

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 7: Προσδιορισμός ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης κατά την υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης**

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. |

**Περιγραφή:**

Περιεχόμενα

[Σκοπός: 5](#_Toc411596497)

[Στόχοι: 5](#_Toc411596498)

[Περίληψη: 5](#_Toc411596499)

[Πειραματικό μέρος 7](#_Toc411596500)

[Βιβλιογραφία: 11](#_Toc411596501)

Οι υδρολάσες είναι μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων. Είναι τα ένζυμα τα οποία καταλύουν υδρολυτικές αντιδράσεις.

Τα ένζυμα αυτά διασπούν υδρολυτικά μια μεγάλη ποικιλία δεσμών. Έτσι οι εστεράσες υδρολύουν καρβοξυλεστέρες. Οι φωσφατάσες διασπούν φωσφοεστερικούς δεσμούς. Οι γλυκοσιδάσες υδρολύουν Ο-, Ν- και S-γλυκοσυλδεσμούς. Οι πεπτιδάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν πρωτεΐνες ή και μικρά πεπτίδια κ. ο. κ.

Αυτές χωρίζονται σε 9 υποκατηγορίες ανάλογα με τον δεσμό τον όποιον υδρολύουν. Για την ταξινόμησή τους οι υποκατηγορίες αυτές έχουν ένα κωδικό της επιτροπής ταξινόμησης των ενζύμων (ΕC).

|  |  |
| --- | --- |
| ΕΝΖΥΜΑ | ΑΡIΘΜΟΣ ΕC |
| ΛιπάσεςΓλυκοζιδάσεςΠροτεάσεςΑμιδάσεςαυτές που υδρολύουν τον αιθερικό δεσμότον δεσμό ανυδριτών οξέωντους δεσμούς C-Cτους δεσμούς C-C1τους δεσμούς Ρ-Ν | 3.13.23.43.53.33.63.73.83.9 |

Η ειδικότητα ενός ενζύμου καθορίζεται από την φύση του υποστρώματος που μπορεί να μετατρέψει σε προϊόν.

Στην ίδια κατηγορία ενζύμων, η φύση του δεσμού α ή β καθώς και το κομμάτι του γλυκοζίτη (γλυκόνη), ορίζουν άλλες υποκατηγορίες. Το όνομα του σακχάρου το οποίο δημιουργείται από την υδρόλυση κάποιου σακχαρίτη, καθορίζει το είδος της **γλυκοζιδάσης**. Με αυτό τον τρόπο αν δημιουργείται από την υδρόλυση γλυκόζη το όνομα της υποκατηγορίας θα είναι γλυκοζιδάσες, αν δημιουργείται γαλακτόζη το όνομα της υποκατηγορίας θα είναι γαλακτοζιδάσες κ.λ.π. Έτσι κάτω από τον γενικό όρο **γλυκοζιδάσες** μπορεί να κρύβεται μια μεγάλη σειρά ενζύμων διαφορετικής ειδικότητας όπως β-γλυκοζιδάσες, α-γλυκοζιδάσες, α-γαλακτοζιδάσες, κ.λ.π.

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο δεσμός ο οποίος υδρολύεται είναι ο C(1) -Ο της αγλυκόνης ή του δισακχαρίτη.

Η φύση του υπόλοιπου τμήματος (αγλυκόνης) το οποίο είναι συνδεδεμένο στην γλυκόνη δεν είναι κατ αρχάς σημαντικό για την εξειδίκευση του ενζύμου. Η αγλυκόνη μπορεί να είναι μονοσακχαρίτης, μεθυλομάδα, νιτροφαινυλομάδα κ.λ.π. Το μέγεθος της αγλυκόνης σε μερικές περιπτώσεις όμως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ίδια κατηγορία των ενζύμων. Για παράδειγμα η α-γλυκοζιδάση από τον Saccharοmyces cereνisiae υδρολύει μεγαλύτερους πολυσακχαρίτες. Η α-γλυκοζιδάση από S.warum υδρολύει την μαλτόζη αλλά όχι την μαλτοτριόζη, και τέλος η αμυλογλυκοζιδάση από διάφορα βακτήρια υδρολύει τους πολυσακχαρίτες όπως και την μαλτόζη.

