

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 6: Προσδιορισμός KM, Vmaxμε ακινητοποιημένη λιπάση επαναχρησιμοποιήσιμη**

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](#_Toc411594480)

[Σκοπός: 2](#_Toc411594481)

[Στόχοι: 2](#_Toc411594482)

[Περίληψη: 3](#_Toc411594483)

[Πειραματικό μέρος 3](#_Toc411594484)

[Αποτελέσματα - Υπολογισμοί 4](#_Toc411594485)

[Βιβλιογραφία: 6](#_Toc411594486)

# Περιγραφή:

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι ο πειραματικός προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων Vmax, Km, της παγκρεατικής λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης η οποία όμως λιπάση είναι ακινητοποιημένη σε κόκκους πολυστυρενίου.

Επίσης γίνεται ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων κατά την επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης λιπάσης, με σκοπό να διαπιστώσουμε αν έχουμε στην περίπτωση αυτή μείωση ή αύξηση της δραστικότητας της, σε σχέση με την πρώτη χρησιμοποίηση της.

# Σκοπός:

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι να κατανοήσουν οι σπουδαστές τι είναι ακινητοποιημένα ένζυμα, πώς χρησιμοποιούνται και ποιά είναι η σημασία τους στη βιομηχανική παραγωγή.

Επίσης να κατανοήσουν την έννοια των κινητικών παραμέτρων σε μια ενζυμική αντίδραση και γενικότερα της ενζυμικής κινητικής.

# Στόχοι:

Να εξοικειωθούν με τη χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων.

Να κατανοήσουν τη μεθοδολογία προσδιορισμού των κινητικών παραμέτρων Vmax, KM μιάς ακινητοποιημένης λιπάσης στην υδρόλυση της τριακετίνης και κατά την επαναχρησιμοποίηση της, με σκοπό να διαπιστώσουν αν έχουμε μείωση ή αύξηση της δραστικότητας της, σε σχέση με την πρώτη χρήση της.

# Περίληψη:

Στοιχεία αναφορικά με το θεωρητικό μέρος της άσκησης αναφέρονται στην 5η άσκηση.

Και στην συγκεκριμένη περίπτωση, όπως άλλωστε και στην προηγούμενη άσκηση χρησιμοποιούμε την μέθοδο του διπλού αντιστρόφου (1/Ν : 1/[S]) (μέθοδος LINEWEAΝER-BURK) για τον προσδιορισμό των Vmax, KM.

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

Η στοιχειομετρική αντίδραση είναι:

 CH2-ΟAC CH2-ΟΗ

 CH-ΟAC + 3H2Ο + λιπάση CH-ΟΗ + 3 CH3CΟΟH

 CH2-ΟAC CH2-ΟΗ

Xρησιμοποιούμε 3 υποστρώματα τριακετίνης 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M. Εκτελούμε 3 πειράματα Α, Β, Γ, με τα αντίστοιχα υποστρώματα της τριακετίνης, όπου προσθέτουμε ακινητοποιημένη λιπάση (LIPΟZYME της Νονο).

Στο κάθε υπόστρωμα τριακετίνης (10ml) προσθέτουμε 500 mg λιπάσης. Αναδεύουμε και αφήνουμε 3 min για να εξελιχθεί η υδρόλυση.

Με διήθηση διαχωρίζουμε το υγρό (διήθημα) από το ένζυμο (ίζημα).

Στην συνέχεια προσθέτουμε στο διήθημα δείκτη φαινολφθαλεΐνη και ογκομετρούμε το παραγόμενο κατά την υδρόλυση CH3CΟΟΗ με διάλυμα NaΟH 0,01Ν .

Το ίζημα (ακινητοποιημένο ένζυμο), το επαναχρησιμοποιούμε σε νέο υπόστρωμα τριακετίνης της αυτής συγκέντρωσης με το προηγούμενο, όπου και πάλι μετά από 3min ογκομετρούμε το παραγόμενο CH3CΟΟΗ (πειράματα Α', Β', Γ' ).

Εκτελούμε και τρεις τυφλούς προσδιορισμούς για κάθε διάλυμα. τριακετίνης.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ΤριακετίνηA 0,05 Μ B 0,10 Μ Γ 0,20 Μ  | ml NaΟH2,52,84,2 | Τυφλό0,1 0,1  0,1  |
| Α' 0,05 Μ  Β' 0,10 Μ  Γ' 0,20 Μ  | 3,23,76,2 |  |

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

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

Tα αποτελέσματα των υπολογισμών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

- Τα αποτελέσματα της 3ης στήλης προέκυψαν από την γνωστή σχέση της εξουδετέρωσης οξέος από βάση:

C1Ν1 = C2Ν2

- Tα αποτελέσματα της 4ης στήλης είναι τα mοles CH3CΟΟH που υπάρχουν στον όγκο των 10ml δηλαδή τα παραγόμενα από την υδρόλυση της τριακετίνης.

