

# Kinetika enzima katalaze

---

**Mihalic, Luka**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University North / Sveučilište Sjever**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:116294>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

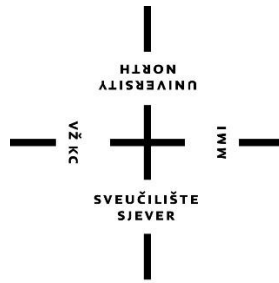
*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-30**



*Repository / Repozitorij:*

[University North Digital Repository](#)





# Sveučilište Sjever

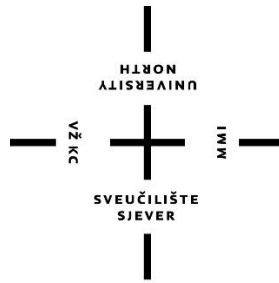
Završni rad br. 20/PREH/2022

## Kinetika enzima katalaze

Luka Mihalic, 0336038491

Koprivnica, kolovoz 2022. godine





# Sveučilište Sjever

**Odjel za Prehrambenu tehnologiju**

**Završni rad br. 20/PREH/2022**

## **Kinetika enzima katalaze**

### **Student**

Luka Mihalic, 0336038491

### **Mentor**

Izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Luka Mihalic

MATIČNI BROJ 0336038491

BATIM 01.07.2022.

KOLEGIJ Osnove biokemije

NASLOJ RADA Kinetika enzima katalaze

NASLOJ RADA NA ENGL. JEZIKU Catalase kinetics

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv.prof.dr.sc.

ČLANOVI POVJERENSTVA

1. doc.dr.sc. Dunja Šamec, predsjednica
2. Ivana Dodek Šarkanj, pred., članica
3. izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj, mentor
4. izv.prof.dr.sc. Krunoslav Hajdek, zamjena člana
5. \_\_\_\_\_

## Zadatak završnog rada

BROJ 22/PREH/2022

OPIS

Zadatak rada je opisati kemijske reakcije prvog, drugog i nultog reda radi boljeg razumijevanja enzimskih reakcija te izvod formula za računanje brzine enzimske reakcije. Ispitati aktivnost enzima katalaze kod različitih pH vrijednosti i temperatura te potvrditi stabilnost kupovnog enzima i primjeniti znanja o kinetici enzima za preračunavanje njegove aktivnosti.

ZADATAK UNUČEN

5.9.2022.

SVUČILIŠTE  
SIEVER



# **Predgovor**

Razlog odabira područja i teme rada je želja za detaljnijim znanjem biokemije, a posebno želja da naučim više o načinu kako djeluju enzimi te da naučeno potvrdim sa istraživanjem na katalazi u novoizgrađenom laboratoriju na sveučilištu. Cilj rada bio je naučeno o inhibicijama enzima te njihovoj kinetici potvrditi pomoću eksperimenata.

## Sažetak

Enzimi su građeni od proteina, jedne od četiri glavnih skupina biomolekula. Ljudski organizam bez njih ne bi mogao funkcionirati jer bi se neke metaboličke reakcije odvijale presporo pa su zato oni tu da ubrzaju te reakcije. Ubrzavanje tih reakcija se temelji na vezanju supstrata u aktivno mjesto, a to vezanje može biti na principu ključ-brava kada supstrat idealno pristaje u aktivno mjesto enzima ili može biti izazvano pristajanje kada se enzim prilagodi na supstrat. U početku rada će biti opisane kemijske reakcije prvog, drugog i nultog reda radi boljeg razumijevanja enzimskih reakcija. Također će biti prikazan cijeli izvod formule za računanje brzine enzimske reakcije, koja se do određene koncentracije supstrata povećava, a nakon toga ostaje stalna kada je sav enzim zasićen supstratom. Svaki enzim sastoji se od aktivnog mjesta u kojem ima afinitetno mjesto koje sudjeluje u vezanju supstrata te katalitičko mjesto koje sudjeluje u provedbi reakcije. Enzimi različito djeluju, pri različitim uvjetima temperature, pH i u prisustvu inhibitora. Na kraju rada provedeno je ispitivanje aktivnosti enzima katalaze pri određenim uvjetima pH i temperature. Katalaza provodi reakciju razgradnje vodikovog peroksida na vodu i kisik.

**Ključne riječi:** kinetika enzima; katalaza; vodikov peroksid, inhibicija enzima

## **Abstract**

All enzymes are made of proteins, one of the main biomolecules. Human metabolism won't operate in the absence of enzymes since reactions would take place too slowly and that is the main function of enzymes, to speed up reactions. Speeding up reactions with enzymes is based on binding substrates to an active place. Types of binding are lock and key model or induced fit. At the beginning of this paper, it will be a discussion about the order of the reaction. Reactions can be of first, second, and zero order. Onwards the whole derivation of the enzyme kinetics equation will be displayed. All enzymes contain active sites in which are found affinity sites, where the substrate binds, and catalytic sites where the reaction occurs. Different conditions of pH, temperature and the presence of inhibitors affect enzymes. The experiment on catalase activity in different conditions of pH and temperature was made. Catalase carries out the degradation of hydrogen peroxide into water and oxygen.

**Keywords:** enzyme kinetics, catalase, hydrogen peroxide, enzyme inhibition



## Popis korištenih kratica

<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b><math>\Delta A</math></b>	Promjena apsorbancije
<b>DIPF</b>	diizopropilfosfofluoridat
<b>DHAP</b>	Dihidroksiaceton fosfat
<b>DNA</b>	Dekosiribonukleinska kiselina
<b>[E]</b>	Koncentracija enzima
<b>ES</b>	Enzim-supstrat kompleks
<b>[ES]</b>	Koncentracija enzim-supstrat kompleksa
<b>[E]<sub>T</sub></b>	Koncentracija ukupnog enzima
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinukleotid
<b>FADP</b>	Flavin adenin dinukleotid fosfat
<b><math>\Delta G</math></b>	Promjena Gibbsove slobodne energije
<b><math>\Delta G^\circ</math></b>	Promjena Gibbsove slobodne energije pri standardnim uvjetima
<b><math>k_{-2}</math></b>	konstanta brzine spajanja enzima i produkta natrag u enzim supstrat kompleks
<b><math>k_{-1}</math></b>	konstanta brzine disocijacije enzim supstrat kompleksa na enzim i supstrat
<b><math>k_1</math></b>	konstanta brzine spajanja enzima i supstrata u enzim supstrat kompleks
<b><math>k_2</math></b>	konstanta brzine disocijacije enzim supstrat kompleksa na enzim i produkt
<b><math>k_{cat}</math></b>	Okretni broj enzima
<b><math>K'_{eq}</math></b>	Konstanta ravnoteže pri standardnim uvjetima
<b><math>K_M</math></b>	Michaelis-Mentenina konstanta
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nikotin amid dinukleotid
<b>NADH</b>	Protonirani nikotin amid dinukleotid
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nikotin amind dinukleotid fosfat
<b>pH</b>	Mjera za kiselost, negativan logaritam koncentracije vodikovih iona
<b>pKa</b>	Logaritamska konstanta disocijacije kiseline
<b>R</b>	Opće plinska konstanta
<b>RNA</b>	Ribonukleinska kiselina
<b>[S]</b>	Koncentracija supstrata
<b>T</b>	Termodinamička temperatura
<b><math>V_0</math></b>	Početna brzina
<b><math>V_{max}</math></b>	Najveća brzina



# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	2
2.1.	Gibbsova slobodna energija .....	2
2.2.	Brzina kemijske reakcije .....	3
2.2.1.	Reakcije prvog reda .....	3
2.2.2.	Reakcije drugog reda .....	5
2.2.3.	Reakcije nultog reda .....	5
2.3.	Aktivno mjesto enzima i prijelazno stanje .....	7
2.4.	Michaelis – Mentenina jednadžba .....	10
2.4.1.	Izvod .....	10
2.4.2.	Značenje Michaelisove konstante ( $K_M$ ) .....	14
2.4.3.	Okretni broj ( $k_{cat}$ ) .....	16
2.4.4.	Efikasnost enzima ( $k_{cat}/K_M$ ) .....	16
2.5.	Višesupstratne reakcije .....	17
2.6.	Utjecaj različitih faktora na brzinu enzimske reakcije .....	19
2.6.1.	pH .....	19
2.6.2.	Temperatura .....	20
2.6.3.	Inhibicija enzima .....	21
2.6.4.	Kompetitivna inhibicija .....	21
2.6.5.	Akompetitivna inhibicija .....	22
2.6.6.	Nekompetitivna inhibicija .....	23
2.6.7.	Parcijalno kompetitivna inhibicija .....	24
2.6.8.	Parcijalno nekompetitivna inhibicija .....	24
2.6.9.	Inhibicija supstratom .....	24
2.6.10.	Miješana inhibicija .....	24
2.6.11.	Alosterički enzimi .....	25
2.6.12.	Ireverzibilna inhibicija .....	26
2.6.13.	Analozi prijelaznog stanja .....	27
2.7.	Katalaza .....	28
2.7.1.	Struktura .....	28
2.7.2.	Hem džep .....	29
2.7.3.	Kinetika katalaze .....	29
3.	PRAKTIČNI DIO .....	31
3.1.	Materijali i metode .....	31
3.2.	Spektrofotometrija .....	31
3.3.	Postupak testiranja .....	32
4.	Rezultati i rasprava .....	33
5.	ZAKLJUČAK .....	36
6.	LITERATURA .....	37
7.	POPIS SLIKA I TABLICA .....	38

# 1. UVOD

Enzimi su stanični biokatalizatori i većina biološki relevantnih reakcija bez njih bila bi prespora ili se ne bi niti završile. Znanstvenik James Sumner je otkrio da je većina enzima građena od proteina, odnosno aminokiselina. Dakle u većini slučajeva enzimi su proteini, ali neke RNA molekule, kao npr. RNA-polimeraze, mogu se ponašati kao enzimi. Enzimi se, kao i proteini, sastoje od primarne, sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture. Molekularna masa enzima se preseže od 12 000 do 1 milijun. Denaturacijom, odnosno uništavanjem strukture enzima, gubi se i sama njihova aktivnost [1]. Enzimi su strukturirani tako da u sebi imaju „džep“ zvan aktivno mjesto u kojem se nalaze aminokiseline s kofaktorima i koenzimima, u tom mjestu se provode reakcije katalize. Najčešća aminokiselina u aktivnom mjestu je histidin, razlog tome je što on disocira na pH između 6 i 7 što je približno fiziološkoj pH vrijednosti [2]. Enzim sa svojim kofaktorom zove se holoenzim. Kofaktori mogu biti metali ili koenzimi. Pod koenzime spadaju prostetske skupine i kosupstrati. Prostetske skupine su skupine koje su čvrsto (kovalentno) vezane za enzim i pomažu u katalizi, primjer toga je biotin, kod piruvat karboksilaze, koji prenosi CO<sub>2</sub> s karboksifosfata u aktivno mjesto piruvat karboksilaze te taj enzim dodaje piruvatu CO<sub>2</sub> i nastaje oksaloacetat. Kosupstrati su spojevi koji se skupa sa supstratom vežu na enzim i tako omogućuju katalizu. Najpoznatiji kosupstrati u ljudskom organizmu su NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD i FADP. Enzimi se razlikuju po svojoj specifičnosti. Specifični su za točno određenu (ili sličnu) reakciju i za supstrat. Neki supstrati ne zahtijevaju visoku specifičnost, kao npr. enzim papain koji može pocijepati peptidnu vezu na bilo kojem mjestu, a neki su zahtjevni te oni mogu pocijepati peptidnu vezu između točno određenih aminokiselina. Ta specifičnost enzima je važna jer tako se sprječava nagomilavanje nepotrebnih nusprodukata. Važno je napomenuti da enzimi pomažu u pretvorbi energije iz jednog oblika u drugi pa tako kad pojedemo hranu oni pretvaraju komponente hrane u energiju sačuvanu u fosfodieterskoj vezi ATPa, tako čovjek dobiva energiju. Enzimi se dijele prema tipu reakcije koje provode. Oksidoreduktaze provode reakcije oksidacije i redukcije (dehidrogenaze, oksidaze, reduktaze). Transferaze premještaju određene skupine s jedne molekule na drugu (transketolaza, transaldolaza). Hidrolaze provode reakcije hidrolize veze u molekulama (proteaze – cijepaju peptidne veze). Liaze eliminiraju atome u spoju i time nastaju dvostruka ili trostruka veza. Izomeraze premještaju skupinu unutar istog spoja i tako nastaje izomer supstrata. Ligaze stvaraju nove veze uz utrošak ATPa [3].