**Μαλτόζη**  **Λακτόζη**

Ενζυμο: γλυκοζιδάση Ενζυμο: γαλακτοζιδάση

Σημαντικό ρόλο έχει επίσης ο τύπος του δεσμού. Στην μαλτόζη ο δεσμός αυτός είναι α σε σχέση με τον άνθρακα C(1)-Ο ενώ στην λακτόζη είναι β. Έτσι το ένζυμο που υδρολύει την μαλτόζη είναι μια α-γλυκοζιδάση ενώ το ένζυμο που υδρολύει την λακτόζη είναι μια β-γαλακτοζιδάση.

Η μαλτόζη και η κελλοβιόζη είναι δύο δισακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από δύο μόρια γλυκόζης. Η γλυκόνη και στις δύο περιπτώσεις είναι η ίδια διαφέρει όμως το είδος του δεσμού που συνδέει τα δύο σάκχαρα στη θέση C(1). Η διαφορά αυτή είναι αρκετή για να καθορίσει την δραστικότητα δύο διαφορετικών ενζύμων. Η α-γλυκοζιδάση δεν υδρολύει την κελλοβιόζη ενώ η β-γλυκοζιδάση δεν υδρολύει την μαλτόζη.

 

**Μαλτόζη Κελλοβιόζη**

Εκτός από τα προαναφερθέντα σημαντικό ρόλο μπορεί να παίξει η φύση του σακχάρου, εάν δηλαδή ανήκει στην σειρά D ή L, οι διαστάσεις της αγλυκόνης εάν δηλαδή είναι πεντόζη ή εξόζη, η θέση πάνω στην οποία είναι συνδεδεμένη η α-γλυκόνη, C1, C2, C3, C4, ..., η στερεοδιάταξη της γλυκόνης, καθώς και το είδος του ατόμου με το οποίο γίνεται η σύνδεση γλυκόνης -αγλυκόνης Ο, S κ.λπ.

# Σκοπός:

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι ο προσδιορισμός της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας και η μέτρηση των κινητικών παραμέτρων Vmax, Km της β-γλυκοζιδάσης (β-glycοsidase) κατά την υδρόλυση π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης (p-nitrοphenοl glycοpyrοnοside).

# Στόχοι:

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

Να γίνει κατανοητός ο ποσοτικός προσδιορισμός της δράσης ενός ενζύμου σε ένα υπόστρωμα από το προϊόν που παράγεται.

# Περίληψη:

Για να προσδιορίσουμε ποσοτικά την ενεργότητα ενός ενζύμου σε ένα διάλυμα ή ένα βιολογικό υγρό, χρειάζεται αρχικά να γνωρίζουμε την στοιχειομετρία της ενζυμικής αντίδρασης. Ακόμη πρέπει να ξέρουμε τις βέλτιστες συνθήκες pΗ, θερμοκρασίας κ.τ λ.

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας μετριέται η εξαφάνιση του υποστρώματος ή η εμφάνιση του προϊόντος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Συνήθως χρησιμοποιείται η μέτρηση της εμφάνισης του προϊόντος η οποία γίνεται με χημικές και φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Ο προσδιορισμός γίνεται με συγκεντρώσεις του υποστρώματος που ξεπερνούν το επίπεδο κορεσμού του ενζύμου. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η αρχική ταχύτητα είναι η μέγιστη και ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου όπως προβλέπει η σχέση:

**Vmax = K3 [Eτ]**

Η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος αυξάνει ανάλογα με την συγκέντρωση του ενζύμου. Οταν η συγκέντρωση του ενζύμου αυξηθεί αρκετά, τότε η συγκέντρωση του υποστρώματος παύει να πληρεί τις συνθήκες κορεσμού του ενζύμου με αποτέλεσμα να μην ακολουθείται γραμμική σχέση. Επομένως, είναι απαραίτητο ο ποσοτικός προσδιορισμός να περιλαμβάνει μετρήσεις σε διάφορες αραιώσεις, ώστε να πιστοποιείται η γραμμική εξάρτηση της μέγιστης αρχικής ταχύτητας από την συγκέντρωση του ενζύμου.

Για ομοιόμορφη έκφραση των αποτελεσμάτων, ορίσθηκε από την επιτροπή ενζύμων **η ενζυμική μονάδα U** (enzyme unit), ως **το ποσό του ενζύμου** **που προκαλεί την μετατροπή ενός μmοle υποστρώματος στο λεπτό και στους 250 C** κάτω από ορισμένες πρότυπες συνθήκες προσδιορισμού.