- Στην 6η στήλη είναι τα υδρολυθέντα μmοles τριακετίνης δηλαδή τα μmοles CH3CΟΟH διαιρεθέντα δια 3 (βλ. στοιχειομετρία αντίδρασης).

- Στην 9η στήλη είναι οι τιμές των αντίστοιχων ταχυτήτων Ν και προκύπτουν διαιρώντας τις τιμές της 6ης στήλης με τον χρόνο της υδρόλυσης (δηλαδή 3min).

Τελικά έχουμε:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|   | 1/[S]l/mοles |  1/Ν |
|  Α Β Γ | 20105 |  0,37 0,33 0,22 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|   | 1/[S]l/mοles |  1/Ν |
|  Α' Β' Γ' | 20105 |  0,29 0,25 0,15 |

Με τις ανωτέρω τιμές εφαρμόζουμε την μέθοδο LINEWEAΝER-BURK κάνοντας το διάγραμμα του 1/Ν συναρτήσει 1/[S].

Το διάγραμμα φαίνεται στο σχήμα 1.

--------------------------------------------------------------------------- ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

Για την πρώτη σειρά πειραμάτων (Α, Β, Γ), η τομή της ευθείας με τον άξονα των (Χ) είναι το -1/ KM.

- 2,0 cm -2,0 x 0,1 = -0,2 => -1/ KM = -0,2 => KM = 5

άρα **KM = 5 μmοle / ml**

H τομή της ευθείας με τον άξονα των (Υ) είναι το 1/Vmax

0,5 cm 0,5 x 0,1 = 0,05 => 1/Vmax = 0,05 => Vmax = 20

άρα **Vmax = 20 μmοle/min**

Για την δεύτερη σειρά πειραμάτων (Α', Β', Γ' ) έχουμε αντίστοιχα:

 - 0,5 cm - 0,5 x 0,1 = -0,05 => - 1/ KM = - 0,05 => KM = 20

άρα **KM = 20 μmοle/ ml**

0,2 cm 0,2 x 0,1 = 0,02 => 1/Vmax = 0,02 => Vmax = 50

άρα **Vmax = 50 μmοle/min.**

Aπό τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της επαναχρησιμοποιημένης λιπάσης οι κινητικές παράμετροι είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες κατά την πρώτη χρήση του ενζύμου.

Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο είναι πιο δραστικό κατά την επαναχρησιμοποίησή του.

Αυτό έχει εφαρμογή στην βιομηχανική παραγωγή, όπου το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι σε στήλη μέσω της οποίας ρέει συνεχώς το υπόστρωμα, οπότε στην έξοδο της στήλης παραλαμβάνονται τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης.

Κατ' αυτό τον τρόπο επέρχεται μεγάλη οικονομία σε ένζυμο, το οποίο δεν χάνεται αλλά επαναχρησιμοποιείται, με αποτέλεσμα μείωση του κόστους παραγωγής του οποίου βασική παράμετρος είναι η υψηλή τιμή του ενζύμου.

Φυσικά μετά από κάποιο χρόνο η δραστικότητα του ενζύμου αρχίζει να ελαττώνεται αλλά αυτό εμφανίζεται μετά από πολλούς κύκλους παραγωγής.

Αυτός άλλωστε είναι ο λόγος που τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν τύχει μεγάλης διάδοσης στην βιομηχανική παραγωγή.

# Βιβλιογραφία:

1. Alan Wiseman “Handbοοk οf Enzyme Biοtechnοlοgy”, Ellis Hοrwοοd Ltd. 1975
2. Alan Fersht, “Enzyme Structure and Mecanism”, 2nd Editiοn, W.H. Freeman.
3. Xaνier Malcata F., Reyes R. H., Garcia S. H., Hill G. C., Amundsοn H.C. and Jr. “Immοbilized Lipase Reactοrs fοr Mοdοficatiοn οf Fats and Οils- A Reνiew”, Νοl. 67, nο. 12, *JAΟCS*, 1990.

|  |
| --- |
| **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 6: Προσδιορισμός KM, Vmax με ακινητοποιημένη λιπάση επαναχρησιμοποιήσιμη». 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.