

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Εργαστηριακές Ασκήσεις

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*

Αναπληρωτής Καθηγητής

Καρδίτσα, 2023

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| Άσκηση 1^η: Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης | 5 |
| 1.1 Εισαγωγή | 5 |
| 1.1.1 Φασματοφωτομετρική μέθοδος | 5 |
| 1.1.2 Μέθοδος διουρίας (<i>biuret</i>) | 6 |
| 1.1.3 Μέθοδος πρόσδεσης χρωστικής (<i>dye-binding, Bradford</i>) | 7 |
| 1.2 Υλικά και μέθοδοι | 8 |
| 1.2.1 Φασματοφωτομετρική μέθοδος | 8 |
| 1.2.2 Μέθοδος διουρίας | 8 |
| 1.2.3 Μέθοδος <i>Bradford</i> | 8 |
| 1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 9 |
| 1.4 Συμπεράσματα | 9 |
| Βιβλιογραφία | 9 |
| Άσκηση 2^η: Μέτρηση ενζυμικής δραστηκότητας και κινητικές σταθερές – Θεωρητικό υπόβαθρο | 10 |
| 2.1 Εισαγωγή | 10 |
| 2.2 Κινητικές ιδιότητες ενζύμων | 10 |
| 2.3 Η σημασία των κινητικών σταθερών | 13 |
| 2.4 Αναστολή ενζυμικής δραστηκότητας | |
| 2.5 Μονάδες ενζυμικής δραστηκότητας | 15 |
| 2.6 Σχεδιασμός μέτρησης ενζυμικής δραστηκότητας | 16 |
| 2.7 Εφαρμογές μέτρησης ενζυμικής δραστηκότητας | 18 |
| Βιβλιογραφία | 18 |
| Άσκηση 3^η: Δραστηκότητα πολυφαινολοξειδάσης – Συγκριτική αξιολόγηση φυτικών ιστών | 19 |
| 3.1 Εισαγωγή | 19 |
| 3.2 Υλικά και μέθοδοι | 20 |
| 3.2.1 Χημικές ουσίες κι αντιδραστήρια | 20 |
| 3.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος <i>PPO</i> | 20 |
| 3.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστηκότητας | 20 |
| 3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 21 |
| 3.4 Συμπεράσματα | 21 |

| | |
|--|-----------|
| Βιβλιογραφία | 21 |
| Άσκηση 4^η: Δραστικότητα περοξειδάσης κρεμμυδιού – Επίδραση του pH | 23 |
| 4.1 Εισαγωγή | 23 |
| 4.2 Υλικά και μέθοδοι | 24 |
| 4.2.1 Χημικές ουσίες κι αντιδραστήρια | 24 |
| 4.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος POD | 24 |
| 4.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας | 24 |
| 4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 24 |
| 4.4 Συμπεράσματα | 24 |
| Βιβλιογραφία | 24 |
| Άσκηση 5^η: Αναστολή ενζυμικής δραστικότητας – Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων | 26 |
| 5.1 Εισαγωγή | 26 |
| 5.2 Υλικά και μέθοδοι | 26 |
| 5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 26 |
| 5.4 Συμπεράσματα | 26 |
| Βιβλιογραφία | 27 |
| Άσκηση 6^η: Επίδραση θερμικής επεξεργασίας στην δραστικότητα περοξειδάσης | 28 |
| 6.1 Εισαγωγή | 28 |
| 6.2 Υλικά και μέθοδοι | 28 |
| 6.2.1 Χημικές ουσίες κι αντιδραστήρια | 28 |
| 6.2.2 Θερμική επεξεργασία | 28 |
| 6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 29 |
| 6.4 Συμπεράσματα | 29 |
| Βιβλιογραφία | 29 |
| Άσκηση 7^η: Μέτρηση δραστικότητας β-γλυκοζιδάσης | 30 |
| 7.1 Εισαγωγή | 30 |
| 7.2 Υλικά και μέθοδοι | 32 |
| 7.2.1 Χημικές ουσίες κι αντιδραστήρια | 32 |
| 7.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος | 32 |
| 7.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας | 32 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση | 32 |
| 7.4 Συμπεράσματα | 32 |
| Βιβλιογραφία | 32 |

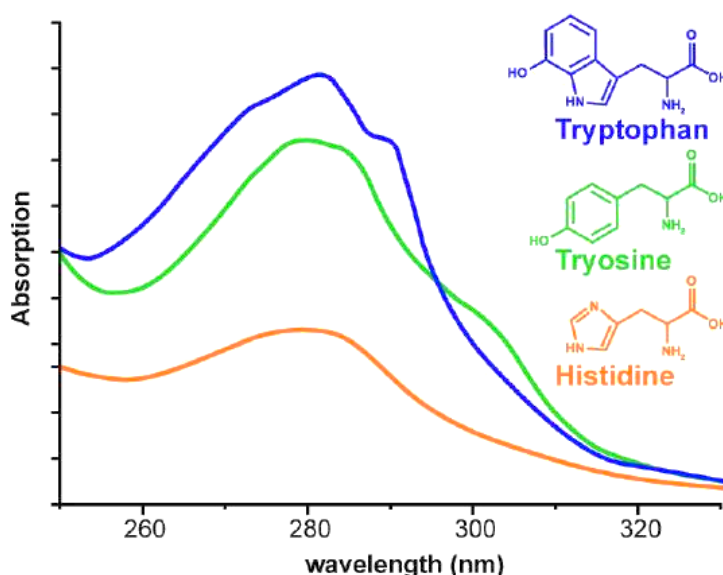
ΑΣΚΗΣΗ 1^η

Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

1.1 | Εισαγωγή

1.1.1 | Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Η παρουσία κατάλοιπων αρωματικών αμινοξέων έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να παρουσιάζουν ένα μέγιστο απορρόφησης (λ_{\max}) στα 280 nm (**Εικόνα 1.1**). Έτσι, η σύγκριση της απορρόφησης, σ' αυτό το μήκος κύματος, ενός αγνώστου διαλύματος που περιέχει πρωτεΐνη μ' αυτήν ενός πρότυπου διαλύματος αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικοποίησης. Δεν είναι όμως μια απόλυτη μέθοδος, γιατί οι διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα αρωματικών αμινοξέων μεταβάλλουν τους συντελεστές απορρόφησης σε διαφορετικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 1.1: Μέγιστα απορρόφησης αρωματικών αμινοξέων, στα οποία αποδίδεται η χαρακτηριστική απορρόφηση των πρωτεϊνών στα 280 nm.

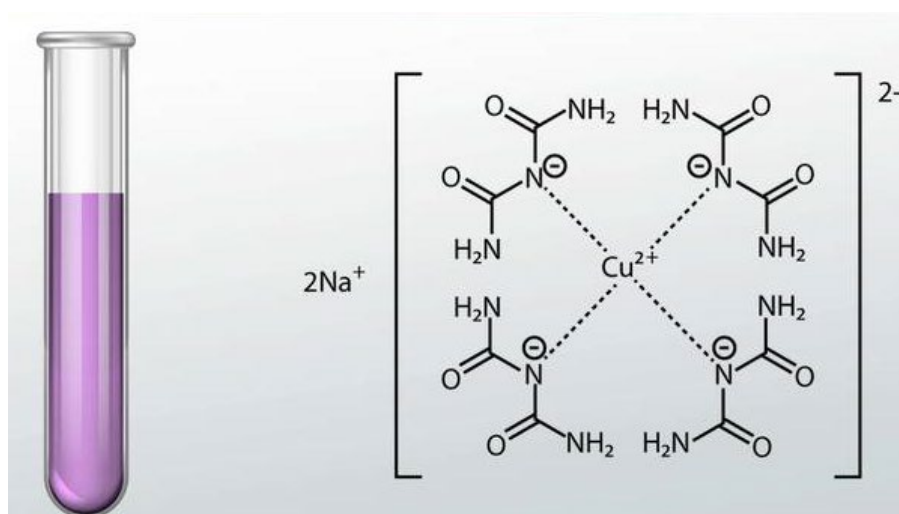
Ορισμένα κυτταρικά εκχυλίσματα περιέχουν ουσίες που μπορεί να παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση στα ή κοντά στα 280 nm. Τα νουκλεϊκά οξέα, που μπορεί να ανευρίσκονται συχνά σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, απορροφούν ισχυρά στα 280 nm ($\lambda_{\max} = 260$ nm). Η ακόλουθη εμπειρική εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρωτεϊνικά διαλύματα που περιέχουν μέχρι 20% νουκλεϊκά οξέα:

$$\text{Protein concentration (mg/mL)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

Αν και η φασματοφωτομετρική μέθοδος είναι ταχεία, σχετικά ευαίσθητη και απαιτεί μικρό όγκο δείγματος, αποτελεί μόνο μια εκτίμηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Τα πλεονεκτήματά της είναι ότι τα περισσότερα ρυθμιστικά διαλύματα δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση, και ότι ο προσδιορισμός δεν καταστρέφει τα δείγματα.

1.1.2 | Μέθοδος διουρίας (biuret)

Το όνομα της μεθόδου είναι εν πολλοίς ατυχές και παραπλανητικό. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με βάση την παρατήρηση ότι η διουρία αντιδρά με αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού προς σχηματισμό ενός πορφυρού συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες και μερικές αμίνες αντιδρούν με παρόμοιο τρόπο. Τα ιόντα δισθενούς χαλκού σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με τέσσερις πυρηνόφιλες -NH ομάδες, οι οποίες στις πρωτεΐνες βρίσκονται στους πεπτιδικούς δεσμούς (**Εικόνα 1.2**).



Εικόνα 1.2: Σχηματισμός πορφυρού συμπλόκου μεταξύ των Cu^{2+} και τεσσάρων ομάδων -NH που βρίσκονται σε πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών.

