

Πείραμα 3^ο: Ποιοτική μελέτη του τρόπου λειτουργίας των ενζύμων με χρήση δυο ενζυμικών αντιδράσεων:

(α) Οξείδωση της κατεχόλης με χρήση οξειδάσης

(β) Αποικοδόμηση του αμύλου με χρήση αμυλάσης

Στοιχεία θεωρίας

I. ENZYMA KAI ENZYMIKH ENERΓΟΤΗΤΑ

Στα κύτταρα των ζωντανών οργανισμών γίνονται πολλές χημικές διεργασίες. Οι περισσότερες από τις αντιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται ταχύτατα εξαιτίας της παρουσίας ενζύμων. Τα ένζυμα είναι βιολογικοί καταλύτες που αυξάνουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης χωρίς αυτά να καταναλώνονται ή να υφίστανται αλλαγή στη σύστασή τους. Η ένωση με την οποία αντιδρά ο καταλύτης ονομάζεται υπόστρωμα και κατά τη διάρκεια της αντίδρασης τροποποιείται ώστε να δώσει το προϊόν (Εικόνα 1). Το ενεργό κέντρο του ενζύμου συνδέεται με το υπόστρωμα σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η κατάλυση και όταν αυτή ολοκληρωθεί το σύμπλοκο διαχωρίζεται σε ένζυμο και προϊόν (ή προϊόντα). Τα ένζυμα είναι είτε στο σύνολο τους ή εν μέρει, σφαιρικές πρωτεΐνες με μεγάλη εξειδίκευση. Κάθε ένζυμο αντιδρά με ένα περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων παρόμοιας δομής και η αντίδραση οδηγεί σε προϊόντα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες συγκέντρωσης, pH, θερμοκρασίας κ.τ.λ. Στο μεταβολισμό, ομάδες ενζύμων συνεργάζονται για την πραγματοποίηση διαδοχικών αντιδράσεων που οδηγούν σε σύνθετες μοριακές μετατροπές, π.χ. η μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό (γλυκόλυση). Τα ένζυμα λειτουργούν μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για την πραγματοποίηση της αντίδρασης με αποτέλεσμα να αυξάνεται κατά πολύ η ταχύτητά της. Παρόλα αυτά όμως δεν καθορίζουν ούτε την κατεύθυνση της αντίδρασης ούτε τη χημική ισορροπία. Το ένζυμο αυτό καθαυτό εμφανίζεται ανέπαφο μετά το τέλος της αντίδρασης και έτοιμο να συνδεθεί με ένα άλλο μόριο υποστρώματος, οπότε μια σχετικά μικρή ποσότητα ενζύμου αρκεί για την επεξεργασία μιας συγκριτικά πολύ μεγαλύτερης ποσότητας υποστρώματος.

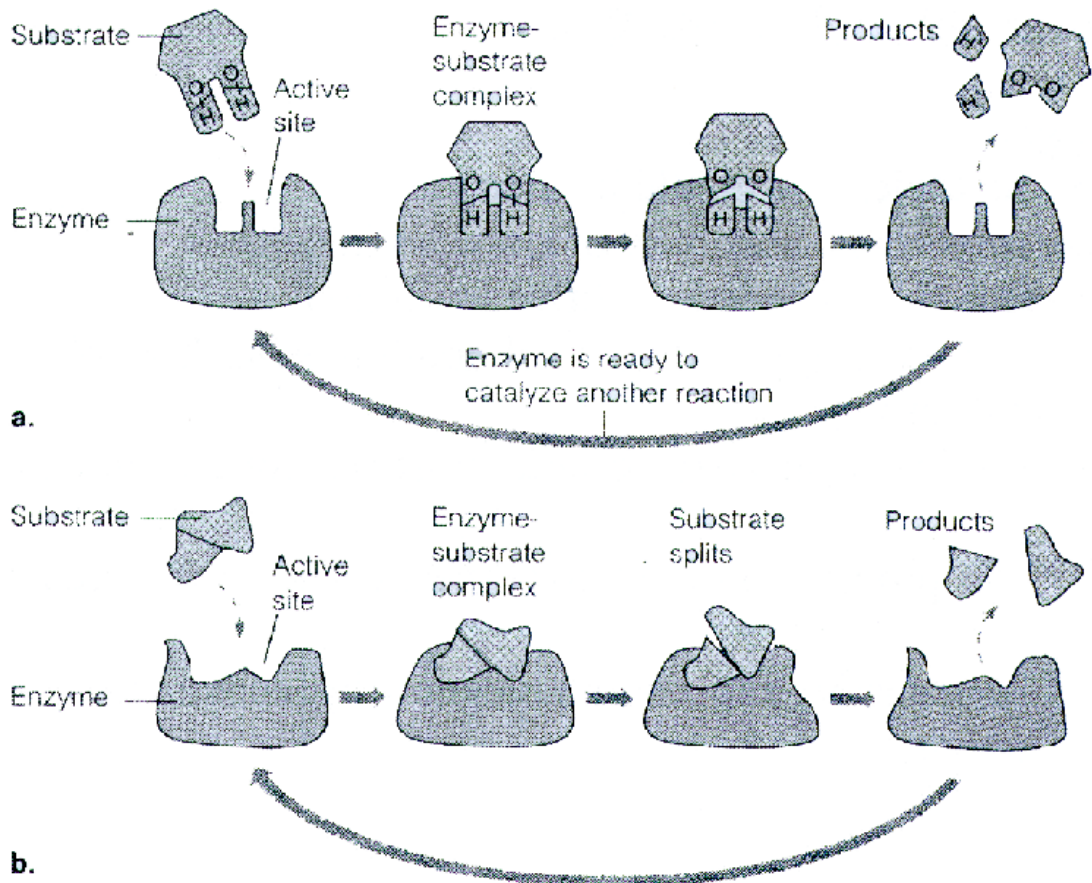
Αυτό που μας ενδιαφέρει πραγματικά σε μια ενζυμική αντίδραση είναι το ποσό του προϊόντος που σχηματίζεται στη μονάδα του χρόνου. Αυτό ορίζεται ως **ενεργότητα (activity)**. Η ενεργότητα μπορεί να εκφράζεται άμεσα ως το ποσό του υποστρώματος που χρησιμοποιείται στη μονάδα του χρόνου (π.χ. nmol min^{-1} , κ.τ.λ.)