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Gibbsova slobodna energija

Za razumijevanje kinetike enzima najprije je potrebno razumjeti pojam Gibbsove slobodne energije. Gibbsova slobodna energija ( $\Delta G$ ) je razlika energija između produkata i reaktanata. Ako produkti imaju više slobodne energije nego reaktanti, tada je  $\Delta G$  pozitivan i ta reakcija je endergona, odnosno ona se ne može odvijati spontano već se mora uložiti energija da bi se ona odvijala, primjer jedne takve reakcije je fosforilacija ADPa u ATP koja se odvija na unutarnjoj membrani mitohondrija. Ako produkti imaju manje slobodne energije nego reaktanti, tada je  $\Delta G$  negativan i reakcija je egzergona, odnosno ona se odvija spontano uz nastajanje energije, primjer je hidroliza fosfodieterske veze ATPa čime se oslobađa energija. Za izračunavanje Gibbsove slobodne energije kod enzimskih reakcija potrebno je definirati Gibbsovu slobodnu energiju pri standardnim uvjetima ( $\Delta G^\circ$ ). Standardni uvjeti su: temperatura od 298 K, tlak od 1 atm ili 101.3 kPa te koncentracija svih reaktanata i produkata 1 M. Gibbsovu slobodnu energiju pri standardnim uvjetima u biokemiji ćemo označavati s  $\Delta G'^\circ$  jer se u biokemijskim sustavima najčešće pojavljuju  $H^+$  ioni čija je koncentracija daleko ispod 1 M. Jednadžba za Gibbsovu slobodnu energiju glasi:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln\left(\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}\right) \quad (1)$$

U jednadžbi (1), R označava opću plinsku konstantu koja iznosi  $8.315 \times 10^{-3}$  kJ/molK, T označava termodinamičku temperaturu koja pri standardnim uvjetima od  $25^\circ\text{C}$  iznosi 298 K, a [C], [D], [A] i [B] su koncentracije produkata/reaktanata. Ako uzmemo da je sustav u ravnoteži i nema promjene slobodne energije, odnosno  $\Delta G = 0$  tada vrijedi:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln\left(\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}\right) \quad (2)$$

$$\ln(x) = 2.303 \log_{10} X \quad (3)$$

Preuređenjem jednadžbe (2) pomoću (3) dobivamo:

$$\Delta G^\circ = -2.303 RT \log_{10}\left(\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}\right) \quad (4)$$

U jednadžbu se može uvesti i konstanta ravnoteže pri standardnim uvjetima koja glasi:

$$K'_{eq} = \left(\frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}\right) \quad (5)$$

Uvrštavanjem konstante ravnoteže (5) u jednadžbu (4) i okretanjem jednadžbe dobivamo:

$$K'_{eq} = 10^{\frac{-\Delta G^\circ}{2.303RT}} \quad (6)$$

Te ako uvrstimo vrijednosti za R i T kod standardnih uvjeta dobivamo:

$$K'_{eq} = 10^{\frac{-\Delta G^\circ}{5.69}} \quad (7)$$

Ovaj odnos pokazuje da se povećanjem konstante ravnoteže, odnosno povećanjem omjera produkata i reaktanata, smanjuje vrijednost Gibbsove slobodne energije pri standardnim uvjetima. Također ako usporedimo jednadžbu (1) i (4), vidimo da Gibbsova slobodna energija ne mora imati negativnu vrijednost ako je  $\Delta G^\circ$  negativan jer ako je omjer koncentracija produkata i reaktanata velik tada je Gibbsova slobodna energija pozitivna i reakcija je endergona. To pokazuje da ako imamo puno veću koncentraciju produkata reakcija će biti endergona. Važno je napomenuti da enzimi ne mijenjaju zakone termodinamike i ne mogu promijeniti hoće li neka reakcija biti spontana ili ne te oni ne mijenjaju ravnotežu kemijske reakcije. Enzimi primarno djeluju na brzinu kemijske reakcije smanjenjem energije aktivacije i stabilizacijom prijelaznog stanja što će biti objašnjeno kasnije [3].

## 2.2. Brzina kemijske reakcije

### 2.2.1. Reakcije prvog reda

Brzina reakcije prvog reda se definira kao pretvaranje jednog reaktanta u produkt u određenom vremenu. Jednadžbom ovo možemo prikazati ovako:

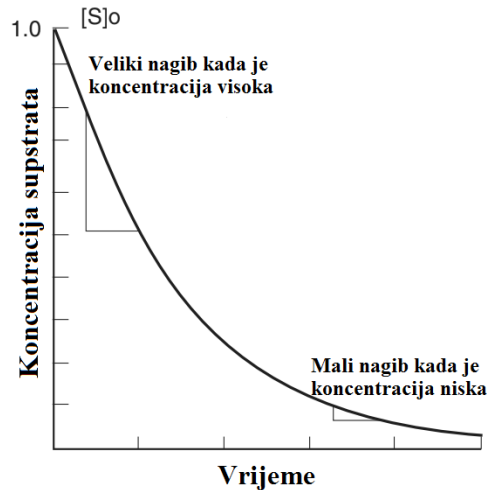


Brzina reakcije ovisi o koncentracijama reaktanata i produkata jer se tijekom reakcije koncentracija reaktanata smanjuje, a koncentracija produkata se povećava pa iz tog zaključka izvodimo formulu :

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad (9)$$

Formula (9) pokazuje zakon brzine kemijske reakcije te pokazuje kako brzina reakcije ovisi o koncentraciji reaktanta. Red reakcije u ovom primjeru je  $[A]^1$  jer je stehiometrijski koeficijent ispred reaktanta 1. U formuli također postoji  $k$ , što označava konstantu reakcije i također označava nagib same krivulje. Mjerna jedinica za koncentraciju je mol/L ili kako se često u kemiji označava

M (molarno), a znamo da se kod formula za brzinu sve događa u nekom vremenu pa tako pretvorba određene koncentracije reaktanata u produkt mora biti u nekom vremenu, za što se uzima sekunda. Kako bi na kraju mjerna jedinica bila pravilna, mjerna jedinica konstante  $k$  je recipročna vrijednost sekunde, odnosno  $s^{-1}$ . Iz formule (9) možemo vidjeti kako brzina reakcije ovisi o koncentraciji reaktanata, dakle kako reakcija napreduje, koncentracija reaktanata je sve manja, supstrat se iskorištava, a reakcija je s vremenom sve sporija. Ovo se može prikazati grafom na „slici 2.2.1.1“



Slika 2.2.1.1 Graf ovisnosti brzine o koncentraciji supstrata [4]

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (10)$$

Formula (10) povezuje koncentraciju supstrata  $A$  s koncentracijom supstrata u početnom stanju  $A_0$  u bilo kojem vremenu  $t$  i konstantu  $k$  za reakciju prvog reda. Ovu reakciju koristimo jer na početku same reakcije znamo točno koju koncentraciju supstrata imamo, a tijekom reakcije se koncentracija mijenja i točnost je sve manja. Ako idemo dalje izvodit u vremenu  $t = 0$  vidimo da je vrijednost  $e^{-kt} = 1$  jer je  $e^0 = 1$  pa je tada  $A = A_0$ . Što zapravo i potvrđuje prijašnji graf. Također je važno napomenuti da je, za pretvorbu polovice supstrata u produkt, potrebno točno određeno vrijeme bez obzira na početnu koncentraciju supstrata. Matematički to pokazujemo:

$$A = \frac{1}{2} A_0 \quad (11)$$

Kada (11) uvrstimo u (10) rješavanjem formule dobivamo:

$$\frac{0.695}{k} = t_{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Tim izrazom potvrđujemo prethodnu tezu i zaključujemo da vrijeme potrebno za pretvorbu polovice supstrata u produkt ovisi samo o vrijednosti  $k$  [4].

### 2.2.2. Reakcije drugog reda

Reakcije drugog reda su reakcije u kojima sudjeluju dva reaktanta, odnosno supstrata i nastaje jedan produkt. Kako su u ovim reakcijama bitne koncentracije oba reaktanta u formuli se također to uzima u obzir:

$$V = k[A][B] \quad (13)$$

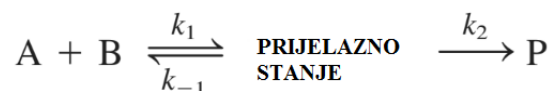
Ako imamo kod jednog reaktanta stehiometrijski koeficijent 2 tada reakcija postaje reakcija trećeg reda i tada se stehiometrijski koeficijent, u formuli, stavlja u eksponent kraj koncentracije tog reaktanta. Mjerne jedinice su iste kao i kod reakcija prvog stupnja. U slučaju reakcija drugog reda postoji mjerodavni reaktant čija se koncentracija uvelike smanjuje i o njoj ovisi hoće li se reakcija događati. Uzmimo da je mjerodavni reaktant A, a [B] se gotovo ni ne mijenja. Tako možemo zaključiti da brzina reakcije drugog stupnja gotovo u potpunosti ovisi o koncentraciji mjerodavnog reaktanta [4].

### 2.2.3. Reakcije nultog reda

Reakcije nultog reda su reakcije kojima brzina ne ovisi o koncentraciji supstrata već je brzina konstantna i jednaka je kao vrijednost konstante  $k$  čije je mjerna jedinica, u ovom slučaju, M/min. Ovu tezu možemo napisati i pomoću formule:

$$V = k \quad (14)$$

Uzmimo za primjer ovu reakciju:

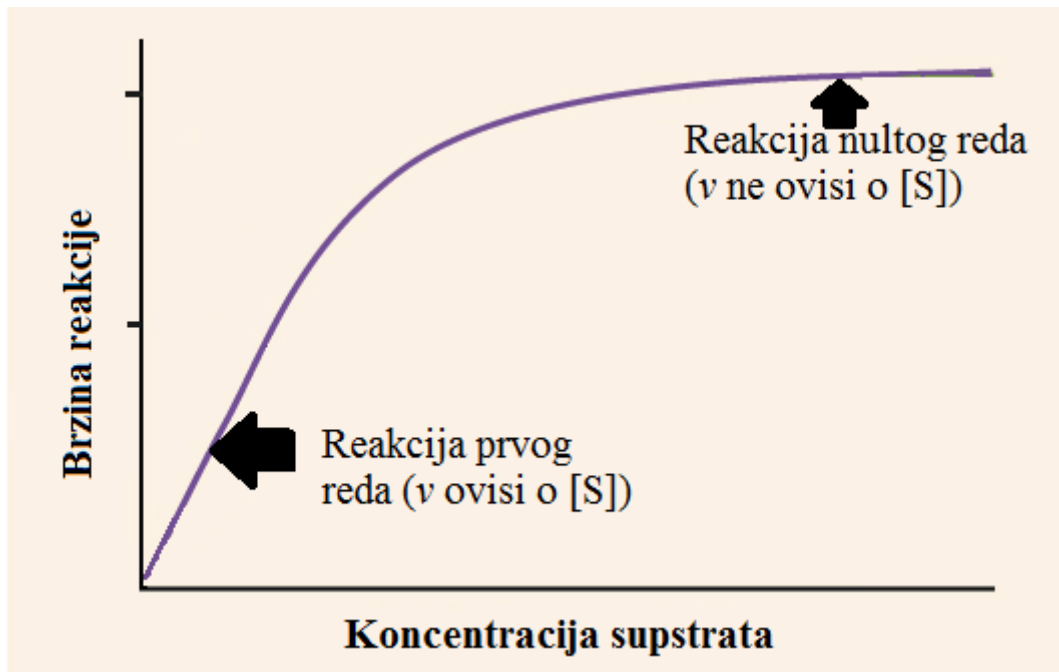


*Slika 2.2.3.1 Primjer jednadžbe nultog stupnja [4]*

U reakciji kada je puno manje reaktanta A, a puno više reaktanta B, tada reakcija ovisi samo o reaktantu A jer kada se on potroši nema više prelaska u prijelazno stanje. Samo prijelazno stanje može prijeći u produkt P pa tako možemo reći da nastanak produkta izravno ovisi samo o koncentraciji jednog reaktanta što je reakcija prvog stupnja, a ako gledamo iz perspektive reaktanta B tada je to reakcija nultog stupnja jer nastanak produkta ne ovisi o koncentraciji reaktanta B. Kod



enzimske kinetike mnoge reakcije sa strane supstrata su reakcije nultog stupnja, a sa strane enzima su prvog stupnja što će biti objašnjeno kasnije u radu [4].

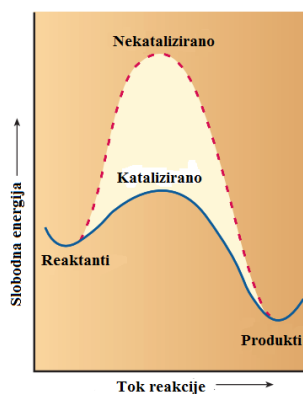


Slika 2.2.3.2 Primjer grafa koji prikazuje reakciju prvog i nultog reda [5]

Formula za brzinu reakcije u ovom slučaju u prisutnosti enzima je:

$$V = V[X^\ddagger] = \frac{kT}{h[S]e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}} \quad (15)$$

Formula (15) se sastoji od Boltzmannove konstante koja je označena slovom  $k$ , termodinamičke temperature pri standardnim uvjetima, Planckove konstante, opće plinske konstante, slobodne energije aktivacije i koncentracije supstrata. Smanjenjem slobodne energije aktivacije, prema jednažbi, povećava se brzina kemijske reakcije što odlično opisuje djelovanje enzima na energiju aktivacije no o tome će biti riječ kasnije u radu. Ako se energija aktivacije smanji, više supstrata će prijeći u produkt [3]. Graf smanjenja energije aktivacije prikazan je na „slici 2.2.3.3“.

