

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΤΙΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ ΑΠΟ ΠΑΤΑΤΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

1

Βιοχημικές μελέτες της φωσφορυλάσης από πατάτα
Biochemical studies of potato phosphorylase

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ. Λεωνίδας Δημήτριος (επιβλέπων) Καθηγητής Βιοχημείας

Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού

Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	7
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
Εισαγωγή.....	10
Κεφάλαιο 1 ^ο : Άμυλο.....	12
1.1. Εισαγωγικά Στοιχεία.....	12
1.2. Ιστορική αναδρομή.....	13
1.3. Αποθήκη ενέργειας φυτών.....	13
1.3.1. Βιοσύνθεση αμύλου.....	14
1.3.2. Αποικοδόμηση αμύλου.....	14
1.4. Ιδιότητες.....	14
1.4.1. Δομή.....	14
1.4.2. Υδρόλυση.....	15
Κεφάλαιο 2 ^ο : Φωσφορυλάση & Φωσφορυλίωση.....	15
2.1. Φωσφορυλάση.....	15
2.1.1. Λειτουργία.....	16
2.1.2. Τύποι.....	16
2.1.3. Ενεργοποίηση.....	16
2.2. Φωσφορυλίωση.....	17
2.2.1. Γλυκόζη.....	17
2.2.2. Τριφωσφορική αδενοσίνη.....	17
2.2.3. Γλυκόλυση.....	18

Κεφάλαιο 3 ^ο : Φωσφορυλάση αμύλου.....	19
3.1. Εισαγωγικά Στοιχεία.....	19
3.1.1. Κατανομή.....	19
3.2. Πολλαπλότητα ενζύμων.....	20
3.3. Σημασία της φωσφορυλάσης αμύλου.....	20
3.3.1. Σημασία της πλαστιδιακής SP στα φυτά.....	20
3.3.2. Σημασία της κυτοσολικής SP στα φυτά.....	21
3.3.3. Βιοχημικές πτυχές.....	22
3.4. Δομή και Λειτουργία.....	23
3.5. Πιθανοί ρόλοι των πλαστιδιακών φωσφορυλασών.....	23
3.6. Πιθανοί ρόλοι κυτοσολικών φωσφορυλασών.....	24
3.7. Βιοτεχνολογικές πτυχές/βιομηχανικές εφαρμογές.....	25
Κεφάλαιο 4 ^ο : Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	27
4.1. Χαρακτηρισμός των ενζύμων.....	27
4.2. Ενζυμική κινητική.....	27
4.3. Κινητική Michaelis-Menten.....	27
4.4. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή Lineweaver-Burk.....	29
4.5. Σταθερά αναστολής K_i	29
4.6. Αλλοστερικά ένζυμα.....	31
4.7. IC_{50}	32
Κεφάλαιο 5 ^ο : Υλικά-Μέθοδοι.....	33
5.1. Αντιδραστήρια.....	33
5.2. Υλικά και όργανα.....	34
5.3. Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP.....	34
5.4. Μέθοδος ασκορβικού οξέος.....	34
5.5. Προσδιορισμός K_m	35

5.6. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα Ks511 έναντι της PSP	35
Κεφάλαιο 6 ^ο : Αποτελέσματα.....	38
6.1. Προσδιορισμός της K_m	38
6.2. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα Ks511 έναντι της PSP	38
Κεφάλαιο 7 ^ο : Συζήτηση.....	39
Βιβλιογραφία.....	40
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	40
Ελληνική.....	46

Ευχαριστίες:

Μέσα από αυτές τις λίγες γραμμές, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη, καθηγητή του τμήματος της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ανάθεση της παραπάνω πτυχιακής εργασίας. Η πραγμάτωση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του Γεώργιου Στραβοδήμου αλλά και του Συμεών Κούλα που με τις υποδείξεις, την καθοδήγηση και την προθυμία τους, κατάφερα να ολοκληρώσω το τελευταίο κομμάτι των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την οικονομική, αλλά και την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Το άμυλο αποτελεί τη μεγαλύτερη δεξαμενή/αποθήκη υδατανθράκων για τα φυτά. Η έναρξη της σύνθεσης-αποδόμησης αμύλου στα πλαστίδια εξαρτάται κυρίως από τον κύκλο ημέρας-νύχτας, τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και τη φωσφορυλίωση του αμύλου. Ένας σημαντικός μεσολαβητικός ρόλος μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του αμύλου αποδίδεται στις φωσφορυλάσες του αμύλου. Το ένζυμο της φωσφορυλάσης εμπλέκεται στη φωσφορολυτική αποικοδόμηση του αμύλου. Παράλληλα θεωρείται πως καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση, τη μεταφορά μονάδων γλυκοζυλίου από τη 1-φωσφορική γλυκόζη στο μη αναγωγικό άκρο της αλυσίδας της γλυκάνης με απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων. Η πολυπλοκότητα των ενζύμων της φωσφορυλάσης του αμύλου έχει παρατηρηθεί πως κατέχει διαφορετικούς ρόλους στο μεταβολισμό του αμύλου. Στην παρούσα εργασία περιγράφονται το άμυλο, η φωσφορυλάση αμύλου όπως επίσης και η σημασία/ρόλος της πλαστιδιακής και της κυτοσολικής φωσφορυλάσης αμύλου.

Abstract

Starch is the largest carbohydrate reservoir for plants. The onset of starch synthesis-degradation in plastids depends mainly on the day-night cycle, post-translational regulation of enzyme activity, and starch phosphorylation. An important mediating role between starch synthesis and degradation is attributed to starch phosphorylases. Phosphorylase is involved in the phosphorolytic degradation of starch. In parallel, it is considered that it also catalyzes the reverse reaction, the transport of glycosyl units from glucose 1-phosphate to the non-reducing end of the glucan chain with the release of inorganic phosphate. The complexity of starch phosphorylase enzymes has been observed to play different roles in starch metabolism. The present work describes starch, and starch phosphorylase as well as the importance / role of starch plastic and cytosolic phosphorylase.

Εισαγωγή

Οι υδατάνθρακες αποτελούν τη δεύτερη μεγάλη κατηγορία βιομορίων στον ανθρώπινο οργανισμό (πρώτη είναι οι πρωτεΐνες). Μαζί με τα λίπη συνιστούν τις κύριες πηγές ενέργειας του οργανισμού (Flitsch and Ulijn, 2003). Σε σχέση με τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες μπορούν να χαρακτηριστούν ως πιο άμεση πηγή ενέργειας. Εκτός των μορίων γλυκόζης και γλυκογόνου που είναι άμεσα συνδεδεμένα με την παροχή και αποθήκευση ενέργειας στον οργανισμό, ορισμένοι υδατάνθρακες όπως το υαλουρονικό οξύ, η δερματάνη, η κερατάνη, η θειική χονδροϊτίνη και η ηπαρίνη συμμετέχουν στη δομή και τη λειτουργία των αρθρώσεων, του δέρματος, των αγγείων, του κερατοειδούς κλπ. Ορισμένοι υδατάνθρακες συνδέονται με εξωκυττάρια πρωτεΐνες επηρεάζοντας τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Επίσης συνδέονται με πρωτεΐνες και λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους και με το συνδετικό ιστό (Flitsch and Ulijn, 2003).

Οι υδατάνθρακες (όπως γίνεται φανερό και από το όνομά τους) αποτελούνται από τα στοιχεία άνθρακα C, υδρογόνο H και οξυγόνο O σε αναλογία C:H:O 1:2:1 με γενικό μοριακό τύπο (CH₂O)_n δηλαδή σε κάθε άνθρακα αντιστοιχούν δύο άτομα υδρογόνου και ένα άτομο οξυγόνου όπως στο μόριο του νερού. Πρόκειται για πολυυδροξυαλδεΐδες (αλδόζες) ή πολυυδροξυκετόνες (κετόζες). Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα χαρακτηρίζονται ως τριόζες, τετρούζες, πεντόζες, εξόζες κλπ. Οι απλούστεροι υδατάνθρακες που απαντώνται στον οργανισμό αποτελούνται από τρία άτομα άνθρακα και είναι οι τριόζες γλυκεραλδεΐδη (αλδοτριόζη) και διυδροξυακετόνη (κετοτριόζη) (Flitsch and Ulijn, 2003).

Η απλούστερη αλδόζη, η γλυκεραλδεΐδη, είναι ασύμμετρο μόριο. Συγκεκριμένα έχει ασύμμετρο το δεύτερο άτομο άνθρακα. Για το λόγο αυτό παρατηρούνται δύο ισομερείς μορφές της γλυκεραλδεΐδης, ανάλογα με τη θέση του υδροξυλίου του δεύτερου άνθρακα, η D- και L-μορφή (Reed, 2013). Οι υδατάνθρακες με περισσότερα άτομα άνθρακα έχουν περισσότερα ασύμμετρα άτομα και μπορούν να δώσουν πολύ περισσότερα ισομερή. Συνηθίστηκε ωστόσο να χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τη συμμετρία του πιο απομακρυσμένου από την αλδεΐδομάδα ασύμμετρου ατόμου άνθρακα που περιέχουν. Έτσι, αν αυτό παρουσιάζει ίδια συμμετρία με τον άνθρακα 2 της D-γλυκεραλδεΐδης χαρακτηρίζονται ως D-υδατάνθρακες. Αν παρουσιάζει όμοια συμμετρία με τον άνθρακα 2 της L-γλυκεραλδεΐδης χαρακτηρίζονται ως L-υδατάνθρακες (Reed, 2013).

Οι περισσότεροι υδατάνθρακες που απαντώνται στη φύση έχουν διαμόρφωση D αν και υπάρχουν και υδατάνθρακες με διαμόρφωση L. Οι τριόζες απαντώνται στον οργανισμό μας κυρίως ως ενδιάμεσα προϊόντα αντιδράσεων. Οι συνηθέστεροι υδατάνθρακες που αποτελούν τις δομικές μονάδες των μεγαλομοριακών υδατανθράκων των τροφών και του οργανισμού μας αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα, είναι δηλαδή εξόζες. Οι εξόζες αυτές χαρακτηρίζονται ως μονοσακχαρίτες ενώ οι μεγαλομοριακοί υδατάνθρακες που συντίθενται απ' αυτούς χαρακτηρίζονται ως πολυσακχαρίτες (βιβλίο Βιοχημείας, 2012).

Οι δισακχαρίτες σχηματίζονται με δημιουργία δεσμού μεταξύ δύο μονοσακχαριτών (IUPAC, 2014). Οι δεσμοί αυτοί ονομάζονται γλυκοζιτικοί. Για το χαρακτηρισμό των δεσμών λαμβάνονται υπ' όψη η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα των δύο μονοσακχαριτών που συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρα οξυγόνου και η στερεοχημεία του δεσμού (α ή β). Έτσι παρατηρείται δημιουργία α (1→4) γλυκοζιτικών δεσμών, β (1→4) γλυκοζιτικών δεσμών, α (1→6) γλυκοζιτικών δεσμών κλπ.. Επισημαίνεται ότι το είδος του δεσμού έχει ιδιαίτερη σημασία αφού υπάρχουν ένζυμα που μπορούν να υδρολύουν τον α (1→4) αλλά όχι τον β (1→4) ή τον α (1→6) γλυκοζιτικό δεσμό. Στους δισακχαρίτες ανήκει η σακχαρόζη ή σουκρόζη (κοινώς η ζάχαρη) και η λακτόζη ο κύριος δισακχαρίτης του γάλακτος. Η σουκρόζη αποτελείται από 2 μόρια: ένα γλυκόζη και ένα φρουκτόζη ενωμένα με 1→2 γλυκοζιτικό δεσμό. Η λακτόζη αποτελείται επίσης από 2 μόρια: ένα γλυκόζη και ένα γαλακτόζη ενωμένα με β 1→4 γλυκοζιτικό δεσμό. Ο δισακχαρίτης που αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης ενωμένα με α 1→4 γλυκοζιτικό δεσμό ονομάζεται μαλτόζη (IUPAC, 2014).