ή σε **units (U)**. Το unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος σε προϊόν (ή προϊόντα) σε 1 min κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η προτεινόμενη SI μονάδα ενζυμικής ενεργότητας είναι το katal (kat), το οποίο ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που μετατρέπει 1 mol υποστρώματος σε προϊόν (ή προϊόντα) σε 1 sec κάτω από βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης:

$$\text{ενζυμική ενεργότητα (kat)} = \frac{\text{υπόστρωμα που καταναλώνεται (mol)}}{\text{χρόνος (sec)}}$$

Η μονάδα αυτή είναι σχετικά μεγάλη ($1 \text{ kat} = 6 \times 10^7 \text{ U}$) οπότε στην πράξη χρησιμοποιούνται συχνά προθέματα του SI όπως nkat ή pkat για καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Πρέπει να τονιστεί ότι οι μονάδες αυτές αναφέρονται σε ποσότητα υποστρώματος (mol) κι όχι συγκέντρωση (mol L^{-1} ή mol m^{-3}).

Ο αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου ορίζεται ως το ποσό του υποστρώματος (mol) που μετατρέπεται σε προϊόν σε 1 sec από 1 mol ενζύμου κάτω από βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου. Στην πράξη, ο υπολογισμός του αριθμού μετατροπής προϋποθέτει γνώση του μοριακού βάρους του ενζύμου, της ποσότητας του ενζύμου που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση και της μέγιστης ταχύτητάς του. Παρατηρώντας την Εικόνα 1 γίνεται φανερό ότι υπάρχουν δύο τρόποι να μετρηθεί η ενζυμική ενεργότητα: (1) Μετρώντας την ταχύτητα εξαφάνισης του υποστρώματος, και (2) μετρώντας την ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Ενζυμική ενεργότητα: Το υπόστρωμα (ή τα υποστρώματα) προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σχηματίζοντας το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια διασπάται δίνοντας ένζυμο και προϊόν (ή προϊόντα). Το ένζυμο, είτε καταλύει την προσθήκη ή απομάκρυνση ενός μορίου (ή τμήματός του) από το υπόστρωμα δίνοντας προϊόν (α) ή καταλύει τη διάσπαση του υποστρώματος στις υπομονάδες του οδηγώντας σε προϊόν (β).

II. ENZYMIKH ANASTOLH

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Αλλάζοντας πειραματικές συνθήκες όπως το pH ή η θερμοκρασία υπάρχει περίπτωση να επηρεαστεί η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου, κατά συνέπεια και η ενεργότητά του.

Η ενεργότητα του ενζύμου καθορίζεται σε πολλές περιπτώσεις, από μια συγκεκριμένη πρωτεϊνική αλυσίδα του μορίου. Συνήθως το ένζυμο απαρτίζεται από την κυρίως πρωτεΐνη και ένα σύνολο διαφόρων άλλων τμημάτων που ονομάζονται συμπαράγοντες. Είναι πολύ συνηθισμένο να αναφερόμαστε στο ενζυμικό σύμπλοκο απλά ως ένζυμο.

Το πολυπεπτίδιο ή πρωτεϊνικό κομμάτι του ενζύμου ονομάζεται **αποένζυμο** και πολλές φορές είναι ανενεργό από μόνο του. Η μη ενεργή μορφή του αποενζύμου καλείται επίσης **προένζυμο** ή **ζυμογόνο**. Πιθανό να περιέχει κάποια επιπλέον αμινοξέα, τα οποία κάποια στιγμή απομακρύνονται ώστε το μόριο να πάρει την τελική τεταρτοταγή του διαμόρφωση προκειμένου να μεταβεί στην ενεργή του μορφή ως ένζυμο.

Οι συμπαράγοντες είναι μη πρωτεϊνικές ουσίες οι οποίες όταν έχουν οργανική προέλευση ονομάζονται **συνένζυμα**. Τα συνένζυμα συχνά προέρχονται από βιταμίνες. Ένας άλλος τύπος συμπαράγοντων είναι τα ανόργανα μεταλλικά ιόντα και ονομάζονται απλά **συμπαράγοντες μεταλλικών ιόντων**. Ο κύριος λόγος που τα ιχνοστοιχεία είναι απαραίτητα στη διατροφή μας είναι για να προμηθεύουν στα ένζυμα μεταλλικά ιόντα όπως Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} και Na^{+} προκειμένου να συμβάλλουν στην ενεργοποίησή τους.

Ο τρόπος με τον οποίο συνδέεται το αποένζυμο με τον/τους συμπαράγοντες ποικίλει. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι δεσμοί αυτοί είναι μάλλον χαλαροί και υφίστανται μόνο κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης. Άλλοτε πάλι τα τμήματα του ενζυμικού συμπλόκου συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Σε κάθε περίπτωση ο συμπαράγοντας δρα είτε επιδρώντας στην πρωτεΐνη αλλάζοντας τη διαμόρφωσή της, είτε παίρνοντας ενεργά μέρος στην ενζυμική αντίδραση.

