

**Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Zavod za biokemiju**

OSNOVE BIOKEMIJE

Mladen Miloš

(Skripta za internu upotrebu)

Split, 2009.

SADRŽAJ	2
1. POGLAVLJE: ŽIVA STANICA	6
1.1. Prokariotske žive stanice	
1.2. Eukariotske žive stanice	
1.3. Važnije stanične komponente	
1.3.1. Stanična membrana	
1.3.2. Citoplazma	
1.3.3. Jezgra	
1.3.4. Mitohondrije	
1.3.5. Ribosomi i endoplazmatska mrežica	
1.3.6. Golgijev aparat	
1.4. Kemijska aktivnost stanice	
2. POGLAVLJE: BIOMOLEKULE	8
2.1. Molekulska logika živih organizama	
2.2. Osnovni sastojci žive tvari	
2.2.1. Bioelementi	
2.2.2. Biomolekule	
2.3. Prekursori	
2.3.1. Preteče proteina	
2.3.2. Preteče nukleinskih kiselina	
2.3.3. Preteče masti	
2.3.4. Preteče šećera	
2.4. Kemijske veze među biomeolekulama	
2.4.1. Ionska veza	
2.4.2. Kovalentna veza	
2.4.3. Nekovalentne veze	
2.5. Voda	
2.5.1. Anomalije vode	
2.5.2. Reakcije s vodom	
2.5.3. pH - vrijednost vodenih otopina	
3. POGLAVLJE: AMINOKISELINE	12
3.1. Klasifikacija aminokiselina prema R skupini	
3.1.1. Nepolarne ili hidrofobne aminokiseline	
3.1.2. Polarne i električki nenabijene aminokiseline	
3.1.3. Polarne i negativno nabijene aminokiseline	
3.1.4. Polarne i pozitivno nabijene aminokiseline	
3.2. Aminokiseline koje ne ulaze u sastav proteina	
3.3. Aminokiseline kao dvopolni ioni	
3.3.1. Titracijske krivulje	
3.3.2. Izoelektrična točka	
3.3.3. pK vrijednosti funkcijskih skupina	
3.4. Optička aktivnost aminokiselina	
3.4.1. Zakretanje polarizirane svjetlosti	
3.4.2. Apsorpcija u UV/VIS području elektromagnetskog zračenja	

3.5.	Karakteristične kemijske reakcije aminokiselina	
3.5.1.	Ninhidrińska reakcija	
3.5.2.	Reakcija s 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenom	
3.6.	Opće kemijske reakcije aminokiselina	
3.6.1.	Svojstva povezana s karboksilnom skupinom	
3.6.2.	Svojstva povezana s amino skupinom	
3.7.	Raspodjela aminokiselina u ljudskom organizmu	
3.7.1.	Aminokiseline u krvi i mokraći	
3.8.	Biosinteza aminokiselina	
4.	POGLAVLJE: PEPTIDI	25
4.1.	Peptidna veza	
4.2.	Dokaz postojanja peptidne veze	
4.3.	Redoslijed aminokiselina u nekom peptidu	
4.4.	Određivanje aminokiselina na N završetku	
4.4.1.	Sangerova metoda	
4.4.2.	Enzimská metoda (aminoegzo-peptidaza)	
4.5.	Određivanje aminokiselina na C završetku	
4.5.1.	Kemijska metoda	
4.5.2.	Enzimská metoda (karboksiegzopeptidaza)	
4.6.	Hidroliza peptidne veze unutar peptidnih lanaca	
4.6.1.	Neselektivna hidroliza peptidnog lanca	
4.6.2.	Selektivna hidroliza peptidnog lanca	
4.7.	Određivanje redoslijeda aminokiselina Edmanovom metodom	
4.8.	Biološka uloga peptida	
4.8.1.	Hormonski peptidi	
4.8.2.	Peptidi antibiotici	
4.8.3.	Ostale biološke uloge peptida	
5.	POGLAVLJE: PROTEINI	33
5.1.	Podjela proteina prema strukturnoj građi	
5.1.1.	Primarna struktura	
5.1.2.	Sekundarna struktura	
5.1.3.	Tercijarna struktura	
5.1.4.	Kvarterna struktura	
5.2.	Konformacija proteina	
5.3.	Topivost proteina u vodi	
5.3.1.	Utjecaj pH	
5.3.2.	Utjecaj ionske sile μ	
5.3.3.	Utjecaj temperature	
5.3.4.	Utjecaj organskih otapala	
5.3.5.	Utjecaj nekih kemijskih spojeva	
5.4.	Puferska svojstva proteina	
5.5.	Određivanje izoelektrične točke proteina	
5.6.	Kemijska svojstva proteina	
5.7.	Apsorpcija proteina u ultraljubičastom području	
5.8.	Biološka uloga proteina	
5.8.1.	Mioglobin i hemoglobin	

6.	POGLAVLJE: ENZIMI	44
6.1.	Definicija aktivnog mjesta	
6.2.	Enzimska kinetika	
6.2.1.	Utjecaj koncentracije enzima i supstrata na brzinu enzimske reakcije	
6.2.2.	Michaelis-Mentenova pretpostavka	
6.2.3.	Grafičko određivanje Michaelisove konstante i maksimalne brzine	
6.2.4.	Značenje Michaelisove konstante	
6.3.	Moduliranje enzimske aktivnosti	
6.3.1.	Reverzibilnost enzimskih aktivnosti	
6.3.2.	Specifičnost enzimskih reakcija	
6.3.3.	Fizički uvjeti sredine	
6.3.4.	Utjecaj kemijskih tvari	
6.4.	Inhibitori enzimske aktivnosti	
6.4.1.	Kompetitivna inhibicija	
6.4.2.	Nekompetitivna inhibicija	
7.	POGLAVLJE: KOFAKTORI I VITAMINI	55
7.1.	Zajednička svojstva svih kofaktora	
7.2.	Podjela kofaktora	
7.3.	Podjela koenzima po načinu djelovanja	
7.3.1.	Specifična svojstva prostetičkih skupina	
7.3.2.	Specifična svojstva kosupstrata	
7.4.	Podjela koenzima po biološkoj funkciji	
7.4.1.	Koenzimi prijenosnici funkcijskih skupina	
7.4.2.	Oksidoredukcijski koenzimi	
7.4.3.	Ostali oksido-redukcijski koenzimi	
8.	POGLAVLJE: ŠEĆERI	65
8.1.	Podjela šećera	
8.1.1.	Jednostavni šećeri ili monosaharidi	
8.1.2.	Složeni šećeri	
8.2.	Linearna struktura monosaharida	
8.3.	Ciklična struktura monosaharida	
8.3.1.	Haworth-ov eksperimentalni dokaz	
8.4.	Prostorno uređenje cikličnih monosaharida	
8.5.	Svojstva šećera	
8.5.1.	Optička aktivnost šećera	
8.5.2.	Kemijska stabilnost šećera	
8.5.3.	Kemijska svojstva povezana s karbonilnom skupinom	
8.5.4.	Kemijska svojstva povezana s alkoholnom skupinom	
8.6.	Biološki važni monosaharidi	
8.7.	Oligosaharidi	
8.7.1.	Određivanje strukture nekog oligosaharida	
8.7.2.	Biološki važni oligosaharidi	
8.8.	Polisaharidi	
8.8.1.	Struktura polisaharida	
8.8.2.	Homogeni polisaharidi	
8.8.3.	Heterogeni polisaharidi	
8.9.	Glikokonjugati	

8.9.1. Glikoproteini

8.9.2. Glikolipidi

9. POGLAVLJE: LIPIDI 82

9.1. Prekursori lipida - višemasne kiseline

9.1.1. Zasićene višemasne kiseline

9.1.2. Nezasićene masne kiseline

9.1.3. Prostaglandini

9.1.4. Fizička svojstva masnih kiselina

9.1.5. Kemijska svojstva višemasnih kiselina povezana s karboksilnom skupinom

a) Stvaranje soli

b) Stvaranje estera

9.1.6. Kemijska svojstva masnih kiselina povezana s dvostrukim vezama

9.2. Jednostavni lipidi

9.2.1. Gliceridi ili masti

9.2.2. Steroidi

9.3. Složeni lipidi

9.3.1. Glicerofosfolipidi

9.3.2. Sfingolipidi

9.3.3. Lipoproteini

9.4. Biološke membrane

9.4.1. Građa bioloških membrana

9.4.2. Propusnost i prijenos tvari kroz staničnu membranu

10. POGLAVLJE: BIOENERGETIKA 98

10.1. Slobodna entalpija i spontani procesi

10.2. Endergone reakcije

10.3. Metastabilnost živog sustava

11. POGLAVLJE: METABOLIZAM 102

11.1. Crpljenje energije iz hrane

11.2. Razgradnja glukoze (glikoliza)

11.3. Ciklus limunske kiseline

11.4. Oksidacijska fosforilacija

11.5. Razgradnja masnih kiselina

11.6. Razgradnja aminokiselina

11.6.1. Ciklus uree

11.6.2. Razgradnja ugljikovih okosnica

LITERATURA 114

1. POGLAVLJE

ŽIVA STANICA

Danas se biokemija bavi uglavnom kemijskim reakcijama u živoj stanici, a također i vezom koja postoji između stanične strukture i njene funkcije. Albert Lehninger definirao je živu stanicu kao izotermni sustav molekula koje se same prilagođuju, vezuju, obnavljaju i produžuju, a izmjenjuju tvari i energiju s okolinom. Takav sustav radi uz maksimalnu uštedu energije, a organske reakcije koje se tu odvijaju katalizirane su enzimima koje proizvodi sama stanica. Makromolekule koje stvaraju komponente stanice, nastaju od građevnih biomolekula (prekursora). Šećeri, lipidi, proteini i nukleinske kiseline dalje sudjeluju u izgradnji staničnih sustava koji omogućavaju funkciju žive stanice. Obzirom na veličinu i kompleksnost građe, postoje dva glavna tipa živih stanica: prokariotske i eukariotske.

1.1. Prokariotske žive stanice

Prokarioti su mali jednostanični organizmi, obično manji od 1 μm (10^{-6} m), a općenito ne veći od 3 μm . Imaju jednostavnu strukturnu organizaciju. Nemaju jezgru i nedostaju im mnoge membranske strukture koje se nalaze u složenijim staničnim tipovima. Tri su glavne skupine prokariota: bakterije, mikoplazme i modrozelenne alge.