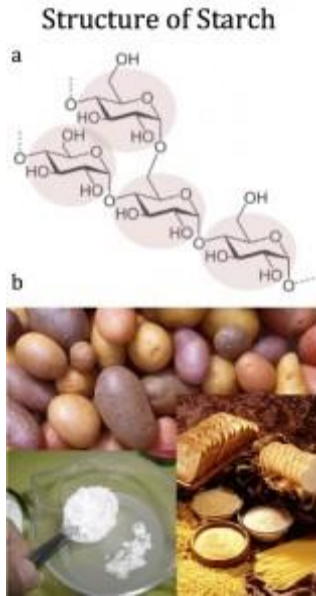
Οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από πολλούς μονοσακχαρίτες οι οποίοι είναι ενωμένοι με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι σημαντικότεροι πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο και το γλυκογόνο που αποτελούνται από μόρια γλυκόζης. Το άμυλο αποτελεί το σημαντικότερο πολυσακχαρίτη των φυτών, ενώ το γλυκογόνο των ζώων. Το άμυλο είναι μείγμα δύο πολυσακχαριτών, της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης. Η αμυλόζη (γραμμικός πολυσακχαρίτης) αποτελείται από μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα μόνο με α (1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η μαλτόζη θεωρείται δομική μονάδα της αμυλόζης. Η αμυλοπηκτίνη από την άλλη είναι ένας διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης. Στο γραμμικό τμήμα του μορίου, τα δομικά στοιχεία της γλυκόζης ενώνονται ξανά με α (1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στην αμυλοπηκτίνη και το γλυκογόνο, εκτός από α (1→4) υπάρχουν και γλυκοζιτικοί δεσμοί α (1→6) δεσμοί, στα σημεία έναρξης μιας διακλάδωσης. Τόσο το άμυλο όσο και το γλυκογόνο λειτουργούν ως αποθήκες γλυκόζης των φυτικών και ζωικών οργανισμών αντίστοιχα (Eastwood and Kritchevsky, 2005). Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη της φωσφορυλάσης του αμύλου.

Κεφαλαίο 1ο : Άμυλο

1.1. Εισαγωγικά Στοιχεία

Το άμυλο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από πολυάριθμους μονοσακχαρίτες ενωμένους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η παραγωγή αυτού του πολυσακχαρίτη προέρχεται από τα περισσότερα πράσινα φυτά και χρησιμεύει ως «αποθήκη» ενέργειας. Παγκοσμίως, στην ανθρώπινη διατροφή, είναι ο πιο κοινός υδατάνθρακας καθώς βρίσκεται άφθονο σε βασικά προϊόντα, όπως στο σιτάρι, στις πατάτες, στο καλαμπόκι και στο ρύζι. Το καθαρό άμυλο χαρακτηρίζεται ως άχρωμη, άοσμη και άγευστη σκόνη η οποία δεν διαλύεται σε αλκοόλ ή κρύο νερό. Οι κόκκοι αμύλου αποτελούνται από ομόκεντρους και παρεμβαλλόμενους δακτυλίους «ανάπτυξης» αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης. Η αμυλόζη είναι ως επί το πλείστον γραμμική ενώ η αμυλοπηκτίνη έχει δομή σαν δέντρο (συνδεδεμένες αλυσίδες πολυσακχαριτών). Στην αμυλοπηκτίνη, οι διπλές έλικες μπορούν να σχηματίσουν συστάδες διαφορετικών διατάξεων που προκαλούν τις ημι-κρυσταλλικές ιδιότητες του κόκκου (Adélaïde and Oliver, 2017).

Η πηγή από την οποία προέρχεται το άμυλο συχνά περιέχει σε ποσοστό κατά βάρος (% w/w) 20-25% αμυλόζης και 75-80% αμυλοπηκτίνης αντίστοιχα (Brown and Roon, 2005). Το γλυκογόνο (η αντίστοιχη αποθήκη ενέργειας ενός ζώου) αποτελεί και αυτό μια διακλαδισμένη εκδοχή της αμυλοπηκτίνης. Στη βιομηχανία, το άμυλο συχνά χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης σε ποτά (μπύρα, ούισκι κ.α.) και για ενέργεια ως βιοκαύσιμο. Στον τομέα της διατροφής, υποβάλλεται σε περεταίρω επεξεργασία για τη δημιουργία σακχάρων, όπου χρησιμεύουν σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Η ανάμειξη αμύλων και ζεστού νερού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πάστας που χρησιμεύει ως σκληρυντικό, κολλητικό ή πηκτικό. Στο εμπόριο χρησιμοποιείται για την παρασκευή υλικών κόλλας και ηλεκτροδίων. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία ως συνδετικό σε συστήματα αποθήκευσης ενέργειας με μη υδατικούς ηλεκτρολύτες (Paweł and Przemysław, 2019).



Εικόνα 1.1 . : a) Τα μόρια του αμύλου είναι μακριές, διακλαδισμένες αλυσίδες του σακχάρου, της γλυκόζης, συνδεδεμένες μεταξύ τους. Η ροζ σκίαση υποδηλώνει μεμονωμένα μόρια γλυκόζης.
b) Το καθαρό άμυλο, είναι μια λεπτή, λευκή, άγευστη σκόνη.

1.2. Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτοι κόκκοι αμύλου που βρέθηκαν ως αλεύρι σε ευρωπαϊκές μυλόπετρες χρονολογούνται 300.000 χρόνια πριν (Revedin et al., 2010). Κόκκοι αμύλου σόργου (σιτηρού) 100.000 χρόνων πριν βρέθηκαν σε μυλόπετρες των σπηλαίων Ngalue στη Μοζαμβίκη (The Telegraph, 2009). Στην αρχαία Αίγυπτο, φαίνεται να χρησιμοποιήθηκε καθαρός πολτός αμύλου σίτου για τη συγκόλληση παπύρων (Pliny the Elder, 2009). Ο διαχωρισμός του αμύλου περιγράφηκε για πρώτη φορά γύρω στο 77-79 μ.Χ.. Η χρήση του από τους Ρωμαίους ήταν αυτή του καλλυντικού προϊόντος σε κρέμες και πούδρες. Στη Κίνα, το άμυλο ρυζιού χρησιμοποιούνταν για την επεξεργασία της επιφάνειας του χαρτιού από το 700 μ.Χ. (Hunter, 1987).

1.3. Αποθήκη ενέργειας φυτών

Η αποθήκευση της ενέργειας ως άμυλο στα περισσότερα πράσινα φυτά «πακετάρεται» σε ημι-κρυσταλλικούς κόκκους (Zobel, 1988). Η περίσσεια γλυκόζης γίνεται άμυλο, το οποίο είναι ως μόριο περιπλοκότερο από τη γλυκόζη που παράγουν τα φυτά. Μέχρι να βρεθούν ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη των νέων φυτών οι αποθήκες ενέργειας βρίσκονται στις ρίζες, στους σπόρους και στους καρπούς. Η ενέργεια στα φυτά προέρχεται μέσω της φωτοσύνθεσης, μιας διαδικασίας μέσω της οποίας η ηλιακή ενέργεια δεσμεύεται και μετατρέπεται σε χημική. Στη συνέχεια αυτή χρησιμοποιείται στο μεταβολισμό, κατά την παραγωγή οργανικών ενώσεων (νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α.) ή αποθηκεύεται στους αμυλοπλάστες με τη μορφή

αμύλου. Η γλυκόζη (σε αντίθεση με το άμυλο), είναι υδατοδιαλυτή, υδρόφιλη και οσμωτικά ενεργή καθιστώντας τη μορφή αποθήκευσης του αμύλου πιο συμπαγή (Δρ. Π. Πλαγεράς & Δρ. Α. Παπαιωάννου, 2012).

1.3.1. Βιοσύνθεση αμύλου

Η παραγωγή αμύλου από τα φυτά γίνεται σε εξειδικευμένα οργανίδια τους αμυλοπλάστες με την είσοδο της σακχαρόζης στο ενδοσπέρμιο. Στη συνέχεια μετατρέπεται σε UDP-γλυκόζη και 1-φωσφορική-φρουκτόζη. Η 1-φωσφορική-φρουκτόζη μετατρέπεται σε 1-φωσφορική-γλυκόζη και έπειτα σε ADP-γλυκόζη. Το ένζυμο συνθάση αμύλου προσθέτει στη συνέχεια την ADP-γλυκόζη μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1, 4 σε μια αυξανόμενη αλυσίδα υπολειμμάτων γλυκόζης, απελευθερώνοντας ADP και δημιουργώντας αμυλόζη. Η ADP-γλυκόζη προστίθεται σχεδόν σίγουρα στο μη αναγωγικό άκρο του πολυμερούς αμυλόζης, όπως η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο του γλυκογόνου κατά τη διάρκεια της σύνθεσης γλυκογόνου (Lehninger et al., 2013). Το ένζυμο διακλάδωσης αμύλου εισάγει α-1, 6 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων αμυλόζης, δημιουργώντας τη διακλαδισμένη αμυλοπηκτίνη (Adélaïde and Oliver, 2017).

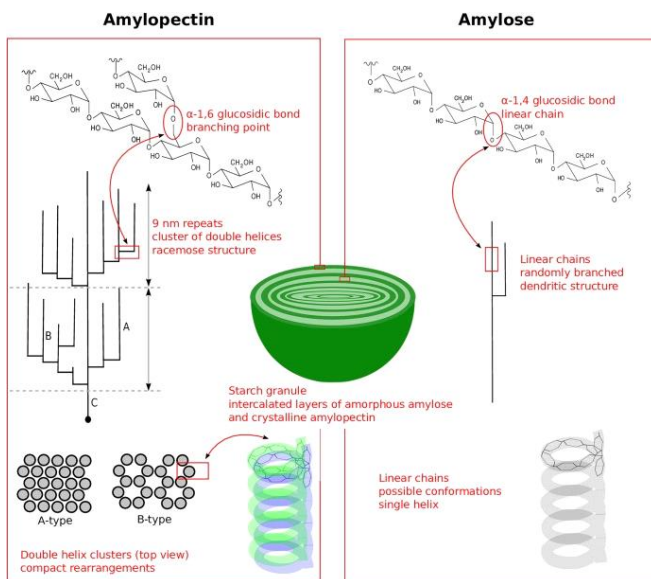
1.3.2. Αποικοδόμηση αμύλου

Η σύνθεση του αμύλου γίνεται στα φύλλα των φυτών κατά τη διάρκεια της μέρας και αποθηκεύεται με την μορφή κόκκων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, χρησιμεύοντας ως πηγή ενέργειας τη νύχτα. Οι αδιάλυτες, διακλαδισμένες αλυσίδες αμύλου πρέπει να φωσφορυλιωθούν για να είναι προσβάσιμες στο φυτό για ενέργεια. Το ένζυμο α-αμυλάση, β-αμυλάση, αποδιακλαδωτικά ένζυμα και οι α-γλυκοζιδάσες είναι υπεύθυνα για τη φωσφορυλίωση. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης του αμύλου είναι κυρίως η μαλτόζη και σε μικρότερες ποσότητες η γλυκόζη (Weise et al., 2004).

1.4. Ιδιότητες

1.4.1. Δομή

Παρόλο που η αμυλόζη πιστεύεται ότι είναι εντελώς μη διακλαδισμένη, ορισμένα από τα μόριά της είναι πλέον γνωστό ότι περιέχουν σημεία διακλάδωσης. Η αμυλόζη είναι πολύ μικρότερο μόριο από την αμυλοπηκτίνη. Γεμίζει χώρους στην ημι-κρυσταλλική μήτρα που σχηματίζεται από την αμυλοπηκτίνη, καθιστώντας πιθανότατα τον κόκκο του αμύλου πιο πυκνό. Αντίθετα, η αμυλοπηκτίνη αποτελεί το δομικό πλαίσιο και ως επακόλουθο τη βάση της ημι-κρυσταλλικής φύσης του αμύλου. (Barbara Pfister, Samuel C. Zeeman, 2016).



