



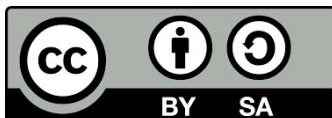
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΑΝΟΙΚΤΑ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ**



Εργαστήριο Βιοχημείας

**i) Ακινητοποιημένη ζύμη ii)
Μεταβολισμός γλυκόζης και ανίχνευση
πυροσταφυλικού-ακεταλδεϋδης**

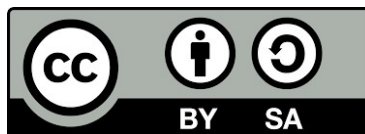
**Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε. Κούκκου,
Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ. Ε. Πάνου,
Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α. Τσελέπης, Καθ.
Δ. Τσουκάτος**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



ΑΣΚΗΣΗ 9

Ακίνητοποιημένη ζύμη-Μεταβολισμός γλυκόζης και ανίχνευση Πυροσταφυλικού-Ακεταλδεΐδης

- I. Ακίνητοποίηση ζύμης σε άλας Na του αλγινικού οξέος
 - A. Γενικό μέρος
 - B. Πειραματικό μέρος

- II. Μεταβολισμός γλυκόζης-ανίχνευση πυροσταφυλικού και ακεταλδεΐδης με την επίδραση ακίνητοποιημένης ζύμης
 - A. Γενικό μέρος
 - B. Πειραματικό μέρος

I. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΑΛΑΣ ΜΕ Na ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στη σύγχρονη Βιοτεχνολογική Βιομηχανία η παραγωγή διαφόρων προϊόντων γίνεται σε βιοαντιδραστήρες όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόντα με τη δράση ελευθέρων ενζύμων ή ολόκληρων κυττάρων (βιοκαταλύτες). Σημαντική παράμετρος για την μεγιστοποίηση της παραγωγής και την ελαχιστοποίηση του κόστους είναι ο γρήγορος και αποτελεσματικός διαχωρισμός των προϊόντων από τον βιοκαταλύτη καθώς και η επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη. Γι' αυτό το σκοπό μεγάλη σημασία έχει η χρήση βιοκαταλυτών δεσμευμένων σε αδρανή υποστρώματα που είναι εύκολο να διαχωριστούν (με διήθηση ή φυγοκέντρηση κλπ.) από το μίγμα των αντιδρώντων σωμάτων εντός του βιοαντιδραστήρα. Η δέσμευση αυτή του βιοκαταλύτη σε ένα αδρανές υπόστρωμα που δεν συμμετέχει στην αντίδραση χωρίς να αλλοιώσει την δραστικότητα του βιοκαταλύτη καλείται ακινητοποίηση.

Σε αυτή την άσκηση περιγράφεται η ακινητοποίηση κυττάρων ζύμης σε αλγινικό οξύ. Τα κύτταρα της ζύμης ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, ένας μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην παραδοσιακή αρτοποιία, ζυθοποιία και οινοποιία. Τα κύτταρα της ζύμης όταν αναπτύσσονται σε σακχαρούχες πρώτες ύλες (π.χ. εκχύλισμα σταφυλιών - μούστος) μεταβολίζουν ελόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη) μέσω του μονοπατιού Emben Meyerhof - Parnes και παράγουν αιθανόλη.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά: 5g Ζύμης (Μαγιά αρτοποιίας)

0,5g Αλγινικό Νάτριο

0,05M CaCl₂, αποστειρωμένο και αποσταγμένο H₂O

2 ποτήρια ζέσης 250ml

1 σιφόνιο 10ml

Εκτέλεση: Παρασκευάσατε αιώρημα 1% αλγινικού οξέος, 10% ζύμης (w/v) σε 50ml H₂O εντός ποτηριού ζέσης 250ml. Ανακινώντας συνεχώς μεταφέρατε σταγόνες του αιωρήματος σε ένα διάλυμα CaCl₂ (≈ 100 ml) εντός ποτηριού ζέσης 250 ml με τη χρήση σιφωνίου των 10 ml. Οι σταγόνες του αιωρήματος όταν πέσουν στο διάλυμα CaCl₂ σχηματίζουν μικρές σφαίρες που αποτελούνται από ακινητοποιημένα κύτταρα σε αλγινικό οξύ. Αφήστε τα