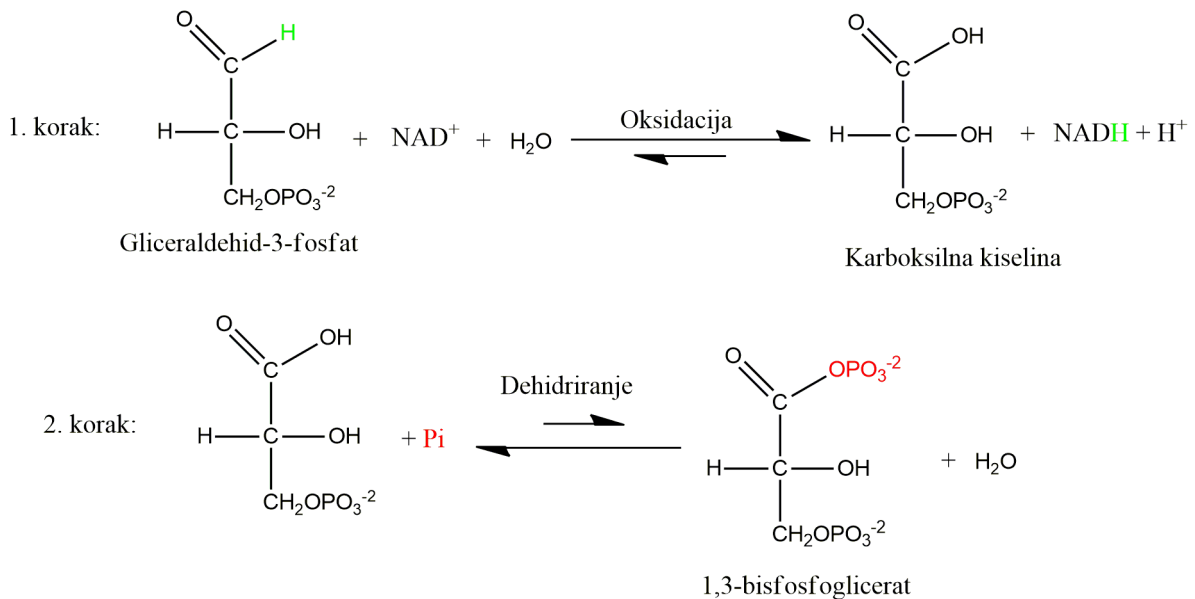


*Slika 2.2.3.3 Graf smanjenja energije aktivacije [6]*

### **2.3. Aktivno mjesto enzima i prijelazno stanje**

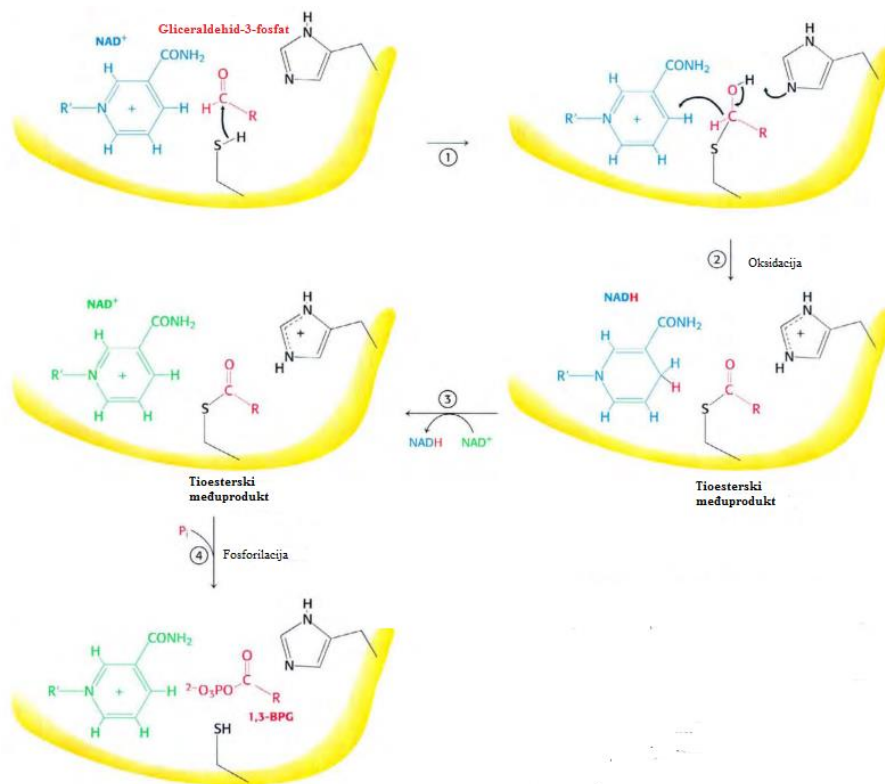
Kako bi se odredila brzina enzimske reakcije potrebno je odrediti i put po kojem je reakcija provedena. Prije nastanka produkta supstrat dolazi u prijelazno stanje. Prijelazno stanje je jako kratko i nestabilno te zato ima puno više slobodne energije nego supstrati ili produkti. Kod prijelaznog stanja dešava se cijepanje postojeće veze i formiranje nove. Razlika između energije prijelaznog stanja i energije supstrata zove se slobodna energija aktivacije i pokazuje koliko energije je potrebno uložiti da bi se prešla ta barijera za nastanak produkta te je važno napomenuti da ona uvijek ima pozitivnu vrijednost jer je energija prijelaznog stanja uvijek viša nego energija supstrata, osim u slučaju prejakog vezanja. Što je veća razlika između energije prijelaznog stanja i supstrata to je veća slobodna energija aktivacije, odnosno to će se reakcija dulje odvijati. Enzimi djeluju na slobodnu energiju aktivacije tako da ju smanjuju i time ubrzavaju prelazak supstrata u prijelazno stanje. Važno je napomenuti da se prijelazno stanje ne uzima u obzir kod računanja Gibbsove slobodne energije jer ta energija koja se uloži u nastanak prijelaznog stanja iz supstrata oslobodi se odmah nakon toga kada prijelazno stanje prelazi u produkt. Aktivno mjesto enzima je mjesto u koje supstrat ulazi i reagira s enzimom i tako se smanjuje slobodna energija aktivacije. Aktivno mjesto enzima se sastoji od aminokiselinskih ostataka koji su jedan od drugoga udaljeni te tako lakše djeluju na supstrat jer da su blizu došlo bi do steričkih smetnji i struktura bi se izokrenula te enzim ne bi mogao provoditi katalizu. Enzimi imaju jako velike molekulske mase i jako puno gradivnih jedinica odnosno aminokiselina. Te aminokiseline koje ne služe za katalizu, služe kako bi enzim poprimio pravilnu trodimenzionalnu strukturu jer je dobro poznato da enzimi djeluju na principu ključ-brava gdje bravu predstavlja enzim u koji se savršeno mora vezati supstrat kako bi se reakcija dogodila [3]. Kod modela ključ-brava može doći do problema kada se supstrat i enzim prejako povežu i tada imaju nižu slobodnu energiju nego supstrat i enzim kada su odvojeni pa će za prelazak u enzim i produkt opet biti potreba veća energija aktivacije [6]. Danas

postoji još jedan format koji opisuje vezanje enzima i supstrata, to je inducirano pristajanje, koje opisuje da kada se supstrat poveže za enzim tada se enzim izvrće i zarobljava supstrat unutar aktivnog mjesta, u izvrtnju također sudjeluju aminokiseline koje nisu u aktivnom mjestu. Aminokiseline koje nisu u aktivnom mjestu tvore i regulacijska mjesta enzima, a to su mjesta na koja se vežu inhibitori ili aktivatori i tako se regulira aktivnost enzima. U aktivnom mjestu enzima je hidrofobna okolina osim ako je u enzimsku reakciju uključena voda no to ne znači da u aktivnom mjestu nema polarnih aminokiselina. Interakcije koje se pojavljuju kod vezanja supstrata na enzim su vodikove veze, ionske veze, hidrofobne interakcije te van der Waalsove sile. Važno je za znati da se enzim nikada ne želi vezati za supstrat kovalentnom vezom jer su te veze prejake i nakon reakcije, produkt se ne bi mogao odvojiti od enzima koji je potreban u prvobitnom obliku za daljnje reakcije. Kada se enzim i supstrat povežu nastaje prijelazno stanje odnosno enzim-supstrat kompleks. Nastajanjem tog enzim-supstrat kompleksa oslobađa se slobodna energija odnosno energija vezanja. Nastajanje energije vezanja pojašnjava se smanjenjem slobodne energije aktivacije i lakšim i bržim prelaskom supstrata u produkt. Enzim-supstrat kompleks je jako nestabilan i brzo prelazi ili natrag u supstrat ili se pretvara u produkt. Uzmimo za primjer prelazak gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat. Ova reakcija se nalazi u metaboličkom putu zvanom glikoliza. Gliceraldehid-3-fosfat bez enzima reagira s vodom uz redukciju molekule  $\text{NAD}^+$  u  $\text{NADH}$  i nastaje karboksilna kiselina koja sadrži jako stabilnu karboksilnu grupu pa je u sljedećem koraku potrebno uložiti puno energije da ta karboksilna kiselina reagira se ortofosfatom i prijeđe u 1,3-bisfosfoglicerat. Reakciju možemo vidjeti na „slici 2.3.1“ .



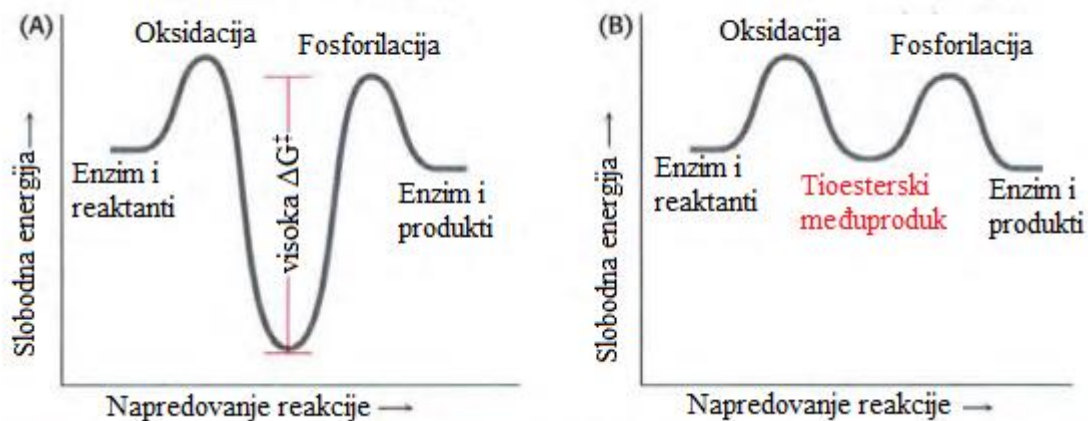
*Slika 2.3.1 Prelazak Gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat bez enzima*

Ova reakcija se u organizmu provodi uz pomoć enzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze koja stvara enzim-supstrat kompleks tako da se gliceraldehid-3-fosfat veže za tiolnu skupinu na cisteinskom aminokiselinskom ostatku i nastaje tiolni međuprodukt (prijelazno stanje) koji je znatno nestabilniji nego prethodno navedena karboksilna kiselina. Nakon nastanka tiolnog međuprodukta reakcija je ista kao i bez enzima, dakle  $\text{NAD}^+$  se reducira u  $\text{NADH}$ , a na mjestu veze sa sumporom se veže ortofosfat i nastaje 1,3-bisfosfoglicerat, a enzim je vraćen u prvobitni oblik.



*Slika 2.3.2 Prelazak Gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat s enzimom [3]*

Ovaj primjer je uzet kako bi se prikazalo da enzim stvara nestabilniji međuprodukt i tako slobodnu energiju aktivacije. Grafovi na „slici 2.3.3“ prikazuju razliku u energiji aktivacije prethodno opisane reakcije bez enzima i sa enzimom. Slobodna energija aktivacije u grafu A puno veća nego u grafu B [3].



Slika 2.3.3 Grafovi slobodne energije prelaska glicerinaldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat [3]

## 2.4. Michaelis – Mentenina jednađba

### 2.4.1. Izvod

Kinetika enzima se bavi brzinom kemijske reakcije u koju je uključen enzim. Kinetika enzima prati pravila za brzinu kemijske reakcije koja su prethodno opisana. Enzim se spaja sa supstratom i daje enzim-supstrat kompleks (prijelazno stanje) konstantom brzine  $k_1$ . Sudbina ES kompleksa može biti vraćanje natrag u slobodan enzim i nevezani supstrat uz konstantu brzine  $k_{-1}$  ili može prijeći u produkt koji se odvaja od enzima uz konstantu brzine  $k_2$ . Enzim i produkt također mogu reagirati i vratiti se natrag u ES kompleks uz konstantu brzine  $k_{-2}$ . Ovo objašnjenje potkrjepljuje „slika 2.4.1.1“.



Slika 2.4.1.1 Nastanak i sudbina ES kompleksa

Kako bi se olakšao izračun uzima se početna brzina  $V_0$ . Pri početnoj brzini gotovo da i nema produkta pa je povratna reakcija koja je opisana konstantnom brzine  $k_{-2}$  nemoguća i tada vrijedi oblik jednađbe prikazan na „slici 2.4.1.2“.