1.2. Eukariotske žive stanice

Eukariotske stanice su veće i kompliciranije od prokariotskih. Ove stanice su prisutne u višim biljnim i životinjskim organizmima. Bitna razlika od prokariotskih stanica je što one sadrže jezgru u kojoj je nasljedna tvar vezana uz kromosome. Jezgrina membrana ima mnogo pora kroz koje se vrši izmjena tvari između jezgre i citoplazme.

1.3. Važnije stanične komponente

Da bi mogli govoriti o biokemijskim procesima i funkciji bakterijske, biljne ili životinjske stanice, potrebno je poznavati njihove podstanične komponente. Među glavne podstanične komponente ubrajaju se:

1.3.1. Stanična membrana. Sve podstanične komponente se nalaze unutar stanične membrane koja ima vitalnu ulogu kod prolaza hrane u stanicu i uklanjanja nepotrebnih tvari. Po kemijskom sastavu membrana sadrži mnogo lipida i proteina. Proteini su uglavnom integralni dio membrane odgovoran za transport tvari. Oni u staničnoj membrani grade ultramikroskopske pore, a o veličini tih pora ovisi koje molekule mogu proći kroz membranu.

1.3.2. Citoplazma. Citoplazma je vodena faza unutar stanične membrane koja sadrži otopine raznih makromolekula. Npr. mnogi enzimi se nalaze u citoplazmi. Citoplazma je inače potpora staničnim organelama kao što su jezgra i mitohondrije. Odlikuje se neobičnim svojstvom da može nastupiti kao tekućina i da se može elastično izobličiti kao kruto tijelo. U citoplazmi se odvijaju dvije važne funkcije: pretvorba kemijske energije u rad i biosinteza proteina.

1.3.3. Jezgra. Kao što samo ime kaže, jezgra je središnja i vrlo bitna stanična organela kod eukariotskih stanica. Odvojena je od citoplazme dvostrukim slojem jezgrine membrane koja regulira kretanje tvari u jezgru i izvan nje. Značenje jezgre u metabolizmu stanice može se vidjeti ako umjetno otklonimo jezgru. Tada važne aktivnosti stanice prestanu, nema diobe i konačno stanica ugiba. Poznato je da se u jezgri nalazi i umnožava veći dio nasljedne tvari koja se nalazi u kromosomima. Kromosomi su sastavljeni od DNA i proteina. Jezgra sadrži jednu ili više malih okruglih jezgrića koje imaju važnu ulogu kod sinteze RNA molekula.

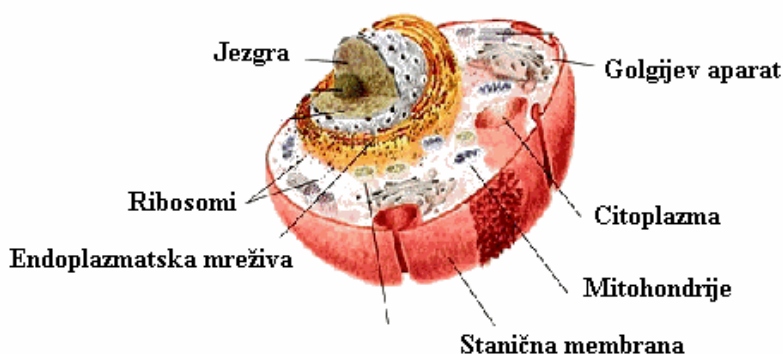
1.3.4. Mitohondrije. Mitohondrije su kompleksne stanične organele izduženog oblika. Najvažnija im je funkcija produkcija potrebne energije u obliku molekula ATP, tj. fosfatne skupine koja se veže na ADP s visokim energijskim potencijalom. Mitohondrije često nazivaju energetske centralne stanice. U njima se proizvodi oko 95% molekula ATP u životinjskim stanicama. U biljnim stanicama postotak je manji jer se ATP proizvodi u kloroplastima. Tekućina unutar mitohondrija sadrži proteine, neutralne lipide, nukleinske kiseline i enzime potrebne za funkcioniranje ciklusa limunske kiseline.

1.3.5. Ribosomi i endoplazmatska mrežica. Ribosomi su sićušne citoplazmatske tvorbe (0,15 - 20 nm) na kojima se sintetiziraju proteini. Mogu biti slobodni u citoplazmi ili vezani za endoplazmatsku mrežicu. Endoplazmatska mrežica koja sadrži ribosome je grubog, granularnog sastava, za razliku od glatke endoplazmatske mrežice koja ne sadrži ribosome.

1.3.6. Golgijev aparat. Golgijev aparat je otkriven nakon primjene elektronskog mikroskopa. Oblik Golgijevog aparata je složen i izgleda kao niz međusobno povezanih cjevčica, mjehurića i cisterni. Cisterne su prostori obavijeni membranom u koje se mogu gomilati različite tvari i izlučevine. Mnogobrojne cisterne su međusobno vezane i izgledaju kao skupovi lamela. Golgijev aparat je često vezan uz staničnu membranu, tako da preko membranskih pora sudjeluje u transportu tvari proizvedenih u podstaničnim organelama.

1.4. Kemijska aktivnost stanice

Kemijska aktivnost čitave stanice, u smislu njenog rasta, održavanja i obnove sačinjava proces metabolizma. U stanicama dolazi do kataboličkog razgrađivanja proteina, masti i šećera iz hrane. Oslobođena energija se pretvara u kemijsku energiju u obliku ATP, zatim, u kinetičku energiju za pokretanje mišića i toplinu za održavanje tjelesne temperature. Pored energije, u kataboličkim procesima stanice dolazi do nastajanja jednostavnih molekula. Anabolički procesi u stanici su oni kod kojih jednostavnije molekule međusobnim udruživanjem grade kompleksnije makromolekule, a kao rezultat dolazi do stvaranja novog staničnog materijala i do rasta stanice.

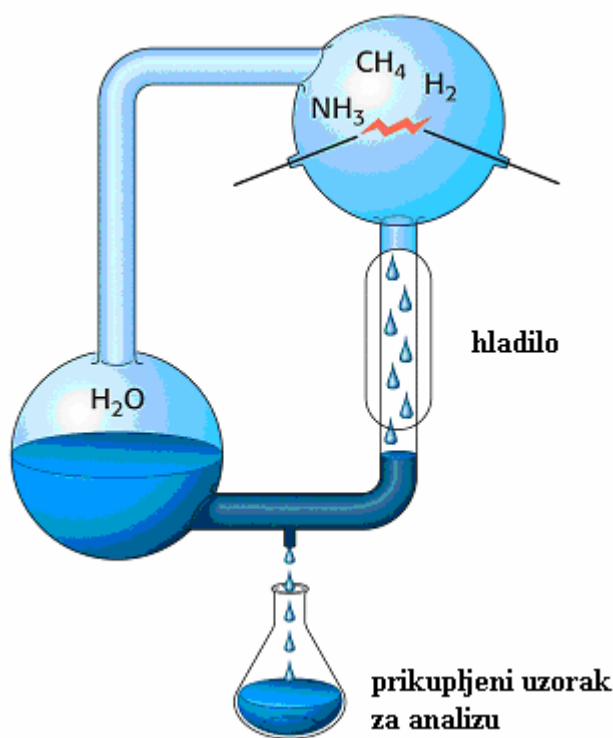


2. POGLAVLJE

BIOMOLEKULE

Fizičari su znanstvenim metodama proračunali da je svemir star 15-20 milijardi godina. Iz sadašnje slike svemira i opažanja da se svemir širi, zaključeno je da je svemir nastao velikom eksplozijom ("big bang"). Sunčev sustav je nastao prije približno 4,5-5 milijardi godina, a prve organske molekule na Zemlji, pretpostavlja se, prije 3,5-3,8 milijardi godina. Zemljina praatmosfera se sastojala od vodika, koji je kao najlakši element izmakao djelovanju sile teže. Vulkani su neprestano izbacivali plinove koji su mijenjali prvobitnu atmosferu. Praatmosfera nije sadržavala kisik, već uglavnom H_2 , CH_4 , NH_3 i H_2O .

Ruski znanstvenik Oparin (1936.) pretpostavio je da su prve organske molekule nastale abiotički, bez sudjelovanja živih organizama. Američki istraživač Miller (1953.) potvrdio je ovu opasku poznatim Millerovim pokusom.



Millerov pokus

On je u laboratoriju oponašao uvjete praatmosfere. Smjesu vodene pare, metana, amonijaka i vodika izložio je električnim pražnjenjima i djelovanju UV-zraka. Mješavina se smeđe obojila. Kemijske analize kondenzata dokazale su postojanje različitih malih organskih molekula, između ostalog aminokiselina i nukleotida. Dakle, Millerov pokus je dokazao da su male organske molekule mogle nastati prije nego li su postojali živi organizmi.

2.1. Molekulska osnova živih organizama

Organski spojevi ili biomolekule u živim organizmima su veoma raznoliki i vrlo kompleksni. Npr. jedna jedina stanica neke bakterije sadrži oko 5000 različitih biomolekula.

Da bi izolirali, identificirali ili sintetizirali tako različite biomolekule iz živih organizama, biokemičari bi imali nepremostive probleme, ali se priroda "pobrinula" i "pojednostavila" te probleme. Tako su mnoge makromolekule (proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi itd.) izgrađene od veoma malog broja jednostavnih biomolekula. Npr. svi proteini su izgrađeni od 20 aminokiselina, dok su nukleinske kiseline izgrađene od samo četiri različita prekursora koji se međusobno povezuju i stvaraju raznolike nukleinske kiseline.

Postoji nekoliko principa u molekulskoj logici živih organizama:

- * postoji osnovna jednakost u strukturi biomolekula,
- * sva živa bića koriste iste prekursore za izgradnju makromolekula,
- * sve biomolekule imaju specifičnu funkciju u stanici,
- * identitet živih bića je zaštićen posjedovanjem, na svojstven način, izgrađenih, makromolekula
- * biomolekule koje se ne mogu sintetizirati u živom organizmu moraju se unijeti s hranom.