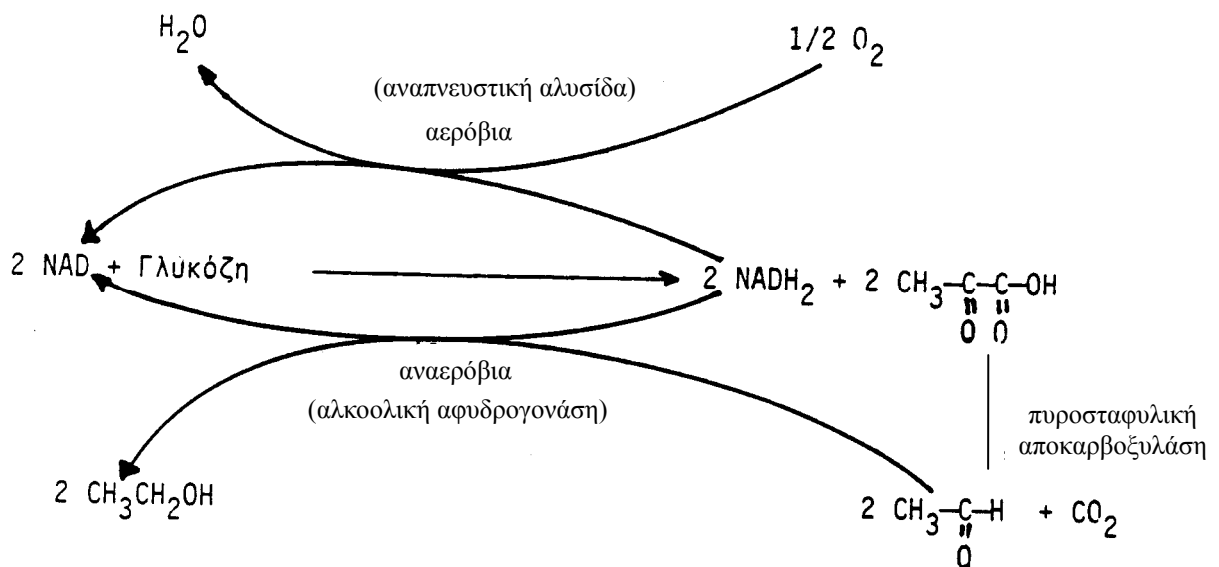
ακίνητοποιημένα κύτταρα εντός του CaCl_2 για 1 h. Στη συνέχεια μεταφέρατε τις σφαίρες των ακίνητοποιημένων κυττάρων στο υλικό της ζύμωσης.

Η ακίνητοποιημένη ζύμη θα χρησιμοποιηθεί, παρακάτω, για τη ζύμωση της γλυκόζης και την ανίχνευση πυροσταφυλικού και ακεταλδεΐδης.

II. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΖΥΜΗΣ.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η αρχή της μεθόδου και η ολική αντίδραση μπορούν να παρασταθούν σαν μεταφορά δυο ζευγών υδρογονατόμων από τη γλυκόζη στο NAD, κατά το σχήμα:



Οι μεταβολίτες πυροσταφυλικό και ακεταλδεΐδη βρίσκονται κανονικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Έτσι για την ανίχνευση τους, σαν ενδιάμεσα της γλυκολυτικής πορείας, θα πρέπει να επινοήσουμε κάποιους τρόπους παρεμπόδισης της συνέχειας της αντίδρασης.

Αυτή είναι μια γενική μεθοδολογία που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη διερεύνηση των μεταβολικών πορειών και συνήθως επιτυγχάνεται με το «μπλοκάρισμα» των ενζύμων που καταλύουν την εξεταζόμενη μεταβολή, με αναστολείς. Γενικά, μπορούν να αλλάξουν οι φυσιολογικές συνθήκες και το ένζυμο να «εργάζεται» πολύ κάτω από τη μέγιστη ενεργότητά του, ή να προστεθεί ένα «συμπλεκτικό» αντιδραστήριο, που να αντιδρά με το ενδιάμεσο σχηματίζοντας μια ένωση που δεν μεταβολίζεται παραπέρα.

Αυτές οι δυο μέθοδοι θα χρησιμοποιηθούν στα παρακάτω πειράματα.

Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (4.1.1.1) είναι ανενεργή σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα. Έτσι το πυροσταφυλικό συσσωρεύεται και η παρουσία του ανιχνεύεται με νιτροπρωσσικό νάτριο ή 2, 4-δινιτροφαινυλδραζίνη. Στο δεύτερο πείραμα προστίθεται Na_2SO_3 στο επωαζόμενο μίγμα, που μπλοκάρει την ακεταλδεΐδη. Η παρουσία της ακεταλδεΐδης πιστοποιείται με τη κυανή χροιά που παράγεται με την προσθήκη του νιτροπρωσσικού νατρίου και της πιπεριδίνης.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

1. Na_2HPO_4 (0.5 mol/l)	500 ml
2. KH_2PO_4 (0.5 mol/l)	500 ml
3. Γλυκόζη (100g/l) H_2O	100 ml
4. Νιτροπρωσσικό Na (50g/l)	10 ml

5. NH_4OH

6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

7. Na_2SO_3

8. Πιπεριδίνη (30g/l υδατικό διάλυμα)

9. CCl_3COOH (100g/l)

10. Πυκνό διάλυμα αμμωνίας (προσοχή να γίνει χρήση πουάρ και ποτέ με το στόμα.