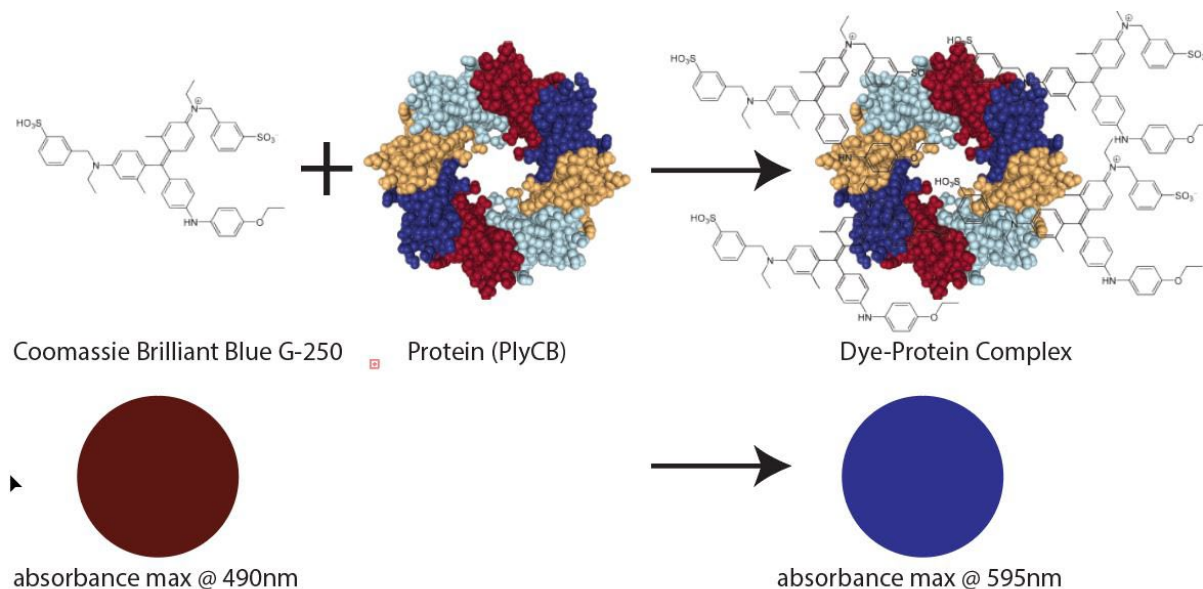
Το σύμπλοκο παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στα 330 και 545 nm. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται συνήθως στα 545 nm, γιατί αν και η μέτρηση έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στα 330 nm, υπάρχει υψηλότερη παρεμπόδιση. Ουσίες που περιέχουν μια από τις ακόλουθες ομάδες ενωμένες με άτομο άνθρακα, δίνουν παρόμοια αντίδραση: $-\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{CSNH}_2$. Μερικές πολυόλες, κυρίως η γλυκερόλη και η αιθυλενογλυκόλη, σχηματίζουν παρόμοια σύμπλοκα, αλλά με ελαφρώς διαφορετικά μέγιστα απορρόφησης.

Το αντιδραστήριο διουρίας αποτελείται από αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού, που περιέχει είτε τρυγικό κάλιο είτε κιτρικό νάτριο, για ν' αποτραπεί η καταβύθιση των Cu^{2+} υπό την μορφή υδροξειδίου.

Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ανθεκτική σε μεταβολές πειραματικών συνθηκών και αξιόπιστη, και υπακούει στον νόμο Beer-Lambert μέχρι τελικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης 2 g L^{-1} , με χαμηλότερο όριο τα 100 μg πρωτεΐνης. Το χρώμα αποκτά την μέγιστη έντασή του μετά από 15 min και παραμένει σταθερό για αρκετές ώρες. Το σημαντικότερο μειονέκτημά της είναι η μικρή ευαισθησία. Όλες οι πρωτεΐνες αντιδρούν παρόμοια και δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές για διαφορετικές πρωτεΐνες.

1.1.3 | Μέθοδος πρόσδεσης χρωστικής (dye-binding, Bradford)

Η χρωστική Coomassie brilliant blue χρησιμοποιείται εκτενώς σε γενικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με πρωτεΐνες και επιδεικνύει μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησής της από τα 464 στα 595 nm (**Εικόνα 1.3**). Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Η μέγιστη απορρόφηση αναπτύσσεται ταχέως (2 – 5 min) και παραμένει σταθερή για τουλάχιστον 1 h.



Εικόνα 1.3: Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της χρωστικής Coomassie brilliant blue και μιας πρωτεΐνης, και η σχετιζόμενη μεταβολή χρώματος.

Η μέθοδος είναι κατάλληλη για όλες τις πρωτεΐνες, αλλά η ποσότητα της χρωστικής που συμπλέκεται διαφέρει σε διαφορετικές πρωτεΐνες, και φαίνεται να σχετίζεται με την αναλογία των κατάλοιπων βασικών αμινοξέων. Για παράδειγμα, η αλβουμίνη ορού βοδινού δίνει 60% υψηλότερες τιμές απορρόφησης από την αλβουμίνη αυγού, για την ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης. Συνεπώς, είναι εξαιρετικά σημαντικό τα πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της καμπύλης προσδιορισμού, να έχουν παρόμοια σύσταση με την προς ανάλυση πρωτεΐνη.

Η ρύθμιση του pH είναι επίσης σημαντική και, παρότι το αντιδραστήριο είναι ισχυρά ρυθμισμένο, κάθε δείγμα υψηλής αλκαλικότητας μπορεί να προκαλέσει μεταβολή του pH και ν' αλλοιώσει το αποτέλεσμα. Μερικά απορρυπαντικά μπορούν να παρεμβάλουν στην μέθοδο, προκαλώντας σημαντική αύξηση της απορρόφησης.

Η μέθοδος μπορεί ν' ανιχνεύσει επίπεδα της τάξης των 5 μg πρωτεΐνης και η χρήση καμπύλης αναφοράς είναι απαραίτητη, εξαιτίας των διακυμάνσεων μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών και της μη-γραμμικής σχέσης απορρόφησης – συγκέντρωσης.

1.2 | Υλικά και μέθοδοι

1.2.1 | Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Διάλυμα καθαρής τυροσινάσης 1% (β/ο) έχει $E_{280}^{1\%} = 24.9$, δηλαδή παρουσιάζει απορρόφηση (A_{std}) στα 280 nm, μετρημένη σε κυψελίδα 1 cm, ίση με 24.9. Αν A_x η απορρόφηση ενός αγνώστου διαλύματος τυροσινάσης, τότε η συγκέντρωση υπολογίζεται ως εξής:

$$\frac{A_{std}}{C_{std}} = \frac{A_x}{C_x}$$

A_{std} = absorbance of the 1% standard solution = 24.9

C_{std} = concentration of the standard solution = 1% (1 g/dL)

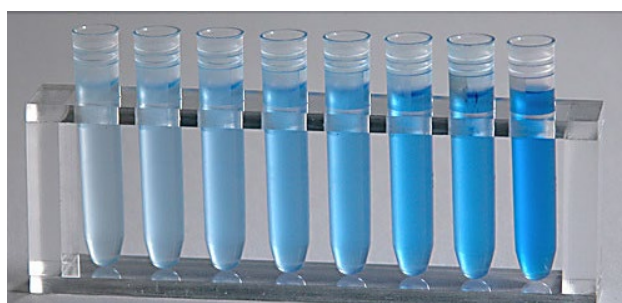
A_x = absorbance of the unknown solution

C_x = concentration of the unknown solution in %

1.2.2 | Μέθοδος διουρίας

Το αντιδραστήριο αποτελείται από διάλυμα CuSO_4 (1.5 g L^{-1}), τρυγικού καλίου-νατρίου (6.0 g L^{-1}) και υδροξειδίου του νατρίου (30.0 g L^{-1}).

Σε δοκιμαστικό σωλήνα Eppendorf φέρονται 0.1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος και 0.9 mL αντιδραστηρίου διουρίας. Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς και αφήνεται ν' αντιδράσει σε ατμοσφαιρική θερμοκρασία για 30 min. Ακολούθως, λαμβάνεται η απορρόφηση στα 545 nm, με κατάλληλο δείγμα ελέγχου (λευκό). Η συγκέντρωση προσδιορίζεται με βάση καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης (**Εικόνα 1.4**), σε εύρος συγκεντρώσεων $0.5 - 20 \text{ g L}^{-1}$.

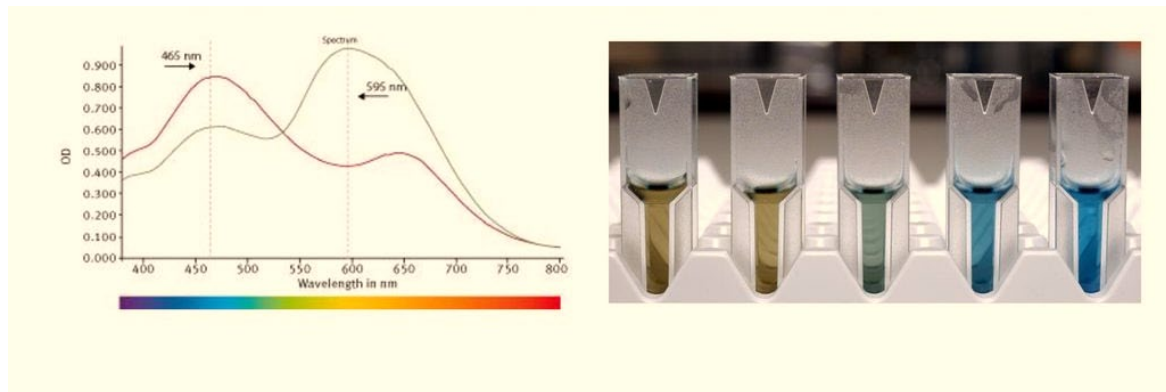


Εικόνα 1.4: Ανάπτυξη χρώματος σε πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης, μετά από αντίδραση διουρίας.

1.2.3 | Μέθοδος Bradford

Το αντιδραστήριο Bradford διατίθεται σε εμπορικό σκεύασμα. Όγκος 0.1 mL διαλύματος πρωτεΐνης εισάγεται σε σωληνάκι Eppendorf του 1.5 mL και προστίθενται 0.2 mL αντιδραστηρίου Bradford και 0.7 mL απιονισμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται ν' αντιδράσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595, χρησιμοποιώντας

απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου. Η συγκέντρωση προσδιορίζεται με βάση καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης (**Εικόνα 1.5**), σε εύρος συγκεντρώσεων 100 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Εικόνα 1.5: Παράδειγμα πρότυπων διαλυμάτων με αύξουσα συγκέντρωση BSA, μετά την αντίδραση με το αντιδραστήριο Bradford.

1.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Παρατίθενται τ' αποτελέσματα των μετρήσεων με τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν και γίνεται συγκριτική αξιολόγηση.

1.4 | Συμπεράσματα

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων που παραλήφθηκαν με διαφορετικές μεθόδους

Βιβλιογραφία

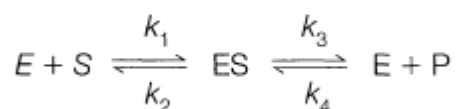
- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.
- Holme D.J., Peck H., 1998. Analytical Biochemistry, 3rd Edition, Prentice Hall, Essex, England.

ΑΣΚΗΣΗ 2^η

Ενζυμική Δραστικότητα και Κινητικές Σταθερές – Θεωρητικό Υπόβαθρο

2.1 | Εισαγωγή

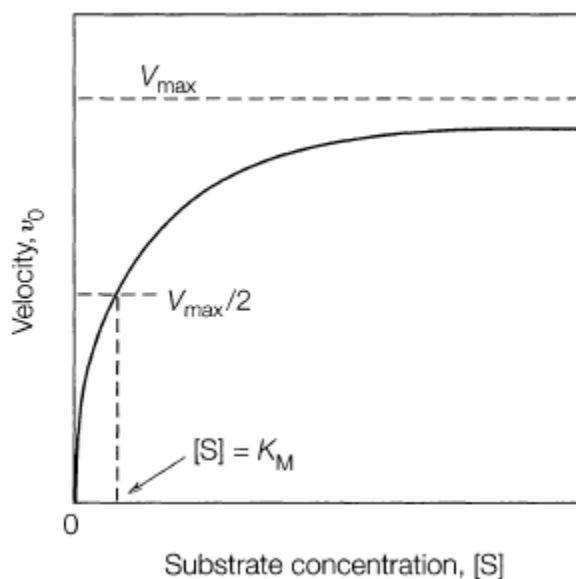
Οι ενζυμικές αντιδράσεις διεξάγονται μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου ES, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση, όπου περιλαμβάνονται και οι ξεχωριστές σταθερές ταχύτητας:



Το E αντιπροσωπεύει το ένζυμο, το S το υπόστρωμα, και το P το προϊόν. Για ένα συγκεκριμένο ένζυμο, μόνο ένα ή λίγα διαφορετικά υποστρώματα μπορούν να προσδεθούν κατάλληλα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και να δημιουργήσουν λειτουργικό σύμπλοκο ES. Το υπόστρωμα πρέπει να έχει σχήμα, μέγεθος και πολικότητα συμβατά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μερικά ένζυμα καταλύουν τον μετασχηματισμό πολλών διαφορετικών μορίων, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει ένας κοινός τύπος σύνδεσης με το υπόστρωμα. Κάποια άλλα έχουν απόλυτη εξειδίκευση και μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά σύμπλοκα ES μόνο με μια μοριακή δομή. Μερικά ένζυμα μπορούν να διαχωρίσουν D και L ισομερή ενός υποστρώματος.