Εικόνα 1.4.1: τύποι μορίων αμύλου: γραμμική - ελικοειδή αμυλόζη (οι μη διακλαδισμένες αλυσίδες α-1,4 εμφανίζουν ελικοειδείς δομές, οι οποίες σταθεροποιούνται με το σχηματισμό διπλών ελίκων) και διακλαδισμένη αμυλοπηκτίνη (α-1,6 σημείο διακλάδωσης) (Adélaïde and Oliver, 2017).

1.4.2. Υδρόλυση

Η υδρόλυση/διάσπαση του αμύλου σε σάκχαρα, δηλαδή, σε υδατάνθρακες με μικρότερο μήκος αλυσίδας (πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και τελικά γλυκόζη), επιτυγχάνεται χάρη των ενζύμων που ονομάζονται αμυλάσες.

Το ανθρώπινο σάλιο (σιελογόνοι αδένες), όπως, και το πάγκρεας, είναι πλούσια σε περιεκτικότητα αλφα-αμυλάσης. Το άμυλο που υδρολύεται από την αλφα-αμυλάση έχει ως τελικά προϊόντα τη μαλτοτριόζη, τη μαλτόζη και τη γλυκόζη. Άτομα στα οποία οι διατροφικές συνήθειες συνοδεύονται από μεγάλη κατανάλωση αμύλου τείνουν να διαθέτουν περισσότερα γονίδια αμυλάσης σε σχέση με άτομα που η διατροφή τους είναι χαμηλή σε περιεκτικότητα αμύλου. Η διάσπαση του αμύλου από την βήτα-αμυλάση, η οποία απαντάται σε φυτά, βακτήρια και μύκητες, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της μαλτόζης (Δρ. Π. Πλαγεράς & Δρ. Α. Παπαιωάννου, 2012).

Κεφάλαιο 2ο : Φωσφορυλάση & Φωσφορυλίωση

2.1. Φωσφορυλάση

Οι φωσφορυλάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας από ένα ανόργανο φωσφορικό άλας (φωσφορικό + υδρογόνο) σε έναν δέκτη. Περιλαμβάνουν αλλοστερικά ένζυμα που καταλύουν την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης από μια γλυκάνη όπως το γλυκογόνο, το άμυλο ή τη μαλτοδεξτρίνη. Η φωσφορυλάση είναι κοινός όρος με τη

«φωσφορυλάση του γλυκογόνου» προς τιμήν του Earl W. Sutherland Jr., ο οποίος στα τέλη της δεκαετίας του 1930 την ανακάλυψε (Moran, 2012).

2.1.1. Λειτουργία

Οι φωσφορυλάσες δεν πρέπει να συγχέονται με τις φωσφατάσες (υδρολάσες) ή τις κινάσες (φωσφοτρανσφεράσες). Μια φωσφατάση αφαιρεί μια φωσφορική ομάδα από έναν δότη χρησιμοποιώντας νερό, ενώ μια κινάση μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα από έναν δότη (συνήθως ATP) σε έναν δέκτη (Δρ. Π. Πλαγεράς & Δρ. Α. Παπαιωάννου, 2012).

2.1.2. Τύποι

Οι φωσφορυλάσες ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες γλυκοσυλτρανσφερασών δηλαδή ενζύμων που διασπούν τις γλυκάνες αφαιρώντας ένα κατάλοιπο γλυκόζης (σπάζουν τον Ο-γλυκοσιδικό δεσμό):

- Φωσφορυλάση γλυκογόνου
- Φωσφορυλάση αμύλου
- Φωσφορυλάση μαλτοδεξτρίνης
- Ένζυμα που διασπούν τα νουκλεοσίδια στις βάσεις και τα σάκχαρα τους (διασπούν τον Ν-γλυκοσιδικό δεσμό)
- Φωσφορυλάση νουκλεοσιδίου πουρίνης (PNPase)
- Νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες
- Ένζυμα που έχουν φωσφορολυτική δράση 3' έως 5' εξοριβονουκλεάσης (σπάει το φωσφοδιεστερικό δεσμό)
- RNase PH
- Πολυνουκλεοτιδική Φωσφορυλάση (PNPase)

Όλες οι γνωστές φωσφορυλάσες έχουν καταλυτικές και δομικές ιδιότητες (Moran, 2012).

2.1.3. Ενεργοποίηση

Η φωσφορυλάση α είναι η πιο ενεργή μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που προέρχεται από τη φωσφορυλίωση της λιγότερο δραστικής μορφής, της φωσφορυλάσης β. Η ανενεργή μορφή, β, φωσφορυλιώνεται από την κινάση της φωσφορυλάσης και μετατρέπεται σε α (Moran, 2012).

2.2. Φωσφορυλίωση

Φωσφορυλίωση ενός μορίου είναι η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας. Αυτή η διαδικασία και η αντίστροφή της (αποφωσφορυλίωση), είναι σημαντικές για πλήθος κυτταρικών

διεργασιών στη βιολογία. Μέσω αυτής της τροποποίησης ενεργοποιούνται (ή απενεργοποιούνται) αρκετές πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία τους (Tripodis et al., 2015 & Vlastaridis et al., 2017).

Στον καταβολισμό των σακχάρων η φωσφορυλίωση είναι συνήθως το πρώτο στάδιο, επιτρέποντας τη συσσώρευσή τους στα κύτταρα καθώς η φωσφορική ομάδα εμποδίζει τα μόρια να διαχυθούν πίσω στον μεταφορέα τους. Η φωσφορυλίωση της γλυκόζης είναι μια βασική αντίδραση στο μεταβολισμό των σακχάρων επειδή πολλά απ' αυτά μετατρέπονται πρώτα σε γλυκόζη πριν μεταβολιστούν παραπάνω. Η χημική εξίσωση για τη μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη στο πρώτο στάδιο γλυκόλυσης δίνεται από:



2.2.1. Γλυκόζη

Είναι ο κυριότερος μονοσακχαρίτης και η πρωταρχική πηγή ενέργειας του οργανισμού μας, αφού θεωρείται απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργία του εγκεφάλου αλλά και των ιστών. Η ινσουλίνη παίζει πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης μέσω των επιδράσεών της στους ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς: τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ρυθμίζονται ταυτόχρονα από τους ρυθμούς παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ (και τους νεφρούς) και τους ρυθμούς απομάκρυνσής της από τους περιφερικούς ιστούς (κυρίως σκελετικός μυς). Ο λιπώδης ιστός είναι ένας βασικός συνεργάτης σε αυτό το σενάριο, παρέχοντας μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFA) ως εναλλακτικό καύσιμο για τους σκελετικούς μύες, το συκώτι και τα νεφρά όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα εξαντλούνται. Οι αλλαγές στην έκκριση και τη δράση της ινσουλίνης συντονίζονται σε μεγάλο βαθμό από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Dimitriadis et al., 2021).

2.2.3. Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση αποτελεί τη διαδικασία της διάσπασης της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, μέσω κάποιων σταδίων, με τη βοήθεια διάφορων ενζύμων (Alfarouk et al., 2014). Η γλυκόζη σε μια σειρά δέκα αντιδράσεων που συνολικά είναι γνωστές ως γλυκολυτική οδός, μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Το σύνολο των αντιδράσεων αυτών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Η πρώτη αντίδραση της γλυκολυτικής οδού είναι η δημιουργία της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Η 6-φωσφορική γλυκόζη μπορεί να προέλθει είτε από την ελεύθερη γλυκόζη είτε από την 1-φωσφορική γλυκόζη. Η ελεύθερη γλυκόζη μετατρέπεται στην 6-φωσφορική γλυκόζη με κατανάλωση ενός μορίου ATP. Η αντίδραση μπορεί να καταλυθεί από τα ένζυμα εξοκινάση και γλυκοκινάση. Έπειτα από ένα σύνολο αντιδράσεων η συνολική αντίδραση που πραγματοποιείται στη γλυκολυτική οδό είναι (Alfarouk et al., 2014):



Από την διάσπαση ενός μορίου γλυκόζης παράγονται δύο μόρια ATP, δύο μόρια NADH₂ και δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Τα μόρια NADH₂ και πυροσταφυλικού οξέος μπορούν να αξιοποιηθούν περεταίρω και να αποδώσουν επιπλέον ενέργεια (Alfarouk et al., 2014).

Κεφάλαιο 3ο : Φωσφορυλάση αμύλου

3.1. Εισαγωγικά Στοιχεία

Στον μεταβολισμό των φυτικών υδατανθράκων, ένας δυναμικός μεσολαβητικός ρόλος μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του αμύλου έχει αποδοθεί στη φωσφορυλάση του αμύλου (SP - Starch Phosphorylase) (Schneider et al., 1981). Άλλες φωσφορυλάσες περιλαμβάνουν τη φωσφορυλάση σακχαρόζης, τη φωσφορυλάση μαλτόζης, τη φωσφορυλάση κυτταροδεξτρίνης κ.α.. Η φυτική φωσφορυλάση έχει παρόμοια μορφή με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου των ζωικών οργανισμών, με τη διαφορά ότι δρα στο άμυλο αντί για το γλυκογόνο. Η φωσφορυλάση αμύλου είναι ευρέως γνωστή για τη φωσφορολυτική αποικοδόμηση του αμύλου. Η καταλυτική της δράση περιορίζεται στο μη αναγωγικό άκρο του αμύλου. Πιο συγκεκριμένα καταλύει την αντίδραση της α-1,4-γλυκάνης με ορθοφωσφορικό ιόν για την παραγωγή 1-φωσφορική γλυκόζης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αμύλου. Σχετικά πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η φωσφορυλίωση των κόκκων του αμύλου είναι απαραίτητη για την επακόλουθη αποικοδόμησή του (Fettke et al., 2007). Μέσα στους κόκκους αμύλου, αλυσίδες γλυκάνης του κλάσματος της αμυλοπηκτίνης σχηματίζουν διπλές έλικες και συσσωρεύονται για να σχηματίσουν κρυσταλλικά ελάσματα και διπλές έλικες στην επιφάνεια των κόκκων και διασπώνται με την προσθήκη φωσφορικών ομάδων και μεμονωμένων υπολειμμάτων γλυκοζυλίου.

Η προσθήκη φωσφορικών ιόντων διαμεσολαβείται από δύο ένζυμα, τη δικινάση της γλυκάνης και τη δικινάση της φωσφογλυκάνης, αντίστοιχα. Στοιχεία για τη σημασία της φωσφορυλίωσης αμύλου *in vivo* προέρχονται από την ανάλυση αυτών των ενζύμων των μεταλλαγμένων φυτών. Αυτά τα φυτά παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη και συσσωρεύουν άμυλο σχεδόν χωρίς φωσφορικά άλατα σε υψηλά επίπεδα (Zeeman et al., 2007). Η δικινάση της γλυκάνης φωσφορυλιώνει το άμυλο στον C6 ενώ η δικινάση της φωσφογλυκάνης στον C3 όπως έχει προβλεφθεί με μοριακή μοντελοποίηση (Blennow et al., 2002).

3.1.1. Κατανομή

Η φωσφορυλάση αμύλου είναι ευρέως διανεμημένη στο φυτικό βασίλειο (Steup, 1988 & Kumar, 1989), ενώ έχει περιγραφεί σε πολλά φυτά π.χ. στην πατάτα, στη γλυκοπατάτα, στους σπόρους αραβοσίτου, στους σπόρους κριθαριού, μπιζελιού κ.α.. Η φωσφορυλάση αμύλου έχει επίσης αναφερθεί στα φρούτα της μπανάνας (Singh and Sanwal, 1975).

