

Άσκηση 4

Ένζυμα

4. 1 Σκοπός της άσκησης
4. 2 Εισαγωγή-Θεωρητικό Μέρος
 4. 2. 1 Γενικά περί ενζύμων
 4. 2. 2 Εξειδίκευση των ενζύμων
 4. 2. 3 Κατάταξη των ενζύμων
 4. 2. 4 Ενεργό κέντρο των ενζύμων
 4. 2. 5 Ρύθμιση της δράσης των ενζύμων
 4. 2. 6 Ποσοτικός προσδιορισμός ενζύμων – Δραστικότητα ενζύμων
 4. 2. 7 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων
 4. 2. 7. 1 Μαθηματική παραγωγή της εξίσωσης Michaelis-Menten
 4. 2. 7. 2 Ποιές είναι οι υποθέσεις και παραδοχές που έγιναν για την παραγωγή της εξίσωσης των Michaelis-Menten
 4. 2. 7. 3 Ποιά είναι η φυσική σημασία των σταθερών K_m και V_{max}
 4. 2. 7. 4 Μορφές γραφικής παράστασης της εξίσωσης των Michaelis-Menten
 4. 2. 7. 4. 1 Διάγραμμα Lineweaver-Burk
 4. 2. 7. 4. 2 Διάγραμμα Hanes
 4. 2. 7. 4. 3 Διάγραμμα Hofstee
 4. 2. 7. 5 Γιατί χρησιμοποιούμε διαφορετικές μαθηματικές μεθόδους υπολογισμού των V_{max} και K_m
 4. 2. 7. 6 Τύποι ενζυμικής αναστολής
 4. 2. 7. 6. 1 Μη αντιστρεπτή
 4. 2. 7. 6. 2 Αντιστρεπτή
 4. 2. 7. 6. 2. 1 Συναγωνιστική αναστολή (competitive)
 4. 2. 7. 6. 2. 2 Μη συναγωνιστική αναστολή (no competitive)

- 4. 2. 7. 6. 3. Ασυναγώνιστη αναστολή (un competitive)
- 4. 2. 7. 7 Επίδραση του pH στην ταχύτητα
- 4. 2. 7. 8 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα
- 4. 2. 7. 9 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

4. 2 Εισαγωγή-Θεωρητικό Μέρος

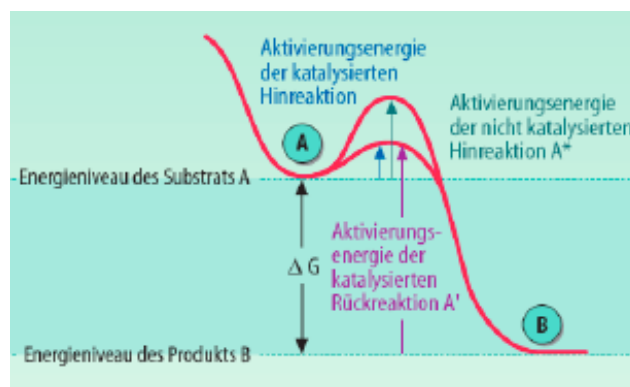
4. 2. 1 Γενικά περί ενζύμων

Τα ένζυμα είναι οι καταλύτες της ζωής γιαυτό και ονομάζονται βιοκαταλύτες. Τα ένζυμα είναι κυρίως πρωτεΐνες και όπως όλες οι λειτουργικές πρωτεΐνες, δεσμεύουν εκλεκτικά ορισμένα μόρια τα οποία στην περίπτωση των ενζύμων ονομάζονται υποστρώματα (substrates). Ο ρόλος των ενζύμων είναι η κατάλυση της χημικής τροποποίησης των υποστρωμάτων τους.

Οι βιολογικές αντιδράσεις καταλύονται από τα ένζυμα τα οποία είναι κυρίως πρωτεΐνες (τελευταία ανακαλύφθηκαν μόρια RNA με ενζυμικές ιδιότητες, τα ριβοένζυμα, ribozymes) που παρουσιάζουν δράση και ιδιότητες παρόμοιες με τις ιδιότητες των ενζύμων.

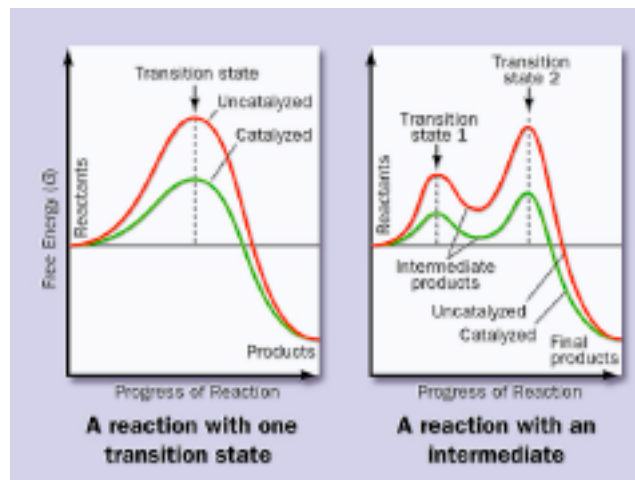
Όσον αφορά τη δομή, τις ιδιότητες και τις μεθόδους καθαρισμού των ενζύμων ισχύουν όλα όσα αναφέρθηκαν για τις πρωτεΐνες (άσκηση 3) μια και τα ένζυμα, όπως αναφέρθηκε, είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών.

Ο τρόπος δράσης των ενζύμων είναι παρόμοιος με αυτόν των ανόργανων καταλυτών. Έτσι, τα ένζυμα χωρίς να μετατοπίζουν τη θέση της χημικής ισορροπίας, αυξάνουν την ταχύτητα των αντιδράσεων τις οποίες καταλύουν, Εικόνα 4. 1.



Εικόνα 4. 1

Αυτό επιτυγχάνεται με την ελάττωση της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται για τη μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα της αντίδρασης. Ωστόσο τα ένζυμα παρουσιάζουν σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με τους ανόργανους καταλύτες, η κυριότερη των οποίων είναι η μεγάλη τους εξειδίκευση.



Εικόνα 4. 2

Ενζυμικές αντιδράσεις παρουσία και απουσία ενζύμου με μία ή δύο μεταβατικές καταστάσεις

4. 2. 2 Εξειδίκευση των ενζύμων

Την εξειδίκευση των ενζύμων μπορούμε να την διακρίνουμε σε απόλυτη, υψηλή και χαμηλή.

- Ένζυμα με απόλυτη εξειδίκευση είναι εκείνα που δρουν αποκλειστικά σε ένα μόνο υπόστρωμα (π.χ. η ουρεάση που υδρολύει μόνο την ουρία).
- Ένζυμα με υψηλή εξειδίκευση καταλύουν τη μετατροπή ενός πολύ περιορισμένου αριθμού υποστρωμάτων.
- Ένζυμα με χαμηλή εξειδίκευση (π.χ. ορισμένες φωσφατάσες, εστεράσες κλπ.) μπορούν να καταλύσουν μια σειρά από παρόμοιες αντιδράσεις.

Αξιοσημείωτη είναι και η στερεοεξειδίκευση που παρουσιάζουν ορισμένα ένζυμα, καταλύοντας π.χ. τη μετατροπή μιας από τις δυο ισομερείς μορφές του ίδιου υποστρώματος, ή αντίστοιχα παράγοντας μόνο τη μια από τις δυο πιθανές ισομερείς μορφές του προϊόντος.

