





MERJENJE HITROSTI ENCIMSKO KATALIZIRANE REAKCIJE

1. UVOD

Encimi so biološki katalizatorji, ki povečujejo hitrost reakcije za 10^6 do 10^{12} -krat s tem, da znižajo aktivacijsko energijo reakcije. Delujejo v milih reakcijskih pogojih, specifično prepoznajo substrat in tvorijo specifične produkte, sami pa iz reakcije izstopajo nespremenjeni. So pod vplivom različnih tipov regulacije, kot sta alosterična regulacija in kovalentna modifikacija. Encimi katalizirajo pretvorbo substrata v produkt, tako da nase vežejo eno ali nekaj molekul substrata, da nastane funkcionalni kompleks encim-substrat. Vezava encima in substrata pa je zelo specifična, substrat se veže na alosterično mesto na encimu.

Encimi so po sestavi enostavne ali sestavljene beljakovine, nekateri za svoje delovanje potrebujejo kofaktorje oz. koencime, ki so nanje vezani kovalentno ali nekovalentno. Na podlagi reakcij, ki jih katalizirajo, delimo encime na:

- oksidoreduktaze: katalizirajo reakcije redukcije in oksidacije

- transferaze: pomagajo pri prenosu funkcionalnih skupin
- hidrolaze: cepijo vezi
- liaze: sodelujejo pri nastanku dvojnih vezi
- izomeraze: sodelujejo pri izomerizaciji
- ligaze: sodelujejo pri nastanku novih vezi

Encimsko aktivnost najpogosteje izražamo z U, katalom ali z specifično aktivnostjo in so definirane kot število molov substrata, ki se preoblikuje v produkt v neki časovni enoti. Encimska aktivnost pa je odvisna od koncentracije substrata, kofaktorje, pH, temperature in ionske moči.

Hitrost encimske reakcije lahko določamo tako, da merimo porabo substrata ali pa nastajanje produkta v odvisnosti od časa. Splošna enačba za encimsko reakcijo Michaelis-Mentelov model, ki predpostavlja, da je reakcija nastanka kompleksa encim-substrat reverzibilna, reakcija razpada tega kompleksa na encim in substrat pa ireverzibilna. Hitrost reakcije je odvisna le od hitrosti pretvorbe kompleksa encim-substrat v produkt in encim. Saj je povratek v substrat in encim zanemarljiva. Ta model se uporablja za 1 in 2 substratne reakcije, ter takrat ko ima encim samo eno poudenoto. Sicer pa uporabljamo koperativni model sinteze.

Na delovanje encima vpliva koncentracija encima, konc. substrata, efektorji encimskega delovanja, temperatura in pH. Večinoma encimov je aktivnih pri razponu temperature od 25°C pa do 50°C.

2. REZULTATI

a) Hitrost odvisna od koncentracije substrat:

Koncentracija substrata (M) [1/S]	Absorpcija (A 410)	1/v
0.00200 (500)	2.415	41410
0.00100 (1000)	1.424	70220
0.00070 (1430)	1.280	78130
0.00049 (2040)	0.877	114030
0.00024 (4170)	0.422	236970

b) Merjenje časovne odvisnosti razgradnje:

Koncentracija sub. (M)	Čas inkubiranja (min)	Absorpcija (A 410)
0.00100	5	0.550
0.00100	10	0.739
0.00100	15	1.618
0.00100	30	1.737

c) *pH optimum*

Koncentracija sub. (M)	pH	Absorpcija (A 410)
0.001	4	0.002
0.001	5	0.002
0.001	6	0.021
0.001	7	0.77
0.001	8	0.874
0.001	9	0.948
0.001	10	0.881

d) *Odvisnost delovanja encima od temperature:*

Čas inkubacije	T (°C)	Absorpcija (A 410)
5	4	0.446
	20	0.691
	37	1.660
	60	1.104
30	4	0.799
	20	1.430
	37	2.100
	60	1.673

GRAF a)

GRAF b)

GRAF c)

GRAF d)

3. ZAKLJUČEK

Narisani grafi nam omogočajo, da lažje razberemo optimume delovanja encima pri različnih okoliščinah. Tako smo to preverjali pri spreminjanju temperature, koncentracije substrata, pH-ja in razgradnjo v odvisnosti od časa. Menim, da je vaja bila uspešna, saj ni prišlo do vidnejših odstopanj oz. napak napram ostalim. Seveda pa lahko do manjših napak zmerom pride npr. pri odmerjanju volumna snovi ali pa je lahko epruveta nečista in lahko pride do napak pri meritvah v spektro-fotometru.