*Slika 2.4.1.2 Nastanak i sudbina ES kompleksa pri  $V_0$*

Za formulu koja povezuje brzinu enzimske reakcije s koncentracijama supstrata i enzima kreće se od formule (16) jer samo ES kompleks može preći u produkt.

$$V_0 = k_2[ES] \quad (16)$$

Izraz  $[ES]$  iz formule (16) se može razdvojiti na dva dijela:

$$[ES] = k_1[E][S] \quad (17)$$

$$[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (18)$$

Formula (17) opisuje slučaj kada se enzim-supstrat kompleks formira iz enzima i supstrata pa ovisi o koncentracijama istih, a formula (18) opisuje odvajanje enzim-supstrat kompleksa, to može biti u smjeru produkta ili u smjeru supstrata pa se uzimaju konstante brzine  $k_{-1}$  i  $k_2$  te ovisi o koncentraciji samog enzim-supstrat kompleksa. Nadalje, 1924. godine otkriveno je takozvano ustaljeno stanje, kod kojeg se koncentracije supstrata i produkta mijenjaju, a koncentracija enzim-supstrat kompleksa je jednaka i tako se formule (17) i (18) mogu spojiti i preurediti na sljedeći način koji prikazuju formule (19) i (20).

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (19)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (20)$$

Izraz na desnoj strani jednakosti u formuli (20) zovemo Michaelisova konstanta  $K_M$ .

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (21)$$

Izraz  $K_M$  se uvrštava u formulu (20):

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_M \quad (22)$$

Formulom (22) se vidi da Michaelisova konstanta ovisi o koncentracijama enzima, supstrata i enzim-supstrat kompleksa. Ukupna koncentracija enzima se označava s  $[E]_T$  i predstavlja sav slobodan enzim ( $[E]$ ) i enzim-supstrat kompleks ( $[ES]$ ), dok s druge strane, pod pretpostavkom da je u većini slučajeva puno veća koncentracija supstrata od enzima, ona je jednaka ukupnoj koncentraciji ES kompleksa jer je većina aktivnih mjesta tada popunjeno.

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (23)$$

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (24)$$

Dobiven izraz za  $[E]$ , uvrštava se u formulu (22) i rješava da se dobije  $[ES]$ .

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{K_M} \quad (25)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T[S] - [ES][S]}{K_M} \quad (26)$$

$$[ES]K_M + [ES][S] = [E]_T[S] \quad (27)$$

$$[ES](K_M + [S]) = [E]_T[S] \quad (28)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (29)$$

U prvom koraku se iz (25) u (26) množi izraz u zagradi s  $[S]$ , nakon toga se iz (26) u (27) množi cijela jednačica s  $K_M$  i prebacuje se izraz koji sadrži  $[ES]$  s desne strane na lijevu. Nakon toga se iz (27) u (26) izlučuje  $[ES]$  i na kraju se sve dijeli s izrazom u zagradi koji je nastao izlučivanjem  $[ES]$ , dobivena je formula (29). Dobivena formula za  $[ES]$  u ustaljenom stanju može se uvrstiti u formulu (16).

$$V_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (30)$$

Najveća brzina postiže se kada su svi enzimi popunjeni supstratom pa se može reći da je tada ukupna koncentracija enzima jednaka koncentraciji enzim-supstrat kompleksa.

$$V_{\max} = k_2[E]_T \quad (31)$$

Kada se formula (31) uvrsti u (30) dobiva se:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad (32)$$

Formula (32) zove se Michaelis-Mentenina jednačba. Michaelisova konstanta ima veliko značenje za razumijevanje kinetike enzima. Tako  $K_M$  označava koncentraciju supstrata ( $K_M = [S]$ ) kada je brzina reakcije točno pola od maksimalne brzine te je točno pola prisutnih enzima popunjeno supstratom, ovo prikazuje formula (34).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} \quad (33)$$

$$V_0 = \frac{V_{max}}{2} \quad (34)$$

U primjeni kada je  $K_M$  niži, maksimalna brzina enzimske reakcije će biti niža i tako će biti potrebno kraće vrijeme i manje supstrata da se dostigne maksimalna brzina reakcije, dok će u slučaju visoke vrijednosti biti potrebno dulje vrijeme i više supstrata da se dostigne maksimalna brzina reakcije i tako bi supstrat mogao ostajati dulje u organizmu te ako bi bio toksičan bi mogao imati loš utjecaj na zdravlje. Ako se pretpostavi da je u početku reakcije puno manja koncentracija supstrata od vrijednosti  $K_M$ , tada je  $[S] + K_M$  približno jednako  $K_M$  i tada Michaelis-Mentenina jednačba izgleda ovako:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M} \quad (35)$$

Ako se podesi tako da nazivnik  $K_M$  bude ispod  $V_{max}$  dobije se slična formula kao ona za kemijsku reakciju prvog reda, kada je koncentracija supstrata jako mala graf linearno raste i brzina enzimske reakcije ovisi o koncentraciji supstrata. S druge strane kada je puno veća koncentracija supstrata od vrijednosti  $K_M$  tada se može pretpostaviti da je  $[S] + K_M$  približno jednako  $[S]$  te tada jednačba izgleda ovako:

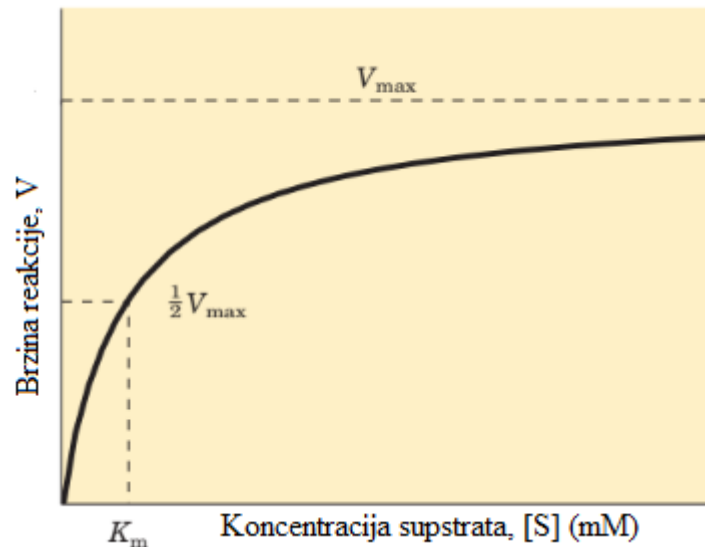
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S]} \quad (36)$$

$$V_0 = V_{max} \quad (37)$$

Ovime se pokazuje da kada je u reakciji jako puno supstrata, sva aktivna mjesta enzima su popunjena i postignuta je maksimalna brzina enzimske katalize te je to reakcija nultog reda. „slika 2.4.1.3“ prikazuje dijagram koji opisuje maksimalnu brzinu i Michaelisovu konstantu i na njemu



se može vidjeti da je vrijednost  $K_M$  pola od maksimalne brzine i da graf nikad ne dodiruje liniju maksimalne brzine već joj se asimptomatski približava [3].



*Slika 2.4.1.3 Graf brzine enzimske reakcije u ovisnosti o koncentraciji supstrata [S] [1]*

## 2.4.2. Značenje Michaelisove konstante ( $K_M$ )

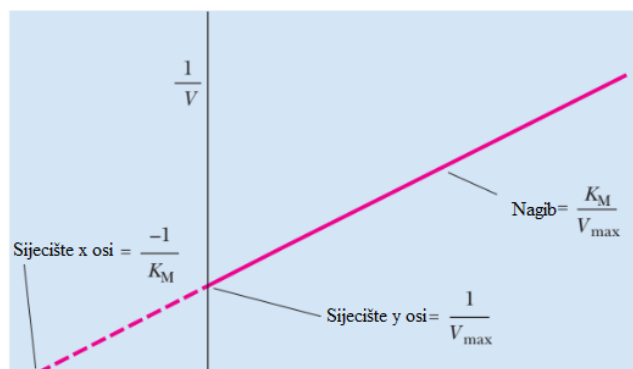
Izračunavanje  $K_M$  se provodi tako da se hiperbola pretvara u pravac. To se tako da se uzima recipročna vrijednost Michaelis-Mentenine jednadžbe i dalje se uređuje da bi se dobila jednadžba pravca.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{v_{max} \times [S]} \quad (38)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max} \times [S]} + \frac{[S]}{v_{max} \times [S]} \quad (39)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (40)$$

Sada je jednadžba u obliku  $y = ax + b$ , odnosno  $\frac{1}{v_0}$  je y os odnosno ordinata,  $\frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]}$  je ax i određuje nagib pravca, a  $\frac{1}{v_{max}}$  je b te određuje točku u kojoj pravac siječe ordinatu. Ovaj pravac se nalazi na „slici 2.4.2.1“ i zove se Lineweaver-Burkov dijagram [6].



Slika 2.4.2.1 Lineweaver-Burkov dijagram za kinetiku enzima [6]

U prethodnom poglavlju je spomenuto jedno značenje vrijednosti  $K_M$ , a to je koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije točno pola od maksimalne te je tada točno pola enzima zasićeno supstratom. Drugo značenje  $K_M$  vrijednosti proizlazi iz ustaljenog stanja kada se koncentracija ES kompleksa ne mijenja, a mijenjaju se koncentracije supstrata i produkta pa tako i slobodnih enzima. U tom stanju kada je  $k_{-1}$  pun veći od  $k_2$ , može se reći da je izraz iz jednadžbe pri ustaljenom stanju za  $K_M$  oblikovan na sljedeći način:

$$k_{-1} + k_2 \approx k_{-1} \quad (41)$$

Pa je tada:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (42)$$

Na taj način  $K_M$  opisuje ravnotežu disocijacije ES kompleksa.

$$k_{-1}[ES] = k_1[E][S] \quad (43)$$

Okretanjem izraza (43) dobiva se:

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_M \quad (44)$$

Formulom (44) dobije se drugo značenje vrijednosti  $K_M$ , a to je da ako je  $K_M$  visok tada su vrijednosti  $[E]$ ,  $[S]$  i  $k_{-1}$  visoke, to znači da se enzim i supstrat slabije vežu i imaju slabiji afinitet jedan za drugo, a ako je vrijednost  $K_M$  niska tada su vrijednosti  $[ES]$  i  $k_1$  visoke i znači da enzim ima veliki afinitet za supstrat i da će se dobro vezati. Utvrđeno je da  $K_M$  opisuje čvrstoću ES kompleksa [3].  $K_M$  također ovisi o koncentraciji prisutnog supstrata, ako je vrlo malo prisutnog supstrata ta vrijednost će biti niska, a ako je koncentracija supstrata visoka taj broj će biti visok [1].

### 2.4.3. Okretni broj ( $k_{cat}$ )

Kako bi se odredio okretni broj potrebno je ponovo krenuti od brzine enzimske reakcije. Ovoga puta kreće se od formule za brzinu nastanka produkta koja glasi:

$$V_0 = k_2[ES] \quad (45)$$

Pretpostavka je da su svi enzimi popunjeni supstratom i tada se dobiva maksimalna brzina enzimske reakcije, a za  $[ES]$  se može reći da je jednak  $[E]_T$  pa je zapravo formula (45):

$$V_{max} = k_2[E]_T \quad (46)$$

Vrijednost za najveću brzinu enzimske reakcije također opisuje najveći broj molekula supstrata koji se pretvaraju u produkt u jedinici vremena. Okretanje jednadžbe (46) dobiva se:

$$k_2 = \frac{V_{max}}{[E]_T} \quad (47)$$

Dobivena konstanta  $k_2$  također se naziva i okretni broj i označava se kao  $k_{cat}$  [3]. Treba uzeti u obzir kada se enzimska reakcija odvija u više koraka, odnosno kada se dodaje još jedan korak za odvajanje produkta od enzima što ograničava brzinu reakcije, tada je taj  $k_{cat}$  sinonim za posljednju konstantu u reakciji [1]. Taj broj označava koju količinu supstrata, koju enzim može prevesti u produkt u jedinici vremena (npr. sekundi). Kako bi se dobio podatak koliko vremena je potrebno da se jedna molekula supstrata prevede u produkt, potrebno je samo uzeti recipročnu vrijednost dobivene  $k_{cat}$ . Primjer za veliku vrijednost  $k_{cat}$  je ugljična anhidraza koja prevodi ugljikov dioksid u hidrogenkarbonat koji je topljiv u krvnoj plazmi i pomoću nje se prenosi do pluća i tako se izbacuje iz organizma. Visoki okretni broj kod ugljične anhidraze vrlo je važan jer, u većini stanica našeg tijela nastaje  $CO_2$  kojeg je potrebno što prije izbaciti iz organizma, a visok okretni broj omogućava to izbacivanje. S druge strane tu je RNA polimeraza koja ima jako niski okretni broj što je bitno jer ona mora biti jako precizna kod čitanja koda s DNA i još k tome nema sposobnost ispravljanja pogrešaka, a pogreške mogu biti kobne po ljudsko zdravlje [3].