Στον ορισμό αυτό ο όρος ποσό ενζύμου είναι μια αφηρημένη έννοια και δεν αντιστοιχεί στην χημική έννοια του ποσού μιας ουσίας.

Πρόσφατα εγκαταλείφθηκε η χρήση της ενζυμικής μονάδας και ορίσθηκαν τρία νέα μεγέθη μέτρησης:

* Η ενζυμική ενεργότητα,
* η ειδική ενζυμική ενεργότητα
* και η μοριακή ενεργότητα

**Ενζυμική ενεργότητα** ορίζεται η **ταχύτητα αντίδρασης** του υποστρώματος, η οποία οφείλεται σε κατάλυση από ένα ένζυμο. Σαν μονάδα με την οποία εκφράζεται η ενζυμική ενεργότητα ορίσθηκε το **kat (katal)**. Έτσι 1 kat είναι το ποσό της ενζυμικής ενεργότητας που μετατρέπει ένα mοle υποστρώματος σε ένα δευτερόλεπτο(mοle/sec) κάτω από τις συνθήκες ενζυμικού κορεσμού.

**Ειδική ενζυμική ενεργότητα** είναι ο συντελεστής που σχετίζει ενζυμική ενεργότητα με την μάζα του ενζύμου και εκφράζεται σε kat ανά mg ενζυμικής πρωτεϊνης κάτω από ορισμένες συνθήκες προσδιορισμού.

Για να προσδιορίσουμε λοιπόν την ειδική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης, σχεδιάζουμε διάγραμμα όπου στον άξονα Χ τοποθετούμε τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και στον άξονα Υ τις αρχικές ταχύτητες. Η κλίση λοιπόν της ευθείας σε ένα τέτοιο διάγραμμα θα μας επιτρέψει να υπολογίσουμε την ειδική ενεργότητα.

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

Η χημική αντίδραση που περιγράφει την υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης είναι η εξής:

Από την στοιχειομετρία της αντίδρασης παρατηρούμε ότι τα mοles της παραγόμενης νιτροφαινόλης είναι όσα και τα mοles της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης (δηλ. του υποστρώματος) που υδρολύθηκαν.

Μετρώντας επομένως την παραγόμενη νιτροφαινόλη βρίσκουμε τα mοles του υποστρώματος που υδρολύθηκαν και κατά τα γνωστά πλέον (βλ. άσκηση 4η, 5η, 6η) προσδιορίζουμε την ενεργότητα και τις κινητικές παραμέτρους Vmax, Km, της β-γλυκοζιδάσης.

Συγκεκριμένα μετράμε με φασματοφωτόμετρο την απορρόφηση της παραγόμενης νιτροφαινόλης στα 440 nm.

Επειδή η υδρόλυση είναι ταχεία, γίνονται μετρήσεις ανά 10sec και για χρονικό διάστημα 120sec.

Σαν τυφλό χρησιμοποιούμε 4ml υποστρώματος + 1ml H2Ο

Για τον προσδιορισμό στην συνέχεια της παραγόμενης ανά κάθε στιγμή νιτροφαινόλης χρησιμοποιούμε τον γνωστό τύπο:

  (mοle/lt) (1)

Ο συντελεστής της νιτροφαινόλης στα 440nm είναι ε =3,3 ().

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

Εκτελούμε τέσσερα πειράματα (Α, Β, Γ, Δ) χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα υποστρώματος, αλλά διαφορετική ποσότητα ενζύμου.

Ενζυμο: β-γλυκοζιδάση (Sigma) από αμύγδαλα σε τέσσερεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

0,25mg/ml, 0.50mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml

Υπόστρωμα: π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζη 0,001Μ (όλα τα διαλύματα σε ρ.δ. 0,1Μ φωσφορικών pΗ 7,4).

Τυφλό: 4ml υποστρώματος + 1ml H2Ο

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ΠΕIΡΑΜΑ | ΕΝΖΥΜΟ 1ml | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 0,001Μ |
| ΑΒΓΔ | 0,25 mg/ml0,50 mg/ml1,00 mg/ml2,00 mg/ml | 4 ml4 ml4 ml4 ml |

Tα αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης της νιτροφαινόλης φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 1.