4. 2. 3 Κατάταξη των ενζύμων

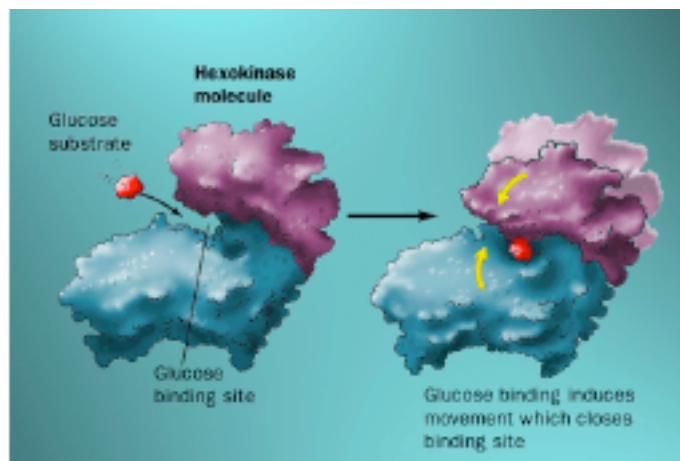
Τα ένζυμα ανάλογα με τη φύση των αντιδράσεων που καταλύουν κατατάσσονται σε έξι μεγάλες κατηγορίες κάθε μια από τις οποίες χωρίζεται σε μικρότερες υποκατηγορίες. Οι κύριες κατηγορίες είναι:

- Οξειδοαναγωγάσες: καταλύουν την οξείδωση ή αναγωγή του υποστρώματος.
- Τρανσφεράσες: καταλύουν τη μεταφορά ομάδων από μια χημική ένωση σε άλλη.
- Υδρολάσες: καταλύουν την υδρόλυση του υποστρώματος.
- Λυάσες: καταλύουν τη μη υδρολυτική αφαίρεση ομάδων με δημιουργία διπλού, ή την προσθήκη ομάδων σε διπλό δεσμό.
- Ισομεράσες: καταλύουν ενδομοριακές μεταθέσεις μέσα στο μόριο.
- Λιγάσες: καταλύουν το σχηματισμό χημικών δεσμών με ταυτόχρονη διάσπαση ATP.

4. 2. 4 Ενεργό κέντρο των ενζύμων

Η αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος δεν γίνεται σε τυχαίες περιοχές του ενζύμου αλλά σε συγκεκριμένη περιοχή, η οποία στα περισσότερα ένζυμα έχει τη μορφή ρωγμής ή σχισμής, που σχηματίζεται από τις αναδιπλώσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η περιοχή αυτή ονομάζεται ενεργό κέντρο (καταλυτικό κέντρο) του ενζύμου. Ο ρόλος του ενεργού κέντρου είναι να αναγνωρίζει το υπόστρωμα, να το προσανατολίζει στην κατάλληλη θέση σε σχέση με το ένζυμο και να του προσδίδει την κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση.

Η περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο λέγεται καταλυτική περιοχή. Όταν πρόκειται για ένζυμο με περισσότερες από μια υπομονάδες, τότε αυτή που περιέχει, το καταλυτικό κέντρο, λέγεται καταλυτική υπομονάδα. Αντίστοιχα διακρίνουμε τις ρυθμιστικές περιοχές και τις ρυθμιστικές υπομονάδες, που χαρακτηρίζουν τα τμήματα του ενζύμου που δεν συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση αλλά συντελούν στη διαμόρφωση της δομής και στη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου.



Εικόνα 4. 3

Σχηματική παρουσίαση του ενεργού κέντρου της εξοκινάσης της γλυκόζη και η αλλαγή της δομής του ενζύμου μετά την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα

4. 2. 5 Ρύθμιση της δράσης των ενζύμων

Η δράση των ενζύμων ρυθμίζεται είτε με ομοιοπολικές τροποποιήσεις της δομής τους, είτε με αλληλεπίδραση με διάφορες ενώσεις (αναστολείς ή ενεργοποιητές).

Οι κυριότερες αντιστρεπτές ομοιοπολικές τροποποιήσεις της δομής ενός ενζύμου οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή ανενεργοποίηση (αναστολή) της δράσης του είναι:

- φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση
- αδενυλιλίωση-αποαδενυλιλίωση
- ουριδυλιλίωση-αποουριδυλιλίωση
- ακετυλίωση-αποακετυλίωση
- μεθυλίωση-απομεθυλίωση

Μη αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση γίνεται με την περιορισμένη πρωτεόλυση. Ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων συντίθεται στα μεγαλύτερα και αδρανή ή ελάχιστα δραστικά πρόδρομα μόρια. Η ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων γίνεται με την απόσπαση ενός ή λίγων πεπτιδίων από την πολυπεπτιδική αλυσίδα, που επιτυγχάνεται με περιορισμένη πρωτεόλυση.

Αναστολείς (ή παρεμποδιστές) ονομάζονται οι ουσίες εκείνες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων. Διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς αναστολείς.

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς διακρίνονται σε

- συναγωνιστικούς (οι οποίοι δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και συναγωνίζονται με το υπόστρωμα) και
- σε μη συναγωνιστικούς (δεσμεύονται σε διαφορετική περιοχή από αυτή του ενεργού κέντρου).

Μια ειδική περίπτωση αντιστρεπτής συναγωνιστικής αναστολής είναι και εκείνη που τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Το φαινόμενο αυτό καλείται ανάδραση (feedback inhibition).

Ενεργοποιητές ονομάζονται οι ουσίες που αυξάνουν τη δράση των ενζύμων είτε μετατρέποντας τη στερεοδιάταξη του ενζύμου στην ενεργό μορφή, είτε ενωμένες αντιστρεπτά με το ένζυμο (ή το υπόστρωμα) συμβάλλοντας στη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιούν για τη δράση τους μικρού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις, που ονομάζονται συνένζυμα.

Τα **συνένζυμα** που είναι απαραίτητα για την εμφάνιση της ενζυμικής δράσης των συγκεκριμένων ενζύμων, δεσμεύονται αντιστρεπτά στο ένζυμο (αποένζυμο) σχηματίζοντας το σύμπλοκο ενζύμου-συνενζύμου (ολοένζυμο). Μερικά από τα συνηθισμένα συνένζυμα είναι

- νικοτιναμιδοαδενινοδινουκλεοτίδιο (NAD)
- φλαβινοαδενινοδινουκλεοτίδιο
- το ακετυλοσυνένζυμο (CoA)
- ATP
- φωσφορική πυριδοξάλη κλπ.

4. 2. 6 Ποσοτικός προσδιορισμός ενζύμων – Δραστικότητα ενζύμων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός ενζύμου δεν γίνεται με βάση τη φύση του (πρωτεϊνική) και αυτό γιατί σε ένα ενζυμικό παρασκεύασμα συνυπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που δεν είναι ένζυμα, ή ακόμη και άλλα ένζυμα με διαφορετική καταλυτική δράση, αλλά με βάση τη δραστικότητά του.

Η **δραστικότητα** (ή **ενεργότητα**) ενός ενζύμου εκφράζεται συνήθως με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο. Ως ταχύτητα, ορίζεται η ποσότητα του υποστρώματος που μετατρέπεται στη μονάδα του χρόνου.

Ποσοτικά η δραστικότητα ενός ενζύμου εκφράζεται με τους εξής όρους:

- Μονάδα ενζυμικής δράσης ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που μετατρέπει 1mole υποστρώματος σε 1 sec και λέγεται διεθνώς katal ή kat (1katal = 1mole/sec).
- Παλαιότερα ως μονάδα ενζυμικής δράσης χρησιμοποιούσαν το Unit που ορίζεται σαν το ποσό 1mmol/min, ισχύει δε 1Unit = 16,67nkat.
- Ειδική ενεργότητα ενός ενζύμου ορίζεται ο λόγος Unit/mg πρωτεΐνης ή katal/mg πρωτεΐνης.

Οι πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού της δραστικότητας των ενζύμων βασίζονται στη μέτρηση είτε της κατανάλωσης του αντιδρόντος, είτε της εμφάνισης του προϊόντος της αντίδρασης και μπορεί να είναι:

- φασματοφωτομετρικές
- πεχαμετρικές
- πολωσιμετρικές
- χημικές
- μανομετρικές
- χρωματογραφικές
- ισοτοπικές.

Σε ένα συνηθισμένο προσδιορισμό της δραστικότητας ενός ενζύμου (assay), το ένζυμο επωάζεται με το υπόστρωμα σε μια ορισμένη θερμοκρασία και σε ένα ορισμένο pH. Μαζί με το assay γίνονται δυο πειράματα ελέγχου (controls).

Στο ένα πείραμα ελέγχου δε βάζουμε καθόλου ένζυμο και στο δεύτερο βάζουμε ένζυμο μετουσιωμένο. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να είμαστε βέβαιοι ότι το αποτέλεσμα που παρατηρούμε οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου και όχι σε κάποια άλλη χημική αντίδραση.