2.2. Osnovni sastojci žive tvari

2.2.1. Bioelementi. Samo 27 od 92 prirodna elementa imaju bitnu ulogu za različite forme života. Osnovni elementi žive tvari su C, H, O, N, P i S, zatim ioni Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} i Cl^- , dok se Fe, Cu, Zn i ostali elementi nalaze u tragovima.

2.2.2. Biomolekule. Sve biomolekule mogu se promatrati kao derivati ugljikovodika. Jedan ili više vodikovih atoma mogu biti zamijenjeni različitim funkcijskim skupinama koje karakteriziraju različite vrste biomolekula:

<u>Funkcijska skupina</u>	<u>Struktura</u>	<u>Vrsta biomolekule</u>
Hidroksilna	R-OH	Alkoholi
Aldehidna	R-CHO	Aldehidi
Keto	$\text{R}_1\text{-CO-R}_2$	Ketoni
Karboksilna	R-COOH	Kiseline
Amino	R-NH ₂	Amini
Amido	R-CO-NH ₂	Amidi
Tiolna	R-S-H	Tioli
Esterska	$\text{R}_1\text{-COO-R}_2$	Esteri
Eterska	$\text{R}_1\text{-O-R}_2$	Eteri

Biomolekule mogu imati više funkcijskih skupina istovremeno kao što je slučaj kod aminokiselina ili šećera. Svaka funkcijska skupina u biomolekulama čini ih kemijski reaktivnijima od polaznog zasićenog ugljikovodika. Funkcijske skupine utječu na raspored elektrona i na geometriju susjednih atoma i na taj način povećavaju kemijsku reaktivnost biomolekule u cjelini.

2.3. Preteče

Preteče su osnovne, jednostavne molekule koje svojim povezivanjem izgrađuju složenije i kompleksnije makromolekule. Postoji nekoliko tipičnih preteča od kojih su izgrađeni proteini, nukleinske kiseline, šećeri i masti:

2.3.1. Preteče proteina. Preteče koje izgrađuju proteine su aminokiseline. Sve aminokiseline posjeduju najmanje po jednu amino i karboksilnu skupinu, a međusobno se razlikuju u dijelu molekule gdje se veže različita R-skupina. U sastav proteina ulazi 20 različitih aminokiselina

2.3.2. Preteče nukleinskih kiselina. Nukleinske kiseline su nastale polimerizacijom deoksiribonukleotida u DNA, odnosno ribonukleotida u RNA. Svaki nukleotid je izgrađen od tri karakteristična preteča: dušikova organska baza (pirimidinska ili purinska), šećer pentoza (riboza ili deoksiriboza) i fosforna kiselina

2.3.3. Preteče masti. Masti su izgrađene od glicerola i više-masnih kiselina.

2.3.4. Preteče šećera. Osnovna preteča je α -D-glukoza.

2.4. Kemijske veze među biomeolekulama

2.4.1. Ionska veza. Atomi s nepopunjenom valentnom elektronskom orbitalom primaju elektrone koje otpuštaju atomi koji u vanjskoj orbitali posjeduju malo elektrona.

2.4.2. Kovalentna veza. Ovaj tip veze nastaje tako što dva atoma dijele zajednički elektronski par, tako da preklapanjem atomskih orbitala nastaju molekulske orbitale, a atomi se udružuju u molekule.

2.4.3. Nekovalentne veze. Takve veze nastaju između atomskih grupa, a da se pri tom ne preklapaju njihove atomske orbitale. To su vodikove, hidrofobne i Van der Walsove veze.

Vodikove veze se stvaraju između neke HO-grupe ili HN-grupe i slobodnog elektronskog para atoma kisika, odnosno atoma dušika, ako se približe na udaljenost od 0,28 nm. Energija vodikove veze je 1/10 kovalentne veze. Imaju bitnu ulogu za stabiliziranje prostornog uređenja makromolekula.

Hidrofobne veze nastaju kada se ugljikovodične skupine nalaze u vodenoj sredini. Dolazi do poremećaja u strukturi vode jer se "kidaju" vodikove veze. Poremećaj je manji ako se dvije ili više ugljikovodičnih skupina toliko približe da između njih više ne postoje molekule vode. Hidrofobno istiskivanje vode rezultira grupiranjem ugljikovodičnih skupina.

Van der Walsove veze nastaju djelovanjem jezgre i elektrona atoma iz jedne molekule na jezgre i elektrone atoma iz druge molekule. Ravnoteža između privlačnih sila i sila odbijanja drže molekule na određenoj udaljenosti. Svako primicanje ili odmicanje molekula zahtijeva utrošak energije. Elektroni između atoma nisu ravnomjerno udaljeni, te često dolazi do stvaranja dipola u molekulama. Uslijed različite elektronegativnosti takve molekule se međusobno privlače ili odbijaju adekvatnim silama pa tako nastaju veze dipol-dipol.

Kemijske veze direktno utječu na molekulsko ustrojstvo žive stanice. U malim molekulama i primarnim strukturama makromolekula sudjeluju kovalentne veze, dok u

sekundarnim i tercijarnim strukturama makromolekula, kao i njihovom udruživanju u kvarterne strukture i stanične organele uglavnom sudjeluju nekovalentne veze.

2.5. Voda

Kemijske veze kisika u vodi su međusobno pod kutom od 104° , pa je molekula vode zakrivljena. Kako atom kisika na sebe privlači elektrone s vodika, nastaje dipolni moment, tj. atomi kisika postaju negativniji, a vodikovi atomi pozitivnije nabijeni. Polarizacija molekule vode omogućava stvaranje vodikovih veza, koje dovode do asocijacija molekula vode, pa je opću formulu vode pravilnije pisati u obliku $(\text{H}_2\text{O})_n$.

2.5.1. Anomalije vode. Zbog vodikovih veza voda u usporedbi sa H_2S ili H_2Se ima mnoge neobične osobine. U usporedbi s navedenim spojevima, voda bi trebala imati ledište na -150°C a vrelište na -80°C . Upravo anomalije vode uslijed vodikovih veza igraju bitnu ulogu za nastajanje i održavanje života na zemlji, prije svega što je voda u tekućem stanju pri normalnim atmosferskim uvjetima. Visoka toplina isparavanja vode je također posljedica vodikovih veza, ali igra bitnu ulogu u živim organizmima, npr. olakšava odvođenje topline pri procesima znojenja. Voda je izvrsno otapalo i za anorganske i za organske spojeve. Pri otapanju može doći do potpunog disociranja soli u ione, dok karboksilne kiseline najčešće samo djelomično disociraju. Po topljivosti u vodi razlikuju se hidrofilne (aminokiseline, šećeri, nukleinske kiseline) i hidrofobne (masti i lipidi) vrste spojeva.

2.5.2. Reakcije s vodom. Voda može biti reaktant ili produkt neke kemijske reakcije. Prilikom nastajanja makromolekula proteina i nukleinskih kiselina, formalno se sastojci povezuju uz odcjepljenje vode. Hidrolizom se makromolekule mogu opet razložiti na sastavne dijelove. Konačno najvažnija reakcija koja upravo omogućava život na zemlji je cijepanje vode energijom svjetlosti pri fotosintezi i obratna reakcija, nastajanja vode pri sagorijevanju hranljivih sastojaka i dobivanja energije u aerobnim organizmima.

2.5.3. pH - vrijednost vodenih otopina. Sorensen (1909) uveo je pH vrijednost koju je definirao kao negativni logaritam koncentracije vodikovih iona

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

U skladu s tim danas se upotrebljava simbol pOH koji naznačuje negativni logaritam koncentracije hidroksid iona $\text{pOH} = -\log[\text{OH}^-]$, te simbol pK kao negativni logaritam konstante ravnoteže $\text{pK} = -\log K$. Odnosno, za ionski produkt vode vrijedi izraz:

$$\text{pH} + \text{pOH} = \text{pK}_w.$$

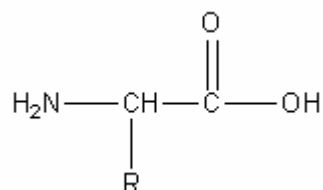
Vrijednost pK_w na 25°C iznosi 14, što znači da čistoj vodi na 25°C u kojoj je koncentracija H^+ iona 10^{-7} mol/l pripada vrijednost $\text{pH} = 7$ (neutralna vrijednost pH). Otopine s $\text{pH} < 7$ smatraju se kisele, a s $\text{pH} > 7$ lužnate.

U biokemiji je pojam pH vrlo važan jer mnogi procesi u živim organizmima jako ovise o koncentraciji H^+ iona, tj. pH vrijednosti. U ekstracelularnom prostoru i krvnoj plazmi pH je jednak 7,4, tu je koncentracija H^+ iona izrazito stalna i normalan raspon je između $\text{pH} = 7,35 - 7,45$. Vanstanične tekućine imaju pH vrijednosti koje mogu znatno odstupati: želučani sok ($\text{pH} 1,5 - 3,0$), sadržaj tankog crijeva (pH oko 8) ili mokraća (pH oko 5).

3. POGLAVLJE

AMINOKISELINE

Aminokiseline koje izgrađuju proteine u kemijskom sastavu imaju amino skupinu, karboksilnu skupinu, vodikov atom i različitu R skupinu vezane na α -ugljičkov atom. Ovaj ugljikov atom je kod svih aminokiselina asimetričan tj. kiralan (na svakoj vezi ima drugačiju skupinu) izuzev glicina. Kod glicina, najjednostavnijeg predstavnika aminokiselina, na α -ugljičkov atom vezana su dva vodikova atoma pa stoga on nije asimetričan.



opća formula

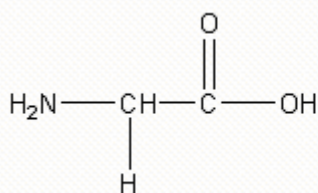
Svi proteini u svim živim organizmima izgrađeni su od dvadeset različitih L-aminokiselina. Različitost je uvjetovana sa dvadeset vrsta R skupina u sastavu aminokiselina. Aminokiseline uglavnom nose imena prema tvari iz koje su prvi put izolirane, a često se označavaju skraćenim simbolima od tri slova ili samo jednim slovom.

Pored toga što aminokiseline izgrađuju proteine, one imaju i druge važne funkcije u živim organizmima. U metabolizmu se mogu različito mijenjati i davati važne ishodne spojeve za izgradnju i drugih bitnih spojeva za život jednog organizma.