Επίσης να γίνεται χρήση απαγωγού για αποφυγή επιβάρυνσης του χώρου με ατμούς αμμωνίας.

11. Υδρόλουτρο 37°C

Σχηματισμός πυροσταφυλικού από γλυκόζη

Μεταφέρονται σε δύο κωνικές φιάλες των 50ml (A και B) από 5 ml διαλύματος γλυκόζης. Γεμίζουμε τους πυθμένες των δύο κωνικών με τις σφαίρες της ακινητοποιημένης ζύμης (το $\frac{1}{4}$ της ποσότητας που διαθέτουμε τοποθετείται σε κάθε μια από τις δυο φιάλες). Προστίθενται 5ml από το διάλυμα του Na_2HPO_4 στην κωνική A (δημιουργία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος) και 5ml από το διάλυμα του KH_2PO_4 στην κωνική B (δημιουργία ελαφρά όξινου διαλύματος). Αφήνονται οι κωνικές σε υδρόλουτρο 37°C για 1h και ακολούθως προστίθενται 2ml διαλύματος CCl_3COOH σε κάθε κωνική. Αναμιγνύουμε και ανιχνεύεται η παρουσία πυροσταφυλικού.

Ανίχνευση της παρουσίας πυροσταφυλικού, με νιτροπρωσσικό Na

Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρεται ποσότητα πάχους 1cm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Προστίθενται σ' αυτούς 2ml από τις κωνικές Α και Β αντίστοιχα. Προστίθενται τρεις σταγόνες διαλύματος νιτροπρωσσικού νατρίου. Ακολουθεί ισχυρή ανάμιξη στο Vortex και προσθήκη πυκνής αμμωνίας προσεκτικά από τις πλευρές του σωλήνα, έτσι ώστε να σχηματισθούν δύο στιβάδες. Η παρουσία πυροσταφυλικού γίνεται φανερή από την εμφάνιση πράσινου ή κυανού δακτύλιου στην επαφή των δυο στοιβάδων. Πριν από αυτό το φαινόμενο ίσως σχηματιστεί ένας ροζ δακτύλιος, στο ίδιο σημείο, δείγμα της παρουσίας θειοομάδων.

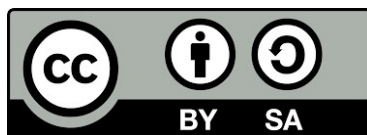
Σχηματισμός ακεταλδεΐδης από γλυκόζη

Μεταφέρονται σε δυο κωνικές φιάλες των 50ml Γ και Δ από 5ml διαλύματος γλυκόζης. Γεμίζουμε τους πυθμένες των δύο κωνικών με τις σφαίρες της ακινητοποιημένης ζύμης (το $\frac{1}{4}$ της ποσότητας που διαθέτουμε τοποθετείται σε κάθε μια από τις δυο φιάλες). Προστίθενται 5ml H₂O και στις δύο κωνικές, συν 0,5g Na₂SO₃ στην κωνική Δ. Ακολουθεί ισχυρή ανάμιξη και επώαση των κωνικών σε υδρόλουτρο 37⁰C για 1h.

Ανίχνευση της παρουσίας ακεταλδεΐδης με νιτροπρωσσικό Na

Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται: 2ml από τις κωνικές Γ και Δ αντίστοιχα, τρεις (3) σταγόνες νιτροπρωσσικό Na και 2ml υδατικού διαλύματος πιπεριδίνης. Ακολουθεί ανάμιξη. Η παρουσία ακεταλδεΐδης πιστοποιείται από την εμφάνιση κυανής χροιάς.

Τέλος Ενότητας



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**» 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.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση 1.0 διαθέσιμη εδώ.

<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

Σημείωμα Αναφοράς

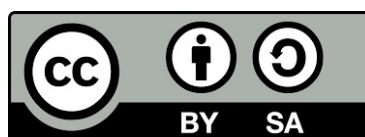
Copyright Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε. Κούκκου,
Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ. Ε. Πάνου,
Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α. Τσελέπης,
Καθ. Δ. Τσουκάτος. «Εργαστήριο
Βιοχημείας. i) Ακινητοποιημένη ζύμη ii)
Μεταβολισμός γλυκόζης και ανίχνευση
πυροσταφυλικού-ακεταλδεϋδης».

Έκδοση: 1.0. Ιωάννινα 2014. Διαθέσιμο
από τη δικτυακή διεύθυνση:

<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

Σημείωμα Αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Παρόμοια Διανομή, Διεθνής Έκδοση 4.0 [1] ή μεταγενέστερη.



- [1] <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.