3.2. Πολλαπλότητα ενζύμων

Η αφθονία της πολλαπλότητας της φωσφορυλάσης του αμύλου έχει προταθεί ως βιοχημική απόκριση λόγω της ετερογένειας των μορίων του αμύλου και της δομής των κόκκων αμύλου. Μπορεί να προκύψει σε μεταγραφικό επίπεδο λόγω διαφορετικών γονιδίων ή λόγω αλλαγών στη συναρμολόγηση του mRNA και σε μεταμεταγραφικό επίπεδο λόγω γλυκοζυλίωσης, πρωτεολυτικών τροποποιήσεων και συσσωμάτωσης (Yu and Pedersen, 1991a). Έχει προταθεί πως η παρουσία πολλαπλών μορφών SP έχει σημασία στη ρύθμιση του μεταβολισμού του αμύλου. Γενικά, το εύρος πολλαπλότητας της φωσφορυλάσης αμύλου κυμαίνεται από 2 έως 5 (Nighojkar and Kumar, 1997). Πολλαπλές μορφές φωσφορυλάσης αμύλου έχουν αναφερθεί στο σπανάκι, στα φύλλα του καλαμποκιού, του μπιζελιού, της μπανάνας κ.α. (Singh and Sanwal, 1975)

Οι Steup και Latzko περιέγραψαν 2 μορφές που βρήκαν στα φύλλα του σπανακιού που ονομάστηκαν Pho1 και Pho2 (Steup, M. & Latzko, E., 1979). Το Pho1 έχει χαμηλή συγγένεια με το γλυκογόνο και βρίσκεται στους χλωροπλάστες ενώ το Pho2 έχει υψηλή συγγένεια με το γλυκογόνο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Στο σιτάρι αναφέρονται 3 μορφές οι P1, P2 και P3 (Schurr and Zeigler, 2004). Η πολλαπλότητα της φωσφορυλάσης αμύλου έχει αποδειχθεί σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια σε σχέση με τη σύνθεση ή την αποικοδόμηση του αμύλου. Αυτή η πολλαπλότητα δεν συμπίπτει με οποιεσδήποτε λειτουργικές αλλαγές, καθώς κάθε μορφή φαίνεται να έχει αποκτήσει έναν ξεχωριστό και διατηρημένο ρόλο στο μεταβολισμό του αμύλου (Ball and Morell, 2003).

Γενικά, τα περισσότερα φυτά διαθέτουν δύο τύπους φωσφορυλασών αμύλου: αυτές που ονομάζονται Pho1 ή L-μορφής (πλαστιδιακό) και αυτές που ονομάζονται Pho2 ή H-μορφής (κυτοσολικό). Η πλαστιδιακή μορφή L έχει μέγεθος περίπου 105.000 Da και χαμηλή συγγένεια με διακλαδισμένες γλυκάνες. Από την άλλη πλευρά, η μορφή H έχει μέγεθος περίπου 90.000 Da και πολύ υψηλή συγγένεια με γραμμικές και διακλαδισμένες γλυκάνες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μορφή H δρα και στις ετερογλυκάνες. Υπάρχει μεγάλη σύγχυση όσον αφορά την ονοματολογία αυτών των ενζύμων καθώς σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι σαφές εάν είναι ισόενζυμα (γενετικά διαφορετικά) (Fettke et al., 2004).

3.3. Σημασία της φωσφορυλάσης αμύλου

Το άμυλο και η σακχαρόζη είναι τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης στα φύλλα των φυτών. Το άμυλο είναι ο κύριος υδατάνθρακας αποθήκευσης των φυτών δίνοντας ενέργεια κατά τους χρόνους της ετερότροφης ανάπτυξης. Ο μεταβολισμός του αμύλου έχει μελετηθεί εκτενώς οδηγώντας σε καλή γνώση πολλών ενζύμων που εμπλέκονται. Αντίθετα, η κατανόηση της ρύθμισης του μεταβολισμού του αμύλου είναι αποσπασματική. Το φυσιολογικό υπόστρωμα και

η ακριβής βιολογική λειτουργία της κυτταροπλασματικής φωσφορυλάσης δεν είναι ακόμη γνωστά στα προαναφερθέντα φυτά, ακόμη και μετά από τόσα χρόνια έρευνας. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση της φυτικής φωσφορυλάσης (Kötting et al., 2005).

Είναι ευρέως γνωστό ότι η φωσφορυλάση του αμύλου είναι ένα ένζυμο αποικοδόμησης του αμύλου. Για τη βιοσύνθεση του αμύλου χρειάζεται η πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης και η συνθάση του αμύλου. Υπάρχει ένας αριθμός αναφορών για τον ομογενή καθαρισμό και το βιοχημικό χαρακτηρισμό της φωσφορυλάσης του αμύλου (Nighojkar and Kumar, 1997). Η εμφάνιση πολλαπλών μορφών και ο διακριτός ενδοκυτταρικός εντοπισμός τους είναι χαρακτηριστικά της φωσφορυλάσης αμύλου. Η ετερογένεια των ενζύμων που καταλύουν προφανώς την ίδια αντίδραση είναι ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα σχεδόν όλων των ενζύμων αποικοδόμησης αμύλου (Rathore et al., 2009).

Ορισμένες μορφές ευνοούν τη βιοσύνθεση του αμύλου έναντι της αποικοδόμησης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η φωσφορυλάση αμύλου πιθανώς συμβάλλει στη σύνθεση αμύλου μιας και η έκφραση και η δραστικότητα της πλαστιδιακής φωσφορυλάσης συσχετίζονται ισχυρά με τη σύνθεση αμύλου (Hannah and James, 2008). Οι Satoh και συνεργάτες (2008) υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλάση του αμύλου διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη βιοσύνθεση του αμύλου στο ενδοσπέρμιο του ρυζιού επηρεάζοντας σημαντικά τη δομή του. Πρόσφατα, προέκυψε μια νέα υπόθεση που προτείνει πολύπλοκο μηχανισμό πολλαπλών πρωτεϊνών για το μεταβολισμό του αμύλου (Satoh, H. et al., 2008).

Έχει αποδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του αμύλου και των ενζύμων διακλάδωσης προάγει το σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων που καταλύουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του αμύλου (Hennen-Bierwegan et al., 2009). Η συσσώρευση αμύλου λαμβάνει χώρα τόσο στους χλωροπλάστες όσο και στους αμυλοπλάστες, ενώ η φωσφορυλάση του αμύλου βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στα πλαστίδια (Kumar, 1989).

3.3.1. Σημασία της πλαστιδιακής SP στα φυτά

Ο ακριβής ρόλος των πλαστιδιακών φωσφορυλασών *in vivo* δεν είναι ακόμη σαφής. Με βάση πολλά έμμεσα στοιχεία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η φωσφορυλάση αμύλου εμπλέκεται κυρίως στη φωσφορολυτική αποικοδόμηση του αμύλου. Ωστόσο, το ένζυμο δεν μπορεί να δράσει απευθείας σε άθικτους κόκκους αμύλου μιας και εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για μεγάλα και διακλαδισμένα υποστρώματα (Zeeman et al., 2004a). Οι κόκκοι αμύλου αποικοδομούνται σε διακλαδισμένες και γραμμικές πολυγλυκάνες. Τα διακλαδισμένα πολυμερή ανάγονται σε γραμμικές γλυκάνες με ένζυμα αποδιακλάδωσης όπως η ισοαμυλάση και η β-οριακή δεξτρινάση που διασπούν ειδικά τον α-1, 6-γλυκοζιτικό δεσμό (Zeeman et al., 2004a).

Οι γραμμικές γλυκάνες αποικοδομούνται περαιτέρω από τη β-αμυλάση και τη φωσφορυλάση αμύλου σε ουδέτερα σάκχαρα (Smith et al., 2005). Ωστόσο, καθώς η κύρια οδός

αποικοδόμησης του αμύλου προέρχεται από την υδρόλυση, η β-αμυλάση θεωρείται ότι είναι ένα σημαντικό ένζυμο στην αποικοδόμηση του αμύλου. Ως εκ τούτου, η απουσία πλαστιδιακής φωσφορυλάσης δεν έχει καμία επίδραση στην αποικοδόμηση του αμύλου. Αντιθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι η φωσφορυλάση του αμύλου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοχή στο στρες. Η έκθεση σε παροδικό στρες αφυδάτωσης οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του αμύλου που με τη σειρά της πυροδοτεί την αποδόμηση του αμύλου (Smith et al., 2005).

Έχει υποστηριχθεί ότι κατά τη διάρκεια της καταπόνησης, η αποικοδόμηση της SP εξυπηρετεί μια ταχεία απόκριση στη μείωση του στρες δρομολογώντας το υπόστρωμα σε μονοφωσφορική οξειδωτική εξόζη (Rathore et al., 2009). Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που δείχνουν ότι η φωσφορυλάση του πλαστιδικού αμύλου πιθανώς συμβάλλει στη σύνθεση αμύλου, καθώς η έκφραση και η δράση της ευνοεί το ρόλο της στη σύνθεση αμύλου (Hannah and James, 2008 & Rathore et al., 2009).

3.3.2. Σημασία της κυτοσολικής SP στα φυτά

Το φυσιολογικό υπόστρωμα και οι βιολογικές λειτουργίες της κυτοσολικής φωσφορυλάσης αμύλου δεν είναι ακόμη ακριβώς σαφείς. Είναι πολύ απίθανο η κυτοσολική φωσφορυλάση αμύλου να δρα σε άθικτους κόκκους αμύλου που συντίθενται στο εσωτερικό των χλωροπλαστών αφού η χλωροπλαστική μεμβράνη είναι μη διαπερατή τόσο από το άμυλο όσο και από το ένζυμο. Οι μελέτες μετάλλαξης σε πατάτα έδειξαν ότι η κυτοσολική φωσφορυλάση αμύλου δεν είχε καμία επίδραση στην αποικοδόμηση του αμύλου. Μελέτες που χρησιμοποιούν RNA για τη κυτοσολική φωσφορυλάση έδειξαν ότι είχε επίδραση στην ανάπτυξη και την ανθοφορία των βλαστών (Rathore et al., 2009). Η κυτοσολική φωσφορυλάση (Pho2) στερείται ενθέματος L78, το οποίο εμποδίζει στερικά τη σύνδεση του υποστρώματος και επομένως είναι πιο αποτελεσματικό στην αποικοδόμηση των διακλαδισμένων μεγάλων γλυκανών και ως εκ τούτου μπορεί να δρα σε άθικτους κόκκους αμύλου (Steup et al., 1983). Θεωρείται ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του δεσμευμένου αμύλου όπου τα κύτταρα που περιέχουν άμυλο δεν έχουν διαμερισματική ακεραιότητα (Schupp and Ziegler, 2004).

3.3.3. Βιοχημικές πτυχές

Ο Kumar (1989) επανεξέτασε τον καθαρισμό και τη δραστικότητα της φωσφορυλάσης αμύλου σε διάφορα φυτά. Το ένζυμο έχει καθαριστεί από φύλλα μπιζελιού, πατάτας, γλυκοπατάτας, σπορόφυτο ρυζιού κ.α.. (Hsu et al., 2004). Το ένζυμο γενικά αδρανοποιείται γρήγορα πάνω από 55°C, ενώ η δραστικότητα της φωσφορυλάσης της πατάτας έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται κατά την αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία (Kennedy και Isherwood, 1975). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί για τη ρύθμιση της δραστικότητας της φωσφορυλάσης αμύλου, οι οποίοι περιλαμβάνουν το pH, τη θερμοκρασία, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, τα επίπεδα ολιγοσακχαριτών, αλλοστερικές μεταβολές και ομοιοπολική τροποποίηση. Δεδομένου ότι όλοι οι μεταβολίτες της αποικοδόμησης του αμύλου τελικά εξάγονται στο κυτοσόλιο, μπορεί να θεωρηθεί ότι η αποικοδόμηση του αμύλου ρυθμίζεται με επανατροφοδοτική αναστολή σε

κυτταρικό επίπεδο και όχι σε ατομικό επίπεδο (Orzechowski, 2008).

3.4. Δομή και Λειτουργία

Το ζωικό ανάλογο της φωσφορυλάσης του αμύλου, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι συγκριτικά ένα πιο μελετημένο ένζυμο. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από μυς κουνελιού είναι το πιο ευρέως μελετημένο ένζυμο μεταξύ όλων των φωσφορυλασών γλυκανών. Υπάρχουν κατατεθειμένες αρκετές δομές στη Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών (PDB) που αφορούν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου από διαφορετικές πηγές, μεταλλάγματα αυτών και σύμπλοκα τους που έχουν βοηθήσει στη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης τους. Ωστόσο, οι ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως η λειτουργία της φωσφορυλάσης μυών κουνελιού και της πατάτας δεν είναι η ίδια (Rathore et al., 2009).

