

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 9: β-γλυκοζιδάση - προσδιορισμός Νmax, KM υπό την επίδραση αναστολέα**

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](#_Toc411600000)

[Σκοπός: 2](#_Toc411600001)

[Στόχοι: 2](#_Toc411600002)

[Περίληψη: 3](#_Toc411600003)

[Αντίδραση χωρίς αναστολέα 3](#_Toc411600004)

[Αντίδραση υπό την επίδραση αναστολέα 4](#_Toc411600005)

[Βιβλιογραφία: 8](#_Toc411600006)

# Περιγραφή:

Μέτρηση των κινητικών παραμέτρων Νmax, KM της β-γλυκοζιδάσης (β-glycοsidase) κατά την υδρόλυση π-νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανόζης (p-nitrοphenοl-glycοpyrοnοside), **παρουσία και απουσία αναστολέα.**

# Σκοπός:

Να κατανοήσουν οι σπουδαστές την αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας από ειδικά μόρια, όπως επίσης και τον τρόπο δράσης των αναστολέων στις διαφορετικού τύπου ενζυμικές αναστολές.

# Στόχοι:

Να μπορούν οι φοιτητές να υπολογίσουν το είδος της ενζυμικής αναστολής κατά την υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης παρουσία λακτόζης, από τη μέτρηση των κινητικών παραμέτρων Νmax, KM της αντίδρασης.

# Περίληψη:

Μια ουσία η οποία με την παρουσία της ελαττώνει την ταχύτητα μιάς ενζυμικής αντίδρασης είναι ένας αναστολέας ( Ι ) της αντίδρασης αυτής. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή.

Στη μη αντιστρεπτή αναστολή ο αναστολέας ενώνεται με το ένζυμο πολύ ισχυρά και η απόσπαση του από αυτό είναι πολύ αργή.

Η αντιστρεπτή αναστολή σε αντίθεση με την προηγούμενη, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Διακρίνουμε τρείς τύπους αντιστρεπτής αναστολής: α) τη συναγωνιστική αναστολή β) τη μη συναγωνιστική αναστολή και γ) την ασυναγώνιστη αναστολή.

Η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή είναι κινητικά διακριτές..

Στην άσκηση αυτή προσδιορίζουμε τις Νmax, KM του ενζύμου β-γλυκοζιδάση, στην υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης, παρουσία και απουσία αναστολέα (λακτόζη). Συγκρίνουμε δε τις τιμές των κινητικών παραμέτρων Νmax, KM στις δύο περιπτώσεις και συμπεραίνουμε το είδος της αναστολής.

Η μέθοδος προσδιορισμού των Νmax, KM στηρίζεται στη δημιουργία της

π-νιτροφαινόλης η οποία απορροφά στα 440 nm.

# Αντίδραση χωρίς αναστολέα

Εκτελούμε 3 πειράματα (A, B, Γ) χρησιμοποιώντας πάντα την ίδια ποσότητα ενζύμου (β-γλυκοζιδάση). Σε κάθε πείραμα αλλάζει η συγκέντρωση του υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζη, σε τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις).

Για κάθε πείραμα αναμιγνύεται η ίδια ποσότητα ενζύμου με 4 ml υποστρώματος και 1 ml απεσταγμένου νερού.

Μετράμε σε φασματοφωτόμετρο την απορρόφηση της παραγόμενης νιτροφαινόλης. Από την στοιχειομετρία της αντίδρασης παρατηρούμε ότι τα mοles της παραγόμενης π-νιτροφαινόλης είναι όσα και τα mοles του υποστρώματος που υδρολύθηκαν.

Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος (Α, Β, Γ) γίνονται μετρήσεις ανά 10sec και για χρονικό διάστημα 120sec. Λαμβάνουμε 12 τιμές απορρόφησης σε κάθε συγκέντρωση. Ακολούθως χαράσσουμε διάγραμμα Α= f(t) και από την κλίση της εφαπτόμενης στην καμπύλη που σχηματίστηκε βρίσκουμε το Νο.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτουν οι τρείς αρχικές ταχύτητες, Νο1, Νο2, Νο3

Με βάση τις τιμές Νο και τις συγκεντρώσεις υποστρώματος χαράσσουμε διάγραμμα 1/Νο = f(1/S).

# Αντίδραση υπό την επίδραση αναστολέα

Επαναλαμβάνουμε την υδρόλυση της π-νιτρο-φαινυλο-γλυκοπυρανόζης αλλά αυτή τη φορά υπό την επίδραση ενός αναστολέα (λακτόζη).

Εκτελούμε 3 πειράματα (A', B', Γ'), χρησιμοποιώντας πάντα την ίδια ποσότητα ενζύμου αλλά διαφορετικά υποστρώματα (τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις, ίδιες με προηγούμενα).

Σε κάθε πείραμα αναμιγνύεται μία ποσότητα ενζύμου με ποσότητα υποστρώματος και 1 ml διαλύματος αναστολέα. Οι ποσότητες αυτές είναι οι ίδιες και στα τρία πειράματα.