4. 2. 7 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες. Οι παραγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι:

- συγκέντρωση υποστρώματος [S]
- συγκέντρωση ενζύμου [E]
- pH διαλύματος
- θερμοκρασία

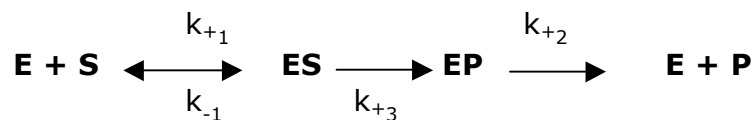
- σύσταση του διαλύτη
- πίεση

Προκειμένου να μελετηθεί πειραματικά η επίδραση κάθε ενός από τους παραπάνω παράγοντες, διατηρούνται σταθεροί όλοι οι υπόλοιποι και μεταβάλλεται μόνο ο υπο εξέταση παράγων. Έτσι, π.χ. για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της αντίδρασης, οι πειραματικές συνθήκες είναι τέτοιες ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του ενζύμου.

Σε μια ενζυμική αντίδραση διακρίνονται τα ακόλουθα στάδια τα οποία δεν είναι πάντα εύκολο να τα διακρίνουμε, αλλά παραδεχόμαστε την ύπαρξή τους για λόγους θεωρητικούς και υπολογιστικούς.

- Σύνδεση του ενζύμου [E] με το υπόστρωμα [S] και σχηματισμός ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος [ES].
- Ενδομοριακή ανακατάταξη (χημική αντίδραση) του συμπλόκου [ES] που οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου: ενζύμου-υποστρώματος: [EP].
- Διάσπαση του συμπλόκου [EP] πρὸς ένζυμο και προϊόν [P]

Η γενική αντίδραση που περιγράφει τη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και τη διάσπαση του στα προϊόντα είναι



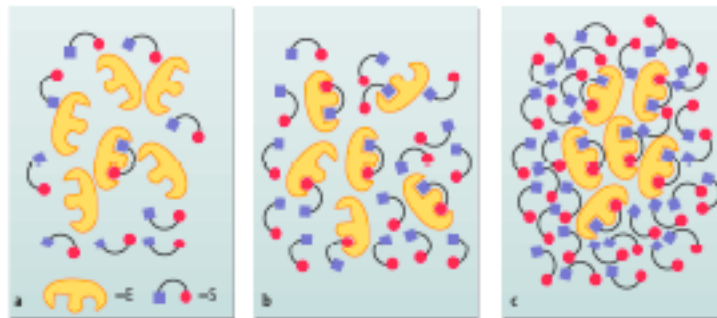
όπου

E: ένζυμο, S: υπόστρωμα, P: προϊόν, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , k_{+3} οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων.

Η κινητική μιας καταλυτικής (μη ενζυμικής) αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή η σχέση ταχύτητας αντίδρασης u και της συγκέντρωσης του υποστρώματος [S] είναι γραμμική $u=f(S)$

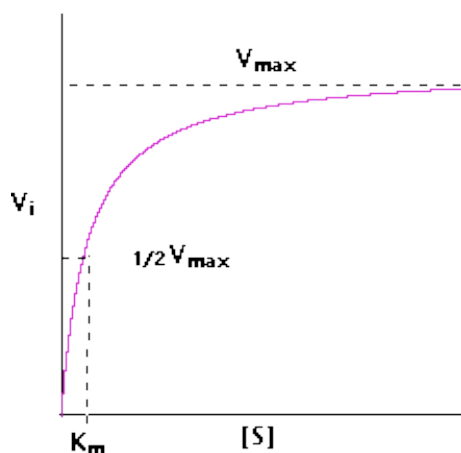
Αντίθετα σε μια ενζυμική αντίδραση, η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος και του ενζύμου, μέχρι μια τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S_x]$ για μια δεδομένη συγκέντρωση του ενζύμου [E]. Μετά την τιμή αυτή $[S_x]$ η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι ανεξάρτητος της [S] και εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου. Η τιμή αυτή $[S_x]$ είναι η ποσότητα του S που έχει κορέσει όλο το ένζυμο. Από το σημείο αυτό η συνάρτηση $u=f[S]$ ακολουθεί κινητική κορεσμού, όπως διαγραμματικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. 4. Δηλαδή οι τιμές της u είναι σχεδόν σταθερές και

παράλληλες προς τον άξονα της συγκέντρωσης. Η τιμή αυτή τείνει προς μια μέγιστη τιμή που λέγεται V_{max} .



Εικόνα 4. 4

Το παραπάνω διάγραμμα συνοψίζει την κινητική κορεσμού των ενζυμικών αντιδράσεων σε τρεις φάσεις: (α) χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος S, (β) μεσαία συγκέντρωση υποστρώματος S, κοντά στον κορεσμό και (γ) υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος S, όπου όλα τα καταλυτικά κέντρα του ενζύμου είναι κατειλημένα από το υπόστρωμα και υπάρχει επίσης ελεύθερο υπόστρωμα, δηλαδή κατάσταση υπερκορεσμού.



Εικόνα 4. 5

Εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση υποστρώματος (σε περίπτωση σταθερής συγκέντρωσης ενζύμου).

- V_i = initial velocity (moles/time)
- $[S]$ = substrate concentration (molar)
- V_{max} = maximum velocity
- K_m = substrate concentration when V_i is one-half V_{max}
(Michaelis-Menton constant)

Η εικόνα 4. 5 παρουσιάζει τη μεταβολή της ταχύτητας (**u**) συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος [**S**].

Η μορφή αυτής της καμπύλης για τις ενζυμικές αντιδράσεις μελετήθηκε και αποδόθηκε με μαθηματικό τρόπο από τους Michaelis-Menten το 1913. Η μαθηματική απόδοση της ενζυμικής κινητικής βασίζεται στην υπόθεση ότι υπάρχει κάποιο σχηματιζόμενο ενδιάμεσο σύμπλοκο το [ES].

Η εξίσωση (β) είναι η γνωστή εξίσωση των Michaelis-Menten

$$u/V_{\max} = [S]/K_m + [S] \quad (\beta)$$

όπου:

u = ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

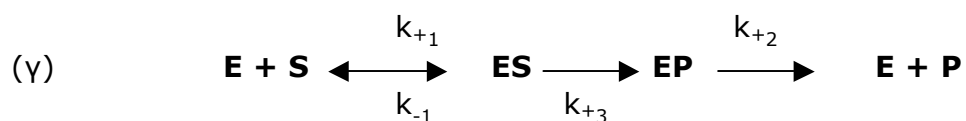
V_{max} = η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγάλη

[S] = η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_m = σταθερά Michaelis-Menten

4. 2. 7. 1 Μαθηματική παραγωγή της εξίσωσης Michaelis-Menten

Υπόθεση: Έστω ένα ένζυμο E αντιδρά με ένα υπόστρωμα S και δημιουργείται το σύμπλοκο ES το οποίο διασπάται σε E και προϊόν P, η ενδιάμεση αντίδραση ES→EP δεν λαμβάνεται, υπόψην όπως αναφέρεται στις παραδοχές που έγιναν για την παραγωγή της εξίσωσης, διότι η k₊₃ είναι πολύ μεγάλη, οπότε δεν ρυθμίζει την κινητική.



όπου k₊₁, k₋₁, k₊₂ και k₊₃: οι σταθερές ταχύτητας

Η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES είναι:

$$(δ) \quad K_S = [E] [S] / [ES]$$

Η ποσότητα του συνολικού ενζύμου E_t ισούται με το άθροισμα του ποσού του ελεύθερου E και του ποσού του ενζύμου υπό τη μορφή του συμπλόκου ES δηλαδή:

$$(ε) \quad [E_t] = [E] + [ES]$$

Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] διότι η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου [ES] είναι πολύ πιο μεγάλη από την ταχύτητα διάσπασής του σε E και P.

$$(στ) \quad u = d[P]/dt = k_{+2}[ES]$$

Όταν όλο το ένζυμο βρίσκεται σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα [ES] τότε η $u=V_{max}$ και συνεπώς $u = k_{+2}[E_t]$.