Οι χημικές ενώσεις που καταστέλλουν την ενζυμική ενεργότητα ονομάζονται **παρεμποδιστές** και η δράση τους μπορεί να διαχωριστεί σε **αντιστρεπτή** και **μη αντιστρεπτή αναστολή**.

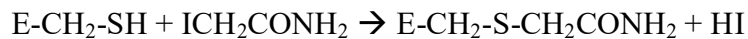
Είναι σημαντικό να διερευνηθεί η παρεμπόδιση της ενζυμικής ενεργότητας από συγκεκριμένα μόρια και ιόντα επειδή:

- Η ενζυμική αναστολή είναι ένας σπουδαίος μηχανισμός ελέγχου στα βιολογικά συστήματα (π.χ. αναστολή λόγω συσσώρευσης του προϊόντος της αντίδρασης).
- Η δράση πολλών φαρμάκων οφείλεται στο ότι παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων.
- Η δράση πολλών τοξινών εξηγείται βάσει της ενζυμικής αναστολής.

Όσον αφορά την αλληλεπίδρασή τους με τα ένζυμα, οι αναστολείς παίρνουν μέρος σε αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές αντιδράσεις και όπως αναφέρθηκε παραπάνω η αναστολή μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή.

Μη αντιστρεπτοί αναστολείς

Πρόκειται για ουσίες, συνήθως μη βιολογικής προέλευσης, οι οποίες αντιδρούν **ομοιοπολικά** με το ένζυμο (E), εμποδίζοντας την πρόσδεση του υποστρώματος, π.χ. το ιωδοακεταμίδιο, το οποίο προσδένεται στις θειολικές ομάδες των ενζύμων όπως παρακάτω:



Η θειολική ομάδα μπορεί να βρίσκεται είτε μέσα στο ενεργό κέντρο αποτελώντας τμήμα των θέσεων δέσμευσης ή μακριά απ' αυτό επηρεάζοντας την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου.

Η τοξικότητα που χαρακτηρίζει τα ιόντα βαρέων μετάλλων (π.χ. Hg^{2+}) οφείλεται κυρίως στη μη αντιστρεπτή αναστολή που προκαλούν στην ενζυμική ενεργότητα.

Αντιστρεπτοί αναστολείς

Οι αναστολείς **δεν αντιδρούν ομοιοπολικά** με το ένζυμο, αντίθετα αυτό που παρατηρείται συνήθως είναι γρήγορη, αντιστρεπτή δέσμευση και αποδέσμευση. Η ταχύτητα της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης ελαττώνεται λόγω του σχηματισμού των συμπλόκων ενζύμου-παρεμποδιστή (EI) ή ενζύμου-υποστρώματος-παρεμποδιστή (ESI).

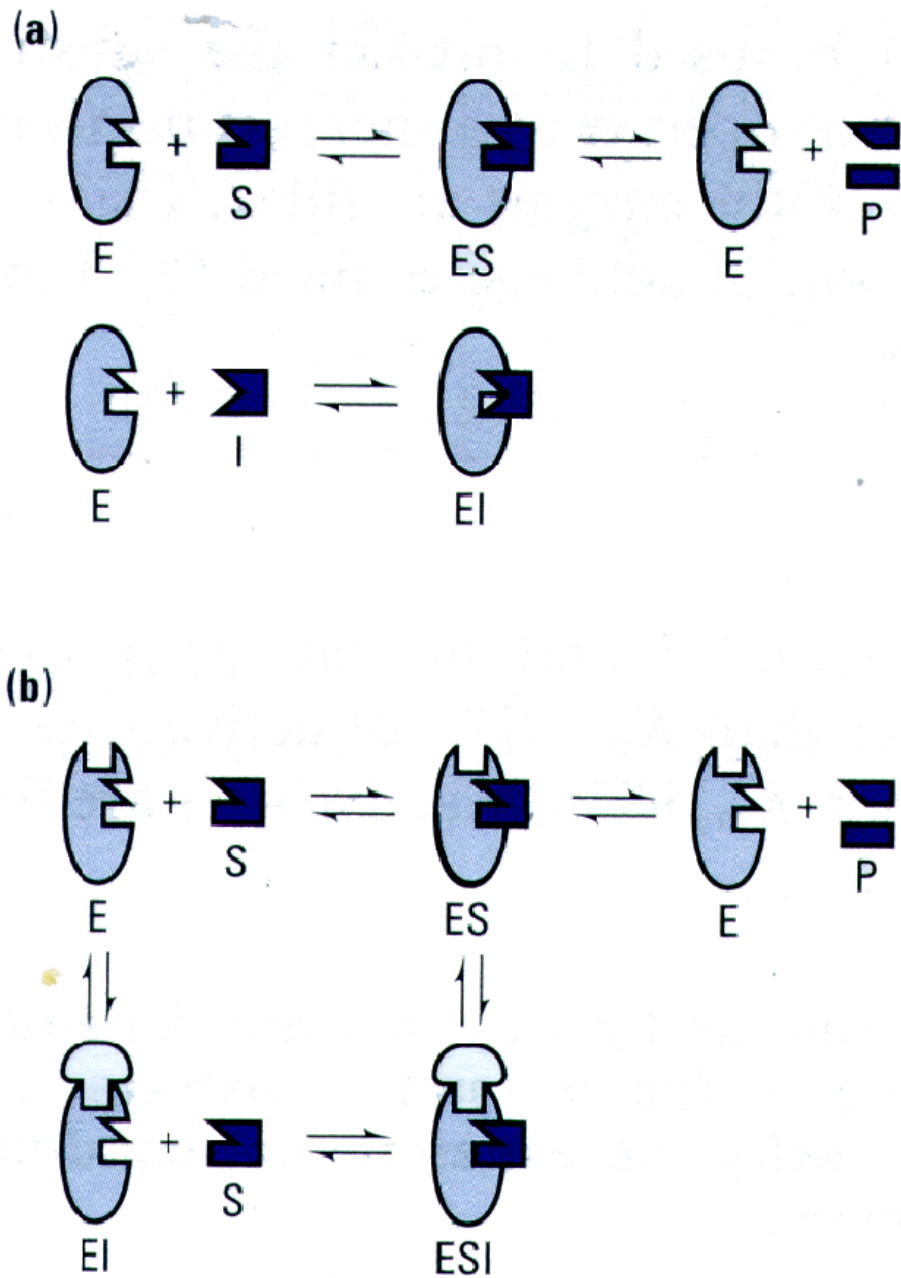
Οι συναγωνιστικοί αναστολείς:

- προσδένονται αντιστρεπτά σε ομάδες του ενεργού κέντρου. Συχνά, η δομή του παρεμποδιστή μοιάζει μ' αυτή του υποστρώματος οπότε η δέσμευση των μορίων του παρεμποδιστή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου εμποδίζει τα μόρια του υποστρώματος να δεσμευτούν στην ίδια περιοχή (εικόνα 2α).

- Το ένζυμο προσδένεται είτε στο υπόστρωμα (S) σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES, είτε στον παρεμποδιστή (I) σχηματίζοντας το σύμπλοκο EI αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί και στις δύο ουσίες (ESI).
- Ο συναγωνιστικός αναστολέας μειώνει την ταχύτητα της κατάλυσης ελαττώνοντας τον αριθμό των μορίων του ενζύμου που μπορούν να προσδεθούν στο υπόστρωμα.
- Οι συνέπειες της συναγωνιστικής αναστολής παύουν να υφίστανται όταν αυξηθεί ανάλογα η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Η μη-συναγωνιστική αντιστρεπτή αναστολή συμβαίνει όταν:

- Ο αναστολέας προσδένεται στο ένζυμο είτε αυτό είναι συνδεδεμένο με το υπόστρωμα είτε όχι (ταυτόχρονος σχηματισμός συμπλόκων ES και ESI). Αυτός ο τύπος παρεμπόδισης προκαλείται κυρίως από φυσικούς αναστολείς των ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού. Στην περίπτωση αυτή ο παρεμποδιστής δεν προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά σε κάποια άλλη περιοχή του οπότε το ένζυμο διαφοροποιείται και χάνονται οι καταλυτικές του ιδιότητες. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους κυρίως: (1) Ο αναστολέας προσδένεται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου οπότε εμποδίζει με φυσικό τρόπο την πρόσβαση του υποστρώματος στη θέση δέσμευσης ή (2) η δέσμευσή του προκαλεί αλλαγή στην τεταρτοταγή δομή του ενζύμου και κατά συνέπεια και στο ενεργό κέντρο του.
- Στην μη συναγωνιστική αναστολή, ο παρεμποδιστής μπορεί να αποδεσμευτεί οπότε το ένζυμο ενεργοποιείται ξανά αλλά σε αντίθεση με την προηγούμενη περίπτωση η αναστολή δεν επηρεάζεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αντίδραση (εικόνα 2).
- Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης μειώνεται εξαιτίας της ελάττωσης του αριθμού μετατροπής.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Σχηματική παράσταση της (α) συναγωνιστικής αναστολής, όπου ο αναστολέας (I) συνδέεται στο ένζυμο στην ίδια θέση μ' αυτή του υποστρώματος και (β) μη-συναγωνιστική αναστολή.

Πείραμα 3^ο: Ποιοτική μελέτη του τρόπου λειτουργίας των ενζύμων με χρήση δυο ενζυμικών αντιδράσεων:

(α) Οξειδωση της κατεχόλης με χρήση οξειδάσης

Στο συγκεκριμένο πείραμα, θα μελετήσετε την ενεργότητα του ενζύμου οξειδάση της κατεχόλης ανάλογα από την εμφάνιση ή όχι του προϊόντος της αντίδρασης. Επιπλέον, θα χρησιμοποιήσετε έναν παρεμποδιστή της ενεργότητας του ενζύμου αυτού και θα πρέπει να αποφασίσετε αν πρόκειται για συναγωνιστικό ή μη συναγωνιστικό αναστολέα.

Σε γενικές γραμμές, το χρονοδιάγραμμα για το συγκεκριμένο πείραμα είναι το εξής:

A. Δράση της οξειδάσης της κατεχόλης – 30 min.

B. Παρεμπόδιση της οξειδάσης της κατεχόλης – 30 min.

Γ. Μελέτη της εξειδίκευσης της οξειδάσης της κατεχόλης – 30 min..

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

A. Δράση της οξειδάσης της κατεχόλης

- Μια μέτρια πατάτα περίπου 100 gr
- Κοφτερό μαχαίρι
- Παγωμένο νερό και δοχείο με πάγο
- Μπλέντερ
- Πλαστικό Χωνί
- Γάζα
- 3 μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες και στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
- Διάλυμα κατεχόλης (catechol) 1% w/v σε νερό
- Parafilm

B. Παρεμπόδιση της οξειδάσης της κατεχόλης

Τα ίδια με παραπάνω και επιπλέον 1ml αραιού διαλύματος φαινυλ-θειουρίας (phenylthiourea, PTU).