### 2.4.4. Efikasnost enzima ( $k_{cat}/K_M$ )

Omjer okretnog broja i Michaelisove konstante koristan je za izračunavanje efikasnosti enzima. Formula za brzinu enzimske reakcije u početku kada je koncentracija supstrata jako niska, u koju je uključen  $k_{cat}$  je:

$$V_0 = k_{cat}[ES] \quad (48)$$

Jedna od formula za  $K_M$  iz prethodnih poglavlja je:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (49)$$

Okretanjem te formule za  $[ES]$  dobije se:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (50)$$

Formula (50) uvrštava se u (48):

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E]_T [S] \quad (51)$$

$[E]$  je prešao u  $[E]_T$ , to je zato što je u početku reakcije koncentracija supstrata jako niska i tada su enzimi u većini slučajeva slobodni pa se može reći da je ukupna koncentracija enzima jednaka koncentraciji slobodnih enzima. Jednadžba (51) je jednadžba drugog reda i kod nje brzina ovisi o omjeru  $\frac{k_{cat}}{K_M}$ , koncentraciji enzima i koncentraciji supstrata. Omjer  $\frac{k_{cat}}{K_M}$  predstavlja konstantu brzine u ovoj jednadžbi i zapravo je mjera efikasnosti enzima. Kada je  $K_M$  visok brzina će biti niska jer je afinitet enzima za supstrat niski, a ako je  $k_{cat}$  visok tada je brzina velika. Za definiranje gornje granice ovog omjera počinje se od uvrštavanja  $K_M$  u omjer:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} \quad k_{cat} = \left( \frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}} \right) k_1 \quad (52)$$

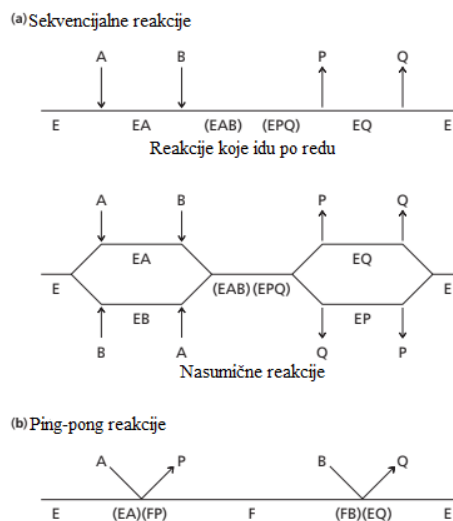
Jednadžbom (52) se zaključuje da je izraz u zagradi manji od jedan jer je nazivnik uvijek veći od brojnika osim kada je  $k_{-1}$  jednak nuli tada je izraz u zagradi 1 odnosno pomnoženo s  $k_1$  ta vrijednost koju ima  $k_1$  i ona određuje kako će se brzo reakcija desiti. Dakle najveća moguća efikasnost enzima se dešava kada se  $k_{-1}$  približava nuli što je logično jer tada nema disocijacije ES kompleksa na enzim i supstrat. Ovo se također može pokazati jednadžbom (53) .

$$\lim_{k_{-1} \rightarrow 0} \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right) = k_1 \quad (53)$$

## 2.5. Višesupstratne reakcije

U radu je do sada bila riječ o kinetici enzimskih reakcija koje imaju samo jedan supstrat i njega pretvaraju u jedan produkt, ali osim toga postoje reakcije koje sadrže dva ili više supstrata koji se vežu u aktivno mjesto enzima i tako se provodi kataliza. Enzimi za ove reakcije su specifični i imaju svoje  $K_M$  vrijednosti koje im pomažu pri „odabiru“ supstrata. Više supstratne reakcije se

dijele na sekvencijske i ping-pong reakcije. Sekvencijske reakcije se također dijele na one reakcije koje idu po redu i na nasumične reakcije. Kod reakcija koje idu po redu važan je redoslijed vezanja supstrata u enzim. Za primjer je enzim koji prevodi piruvat u laktat nakon glikolize u nedostatku kisika, a enzim se zove laktat dehidrogenaza. Supstrati laktat dehidrogenaze su NADH i piruvat. Važno je da se prvo u aktivno mjesto laktat dehidrogenaze veže NADH, a zatim piruvat, također je važno kada da se nakon reakcije produkti laktat i  $\text{NAD}^+$  odvajaju s aktivnog mjesta tim redoslijedom u protivnom do reakcije neće doći. Kod nasumičnih reakcija nije bitan redoslijed vezanja supstrata u aktivno mjesto, da se reakcija dogodi dovoljno je samo da se oba supstrata vežu u aktivno mjesto. Primjer je heksokinaza, enzim koji provodi prvu reakciju u glikolizi i pomoću nje glukoza se zarobljava u stanici i dobiva veću energiju koja se kasnije koristi za dobivanje ATPa. Heksokinaza provodi prijenos fosfatne skupine ATPa na glukozu, dakle supstrati su glukoza i ATP i oni se vežu u heksokinazu nebitno kojim redoslijedom samo je važno da se oba supstrata povežu kako bi se prijenos fosfatne skupine mogao desiti. Ping-pong reakcije su reakcije kod koji se prvo jedan supstrat veže na enzim, može se reći da on ostavlja neku skupinu (npr. fosfatnu) u aktivnom mjestu i disocira u drugom obliku, a enzim je izmijenjen. Nakon toga na enzim se veže drugi supstrat koji se zatim fosforilira tim fosfatom i iz reakcije izlazi nepromijenjen enzim i još jedan produkt. Shemu ovih reakcija pokazuje „slika 2.5.1“ [7].



*Slika 2.5.1 Primjer višesupstratnih reakcija [7]*

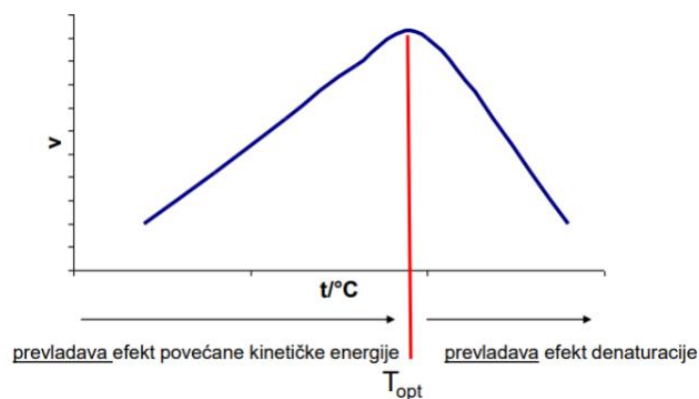
## 2.6. Utjecaj različitih faktora na brzinu enzimske reakcije

### 2.6.1. pH

Kao što je već prije spomenuto svi enzimi su proteini koji se sastoje od 20 esencijalnih aminokiselina. Među tim aminokiselinama su i ionizirajuće aminokiseline poput arginina, asparaginske kiseline, cisteina, glutaminske kiseline, histidina, lizina i tirozina. pH vrijednost uvelike utječe na aktivnost enzima jer pri određenim pH vrijednostima se određene aminokiseline protoniraju i tako se mijenja struktura samog enzima. Te aminokiseline mogu biti u aktivnom mjestu, na bočnim dijelovima „džepa“ ili na nekim udaljenim mjestima koja također imaju utjecaj na brzinu reakcije te utječe na prostetske skupine enzima. Optimalna pH vrijednost je ona vrijednost pri kojoj je su aminokiseline u enzimu u točno onakvom obliku koji je najbolji za vezanje supstrata. Ako smanjimo ili povećamo pH na iznimno visoke ili niske vrijednosti enzimi će denaturirati, odnosno narušit će im se sekundarna i tercijarna struktura. Primjer neka bude neki enzim koji u svom aktivnom mjestu ima npr. lizin i histidin. Histidinova pKa vrijednost je 6, a lizinova 10.9. Pri tim vrijednostima aminokiseline disociraju, odnosno otpuštaju proton i dobivaju naboj. Za enzimsku katalizu enzim mora imati točno određenu konformaciju određene aminokiseline u aktivnom mjestu. U ovom slučaju lizin mora biti deprotoniran, a histidin mora biti protoniran. Kako bi se dobio najveći broj enzima koji su u pravilnoj konformaciji pH se mora podesiti na aritmetičku sredinu obiju pKa vrijednosti. Tako su, pri pH od 8.45, svi enzimi u pravilnoj konformaciji i najveća je njihova iskoristivost [8].

## 2.6.2. Temperatura

Poznato je da se povećanjem temperature povećava i brzina gibanja čestica. Ako čestica ima više kinetičke energije, nastaje više brzih sudara s ostalim česticama i tako nastaje više produkta. To pravilo vrijedi i za enzime. Povećanjem temperature dolazi do bržeg sudaranja supstrata s enzimom i dodatno se ubrzava reakcija do određene temperature. Optimalna temperatura je temperatura pri kojoj se enzim počinje denaturirati, razara se sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura proteina i tada enzim više nema mogućnost katalize. Do točke optimalne temperature prevladava efekt povećanja kinetičke energije, a nakon toga počinje prevladavati efekt denaturacije enzima, ovu činjenicu dobro opisuje „**slika 2.6.2.1**“ [9].



*Slika 2.6.2.1 Graf ovisnosti aktivnosti enzima o temperaturi [9]*

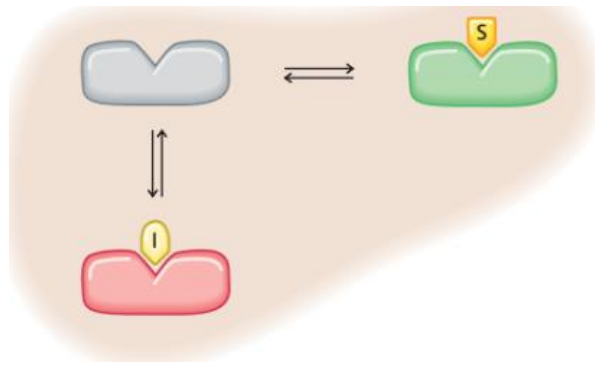
### 2.6.3. Inhibicija enzima

Inhibitori su molekule kojima je cilj usporiti ili čak i zaustaviti enzimsku reakciju. Inhibitori su bitni u ljudskom organizmu kako bi se neke nepotrebne reakcije zaustavile ili usporile i oni se koriste kao lijekovi. Jedan primjer takvog lijeka je aspirin koji djeluje na prostaglandin H<sub>2</sub> sintazu, ona iz arahidonske kiseline stvara prostaglandin H<sub>2</sub> i tako dolazi do bolova u mišićima tijekom velikih napora, odnosno upale mišića, a aspirin dovodi do stanične signalizacije koja signalizira vezanje inhibitora na enzim što sprečava bolove odnosno sintezu prostaglandina H<sub>2</sub>. Inhibicije dijele na ireverzibilne i reverzibilne. Kod ireverzibilnih inhibicija, inhibitor se veže u aktivno mjesto enzima kovalentnom vezom koja je jaka i tada inhibitor ne može disocirati s enzima i tako ga trajno inhibira, te interakcije mogu biti i jake ionske interakcije. Reverzibilne inhibicije su one kod kojih dolazi do privremenog vezanja inhibitora u aktivno mjesto ili na neko drugo alosteričko mjesto, dakle enzim se privremeno inhibira. Tipovi reverzibilne inhibicije su kompetitivna, akompetitivna, nekompetitivna, parcijalno kompetitivna i parcijalno nekompetitivna te mješovita [3].

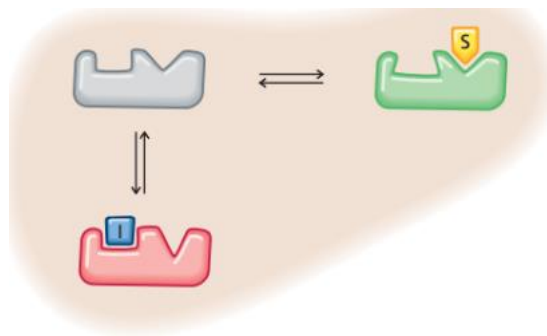
### 2.6.4. Kompetitivna inhibicija

Kompetitivna inhibicija enzima je kada se inhibitor natječe sa supstratom za aktivno mjesto, dakle struktura takvog inhibitora je jako slična strukturi supstrata. Kada se inhibitor jednom veže za aktivno mjesto, tada se supstrat ne može vezati tako dugo dok taj inhibitor ne disocira s enzima. Kako svaki enzim ima afinitet za vezanje supstrata, tako svaki enzim ima i afinitet za vezanje inhibitora koji se označava s  $K_i$  vrijednošću [9]. Ova inhibicija se može nadvladati tako da se poveća koncentracija supstrata u „otopini“. Kako je potrebno više supstrata da se dođe do polovice maksimalne brzine enzimске reakcije, tako se povećava i  $K_M$  vrijednost, što potvrđuje tezu da se kod ove inhibicije prividno smanjuje afinitet za supstrat, a prividno znači da iako se afinitet za supstrat smanjuje taj afinitet ostaje isti na enzimima koji nisu inhibirani. U Michaelis- Menteninoj jednadžbi, kod ove inhibicije treba  $K_M$  pomnožiti s omjerom koncentracije inhibitora i njegovom  $K_i$  vrijednošću. Govoreći o efikasnosti inhibitora treba uzeti u obzir obje varijable. Postoji još jedan tip ove inhibicije, to je neklasična kompetitivna inhibicija gdje se inhibitor veže na neko alosteričko mjesto na enzimu i mijenja oblik aktivnog mjesta tako da se sprečava ulazak supstrata u njega. „slika 2.6.4.1“ prikazuje klasičnu kompetitivnu inhibiciju, a „slika 2.6.4.2“ prikazuje neklasičnu kompetitivnu inhibiciju [7].