Από την εξίσωση (δ) έχουμε:

$$(ζ) \quad [ES] = [E] [S] / K_s$$

Από την εξίσωση (ε) έχουμε

$$(η) \quad [E] = [E_t] - [ES]$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (στ), (ζ) και (η) έχουμε:

$$u = k_{+2}[E_t] [S] / [S] + K_s \quad (\theta) \quad k_{+2}[E_t] = V_{max} \quad (ι)$$

$$u/V_{max} = [S] / [S] + K_s \quad (κ)$$

Η εξίσωση προκύπτει ως εξής:

Η εξίσωση (στ) $u = k_{+2}[ES]$ διαιρείται δια $[E_t]$ οπότε

$$u/[E_t] = k_{+2}[ES]/[E_t],$$

αντικατάσταση $[E_t]$, βάσει της (ε), στο δεύτερο βάσει της (ε), στο δεύτερο σκέλος έχουμε:

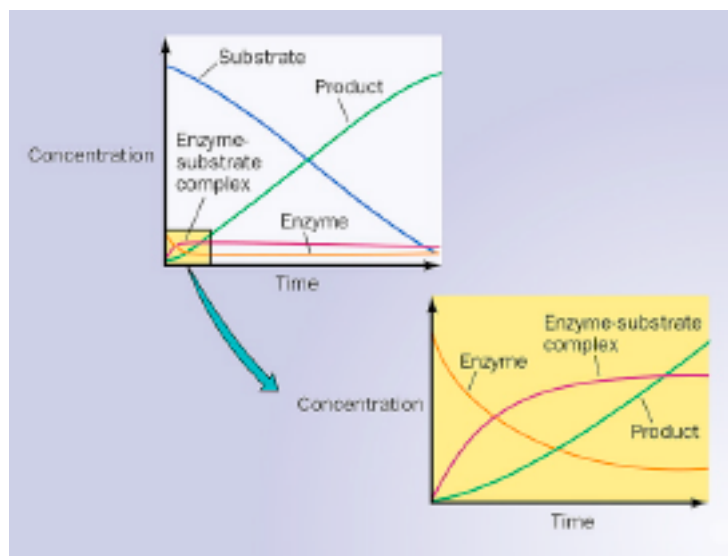
$u/[E_t] = k_{+2} [ES]/[E] + [ES]$ με περαιτέρω αντικατάσταση $[ES]$ με

$[E] [S] / K_s$ βάσει της (ζ) έχουμε:

$$\frac{u}{[E_t]} = \frac{k_{+2}[E] [S] / K_s}{[E] + [E][S]/K_s} \longrightarrow \frac{u}{k_{+2} [E_t]} = \frac{[S] / K_s}{1 + [S] / K_s} \longrightarrow$$

$$\frac{u}{V_{max}} = \frac{[S] / K_s}{1 + [S] / K_s} \longrightarrow \frac{u}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Εάν παρακολουθήσουμε τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των S, P και του ενζύμου E και του συμπλόκου ES με την εξέλιξη της αντίδρασης (χρόνος) θα παραχθεί η παρακάτω γραφική παράσταση:



Εικόνα 4. 6

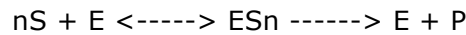
Μακροσκοπική εικόνα της εξέλιξης μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η μεγέθυνση του διαγράμματος κοντά στην αρχή του διαγράμματος, αφορά την αρχική κατάσταση της αντίδρασης όπου υπάρχει γραμμικότητα μεταξύ ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης και συγκέντρωσης υποστρώματος.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Εικόνα 4. 6) διαπιστώνουμε ότι οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των [E] και [ES] συγκρινόμενες με τις μεταβολές του υποστρώματος και του προϊόντος είναι πολύ μικρές. Μετά απο κάποιο χρονικό διάστημα που είναι πολύ μικρό, η μεταβολή $d[ES]/dt=0$.

Στο σημείο αυτό έχει αποκατασταθεί μια δυναμική ισορροπία (steady state) μεταξύ του ποσού του συμπλόκου που σχηματίζεται και του ποσού που στη συνέχεια διασπάται προς ένζυμο και προϊόν της αντίδρασης [P]:

$$d[ES]/dt = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] = 0$$

Το υπόστρωμα δεσμεύεται σε ένα μόνο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Εάν δεν συμβαίνει αυτό και το S συνδέεται σε n μέρη του ενζύμου, τότε η αντίδραση γίνεται:



και η ταχύτητα της αντίδρασης θα ορίζεται ως:

$$u / V_{\max} = [S]^n / [S]^n + K_m$$

και θα παίρνει τη τιμή $V_{\max}/2$ όταν $[S] = K_m^{1/n}$

4. 2. 7. 2 Ποιές είναι οι υποθέσεις και παραδοχές που έγιναν για την παραγωγή της εξίσωσης των Michaelis-Menten

1. Σχηματισμός κάποιου συμπλόκου μεταξύ E και S, του ES. Η υπόθεση αυτή είναι το πλέον σημαντικό σημείο στην θεωρία των Michaelis-Menten.
2. Στην πρώτη ημιαντίδραση $E+S \rightarrow ES$ θεωρείται ότι αποκαθίσταται κάποια ισορροπία μεταξύ συμπλόκου ES και ελεύθερου S. Στη δεύτερη ημιαντίδραση $ES \rightarrow E+P$ γίνεται η παραδοχή ότι το σύμπλοκο διασπάται γρήγορα σε E και P.
3. Η πρώτη ημιαντίδραση είναι σημαντικά γρηγορότερη από τη δεύτερη ημιαντίδραση.
4. Παραβλέπει το συμπλόκο ενζύμου – υποστρώματος EP, δεχόμενοι ότι η k_{+3} είναι πολύ μεγάλη, οπότε η διάσπασή του είναι πολύ γρήγορη.
5. Για τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου $[E_t]$, έγινε η παραδοχή ότι $[E_t]=[E]+[ES]$. Αντίθετα για το υπόστρωμα έγινε η παραδοχή ότι η $[S_t]=[S]$ του ελευθέρου υποστρώματος. Αυτό συμβαίνει διότι $[S_t]$ είναι πολύ μεγάλη, οπότε το υπόστρωμα υπό μορφή $[ES]$ είναι αμελητέο.
6. Μη αντιστρεπτότητα της αντίδρασης. Συνήθως τα ένζυμα καταλύουν την αντίδραση και προς τις δύο κατευθύνσεις, γεγονός που δεν λάβαμε υπόψη μας στην δεύτερη ημιαντίδραση.

4. 2. 7. 3 Ποιά είναι η φυσική σημασία των σταθερών K_m και V_{\max}

1. Το K_m εκφράζει κατά προσέγγιση τα ενδοκυτταρικά επίπεδα συγκέντρωσης του υποστρώματος.
2. Το K_m είναι σταθερό και χαρακτηριστικό για κάθε ένζυμο και το υποστρωμά του κάτω από δεδομένες πειραματικές συνθήκες (pH, θερμοκρασία, πίεση κλπ).

3. Το K_m μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνουμε ένζυμο είτε από διαφορετικούς οργανισμούς, είτε από διαφορετικούς ιστούς του ίδιου οργανισμού.
4. Μετρώντας το K_m μιας ενζυμικής αντίδρασης, μπορούμε να ρυθμίσουμε τη συγκέντρωση του S να είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της τιμής του K_m με σκοπό να προσδιορίσουμε το V_{max} και περαιτέρω τη συγκέντρωση του ενζύμου E , που αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του συνολικού ενζύμου. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το "σχετικά ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό" ενός ενζύμου σε βιολογικά παρασκευάσματα χωρίς να είναι αναγκαίος ο καθαρισμός του.
5. Μελετώντας την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη τιμή του K_m μπορούμε να κατευθύνουμε για την επίδραση αυτών των παραγόντων στο ένζυμο, όπως αναστολή, ενεργοποίηση κλπ.
6. Τέλος το K_m είναι ενδεικτικό για τη σχετική καταλληλότητα ενός ή περισσοτέρων υποστρωμάτων για ένα ένζυμο. Το καλύτερο υπόστρωμα για ένα ένζυμο είναι εκείνο με τη μέγιστη τιμή στη σχέση V_{max}/K_m

4. 2. 7. 4 Μορφές γραφικής παράστασης της εξίσωσης των Michaelis-Menten

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παράστασης της βασικής εξίσωσης των Michaelis-Menten όπως περιγράφεται παρακάτω.