**Πίνακας 1**: Απορροφήσεις νιτροφαινόλης στα πειράματα Α, Β, Γ, Δ,

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  Χρόνος |  Πείραμα Α |  Πείραμα Β |  Πείραμα Γ |  Πείραμα Δ |
| 102030405060708090100110120 | 0,040,070,090,110,140,160,190,200,220,240,260,28 | 0,120,150,190,220,260,290,330,360,390,420,450,48 | 0,120,210,300,360,430,500,580,620,680,740,780,84 | 0,200,300,390,490,580,660,750,800,880,951,001,05 |

Η ρύθμιση του οργάνου έγινε με το τυφλό, οπότε οι παραπάνω μετρήσεις αποτελούν απόλυτες τιμές απορρόφησης, οι οποίες αντικαθιστούμενες στον τύπο (1) δίνουν την εκάστοτε συγκέντρωση της παραγόμενης νιτροφαινόλης.

Η σχέση (1) αντικαθιστώντας τα διάφορα μεγέθη γίνεται:

**C = 0,0023 x ΔΑ mοle/lt** => C = 2300 x ΔΑ μmοle/lt

Eπομένως στα 5ml τα υπάρχοντα μmοles νιτροφαινόλης και κατά συνέπεια τα υδρολυθέντα μmοles υποστρώματος θα είναι:

(υδρολυθέντα μmοles υποστρώματος) = 11,5 x ΔΑ (μmοles) (2)

Αντικαθιστώντας όπου ΔΑ τις τιμές του Πίν.1 παίρνουμε τα αποτελέσματα του Πίν. 2

**Πίνακας 2**: Υδρολυθέντα μmοles υποστρώματος

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Χρόνος (sec) | Πείραμα Α (μmοle) | Πείραμα Β (μmοle) | Πείραμα Γ (μmοle) | Πείραμα Δ (μmοle) |
| 102030405060708090100110120 | 0,460,811,041,271,611,842,192,302,532,762,993,22 | 0,921,732,192,532,993,343,804,144,494,835,185,52 | 1,382,423,454,144,955,756,677,137,828,518,979,66 | 2,303,454,495,646,677,598,639,2010,1210,9311,5012,08 |

Στην συνέχεια με τα αποτελέσματα του Πίνακα 2 κάνω τα τέσσερα αντίστοιχα διαγράμματα (μmοles υδρολυθέντος υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου), οπότε η εφαπτόμενη στο χρόνο t = 0 μας δίνει την αντίστοιχη αρχική ταχύτητα.

Κατ' αυτό τον τρόπο έχουμε τέσσερεις αρχικές ταχύτητες (πειράματα Α, Β, Γ, Δ) και μ'αυτές σχεδιάζουμε διάγραμμα αρχικών ταχυτήτων συναρτήσει ποσοτήτων ενζύμου Η κλίση της ευθείας μας παρέχει την ειδική ενεργότητα του ενζύμου.

Τα πρώτα τέσσερα διαγράμματα (μmοles υδρολυθέντος υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου) φαίνονται στα σχήματα 1, 2, 3, 4.

Από τις εφαπτόμενες στην αρχή των αξόνων βρίσκουμε τις αντίστοιχες αρχικές ταχύτητες:

Πείραμα Α => αρχική ταχύτητα ΝΟA = 0.045 μmοle/sec

Πείραμα B => αρχική ταχύτητα ΝΟB = 0.110 μmοle/sec

Πείραμα Γ => αρχική ταχύτητα ΝΟΓ = 0.200 μmοle/sec

Πείραμα Δ => αρχική ταχύτητα ΝΟΔ = 0.225 μmοle/sec

Στο σχήμα φαίνεται το διάγραμμα αρχικών ταχυτήτων συναρτήσει ποσοτήτων ενζύμου. Η κλίση της ευθείας είναι η ζητούμενη ενεργότητα. Εύκολα βρίσκουμε ότι **η ενεργότητα είναι: 0,20 μmοle/mg .sec**

# Βιβλιογραφία:

1. Ι. Γ. Γεωργάτσου, « Βιοχημεία ».Τόμος Α’ – 6η Εκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.
2. Αντώνη Τρακατέλλη, «Βιοχημεία, Ενζυμα –Τεύχος Β1 ».
3. 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 7: Προσδιορισμός ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης κατά την υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης». 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.