Μετράμε την απορρόφηση της παραγόμενης νιτροφαινόλης. Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος (Α', Β', Γ') γίνονται μετρήσεις ανά 10sec και για χρονικό διάστημα 120sec. Ακολούθως χαράσσουμε διάγραμμα Α= f(t) και υπολογίζουμε το Νο'.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτουν οι τρείς νέες αρχικές ταχύτητες, Νο'1, Νο'2, και Νο'3. Χαράσσουμε διάγραμμα 1/Νο' = f(1/S).

Aπό το διάγραμμα συγκρίνοντας τις τιμές Νmax, KM κατά την αντίδραση χωρίς αναστολέα και τις τιμές Νmax, KM κατά την αντίδραση με αναστολέα, προκύπτει ότι η αναστολή είναι μη συναγωνιστική.

**A. ΑΝΤIΔΡΑΣΗ ΧΩΡIΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ**

1. Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.001 Μ

0.50 mg/ml ενζύμου αναμιγνύονται με 4 ml υποστρώματος και 1 ml δισαπεσταγμένου νερού.

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.020 0.025 0.045 0.047 0.055 0.065 0.075 |  70 80 90 100 110 120 |  0.085 0.095 0.1 0.11 0.125 0.13 |

2) Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.002 Μ

Οι ποσότητες που αναμιγνύονται είναι ίδιες με τις παραπάνω.

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.040 0.055 0.070 0.090 0.120 0.130 0.135 |  70 80 90 100 110 120 |  0.155 0.170 0.190 0.200 0.220 0.240 |

3) Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.004 Μ

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.05 0.07 0.10 0.13 0.16 0.18 0.215 |  70 80 90 100 110 120 |  0.24 0.27 0.31 0.32 0.35 0.38 |

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτουν οι εξής αρχικές ταχύτητες:

Νο1 = 2,86 A10-3 M/sec

Νο2 = 6,30 A10-3 M/sec

Νο3 = 12,37 A10-3 M/sec

**B. ANTIΔΡΑΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠIΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ (ΛΑΚΤΟΖΗ)**

1) Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.001Μ

0.050 mg/ml ενζύμου αναμιγνύονται με 4 ml υποστρώματος και 1 ml αναστολέα [I] = 0.1Μ.

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.085 |  70 80 90 100 110 120 |  0.10 0.11 0.12 0.13 0.145 0.15 |

2) Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.002 Μ

Οι ποσότητες υποστρώματος, ενζύμου και αναστολέα είναι οι ίδιες.

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.04 0.05 0.07 0.12 0.14 0.16 0.18 |  70 80 90 100 110 120 |  0.20 0.22 0.24 0.26 0.28 0.30 |

3) Συγκέντρωση υποστρώματος [S] = 0.004 Μ

Οι ποσότητες υποστρώματος, ενζύμου και αναστολέα είναι οι ίδιες.

Μετρήσεις:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  t (sec) |  A |  t (sec) |  A |
|  0 10 20 30 40 50 60 |  0.04 0.06 0.08 0.10 0.14 0.15 0.18 |  70 80 90 100 110 120 |  0.20 0.22 0.24 0.26 0.28 0.30 |

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτουν οι εξής αρχικές ταχύτητες:

Νο1 = 2.81 A10-3 M/sec

Νο2 = 5.9 A10-3 M/sec

Νο3 = 9.7 A10-3 M/sec

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

α) Κατά την αντίδραση χωρίς αναστολέα έχουμε:

Νmax = 1,6 M/sec, Km = 0,05 M/L

β) Κατά την αντίδραση με αναστολέα:

Νmax = 0,8 M/sec, Km = 0,025 M/L

Από το διάγραμμα επίσης προκύπτει ότι η αναστολή είναι μη συναγωνιστική.

**Ερωτήσεις:**

1) Η κινητική ενός ενζύμου μετράται ως μία συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος παρουσία και απουσία 2 x 10-3 αναστολέα (Ι).

α) Ποιες είναι οι τιμές των Νmax, KM απουσία αναστολέα και παρουσία αναστολέα ;

β) Τι τύπος αναστολής είναι αυτός

γ) Ποια είναι η σταθερά διάστασης Ki του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Χωρίς αναστολέα**  | **Με αναστολέα** |
| [S] mοles/lt | Ν0 μmοles/min | Ν0 μmοles/min |
|  | 10,4 | 4,1 |
|  | 14,5 | 6,4 |
|  | 22,5 | 11,3 |
|  | 33,8 | 22,6 |
|  | 40,5 | 33,8 |

2) Δίνετε Κm και Νmax ενζυμικής αντίδρασης τα οποία είναι 0,001Μ και 100 μmοl/min όταν δεν υπάρχει αναστολέας και 0,01Μ και 75 μmοl/min όταν υπάρχει 0,005Μ αναστολέα. Να προσδιοριστεί ο τύπος αναστολής και το Ki.

# 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 9: β-γλυκοζιδάση - προσδιορισμός Νmax, KM υπό την επίδραση αναστολέα». 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.