4. 2. 7. 4. 1 Διάγραμμα Lineweaver-Burk

Οι τιμές V_{max} και K_m είναι σταθερές για μια συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση και συμβολίζουν αντίστοιχα τη μέγιστη ταχύτητα και τη συγκέντρωση του υποστρώματος για ταχύτητα ίση με το μισό της μέγιστης (όταν $V=V_{max}/2$ τότε $[S]=K_m$). Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της K_m τόσο πιο μεγάλη είναι η συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα του. Η εξίσωση που εκφράζει την καμπύλη της εικόνας 4. 7 είναι

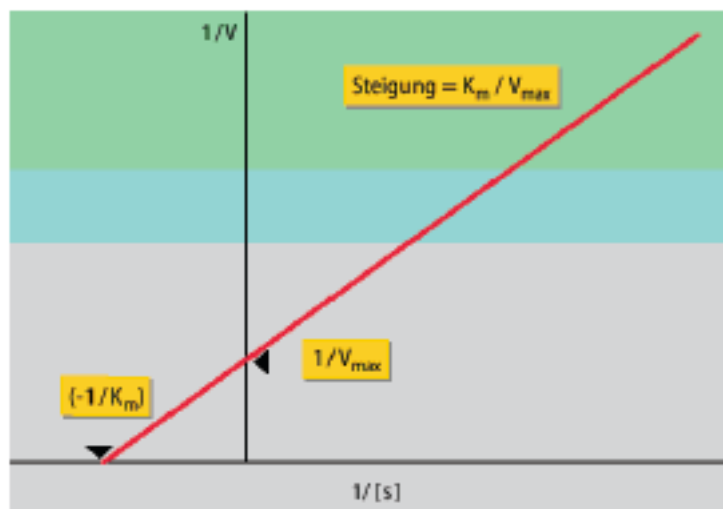
$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

η οποία είναι γνωστή ως εξίσωση **Michaelis-Menten**. Η σταθερά K_m λέγεται και σταθερά Michaelis-Menten.

Επειδή ο γραφικός προσδιορισμός των V_{max} και K_m από το διάγραμμα 4. 4 είναι δύσκολος, οι Lineweaver και Burk πρότειναν την εξίσωση του διπλού-αντιστρόφου

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

Η εξίσωση 2 προκύπτει με αντιστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten. Το διάγραμμα διπλού-αντιστρόφου ή διάγραμμα κατά Lineweaver-Burk φαίνεται στην εικόνα 4. 7. Από ένα τέτοιο διάγραμμα είναι εύκολο να υπολογίσουμε τις V_{\max} και K_m .



Εικόνα 4. 7

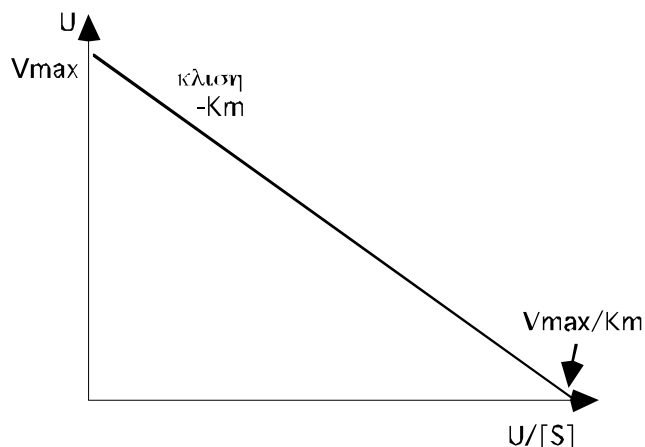
Προσδιορισμός της V_{\max} και K_m από το διάγραμμα κατά Lineweaver και Burk.

4. 2. 7. 4. 2 Διάγραμμα Hofstee

Από την αρχική εξίσωση $1/u = K_m/V_{\max} [S] + 1/V_{\max}$ πολλαπλασιάζοντας με $[S]$ και τα δύο μέλη της εξίσωσης προκύπτει η εξίσωση:

$$[S]/u = [S]/V_{\max} + K_m/V_{\max}$$

εάν πολλαπλασιάσουμε και τα δύο μέλη επί V_{\max} $u/[S]$ προκύπτει η σχέση: $u = -K_m u/[S] + V_{\max}$ η οποία οδηγεί στη γραφική παράσταση του Hofstee.



4. 2. 7. 5 Γιατί χρησιμοποιούμε διαφορετικές μαθηματικές μεθόδους υπολογισμού των V_{max} και K_m

Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αραιές συγκεντρώσεις ενζύμου και υποστρώματος όταν και τα δύο είτε είναι σπάνια είτε κοστίζουν.

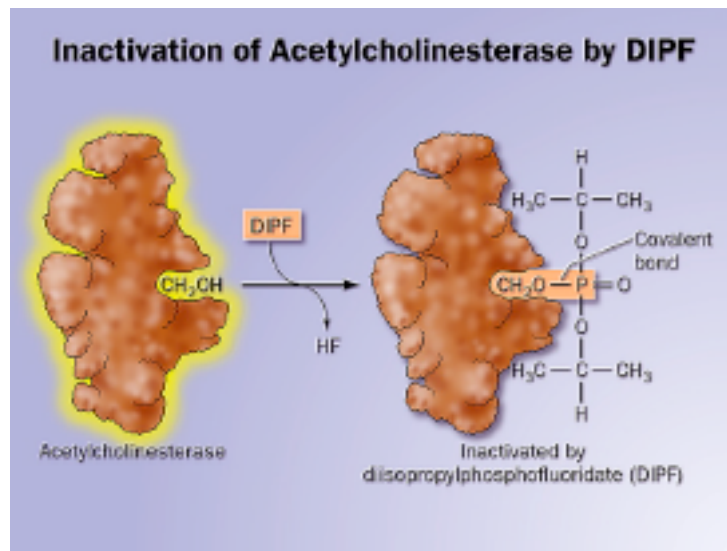
Στην περίπτωση αυτή, η χρήση του διαγράμματος Lineweaver-Burk θα μας δώσει σημαντικά σφάλματα, γεγονός που μπορούμε να το αποφύγουμε χρησιμοποιώντας άλλες μαθηματικές εκφράσεις.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν μια δεδομένη γραφική παράσταση ανάλογα με τα πειραματικά μας δεδομένα μπορούμε να ελαχιστοποιήσουμε τα σφάλματα επεξεργασίας των δεδομένων μας.

4. 2. 7. 6 Τύποι ενζυμικής αναστολής

4. 2. 7. 6. 1 Μη αντιστρεπτή

Ο αναστολέας δένεται ομοιοπολικά με ένα από τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου και το αδρανοποιεί, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 8.