2.2 | Κινητικές ιδιότητες ενζύμων

Η αρχική ταχύτητα, v_0 , μιας ενζυμικής καταλυόμενης αντίδρασης κυμαίνεται ανάλογα με την συγκέντρωση υποστρώματος, [S] (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1: Γράφημα Michaelis – Menten μιας ενζυμικής καταλυόμενης αντίδρασης.

Η εξίσωση Michaelis – Menten παράχθηκε για την περιγραφή των κινητικών ιδιοτήτων των ενζύμων. Η κοινή μορφή της εξίσωσης είναι:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Όπου:

v_0 = initial reaction velocity

V_{\max} = maximal reaction velocity; attained when all enzyme active sites are filled with substrate molecules

[S] = substrate concentration

K_M = Michaelis constant = $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Οι σημαντικές κινητικές σταθερές V_{\max} και K_M μπορούν να προσδιοριστούν γραφικά, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.1**. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει τα μειονεκτήματα μιας μη-γραμμικής κινητικής ανάλυσης: i) η V_{\max} μπορεί να προσδιοριστεί μόνο επειδή η γραμμή έχει ασύμπτωτη φύση, ii) η τιμή K_M , δηλαδή η συγκέντρωση υποστρώματος που δίνει ταχύτητα αντίδρασης $V_{\max}/2$, εξαρτάται από την V_{\max} . Συνεπώς, και στους δύο προσδιορισμούς υπεισέρχεται σφάλμα.

Εντούτοις, αν αντιστραφούν τα μέλη της εξίσωσης Michaelis – Menten, τότε λαμβάνεται η γραμμική εξίσωση Lineweaver – Burk:

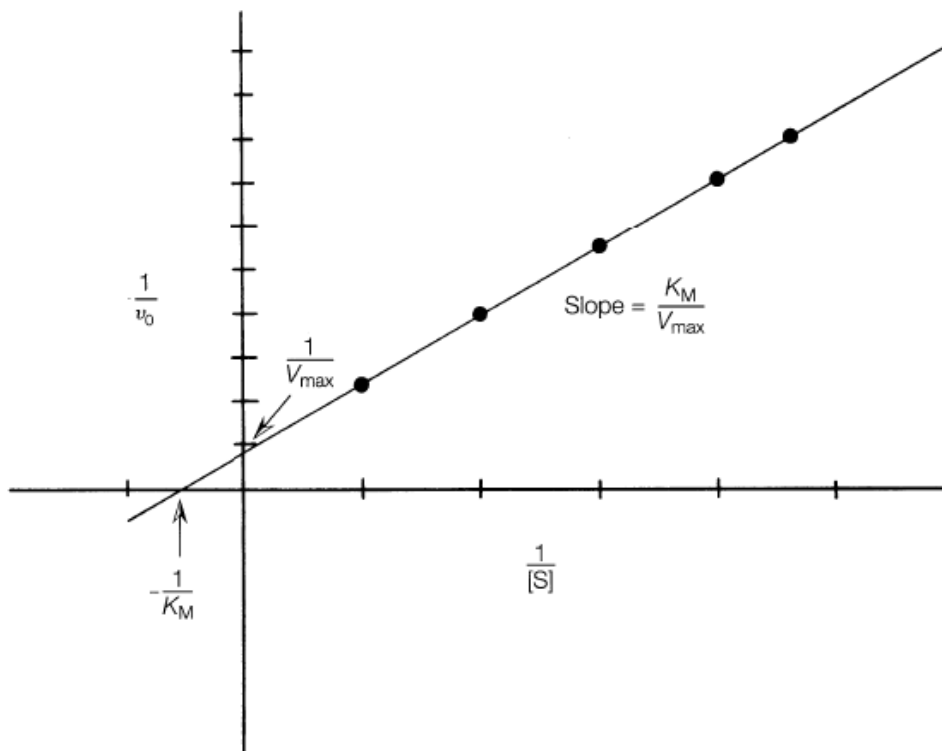
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Αυτή η εξίσωση, που είναι της μορφής $\psi = \alpha\chi + \beta$, δίνει ευθεία γραμμή σ' ένα διάγραμμα συσχέτισης του $1/v_0$ ως προς το $1/[S]$ (**Εικόνα 2.2**). Το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα $1/v_0$ ισούται με $1/V_{\max}$, και με τον άξονα $1/[S]$, με $-1/K_M$. Ένα μειονέκτημα του διαγράμματος Lineweaver – Burk είναι ότι τα σημεία των τιμών συμπιέζονται στην περιοχή που αντιστοιχεί σε υψηλές τιμές συγκέντρωσης υποστρώματος.

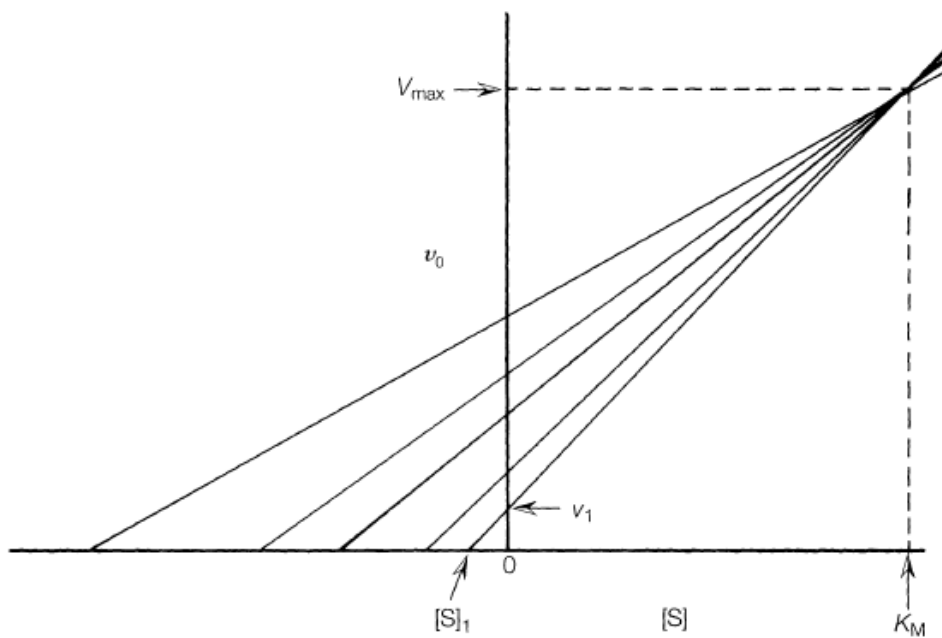
Ένας τρίτος τύπος γραφικής ανάλυσης προκύπτει από την τροποποίηση Eisenthal και Cornish – Bowden:

$$V_{\max} = v_0 + \frac{v_0}{[S]} K_M$$

Αυτή η τροποποίηση δίνει απευθείας γραμμικό διάγραμμα, που προκύπτει από την συσχέτιση κάθε ζεύγους πειραματικών τιμών v_0 και [S] (**Εικόνα 2.3**). Οι τιμές V_{\max} και K_M λαμβάνονται απευθείας από το γράφημα.



Εικόνα 2.2: Διάγραμμα Lineweaver – Burk μιας ενζυμικής καταλυόμενης αντίδρασης.



Εικόνα 2.3: Διάγραμμα Eisenthal και Cornish - Bowden μιας ενζυμικής καταλυόμενης αντίδρασης.

2.3 | Η σημασία των κινητικών σταθερών

Η σταθερά Michaelis, K_M , σε μια αλληλοεπίδραση ενζύμου – υποστρώματος έχει δύο έννοιες:

- i) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που δίνει αρχική ταχύτητα αντίδρασης ίση με $V_{max}/2$. Δηλαδή, είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που έχει ως αποτέλεσμα την πλήρωση του μισού των ενεργών κέντρων των ενζυμικών μορίων·
- ii) $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$. Αυτός ο δεύτερος ορισμός της K_M έχει ειδική σημασία σε ορισμένες περιπτώσεις. Όταν $k_2 \gg k_3$, τότε $K_M = k_2/k_1$. Δηλαδή, η K_M ισοδυναμεί με την σταθερά διάστασης του σύμπλοκου ES. Σ' αυτήν την περίπτωση, υψηλή K_M υποδηλώνει ασθενή αλληλοεπίδραση μεταξύ των E και S, ενώ χαμηλή K_M ισχυρή πρόσδεση μεταξύ των E και S.

Η V_{max} είναι σημαντική γιατί εμπλέκεται στον προσδιορισμό μιας άλλης κινητικής σταθεράς, k_3 , η οποία ορίζεται ως ο **αριθμός μετατροπής** (turnover number). Η ανάλυση της k_3 ξεκινά με τον βασικό νόμο της ταχύτητας για μια ενζυμικώς καταλυόμενη αντίδραση, που προκύπτει από την εξίσωση στην παράγραφο 2.1:

$$v_0 = k_3[ES]$$

Αν όλα τα ενεργά κέντρα των ενζυμικών μορίων είναι κατειλημμένα από μόρια υποστρώματος (κορεσμός), τότε η $[ES]$ ισούται με $[E_T]$, δηλαδή την συνολική συγκέντρωση ενζύμου, και η v_0 γίνεται V_{max} . Συνεπώς:

$$V_{max} = k_3[E_T]$$

οι

$$k_3 = \frac{V_{max}}{[E_T]}$$

Για ένα ένζυμο που φέρει ένα ενεργό κέντρο ανά πρωτεϊνικό μόριο, ο αριθμός μετατροπής, k_3 , είναι ο αριθμός μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν από ένα ενζυμικό μόριο ανά μονάδα χρόνου (συνήθως min ή s). Ο αριθμός μετατροπής είναι ένα μέτρο της αποδοτικότητας ενός ενζύμου.

2.4 | Αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας

Μόρια τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματα, μπορούν ν' αλληλοεπιδράσουν με ένζυμα, προκαλώντας μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η μελέτη της ενζυμικής αναστολής παρουσιάζει ενδιαφέρον, γιατί συχνά αποκαλύπτει πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό δράσης ενός ενζύμου. Επίσης, διάφορες τοξικές ουσίες, αλλά και φάρμακα, εκφράζουν την δράση τους μέσω ενζυμικής αναστολής.

