

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 8: Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων ΚΜ, Vmax 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. |

Περιεχόμενα

[Περιγραφή: 2](#_Toc411597873)

[Σκοπός: 2](#_Toc411597874)

[Περίληψη: 2](#_Toc411597875)

[Ερωτήσεις: 5](#_Toc411597876)

[Βιβλιογραφία: 5](#_Toc411597877)

# Περιγραφή:

Υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης παρουσία ενζύμου β-γλυκοζιδάση. Μέτρηση της παραγόμενης π-νιτροφαινόλης φασματοφωτομετρικά. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων Vmax, KM της β-γλυκοζιδάσης.

# Σκοπός:

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

# Περίληψη:

Σ` αυτή την άσκηση χρησιμοποιούμε την μέθοδο του διπλού αντιστρόφου για τον προσδιορισμό των Vmax, KM.

Η μέθοδος προσδιορισμού των Vmax, KM στηρίζεται στη δημιουργία της

π-νιτροφαινόλης η οποία απορροφά στα 440 nm.

Για να προσδιορίσουμε τις κινητικές παραμέτρους Vmax, Km της β-γλυκοζιδάσης

Eκτελούμε 3 πειράματα (A, B, Γ) χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα ενζύμου αλλά διαφορετικά υποστρώματα.

Ενζυμο: β-γλυκοζιδάση (β-glycοsidase) 0,50 mg/ml

Yπόστρωμα: π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζη (p-nitrοphenοlglycοpynοside)

σε τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,001 M, 0,002 M, 0,004 M.

(όλα τα διαλύματα σε ρ.δ. 0,1 Μ φωσφορικών ΡΗ 7.4)

Τυφλό: 4 ml υποστρώματος + 1ml Η2Ο

Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος (Α, Β, Γ) γίνονται μετρήσεις ανά 10sec και για χρονικό διάστημα 120sec.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ΠΕIΡΑΜΑ | ΕΝΖΥΜΟ 1 ml | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ |
| Α  Β  Γ | 0.50 mg/ml  0.50 mg/ml  0.50 mg/ml | 4 ml (0.001 M)  4 ml (0.002 M)  4 ml (0.004 M) |

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Απορροφήσεις π-νιτροφαινόλης στα πειράματα Α, Β, Γ.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Χρόνος sec | Πείραμα Α = Β | Πείραμα = Β | Πείραμα = Γ |
| 10  20  30  40  50  60  70  80  90  100  110  120 | 0.08  0.15  0.19  0.22  0.26  0.29  0.33  0.36  0.39  0.42  0.45  0.48 | 0.15  0.22  0.29  0.34  0.40  0.46  0.51  0.56  0.60  0.66  0.70  0.75 | 0.34  0.58  0.72  0.85  1.00  1.10  1.25  1.35  1.45  1.50  1.60  1.70 |

Και σ'αυτή την περίπτωση των πειραμάτων Α, Β, Γ, η ρύθμιση του οργάνου έγινε με τα τυφλά, οπότε οι παραπάνω μετρήσεις αποτελούν απόλυτες τιμές απορρόφησης, οι οποίες αντικαθιστούμενες στον τύπο (2)(εργαστήριο 7) δίνουν την εκάστοτε ποσότητα υδρολυθέντος υποστρώματος.

Αντικαθιστώντας όπου ΔΑ στην σχέση (2) τις τιμές του Πίνακα 3, παίρνουμε τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Υδρολυθέντα μmοle υποστρώματος

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Χρόνος sec | Πείραμα Α = Β (μmοle) | Πείραμα = Β (μmοle) | Πείραμα = Γ (μmοle) |
| 10  20  30  40  50  60  70  80  90  100  110  120 | 0.92  1.73  2.19  2.53  2.99  3.34  3.80  4.14  4.49  4.83  5.18  5.52 | 1.73  2.53  3.34  3.91  4.60  5.29  5.87  6.44  6.90  7.59  8.05  8.63 | 3.91  6.67  8.28  9.78  11.50  12.65  14.38  15.53  16.68  17.25  18.40  19.55 |

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 κατασκευάζω τα διαγράμματα μmοles υδρολυθέντος υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου για να βρω τις αρχικές ταχύτητες.

Βέβαια το πείραμα Α είναι το αυτό με το πείραμα Β κατά τον υπολογισμό της ενεργότητας.

Επομένως η αρχική ταχύτητα είναι:

ΝΟA = ΝΟB = 0,090 μmοle/sec

Tα άλλα δύο διαγράμματα για τα πειράματα Β και Γ φαίνονται στα σχήματα 6 και 7 που ακολουθούν.

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

Πείραμα Β => αρχική ταχύτητα ΝΟB' = 0,21 μmοles/sec

Πείραμα Γ => αρχική ταχύτητα ΝΟΓ' = 0,37 μmοles/sec

Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων Vmax, Km ακολουθούμε την μέθοδο του διπλού αντιστρόφου κάνοντας διάγραμμα 1/Νο συναρτήσει 1/S όπου Νο είναι οι αντίστοιχες αρχικές ταχύτητες και S η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος.

Πίνακας 5: Τιμές 1/Νο ή 1/S στα πειράματα Α, Β, Γ.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Νο (μmοles/sec) | S (μmοles/sec) | 1/Νο (μmοles/sec) | 1/S  (μmοles/sec) |
| Πείραμα Α  Πείραμα Β  Πείραμα Γ | 0,11  0,21  0,37 | 1  2  4 | 9.1  4.8  2.7 | 1,00  0,50  0,25 |

Στο σχήμα 8 που ακολουθεί φαίνεται το διάγραμμα του διπλού αντίστροφου για τον προσδιορισμό των Vmax, Km με βάση τις τιμές του Πίνακα 5.

Από το σχήμα προκύπτει:

α) 1/Vmax = 0,6 => Vmax = 1.7 μmοles/sec

β) - 1/Κm = -0,07 => Km = 14.3 μmοles/ml

# Ερωτήσεις:

Ένα ένζυμο το οποίο καταλύει αντίδραση ενός υποστρώματος έχει KM = 2,4 x10-4 mοles/lt. Γίνεται η ενζυμική αντίδραση με συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0,05 mοles/lt και παρατηρείται ταχύτητα 2,13 μmοles/lt/sec.

Ποιές θα είναι οι αρχικές ταχύτητες που θα παρατηρηθούν σε κάθε μία από τις εξής συγκεντρώσεις υποστρώματος: α) 2x10-7 mοles/lt β) 6,3 x 10-5 mοles/lt γ)10-4 mοles/lt δ) 2 x 10-3 mοles/lt ε) 0,05 mοles/lt.

# Βιβλιογραφία:

1. Ι. Γ. Γεωργάτσου, « Βιοχημεία ».Τόμος Α’ – 6η Εκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.
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 8: Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων ΚΜ, Vmax 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».

[](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.