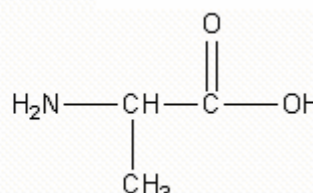
3.1. Klasifikacija aminokiselina prema R skupini

Prema R skupini, odnosno njezinoj tendenciji reagiranja s vodom na $\text{pH} = 7$, aminokiseline dijele se u četiri skupine: 1. nepolarne ili hidrofobne R skupine, 2. polarne i električki nenabijene skupine, 3. polarne i negativno nabijene skupine, 4. polarne i pozitivno nabijene skupine.

3.1.1. Nepolarne ili hidrofobne aminokiseline. *Glicin* je najjednostavnija aminokiselina (nalazi se u skleroproteinima). *Alanin* se može formalno shvatiti kao ishodni spoj za sve ostale aminokiseline jer zamjenom jednog ili oba vodika u metilnoj skupini s nekim drugim ostatkom nastaju strukturne formule ostalih aminokiselina.

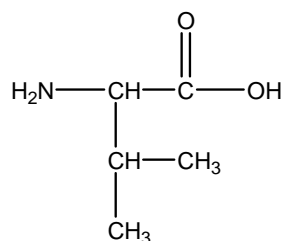
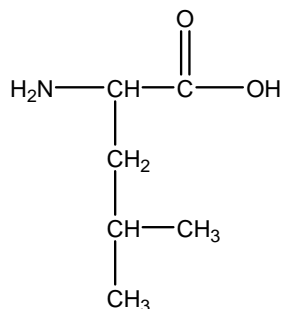
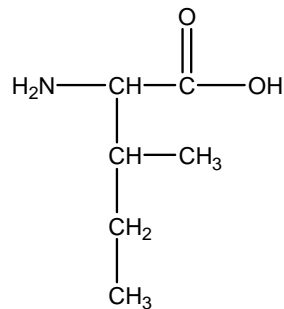


glicin ($M_r = 75$)

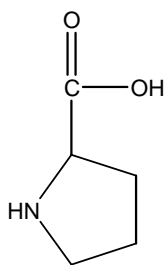
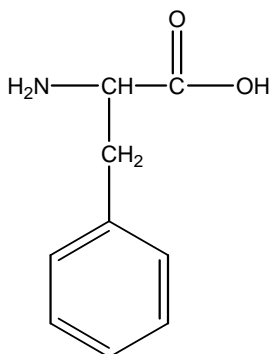
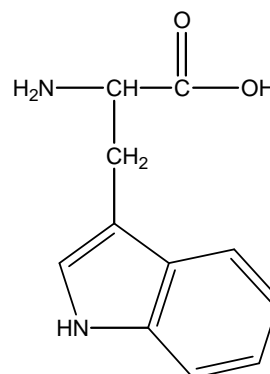


alanin ($M_r = 89$)

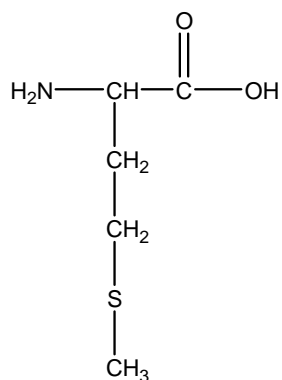
Valin, leucin i izoleucin imaju razgranat ugljikov skelet. Kemijski su vrlo slični pa se vrlo teško međusobno odjeljuju.

valin ($M_r = 117$)leucin ($M_r = 131$)izoleucin ($M_r = 131$)

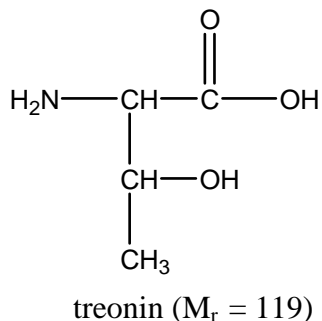
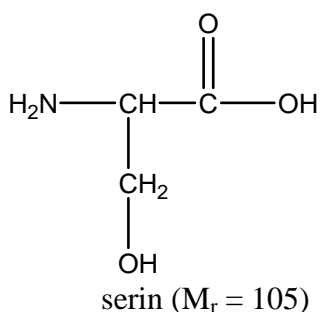
Prolin koji se često nalazi u proteinskim hidrolizatima je cikličke građe. Dušikov atom u α - položaju uključen je u prsten, pa stoga nije primarni nego sekundarni amin. *Fenilalanin* sadrži jedan aromatski prsten. Fenilalanin je u tijesnoj vezi s tirozinom, koji spada u polarne i električki nenabijene aminokiseline. *Triptofan* je heterociklička aminokiselina koja posjeduje indolni prsten.

prolin ($M_r = 115$)fenilalanin ($M_r = 165$)triptofan ($M_r = 204$)

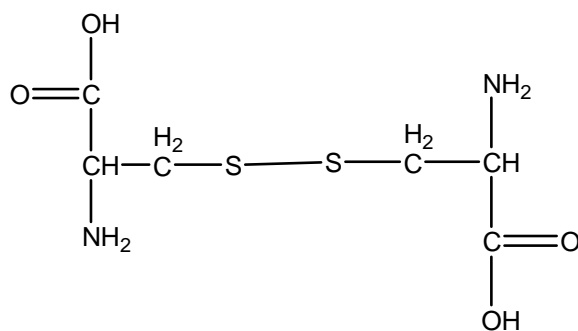
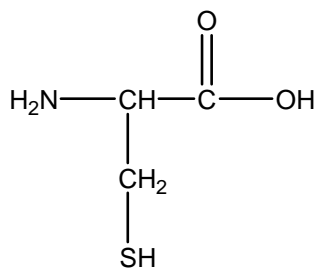
Metionin pored toga što ulazi u sastav proteina važan je i kao donor metilne skupine.

metionin ($M_r = 149$)

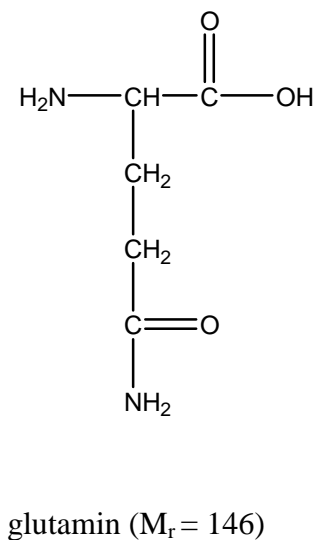
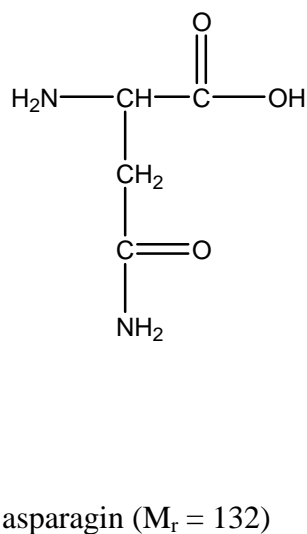
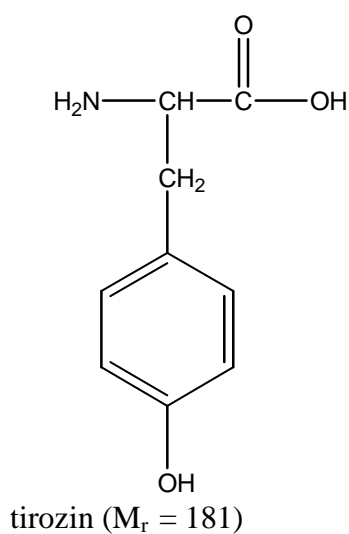
3.1.2. Polarne ali električki nenabijene aminokiseline. U ovoj skupini ima šest aminokiselina: *Serin* sadrži jednu hidrosilnu skupinu koja pokazuje uobičajene reakcije alkohola, npr. stvaranje estera s kiselinama. *Treonin* je viši homolog serina. Posjeduje dva asimetrična C atoma, pa stoga može postojati u četiri stereoisomera.



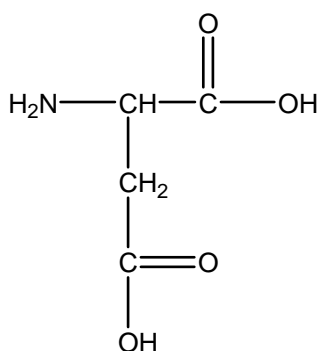
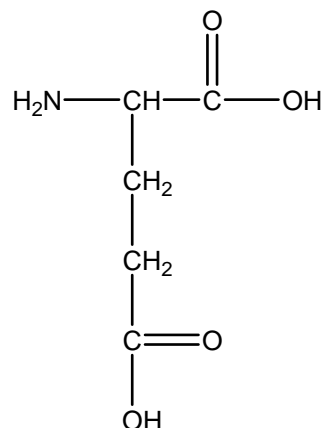
Cistein sadrži sumpor. SH skupina prilično je reaktivna i može lagano dehidrirati. Pri tome se dvije molekule povezuju u *cistin*, a takvo povezivanje preko S - S veze susreće se u mnogim proteinima (disulfidna veza).



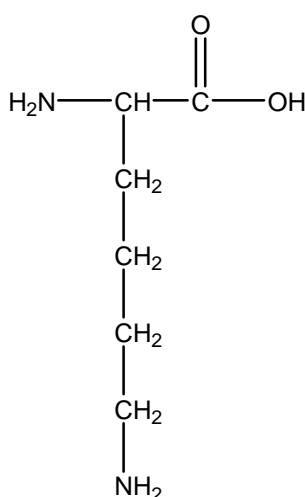
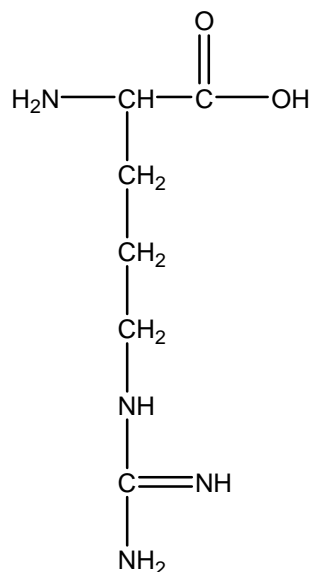
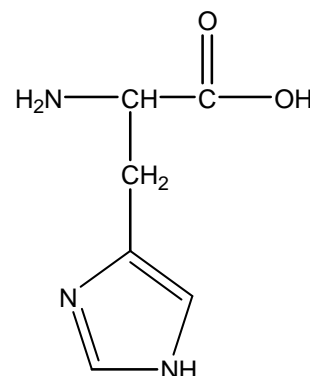
Tirozin posjeduje fenolnu OH skupinu koja ima slabo kisela svojstva. *Asparagin* i *glutamin* posjeduju kiselu amidnu grupu koja im daje hidrofilna svojstva.