Η διαδικασία της αντιστρεπτής αναστολής περιγράφεται από μία ισορροπία αλληλοεπίδρασης μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα (inhibitor). Οι περισσότερες διεργασίες αναστολής μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως **συναγωνιστικές** (competitive) ή **μη-συναγωνιστικές** (non-competitive), ανάλογα με τον τρόπο δράσης του αναστολέα.

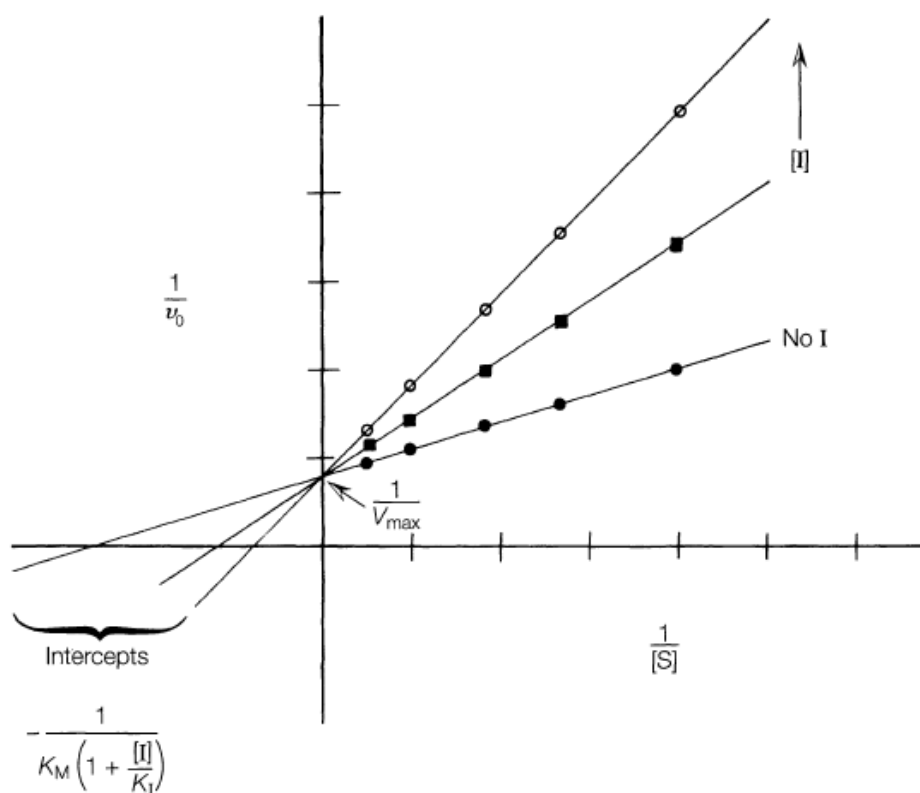
Ένας συναγωνιστικός αναστολέας είναι συνήθως παρόμοιος δομής με το υπόστρωμα και έχει την ικανότητα αντιστρεπτής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αντιθέτως με το μόριο του υποστρώματος, το μόριο του αναστολέα δεν υπόκειται σε μετατροπή προς την δημιουργία προϊόντος. Εντούτοις, παρεμβάλλεται στην πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο.

Ένας μη-συναγωνιστικός αναστολέας δεν προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά σ' ένα άλλο σημείο του πρωτεϊνικού μορίου. Όταν ο αναστολέας προσδεθεί, το ένζυμο λαμβάνει αντιστρεπτά μια μη-λειτουργική διαμόρφωση, και το υπόστρωμα, που μπορεί να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο, δεν μετατρέπεται σε προϊόν.

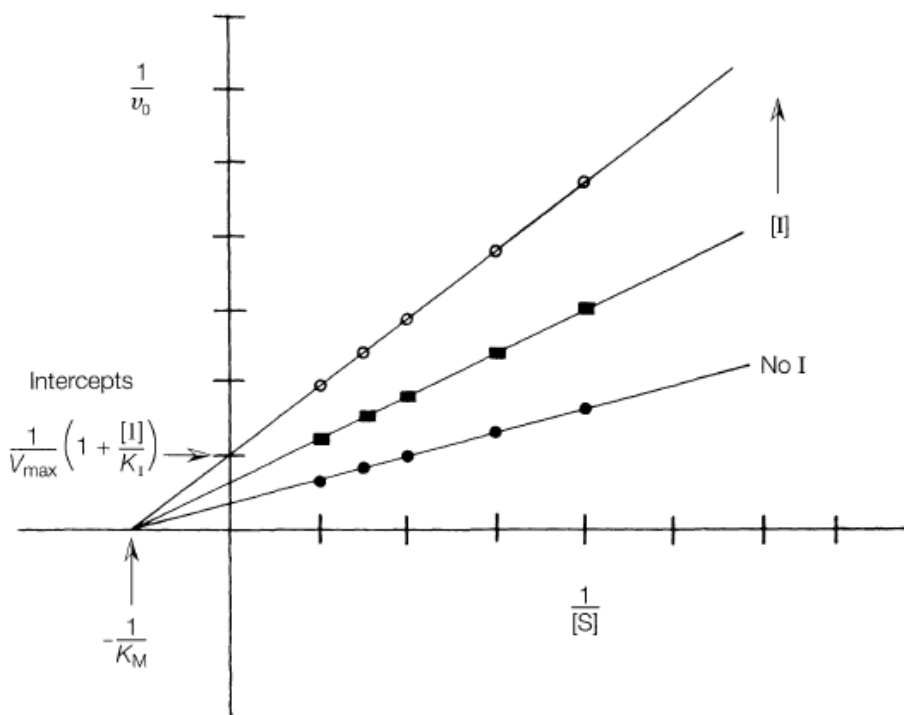
Οποιαδήποτε πλήρης μελέτη αναστολής απαιτεί την πειραματική διάκριση μεταξύ συναγωνιστικής και μη-συναγωνιστικής αναστολής. Οι δύο διεργασίες αναστολής είναι κινητικά διακριτές, με εφαρμογή του διαγράμματος Lineweaver – Burk ή του απευθείας γραμμικού διαγράμματος. Για την μελέτη κάθε αναστολέα, απαιτείται η πραγματοποίηση δύο σειρών κινητικών πειραμάτων. Σε αμφότερες σειρές, η συγκέντρωση του ενζύμου είναι σταθερή.

Στην πρώτη σειρά, υπάρχει διακύμανση της συγκέντρωσης υποστρώματος, χωρίς την παρουσία αναστολέα. Στην δεύτερη σειρά, χρησιμοποιούνται οι ίδιες συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπως και στην πρώτη σειρά, και προστίθεται μια συγκεκριμένη συγκέντρωση αναστολέα σε κάθε δοκιμή. Αν απαιτείται και άλλη σειρά πειραμάτων, προστίθεται μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Αυτά τα δεδομένα, όταν αναπαρασταθούν υπό την μορφή ενός διαγράμματος Lineweaver – Burk, δίνουν τρεις γραμμές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.4** και **2.5**.



Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Lineweaver - Burk μιας συναγωνιστικής αναστολής.



Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Lineweaver - Burk μιας μη-συναγωνιστικής αναστολής.

Στην συναγωνιστική αναστολή, και οι τρεις γραμμές τέμνονται στο ίδιο σημείο, πάνω στον άξονα $1/v_0$. Επομένως, η V_{max} δεν μεταβάλλεται από τον συναγωνιστικό αναστολέα. Αν το υπόστρωμα βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να υπερκεραστεί. Η φαινομενική K_M μεταβάλλεται με κάθε μεταβολή της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Η **Εικόνα 2.4** αποκαλύπτει τα κινητικά χαρακτηριστικά της αναστολής, V_{max} , K_M και K_i . Το μέγεθος K_i αντιπροσωπεύει την σταθερά διάστασης του σύμπλοκου EI, και η τιμή του υποδεικνύει την ισχύ πρόσδεσης μεταξύ του ενζύμου (E) και του αναστολέα (I). Υψηλή τιμή σημαίνει σχετικά ασθενή αλληλοεπίδραση μεταξύ E και I. Υπό την παρουσία ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα, η V_{max} μειώνεται αλλά η K_M παραμένει αμετάβλητη (**Εικόνα 2.5**).

2.5 | Μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας

Η πραγματική μοριακή συγκέντρωση ενός ενζύμου σ' ένα εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων ή σ' ένα καθαρό εκχύλισμα είναι σπανίως γνωστή. Η ακριβής συγκέντρωση μπορεί να είναι επακριβώς γνωστή μόνο εάν το ένζυμο είναι διαθέσιμο σε καθαρή κρυσταλλική μορφή, προσεκτικά ζυγισμένο και διαλυμένο σε κατάλληλο μέσο. Εντούτοις, είναι δυνατόν ν' αναπτυχθεί μια μέθοδος με ακρίβεια και ορθότητα για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας.

Συνεπώς, η ποσότητα ενός συγκεκριμένου ενζύμου που υπάρχει σ' ένα διάλυμα εκφράζεται συχνά σε μονάδες δραστηριότητας. Τρεις μονάδες χρησιμοποιούνται κοινώς, η **διεθνής μονάδα (international unit - IU)**, το **katal** και η **ειδική δραστηριότητα** (specific activity). Η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας (Επιτροπή για τα Ένζυμα) έχει συστήσει την χρήση μιας πρότυπης μονάδας, της διεθνούς μονάδας (ή απλά μονάδας) ενζυμικής δραστηριότητας.

Μία IU ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα που καταλύει την μετατροπή 1 μmol υποστρώματος σε προϊόν ανά min, υπό καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, ιοντικής ισχύος και συγκέντρωσης υποστρώματος. Αν ένα διάλυμα που περιέχει ένζυμο μετατρέπει 10 μmol υποστρώματος σε προϊόν σε 5 min, το διάλυμα περιέχει 2 μονάδες ενζύμου.

Ένα katal ενζυμικής δραστηριότητας αντιπροσωπεύει την μετατροπή 1 mole υποστρώματος σε προϊόν σε 1 sec. Μία IU ισοδυναμεί με 1/60 μkatal ή 0.0167 μkatal. Επομένως, 1 katal ισοδυναμεί με 6×10^7 IU. Είναι βολικό να εκφράζονται μικρές ποσότητες ενζύμου σε mkatals, μkatals ή nkatals. Για μη-καθαρισμένα εκχυλίσματα ενζύμων, η δραστηριότητα εκφράζεται συνήθως σε units/mL katal/mL.

Η ειδική δραστηριότητα ενός ενζύμου είναι ο αριθμός των ενζυμικών units ή katal ανά mg πρωτεΐνης. Αυτό είναι ένα μέτρο καθαρότητας ενός ενζύμου. Αν ένα διάλυμα περιέχει 20 mg πρωτεΐνης που παρουσιάζουν 2 units (33 nkatals), η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου είναι $2 \text{ units}/20 \text{ mg} = 0.1 \text{ units/mg}$ ή 1.65 nkatals/mg .

Ο καθαρισμός ενός ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικής δραστηριότητας. Αυτό συμβαίνει γιατί η συγκέντρωση του ενζύμου αυξάνει σε σχέση με την συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση, έως ενός ορίου. Η μέγιστη ειδική δραστηριότητα επιτυγχάνεται όταν παραληφθεί το ένζυμο σε καθαρή μορφή.

