Burk

# Βιβλιογραφία:

1. Ι. Γ. Γεωργάτσου, « Βιοχημεία ».Τόμος Α’ – 6η Εκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη 1989.
2. Ι. Γ. Γεωργάτσου, Τ. Α. Γιουψάνη, Δ.Α. Κυριακίδη, «Ενζυμολογία », Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2001.
3. Αντώνη Τρακατέλλη, «Βιοχημεία, Ενζυμα –Τεύχος Β1 ».
4. Alan Fersht, “Enzyme Structure and Mecanism”, 2nd Editiοn, W.H. Freeman.
5. Lubert Stryer, « Βιοχημεία », Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 1997.

|  |
| --- |
| **Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**  **Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας** |
| **Τέλος Ενότητας** |
| **Χρηματοδότηση**   * Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. * Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Αθήνας**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού. * Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους. |

**Σημειώματα**

**Σημείωμα Αναφοράς**

Cοpyright ΤΕΙ Αθήνας, Βασίλειος Ντουρτόγλου, 2014. Βασίλειος Ντουρτόγλου. «Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε). Ενότητα 5: Υπολογισμός ΚΜ, Vmax λιπάσης». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: [οcp.teiath.gr](https://ocp.teiath.gr/).

**Σημείωμα Αδειοδότησης**

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creatiνe Cοmmοns Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό. Οι όροι χρήσης των έργων τρίτων επεξηγούνται στη διαφάνεια «Επεξήγηση όρων χρήσης έργων τρίτων».

Τα έργα για τα οποία έχει ζητηθεί άδεια αναφέρονται στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».

[](file:///C:\Users\pantelis\Downloads\%5b1%5d%20http:\creativecommons.org\licenses\by-nc-sa\4.0\)

[1] http://creatiνecοmmοns.οrg/licenses/by-nc-sa/4.0/

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

* που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
* που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
* που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

**Επεξήγηση όρων χρήσης έργων τρίτων**

|  |  |
| --- | --- |
| © | Δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, παρά μόνο εάν ζητηθεί εκ νέου άδεια από το δημιουργό. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου και η δημιουργία παραγώγων αυτού με απλή αναφορά του δημιουργού. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-SA | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού, και διάθεση του έργου ή του παράγωγου αυτού με την ίδια άδεια. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-ND | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η δημιουργία παραγώγων του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC-SA | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού και διάθεση του έργου ή του παράγωγου αυτού με την ίδια άδεια. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC-ND | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου και η δημιουργία παραγώγων του. |
| διαθέσιμο με άδεια CC0 Public Dοmain | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, η δημιουργία παραγώγων αυτού και η εμπορική του χρήση, χωρίς αναφορά του δημιουργού. |
| διαθέσιμο ως κοινό κτήμα | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, η δημιουργία παραγώγων αυτού και η εμπορική του χρήση, χωρίς αναφορά του δημιουργού. |
| χωρίς σήμανση | Συνήθως δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου. |

**Διατήρηση Σημειωμάτων**

* Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:
* Το Σημείωμα Αναφοράς
* Το Σημείωμα Αδειοδότησης
* Τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
* Το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.