3.1.3. Polarne i negativno nabijene skupine. *Asparaginska i glutaminska* kiselina na bočnom lancu imaju još jednu karboksilnu skupinu kojoj proton lagano disocira. Zbog toga nastaju daljnji negativni naboji. Ova svojstva znatno utječu na elektrokemijska svojstva proteina bogatih asparaginskom i glutaminskom kiselinom.

asparaginska kiselina ($M_r = 133$)glutaminska kiselina ($M_r = 147$)

3.1.4. Polarne i pozitivno nabijene aminokiseline. U ovu skupinu ubrajaju se tri aminokiseline koje se odlikuju bazičnom skupinom na pobočnom lancu i stoga djeluju kao lužine. *Lizin* posjeduje slobodnu amino skupinu na pobočnom lancu.

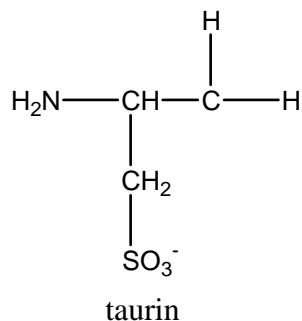
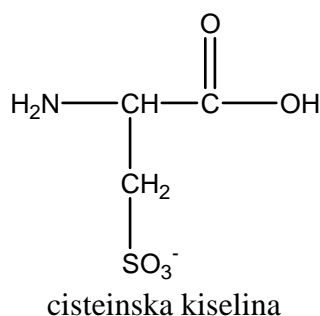
lizin ($M_r = 146$)arginin ($M_r = 124$)histidin ($M_r = 155$)

Arginin posjeduje gvanidino skupinu koja ima jača bazna svojstva od pobočne amino skupine lizina. *Histidin* sadrži imidazolni prsten koji kod mnogih enzima djeluje kao donator i akceptor protona.

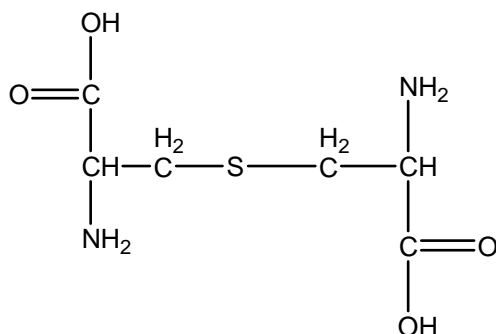
3.2. Aminokiseline koje ne ulaze u sastav proteina

Osim dvadeset aminokiselina koje izgrađuju proteine, u prirodi ima i drugih aminokiselina. One postoje kao slobodne u biljnim i životinjskim tkivima, ili vezane u jednostavnim peptidima ili su pak međuprodukti metabolizma. Npr. aminokiseline sa

sumporom, koje su u vezi s cisteinom i metioninom. *Cisteinska kiselina* i njezin produkt dekarboksilacije *taurin*.

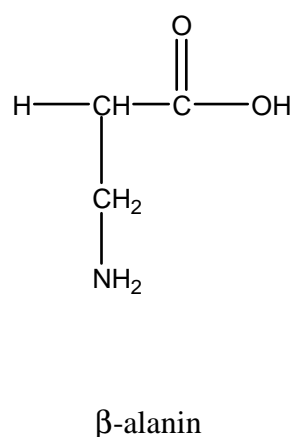
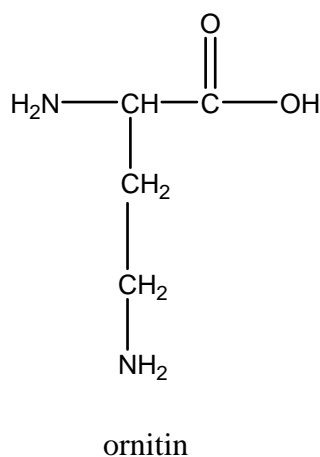


Lantionin ima jedan S atom manje od cistina. Izoliran je iz hidrolizata vune.



lantionin

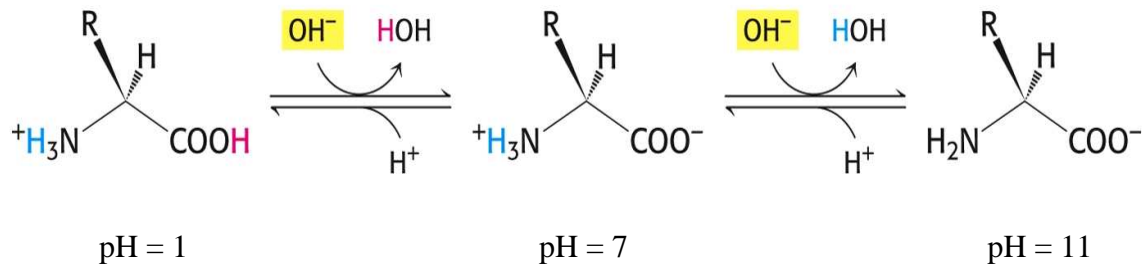
Neke aminokiseline nastaju metaboličkim transformacijama "običnih" aminokiselina. To su npr. *ornitin* iz arginina ili *β-alanin* iz asparaginske kiseline.



3.3. Aminokiseline kao dvopolni ioni

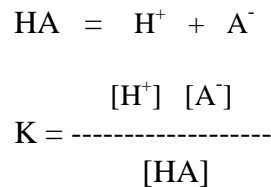
Aminokiseline su ionizirane pri neutralnom pH, i u otopinama se nalaze kao dvopolni ioni (Zwiter-ioni). Kad je aminokiselina u dvopolnom obliku, njezina amino-skupina je

protonirana ($-\text{NH}_3^+$), a karboksilna skupina je disocirana ($-\text{COO}^-$). Ionizacijsko stanje aminokiselina mijenja se sa pH.



Zbog svoje dipolnosti aminokiseline se ponašaju kao puferi i imaju karakteristične titracijske krivulje. Zbog ovih osobina aminokiseline igraju vrlo važnu ulogu u održavanju neutralne vrijednosti pH u živim organizmima.

3.3.1. Titracijske krivulje. Disociranje kiselih i baznih skupina aminokiselina podložna je zakonu o djelovanju masa jednako kao i disociranje slabih kiselina i baza.



Svaka skupina ima svoju konstantu disociranja K , kojoj se negativni logaritam označava kao pK vrijednost. Henderson-Hasselbalchova jednačba prikazuje samo drugačiji izraz konstante disociranja. Prvo se traži rješenje za $[\text{H}^+]$

$$[\text{H}^+] = K \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Zatim se uzima negativan logaritam s obje strane jednačbe

$$-\log [\text{H}^+] = -\log K - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Zamijeni se pH umjesto $-\log [\text{H}^+]$ i pK umjesto $-\log [\text{HA}]/[\text{A}^-]$ i dobije se

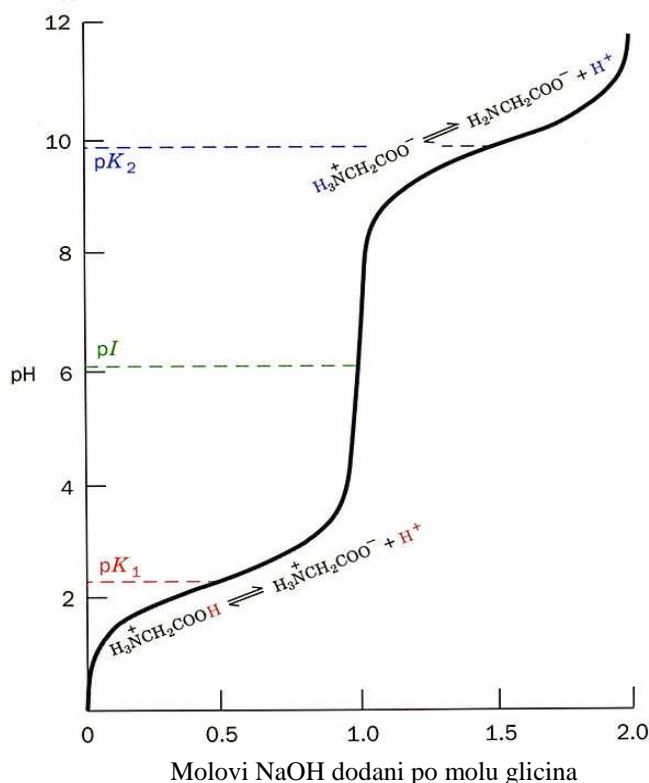
$$\text{pH} = \text{pK} - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Ako se sada izvrši inverzija $-\log [\text{HA}]/[\text{A}^-]$, promijenit će se predznak i dobiti Henderson-Hasselbalchova jednačba

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Henderson-Hasselbalch-ova jednačba je vrlo praktična za izračunavanje pH vrijednosti koje se uspostavljaju u smjesama soli i kiselina. Pufere imaju osobinu da vežu H^+ -ione (i OH^- ione) i tako ublažavaju promjene pH koje nastaju dodatkom kiselina, odnosno lužina. Kao puferske smjese općenito služe slabe kiseline ili slabe baze u smjesi sa svojim solima. Njihovo pufersko djelovanje najbolje je u području pK vrijednosti.

Aminokiseline se također ponašaju kao pufere. Karboksilna skupina aminokiselina može kao kisela grupa disociranjem osloboditi H^+ -ione, dok bazična amino skupina prima H^+ -ione. Kad su obje skupine disocirane dobivamo dipolarni ion. Za mnoge je svrhe praktično prikazati disociranje aminokiselina titracijskom krivuljom. Titracija se vrši kiselinom ili lužinom. Postignuta pH vrijednost se unosi kao funkcija dodane količine kiselina, odnosno lužine. Aminokiseline posjeduju dvije ili tri pK vrijednosti. Npr. glicin ima samo karboksilnu i amino skupinu u svom sastavu, pa stoga posjeduje samo dvije pK vrijednosti. Histidin, pored karboksilne i amino skupine, posjeduje još jednu lužnatu skupinu na pobočnom lancu, pa posjeduje ukupno tri pK vrijednosti.



