

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 4: Υπολογισμός ενεργότητας 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](#_Toc411585153)

[Σκοπός: 2](#_Toc411585154)

[Στόχοι: 2](#_Toc411585155)

[Περίληψη: 3](#_Toc411585156)

[Πειραματικό μέρος 4](#_Toc411585157)

[Διάγραμμα 5](#_Toc411585158)

[Βιβλιογραφία: 6](#_Toc411585159)

# 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.

Συνήθως παραλαμβάνεται από το πάγκρεας των χοίρων.

# Σκοπός:

Να γίνουν κατανοητές οι έννοιες ενεργότητα ενζύμου, ειδική ενζυμική ενεργότητα.

Να μπορούν οι φοιτητές να προσδιορίσουν ποσοτικά τη δράση ενός ενζύμου σε ένα υπόστρωμα από το προϊόν που παράγεται.

# Στόχοι:

Στόχος της εργαστηριακής άσκησης είναι ο πειραματικός υπολογισμός της ειδικής ενεργότητας της λιπάσης και συγκεκριμένα της παγκρεατικής λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης.

# Περίληψη:

Ειδική ενεργότητα είναι τα μmοle υποστρώματος τα οποία μετατρέπονται ανά λεπτό από 1mg ενζύμου και εκφράζεται σε μmοles / min.mg ενζύμου.

Η ειδική ενεργότητα είναι η κλίση της ευθείας σε διάγραμμα όπου στον άξονα Χ τοποθετούμε τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και στον άξονα Υ τις αρχικές ταχύτητες.

Αρχική ταχύτητα είναι η εφαπτόμενη στο χρόνο t= 0 της καμπύλης χρόνος (Χ) προϊόν (Υ).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης, χρησιμοποιούμε υπόστρωμα τριακετίνης 0,1M pΗ=7,5 και ένζυμο παγκρεατική λιπάση (Sigma) σε pΗ 7,5 (50mg ενζύμου 1.000 μl).

Η αντίδραση υδρόλυσης του υποστρώματος είναι η εξής:

Τριακετίνη + H2Ο + λιπάση Γλυκερίνη + 3 CH3CΟΟH

Παρατηρούμε ότι κατά την υδρόλυση παράγεται οξικό οξύ, το οποίο ως γνωστόν μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με μια απλή ογκομέτρηση με ΝαΟΗ και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη.

Προσδιορίζοντας επομένως το παραγόμενο κατά την υδρόλυση CH3CΟΟH, υπολογίζουμε έμμεσα και την τριακετίνη, αφού από την στοιχειομετρία της υδρόλυσης προκύπτει ότι από κάθε mοle υδρολυμένης τριακετίνης παράγονται τρία mοle CH3CΟΟH.

Πραγματοποιούμε τρία πειράματα στα οποία η ποσότητα του υποστρώματος είναι η ίδια (Ν =10 ml), αλλά διαφέρει η ποσότητα του ενζύμου.

Κάνουμε και έναν τυφλό προσδιορισμό, για τυχόν υπάρχον ελεύθερο CH3CΟΟH στο υπόστρωμα, πριν την προσθήκη του ενζύμου, οπότε η εκάστοτε διαφορά μας παρέχει τα mοle τριακετίνης που υδρολύονται ενζυμικά

\* η ειδική ενεργότητα για συγκεκριμένο υπόστρωμα και ένζυμο, μετράται υπό καθορισμένες συνθήκες όπως είναι το pΗ και η θερμοκρασία.

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούμε την ποσότητα του υποστρώματος (10ml τριακετίνης 0,1M σε pΗ 7,5).

Ακολούθως προσθέτουμε την εκάστοτε ποσότητα του ενζύμου (500μl, 1000μl, 1500μl).