*Slika 2.6.4.1 Klasična kompetitivna inhibicija [7]*

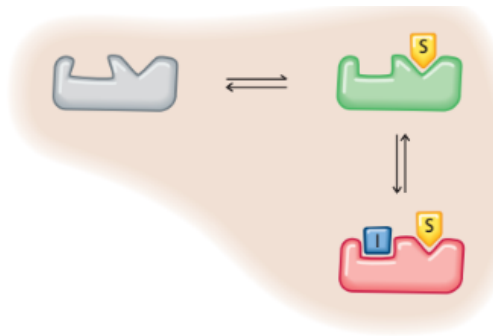


*Slika 2.6.4.2 Neklasična kompetitivna inhibicija [7]*

### 2.6.5. Akompetitivna inhibicija

Kod akompetitivne inhibicije prvo dolazi do spajanja supstrata u aktivno mjesto i nakon toga se formira alosteričko mjesto gdje se može vezati inhibitor. Taj inhibitor kada se veže za enzim on blokira otpuštanje supstrata iz aktivnog mjesta i samim time povećava afinitet tog enzima za supstrat, a  $K_M$  se smanjuje. Kako se supstrat ne može odvojiti od enzima tako je prisutno manje funkcionalnih enzima, odnosno smanjila se vrijednost  $[E_T]$  pa se tako i smanjuje  $V_{max}$  jer formula glasi:

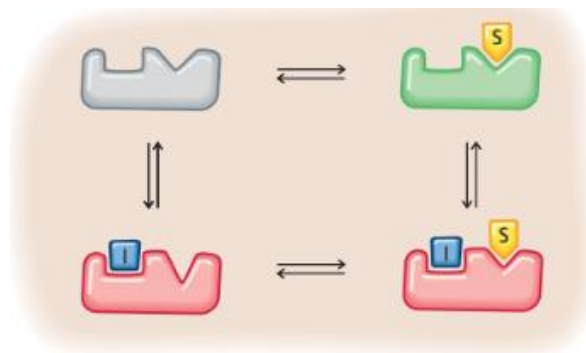
$$V_{max} = [E_T] \times k_{cat} \quad (54)$$



*Slika 2.6.5.1 Akompetitivna inhibicija [7]*

## 2.6.6. Nekompetitivna inhibicija

Nekompetitivna inhibicija je karakteristična za alosteričke enzime. Oni imaju, na udaljenom mjestu od aktivnog mjesta, alosteričko mjesto na koje se veže inhibitor. Ova inhibicija nije kompetitivna jer se inhibitor ne natječe sa supstratom za aktivno mjesto, već kada se on poveže na alosteričko mjesto, tada se mijenja oblik aktivnog mjesta. Inhibitor se može vezati za enzim bez obzira je li supstrat već vezan ili nije. Inhibitor uzrokuje izvrtnanje aminokiselina u aktivnom mjestu koje su potrebne za prevođenje supstrata u produkt i tada do reakcije ne može doći. Inhibitor tako svojim djelovanjem smanjuje maksimalnu brzinu enzimske reakcije te okretni broj ( $k_{cat}$ ), ali ne utječe na vrijednost  $K_M$ , koja opisuje afinitet vezanja supstrata za enzim jer će se kod ove inhibicije u svakom slučaju supstrat povezati za enzim no neće se prevesti u supstrat. U Michaelis-Menteninoj jednadžbi potrebno je u nazivniku i  $K_M$  i  $[S]$  pomnožiti s  $1 + [I]/K_i$  jer je se mora uzeti u obzir afinitet vezanja inhibitora. „slika 2.6.6.1“ prikazuje nekompetitivnu inhibiciju [3].



*Slika 2.6.6.1 Nekompetitivna inhibicija [7]*

### **2.6.7. Parcijalno kompetitivna inhibicija**

Kod ove kompeticije se inhibitor veže za regulatorno mjesto na enzimu i time se mijenja konformacija veznog dijela aktivnog mjesta i tako se supstrat otežano veže za enzim. Kako se kod kompetitivne inhibicije prividno smanjuje afinitet enzima za supstrat, kod ove inhibicije se stvarno smanjuje afinitet. Smanjenje afiniteta rezultira povećanjem  $K_M$  vrijednosti. Maksimalna brzina se ne mijenja jer nema promjene konformacije na katalitičkom dijelu aktivnog mjesta. Maksimalna brzina se može postići tako da se doda velika koncentracija supstrata bez obzira na inhibitor [9].

### **2.6.8. Parcijalno nekompetitivna inhibicija**

Parcijalno nekompetitivna inhibicija specifična je po tome što se na regulatorno mjesto veže inhibitor i to potiče promjenu konformacije katalitičkog dijela aktivnog mjesta. Time  $K_M$  ostaje isti jer se afinitet enzima za vezanje supstrata ne mijenja. Maksimalna brzina u ovom se slučaju smanjuje pa se reakcija odvija sporije. Razlika ove i nekompetitivne inhibicije je to što enzim na koji je vezan inhibitor može provoditi reakciju ali se to dešava sporije [9].

### **2.6.9. Inhibicija supstratom**

Do inhibicije supstratom dolazi kada su jako visoke koncentracije supstrata i tada se u aktivno mjesto nastoje povezati dva supstrata i tako se enzim inhibira.

### **2.6.10. Miješana inhibicija**

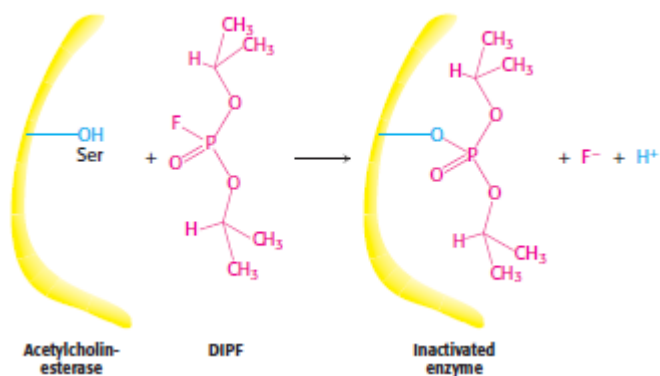
Miješana inhibicija je spoj parcijalno kompetitivne i nekompetitivne inhibicije. Inhibitor se veže na regulatorno mjesto i time mijenja konformaciju i veznog i katalitičkog dijela aktivnog mjesta enzima što znači da je  $K_M$  veći, a  $V_{max}$  manji u odnosu na neinhibiranu reakciju [9].

## 2.6.11. Alosterički enzimi

Alosterički enzimi rade po zasebnoj kinetici, a ne po Michaelis-Menteninoj kinetici. Imaju kvarternu strukturu, dakle sastoje se od dvije ili više podjedinica. Kada se neka molekula (ligand) poveže na podjedinicu, mijenja se konformacija ostalih podjedinica i to se zove efekt kooperativnosti. Kooperativnost može biti pozitivna i negativna. Kod pozitivne kooperativnosti, vezanjem liganda, konformacija ostalih podjedinica se mijenja tako da one lakše vežu supstrat, odnosno prelaze u R stanje. Negativna kooperativnost je suprotna, dakle vezanjem liganda, konformacija ostalih podjedinica prelazi u T stanje i one teže vežu supstrat u aktivno mjesto. Postoje heterotropna i homotropna alosterija. Kod homotropne alosterije je supstrat taj koji uzrokuje promjenu konformacije podjedinica, može biti pozitivna kooperativnost gdje supstrat potiče promjenu konformacije podjedinica koja rezultira povećanjem afiniteta za vezanje supstrata i može biti negativna koja je suprotna od pozitivne. Heterotropna alosterija je regulacija pomoću neke efektorne molekule koja smanjuje ili povećava afinitet enzima za supstrat ovisno je li aktivator ili inhibitor. Postoje dva modela koja objašnjavaju homotropnu alosteriju, a to su sekvencijski model i usklađeni model. Kod sekvencijskog modela supstrat se veže za enzim i to uzrokuje prelazak susjednih podjedinica iz T stanja u R i time povećava drugim podjedinicama afinitet za supstrat, kod negativne kooperativnost događa se suprotno. Kod sekvencijskog modela može u enzimu biti hibridnih podjedinica. Usklađeni model govori da sve podjedinice mogu biti samo u R ili samo u T obliku, ne mogu biti hibridne, vezanjem supstrata na jednu podjedinicu mijenja se oblik iz T u R ili obrnuto na svim podjedinicama. Kako alosterički aktivatori povećavaju afinitet enzima za vezanje supstrata i samim time utječu na  $K_M$  vrijednost.  $K_M$  vrijednost kod T stanja je veća od  $K_M$  vrijednosti u R stanju. Krivulja ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata kod alosteričkih enzima ima sigmoidalan oblik, kod niskih koncentracija supstrata brzina ima slabi prirast do određene točke kada se brzina naglo povećava, a kada su sve podjedinice u R obliku tada prirast brzine opet opada i krivulja se asimptotski približava  $V_{max}$ . To je vrlo važno kod enzima koji sudjeluju u metabolizmu jer moraju reagirati na vrlo male promjene koncentracije. Tip alosteričke kinetike može se prepoznati matematički tako da se u omjer stavi koncentracija supstrata pri 10% aktivnosti enzima i koncentracija supstrata pri 90% aktivnosti enzima. Ako je dobivena vrijednost puno veća od 81 tada se radi o negativnoj kooperativnosti, ako je puno manja od 81 o pozitivnoj kooperativnosti te ako je jednaka 81, enzim slijedi Michaelis-Menteninu kinetiku [9].

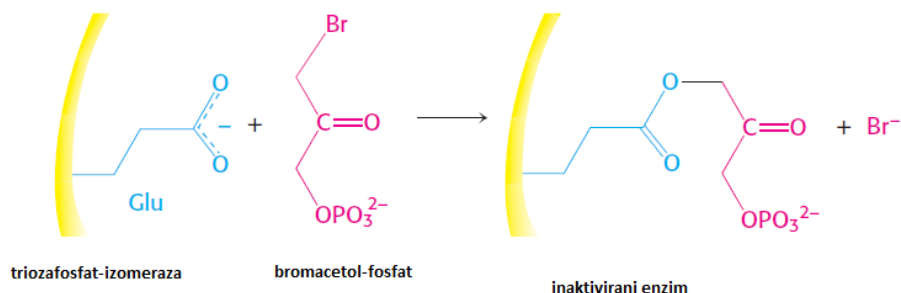
## 2.6.12. Ireverzibilna inhibicija

Ireverzibilna inhibicija se temelji na kovalentnom vezanju inhibitora za enzim i samim time ga nepovratno inhibira. Postoje 3 vrste ireverzibilnih inhibitora, a to su grupno specifični reagensi, reaktivni analozi supstrata i suicidalni inhibitori. Grupno specifični inhibitori su inhibitori koji se vežu točno za određene skupine na enzimu. Primjer je serinska proteaza koja u aktivnom mjestu sadrži reaktivan serin koji provodi katalizu. Inhibitor takve proteaze je diizopropilfosfofluoridat (DIPF) koji se veže, umjesto supstrata, za serin i tako inaktivira tu proteazu, a primjer ove reakcije je na „slici 2.6.7.1“ [3].

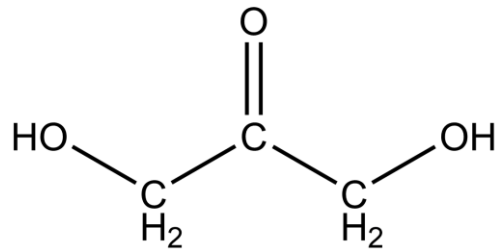


Slika 2.6.7.1 Primjer grupno specifične inhibicije [3]

Reaktivni analozi supstrata su molekule koje su jako slične supstratu i imaju veći afinitet za vezanje u aktivno mjesto enzima od supstrata. Jedan ovakav primjer je enzim triozafosfat-izomeraza, čiji supstrat je dihidroksiaceton fosfat (DHAP) te ga u glikolizi pretvara u gliceraldehid-3-fosfat koji dalje odlazi do piruvata, a inhibitor je bromacetol-fosfat koji jako nalikuje na DHAP. Primjer ove inhibicije vidimo na „slici 2.6.7.2“, a kako bi se vidjela sličnost između bromacetol-fosfata i dihidroksiaceton fosfata, na „slici 2.6.7.3“ je prikazan dihidroksiaceton fosfat. [3].



Slika 2.6.7.2 Primjer inhibicije reaktivnim analogom supstrata [3]

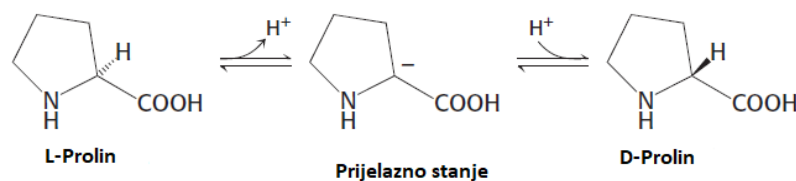


*Slika 2.6.7.3 Struktura dihidroksiaceton fosfata*

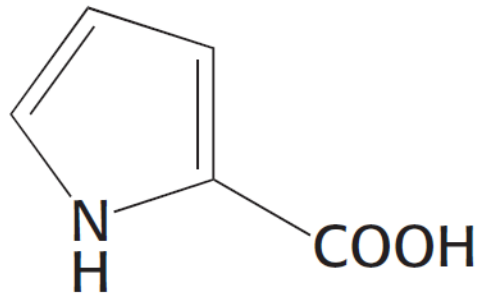
Suicidalni inhibitori su molekule koje se vežu za aktivno mjesto te reakcija se normalno provodi kao da se u aktivno mjesto povezao supstrat. Nakon nekog vremena se proizvede međuprodukt koji kovalentno inhibira taj isti enzim. Tako enzim, uz pomoć ove vrste inhibitora, sam se sebe inaktivira [3].