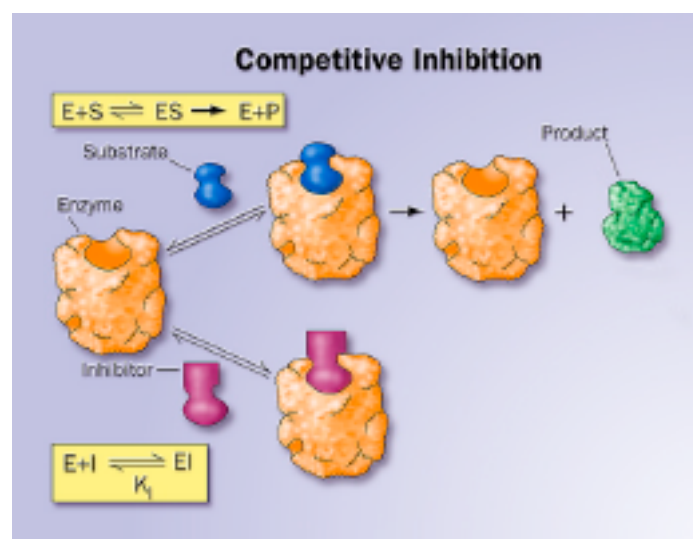
Εικόνα 4. 8

Αδρανοποίηση της ακετυλχολινεστεράσης από Δίισοπροφυλφωσφοφλουορίδιο

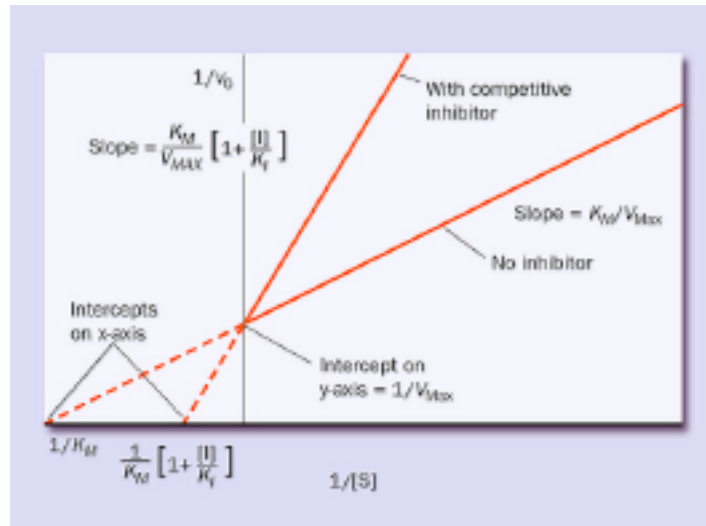
4. 2. 7. 6. 2 Αντιστρεπτή

4. 2. 7. 6. 2. 1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive)

Ο συναγωνιστικός αναστολέας (inhibitor) στη συναγωνιστική αναστολή παρουσιάζει ομοιότητες δομής με το υπόστρωμα και συνδέεται αντιστρεπτά στην ενεργό περιοχή του ενζύμου. Δεν επηρεάζει την V_{max} της αντίδρασης αλλά αυξάνει την K_m όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 10.



Εικόνα 4. 9

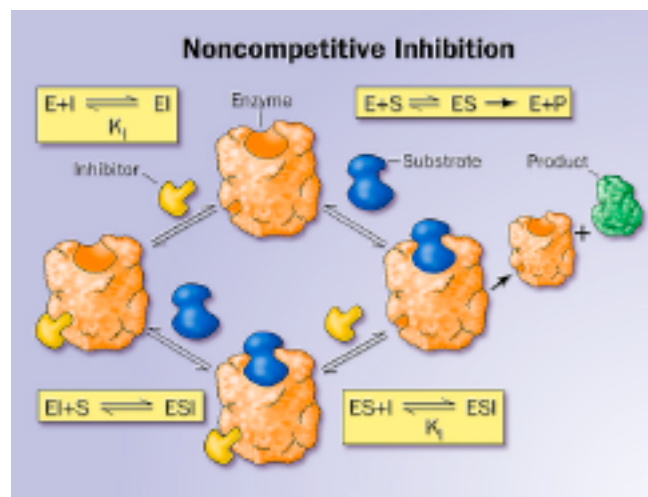


Εικόνα 4. 10

4. 2. 7. 6. 2. 2 Μη συναγωνιστική αναστολή (non competitive inhibition)

Ο αναστολέας δένεται σε διαφορετική θέση στο ένζυμο από ότι το υπόστρωμα. Αύξηση της [S] δεν μπορεί να υπερνικήσει την αναστολή διότι ο αναστολέας ενώνεται με το ένζυμο σε μια διαφορετική περιοχή από ότι το υπόστρωμα όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 11.

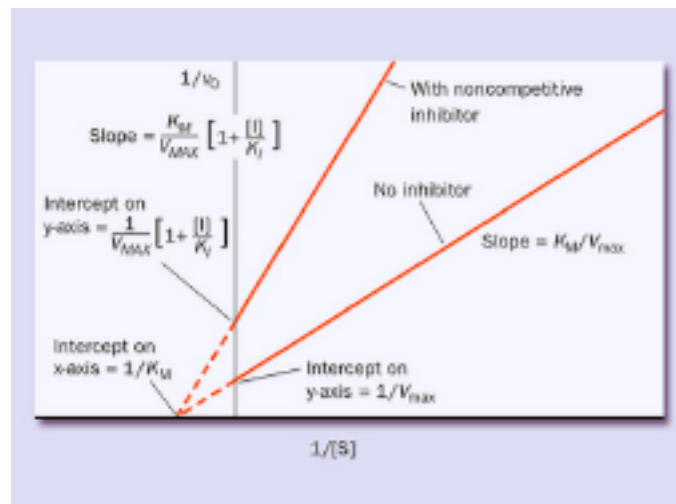
Έτσι ο αναστολέας μπορεί να ενωθεί με το ελεύθερο E καθώς και το ES και μπορεί να δώσει μορφές του ES που δεν διασπώνται σε προϊόν.



Εικόνα 4. 11

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η καταλυτική δράση του ενζύμου είναι κανονική. Η Km που δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου δεν μεταβάλλεται. Η Vmax όμως μειώνεται, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 10.

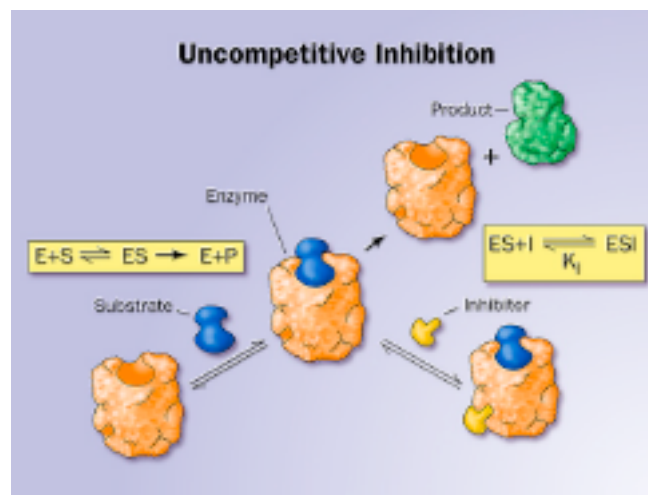
Συνήθως συμβαίνει σε ένζυμα στα οποία η ενζυμική ενεργότητα εξαρτάται από ομάδες που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ενεργότητάς του (πχ. -SH και δέσμευση βαρέων μετάλλων).



Εικόνα 4. 12

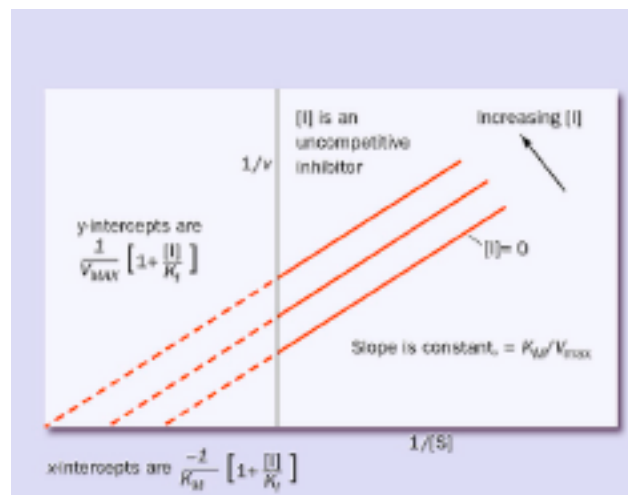
4. 2. 7. 6. 3. Ασυναγώνιστη αναστολή (un competitive)

Είναι σπάνια μορφή αναστολής σε ενζυμική αντίδραση με ένα υπόστρωμα διότι ο αναστολέας συνδέεται αντιστρεπτά μόνο με το σύμπλοκο ES και όχι και με το ελεύθερο ένζυμο όπως συμβαίνει στην μη συναγωνιστική αναστολή, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 13.



Εικόνα 4. 13

Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αναστολέα το V_{max} και η K_m μειώνονται αντίστοιχα, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην παρακάτω εικόνα 4. 14.