Γ. Δράση της οξειδάσης της κατεχόλης

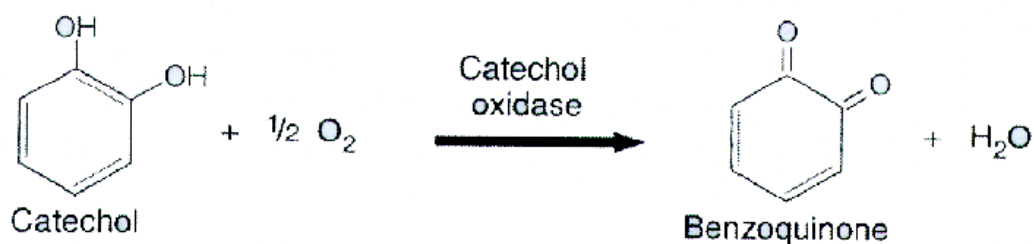
Τα ίδια με το μέρος A και επιπλέον διάλυμα 1% w/v υδροκινόνης (hydroquinone).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Δράση του ενζύμου οξειδάση της κατεχόλης

Η οξειδάση της κατεχόλης, παρουσία οξυγόνου, καταλύει την απομάκρυνση των ηλεκτρονίων και των υδρογόνων από την κατεχόλη, μια φαινολική ένωση που βρίσκεται στα φυτικά κύτταρα. Η κατεχόλη μετατρέπεται σε βενζοκινόνη, ένα προϊόν με καφέ χρώμα (Εικόνα 3). Τα μόρια του υδρογόνου συνδέονται με το οξυγόνο δίνοντας νερό. Η παραπάνω αντίδραση προκαλεί το «μαύρισμα» ορισμένων φρούτων (όπως τα μήλα) και λαχανικών (όπως οι πατάτες) όταν καθαριστούν και εκτεθούν στον αέρα.

Στην άσκηση αυτή (καθώς και στις επόμενες δυο) θα χρησιμοποιήσετε εκχύλισμα πατάτας για να διαπιστώσετε την ύπαρξη του ενζύμου οξειδάση της κατεχόλης από την παρουσία ή όχι προϊόντος.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η οξείδωση της κατεχόλης: Παρουσία της οξειδάσης της κατεχόλης, η κατεχόλη μετατρέπεται σε βενζοκινόνη. Τα υδρογόνα που απομακρύνονται από την κατεχόλη αντιδρούν με το οξυγόνο και σχηματίζεται νερό.

Καθαρίστε την πατάτα και κόψτε την σε μικρά κομμάτια. Ζυγίστε περίπου 100 gr και τοποθετήστε τα σε ένα κρύο μπλέντερ το οποίο περιέχει την αντίστοιχη ποσότητα παγωμένου νερού (για παράδειγμα εάν έχετε 95 gr πατάτας τότε προσθέτετε 95 ml νερό). Αλέστε καλά την πατάτα, αρχικά ανοιγοκλείνοντας το διακόπτη και στη συνέχεια στην υψηλότερη ταχύτητα για 4-5 δευτερόλεπτα. Σουρώστε το διάλυμα χρησιμοποιώντας 4 στοιβάδες γάζας. Σφίξτε τη γάζα για να πάρετε όλο το υγρό. Το υγρό συλλέγεται σε παγωμένο ποτήρι ή κωνική φιάλη το οποίο θα πρέπει να παραμένει σε πάγο σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Χρησιμοποιώντας τον πίνακα 1, παρασκευάστε τους τρεις σωλήνες του πειράματος. Προσέξτε ότι ο τελικός όγκος του δείγματος είναι ο ίδιος και στους τρεις σωλήνες. Όταν ολοκληρωθεί η προσθήκη των συστατικών σε κάθε σωλήνα, χρησιμοποιήστε ένα κομμάτι parafilm (διαφορετικό κάθε φορά!) για να σφραγίσετε το σωλήνα και να ανακατέψετε ήπια το περιεχόμενο. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Σωλήνας	Απιονισμένο νερό	Κατεχόλη	Εκχύλισμα πατάτας
1	5,5 ml	0,5 ml	-
2	5,5 ml	-	0,5 ml
3	5ml	0,5 ml	0,5 ml

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Η κατεχόλη είναι δηλητήριο. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και μην αναπνέετε τη σκόνη.

B. Παρεμπόδιση του ενζύμου οξειδάση της κατεχόλης

Στην άσκηση αυτή θα μελετηθεί η παρεμπόδιση της ενεργότητας του ενζύμου από την φαίνυλ-θειουρία (phenylthiourea, PTU). Για να είναι ενεργή, η οξειδάση της κατεχόλης χρειάζεται χαλκό ως συμπάραγοντα. Η PTU ενώνεται με το χαλκό στην οξειδάση της κατεχόλης και εμποδίζει την ενζυμική ενεργότητα. Στο πείραμα που ακολουθεί θα πρέπει επίσης να αποφασίσετε αν η PTU είναι συναγωνιστικός ή μη συναγωνιστικός αναστολέας.

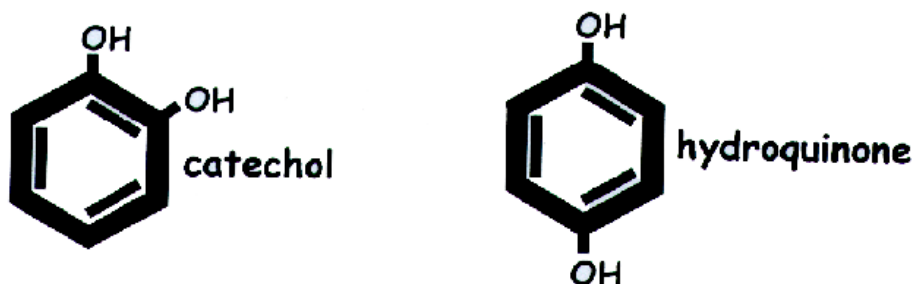
Χρησιμοποιώντας τον πίνακα 2, παρασκευάστε τους τρεις σωλήνες του πειράματος. Είναι σημαντικό να προσθέσετε τα διαλύματα με τη σειρά που αναγράφονται στον πίνακα (πρώτα το νερό, στη συνέχεια το εκχύλισμα κ.τ.λ.). Προσέξτε ότι ο τελικός όγκος του δείγματος είναι ο ίδιος και στους τρεις σωλήνες. Όταν ολοκληρωθεί η προσθήκη των συστατικών σε κάθε σωλήνα, χρησιμοποιήστε ένα κομμάτι parafilm (διαφορετικό κάθε φορά!) για να σφραγίσετε το σωλήνα και να ανακατέψετε ήπια το περιεχόμενο. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Σωλήνας	Απιονισμένο νερό	Εκχύλισμα πατάτας	PTU	Κατεχόλη
1	5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
2	4,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
3	5,5 ml	0,5 ml		0,5 ml