3.3.2. Izoelektrična točka. Izoelektrična točka predstavlja pH pri kojem je molekula aminokiseline električki neutralna i ne može se kretati u električnom polju. Matematički gledano, izoelektrična točka je aritmetička srednja vrijednost dviju konstanti ionizacije; kiselog i bazičnog oblika.

$$pH_I = (pK_{+1,0} + pK_{-1,0}) / 2$$

- $pK_{+1,0}$ je vrijednost konstante ionizacije između oblika aminokiseline u +1 stanju i stanja kada je ukupan naboj aminokiseline 0;

- $pK_{-1,0}$ je vrijednost konstante ionizacije između oblika aminokiseline u -1 stanju i stanja kada je ukupan naboj aminokiseline 0.

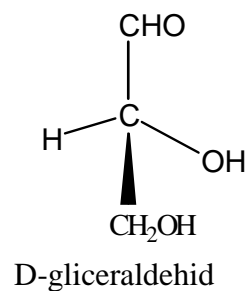
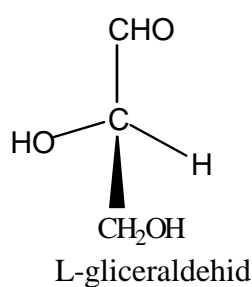
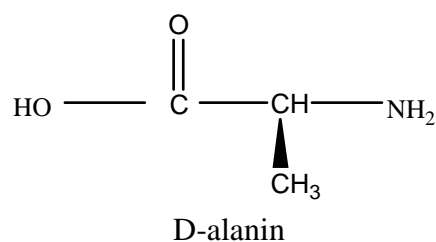
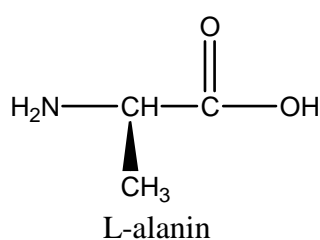
3.3.3. pK vrijednosti funkcijskih skupina. Svakoj funkcijskoj skupini odgovara njena konstanta disocijanja. Vrijednosti pK kiselinske skupine su u intervalu 1,7-2,6. Za amino skupinu, pK vrijednosti se kreću u intervalu 8,9-10,6. Različite R skupine imaju vrlo različite pK vrijednosti.

Aminokiselina	pK ₁ -COOH	pK ₂ -NH ₃	pK ₃ R-grupa
Glicin	2,34	9,60	
Alanin	2,34	9,69	
Leucin	2,36	9,60	
Serin	2,21	9,15	
Treonin	2,63	10,43	
Glutamin	2,17	9,13	
Asparaginska kiselina	2,09	9,82	3,86
Glutaminska kiselina	2,17	9,67	4,25
Histidin	1,82	9,17	6,00
Cistein	1,71	10,78	8,33
Tirozin	2,20	9,11	10,07
Lizin	2,18	8,95	10,53
Arginin	2,17	9,04	12,48

3.4. Optička aktivnost aminokiselina

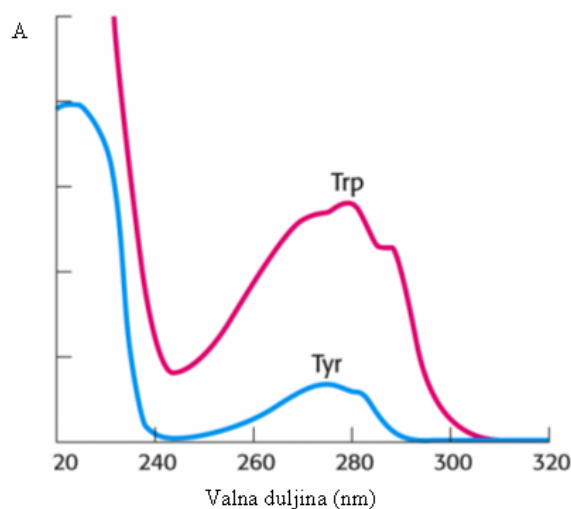
3.4.1. Zakretanje polarizirane svjetlosti. Sve aminokiseline izuzevši glicin sadrže asimetričan ugljikov atom. Poznato je u organskoj kemiji da molekule koje sadrže asimetričan ugljikov atom posjeduju sposobnost zakretanja polarizirane svjetlosti u polarimetru. Takve tvari se nazivaju optički aktivnim.

Molekule koje su optički aktivne posjeduju asimetričan ugljikov atom te mogu imati dvije različite forme u prostoru kao neki predmet gledan u zrcalu.

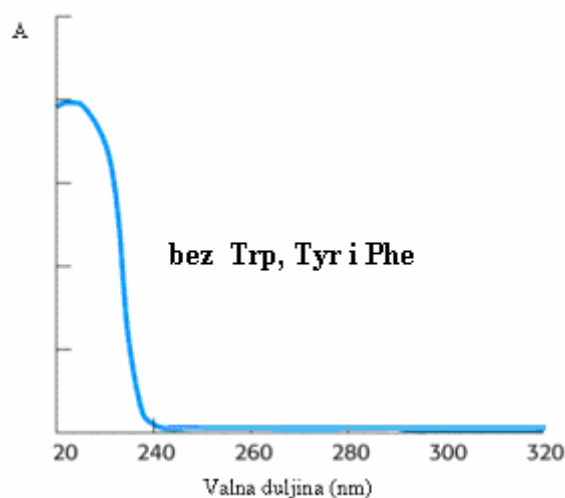


Takve dvije forme su optički izomeri-enantiomeri, a označavaju se velikim slovima L i D. Predznak L, odnosno D, za sve molekule koje posjeduju asimetričan ugljikov atom određen je konvencijom prema odgovarajućoj formi L-gliceraldehida, odnosno D-gliceraldehida. Predznak L i D ne zavise od toga je li neka molekula zakreće polariziranu svjetlost u lijevo ili desno. U tu svrhu koriste se oznake (-) i (+) ili mala slova (l) i (d). Ako u otopini imamo ekvimolarne koncentracije L i D izomera, tada ta otopina neće zakretati polariziranu svjetlost u polarimetru. Takve smjese nazivaju se racemičnim ili jednostavno racematima.

3.4.2. Apsorpcija u UV/VIS području elektromagnetnog zračenja. Sve aminokiseline apsorbiraju svjetlost u dalekom UV području (manjem od $\lambda = 220$ nm) što nema velikog značaja za eksperimentalna istraživanja. Dimer cisteina (cistin) apsorbira na $\lambda = 240$ nm, te omogućava dokazivanje disulfidne veze u nekom peptidnom lancu. Fenilalanin apsorbira na $\lambda = 260$ nm, a tirozin i triptofan imaju maksimum apsorpcije na $\lambda = 280$ nm.

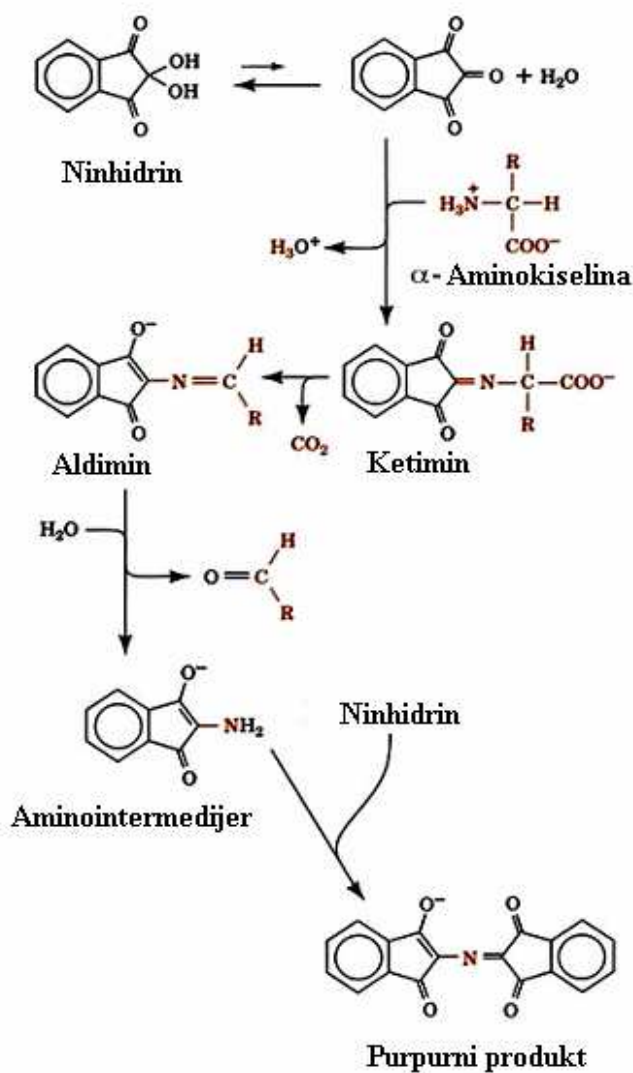


Budući da svi proteini u svom sastavu imaju manje ili više tirozina i triptofana ovo interesantno svojstvo se može iskoristiti za kvantitativno spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina pri valnoj duljini $\lambda = 280$ nm, ali i za kvalitativno određivanje proteina koji u svome sastavu nemaju aminokiseline tirozin, triptofan i fenilalanin.

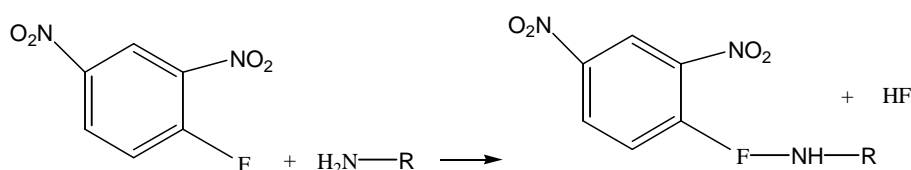


3.5. Karakteristične kemijske reakcije aminokiselina

3.5.1. Ninhidrinska reakcija. Ninhidrinska reakcija se koristi za detekciju i određivanje koncentracije aminokiselina. Ova reakcija je veoma osjetljiva pa se kolorimetrijski mogu vrlo precizno odrediti i vrlo male koncentracije aminokiselina.