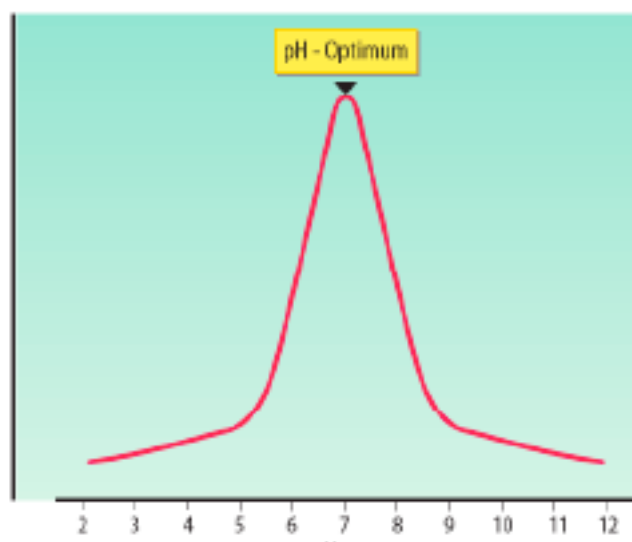


Εικόνα 4. 14

4. 2. 7. 7 Επίδραση του pH στην ταχύτητα

Τα περισσότερα ένζυμα έχουν μια ορισμένη τιμή pH στην οποία παρουσιάζουν το μέγιστο της ενζυμικής τους δράσης. Η βέλτιστη τιμή pH είναι συνήθως μεταξύ 5 και 9.

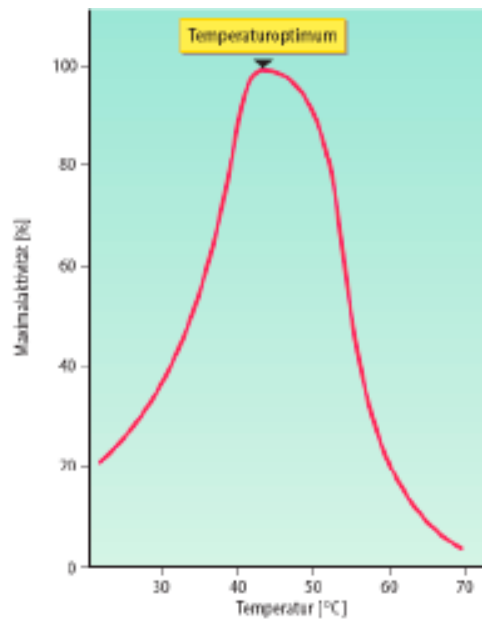
Ακραίες τιμές pH έχουν επιπτώσεις στις ανώτερες δομές των ενζύμων και έτσι επηρεάζουν και τη δραστηρότητά τους. Επομένως η ταχύτητα θα αυξάνεται μέχρι μια ορισμένη τιμή του pH και στη συνέχεια θα ελαττώνεται, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 4. 15.



Εικόνα 4. 15

4. 2. 7. 8 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα

Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μέχρι μια ορισμένη θερμοκρασία. Από εκεί και πέρα η ταχύτητα ελαττώνεται, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 4. 16, γιατί και εδώ θα έχουμε επίδραση της θερμοκρασίας στις ανώτερες δομές του ενζύμου.



Εικόνα 4. 16

4. 2. 7. 9 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

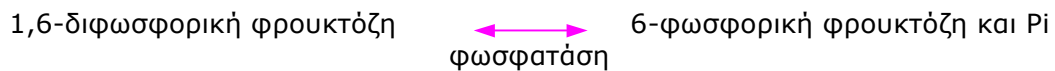
Σε καθαρά ενζυμικά συστήματα, η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Από ένα σημείο και μετά η γραμμικότητα παύει να υφίσταται λόγω της κατανάλωσης του υποστρώματος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

4.3 Γενικά

Οι φωσφατάσες είναι ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Ανήκουν στην 3η κατηγορία ενζύμων (υδρολάσες) και καταλύουν την υδρόλυση φωσφορικών μονοεστέρων απελευθερώνοντας φωσφορικό ιόν (P_i).

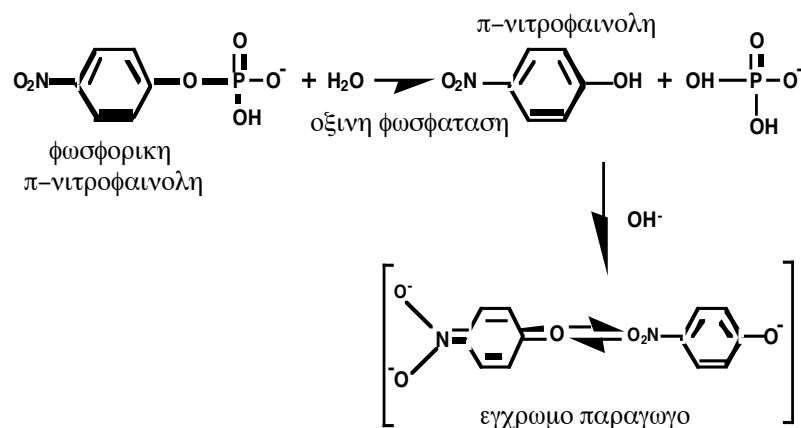
Μερικά από τα ένζυμα αυτά δρουν μόνο σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Στις περιπτώσεις αυτές συνήθως δεν είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο φυσιολογικός τους ρόλος. Για παράδειγμα, η φωσφατάση της δισφωφορικής φρουκτόζης καταλύει μια από τις ενδιάμεσες αντιδράσεις της γλυκονεογένεσης.



Υπάρχουν όμως και φωσφατάσες που δρουν σε ένα συγκεκριμένο φάσμα υποστρωμάτων. Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται σε όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες, ανάλογα με το pH στο οποίο δρουν.

Στις ασκήσεις αυτές θα μελετηθούν οι γενικές κινητικές ιδιότητες της όξινης φωσφατάσης. Σαν πηγή του ενζύμου θα χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα πατάτες και σαν υπόστρωμα η φωσφορική-π-νιτροφαινόλη.

Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται με βάση το βαθμό υδρόλυσης του υποστρώματος, ο δε βαθμός υδρόλυσης προσδιορίζεται φωτομετρικά. Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης, η π-νιτροφαινόλη, σχηματίζει σε αλκαλικό περιβάλλον παράγωγα που έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 405_{nm}.



Πείραμα 1ον

4. 4 Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της π-νιτροφαινόλης

4. 4. 1 Σκοπός πειράματος

Η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της π-νιτροφαινόλης, βάσει της απορρόφησης ακτινοβολίας στα 405_{nm}.

4. 4. 2 Εκτέλεση

Σε 6 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, αναμείξτε τις ποσότητες διαλύματος π-νιτροφαινόλης που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 4. 1, με 0.02 M NaOH μέχρι τελικού όγκου 6ml. Αναδεύσατε καλά τους σωλήνες και μετρήστε την απορρόφηση στα 405_{nm} χρησιμοποιώντας σαν τυφλό για τον μηδενισμό του οργάνου τον σωλήνα που δεν περιέχει π-νιτροφαινόλη.

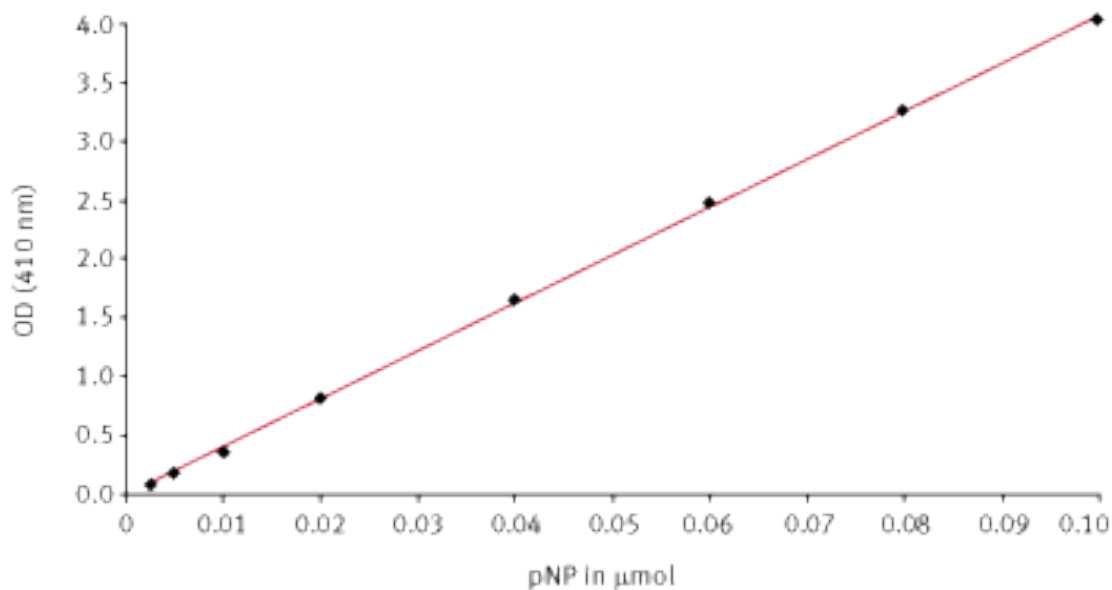
Πίνακας μετρήσεων 4. 1

Αρ. σωλήνα	Όγκος 60mM π-νιτροφαινόλης	Τελικός όγκος στον σωλήνα	Απορρόφηση στα 405 _{nm}
1	0	6 ml	0
2	1 ml	6 ml	
3	2 ml	6 ml	
4	3 ml	6 ml	
5	4 ml	6 ml	
6	5 ml	6 ml	