Γ. Διερεύνηση της εξειδίκευσης του ενζύμου της οξειδάσης της κατεχόλης

Στην άσκηση αυτή θα μελετηθεί η εξειδίκευση της ενζυμικής ενεργότητας αντικαθιστώντας το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου (κατεχόλη) με ένα δομικό του ισομερές, την υδροκινόνη (εικόνα 4).



ΕΙΚΟΝΑ 4. Κατεχόλη και υδροκινόνη - δομικά ισομερή.

Χρησιμοποιώντας τον πίνακα 3 παρασκευάστε τους τρεις σωλήνες του πειράματος. Όλοι οι σωλήνες πρέπει να περιέχουν τον ίδιο τελικό όγκο διαλύματος. Προσέξτε επίσης να αλλάζετε πιπέτα έπειτα από κάθε προσθήκη. Μόλις ολοκληρώνεται η προσθήκη των αντιδραστηρίων σε κάθε σωλήνα καλύψτε με parafilm και ανακινήστε ήπια φροντίζοντας να γίνει καλή ανάμειξη των συστατικών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Σωλήνας	Απιονισμένο νερό	Υδροκινόνη	Εκχύλισμα πατάτας
1	5,5 ml	0,5 ml	-
2	5,5 ml	-	0,5 ml
3	5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Παρατηρήστε τις αντιδράσεις στους σωλήνες και καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας.

Πείραμα 3^ο : Ποιοτική μελέτη του τρόπου λειτουργίας των ενζύμων με χρήση δυο ενζυμικών αντιδράσεων:

(β) Αποικοδόμηση του αμύλου με χρήση αμυλάσης

Στην άσκηση που ακολουθεί θα μελετήσετε την επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου, του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου **αμυλάση**. Η αμυλάση αποτελεί βασικό συστατικό του σάλιου του ανθρώπου και πολλών ζώων που χρησιμοποιούν άμυλο ως πηγή τροφής. Το άμυλο, η κύρια «αποθήκη» υδατανθράκων στα φυτά, είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μονομερών γλυκόζης συνδεδεμένων μεταξύ τους. Η αμυλάση είναι υπεύθυνη για την αρχική αποικοδόμηση του αμύλου. Συγκεκριμένα, η αμυλάση διασπά τις αλυσίδες των μορίων γλυκόζης του αμύλου σε μαλτόζη, μια ένωση που αποτελείται από δυο μόρια γλυκόζης. Η περαιτέρω αποικοδόμηση του δισακχαρίτη αυτού απαιτεί επιπλέον ένζυμα που εντοπίζονται στις παγκρεατικές και εντερικές εκκρίσεις. Για να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε την αποικοδόμηση του αμύλου σε μαλτόζη από την αμυλάση του σάλιου θα εκμεταλλευτούμε το γεγονός ότι το άμυλο, αλλά όχι η μαλτόζη, αποκτά σκούρο μωβ χρώμα έπειτα από κατεργασία με διάλυμα I₂KI (το διάλυμα αυτό έχει κανονικά κίτρινο-καφέ χρώμα).

A. Η επίδραση της ενζυμικής συγκέντρωσης στο ρυθμό αποικοδόμησης του αμύλου.

Στο στάδιο αυτό θα διαφοροποιήσετε τη συγκέντρωση του ενζύμου (αμυλάση) για να διαπιστώσετε την επίδραση που θα έχουν οι αλλαγές αυτές στην ταχύτητα της αντίδρασης. Πρέπει να έχετε υπόψη σας ότι ο ρυθμός εμφάνισης του προϊόντος (δηλαδή της μαλτόζης) σας παρέχει τις ίδιες ακριβώς πληροφορίες, όμως η παρατήρηση του αμύλου είναι απλούστερη.