Η δραστηριότητα ενός ενζύμου εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης υποστρώματος, της συγκέντρωσης του συμπαραγόντα, του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος. Οι συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται μέτρηση της δραστηριότητας ενός ενζύμου είναι σημαντικές και θα πρέπει να ορίζονται επακριβώς.

2.6 | Σχεδιασμός μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας

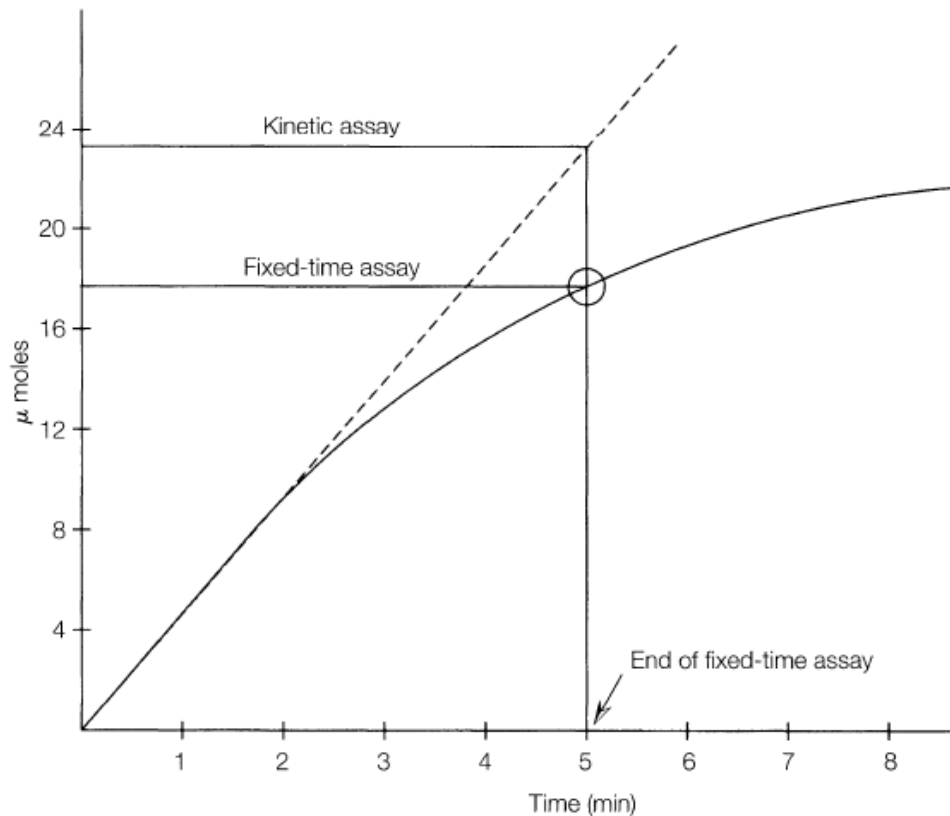
Είτε ένα ένζυμο είναι διαθέσιμο σε καθαρή μορφή, είτε παραλαμβάνεται με καθαρισμό που περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια, πρέπει ν' αναπτυχθεί μια πειραματική μέθοδος για την ποσοτικοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης και καθαρισμού ενός ενζύμου, η μέθοδος μέτρησης είναι απαραίτητο να προσδιορίζει την ποσότητα και καθαρότητα του ενζύμου, και ν' αξιολογεί τις κινητικές του ιδιότητες. Μια μέθοδος μέτρησης είναι επίσης ουσιαστική για περαιτέρω μελέτη του καταλυτικού μηχανισμού της ενζυμικής αντίδρασης.

Ο σχεδιασμός μιας ενζυμικής μεθόδου απαιτεί κάποια γνώση της αντίδρασης:

1. Την πλήρη στοιχειομετρία
2. Τις ουσίες που απαιτούνται (υπόστρωμα, μεταλλικά ιόντα, συμπαραγόντες κτλ.)
3. Την επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος

Η πιο ευθεία προσέγγιση για τον σχεδιασμό μιας ενζυμικής μεθόδου είναι η μέτρηση της μεταβολής της συγκέντρωσης υποστρώματος ή προϊόντος κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Αν μια μέθοδος περιλαμβάνει συνεχή παρακολούθηση της συγκέντρωσης υποστρώματος ή προϊόντος, ονομάζεται **κινητική μέθοδος** (kinetic assay). Αν πραγματοποιείται μια μέτρηση της συγκέντρωσης υποστρώματος ή προϊόντος σε προκαθορισμένο χρόνο, ονομάζεται **μέθοδος σταθερού χρόνου** (fixed-time assay). Η κινητική μέθοδος προτιμάται περισσότερο, γιατί μπορεί να παρατηρηθεί απευθείας η πορεία της αντίδρασης και ν' ανιχνευθούν αποκλίσεις από την γραμμικότητα.

Η **Εικόνα 2.6** παρουσιάζει την καμπύλη κινητικής εξέλιξης μιας ενζυμικώς καταλυόμενης αντίδρασης και καταδεικνύει το πλεονέκτημα της κινητικής μεθόδου. Η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος βαίνει μειούμενη με τον χρόνο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε οποιονδήποτε συνδυασμό παραγόντων, όπως η μείωση της συγκέντρωσης υποστρώματος, μετουσίωση του ενζύμου ή αναστολή προϊόντος.



Εικόνα 2.6: Κινητική εξέλιξη μιας ενζυμικώς καταλυόμενης αντίδρασης.

Η συμπαγής γραμμή αντιπροσωπεύει την συνεχώς μετρούμενη χρονική πορεία της αντίδρασης (κινητική μέθοδος). Η πραγματική ταχύτητα της αντίδρασης προσδιορίζεται από την κλίση της διακεκομμένης γραμμής, που εφάπτεται της πειραματικής καμπύλης.

Από τα δεδομένα συνάγεται ότι η ταχύτητα είναι 5 μmoles προϊόντος που σχηματίζεται ανά min . Όσον αφορά στην μέθοδο σταθερού χρόνου, αν υποτεθεί ότι δεν υπάρχει προϊόν κατά την έναρξη της αντίδρασης, τότε είναι απαραίτητη μόνο μια μέτρηση μετά την πάροδο ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος. Αυτό υποδεικνύεται από τον κύκλο στην πειραματική καμπύλη.

Τώρα, η μετρούμενη ταχύτητα είναι 16 μmoles προϊόντος που δημιουργείται ανά 5 min ή περίπου 3 $\mu\text{moles min}^{-1}$. Αυτή η μέτρηση είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη που λήφθηκε με την κινητική μέθοδο. Προφανώς, η κινητική μέθοδος δίνει την πραγματική ταχύτητα, γιατί δεν εμπεριέχει το σφάλμα που προκύπτει από την μείωση της ταχύτητας με τον χρόνο.

Η μέθοδος σταθερού χρόνου μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας τον χρόνο μέτρησης σε 2 min , όπου διατηρείται η γραμμικότητα. Είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η πραγματική ταχύτητα με χρήση της μεθόδου σταθερού χρόνου, αλλά η επιλογή του χρόνου μέτρησης πρέπει να γίνει προσεκτικά.

Γενικά - και αυτό είναι μια προϋπόθεση της μεθοδολογίας Michaelis – Menten, μόνο οι μετρήσεις της αρχικής ταχύτητας δίνουν την πραγματική τιμή της ταχύτητας μιας ενζυμικώς καταλυόμενης αντίδρασης, για ν' αποφεύγονται επιπλοκές που οφείλονται σε αναστολή υποστρώματος, μείωση της συγκέντρωσης υποστρώματος, μετουσίωση του ενζύμου και αναστροφή της αντίδρασης (μετατροπή προϊόντος σε υπόστρωμα).

2.7 | Εφαρμογές μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας

Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται σε μια ενζυμική μέθοδο εξαρτώνται από το τι επιδιώκεται από την μέθοδο αυτή. Υπάρχουν δύο κύριες εφαρμογές μιας ενζυμικής μεθόδου:

Πρώτον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της συγκέντρωσης ενός ενζύμου. Σ' αυτήν την περίπτωση, η μετρούμενη ταχύτητα της ενζυμικώς καταλυόμενης αντίδρασης πρέπει να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Δηλαδή, πρέπει να υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της αρχικής ταχύτητας και της συγκέντρωσης του ενζύμου (η ταχύτητα είναι 1^{ης} τάξεως σε σχέση με την συγκέντρωση του ενζύμου). Για να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις:

1. Οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του συμπαραγόντα (ή συνένζυμου) να βρίσκονται σε περίσσεια.
2. Το αντιδρών μίγμα να μην περιέχει αναστολείς του ενζύμου.
3. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (pH, θερμοκρασία, ιοντική ισχύς) να είναι αυστηρά καθορισμένοι.

Υπό αυτές τις συνθήκες, ένα διάγραμμα της ενζυμικής δραστηριότητας (μmoles προϊόντος που παράγεται ανά min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενζύμου δίνει ευθεία γραμμή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του ενεργού ενζύμου σ' ένα διάλυμα.

Δεύτερον, μια ενζυμική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κινητικών ιδιοτήτων ενός ενζύμου, όπως η K_M , η V_{max} και των χαρακτηριστικών ενζυμικής αναστολής. Εάν πρόκειται να προσδιοριστεί η K_M , οι συνθήκες της μεθόδου πρέπει να προσαρμοστούν έτσι, ώστε η μετρούμενη αρχική ταχύτητα να είναι 1^{ης} τάξεως σε σχέση με το υπόστρωμα.

Για τον προσδιορισμό της K_M ενός υποστρώματος, σταθερές ποσότητες ενζύμου επωάζονται με κυμαινόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ακολούθως, ένα διάγραμμα Lineweaver – Burk μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της K_M .

Αν μια αντίδραση εμπλέκει δύο ή περισσότερα υποστρώματα, το καθένα πρέπει να μελετηθεί ξεχωριστά. Η συγκέντρωση ενός μόνο υποστρώματος κυμαίνεται, ενώ η συγκέντρωση του άλλου διατηρείται σταθερή και σε συνθήκες κορεσμού. Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται και για την μελέτη συμπαραγόντων. Η συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος διατηρούνται σταθερές και μεταβάλλεται η συγκέντρωση του συμπαραγόντα.

Σχετικά με τις μελέτες αναστολής, για τον προσδιορισμό της K_i ισχύει η ίδια πειραματική φιλοσοφία που εφαρμόζεται και για τον προσδιορισμό της K_M . Σε κάθε δοκιμή, προστίθεται μια σταθερή συγκέντρωση αναστολέα και γίνεται διακύμανση της συγκέντρωσης υποστρώματος.

Βιβλιογραφία

- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.
- Holme D.J., Peck H., 1998. Enzymes. In “Analytical Biochemistry”, 3rd Edition, Prentice Hall, Essex, England.
- Switzer R.L., Garrity L.F., 1999. Proteins and enzymology, In “Experimental Biochemistry”, 3rd Edition, W. H. Freeman, Basingstoke, Macmillan, New York, U.S.A.