### 2.6.13. Analози prijelaznog stanja

Analози prijelaznog stanja su molekule koje su sličnije prijelaznom stanju nego supstratu. 1948. godine Linus Pauling je dokazao da su takvi spojevi vrlo jaki inhibitori. Primjer je enzim prolin-racemaza koja pretvara C $\alpha$  atom prolina iz tetraedarskog u trigonalni oblik s negativnim nabojem i to je prijelazno stanje između D i L izomera prolina te je ono planarno, a vodik tada može doći s jedne ili druge strane ravnine. Analog ovog prijelaznog stanja je pirol-2-karboksilat koji ima vrlo sličnu strukturu prijelaznom stanju i puno jače se veže za prolin-racemazu nego sam prolin pa je tako on inhibitor. „slika 2.6.8.1“ prikazuje reakciju koju provodi prolin-racemaza, a „slika 2.6.8.2“ analog prijelaznog stanja.



*Slika 2.6.8.1 Reakcija izomeracije prolina [3]*



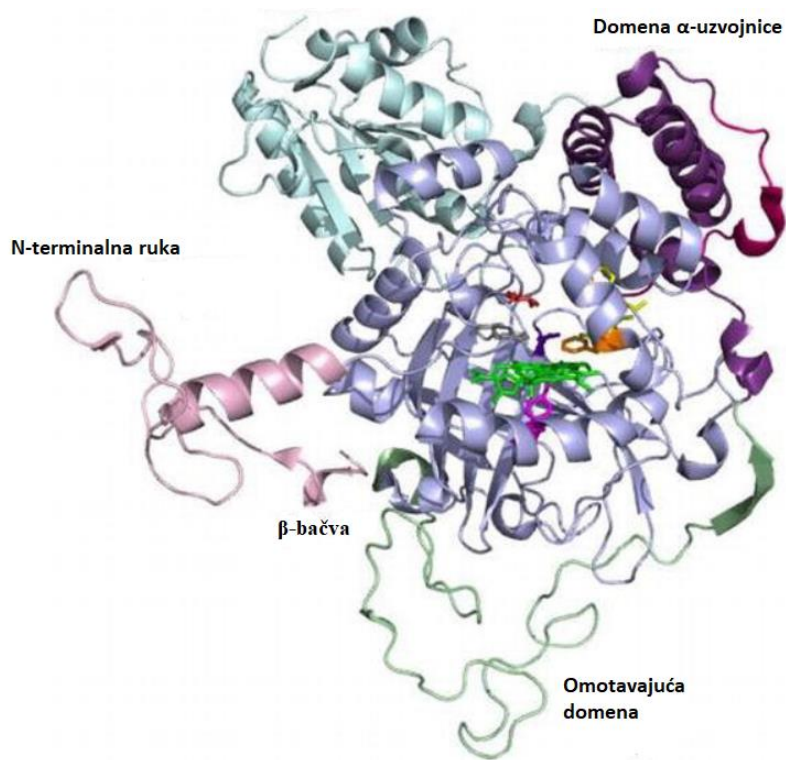
**Pirol-2-karboksilna kiselina**

*Slika 2.6.8.2 Analog prijelaznog stanja prolin-racemaze [3]*

## 2.7. Katalaza

### 2.7.1. Struktura

Katalaza je enzim koji prevodi vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) u vodu i kisik uz pomoć redoks reakcija koje provodi prostetska skupina hema, koja sadrži željezo ili neki drugi metalni ion, ovisno o vrsti katalaze. To je bitno npr. kod razgradnje masnih kiselina duljih od 18 C atoma koja se odvija u peroksisomima, a oni nemaju enzime respiracijskog lanca pa se  $FADH_2$ , nastao u prvoj reakciji razgradnje oksidira s kisikom i nastaje toksičan vodikov peroksid, tu u priču ulazi katalaza koja ga brzo razgrađuje na kisik i vodu. Katalaza se sastoji od 4 podjedinice, amino terminalna ruka, antiparalelna uzvojnica s osam lanaca zvana  $\beta$ -bačva, domena za omotavanje i domena s  $\alpha$ -uzvojnicom. Amino terminalna ruka stvara interakcije između podjedinica, a aminokiselinski ostaci ove domene nam pomažu u opisivanju hem džepa. Što je ova domena duža to je katalaza stabilnija. Druga domena je  $\beta$ -bačva koja je tu kako bi se formirala šupljina do hem džepa te sadrži jednu malu podjedinicu na koju se može vezati NADP(H). Domena za omotavanje služi kako bi povezala domenu  $\beta$ -bačve i domenu  $\alpha$ -uzvojnice. Ova domena se sastoji samo od  $\alpha$ -uzvojnica. Posljednja je domena  $\alpha$ -uzvojnice koja je antiparalelna. Struktura katalaze nalazi se na „slici 2.7.1.1“ [10].



*Slika 2.7.1.1 Struktura katalaze [10]*

### 2.7.2. Hem džep

Hem džep se sastoji od željeza koje se nalazi u sredini, na željezo su s proksimalne strane povezana tri tirozinska aminokiselinska ostatka, a s distalne strane asparagin i histidin. Znamo da se tirozin sastoji od hidroksilne skupine koja je u hemu deprotonirana i ima negativan naboj što stabilizira željezo. S druge strane imidazolni prsten histidina je okrenut tako da se nalazi paralelno od hema te on i asparagin čine okolinu jako hidrofobnom i nepolarnom. Za mehanizam katalaze također je bitan i serinski aminokiselinski ostatak [10].

### 2.7.3. Kinetika katalaze

Katalaza je enzim koji ima jako visok okretni broj, dakle potrebne su jako velike koncentracije supstrata da bi se dosegla maksimalna brzina katalaze. Taj okretni broj varira od 54 000 do 833 000 po sekundi. U slučajevima, relativno visoke koncentracije supstrata, katalaza ne prati Michaelis-Mentenin princip kinetike enzima te se pomoću jednadžbe ne mogu dobiti parametri



maksimalne brzine, okretnog broja i Michaelisove konstante. Ipak pri manjim koncentracijama ona slijedi Michaelis-Menteninu kinetiku, dovoljne su koncentracije manje od 200mM za ovu vrstu kinetike. Aktivnost katalaze pri određenim uvjetima bit će opisana u sljedećim poglavljima koja se temelje na eksperimentalnom djelu [10].

## 3. PRAKTIČNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Za testiranje korišten je enzim katalaza (iz mikroorganizma *Corynebacterium glutamicum* (02071-1ML-F [13]; standard koji je razrijeđen u radnu otopinu omjerom 1:5); koja je prethodno čuvana u hladnjaku te smo ju razrijedili 100 puta kako reakcija ne bi bila preburna. Također je korišten svježe otvoren 30% vodikov peroksid koji je razrijeđen na 20%. Da bi pH vrijednost ostala stalna korišten je 0,1 M fosfatni pufer. Za pripremu pufera korištene su soli natrijev hidrogenfosfat i natrijev dihidrogenfosfat koje su otopljene u destiliranoj vodi tako da su dobivene 3 otopine s pH 5,8; 6,8 i 7,4. Praktični dio odrađen je u kemijskom laboratoriju Prehrambene tehnologije Sveučilišta Sjever. Za mjerenje aktivnosti korištene su mikropipete, pipete, nastavci za pipete, kvarcne kivete, parafilm, boca od 500 mL, plastične prozirne epruvete, stalak za epruvete, termometar, štoperica, a od aparature korištena je analitička vaga, spektrofotometar i vodena kupelj.

### 3.2. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda koja se koristi za mjerenje količine svjetla koju neka tvar apsorbira, odnosno količine svjetla koje prolazi kroz uzorak. Kod spektrofotometrije se koristi izvor svjetlosti koji se usmjerava prema leći. Leća skuplja svjetlost u jednu točku na prizmi, a prizma razdvaja tu bijelu svjetlost na više različitih valnih duljina koje se pojavljuju u različitim bojama. Nakon toga svjetlost odlazi do uzorka te prolazi kroz njega, dok se određeni dio svjetlosti apsorbira, te dolazi do detektora za mjerenje količine apsorbirane svjetlosti. Količina fotona koji će proći kroz kivetu s uzorkom ovisi o duljini kivete i koncentraciji uzorka. Količina svjetlosti koja prođe kroz kivetu označava se slovom T. Ta količina može biti izračunata pomoću formule (55)

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (55)$$

$I_t$  predstavlja intenzitet svjetlosti nakon što svjetlost prođe kroz kivetu, a  $I_0$  je intenzitet svjetlosti prije prolaska kroz kivetu. Pomoću tih podataka može se izračunati i apsorbanciju prema formuli (56)

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0} \quad (56)$$

A predstavlja količinu apsorbirane svjetlosti u uzorku. Nadalje, pomoću Lambert-Beerovog zakona se može izračunati i koncentracija analita. Lambert-Beerov zakon govori da svjetlost koja dolazi do uzorka može biti apsorbirana, odbijena ili prenesena. Kada je svjetlost apsorbirana znači da je „preuzeta“ od strane uzorka, kada je odbijena znači da se raspršuje u drugom smjeru, a prenesena znači da prolazi kroz uzorak u istom smjeru u kojem je prvotno usmjerena. Formula koja opisuje Lambert-Beerov zakon glasi:

$$A = \epsilon lc \quad (57)$$

Oznaka  $\epsilon$  označava molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  je množinska koncentracija analita ( $\text{mol dm}^{-3}$ ), a  $l$  je duljina kivete kroz koju prolazi svjetlost (cm) [11].

### 3.3. Postupak testiranja

Najprije se pripreme puferi i razrjeđuje se vodikov peroksid na 20%. Nakon toga se razrjeđuje početni enzim 100 puta kako reakcija ne bi bila preburna. Spektrofotometar se namjesti na 240 nm i ostavi dvadesetak minuta da se zagrije. Prije samog početka testiranja se napravi slijepa proba u koju se doda 500  $\mu\text{L}$  pufera i 500  $\mu\text{L}$  vodikovog peroksida i stavlja se u spektrofotometar, a vrijednost se nulira pomoću programa i tako nije potrebno od dobivenih vrijednosti oduzimati vrijednost slijepa probe. Slijepa proba ponavlja se sa svakom promjenom pH pufera i promjenom temperature. Za testiranje aktivnosti katalaze u kivetu se doda 490  $\mu\text{L}$  pufera, 500  $\mu\text{L}$  vodikovog peroksida i 10  $\mu\text{L}$  katalaze. Kada se sve to pomiješa na vrh se brzo stavlja parafilm i inverzijom se pomiješa te se umeće u spektrofotometar. Svakih 10 sekundi se, kroz 60 sekundi, zapisuje vrijednost apsorbancije. Sva mjerenja se ponavljaju u triplikatu. Nakon što se odredi kod koje pH vrijednosti je enzim najaktivniji, ispituje se utjecaj temperature na aktivnost enzima. Ispitivane temperature su: sobna temperatura 25 °C, tjelesna temperatura 37 °C i povišena tjelesna temperatura 40 °C. Uzorci su inkubirani 30 minuta te im je određena aktivnost katalaze [12].

## 4. Rezultati i rasprava

Izmjerena je apsorbancija pri pH 5,8; 6,8 i 7,4 te je izračunata promjena apsorbancije i srednja vrijednost prema formuli:

$$\Delta A_{240\text{nm}} = \Delta A_{240\text{nm}} (t = 0\text{s}) - \Delta A_{240\text{nm}} (t = 60\text{s}) \quad (58)$$

Aktivnost katalaze je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost katalaze (U/mL)} = \frac{[\Delta A / \min(SP) - \Delta A / \min(GP)]}{V \cdot \varepsilon(H_2O_2)} \cdot d \cdot V(\text{uk}) \quad (59)$$

Gdje je:

d – faktor razrjeđenja uzorka (100)

V – volumen enzima dodanog u reakcijsku smjesu (0.01 mL)

V(uk) - ukupni volumen smjese (1 mL)

$\varepsilon (H_2O_2) = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  – molarni apsorpcijski koeficijent vodikova peroksida

U nastavku su prikazane tablice aktivnosti enzima pri istraživanim pH vrijednostima.

**Tablica 4.1** Mjerenje apsorbancije pri pH 5,8

pH 5,8				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,622	0,649	0,621	
2.	0,559	0,521	0,484	
3.	0,548	0,642	0,481	
4.	0,508	0,563	0,497	
5.	0,496	0,500	0,469	
6.	0,438	0,487	0,443	
$\Delta A_{240\text{nm}}$	0,184	0,162	0,178	0,175 ±0,011
			Aktivnost kU/mL	40,14±2,52

**Tablica 4.2** Mjerenje apsorbancije pri pH 6,8

pH 6,8				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,624	0,391	1,166	
2.	0,492	0,223	0,839	
3.	0,432	0,169	0,733	
4.	0,332	0,149	0,637	
5.	0,290	0,118	0,613	
6.	0,267	0,092	0,533	
$\Delta A_{240\text{nm}}$	0,357	0,299	0,633	0,430 ±0,178
			Aktivnost kU/mL	98,62±40,83

**Tablica 4.3** Mjerenje apsorbancije pri pH 7,4

pH 7,4				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,367	0,320	1,083	
2.	0,316	0,282	1,012	
3.	0,278	0,261	0,977	
4.	0,260	0,258	0,970	
5.	0,245	0,244	0,954	
6.	0,219	0,134	0,925	
$\Delta A_{240nm}$	0,148	0,186	0,158	0,164 $\pm$ 0,020
			Aktivnost kU/mL	37,62 $\pm$ 4,59

Dobiveno je da je aktivnost katalaze najveća kod pH od 6,8 što je blizu fiziološkog pH, a to je bitno kako bi se što prije razgradio toksičan vodikov peroksid, u našem tijelu, na vodu i kisik.

