

Analiza Michaelis-Mentenine kinetike katalazom iz tkiva jetre različitih vrsta

Sara Jelenčić i Tena Paladinić

3. razred
Gimnazija Karlovac

Mentori: dr. sc. Krešimir Baumann, profesor kemije i biologije
Jasminka Žiža, profesor savjetnik, profesor kemije i biologije

Ključni pojmovi: *enzim, kinetika, vodikov peroksid, pufer*

Sažetak

U okviru ovog rada proučavane su kinetike enzimskog djelovanja katalaze iz tkiva jetre različitih vrsta na vodikova peroksid (H_2O_2). Eksperimentalno su izmjere brzine raspada H_2O_2 i podizanja filter papira, što je korišteno kao indirektna mjera aktivnosti enzima. Na temelju dobivenih podataka tri neovisna uzastopna mjerenja provedene su linearna (MS Excel) i nelinearna (GraphPad Prism) regresija kako bi se odredili ključni kinetički parametri: MichaelisMentenina konstanta, K_m i maksimalna brzina reakcije, V_m . Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju funkcije enzima katalaze u različitim vrstama te mogu poslužiti kao osnova za usporedbu aktivnosti enzima i njezine varijacije među vrstama.

ANALIZA MICHAELIS-MENTENINE KINETIKE KATALAZOM IZ TKIVA JETRE RAZLIČITIH VRSTA

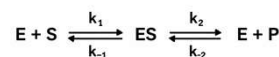
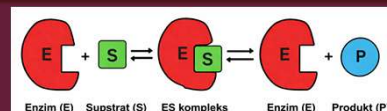
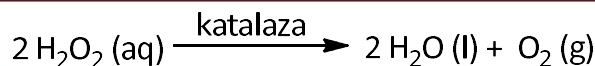
Sara Jelenčić i Tena Paladinić



Mentori: Jasminka Žiža i dr. sc. Krešimir Baumann

SAŽETAK U okviru rada istraživane su kinetike djelovanja enzima katalaze iz tkiva jetre različitih vrsta na vodikov peroksid (H_2O_2) kao supstrat. Aktivnost enzima određena je mjerenjem brzine razgradnje H_2O_2 i podizanja filter papira kao indirektnog pokazatelja. Dobiveni podaci analizirani su linearnom i nelinearnom regresijom radi određivanja kinetičkih parametara Michaelis-Mentenine konstante, K_m i maksimalne brzine reakcije, V_m . Rezultati doprinose razumijevanju varijacija enzimске aktivnosti među vrstama.

UVOD Enzimi su specifični proteinski biokatalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije u živim sustavima snižavanjem energije aktivacije. Prema funkciji se dijele u više skupina, a njihova aktivnost ovisi o uvjetima poput temperature, pH i koncentracije supstrata. Katalaza je važan enzim iz skupine oksidoreduktaza, prisutan u peroksisomima, osobito u jetri, gdje razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik te štiti stanice od oksidativnog oštećenja.¹ Djelovanje enzima temelji se na vezanju supstrata u aktivno mjesto (model ključ-brava), pri čemu dolazi do promjene konformacije samog enzima i olakšavanja kemijske reakcije, nakon čega se produkti oslobađaju, a enzim ostaje nepromijenjen.²



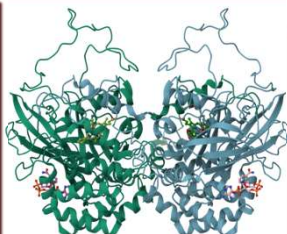
Slika 1. Mehanizam djelovanja enzima na supstrate²

Cilj rada:

Ispitati utjecaj porasta koncentracije vodikova peroksida (H_2O_2) kao supstrata na brzinu djelovanja katalaze iz jetre svinje, pileta i goveda te linearnom i nelinearnom regresijom odrediti kinetičke parametre (K_m i V_m). Također, usporediti aktivnost enzima među vrstama i analizirati moguće razlike i povezanosti kinetičkih parametara.

Hipoteze:

- Povećanjem koncentracije H_2O_2 raste brzina reakcije do postizanja maksimalne brzine (V_m).
- Postoje razlike u enzimskoj aktivnosti između ispitivanih vrsta pri različitim koncentracijama supstrata.
- Postoje razlike u enzimskoj aktivnosti između vrsta i pri istim koncentracijama supstrata.
- Kinetički parametri (K_m i V_m) razlikuju se među vrstama.
- Ne postoji značajna korelacija između pojedinih kinetičkih parametara katalaze iz različitih uzoraka.

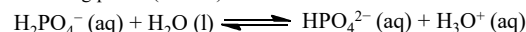


Slika 2. Struktura goveđe katalaze³

MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u školskom laboratoriju uz dostupni pribor i kemikalije analitičke čistoće. Korišteni su fosfatni pufer (0,1 M, pH 7,0), vodikov peroksid različitih koncentracija te ekstrakti svježje jetre. Ekstrakti su pripremljeni homogenizacijom jetre u puferu, razrijeđeni i korišteni za impregnaciju filter papira.

