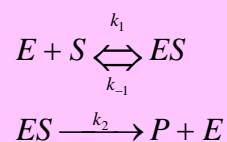


## RAZLAGANJE SAHAROZE ENZIMOM

**Teorijski deo**

Veliki broj enzimski katalisanih reakcija se može predstaviti mehanizmom koji je poznat kao mehanizam Mihaelis-Menten:



Po ovom mehanizmu enzim E reaguje sa supstratom S, gradeći kompleks ES. Ravnoteža između E, S i ES se uspostavlja vrlo brzo ( $k_1 > k_{-1}$ ), ali se zbog slabe rastvorljivosti enzima u vodi ( $[E_{\text{tot}}] \ll [S]$ ,  $[ES] \ll [S]$  i  $[ES] \ll [P]$ ) može primeniti uslov stacionarnosti u odnosu na intermedijernu vrstu ES. Brzina reakcije (brzina nastajanja produkta) je:

$$v = \frac{v_{\text{max}} [S]}{K_M + [S]}$$

gde je  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  Mihaelisova konstanta i  $v_{\text{max}} = k_2 [E_{\text{tot}}]$  maksimalna brzina reakcije.

Ova jednačina se može zapisati u sledećem obliku:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\text{max}} [S]} + \frac{1}{v_{\text{max}}}$$

Iz jednačine se vidi da, ako se  $\frac{1}{v}$  prikaže u funkciji  $\frac{1}{[S]}$ , dobija se prava sa nagibom  $\frac{K_M}{v_{\text{max}}}$  i odsečkom  $\frac{1}{v_{\text{max}}}$ . U ovoj vežbi se ispituje reakcija enzimskog razlaganja saharoze koja se može predstaviti Mihaelis-Menten mehanizmom. Promena koncentracije saharoze sa vremenom se može pratiti na osnovu promene ugla obrtanja ravni polarizovane svetlosti jer su saharoza i produkti razlaganja saharoze optički aktivne supstance. Optička aktivnost je povezana sa postojanjem asimetričnog ugljenikovog atoma u molekulu. Ugao obrtanja ravni oscilovanja polarizovane svetlosti naziva se ugao rotacije,  $\alpha$ , i proporcionalan je koncentraciji aktivne komponente,  $c$ , i debljini sloja,  $l$ , kroz koji prolazi polarizovana svetlost  $\alpha = [\alpha_0]_{\lambda}^T l c$ . Koeficijent proporcionalnosti,  $[\alpha_0]_{\lambda}^T$ , naziva se ugao specifične rotacije i za datu temperaturu i talasnu dužinu upotrebijene svetlosti, karakteristika je optički aktivne supstance. Najčešće se koristi svetlost talasne dužine 589,6 nm (karakteristična žuta linija u spektru pare natrijuma). Ugao specifične rotacije saharoze je 66,55 °, glukoze 52,56 ° i fruktoze – 91,90 °. Kako je ugao obrtanja ravni polarizovane svetlosti jednak algebarskom zbiru uglova obrtanja pojedinih komponenata, tokom procesa inverzije saharoze ugao rotacije će se smanjivati od početne vrednosti  $\alpha_0$ , do granične negativne vrednosti  $\alpha_{\infty}$ , na kraju reakcije. Razlika  $\alpha_0 - \alpha_{\infty}$  proporcionalna je ukupnoj količini saharoze, tj. početnoj koncentraciji,  $[S]_0$ , dok je razlika  $\alpha - \alpha_{\infty}$ , gde je  $\alpha$  ugao rotacije u trenutku  $t$ , proporcionalna trenutnoj koncentraciji saharoze,  $[S]$ , tako da važi jednačina:

$$\frac{[S]}{[S]_0} = \frac{\alpha - \alpha_\infty}{\alpha_0 - \alpha_\infty}$$

Ugao rotacije se meri polarimetrom. Na slici 1 prikazana je aparatura potrebna za izvođenje ove vežbe.



Slika 1. Aparatura potrebna za izvođenje vežbe.

### Eksperimentalni deo

Potrebni rastvori:

1. 1 M saharoza
2. rastvor enzima (10 mg enzima u 10 ml vode)
3. pufer

Napraviti rastvore za merenje početne vrednosti ugla rotacije ( $\alpha_0$ ) prema uputstvu prikazanom u tabeli 1. Odrediti početne uglove rotacije za sve rastvore.

**Tabela 1.** Zapremina puferskog rastvora, saharoze i vode potrebne za pripremu smeša za merenje  $\alpha_0$ .

Exp	V pufera /ml	V <sub>1M saharoze</sub> /ml	V <sub>vode</sub> /ml
1	15,00	15,00	0,75
2	22,50	7,50	0,75
3	26,25	3,75	0,75
4	29,25	0,75	0,75

Reakcione smeše pripremiti u erlenmajeru prema uputstvu prikazanom u tabeli 2.

**Tabela 2.** Zapremina puferskog rastvora, saharoze i enzima potrebne za pripremu reakcionih smeša.

<b>Exp</b>	<b>V pufera /ml</b>	<b>V<sub>1M</sub> saharoze /ml</b>	<b>V enzima /ml</b>
<b>1</b>	<b>30,0</b>	<b>30,0</b>	<b>1,5</b>
<b>2</b>	<b>45,0</b>	<b>15,0</b>	<b>1,5</b>
<b>3</b>	<b>52,5</b>	<b>7,5</b>	<b>1,5</b>
<b>4</b>	<b>58,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>

U trenutku dodavanja rastvora enzima treba uključiti hronometar i pratiti na polarimetru promenu ugla rotacije sa vremenom u što kraćim vremenskim intervalima. Eksperimente početi od najkoncentrovanijeg rastvora saharoze. Merenje prekinuti nakon 10 min (za razblažene rastvore posle 15 minuta). Isprati kivetu polarimetra i eksperiment ponoviti sa preostalim rastvorima saharoze. Rastvor koji je preostao u erlenmajeru, nakon sipanja u polarimetarsku cev, ne treba prosipati, nego ga sačuvati za merenje ugla rotacije posle "beskonačno" dugog vremena.

### **Obrada rezultata merenja**

Izračunati koncentraciju saharoze u funkciji vremena za sve početne koncentracije. Rezultate predstaviti tabelarno ( $t$ ,  $\alpha$ ,  $c$ ). Za sve ispitivane rastvore nacrtati grafike  $c = f(t)$  i grafički odrediti početnu brzinu razlaganja saharoze,  $v_0$  (prvi izvod eksponencijalnog fita za funkciju  $c = f(t)$  u trenutku  $t = 0$ ). Nacrtati grafik  $\frac{1}{v_0}$  u funkciji  $\frac{1}{c_0}$  i odrediti Mihaelisovu konstantu i maksimalnu brzinu reakcije.