Αποτελέσματα

Σχεδιάστε το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης της π-νιτροφαινόλης (σε μmoles/ml). Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάσατε θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των κινητικών δεδομένων στα επόμενα πειράματα.

Σημειώσεις-Παρατηρήσεις

**Σχήμα 4. 5**

Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της p-νιτροφαινόλης

Πείραμα 2°

4. 5 Καταλυτική δράση της φωσφατάσης

4. 5. 1 Εκτέλεση

Σε τρεις μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέστε από 1ml απεσταγμένου νερού στον πρώτο, 1ml ενζυμικού παρασκευάσματος στον δεύτερο και 1ml ενζυμικού παρασκευάσματος που προηγουμένως έχει θερμανθεί σε υδατόλουτρο 100°C για 10min στον τρίτο. Στη συνέχεια, προσθέστε στους σωλήνες τα άλλα διαλύματα που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 4. 2. Αφού αναδεύσετε το περιεχόμενο των σωληνών, τοποθετείστε τους για επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για 10min. Κατόπιν **μεταφέρατε** 1ml από κάθε σωλήνα σε τρεις καθαρούς μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθέστε **αμέσως** 3ml 0.1M NaOH. **Το NaOH σταματάει την ενζυμική αντίδραση** διότι αυξάνει το pH στο 12.5 (ισχυρό αλκαλικό) και επιτρέπει τον προσδιορισμό της p-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε.

Πίνακας αντιδράσεων 4. 2

Αριθμός σωλήνα	0.1M κιτρικό ρυθμιστικό pH 4. 5	2. 5mM φωσφορική π- νιτροφαινόλη	Διάλυμα	0.1M NaOH μετά την αντίδραση	Δημιουργία κίτρινου χρώματος
1	2 ml	2 ml	1 ml απεστ. H ₂ O	3 ml	
2	2 ml	2 ml	1 ml ενζυμικό παρασκεύασμα	3 ml	
3	2 ml	2 ml	1 ml θερμανθέντος ενζυμικού παρασκευάσματος	3 ml	

Παρατηρήσεις**Πείραμα 3ον****4. 6 Κινητική της δραστηριότητας της φωσφατάσης συναρτήσει του χρόνου επώασης****4. 6. 1 Σκοπός πειράματος**

Επειδή η ποσότητα των προϊόντων μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τον χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση του ενζύμου, πρέπει, πριν προχωρήσουμε στην κινητική μελέτη της φωσφατάσης, να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση εκείνη του ενζυμικού παρασκευάσματος για την οποία το ποσό της παραγόμενης π-νιτροφαινόλης είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου. Αυτό στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι απαραίτητο και για ένα δεύτερο λόγο, αφού τα παραγόμενα φωσφορικά ανιόντα αναστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης.

4. 6. 2 Εκτέλεση

Σε ένα μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέστε 2ml 0.1M κιτρικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 4. 5, 2ml διαλύματος 2 (5 mM φωσφορικής π-νιτροφαινόλης) και 1ml ενζυμικού παρασκευάσματος. Αμέσως μόλις αναμείξετε

καλά τα συστατικά του σωλήνα, μεταφέρετε 0.5ml από το μίγμα σε ένα μικρό δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει 3ml NaOH 0.1 M για να σταματήσει η αντίδραση και να αναπτυχθεί το υποκίτρινο χρώμα. Το δείγμα αυτό αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 0min. Αμέσως μετά, τοποθετείστε το μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα σε υδατόλουτρο των 37°C για επώαση. Ακριβώς σε 5min, μεταφέρετε άλλο 0.5ml από το μίγμα επώασης σε νέο σωλήνα που περιέχει 3ml NaOH 0.1 M για να σταματήσει η αντίδραση και να αναπτυχθεί το υποκίτρινο χρώμα,. Επαναλάβετε το ίδιο στα 10 min, κ.ο.κ., όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Μετρήστε την απορρόφηση των δειγμάτων στα 405nm χρησιμοποιώντας σαν τυφλό το δείγμα που αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 0.

Εξετάστε εάν το ποσό της π-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται (μμοles) είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου για τη διάρκεια των 30min. Εάν δεν είναι, επαναλάβετε το πείραμα αραιώνοντας περισσότερο το ενζυμικό παρασκεύασμα της φωσφατάσης μέχρις ότου βρείτε την κατάλληλη αραιώση.

Σημείωση: Για τον υπολογισμό των μμοles της π-νιτροφαινόλης που σχηματίσθηκε θυμηθείτε ότι ο όγκος του μίγματος επώασης ήταν 5ml και ότι κάθε φορά μια ποσότητα από το μίγμα αυτό ίση με 0.5ml για να σταματήσει η αντίδραση και να αναπτυχθεί το υποκίτρινο χρώμα, αραιωνόταν μέχρι τελικού όγκου 3.5ml για τη μέτρηση της απορρόφησης.

Πίνακας μετρήσεων 4. 3

Αριθμός σωλήνα	Χρόνος επώασης (min)	Απορρόφηση στα 405nm
1	0	
2	5	
3	10	
4	20	
5	30	

Αποτελέσματα

Πείραμα 4ον

4. 7 Προσδιορισμός του "άριστου pH" δράσης της φωσφατάσης

4. 7. 1 Εκτέλεση

Σε 7 μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέστε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.2 M κιτρικού-αιθυλενοδιαμίνης ως εξής: στον πρώτο pH 2.0, στον δεύτερο pH 3.0 κ.ο.κ., όπως φαίνεται στον πίνακα 4. 4. Αναμείξτε τα άλλα διαλύματα με τη σειρά που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 4. 4. Αμέσως μετά την προσθήκη ενζυμικού παρασκευάσματος, μεταφέρετε 0.5ml δείγματος από τον σωλήνα με pH 8.0 σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 3ml 0.1 M NaOH για να σταματήσει η αντίδραση και να αναπτυχθεί το υποκίτρινο χρώμα, (το δείγμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό) και επώαστε και τους 7 σωλήνες σε υδατόλουτρο 37°C για 20min.

Στη συνέχεια μεταφέρετε 0.5ml από κάθε σωλήνα σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 3ml 0.1M NaOH και μετρείστε την απορρόφησή τους στα 405nm.

Πίνακας μετρήσεων 4. 4

Αριθμός σωλήνα	pH κιτρικού-αιθυλενοδιαμίνης	2.5 mM φωσφορική π-νιτροφαινόλη	Ενζυμικό παρασκεύασμα	0.1M NaOH μετά την αντίδραση	Απορρόφηση στα 405nm
1	2.0	2 ml	1 ml	3 ml	
2	3.0	2 ml	1 ml	3 ml	
3	4.0	2 ml	1 ml	3 ml	
4	5.0	2 ml	1 ml	3 ml	
5	6.0	2 ml	1 ml	3 ml	
6	7.0	2 ml	1 ml	3 ml	
7	8.0	2 ml	1 ml	3 ml	

Προσδιορίστε τα μmoles της π-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε και σχεδιάστε την ενεργότητα (units) της φωσφατάσης συναρτήσει του pH (units=μmoles/min).

Σημειώσεις-Παρατηρήσεις