3.5.2. Reakcija s 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenom. Spoj 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen, poznat kao Sangerov reagens, reagira sa slobodnom amino skupinom u aminokiselini, pri čemu nastaje žuto obojena dinitrofenil aminokiselina koju je lako kromatografski identificirati i spektrofotometrijski kvantitativno odrediti pri valnoj duljini $\lambda = 360 \text{ nm}$. Ova reakcija je vrlo bitna za određivanje proteinskih struktura.



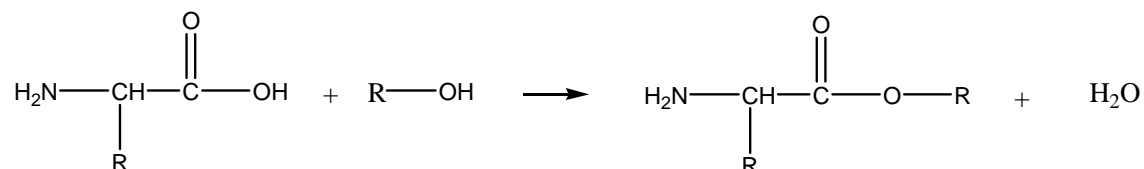
3.6. Opće kemijske reakcije aminokiselina

Opća kemijska svojstva aminokiselina su povezana prisutnošću karboksilne i amino skupine, s druge strane prisutnost reaktivnog R ostatka objašnjava specifična svojstva pojedinih aminokiselina. Reagirajući s dvije funkcijske skupine aminokiseline stvaraju karakteristične derivate.

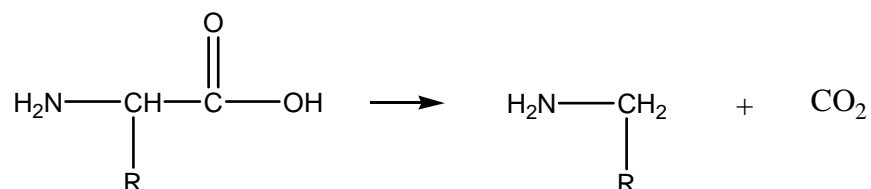
3.6.1. Svojstva povezana s karboksilnom skupinom

Prisutnost karboksilne skupine daje aminokiselinama svojstva organskih kiselina:

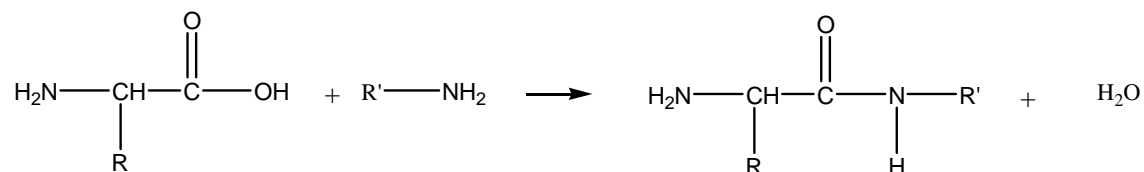
a) Esterifikacija s alkoholima u prisutnosti jakih kiselina. Esteri aminokiselina su tekućine koje mogu destilirati pod smanjenim tlakom. Tijekom vremena uglavnom polimeriziraju ili kondenziraju gradeći ciklične amide.



b) Reakcija dekarboksilacije i nastajanje amina. Dekarboksilacija je moguća kemijskim putem ili enzimski (enzimi dekarboksilaze).



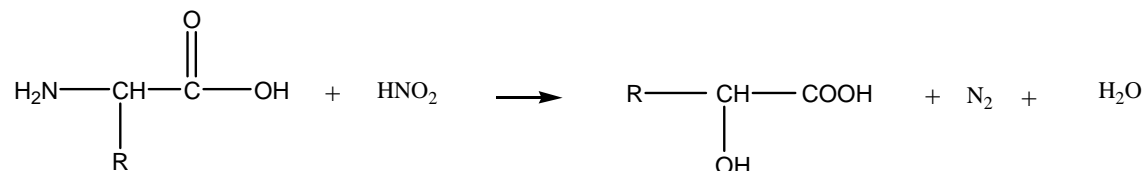
c) Stvaranje amida. Stvaranje amida je rezultat reakcije aminokiseline s aminom.



Ove reakcije imaju posebnu važnost ako amin potiče od druge aminokiseline. Tada nastaje peptidna veza.

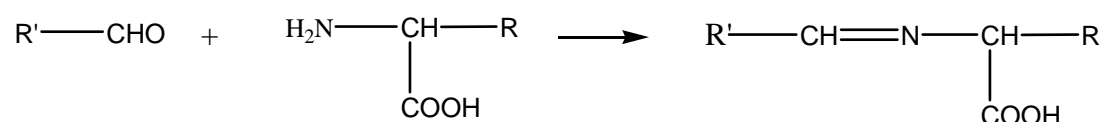
3.6.2. Svojstva povezana s amino skupinom

a) **Dezaminacija.** Djelovanjem nitratne kiseline dolazi do dezaminacije aminokiseline uz stvaranje odgovarajuće kiseline - alkohola i oslobađanje dušika.

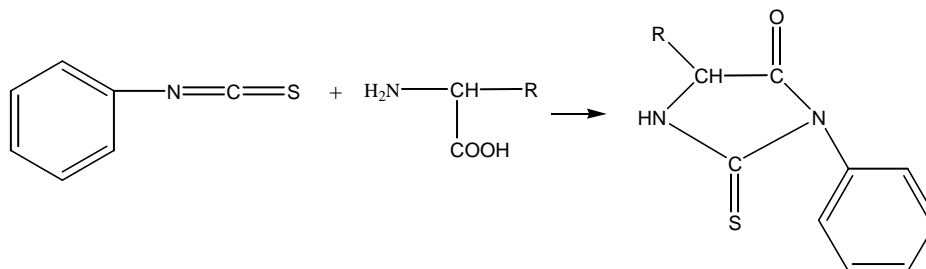


Mjerenjem oslobođenog dušika moguće je određivanje koncentracije aminokiselina.

b) **Stvaranje imina.** Kondenzacijom aromatskih aldehida s aminokiselinama nastaju imini.



c) **Reakcije s fenilizotiocijanatom (Edmanova reakcija).** Ovaj spoj također reagira s amino skupinom i prvo u lužnatoj sredini daje N-fenil derivat koji se zatim ciklizira dajući feniltiohidantoin kojeg je lako identificirati.



3.7. Raspodjela aminokiselina u ljudskom organizmu

Od dvadeset aminokiselina koje izgrađuju proteine, ljudski organizam ne može sintetizirati njih deset: arginin, histidin, valin, leucin, izoleucin, treonin, metionin, lizin, triptofan i fenilalanin. Ove aminokiseline se često nazivaju bitne i čovjek ih mora uzimati u prehrani. Ostale se mogu sintetizirati u ljudskom organizmu i nazivaju se nebitne: alanin, asparagin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glutamin, glicin, prolin, serin i tirozin.

Glicin i alanin su bez sumnje najprisutnije aminokiseline u ljudskom organizmu. Glicin je posebno u velikoj količini prisutan u kolagenu. Arginin izgrađuje neke proteine čak do 90 % ukupne mase. Serin i treonin su u malom postotku zastupljeni u većini proteina. Asparaginska kiselina i glutaminska kiselina se često nalaze u obliku njihovih amida, tj. aminokiselina asparagina i glutamina. Triptofan je također prisutan u malim postocima.

3.7.1. Aminokiseline u krvi i mokraći

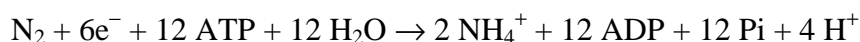
U krvi i mokraći se javljaju svih dvadeset aminokiselina u slobodnom obliku. Njihova koncentracija varira u određenim granicama i ima vrlo važnu ulogu u medicinskoj dijagnostici. Npr. mnoga oboljenja direktno utječu na koncentraciju pojedinih aminokiselina u krvi i mokraći, što uzrokuje devijacije u odnosu na normalne koncentracije i pomaže u donošenju ispravne dijagnoze.

U krvi se nalazi između 0,30-0,35 g/L slobodnih aminokiselina što predstavlja oko 40 mg/L slobodnog dušika. Dokazivanje svih aminokiselina je danas vrlo jednostavno i radi se automatski što omogućava brzu i točnu dijagnostiku.

U mokraći se nalazi određena koncentracija slobodnih aminokiselina, ali isto tako i njihovih derivata i produkata njihove metaboličke razgradnje. Mokraćevinom dnevno se uklanja između 10 i 25 mg svake aminokiseline. Od derivata aminokiselina, najznačajniji su 1-metilhistidin i 3-metilhistidin. Drugi produkti razgradnje aminokiselina su taurin, (iz cisteina), β -alanin (iz asparginske kiseline), γ -aminobutanska kiselina (iz glutaminske kiseline), α -aminobutanska kiselina (iz treonina, metionina i serina) itd.

3.8. Biosinteza aminokiselina

Kada se govori o biosintezi aminokiselina najprije treba razmotriti izvor i ulazak dušika u aminokiseline. Taj proces započinje redukcijom dušika iz zraka N_2 u NH_4^+ . Viši organizmi ne mogu prevesti N_2 u organski oblik. Tu pretvorbu provode bakterije i modrozelenne alge. Proces prevođenja N_2 u NH_4^+ je kataliziran složenim enzimom koji se sastoji od dvije skupine proteinskih komponentata: *reduktaze*, koja osigurava elektrone velike redukcijske moći, i *nitrogenaze*, koja upotrebljava te elektrone za redukciju N_2 u NH_4^+ . Energija veze $N\equiv N$ iznosi oko 950 kJ/mol, pa je stoga za prevođenje N_2 u NH_4^+ potreban ATP kao izvor energije. Stehiometrija zbirne reakcije koja se odvija u mikroorganizmima je slijedeća:



Slijedeći korak ulaska dušika u biomolekule je ugradnja NH_4^+ u aminokiseline. Pri tome glutamat i glutamin imaju ključnu ulogu. Pod djelovanjem glutamin sintetaze amonijev ion reagira s glutatom (glutaminska kiselina) i ugrađuje se u glutamin.