Nakon toga uzet je pufer pri kojem je enzim najaktivniji te je provedeno mjerenje na različitim temperaturama i izračunata promjena apsorbancije i srednja vrijednost prema formuli (58). U nastavku su prikazane tablice aktivnosti enzima pri određenim temperaturama.

**Tablica 4.4** Mjerenje apsorbancije pri 25°C

t = 25 °C				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,057	0,100	0,234	
2.	0,048	0,077	0,176	
3.	0,025	0,067	0,173	
4.	0,012	0,048	0,146	
5.	0,006	0,003	0,143	
6.	0,002	0,021	0,133	
$\Delta A_{240nm}$	0,055	0,079	0,101	0,078 $\pm$ 0,023
			Aktivnost kU/mL	17,89 $\pm$ 5,28

**Tablica 4.5** Mjerenje apsorbancije pri 37 °C

t = 37°C				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,195	0,587	0,194	
2.	0,115	0,507	0,178	
3.	0,102	0,412	0,136	
4.	0,086	0,389	0,127	
5.	0,081	0,326	0,127	
6.	0,062	0,306	0,060	
$\Delta A_{240nm}$	0,133	0,281	0,134	0,183 $\pm$ 0,085
			Aktivnost kU/mL	41,97 $\pm$ 2,29

**Tablica 4.6** Mjerenje apsorbancije pri 40°C

t = 40 °C				
Vrijeme/mjerenje	1.	2.	3.	Srednja vrijednost
1.	0,106	0,036	0,094	
2.	0,027	0,023	0,066	
3.	0,016	0,018	0,036	
4.	0,010	0,014	0,026	
5.	0,006	0,010	0,017	
6.	0,004	0,004	0,015	
$\Delta A_{240nm}$	0,102	0,032	0,079	0,071 ±0.036
			Aktivnost kU/mL	16,284±8,26

Također vidimo da je najveća aktivnost enzima pri 37 °C što je fiziološka temperatura i to je bitno iz istog razloga kao i pH vrijednost. Najmanju aktivnost enzim pokazuje na najvišoj temperaturi jer pri toj temperaturi se neki dio enzima već počeo i denaturirati pa nije bio u mogućnosti provesti reakciju. Uspoređujući aktivnost katalaze s vrijednošću kupljenog standarda, pokazalo se da je aktivnost katalaze u skladu s nabavnim vrijednostima s najvišom aktivnošću kod pH6,8 (deklarirana najviša aktivnost kod pH 7,0), i temperaturi 25°C (kao što je i deklarirano) [13].

## 5. ZAKLJUČAK

Brzina enzimskih reakcija temelji se na pravilima za brzine kemijskih reakcija pogotovo na pravilima za reakcije prvog, drugog i nultog reda. Povećanjem i smanjenjem pH vrijednosti aktivnost enzima raste jer tada enzim odnosno njegove amino kiseline mijenjaju optimalan naboj. Svaki enzim ima svoju optimalnu temperaturu na kojoj je najaktivniji, niže temperature usporavaju reakciju, a više temperature mogu čak i denaturirati enzim. Na primjeru enzima katalaze dokazali smo da su idealni uvjeti za aktivnost katalaze, fiziološki uvjeti organizma iz kojeg je izolirana, dakle na konkretnim testiranjima to je pH od 6,8 i temperatura od 37°C.

## 6. LITERATURA

- [1] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, New York: W.H. Freeman, 2005.
- [2] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell: Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, USA: McGraw.Hill Companies, 2003.
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry, Sixth Edition, New York: W.H. Freeman, 2007.
- [4] H. Gilbert: Basic concepts in biochemistry; a students survival guide, drugo izdanje, Houston, Texas: McGraw-Hill Companies, 2000.
- [5] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/environmental-impacts-on-enzyme-function/a/basics-of-enzyme-kinetics-graphs> , dostupno: 21.6.2022.
- [6] M. K. Campbell, S. O. Farrell: Biochemistry, 7th Edition, USA: Cengage Learning, 2012.
- [7] L. A. Moran, H. R. Horton, K. G. Schrimgeour, M. D. Perry: Principles of Biochemistry, Fifth Edition, USA: Pearson Education, 2012.
- [8] D. E. Meltzer: Biochemistry: The Chemical Reaction of Living Cells, volumes 1 and 2, Iowa, Academic Press, 2003.
- [9] Prof. Dr. Sc. Renata Teparić: Biokemija 1, interna skripta – radna verzija, Prehrambeno-Biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- [10] Bagatini, M. Dulce: Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease, 2020., London: IntechOpen
- [11] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/02%3A\\_Reaction\\_Rates/2.01%3A\\_Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/2.1.05%3A\\_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry) , dostupno: 28.7.2022.
- [12] I. Strelec, T. Kovač: Praktikum iz biokemije, 2014, Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- [13] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/02071> , dostupno: 20.6.2022.



## 7. POPIS SLIKAI TABLICA

<b>Slika 2.2.1.1</b> Graf ovisnosti brzine o koncentraciji supstrata [4].....	4
<b>Slika 2.2.3.1</b> Primjer jednadžbe nultog stupnja [4].....	5
<b>Slika 2.2.3.2</b> Primjer grafa koji prikazuje reakciju prvog i nultog reda [5].....	6
<b>Slika 2.2.3.3</b> Graf smanjenja energije aktivacije [6].....	7
<b>Slika 2.3.1</b> Prelazak Gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat bez enzima.....	8
<b>Slika 2.3.2</b> Prelazak Gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat s enzimom [3].....	9
<b>Slika 2.3.3</b> Grafovi slobodne energije prelaska gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-bisfosfoglicerat [3].....	10
<b>Slika 2.4.1.1</b> nastanak i sudbina ES kompleksa.....	10
<b>Slika 2.4.1.2</b> nastanak i sudbina ES kompleksa pri $V_0$ .....	11
<b>Slika 2.4.1.3</b> Graf brzine enzimske reakcije u ovisnosti o koncentraciji supstrata [S] [1] .....	14
<b>Slika 2.4.2.1</b> Lineweaver-Burkov dijagram za kinetiku enzima [6].....	15
<b>Slika 2.5.1</b> Primjer višesupstratnih reakcija [7].....	18
<b>Slika 2.6.2.1</b> Graf ovisnosti aktivnosti enzima o temperaturi [9].....	20
<b>Slika 2.6.4.1</b> Klasična kompetitivna inhibicija [7] .....	22
<b>Slika 2.6.4.2</b> Neklasična kompetitivna inhibicija [7].....	22
<b>Slika 2.6.5.1</b> Akompetitivna inhibicija [7] .....	23
<b>Slika 2.6.6.1</b> Nekompetitivna inhibicija [7].....	23
<b>Slika 2.6.7.1</b> Primjer grupno specifične inhibicije [3].....	26
<b>Slika 2.6.7.2</b> Primjer inhibicije reaktivnim analogom supstrata [3] .....	26
<b>Slika 2.6.7.3</b> Struktura dihidroksiaceton fosfata.....	27
<b>Slika 2.6.8.1</b> Reakcija izomeracije prolina [3].....	27
<b>Slika 2.6.8.2</b> Analog prijelaznog stanja prolin-racemaze [3] .....	28
<b>Slika 2.7.1.1</b> Struktura katalaze [10].....	29
<b>Tablica 4.1</b> Mjerenje apsorbancije pri pH 5,8.....	33
<b>Tablica 4.2</b> Mjerenje apsorbancije pri pH 6,8.....	33
<b>Tablica 4.3</b> Mjerenje apsorbancije pri pH 7,4.....	34
<b>Tablica 4.4</b> Mjerenje apsorbancije pri 25°C.....	34
<b>Tablica 4.5</b> Mjerenje apsorbancije pri 37 °C.....	34
<b>Tablica 4.6</b> Mjerenje apsorbancije pri 40°C.....	35



**IZJAVA O AUTORSTVU  
I  
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU**

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, Luka Mihalic (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Kinetika enzima katalaze (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Mihalic Luka

(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, Luka Mihalic (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Kinetika enzima katalaze (upisati naslov) čiji sam autor/ica.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Mihalic Luka

(vlastoručni potpis)

2.5%

PlagScan by iParagon Results of plagiarism analysis from 2022-09-05 10:06 UTC  
Kinetika enzima katalaze - završni rad\_BS.docx

Date: 2022-09-05 09:56 UTC

All sources 31 | Internet sources 23 | Own documents 1 | Organization archive 7

- ✓ [0] [core.ac.uk/download/pdf/100158434.pdf](#)  
0.5% 4 matches
- ✓ [1] [peskiadmin.ru/hr/factory-ot-kotoryh-zavisit-skorost-fermentativnoi-reakcii-zavisimost.html](#)  
0.3% 6 matches
- ✓ [2] [ostrov-vikingov.ru/hr/enry-rulera/zavisimost-skorosti-fermentativnoi-reakcii-ot-temperatury.html](#)  
0.3% 5 matches
- ✓ [3] [www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/14otk-p8-enzimska\\_kinetika.pdf](#)  
0.3% 4 matches
- ✓ [4] [core.ac.uk/download/pdf/197871621.pdf](#)  
0.2% 3 matches
- ✓ [5] [www.bib.irb.hr/641532/download/641532.Praktikum\\_iz\\_biokemije\\_2014.pdf](#)  
0.2% 3 matches
- ✓ [6] ["Balaic Patricia SeminarSKI rad - Brze metode za detekciju mikroorganizama.docx" dated 2022-04-21](#)  
0.2% 3 matches
- ✓ [7] [pof.uns.ac.rs/sites/default/files/udzbenici/Biokemija\\_bijaka.pdf](#)  
0.2% 4 matches
- ✓ [8] [zr.nsk.hr/silandora/object/ptfos:889/datastream/PDF/view](#)  
0.2% 4 matches
- ✓ [9] [kercht.ru/bs/izmerenie-fermentativnoi-aktivnosti-metabolizma-i-fermenty/](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [10] [core.ac.uk/download/pdf/232987163.pdf](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [11] [repositorij.ptfos.hr/silandora/object/ptfos:140/datastream/PDF/view](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [12] [repositorij.fki.unizg.hr/silandora/object/ftk:1099/datastream/PDF/view](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [13] [www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/14otk-p8-enzimi-1.pdf](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [14] [www.bib.irb.hr/626054/download/626054.Nivestvic-doktorat.pdf](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [15] [docplayer.net/87540019-Drago-Besko-praktikum-iz-biokemije-skripta-vejsca-2014.html](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [16] [www.fazos.unios.hr/upload/documents/DBesko\\_Praktikum\\_iz\\_biokemije.pdf](#)  
0.2% 2 matches
- ✓ [17] ["Prehrana obojeitih od dijabetesa \(Tip 2\).docx" dated 2022-08-31](#)  
0.2% 1 matches  
1 documents with identical matches
- ✓ [19] ["Završni rad - Jelena Smojević.docx" dated 2022-07-28](#)  
0.2% 1 matches
- ✓ [20] ["Završni\\_rad\\_Kombucha.docx" dated 2021-08-25](#)  
0.2% 1 matches  
1 documents with identical matches
- ✓ [22] [zr.nsk.hr/silandora/object/ptfos:2073/datastream/PDF/view](#)  
0.2% 1 matches
- ✓ [23] [core.ac.uk/download/pdf/185641822.pdf](#)  
0.2% 1 matches
- ✓ [24] [hrcak.srce.hr/file/163846](#)  
0.2% 1 matches
- ✓ [25] [repositorij.ptfos.hr/silandora/object/ptfos:2293/datastream/PDF/download](#)  
0.2% 1 matches  
1 documents with identical matches

0 1 documents with identical matches

- [27] [docplayer.rs/162402615-Sveučilište-josipa-jurja-strossmayera-u-osijeku-prehrambeno-tehnološki-fakultet-osijek-dalja-ratkajec-utjecaj-vrs](#)  
0.5% 1 matches

---

- [28] "Završni ispravljani.docx" dated 2022-09-02  
0.5% 1 matches

---

- [29] "Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom\_B52.docx" dated 2022-07-13  
0.5% 1 matches  
2 documents with identical matches

---

- [32] "Završni\_rad\_Kombucha (1).docx" dated 2021-09-09  
0.5% 1 matches

---

- [33] "Fizikalno - kemijska i tehnološka usporedba kofina i jogurta (10) (1).docx" dated 2021-07-12  
0.5% 1 matches  
2 documents with identical matches

---

- [36] [www.docstity.com/en/upustiva-za-vezbe-iz-biohemije/5695628/](#)  
0.5% 1 matches

---

- [37] [core.ac.uk/download/pdf/197892642.pdf](#)  
0.5% 1 matches

48 pages, 9648 words

PlagLevel: 2.3% selected / 2.5% overall

33 matches from 38 sources, of which 25 are online sources.

#### Settings

Data policy: Compare with web sources, Check against my documents, Check against my documents in the organization repository, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool

Sensitivity: Medium

Bibliography: Consider text

Citation detection: Reduce PlagLevel

Whitelist: --