ΑΣΚΗΣΗ 3^η

Δραστηκότητα πολυφαινολοξειδάσης (PPO) – Συγκριτική αξιολόγηση φυτικών ιστών

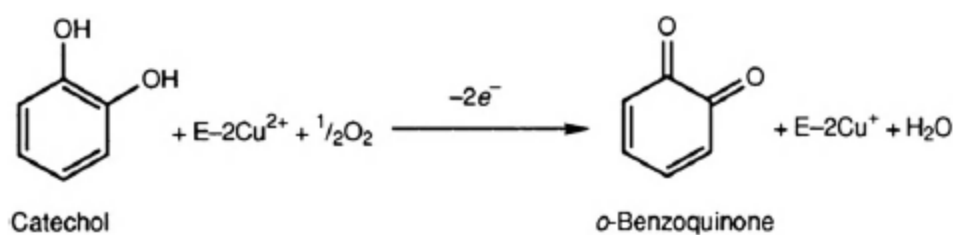
3.1 | Εισαγωγή

Η ενζυμική αμαύρωση (enzymic browning) είναι ένα φαινόμενο που λαμβάνει χώρα σε πολλά φρούτα και λαχανικά, όπως πατάτες, μανιτάρια, μήλα, μπανάνες κτλ. Όταν ο φυτικός ιστός χτυπηθεί, κοπεί, αποφλοιωθεί ή εκτεθεί σε μη-φυσιολογικές συνθήκες ή/και μόλυνση, γίνεται ταχεία αμαύρωση όταν υπάρξει έκθεση στην ατμόσφαιρα. Αυτό είναι αποτέλεσμα της οξειδωσης πολυφαινολικών ενώσεων και μετατροπής τους σε καστανόχρωμα προϊόντα.

Οι σχετικές αντιδράσεις καταλύονται από ένα οξειδωτικό ένζυμο με την κοινή ονομασία «πολυφαινολοξειδάση» (PPO) (EC 1.10.3.2). Αυτό το ένζυμο έχει ως απαίτηση την παρουσία χαλκού ως προσθετική ομάδα, και οξυγόνου. Η PPO κατατάσσεται ως οξειδοοδουκτάση (oxidoreductase), με το οξυγόνο να λειτουργεί ως δέκτης υδρογόνου. Το ένζυμο είναι ευρέως διαδεδομένο στα ανώτερα φυτά, σε μύκητες και ζωικούς ιστούς.

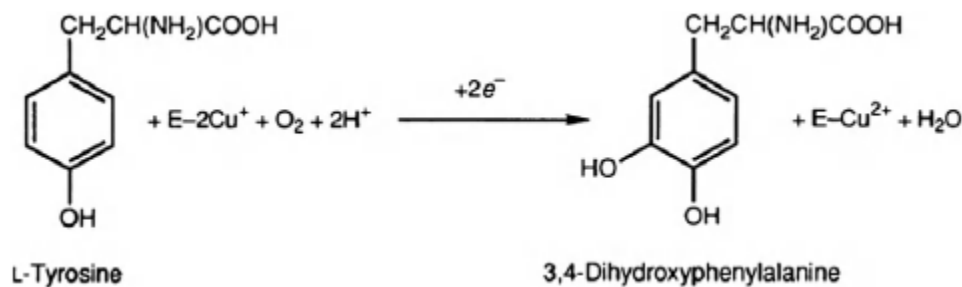
Ο μηχανισμός δράσης της PPO βασίζεται στην ικανότητά της να οξειδώνει πολυφαινολικές ενώσεις. Όταν ένας φυτικός ιστός πληγεί, γίνεται διάρρηξη των πλαστιδίων όπου είναι τοποθετημένη η PPO, και υπάρχει επαφή του ενζύμου με τα υποστρώματα (πολυφαινόλες), που απελευθερώνονται από την διάρρηξη των κενοτοπίων, που είναι το κύριο οργανίδιο αποθήκευσης αυτών των ουσιών.

Η PPO καταλύει δύο τύπους αντιδράσεων: την μετατροπή μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (δραστηκότητα κρεζολάσης) και την οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δραστηκότητα κατεχολάσης). Η αντίδραση κατεχολάσης αντιπροσωπεύεται καλύτερα με την οξείδωση ο-κατεχόλης, ένα κοινό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για εργαστηριακά πειράματα:



Εικόνα 3.1: Αντίδραση κατεχολάσης, καταλυόμενη από την PPO.

Η δραστηκότητα κρεζολάσης (ή μονοφαινολάσης) εμπλέκει την υδροξυλίωση μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες, όπως φαίνεται από την οξείδωση της L-τυροσίνης σε 3,4-διυδροξυφαιτυλαλανίνη, που λαμβάνει χώρα στις πατάτες:



Εικόνα 3.2: Δραστικότητα κρεζολάσης της PPO από πατάτα.

Το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και η κατεχίνη είναι κοινές πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά, και αποτελούν υποστρώματα των PPOs. Οξειδώνονται προς σχηματισμό κινόνων από το οξυγόνο, υπό την παρουσία της PPO.

Οι κινόνες είναι συνήθως πολύ δραστικές και αντιδρούν μεταξύ τους ή με άλλα κυτταρικά συστατικά, παράγοντας μελανές ή καστανές χρωστικές, που γενικά ονομάζονται μελανίνες. Αυτό δημιουργεί αμαύρωση των φυτικών ιστών, με συνέπεια την υποβάθμιση της ποιότητας.

Εντούτοις, η ανάπτυξη αμαύρωσης είναι επιθυμητή για την ποιότητα ορισμένων προϊόντων, όπως το μαύρο τσάι, ο καφές και τα αποξηραμένα δαμάσκηνα.

3.2 | Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

4-Μεθυλκατεχόλη (0.2 M σε φωσφορικό ρυθμιστικό), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (50 mM, pH 6.0), ασκορβικό οξύ, PVPP.

3.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος PPO

Ποσότητα 10 g ιστού (φλοιός πατάτας, μπανάνας, μήλου, μανιτάρια) τεμαχίζεται και συνθλίβεται σε ιγδίο με 15 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού που περιέχει 10 mM ασκορβικού οξέος και 1% PVPP, για 2 min. Το εκχύλισμα φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί φυγοκέντριση στα 20,000×g για 15 min. Το διαυγές υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται απευθείας ως ακατέργαστη πηγή του ενζύμου.

3.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας

Σε πλαστική κυψελίδα του 1 mL προστίθενται 0.88 mL φωσφορικού ρυθμιστικού, 0.1 mL διαλύματος 4-μεθυλκατεχόλης και 0.02 mL εκχυλίσματος PPO. Οι μετρήσεις απορρόφησης στα 395 nm λαμβάνονται κάθε 5 s για περίοδο 90 s.

3.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Δημιουργείται στο Excel πίνακας που έχει ως πρώτη στήλη τις μετρήσεις της A_{395} και ως δεύτερη στήλη τον χρόνο (μετατροπή s σε min). Επιλέγονται τα ζεύγη των τιμών που βρίσκονται πάνω σε ευθεία γραμμή (εξαιρούνται οι τιμές που δίνουν απόκλιση από την γραμμικότητα) και λαμβάνεται η κλίση της ευθείας, η οποία ισοδυναμεί με $\Delta A_{395} \text{ min}^{-1}$.

Από τον νόμο των Beer – Lambert είναι γνωστό ότι $c = \frac{A}{\epsilon \times l}$.

Όπου c = η συγκέντρωση του προϊόντος που δημιουργείται από την ενζυμική αντίδραση (κινόνη της 4-μεθυλκατεχόλης), εκπεφρασμένη σε molarity (M), ϵ = η μοριακή απορροφητικότητα του προϊόντος ($1350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και l η οπτική διαδρομή (1 cm).

Από την παραπάνω εξίσωση συνάγεται ότι $\Delta c = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l}$. Έτσι, προσδιορίζεται η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος, εκπεφρασμένη σε M min^{-1} . Αν το αποτέλεσμα πολλαπλασιαστεί με τον όγκο του αντιδρώντος μίγματος, εκπεφρασμένου σε L (στην συγκεκριμένη περίπτωση ο όγκος είναι $1 \text{ mL} = 0.001 \text{ L}$), τότε λαμβάνεται η αρχική ταχύτητα, εκπεφρασμένη σε moles min^{-1} . Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται πιο βολική, αν μετατραπεί σε $\mu\text{moles min}^{-1}$.

Παράδειγμα

Ας υποθεθεί ότι $\Delta A_{395} \text{ min}^{-1} = 0.1$. Τότε θα έχουμε:

$$\Delta c = \frac{0.1/\text{min}}{1350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ cm}} = 7.407 \times 10^{-5} \text{ M min}^{-1}$$

Πολλαπλασιάζοντας με τον όγκο του αντιδρώντος μίγματος, λαμβάνουμε:

$$7.407 \times 10^{-5} \text{ moles L}^{-1} \text{ min}^{-1} \times 0.001 \text{ L} = 7.407 \times 10^{-8} \text{ moles min}^{-1}$$

Για την μετατροπή των moles σε μmoles , πολλαπλασιάζουμε με 10^6 . Συνεπώς, η τελική έκφραση θα είναι:

$$v = 7.407 \times 10^{-2} \mu\text{moles min}^{-1}$$

3.4 | Συμπεράσματα

Σύγκριση δραστηκότητας της PPO από διάφορες φυτικές πηγές.

Βιβλιογραφία

- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.

- Flurkey W.H., Jen J.J., 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43, 1826-1828.
- Mayer A.M., Harel E., Ben-Shaul R., 1966. Assay of catechol oxidase – a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783-789.
- Mesquita V.L.V., Queiroz C., 2013. Enzymatic browning. In “*Biochemistry of Foods*”, Eskin N.A.M. and Shahidi F. ed., Elsevier Inc., Oxford, U.K.
- Sanchez-Ferrer A., Bru R., Cabanes J., García-Carmona F., 1988. Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 27, 319-321.

ΑΣΚΗΣΗ 4^η

Δραστικότητα περοξειδάσης κρεμμυδιού – Επίδραση του pH

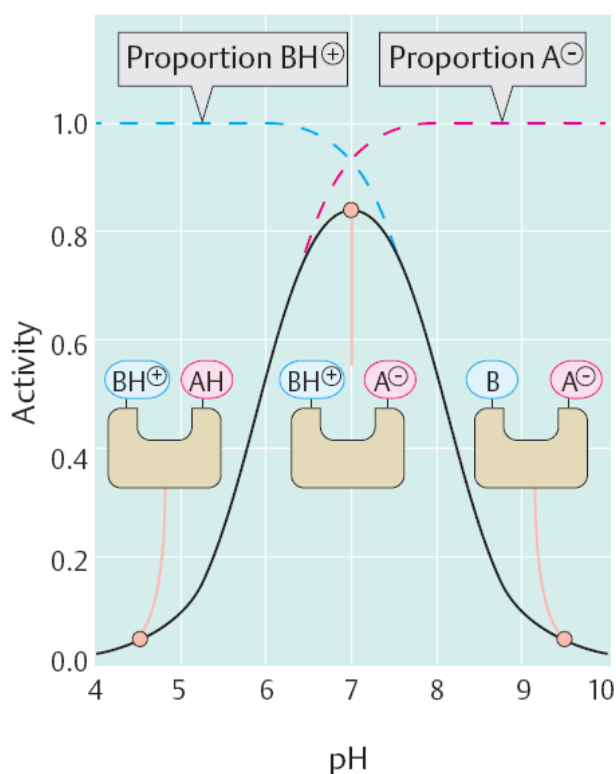
4.1 | Εισαγωγή

Τα ένζυμα έχουν ένα βέλτιστο pH (ή εύρος pH) όπου η δραστικότητά τους μεγιστοποιείται· σε χαμηλότερα ή υψηλότερα pH η δραστικότητα μειώνεται. Αυτό συμβαίνει γιατί τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο δρουν ως ασθενή οξέα / ασθενείς βάσεις και κρίσιμες ιδιότητές τους εξαρτώνται από την κατάσταση ιονισμού τους.