Θα κάνετε διαδοχικές αραιώσεις στο διάλυμα της αμυλάσης για να παρασκευάσετε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αρχικά παίρνετε ένα κλάσμα από το διάλυμα που έχετε παρασκευάσει (0,5%) και το αραιώνετε με ίση ποσότητα απιονισμένου νερού για να έχετε αραιώση 1:1 (δηλαδή το 50% της αρχικής συγκέντρωσης). Στη συνέχεια θα πάρετε ένα κλάσμα από την αραιώση 1:1 και θα του προσθέσετε ίση ποσότητα νερού για να πάρετε ένα διάλυμα αραιωμένο 1:3 σε σχέση με το αρχικό. Θα συνεχίσετε τις αραιώσεις μέχρι να παρασκευάσετε 4 διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
- 8 γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιάτα καλλιέργειας 24 θέσεων
- Διάλυμα αμυλάσης 0,5%
- Διάλυμα I₂KI:
- 0,125% I₂, 0,5% KI
- Διάλυμα αμύλου 1%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris 0,2M, pH=6,8.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Παρασκευάστε τα αραιωμένα διαλύματα αμυλάσης όπως περιγράφεται παρακάτω:
 - Αριθμήστε 4 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες από D1 έως D4.
 - Με ένα σιφόνιο των 5ml, προσθέστε 5ml απιονισμένο νερό σε κάθε σωλήνα.
 - Προσθέστε 5ml διαλύματος αμυλάσης στο σωλήνα D1, καλύψτε το άνοιγμα με parafilm και ανακατέψτε αναποδογυρίζοντας προσεκτικά το σωλήνα.
(Αυτή είναι η αραιώση 1:1 με τελική συγκέντρωση αμυλάσης 0,25%).
 - Προσθέστε 5ml διαλύματος αμυλάσης από το σωλήνα D1 στο σωλήνα D2 και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.
(Αυτή είναι η αραιώση 1:3 με τελική συγκέντρωση αμυλάσης 0,125%).
 - Προσθέστε 5ml διαλύματος αμυλάσης από το σωλήνα D2 στο σωλήνα D3 και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.
(Αυτή είναι η αραιώση 1:7 με τελική συγκέντρωση αμυλάσης 0,063%).
 - Προσθέστε 5ml διαλύματος αμυλάσης από το σωλήνα D3 στο σωλήνα D4 και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.
(Αυτή είναι η αραιώση 1:15 με τελική συγκέντρωση αμυλάσης 0,031%).
- Μόλις ολοκληρώσετε τις αραιώσεις, ετοιμάστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες του πειράματος:
- Αριθμήστε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες E1 έως E4.
 - Μεταφέρετε 1ml από την αραιώση του σωλήνα D4 στο σωλήνα E4.
 - Μεταφέρετε 1ml από την αραιώση του σωλήνα D3 στο σωλήνα E3.
 - Μεταφέρετε 1ml από την αραιώση του σωλήνα D2 στο σωλήνα E2.
 - Μεταφέρετε 1ml από την αραιώση του σωλήνα D1 στο σωλήνα E1.

- Προσθέστε 20 σταγόνες από το ρυθμιστικό διάλυμα pH=6,8 σε καθένα από τους σωλήνες E1-E4. Σκεπάστε με parafilm και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.
- Προσθέστε 2-3 σταγόνες διαλύματος I₂KI σε κάθε μια από τις θέσεις του πιάτου καλλιέργειας.
- Αρχίστε από το σωλήνα E4:
 - α) Προσθέστε 0,5ml από το διάλυμα του αμύλου (1%) στο σωλήνα E4 και ανακατέψτε. Καταγράψτε τη χρονική αυτή στιγμή ως t=0 (**μην ξεχνάτε ότι μόλις το υπόστρωμα και το ένζυμο έρθουν σε επαφή, αρχίζει η αντίδραση**).
 - β) Μόλις περάσουν 20'' προσθέστε 2 σταγόνες από το μίγμα αντίδρασης στην πρώτη θέση του πιάτου.
 - γ) Επαναλάβετε τη διαδικασία αυτή κάθε 20'' χρησιμοποιώντας κάθε φορά μια καινούργια θέση του πιάτου, μέχρι να μην εμφανίζεται πλέον μπλε χρώμα και το διάλυμα I₂KI να παραμένει κίτρινο-καφέ (πράγμα που δείχνει ότι η αποικοδόμηση του αμύλου έχει ολοκληρωθεί).
- Επαναλάβετε τα βήματα α) έως γ) και για τις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις (σωλήνες E3 έως E1) με τη διαφορά ότι η προσθήκη των σταγόνων θα γίνεται κάθε 10'' για τις συγκεντρώσεις αυτές (γιατί;).
- Για την αναφορά σας συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα και γράψτε τα συμπεράσματά σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Χρόνος αποικοδόμησης του αμύλου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αμυλάσης

# σωλήνα	% αμυλάση	Χρόνος αποικοδόμησης αμύλου (sec)
E1	0,25	
E2	0,125	
E3	0,063	
E4	0,031	

B. Επίδραση του pH στην ενεργότητα της αμυλάσης

Το pH είναι ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου. Κάθε ένζυμο έχει ένα βέλτιστο pH στο οποίο φτάνει στο μέγιστο της δράσης του. Στο πείραμα αυτό θα προσδιορίσετε το βέλτιστο pH για την ενεργότητα της αμυλάσης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα ίδια με την παραπάνω άσκηση και επιπλέον:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M κιτρικό, pH=4
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M δις-όξινο φωσφορικό νάτριο, pH=7
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M ανθρακικό νάτριο, pH=10

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αριθμήστε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες 4, 7 και 10.
- Με ένα σιφόνιο των 5ml, προσθέστε 5ml από το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέστε 1,5ml διαλύματος αμυλάσης σε κάθε σωλήνα και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.

- Βάλτε από 2-3 σταγόνες διαλύματος I_2KI στις θήκες του πιάτου καλλιέργειας.

Αρχίζοντας από το σωλήνα pH 4:

α) Προσθέστε 2,5ml από το διάλυμα αμύλου 1% στο σωλήνα pH 4 και ανακατέψτε όπως προηγουμένως. Αυτή είναι η χρονική στιγμή μηδέν ($t=0$). **Μην ξεχνάτε ότι από τη στιγμή που το ένζυμο και το υπόστρωμα έρχονται σε επαφή, αρχίζει η αντίδραση!**

β) Μόλις περάσουν 30'' προσθέστε 2 σταγόνες από το διάλυμα αντίδρασης στο διάλυμα I_2KI στην πρώτη θέση του πιάτου καλλιέργειας.