3.5. Πιθανοί ρόλοι των πλαστιδιακών φωσφορυλασών

Οι ακριβείς ρόλοι των πλαστιδιακών φωσφορυλασών *in vivo* δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Με βάση έμμεσες ενδείξεις, έχει προταθεί ότι οι πλαστιδιακές φωσφορυλάσες εμπλέκονται στη φωσφορολυτική αποικοδόμηση αμύλου. Ωστόσο, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Ο Sonnewald και οι συνεργάτες του (1995) απέδειξαν ότι η αναστολή της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης αμύλου δεν είχε σημαντική επίδραση στη συσσώρευση αμύλου στα φύλλα διαγονιδιακών φυτών πατάτας. Επιπροσθέτως, στο φυτό *Arabidopsis* απώλεια της φωσφορυλάσης του πλαστιδιακού αμύλου δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στο επίπεδο συσσώρευσης αμύλου κατά τη διάρκεια της ημέρας ή της κινητοποίησής του τη νύχτα (Zeeman et al., 2004b).

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η απουσία πλαστιδιακής φωσφορυλάσης αμύλου δεν έχει επίδραση στην αποικοδόμηση του αμύλου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η SP παίζει ρόλο στην ανοχή στο στρες. Η έκθεση σε παροδικό στρες αφυδάτωσης οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του αμύλου που με τη σειρά του πυροδοτεί την αποδόμηση του αμύλου. Έχει υποστηριχθεί ότι κατά τη διάρκεια της καταπόνησης, η αποικοδόμηση φωσφορολυτικού αμύλου χρησιμεύει ως ταχεία απόκριση για την ανακούφιση από το στρες, τροφοδοτώντας υποστρώματα στην οδό των φωσφορικών πεντοζών (Lloyd et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η πλαστιδιακή φωσφορυλάση (Pho 1) συμβάλλει στη σύνθεση αμύλου καθώς η έκφραση και η δραστηριότητα της συσχετίζεται με τη σύνθεση αμύλου (Tetlow et al., 2004b & Hannah and James, 2008).

Ο d'Hulst και οι συνεργάτες του (2007) απέδειξαν ότι η απενεργοποίηση ενός γονιδίου φωσφορυλάσης αμύλου σε πολλά διαγονιδιακά φυτά αυξάνει το μέγεθος των κόκκων του αμύλου και την ποσότητά του. Ο Satoh και οι συνεργάτες του (2008) υπέδειξαν ότι η Pho1 παίζει κρίσιμο ρόλο στη βιοσύνθεση αμύλου στο ενδοσπέρμιο του ρυζιού και επηρεάζει αισθητά τη δομή του αμύλου. Παραμένει όμως ένα άλυτο πρόβλημα όπως το ποιος ακριβώς μηχανισμός βρίσκεται στη βάση της βιοσύνθεσης αμύλου που βασίζεται στη φωσφορυλάση του αμύλου

(Rathore et al., 2009). Άλλες ομάδες έδειξαν ότι τα D-ένζυμα, σε συνδυασμό με τη φωσφορυλάση μπορούν να συμβάλλουν στη συνολική σύνθεση αμύλου με την ανακύκλωση των ενδιάμεσων γλυκανών, που απελευθερώνονται στη διαδικασία (Tetlow et al., 2004a & 2004b). Ο Colleoni και οι συνεργάτες του (1999) υποστήριξαν ότι τα D-ένζυμα διεγείρουν τη φωσφορολυτική αντίδραση της φωσφορυλάσης. Σύμφωνα με την υπόθεση "Glucan Trimming Model" θεωρείται ότι κατά τη διάρκεια της ασυνεχούς σύνθεσης κόκκων αμύλου, οι κοντές αλυσίδες γλυκάνης που απελευθερώνονται από την προ-αμυλοπηκτίνη με τη δράση των ενζύμων αποδιακλάδωσης μετατρέπονται σε μακρύτερες αλυσίδες γλυκάνης από τα D-ένζυμα. Οι μακριές αλυσίδες γλυκάνης αποτελούν στη συνέχεια υποστρώματα για τη φωσφορυλάση αμύλου (Ball and Morell, 2003). Η απελευθερούμενη 1-φωσφορική γλυκόζη χρησιμοποιείται από την πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης για τη σύνθεση αμύλου. Ως εκ τούτου, μπορεί να ειπωθεί ότι η αντίδραση της φωσφορυλάσης αμύλου προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του αμύλου συμβάλλει τελικά στη συνολική σύνθεση αμύλου. Άλλοι έχουν προτείνει έναν πολύπλοκο σύστημα μηχανισμών πολλαπλών πρωτεϊνών για τον μεταβολισμό του αμύλου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης αμύλου και των ενζύμων διακλάδωσης προάγουν επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που οδηγούν στο σύμπλεγμα πολλαπλών πρωτεϊνών καθιστώντας αυτή τη «συναρμολόγηση/συνδεσμολογία» απαραίτητη για τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του αμύλου (Tetlow et al., 2004a; 2004b & Hennen-Bierwagen et al., 2009). Η τελική «απάντηση» σχετικά με τον ειδικό ρόλο της φωσφορυλάσης του αμύλου στο μεταβολισμό του αμύλου απαιτεί νέα σκέψη καθώς και πλήθος πειραμάτων με σκοπό την αποσαφήνισή του.

3.6. Πιθανοί ρόλοι κυτοσολικών φωσφορυλασών

Το φυσιολογικό υπόστρωμα και οι βιολογικές λειτουργίες της κυτοσολικής φωσφορυλάσης έχουν παραμείνει άλυτες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η διαμάχη περιβάλλεται σχετικά με τον ακριβή ρόλο της κυτταροπλασματικής φωσφορυλάσης αμύλου, καθώς οι κόκκοι αμύλου βρίσκονται μέσα στους χλωροπλάστες ή τους αμυλοπλάστες και περιορίζονται από τις γύρω μεμβράνες. Οι μελέτες αποσίωσης της φωσφορυλάσης του αμύλου στο φυτό *Solenum tuberosum* έδειξαν ότι δεν είχε καμία επίδραση στην αποικοδόμηση του αμύλου. Ωστόσο, μελέτες σχετικά με την αναστολή της κυτοσολικής φωσφορυλάσης έδειξαν ότι έχει επίδραση στην ανάπτυξη και την ανθοφορία των βλαστών (Duwenig et al., 1997). Ο Steup και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η κυτοσολική Pho2 στερείται του ενθέματος L78, το οποίο εμποδίζει στερικά τη σύνδεση του υποστρώματος και επομένως είναι πιο αποτελεσματική στην αποικοδόμηση μεγάλων διακλαδισμένων γλυκανών και μπορεί ακόμη και να προσβάλλει κόκκους αμύλου (Steup, M., Robenek, H. & Melkonian, M., 1983).

Ως εκ τούτου, έχει επίσης προβλεφθεί ότι αυτό το ένζυμο εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του εφεδρικού αμύλου σε φυτικά όργανα όπου τα κύτταρα που περιέχουν άμυλο έχουν χάσει τη διαμερισματική τους ακεραιότητα, όπως στις κοτυληδόνες των βλαστών ψυχανθών (Schurrp and Ziegler, 2004). Από την άλλη πλευρά, σε κύτταρα με άθικτα πλαστίδια, η

κυτοσολική φωσφορυλάση μπορεί να εμπλέκεται στο μεταβολισμό των προϊόντων αποικοδόμησης του αμύλου, που εξάγονται από τους χλωροπλάστες και στη ρύθμιση του επιπέδου της κυτοσολικής 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η ομάδα του Steup έδειξε ότι η κυτοσολική φωσφορυλάση λειτουργεί σε έναν νέο μηχανισμό μεταβολισμού γλυκάνης (Steup, M., Robenek, H. & Melkonian, M., 1983).

Τα πειράματα σε μπιζέλια (*Pisum sativum*) και *Arabidopsis* έδειξαν ότι οι διαλυτές ετερογλυκάνες (SHG) με ένα σύνθετο σχέδιο γλυκοσιδικών δεσμών είναι τα υποστρώματα για την κυτοσολική φωσφορυλάση (Fettke et al., 2004). Ο Fettke και οι συνεργάτες του (2005) έδειξαν ότι στα διαγονιδιακά φυτά πατάτας, η αναστολή της Pho2 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένες περιεκτικότητες σε γλυκοζύλιο και ραμνοσύλιο στις γλυκάνες, ενώ η υπερέκφραση της μείωσε τα περιεχόμενά τους. Αυτή είναι ίσως η πρώτη ένδειξη *in vivo* για το φυσιολογικό υπόστρωμα της κυτοσολικής φωσφορυλάσης (Fettke, J. et al., 2005).

Ο Lu και οι συνεργάτες του (2006) έδειξαν ότι το κυτοσολικό AtPHS2 (Pho2) και τα ένζυμα (DPE2) στο *Arabidopsis* δρουν στη μαλτόζη και τα SHGs, παρόμοια με τα ορθόλογα ένζυμα της φωσφορυλάσης αμυλομαλτάσης και μαλτοδεξτρίνης στην *E. coli*. Ο Chia και οι συνεργάτες του (2004) έδειξαν ότι σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* με ανεπάρκεια DPE2, η δραστηριότητα της κυτοσολικής φωσφορυλάσης αυξήθηκε, υποδεικνύοντας ένα ρυθμιστικό ρόλο του ενζύμου μεταξύ της αποικοδόμησης του αμύλου και του κυτταροπλασματικού μεταβολισμού (Chia, T. et al., 2004).

3.7. Βιοτεχνολογικές πτυχές/βιομηχανικές εφαρμογές

Η φωσφορυλάση των α-γλυκανών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, για τη σύνθεση αμυλόζης και ποικιλίας νέων γλυκανών για το σχεδιασμό αμύλου και την ανάπτυξη διαγονιδιακών ποικιλιών με τροποποιημένα άμυλα (Rathore 2009). Η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης και έχει χρησιμοποιηθεί στην καρδιοθεραπεία ως κυτταροστατική ένωση και ως αντιβακτηριακός, αντιφλεγμονώδης και αντικαρκινικός παράγοντας (Rathore et al., 2009). Η αμυλόζη είναι ένα λειτουργικό βιοϋλικό και χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή κυκλοαμυλόζης/κυκλοδεξτρίνης και άλλων πολυμερών γλυκόζης. Η αμυλόζη δεν είναι διαθέσιμη ως βιομηχανική πρώτη ύλη, καθώς ο διαχωρισμός της από την αμυλοπηκτίνη στο άμυλο είναι δύσκολος και έχει χαμηλή απόδοση. Καθώς το μοριακό μέγεθος της αμυλόζης μπορεί να ελεγχθεί με μοριακή αναλογία μπορεί να είναι ένα δυνητικά καλό σύστημα για την παρασκευή της (Ohdan et al., 2006 & 2007).

Δεδομένου ότι η φωσφορυλάση αμύλου μπορεί να συνθέσει μόνο αμυλόζη, η επιθυμητή χαρακτηριστική αναλογία αμυλόζης προς αμυλοπηκτίνη στο βιομηχανικό άμυλο μπορεί να ρυθμιστεί. Η αμυλόζη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε ενώσεις εγκλεισμού και έχει εφαρμογές στη χορήγηση φαρμάκων και στη νανοτεχνολογία (Ohdan et al., 2006 & 2007). Η συνθετική αμυλόζη μπορεί να σχεδιαστεί με μεγαλύτερη μηχανική αντοχή και καλύτερη ικανότητα χύτευσης ελέγχοντας το μοριακό μέγεθος και τη διακλάδωση και επομένως μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως βιοαποδομήσιμα πλαστικά (Masao et al., 2005).