Priprema fosfatnog pufera (izračun):



$$K_{a2} = 6,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}, \text{ p}K_{a2} = 7,207$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{HPO}_4^{2-}]}$$

Tablica 1. Priprema vodenih otopina vodikova peroksida zadanih masenih udjela i koncentracija iz komercijalnog 30%-tnog H_2O_2 (1,11 g/mL, 9,8 M)

V (30% H_2O_2) / mL	V (H_2O) / mL	V (ukupni) / mL	w(H_2O_2) / %	c(H_2O_2) / mol dm ⁻³
7	993	1000	0,2	0,065
10	990	1000	0,3	0,098
17	983	1000	0,5	0,163
34	966	1000	1	0,326
67	933	1000	2	0,653

Aktivnost katalaze određivana je indirektno mjerenjem vremena potrebnog da filter papir natopljen ekstraktom, uslijed nastajanja kisika, ispliva na površinu otopine H_2O_2 . Mjerenja su provedena pri različitim koncentracijama supstrata, u triplicatu i pri sobnoj temperaturi. Dobiveni podaci obrađeni su u programima Excel i GraphPad Prism⁴, a kinetički parametri (K_m i V_m) određeni su linearnom i nelinearnom regresijom. U linearizaciji Michaelis-Mentenine jednadžbe se koristi samo njena recipročna vrijednost.⁵

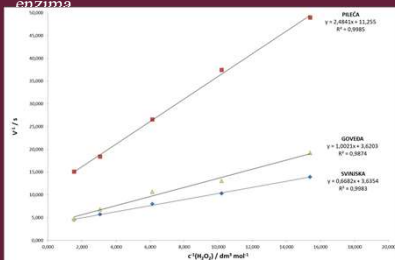
$$v_0 = \frac{V_m [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \rightarrow \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{V_m}$$

ZAKLJUČAK

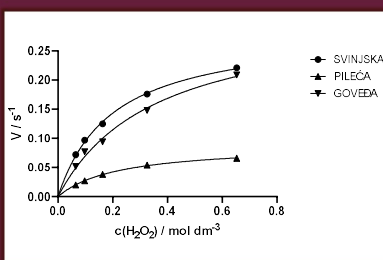
Uočene su razlike u brzini reakcije između katalaza iz svinjske, goveđe i pileće jetre pri različitim, ali i pri istim koncentracijama supstrata, pri čemu svinjska i goveđa katalaza pokazuju veću aktivnost od pileće. Analiza kinetičkih parametara pokazuje da se vrijednosti K_m i V_m razlikuju među vrstama (najniži K_m – svinja, najveći V_m – goveđa), što ukazuje na strukturne i funkcionalne razlike enzima. Uočeno je da viši afinitet (niži K_m) ne znači nužno i veću maksimalnu brzinu reakcije, odnosno ne postoji izravna korelacija između kinetičkih parametara katalaze različitih vrsta. Rezultati pokazuju da se aktivnost katalaze razlikuje među vrstama te ovisi o koncentraciji supstrata, a dobiveni podaci doprinose razumijevanju enzimске kinetike i biološke uloge katalaze.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati potvrđuju da se povećanjem koncentracije vodikova peroksida povećava brzina reakcije do postizanja maksimalne brzine (V_m), nakon čega dolazi do zasićenja enzima.



Slika 3. Lineweaver-Burkovi dijagrami prikaza Michaelis-Mentenine kinetike raspada H_2O_2 pri 25 °C u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7



Slika 4. Određivanje kinetičkih parametara za katalazu Michaelis-Mentenim modelom – nelinearna regresija pri 25 °C u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7

Tablica 2. Kinetički parametri dobiveni nelinearnom regresijom i Lineweaver-Burk linearizacijom Michaelis-Mentenine kinetike raspada H_2O_2 katalazom iz ekstrakta jetre različitih organizama pri 25 °C u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7

IZVOR KATALAZE	Kinetički parametri					
	GraphPad Prism podaci (nelinearna regresija)				Lineweaver-Burk linearizacija	
	raspon K_m / mol dm ⁻³	K_m / mM	raspon V_m / s ⁻¹	V_m / s ⁻¹	V_m / s ⁻¹	K_m / mM
svinjska jetra	0,1669 – 0,2419	200,8	0,2662 – 0,3106	0,287	0,2751	183,8
pileća jetra	0,1925 – 0,2501	219,3	0,08407 – 0,09408	0,08883	0,0888	220,7
goveđa jetra	0,2187 – 0,6188	356,7	0,2532 – 0,4296	0,319	0,276	276,8

LITERATURA

- Berg, J.M., Tymoczko, J., Stryer, L., (1991). *Biokemija*, Zagreb, Školska knjiga, str. 89 – 113., 2. Fersht, A., (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, New York, Freeman
- <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/7cat>, 4. <https://www.graphpad.com/>, 5. Praktikum iz biokemije, interna skripta, Prirodoslovno-matematički fakultet – Zavod za biokemiju, Zagreb, 2017. Str. 9 – 18.