γ) Επαναλάβετε τη διαδικασία αυτή κάθε 30'', χρησιμοποιώντας κάθε φορά μια καινούργια θέση στο πιάτο καλλιέργειας μέχρι το χρώμα του διαλύματος I_2KI να παραμένει κίτρινο-καφέ (αυτή είναι ένδειξη ότι όλο το άμυλο έχει αποικοδομηθεί).

- Επαναλάβετε τα βήματα (α) ως (γ) και για τα pH 7 και 10. Στο pH=7 η προσθήκη σταγόνες από το μείγμα αντίδρασης στον πιάτο καλλιέργειας πρέπει να γίνεται κάθε 10'', (γιατί;).

- Για την αναφορά σας συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα και γράψτε τα συμπεράσματά σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Χρόνος αποικοδόμησης του αμύλου σε διαφορετικά pH για το ένζυμο αμυλάση

pH	Χρόνος αποικοδόμησης αμύλου (sec)
4	

7	
10	

Γ. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της αμυλάσης

Η ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, κυρίως επειδή τα μόρια κινούνται πιο γρήγορα στις συνθήκες αυτές. Αντίστοιχα, τα μόρια του υποστρώματος θα συγκρούονται με μεγαλύτερη συχνότητα με τα ενεργά κέντρα του ενζύμου. Γενικά, αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10° C έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό ή τριπλασιασμό της ταχύτητας μιας συγκεκριμένης αντίδρασης. Όμως δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι σε υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφεται η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή μετουσίωσή τους. Επειδή η ενεργότητα των ενζύμων είναι άμεσα εξαρτώμενη από την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους είναι προφανές ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει από ένζυμο σε ένζυμο ανάλογα με τη δομή τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα ίδια με την πρώτη άσκηση και επιπλέον:

- Υδατόλουτρο στους 37° C
- Υδατόλουτρο στους 80° C
- Παγόλουτρο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αριθμήστε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες από 1 έως 4.
- Με ένα σιφόνιο των 5ml, προσθέστε 2ml από το διάλυμα αμύλου 1% σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέστε 4ml απιονισμένο νερό σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέστε 1ml ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 σε κάθε σωλήνα και ανακατέψτε όπως προηγουμένως.
- Τοποθετήστε τους σωλήνες ως εξής:
 - Σωλήνας 1:** Υδατόλουτρο 80° C
 - Σωλήνας 2:** Υδατόλουτρο 37° C
 - Σωλήνας 3:** Θερμοκρασία δωματίου
 - Σωλήνας 4:** Παγόλουτρο (4° C)

- Αριθμήστε 4 επιπλέον δοκιμαστικούς σωλήνες από 1A έως 4A.
- Με μια πιπέτα του 1ml, προσθέστε 1ml από το διάλυμα αμυλάσης σε κάθε σωλήνα και τοποθετήστε τους ως εξής:

Σωλήνας 1A: Υδατόλουτρο 80° C

Σωλήνας 2A: Υδατόλουτρο 37° C

Σωλήνας 3A: Θερμοκρασία δωματίου

Σωλήνας 4A: Παγόλουτρο (4° C)

- Επωάστε και τους 8 σωλήνες στις παραπάνω συνθήκες τουλάχιστον για 10 λεπτά. Θα πρέπει να έχετε ένα σωλήνα με αμυλάση και ένα με άμυλο σε κάθε θερμοκρασία.
- Τοποθετήστε 2-3 σταγόνες διαλύματος I₂KI σε κάθε θέση του πιάτου καλλιέργειας.
- Χωρίς να απομακρύνετε τους υπόλοιπους σωλήνες από τις θέσεις τους, ανακατέψτε το περιεχόμενο του σωλήνα 3 με αυτό του σωλήνα 3A (αυτή είναι η χρονική στιγμή t=0) και μετά από 10'' προσθέστε 2 σταγόνες από το μίγμα αντίδρασης στην πρώτη θέση του πιάτου καλλιέργειας. **Να θυμάστε ότι από τη στιγμή που το ένζυμο και το υπόστρωμα έρχονται σε επαφή η αντίδραση ξεκινάει!**
- Συνεχίστε να προσθέτετε σταγόνες από το μίγμα αυτό κάθε 10'' κάθε φορά σε καινούργια θέση του πιάτου μέχρι που να μην είναι ορατό το μπλε χρώμα και το διάλυμα του I₂KI να παραμένει κίτρινο-καφέ.
- Επαναλάβετε τα δύο προηγούμενα στάδια για όλες τις συνθήκες θερμοκρασίας. Για τις ακραίες συνθήκες προσθέστε σταγόνες από το μίγμα αντίδρασης στο πιάτο καλλιέργειας κάθε 30''. Εάν μετά από 5' αντίδρασης το χρώμα του διαλύματος στο πιάτο παραμένει σταθερό, σταματήστε τις δοκιμές στις συγκεκριμένες συνθήκες.
- Για την αναφορά σας συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα και γράψτε τα συμπεράσματά σας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Χρόνος αποικοδόμησης του αμύλου σε διαφορετικές θερμοκρασίες για το ένζυμο αμυλάση

# σωλήνα	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος αποικοδόμησης του αμύλου (sec)
1	80°	
2	37°	
3	22°	
4	4°	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

R. F. Boyer, **Modern Experimental Biochemistry**, Addison-Wesley, 1993.

M. Campbell, **Biochemistry**, Saunders college Publishing, 1998.

R. L. Dreyer and G. F. Lata, **Experimental biochemistry**, Oxford University Press, 1989.

R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp.142-173. An introduction to enzyme and kinetics.

L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 181-204. Introduction to enzymes and kinetics

C. Matthews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 360-413. Introduction to enzyme kinetics.

D. Voet, J. Voet, **Biochemistry**, 2nd ed. (1995), John Wiley & Sons (New York), pp.332-410. An Introduction to enzymes.