Η φωσφορυλάση αμύλου χρησιμοποιείται επίσης ως βιοαισθητήρας για την ανίχνευση ποσότητας ανόργανης φωσφορικής ρύπανσης στο περιβάλλον και στη μικροεκτίμηση ανόργανων φωσφορικών υπό παθολογικές συνθήκες (Hüwell et al., 1997). Η παραγωγή γλυκάνης με φθινότερο τρόπο κατέστη δυνατή με την κοινή χρήση της φωσφορυλάσης των α-γλυκανών και άλλων ενζύμων γλυκάνης. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε μικροεκτίμηση ανόργανων φωσφορικών αλάτων υπό παθολογικές συνθήκες και επίσης για παρακολούθηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Κεφάλαιο 4ο: Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

4.1 Χαρακτηρισμός των ενζύμων

Τα ένζυμα αποτελούν τους καταλύτες των βιολογικών αντιδράσεων, και έχουν ως κύριο ρόλο τη πραγματοποίηση αντιδράσεων με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα (επιταχύνουν τις αντιδράσεις ακόμη και κατά εκατομμύρια φορές) καθώς και το μετασχηματισμό διαφόρων μορφών ενέργειας. Δύο από τα χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν είναι η εξειδίκευση και η καταλυτική ισχύς. Με τον όρο εξειδίκευση εννοούμε την εκλεκτικότητά τους τόσο στις αντιδράσεις, όσο και στην επιλογή των διαφόρων αντιδρώντων (των διαφόρων υποστρωμάτων). Η κατάλυση (η δέσμευση των υποστρωμάτων σε κατάλληλη διεύθυνση) λαμβάνει χώρα σε μια συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο (Stryer, 2015).

4.2 Ενζυμική κινητική

Ο όρος ενζυμική κινητική συμπεριλαμβάνει όλες εκείνες τις μελέτες των χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα, με ιδιαίτερη έμφαση στους ρυθμούς αντίδρασης. Το 1910, οι Michaelis-Menten οι οποίοι μέσω της μελέτης της κινητικής του ενζύμου ιμπερτάση οδηγήθηκαν στην εξίσωση 'Michaelis-Menten' που από τότε και στο εξής χρησιμοποιείται ως 'πρότυπο' με στόχο τη περιγραφή της κινητικής πολλών ενζύμων.

4.3 Κινητική Michaelis-Menten

Με τον όρο ταχύτητα της κατάλυσης ενζύμων, V_0 , περιγράφεται ο αριθμός των μορίων (moles) του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, και ο οποίος μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S]. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα η ταχύτητα αυξάνεται γραμμικά για διαφορετικές και αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή υποστρώματος όπου δείχνει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Με το προτεινόμενο μοντέλο από τους Michaelis-Menten, αποσαφηνίζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά ενός ενζύμου και το κυριότερο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων, ενώ το ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στη κατάλυση. Το μοντέλο αυτό είναι το εξής:



Όπου:

E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

P: προϊόν

k₁, k₂, k₋₁, k₋₂: κινητικές σταθερές

Στο σημείο εκκίνησης η ταχύτητα κατάλυσης V_0 ισούται με το γινόμενο της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] πολλαπλασιασμένη με τη k_2

$$V_0 = k_2[ES]$$

Η σταθερά K_M αποτελεί ένα μέτρο της συγγένειας μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος και έχει μονάδες συγκέντρωσης, ενώ είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος.

$$K_M = k_{-1} + k_2 / k_1$$

Η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (V_{max}) επιτυγχάνεται όταν οι δυνατές καταλυτικές περιοχές του ενζύμου είναι κορεσμένες από υπόστρωμα, δηλαδή όταν $[ES] = [E]T$.

$$V_{max} = k_2[E]T$$

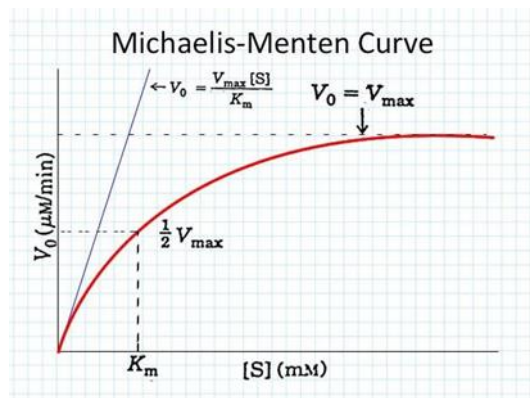
Μετά τη συνεπαγωγή μιας σειράς εξισώσεων καταλήγουμε στην εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

με τη K_m να αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ενζυμικών αντιδράσεων.

Όταν η τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος ισούται με την $[S] = K_m$, τότε σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο $V_0 = V_{max}/2$, πιο συγκεκριμένα ισούται με τη μισή της μέγιστης ταχύτητας. Όσο μικρότερη η τιμή της K_m τόσο λιγότερο υπόστρωμα, ώστε $V_0 = V_{max}/2$ (Stryer, 2015).

Το διάγραμμα τέλος της K_m που προκύπτει από την εξίσωση Michaelis-Menten παρουσιάζεται παρακάτω:



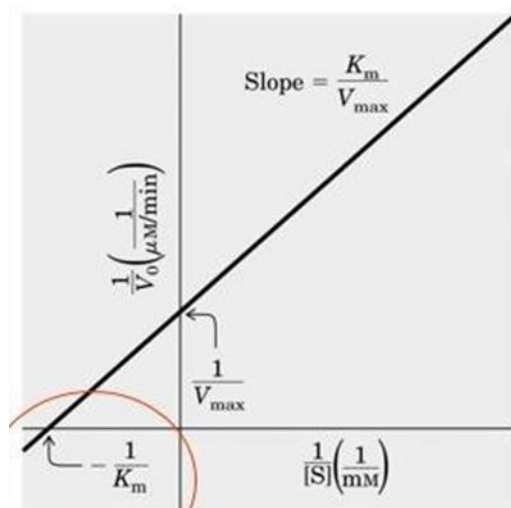
Εικόνα : Διάγραμμα K_m (Tuition Tub, 2016)

4.4 Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή Lineweaver-Burk

Η εξίσωση του Lineweaver-Burk προκύπτει από αντιστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten και στις δύο πλευρές:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Ενώ το αντίστοιχο διάγραμμα αυτής της εξίσωσης είναι το εξής:



Εικόνα : Διάγραμμα Lineweaver-Burk (Tuition Tub, 2016)

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα της παραπάνω εικόνας προκύπτει μια ευθεία γραμμή η οποία τέμνει τον άξονα x στο $-1/K_m$ και τον άξονα y στο $1/V_{\max}$, ενώ η κλίση ισούται με K_m/V_{\max}

(Strayer, 2015).

4.5 Σταθερά αναστολής K_i

Με σκοπό τον προσδιορισμό του είδους της αναστολής (συναγωνιστική, μη συναγωνιστική, ασυναγώνιστη) πραγματοποιούνται μετρήσεις των διαφόρων ταχυτήτων κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα (Strayer, 2015).

Η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να ενσωματώνει την επίδραση των αναστολέων ως εξής:

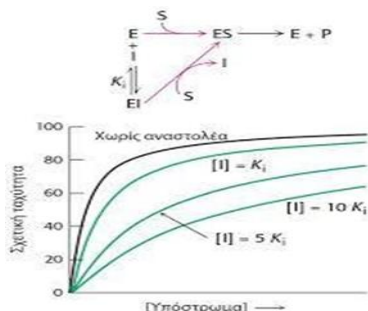
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Όπου:

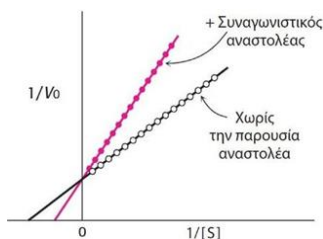
[I]: συγκέντρωση αναστολέα

K_i : σταθερά διάστασης συμπλόκου ένζυμου-αναστολέα

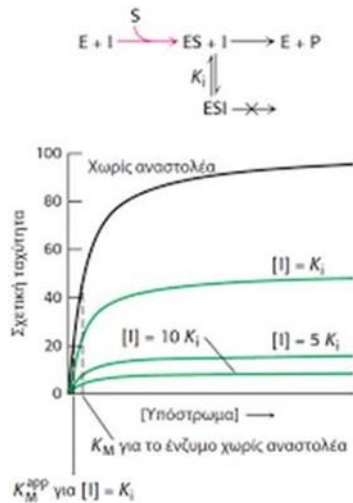
K_i' : σταθερά διάστασης αναστολέα ενζύμου-υποστρώματος (Staffan L. Sjostrom, 2013).



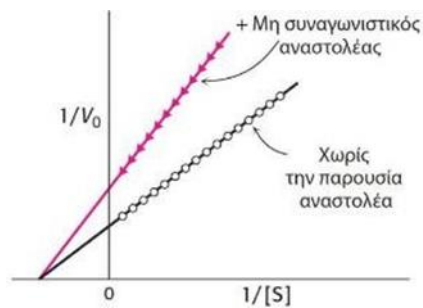
Εικόνα : Κινητική συναγωνιστικού αναστολέα (Strayer, 2015)



Εικόνα : Συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (V_{\max} : δεν επηρεάζεται, K_m : αυξάνεται) (Strayer, 2015)



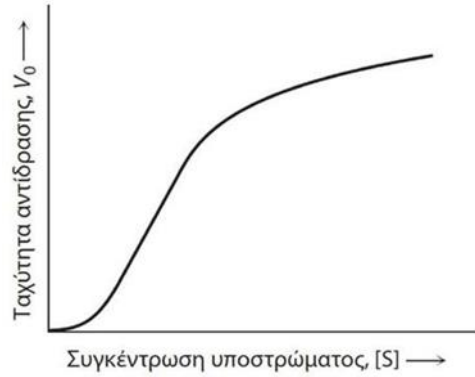
Εικόνα : Κινητική ενός ασυναγωνιστικού αναστολέα (Stryer, 2015)



Εικόνα : Μη συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (V_{max} : ελαττώνεται, K_m : παραμένει σταθερή)(Stryer, 2015)

4.6 Αλλοστερικά ένζυμα

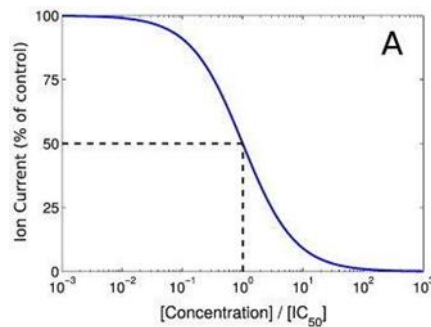
Αλλοστερικά ονομάζονται τα ένζυμα εκείνα τα οποία έχουν περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες και περιέχουν ξεχωριστές μονάδες στις οποίες διεξάγεται η κατάλυση (πολλαπλές υπομονάδες-πολλά ενεργά κέντρα). Παρουσιάζουν χαρακτηριστικές σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις για την κινητική τους. Χαρακτηριστικό των αλλοστερικών ενζύμων είναι πως η πρόσδεση του ενός υποστρώματος σε οποιοδήποτε ενεργό κέντρο μπορεί να μεταβάλλει τις ιδιότητες των υπολοίπων κέντρων στο ίδιο μόριο (συνεργειακή πρόσδεση). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των αλλοστερικών ενζύμων είναι ότι η δραστηριότητα μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, που είναι ανεξάρτητες από τα καταλυτικά κέντρα. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες των κυττάρων (Stryer, 2015).



Εικόνα : Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου (Stryer, 2015)

4.7 IC₅₀

Η τιμή της IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται ώστε να έχουμε 50% μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ αποτελεί και ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής διαδικασίας. Πειραματικά αυτό μπορεί να προσδιοριστεί κατασκευάζοντας μια καμπύλη και εξετάζοντας την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα (Bag Arijit, 2016).