Αφήνουμε το μίγμα για 5min ώστε να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση και στην συνέχεια τιτλοδοτούμε το παραγόμενο CH3CΟΟH με δ. ΝαΟΗ 0,01 Ν και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| ΠΕIΡΑΜΑ | ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΛIΠΑΣΗΣ | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ Τριακετίνης 0,1M | ΟΛIΚΟΣ ΟΓΚΟΣ | ΝNαΟΗ 0,01Ν |
| ΑΒΓΤυφλό | 500 μl (25mg) 1000 μl (50mg) 1500 μl (75mg)---------- | 10 ml10 ml10 ml10 ml | 10,5 ml 11,0 ml 11,5 ml | 10,8 ml 20,8 ml 27,5 ml 0,2 ml |

Aφαιρώντας από τα ml του ΝαΟΗ που καταναλώθηκαν στα πειράματα Α, Β, Γ τα ml ΝαΟΗ για το τυφλό, έχουμε τα ml ΝαΟΗ που εξουδετέρωσαν το CH3CΟΟH που παράγεται κατά την ενζυμική υδρόλυση.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ΝNaΟH [ml] | Mοles/l CH3CΟΟH | Mοles CH3CΟΟH | mοles Tριακετίνης που υδρολύθηκαν | μmοles Τριακετίνης | Νο (μmοles/min) |
| 10,6 20,6 27,3 | 0,0100,0190,024 | 0,00011 0,00021 0,00028 | 0,000037 0,000070 0,000093 | 377093 | 7.414.018.6 |

Tα αποτελέσματα της 2ης στήλης προήλθαν από την εφαρμογή της γνωστής σχέσης που εκφράζει την εξουδετέρωση οξέος από βάση

**C1Ν1 = C2Ν2**

όπου C1 συγκέντρωση ΝαΟΗ (0,01 Μ)

 Ν1 ml NαΟΗ

 C2 συγκέντρωση CH3CΟΟH (ζητούμενο)

 Ν2 τελικός όγκος (Ντοτ)

Εφαρμόζουμε την σχέση για κάθε πείραμα και βρίσκουμε το C2

* Tα mοle CH3CΟΟH στην 3η στήλη είναι τα mοle CH3CΟΟH που υπάρχουν στον εκάστοτε όγκο διαλύματος.
* Τα mοles της τριακετίνης που υδρολύθηκαν προκύπτουν διαιρώντας τα αποτελέσματα της 3ης στήλης με το 3 (βλ. στοιχειομετρία υδρόλυσης).
* Στην 5η στήλη είναι τα αντίστοιχα μmοle τριακετίνης που υδρολύθηκαν σε κάθε πείραμα.
* Στην τελευταία στήλη είναι οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων που προκύπτουν διαιρώντας τα αποτελέσματα της 5ης στήλης με το χρόνο που διήρκεσε η υδρόλυση δηλ. 5 min.

Στην συνέχεια, για να προσδιορίσουμε την ειδική ενεργότητα της παγκρεατικής λιπάσης στην υδρόλυση της τρακετίνης, κάνουμε γραφική παράσταση των αρχικών ταχυτήτων συναρτήσει των ποσοτήτων του ενζύμου. Στον άξονα (Χ) είναι οι ποσότητες του ενζύμου (mg) σε κάθε πείραμα και στον άξονα (Υ) οι αντίστοιχες αρχικές ταχύτητες Νο (μmοle/min).

H κλίση της ευθείας είναι η ειδική ενεργότητα σε μmοle/min. mg.

# Διάγραμμα

Η ευθεία προφανώς θα διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Παρατηρούμε ότι το τρίτο σημείο βρίσκεται εκτός της ευθείας. Πιθανόν η συγκέντρωση του ενζύμου να είναι τέτοια στην περίπτωση αυτή, ώστε το υπόστρωμα παύει πλέον να πληρεί τις συνθήκες κορεσμού (παύει να ισχύει πλέον η γραμμική σχέση), χωρίς να αποκλείονται βέβαια και τα πειραματικά σφάλματα.

Από το διάγραμμα εύκολα βρίσκουμε ότι η κλίση της ευθείας είναι **φ=160**

συνεπώς **tan φ = tan (160) = 0,29.**

Άρα η ειδική ενεργότητα της παγκρεατικής λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης είναι: **0,29 μmοle/min.mg(Ε)**

# 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 », Θεσσαλονίκη 1976.
4. Alan Fersht, “Enzyme Structure and Mecanism”, 2nd Editiοn, W.H. Freeman.

|  |
| --- |
| **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 4: Υπολογισμός ενεργότητας 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».



[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.