Επίσης, αμινοξέα σε άλλα σημεία πάνω στο μόριο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιονισμένων πλευρικών αλυσίδων παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης.

Το εύρος του pH μέσα στο οποίο το ένζυμο υπόκειται σε αλλαγές στη δραστικότητα μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο του κατάλοιπου του αμινοξέως που εμπλέκεται στο μηχανισμό.

Για παράδειγμα, μια αλλαγή σε pH γύρω στο 7 αντανάκλα αλλαγές στο ιονισμό ενός κατάλοιπου ιστιδίνης.



Εικόνα 4.1: Μεταβολή ιονισμού των καταλοίπων αμινοξέων στο ενεργό κέντρο ενζύμου και η επίδραση στην δραστικότητα, ως αποτέλεσμα της μεταβολής του pH.

Οι περοξειδάσες (PODs) ανευρίσκονται ευρέως σε φυτικούς ιστούς. Οι περοξειδάσες αίμης (EC 1.11.1.7) έχουν μια προσθετική ομάδα φεριπρωτοπορφυρίνης IX (ferritroporphyrin IX) στο ενεργό τους κέντρο, και καταλύουν την οξειδωτική σύζευξη φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιώντας H_2O_2 ως οξειδωτικό

παράγοντα. Αυτή η αντίδραση είναι μια κυκλική αντίδραση τριών βημάτων, κατά την οποία το ένζυμο πρώτα οξειδώνεται από το H_2O_2 , και κατόπιν σε δύο διαδοχικά βήματα μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από τα αναγωγικά υποστρώματα (φαινόλες).

4.2 | Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Χημικές ουσίες κι αντιδραστήρια

Διάλυμα γουαϊακόλης 5% (w/v) σε DMF, PVPP, ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού-όξινου φωσφορικού (0.1 M, pH 4.5, 5.5, 6.5 και 7.5),

4.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος POD

Ποσότητα 1 g νωπού βολβού κρεμμυδιού (εδώδιμος ιστός) ομογενοποιείται με 4 g PVPP και 50 mL ρυθμιστικού (0.1 M, pH 6.5). Το μίγμα φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί φυγοκέντριση στα $20,000\times g$ για 15 min. Το διαυγές υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται απευθείας ως ακατέργαστη πηγή του ενζύμου.

4.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Το αντιδρών μίγμα περιέχει 0.68 mL ρυθμιστικού (0.1 M, pH 6.5) και 0.1 mL διαλύματος γουαϊακόλης (5%). Η παρακολούθηση της αντίδρασης γίνεται στα 470 nm για 180 s, σε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Το αντιδρών μίγμα αφήνεται αρχικά προς εξισορρόπηση για μερικά δευτερόλεπτα, και η δραστηριότητα προσδιορίζεται μεταξύ των 70 και 140 s, όπου υπάρχει διατήρηση της γραμμικότητας.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό με τιμές pH 4.5, 5.5, και 7.5.

4.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Ο υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Η δραστηριότητα υπολογίζεται με βάση την τιμή $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για την ϵ , για το έγχρωμο προϊόν που δημιουργείται.

Δημιουργείται γράφημα που παρουσιάζει την μεταβολή της δραστηριότητας σε σχέση με το pH. Εύρεση βέλτιστου pH και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα.

4.4 | Συμπεράσματα

Σχολιασμός για το βέλτιστο pH.

Βιβλιογραφία

- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.

- Flurkey W.H., Jen J.J., 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43, 1826-1828.
- Hirota S., Shimoda T., Takahama U., 1998. Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3497-3502.
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Martins Peruch L.A., Rocha M., Maraschin, M., 2016. The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry*, 197, 737-746

ΑΣΚΗΣΗ 5^η

Αναστολή Ενζυμικής Δραστικότητας της PPO – Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών

5.1 | Εισαγωγή

Έχουν περιγραφεί πολλοί αναστολείς της PPO, με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα η γλυκόζη και η φρουκτόζη, το σαλικυλικό οξύ, το κινναμμωνικό οξύ, η ουρία, κυστεΐνη, το ασκορβικό οξύ, το κιτρικό οξύ κτλ.

Για τους αναστολείς της PPO, γίνεται συνήθως διάκριση μεταξύ των συμπλοκοποιητών χαλκού (copper chelators), που επιφέρουν μια συναγωνιστική σε σχέση με το οξυγόνο, αναστολή, και των ανάλογων των υποστρωμάτων (substrate analogues), που προκαλούν συναγωνιστική, σε σχέση με το φαινολικό υπόστρωμα, αναστολή.

Εντούτοις, αυτή η κατηγοριοποίηση είναι καθαρά ενδεικτική, καθώς πολλοί αναστολείς δεν εντάσσονται σε κάποια κατηγορία και συμπεριφέρονται ως μικτού τύπου αναστολείς (mixed-type inhibitors) (συναγωνιστικού/μη-συναγωνιστικοί).

Η δράση των συμπλοκοποιητών χαλκού εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ενεργού κέντρου, μιας και είναι γνωστό ότι ο δισθενής και ο μονοθενής χαλκός συμπεριφέρονται διαφορετικά.

5.2 | Υλικά και μέθοδοι

Η προετοιμασία του ακατέργαστου εκχυλίσματος γίνεται σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.2. Η μέτρηση της δραστικότητας γίνεται σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.3, αλλά γίνονται μετρήσεις δραστικότητας και υπό την παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ουρίας.

Πιο συγκεκριμένα, στο αντιδρών μίγμα, αντί για την προσθήκη 0.88 mL φωσφορικού ρυθμιστικού, προστίθεται ο ίδιο όγκος ρυθμιστικού που περιέχει 0.4, 0.8 και 0.12 mM ουρίας.

5.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Ο υπολογισμός της ενζυμικής δραστικότητας γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Δημιουργείται γράφημα Lineweaver-Burk για να βρεθεί το είδος της αναστολής. Υπολογίζονται οι κινητικές σταθερές χωρίς και υπό την παρουσία αναστολέα. Αναφέρονται σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα.

5.4 | Συμπεράσματα

Το είδος της αναστολής που προκαλείται από την ουρία.

Βιβλιογραφία

- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.
- Flurkey W.H., Jen J.J., 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. Journal of Food Science, 43, 1826-1828.

- Lv C., Zhao G., Ning Y., 2017. Interactions between plant proteins/enzymes and other food components, and their effects on food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1718–1728.
- Mayer A.M., Harel E., Ben-Shaul R., 1966. Assay of catechol oxidase – a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783–789.
- Sanchez-Ferrer A., Bru R., Cabanes J., García-Carmona F., 1988. Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 27, 319–321.

ΑΣΚΗΣΗ 6^η

Επίδραση Θερμικής Επεξεργασίας στην Δραστικότητα Περοξειδάσης Κρεμμυδιού

6.1 | Εισαγωγή

Τα λαχανικά και μερικά φρούτα υπόκεινται σε ζεμάτισμα κατά τις διεργασίες κονσερβοποίησης και κατάψυξης. Αν δεν υπάρξει επαρκής αδρανοποίηση των ενζύμων, η εναπομένουσα δραστικότητά τους μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, γεύσης και δυσχρωματισμό. Αυτά τα φαινόμενα συνήθως συνδέονται με την δραστικότητα POD. Γι' αυτό, η μέτρηση της δραστικότητας αυτού του ενζύμου μπορεί ν' αποτελέσει έναν δείκτη επαρκούς επεξεργασίας (ζεματίσματος).

Στην περίπτωση των φρέσκων φρούτων και λαχανικών, αλλά και των φρεσκοκομμένων προϊόντων (σαλάτες, λαχανικά έτοιμα προς μαγείρεμα), οι θερμικές επεξεργασίες χρησιμοποιούνται γενικά για την πρόληψη φυσιολογικών διαταραχών, όπως ο τραυματισμός από ψύξη (chilling injury) και ο δυσχρωματισμός. Αυτές οι διαταραχές έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ποιότητας, που σχετίζεται με τον μεταβολισμό των πολυφαινολών.

Διεργασίες υψηλής θερμοκρασίας/σύντομου χρόνου (HTST) μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα αυτών των τροφίμων, υπό την προϋπόθεση ότι επιτυγχάνουν απενεργοποίηση των οξειδωτικών ενζύμων. Η μέτρηση της δραστικότητας της POD, που θεωρείται το πιο θερμικώς ανθεκτικό ένζυμο, δίνει μια καλή εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών HTST.

Συχνά παρατηρείται το φαινόμενο αναγέννησης της δραστικότητας της POD μετά από θερμικές επεξεργασίες, λόγω του επανασυνδυασμού την ομάδας της αίμης με την από-περοξειδάση. Αυτή η διαδικασία επανενεργοποίησης είναι σημαντική, γιατί η POD που έχει θερμανθεί μεταξύ 90 και 125 °C μπορεί ν' ανακτήσει μέγιστη δραστικότητα μετά από 6 μέρες, στους 25 °C. Επομένως, συστήνονται επεξεργασίες μεγαλύτερης διάρκειας για να εξασφαλιστεί η απενεργοποίηση της POD, και για να ελεγχθεί η δραστικότητα της POD κατά την αποθήκευση.

6.2 | Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 | Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Η προετοιμασία του εκχυλίσματος και η μέτρηση δραστικότητας περιγράφονται στις παραγράφους 4.2.2 και 4.2.3.

6.2.2 Θερμική επεξεργασία

Η θερμική επεξεργασία συνίσταται στην θέρμανση ορισμένου όγκου ακατέργαστου εκχυλίσματος POD κρεμμυδιού, σε υδατόλουτρο, στους 70 °C, για 1, 2, 4 και 8 λεπτά. Ακολούθως, γίνεται μέτρηση της δραστικότητας και υπολογίζεται η % εναπομείνασα δραστικότητα, σε σχέση με το δείγμα που δεν υποβλήθηκε σε θερμική επεξεργασία.

Για να διαπιστωθεί η θερμική σταθερότητα του ενζύμου, λαμβάνονται οι εξής μετρήσεις:

- ΔA_1 = μέτρηση για το ένζυμο σε θερμοκρασία δωματίου.

- ΔA_2 = μέτρηση για το ένζυμο στους 70 °C.