Εικόνα : Καμπύλη IC₅₀ (Williams Geoff, 2015)

Κεφάλαιο 5ο: Υλικά-Μέθοδοι

5.1 Αντιδραστήρια

Adenosine 5'-monophosphate monohydrate	<i>SIGMA</i>
Ammonium molybdate	<i>SIGMA</i>
β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate	<i>SIGMA</i>
β-Mercaptoethanol	<i>SIGMA</i>
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	<i>Applichem</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>SERVA</i>
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	<i>Panreac</i>
Glycerol	<i>Panreac</i>
Glycogen from oyster type II	<i>SIGMA</i>
Hydrochloric Acid (HCl)	<i>Merck</i>
Imidazole Bio Ultra	<i>SIGMA</i>
L-Ascorbic Acid	<i>SIGMA</i>
Potassium Chloride (KCl)	<i>Merck</i>
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	<i>SERVA</i>
Sodium Chloride (NaCl)	<i>Applichem</i>
Sodium Hydroxide (NaOH)	<i>Merck</i>
Tris	<i>SERVA</i>
Zinc acetate	<i>SIGMA</i>

5.2 Υλικά και όργανα

Falcons (50 mL, 15 mL)	<i>CORNING</i>
------------------------	----------------

Micro Tubes (1.5 mL)	AHN Biotehnologie GmbH
Tips (0.1-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL)	Gilson
Κυψελίδα χαλαζία	Hellma Analytics

Όργανα

UV-1600 PC Spectrophotometer	VWR
WiseStir HS-30E homogenizing stirrer	
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH
Αυτόματες πιπέτες	Gilson
Μετρητής pH	Metrohm
Υδατόλουτρο	Wisebath
Vortex	Kisker

5.3 Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP

Η αντίδραση κατάλυσης της φωσφορυλάση PSP είναι αντιστρεπτή διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε κατά τη διαδικασία εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, και πιο συγκεκριμένα η κατεύθυνση της σύνθεσης του άμυλου, δηλαδή η ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο άμυλο. Το άμυλο που δημιουργείται απελευθερώνει ορθοφωσφορικά ιόντα τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά και να ποσοτικοποιηθούν.

5.4 Μέθοδος ασκορβικού οξέος(Saheki et al., 1987).

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 µM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο. Αφού γίνει η προετοιμασία των δύο διαλυμάτων και η ρύθμιση του pH, αναμιγνύονται το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε αδιαφανές σκούρο δοχείο. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min από την παρασκευή του. Ακολουθεί προσθήκη στα δείγματα ποσότητας του διαλύματος και μετά τη προσθήκη πραγματοποιείται ισχυρή ανάμιξη με Vortex των δοκιμαστικών σωλήνων και επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για

άλλα 15 λεπτά σε υδατόλουτρο. Έπειτα ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου: (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH στο 5.0 γίνεται με ατμίζων HCl 10 M.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH στο 5.0 γίνεται με NaOH 10 M.

Ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

Τυφλό H₂O	10 μL SDS 1 % (w/v) + 40 μL dH ₂ O
Τυφλό Ενζυμικού Διαλύματος	10 μL SDS 1 % (w/v) + 32 μL dH ₂ O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 31.1 μL dH ₂ O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
Τυφλό Φωσφορικών	10 μL SDS 1 % (w/v) + 30 μL dH ₂ O + 10 μL Pi 1 mM

5.5 Προσδιορισμός K_m

Τα ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης είναι:

- *Assay Buffer 1*: 400 mM KCl, 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 133 mM sodium citrate pH 6.0
- *Assay Buffer 2*: 270 mM KCl, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA, 100 mM sodium citrate pH 6.0

Με σκοπό την παρασκευή του stock G1P, 90 mM χρησιμοποιείται ποσότητα από το διάλυμα των 400 mM.

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P παρασκευάστηκαν μέσω αραιώσης του διαλύματος 90 mM G1P χρησιμοποιώντας το Assay Buffer 2 σε Vτελικό=200 μL

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	G1P] mM σε 180 μL της αντίδρασης
G1P 90 mM 20μL	G1P 9mM	2
Assay buffer 180μL	Vτελ= 200 μL	

G1P 90 mM 30μL Assay buffer 170μL	G1P 13,5mM Vτελ= 200 μL	3
G1P 90 mM 40μL Assay buffer 160μL	G1P 18mM Vτελ= 200 μL	4
G1P 90 mM 60μL Assay buffer 140μL	G1P 27mM Vτελ= 200 μL	6
G1P 90 mM 100μL Assay buffer 100μL	G1P 45mM Vτελ= 200 μL	10
G1P 90 mM 150μL Assay buffer 50 μL	G1P 67.5 mM Vτελ= 200 μL	15

Το ενζυμικό διάλυμα παρασκευάστηκε μέσω της προσθήκης γλυκογόνου.

Ενζυμικό διάλυμα: 250μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 10mg/mL: 3,75μL	L-PSP : 0.15mg/mL
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 25 μL	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 33,75μL	
AB1 400 mM: 187,5 μL	AB1: 300 mM

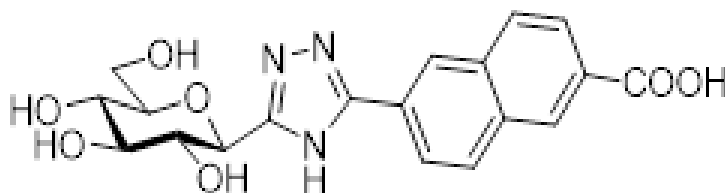
Υποστρώματα: 144 μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις

G1P (9, 13.5, 18, 27, 45, 67.5) mM: 40 μ L	G1P (2, 3, 4, 6, 10, 15) mM
dH ₂ O : 104 μ L	

Για τον προσδιορισμό της K_m παραλήφθηκαν 36 μ L του ενζυμικού διαλύματος, τα οποία και προστέθηκαν στα 144 μ L του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Η χρονική στιγμή αυτή θεωρείται η $t=0$, δηλαδή η στιγμή εκείνη που ξεκινάει η ενζυμική αντίδραση με τελικό όγκο αντίδρασης $V_{τελικό}=180$ μ L. Οι συγκεντρώσεις της G1P ήταν 2, 3, 4, 6, 10 και 15 mM. Στη συνέχεια του πειράματος ελήφθησαν 40 μ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και τοποθετήθηκαν σε 10 μ L SDS 1 % (w/v) με έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.

5.6 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα Ks511 έναντι της PSP

Ο Ks511 είναι ένας αναστολέας, ανάλογο της γλυκόζης, και έχει βρεθεί να συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μυς κονίκλων.



Εικόνα : Συντακτικός τύπος της δομής του αναστολέα Ks511.

Ο προσδιορισμός της K_i έγινε με τις εξής συγκεντρώσεις του αναστολέα KS511:

50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 400 μ M

Υποστρώματα:

	50 μ M	100 μ M	150 μ M	400 μ M
KS511	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
G1P	40 μ L (3 mM)	40 μ L (4 mM)	40 μ L (6 mM)	40 μ L (10 mM)
dH ₂ O μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L

Ενζυμικό διάλυμα: 400 μ L	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 2mg/mL: 30 μ L	L-PSP : 0.15mg/mL

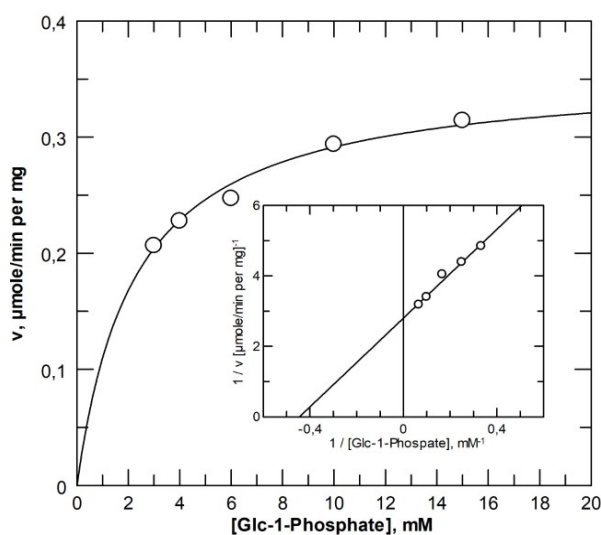
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 40μL	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 30 μL	
AB1 300 mM: 300 μL	AB1: 300 mM

Κεφάλαιο 6ο: Αποτελέσματα

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και τα απαραίτητα διαγράμματα έγιναν με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit

6.1 Προσδιορισμός της K_m

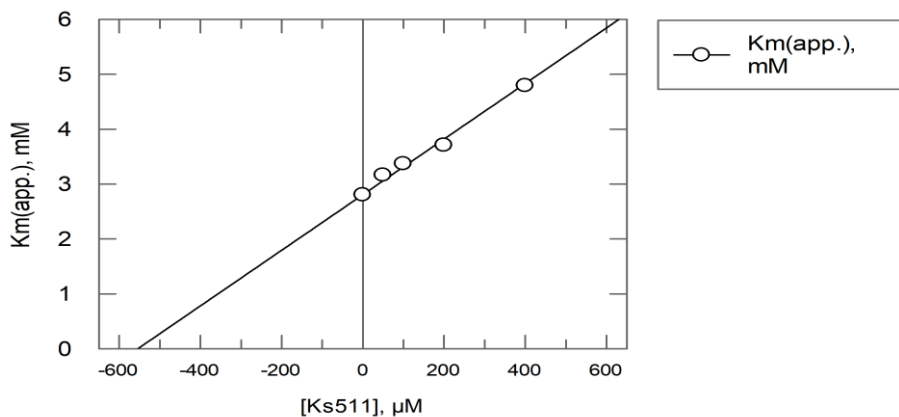
Η K_m για την G1P έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε 2.25 ± 0.23 mM και η V_{max} ίση με $0,36 \pm 0.011$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$.



Εικόνα : Διάγραμμα από τον προσδιορισμό της K_m για την G1P έναντι της L-PSP

6.2 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα Ks511 έναντι της PSP

Η K_i για τον αναστολέα Ks511 έναντι της L-PSP υπολογίστηκε στα 550.2 ± 32.5 μM .



Εικόνα : Διάγραμμα υπολογισμού της K_i του αναστολέα Ks511

Κεφάλαιο 7ο: Συζήτηση

Η φωσφορυλάση του αμύλου του γεωμήλου είναι ένα διμερές ένζυμο μοριακού βάρους 104 kDa, ενώ ανήκει στα μέλη της οικογένειας των γλυκοσυλτρανσφερασών CAZy GT35. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή βρίσκεται σε δύο ισομορφές, αυτή των πλαστιδίων που ονομάζεται και Pho1 (L-PSP), και αυτή του κυτταροπλάσματος που ονομάζεται Pho2 (H-PSP). Η Pho2 (H-PSP) παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια για το άμυλο σε σχέση με τη Pho1. Επίσης, η ισομορφή Pho1 εμπεριέχει και ένα ένθεμα 78 αμινοξέων που δεν απαντάται στην ισομορφή Pho2. Η PSP συμμετέχει στη σύνθεση και στην αποικοδόμηση του αμύλου, καθώς καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της α -1,4-γλυκόζης και του ανόργανου φωσφόρου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP. Αναλυτικότερα, έγινε προσδιορισμός της σταθεράς συγγένειας (K_M) μεταξύ ενζύμου (L-PSP) και υποστρώματος (G1P) και βρέθηκε στα $2.25 \pm 0.23 \text{ mM}$. Ακολούθησαν κινητικές μελέτες της ανασταλτικής επίδρασης ενός αναλόγου γλυκόζης Ks511, που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, και προσδιορίστηκε η τιμή της K_i του αναστολέα Ks511 στα $550.2 \pm 32.5 \mu\text{M}$. Με βάση τις τιμές $K_{M(\text{app})}$ έναντι της PSP προέκυψε το διάγραμμα της παραπάνω εικόνας, όπου στον άξονα y είναι η $K_{M(\text{app})}$ και στον άξονα x οι διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα Ks511. Η αντίστοιχη τιμή της K_i του αναστολέα Ks511 έναντι της ηπατικής φωσφορυλάσης είναι $5.05 \mu\text{M}$, γεγονός που υποδηλώνει τη μεγαλύτερη συγγένεια του για την ηπατική φωσφορυλάση. Συγκρίνοντας τις τιμές αναστολής στα δύο ένζυμα παρατηρείται μια μεγάλη διαφορά 100 φορές για την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε σχέση με την PSP.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση

Alfarouk, K., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A., Bashir, A., Elhassan, G., Ibrahim, M., Orozco, J., Cardone, R., Reshkin, S. and Harguindey, S., 2014. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1(12), pp.777-802.

