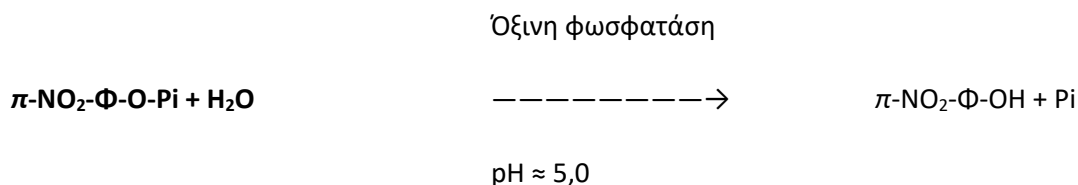


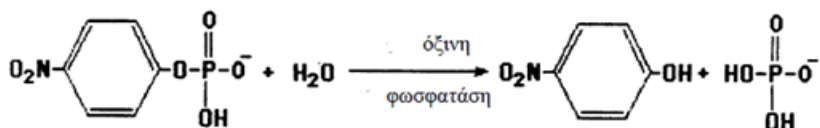
ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ
ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι φωσφατάσες (φωσφο-ϋδρολάσες ορθοφωσφορικών μονοεστέρων) μπορούν να απομονωθούν από διάφορες φυτικές πηγές όπως τα φυτά και ειδικότερα από τους σπόρους των φυτών και η δραστηριότητα του αυξάνεται κατά την περίοδο της βλάστησης. Βρίσκονται επίσης και σε διάφορους ζωικούς ιστούς (π.χ. στα οστά, στον προστάτη και αλλού). Χρησιμοποιούν στην απελευθέρωση των φωσφορικών ριζών από οργανικές ενώσεις. Η όξινη φωσφατάση δρα σε όξινο pH και καταλύει την παρακάτω αντίδραση υδρόλυσης ορθοφωσφορικών μονοεστέρων με την γενική μορφή:

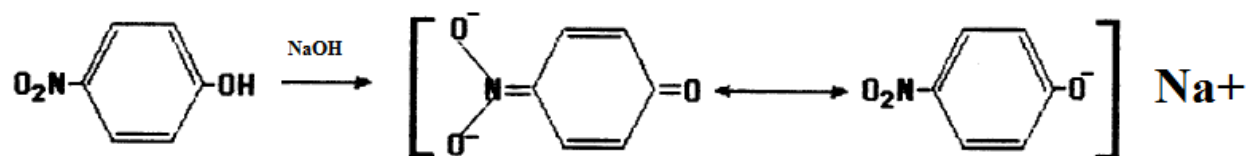


Η όξινη φωσφατάση καταλύει έχει ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Σαν υπόστρωμα στην παρούσα άσκηση θα χρησιμοποιηθεί το π -νιτρο-φαινυλοφωσφορικό (p-Nitrophenyl Phosphate, pNPP) το οποίο παρουσιάζει όξινης φωσφατάσης από σπέρματα σίτου θα υδrolυθεί και θα δώσει το προϊόν της π -νιτροφαινόλης.



π -νιτρο-φαινυλοφωσφορικό

π -νιτροφαινόλη (άχρωμη)



π -νιτροφαινόλη (άχρωμη)

(κίτρινη)

Το π -νιτρο-φαινυλοφωσφορικό στην αντίδραση που προχωρά σε όξινο pH δίνει ως προϊόν την π -νιτροφαινόλη που είναι **άχρωμο προϊόν**. Σε αντίθεση με την αντίδραση που προχωρά σε αλκαλικό pH