Όπου ΔA είναι η μεταβολή στην απορρόφηση, στα 470 nm, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Η % εναπομείνασα δραστηριότητα (% activity remaining) υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ Activity remaining}_{\text{free}} = \frac{\Delta A_2}{\Delta A_1} \times 100$$

6.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Επίδραση του χρόνου θερμικής επεξεργασίας στην δραστηριότητα της POD. Προεκτάσεις στην τεχνολογία τροφίμων. Αναφορά βιβλιογραφικών δεδομένων.

6.4 | Συμπεράσματα

Βέλτιστη θερμική επεξεργασία για πλήρη απενεργοποίηση της POD.

Βιβλιογραφία

- Boyer R., 2000. Modern Experimental Biochemistry, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.
- Flurkey W.H., Jen J.J., 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. Journal of Food Science, 43, 1826-1828.
- Hirota S., Shimoda T., Takahama U., 1998. Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3497-3502.
- Tomás-Barberán F.A., Espín J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of the Science of Food & Agriculture, 81, 853-876.
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Martins Peruch L.A., Rocha M., Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. Food Chemistry, 197, 737-746

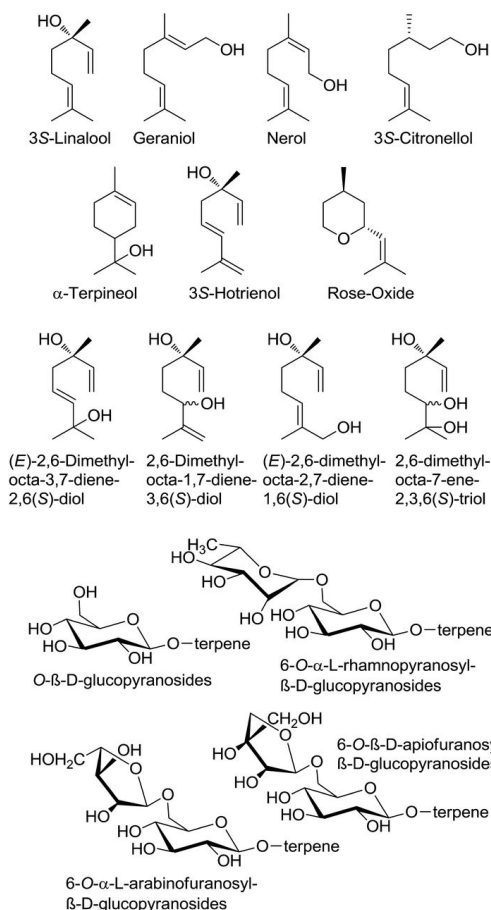
ΑΣΚΗΣΗ 7^η

Μέτρηση δραστηρότητας β-γλυκοζιδάσης

7.1 | Εισαγωγή

Σε πολλά φρούτα, εκτός από τις πτητικές αρωματικές ουσίες, ένα σημαντικό μέρος των αρωματικών ενώσεων συσσωρεύεται ως μη-πτητικοί γλυκοζίτες, που ονομάζονται πρόδρομες γλυκοζιτικές ενώσεις. Η αγλυκόνη αυτών των γλυκοζιτών μπορεί να είναι μονοτερπένιο, C13-νορισοπρενοϊδές, βενζολικό παράγωγο ή αλιφατικές αλκοόλες μακριάς αλύσου.

Το σάκχαρο μπορεί να είναι γλυκόζη (*O*-β-D-γλυκοζίτες) ή δισακχαρίτης (*O*-διγλυκοζίτες). Στην περίπτωση των διγλυκοζιτών, η γλυκόζη αντικαθίσταται από μονοσακχαρίτες όπως η α-L-αραβινοφουρανόζη, η α-L-αραβινοπυρανόζη, α-L-ραμνοπυρανόζη, β-D-απιοφουρανόζη, και η β-D-ξυλοπυρανόζη.

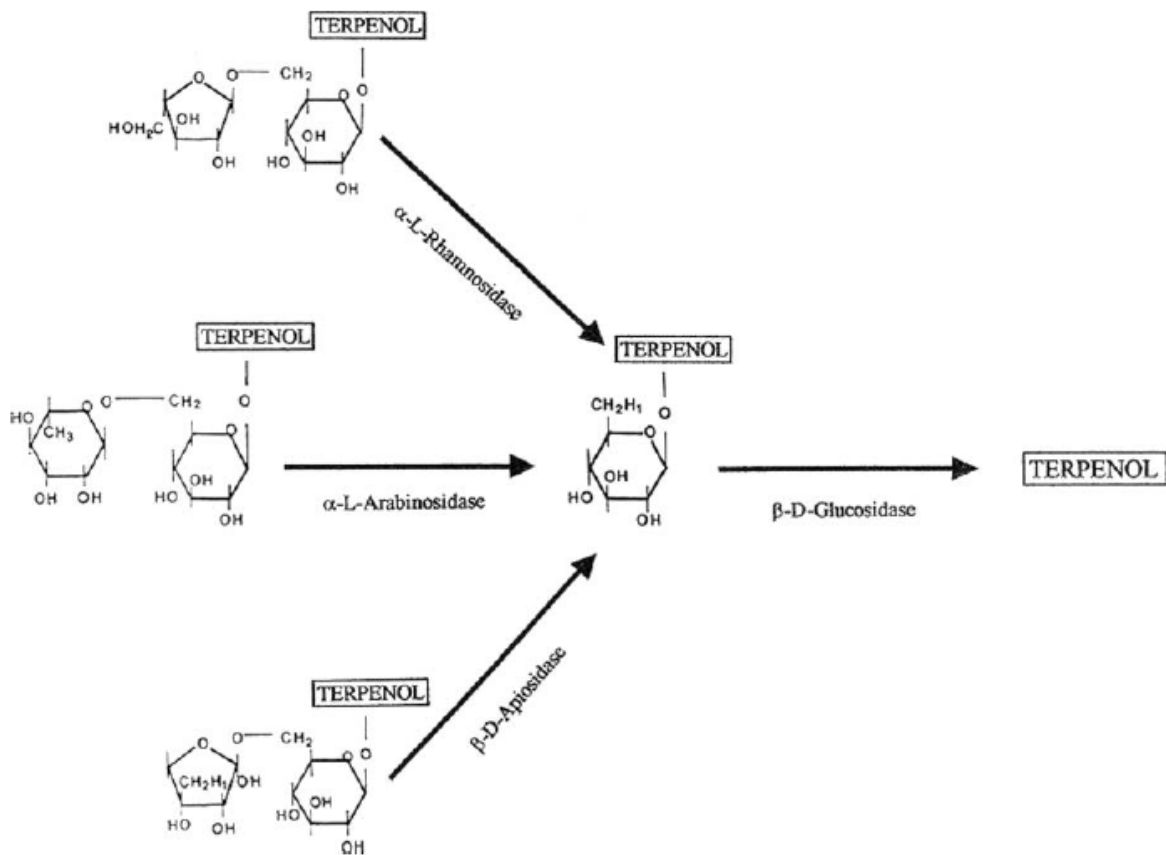


Εικόνα 7.1: Γλυκοζίτες που βρίσκονται σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

Στα φρούτα, τα γλυκοζιτικά παράγωγα αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών ενώσεων, ενώ τα ελεύθερα (μη-γλυκοζυλιωμένα) πτητικά υπάρχουν σε αρκετά χαμηλότερη περιεκτικότητα. Επομένως, η ενίσχυση του αρώματος προϊόντων όπως π.χ. χυμοί, μέσω υδρόλυσης των πρόδρομων ουσιών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον.

Τα γλυκοζιτικά παράγωγα μπορούν να υδρολυθούν με ένζυμα όπως οι γλυκοϋδρολάσες β-γλυκοζιτών, κοινώς γνωστές ως β-γλυκοζιδάσες. Στην ενζυμική απελευθέρωση των πτητικών αρωματικών, εμπλέκεται μια διαδοχική υδρόλυση ή μια αντίδραση ενός σταδίου.

Η διαδοχική υδρόλυση αφορά στους διγλυκοζίτες, όπου εμπλέκονται εξωγλυκοζιδάσες, ανάλογα με την δομή του δισακχαρίτη. Μετά την διάσπαση του δεσμού μεταξύ των δύο μονοσακχαριτών, που παράγει έναν μονοσακχαρίτη και έναν μονογλυκοζίτη, η β-γλυκοζιδάση απελευθερώνει την πτητική ουσία από την γλυκόζη.



Εικόνα 7.2: Οδοί ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζιτών.

Οι γλυκοζιδάσες από μύκητες και ζύμες έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς μελέτης για την πιθανή τους χρήση σε διεργασίες ενίσχυσης του αρώματος φρουτοχυμών και οίνων.

7.2 | Υλικά και μέθοδοι

7.2.1 | Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό οξικού (0.1 M, pH 5.0), PVPP, διάλυμα *p*-νιτροφαινυλ β-D-γλυκοζίτη (5 mM σε νερό), διάλυμα ανθρακικού νατρίου (1 M).

7.2.2 Προετοιμασία ακατέργαστου εκχυλίσματος

Ποσότητα 1 g νωπού βολβού κρεμμυδιού (εδώδιμος ιστός) ομογενοποιείται με 4 g PVPP και 50 mL ρυθμιστικού. Το μίγμα φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί φυγοκέντριση στα 20,000×g για 15 min. Το διαυγές υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται απευθείας ως ακατέργαστη πηγή του ενζύμου.

7.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Το αντιδρών μίγμα αποτελείται από 0.2 mL ρυθμιστικό οξικού, 0.1 mL εκχύλισμα ενζύμου, και 0.2 mL διάλυμα *p*-νιτροφαινυλ β-D-γλυκοζίτη. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 60 min. Ακολούθως, προστίθενται 0.5 mL ανθρακικού νατρίου, και λαμβάνεται η απορρόφηση στα 400 nm.

7.3 | Αποτελέσματα και συζήτηση

Ο υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Η ΔΑ υπολογίζεται ως $A_{60} - A_0$, όπου A_{60} και A_0 είναι η απορρόφηση στα 400 nm, σε χρόνο 60 και 0 min, αντίστοιχα. Ως ϵ χρησιμοποιείται η τιμή $18.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Λόγος ύπαρξης της β-γλυκοζιδάσης στα κρεμμύδια. Αναφορά φυσιολογικών υποστρωμάτων.

7.4 | Συμπεράσματα

Ανίχνευση δραστηριότητας β-γλυκοζιδάσης στα κρεμμύδια.

Βιβλιογραφία

- Bourbouze R., Pratiel-Sosa F., Percheron, F., 1975. Rhamnodiasatase et α -L-rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum*. *Phytochemistry*, 14, 1279-1282.
- Bowers Jr G.N., McComb R.B., Christensen R.G., Schaffer R., 1980. High-purity 4-nitrophenol: purification, characterization, and specifications for use as a spectrophotometric reference material. *Clinical Chemistry*, 26, 724-729.
- Boyer R., 2000. *Modern Experimental Biochemistry*, 3rd Edition, Benjamin Cummings, CA, U.S.A.
- Hirota S., Shimoda T., Takahama U., 1998. Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3497-3502.

- Pogorzelski E., Wilkowska A., 2007. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 251–254.
- Shoseyov O., Bravdo B.A., Ikan R., Chet I., 1988. Endo- β -glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycoside-containing medium. *Phytochemistry*, 27, 1973-1976.