Adélaïde Raguin and Oliver Ebenhöf, 2017. Design starch: stochastic modeling of starch granule biogenesis

Bailey, E. and Long, W., 1916. On the Occurrence of Starch in Green Fruits. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)*, 28, p.153.

Ball, S.G. & Morell, M.K., 2003. From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), pp.207–233.

Barbara Pfister, Samuel C. Zeeman, 2016. Formation of starch in plant cells.

Blennow, A. et al., 2002. Starch phosphorylation: A new front line in starch research. *Trends in Plant Science*, 7(10), pp.445–450.

Bodinham, C., Frost, G. and Robertson, M., 2009. Acute ingestion of resistant starch reduces food intake in healthy adults. *British Journal of Nutrition*, 103(6), pp.917-922.

Bondeson, D., Mathew, A. & Oksman, K., 2006. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose*, 13(2), pp.171–180.

Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), pp.237–248.

Brown, W. and Poon, T., 2005. *Introduction to organic chemistry*. John Wiley & Sons.

Cai, T., Sun, H., Qiao, J., Zhu, L., Zhang, F., Zhang, J., Tang, Z., Wei, X., Yang, J., Yuan, Q., Wang, W., Yang, X., Chu, H., Wang, Q., You, C., Ma, H., Sun, Y., Li, Y., Li, C., Jiang, H., Wang, Q. and Ma, Y., 2021. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide. *Science*, 373(6562), pp.1523-1527.

Chia, T. et al., 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *The Plant Journal*, 37(6), pp.853–863.

Colleoni, C. et al., 1999. Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin Biosynthesis1. *Plant Physiology*,

120(4), pp.1005–1014.

Dhall, R.K., 2013. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), pp.435–450.

d'Hulst, C., Planchot, V. & Chatterjee, M., 2007. Method for improving plants. US patent application 20070209088.

Duwenig, E. et al., 1997. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*, 12(2), pp.323–333.

Eastwood, M. and Kritchevsky, D., 2005. DIETARY FIBER: How Did We Get Where We Are?. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), pp.1-8.

Eliasson, A., 2004. *Starch in food*. Cambridge: Woodhead Publishing.

Englyst, H., Kingman, S. and Cummings, J., 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(Suppl 2), pp.S33-50.

Fettke, J. et al., 2007. Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52.

Fettke, J. et al., 2004. The glycan substrate of the cytosolic (pho 2) phosphorylase isozyme from *pisum sativum* L.: Identification, linkage analysis and subcellular localization. *The Plant Journal*, 39(6), pp.933–946.

Fettke, J. et al., 2005. Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant and Cell Physiology*, 46(12), pp.1987–2004.

Flitsch, S. and Ulijn, R., 2003. Sugars tied to the spot. *Nature*, 421(6920), pp.219-220.

George D. Dimitriadis, Eirini Maratou, Aikaterini Kountouri, Mary Board, Vaia Lambadiari., 2021 *Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach*.

Haalck, L., Conrath, N. & Spener, F., 1997. Maltose phosphorylase from *lactobacillus brevis*: Purification, characterization, and application in a biosensor for ortho-phosphate. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(6), pp.413–420.

Hannah, L.C. & James, M., 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), pp.160–165.

Hennen-Bierwagen, T.A. et al., 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: A model for regulation of

- carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiology*, 149(3), pp.1541–1559.
- Hsu, J. et al., 2004. Purification and characterization of a cytosolic starch phosphorylase from etiolated rice seedlings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, pp.187–196.
- Hunter, D., 1987. *Papermaking*. New York: Dover.
- IUPAC, 2014. disaccharides. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*,.
- Kennedy, M.G.H. & Isherwood, F.A., 1975. Activity of phosphorylase in solanum tuberosum during low temperature storage. *Phytochemistry*, 14(3), pp.667–670.
- Kötting Oliver et al., 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves. the phosphoglucan, Water Dikinase . *Plant Physiology*, 137(1), pp.242–252.
- Kumar, A., 1989. Starch phosphorylase in plants. *J. Scientific Industrial. Res.*, 48, pp.568–576.
- Le Corre, D., Bras, J. & Dufresne, A., 2010. Starch nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules*, 11(5), pp.1139–1153.
- Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M., 2013. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Li, Y., Liu, P., Ma, C., Zhang, N., Shang, X., Wang, L. and Xie, F., 2020. Structural Disorganization and Chain Aggregation of High-Amylose Starch in Different Chloride Salt Solutions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(12), pp.4838-4847.
- Lin, M., Shang, X., Liu, P., Xie, F., Chen, X., Sun, Y. and Wan, J., 2016. Zinc chloride aqueous solution as a solvent for starch. *Carbohydrate Polymers*, 136, pp.266-273.
- Lindeboom, N., Chang, P. and Tyler, R., 2004. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke*, 56(34), pp.89-99.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L. and Li, L., 2009. Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science*, 34(12), pp.1348-1368.
- Liu, H., Yu, L., Xie, F. and Chen, L., 2006. Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), pp.357-363.
- Liu, P., Xie, F., Li, M., Liu, X., Yu, L., Halley, P. and Chen, L., 2011. Phase transitions of maize starches with different amylose contents in glycerol–water systems. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), pp.180-187.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J. & Ritte, G., 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science*, 10(3), pp.130–137.

Lockyer, S. and Nugent, A., 2017. Health effects of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 42(1), pp.10-41.

Lu, Y. et al., 2006. The role of cytosolic α -glucan phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of Amylomaltase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. *Plant Physiology*, 142(3), pp.878–889.

Maki, K., Pelkman, C., Finocchiaro, E., Kelley, K., Lawless, A., Schild, A. and Rains, T., 2012. Resistant Starch from High-Amylose Maize Increases Insulin Sensitivity in Overweight and Obese Men. *The Journal of Nutrition*, 142(4), pp.717-723.

Masao, T., Junichi, T. & Yasushi, M., 2005. Enzymatic synthesis of amylose and its medical Application. *Biol. Ind.*, 22, pp.58–66.

Megha Rajendran, Eric Dane, Jason Conley, Mathew Tantama, 2017. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP).

Moran, L., 2012. *Principles of biochemistry*. 5th ed. Boston: Pearson.

Nighojkar, S.A. & Kumar, A., 1997. Starch phosphorylase: Biochemical, molecular and biotechnological aspects. *Genet. Eng. Biotechnol*, 17, pp.189–202.

Nugent, A., 2005. Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1), pp.27-54.

Ohdan, K. et al., 2006. Enzymatic synthesis of amylose. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(1-2), pp.77–81.

Ohdan, K. et al., 2007. Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylose. *Journal of Biotechnology*, 127(3), pp.496–502.

Orzechowski, S., 2008. Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), pp.435–445.

Paweł Jeżowski, Przemysław Łukasz Kowalczewski, 2019. Starch as a Green Binder for the Formulation of Conducting Glue in Supercapacitors.

Pliny the Elder, 2009. Pliny the Elder, *The Natural History*, BOOK I.1, DEDICATION. 1 Lemaire informs us, in his title-page, that the two first books of the *Natural History* are edited by M. Alexandre, in his edition.. [online] [Perseus.tufts.edu](http://www.perseus.tufts.edu). Available at: <<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137&redirect=true>> [Accessed 13 January 2022].

Puskas, J., 2013. *Introduction to Polymer Chemistry: A Biobased Approach*. DEStech Publications, p.138.

Rathore, R.S. et al., 2009. Starch phosphorylase: Role in starch metabolism and biotechnological

- applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(3), pp.214–224.
- Reed, D., 2013. *Chemistry for biologists*. Harlow: Pearson Education.
- Revedin, A., Aranguren, B., Becattini, R., Longo, L., Marconi, E., Lippi, M., Skakun, N., Sinitsyn, A., Spiridonova, E. and Svoboda, J., 2010. Thirty thousand-year-old evidence of plant food processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), pp.18815-18819.
- Satoh, H. et al., 2008. Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *The Plant Cell*, 20(7), pp.1833–1849.
- Schneider, E.M., Becker, J.-U. & Volkmann, D., 1981. Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. *Planta*, 151(2), pp.124–134.
- Schupp, N. & Ziegler, P., 2004. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant and Cell Physiology*, 45(10), pp.1471–1484.
- Singh, S. & Sanwal, G.G., 1975. Characterization of multiple forms of α -glucan phosphorylase from *Musa paradisiaca* fruits. *Phytochemistry*, 14(1), pp.113–118.
- Sonnewald, U. et al., 1995. A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: Cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Molecular Biology*, 27(3), pp.567–576.
- Steup, M., Starch degradation. In J. Preiss, ed. *The Biochemistry of Plants*. San Diego: Academic Press, pp. 255–266.
- Steup, M. & Latzko, E., 1979. Intracellular localization of phosphorylases in spinach and pea leaves. *Planta*, 145(1), pp.69–75.
- Steup, M., Robenek, H. & Melkonian, M., 1983. In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta*, 158(5), pp.428–436.
- Tan, X., Li, X., Chen, L. and Xie, F., 2016. Solubility of starch and microcrystalline cellulose in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ionic liquid and solution rheological properties. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(39), pp.27584-27593.
- Tetlow, I.J. et al., 2004a. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. *The Plant Cell*, 16(3), pp.694–708.
- Tetlow, I.J., 2004b. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), pp.2131–2145.
- The Telegraph, 2009. Porridge was eaten 100,000 years ago. [online] The Telegraph. Available at: <<https://www.telegraph.co.uk/news/uknews/6834609/Porridge-was-eaten-100000-years-ago.html>> [Accessed 13 January 2022].

Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V. and Coccetti, P., 2015. Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(4), pp.620-627.

Virtual ChemBook, 2003. Virtual ChemBook. [online] Chemistry.elmhurst.edu. Available at: <<http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/index.html>> [Accessed 14 January 2022].

Vlastaridis, P., Papakyriakou, A., Chaliotis, A., Stratikos, E., Oliver, S. and Amoutzias, G., 2017. The Pivotal Role of Protein Phosphorylation in the Control of Yeast Central Metabolism. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 7(4), pp.1239-1249.

Walter, J. and Ley, R., 2011. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp.411-429.

Weise, S., Weber, A. and Sharkey, T., 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*, 218(3), pp.474-482.

www.novamont.com, 2021. Mater-Bi - biodegradable and compostable bioplastics - Novamont. [online] Novamont.com. Available at: <<https://www.novamont.com/eng/mater-bi>> [Accessed 14 January 2022].

Yu, S. & Pederson, M., 1991. One step purification to homogeneity and isoforms of α -1,4- glucan phosphorylase of red sea weeds. *Plant Physiol. Biochem*, 29, pp.9–16.

Zeeman, S.C. et al., 2004. Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiology*, 135(2), pp.849–858.

Zeeman, S.C. et al., 2007. Starch breakdown: Recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Functional Plant Biology*, 34(6), p.465.

Zhang, B., Chen, L., Xie, F., Li, X., Truss, R., Halley, P., Shamshina, J., Rogers, R. and McNally, T., 2015. Understanding the structural disorganization of starch in water–ionic liquid solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(21), pp.13860-13871.

Zhang, C., Xu, D. & Zhu, Z., 2014. Octenylsuccinylation of cornstarch to improve its sizing properties for polyester/cotton blend spun yarns. *Fibers and Polymers*, 15(11), pp.2319–2328.

Zhang, Y., Evans, B., Mielenz, J., Hopkins, R. and Adams, M., 2007. High-Yield Hydrogen Production from Starch and Water by a Synthetic Enzymatic Pathway. *PLoS ONE*, 2(5), p.e456.

Zobel, H., 1988. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch - Stärke*, 40(2), pp.44-50.

Ελληνική

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Βιβλίο Βιοχημείας, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012, Μέρος Ι Ο μοριακός σχεδιασμός της ζωής: Υδατάνθρακες σελ.323

Δρ. Παναγιώτης Πλαγεράς, Δρ. Άγγελος Παπαιωάννου, 2012. Βασικά θέματα Βιοχημείας. Κεφάλαιο 11: Μεταβολισμός των Υδατανθράκων.