που δίνει άμεσα **κίτρινο προϊόν** που φωτομετρείται σε μήκος κύματος 400nm. Στην αντίδραση λοιπόν που προχωρά σε όξινο pH και δίνει **άχρωμο προϊόν** για να διαπιστωθεί η παραγωγή προϊόντος απαιτείτε η προσθήκη στην αντίδραση διαλύματος NaOH, το οποίο θα “χρωματίσει” το άχρωμο προϊόν. Με την προσθήκη ωστόσο διαλύματος NaOH το ένζυμο θα απενεργοποιηθεί, καθώς δεν μπορεί να λειτουργήσει σε ακραίες αλκαλικές συνθήκες. Συνεπώς, σε αυτή την άσκηση που θα χρησιμοποιήσουμε όξινο pH θα μπορέσουμε να διαπιστώσουμε την παρουσία της συγκεκριμένης ενζυμικής δραστηριότητας, δηλ. της όξινης φωσφατάσης, **μόνο** όταν αποφασίσουμε να σταματήσουμε την ενζυμική αντίδραση. Χρειάζεται λοιπόν προσοχή σε όλα τα βήματα, διότι η όποια παράλειψη και το όποιο λάθος θα διαπιστωθεί μόνο όταν τελειώσει η αντίδραση.

Σκοπός της άσκησης:

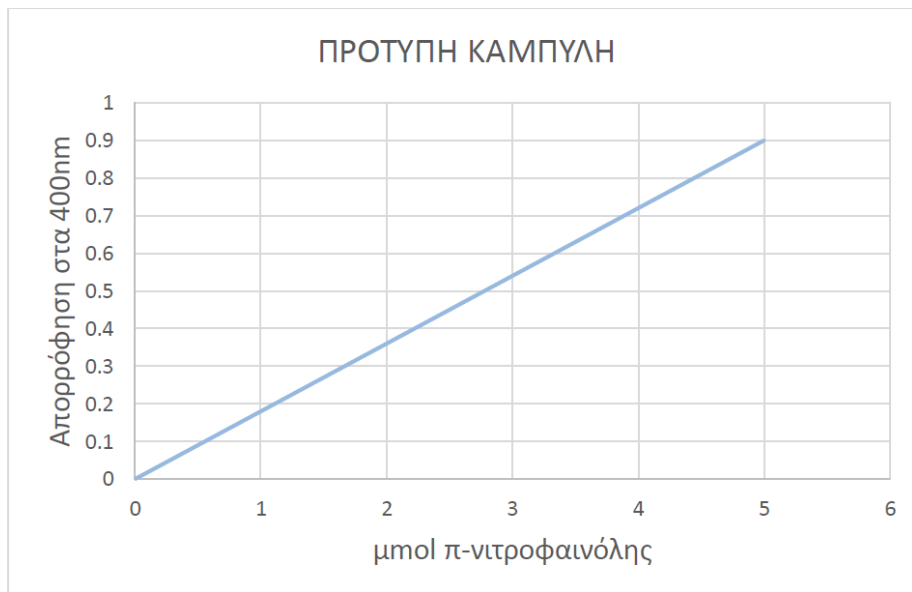
Μελέτη των ιδιοτήτων του ενζύμου της όξινης φωσφατάσης από σπέρμα σίτου. Αναλυτικά θα γίνει **προσδιορισμός της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης**, θα μελετηθεί η **επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης** και θα υπολογιστούν δυο χαρακτηριστικές σταθερές του ενζύμου, οι **σταθερές K_M** (σταθερά Michaelis) και **V_{max}** (μέγιστη ταχύτητα).

Αντιδραστήρια-Όργανα:

1. Ένζυμο (όξινη φωσφατάση από σπέρμα σίτου)
2. Υπόστρωμα (π-νιτρο-φαίνυλοφωσφορικό)
3. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος pH 4.8.
4. Διάλυμα 0.1M NaOH
5. Υδατόλουτρο 37°C
6. Φασματοφωτόμετρο, κυψελίδες φασματοφωτόμετρου (πλαστικές)

Δίνεται ως δεδομένο: η πρότυπη καμπύλη της ποσότητας π-νιτροφαινόλης έναντι της απορρόφησης στα 400nm, που έχει κατασκευαστεί από μετρήσεις διαφόρων πρότυπων συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης (Σχήμα 1). Η εξίσωση της ευθείας που συνδέει την ποσότητας π-νιτροφαινόλης με την απορρόφηση στα 400nm, είναι: **$y=0,18 \cdot x$** .

Άρα ποσότητα π-νιτροφαινόλης (μmol) = απορρόφηση / 0.18



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη της ποσότητας π-νιτροφαινόλης έναντι της απορρόφησης στα 400nm.