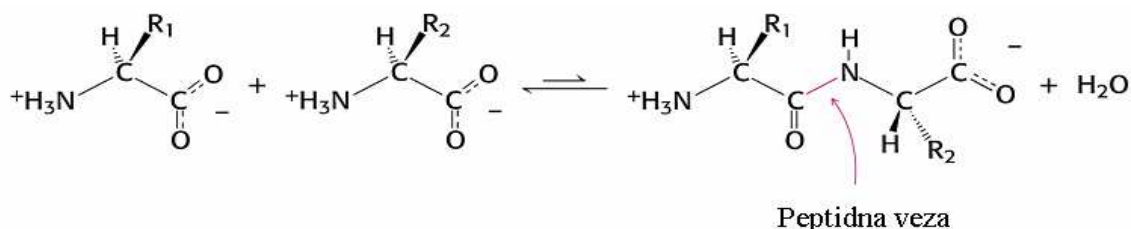
4. POGLAVLJE

PEPTIDI

Peptidi su molekule ili makromolekule koje nastaju međusobnim povezivanjem aminokiselina. U peptidnim lancima α -karboksilna skupina jedne aminokiseline se veže na α -amino skupinu druge aminokiseline peptidnom vezom pri čemu se gubi jedna molekula vode. Ravnoteža te reakcije jako je pomaknuta prema hidrolizi, te za biosintezu peptidnih veza treba uložiti energiju, a za njihovu hidrolizu ne treba. Prema dogovoru za početak polipeptidnog lanca uzima se amino kraj (N-terminal), to jest aminokiselina na kraju lanca kojoj je slobodna amino skupina, a za svršetak karboksilni kraj (C-terminal), to jest aminokiselina na drugom kraju lanca kojoj je slobodna karboksilna skupina. Polipeptidni lanac se sastoji od glavnog lanca ili okosnice, (dio koji se pravilno ponavlja) i promjenljivog dijela koji sadrži međusobno različite ogranke, aminokiselinske R ostatke. Slijedovi aminokiselina do 100 peptidnih veza uglavnom se nazivaju peptidima, a preko 100 proteinima. Svaki peptidni lanac posjeduje najmanje jednu amino skupinu i jednu karboksilnu skupinu te prema tome ima puferska svojstva. Puferska svojstva nekog peptida znatno ovise i od pobočnih R ostataka.

4.1. Peptidna veza

Reakcija α -karboksilne skupine jedne aminokiseline s α -amino skupinom druge aminokiseline daje sekundarni amid, a veza među aminokiselinama se naziva peptidna veza.



Formula peptida počinje slijeva od amino skupine u desno prema karboksilnoj skupini (npr. metionil-histidil-alanin).

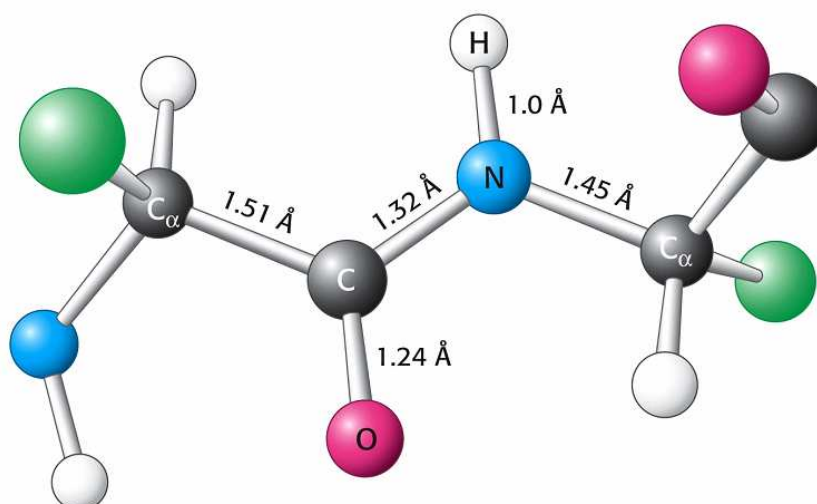
4.2. Dokaz postojanja peptidne veze

Eksperimentalni dokazi peptidne veze su mnogobrojni.

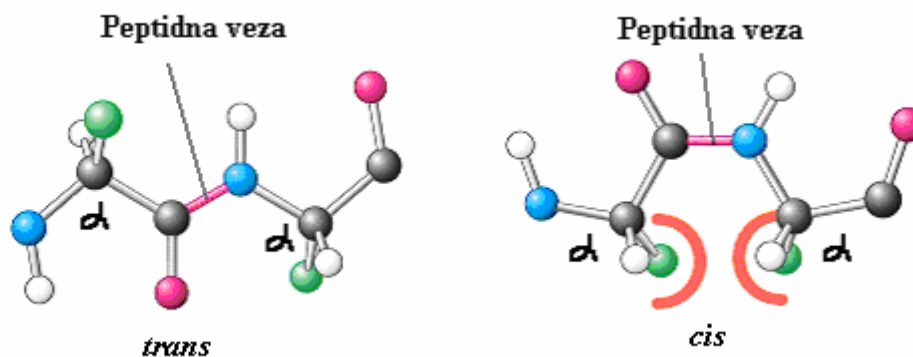
- Hidrolizom nekog peptida u otopini progresivno raste koncentracija aminoskupina i karboksilnih skupina što se može jednostavno dokazati titracijom. U polaznom peptidu bile su slobodne samo one skupine na krajevima peptida, dok poslije hidrolize one su slobodne u svakoj aminokiselini sastavnici peptida.
- Peptidi imaju karakterističan infracrveni spektar.
- Difrakcija (rasipanje) x-zraka potvrđuje peptidnu vezu i omogućava određivanje položaja atoma koji je izgrađuju.

Karakteristike peptidne veze:

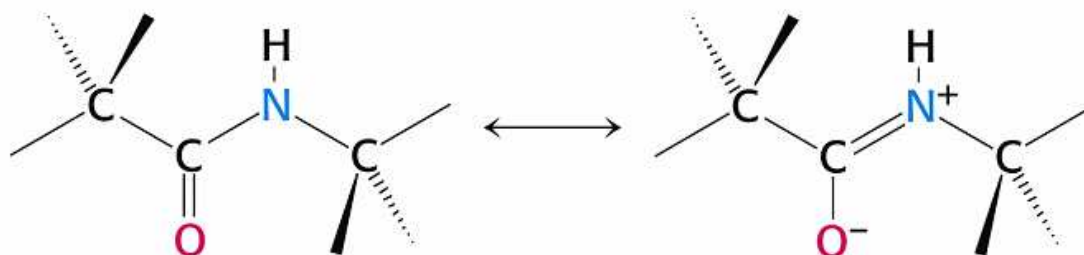
- svih šest atoma C_{α} -CO-NH- C_{α} koji izgrađuju peptidnu vezu nalaze se u istoj ravnini (C_{α} su α -ugljikovi atomi susjednih aminokiselina u vezi).



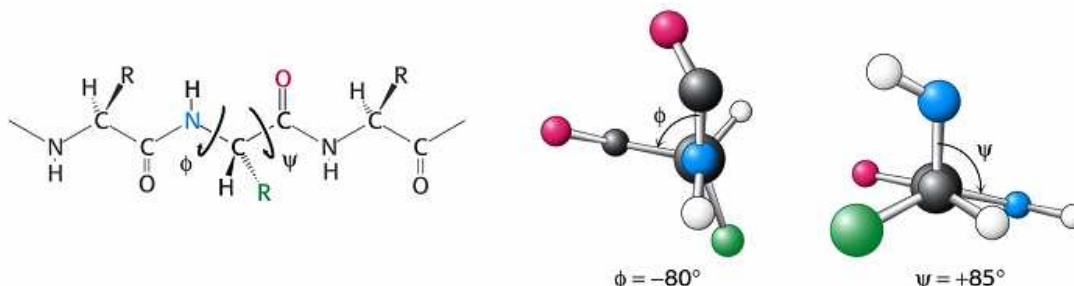
- α -ugljikovi atomi dviju aminokiselina koje su povezane peptidnom vezom nalaze se uglavnom u *trans* položaju u odnosu na peptidnu vezu.



Peptidna veza je stabilizirana rezonantnom strukturom, to jest delokaliziranom dvostrukom vezom između ugljika i kisika koja se premješta između ugljika i dušika.



Tako formirana dvostruka veza onemogućava rotaciju oko same peptidne veze. Međutim α -ugljikov atom jedne aminokiseline je s jedne strane vezan s dušikom iz jedne peptidne veze, a s druge strane s ugljikom iz druge peptidne veze. Tu postoji mogućnost rotacije između C_{α} -N veze koja je određena kutom ϕ , kao i rotacije između C_{α} -C koja je određena kutom ψ . Kada su dvije peptidne veze koplanarne tada su ti kutovi jednaki.

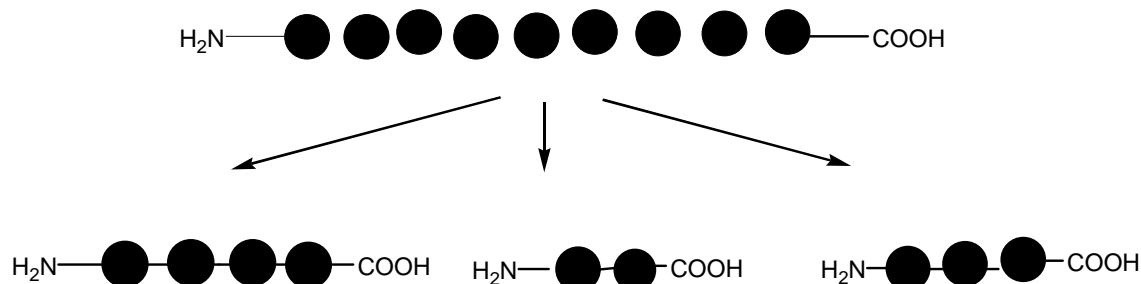


4.3. Redosljed aminokiselina u nekom peptidu

Redosljed povezivanja aminokiselina u nekom peptidu ima presudnu ulogu za njegovu strukturnu građu i biološku aktivnost. Glavni principi određivanja redosljeda aminokiselina u nekom peptidu su:

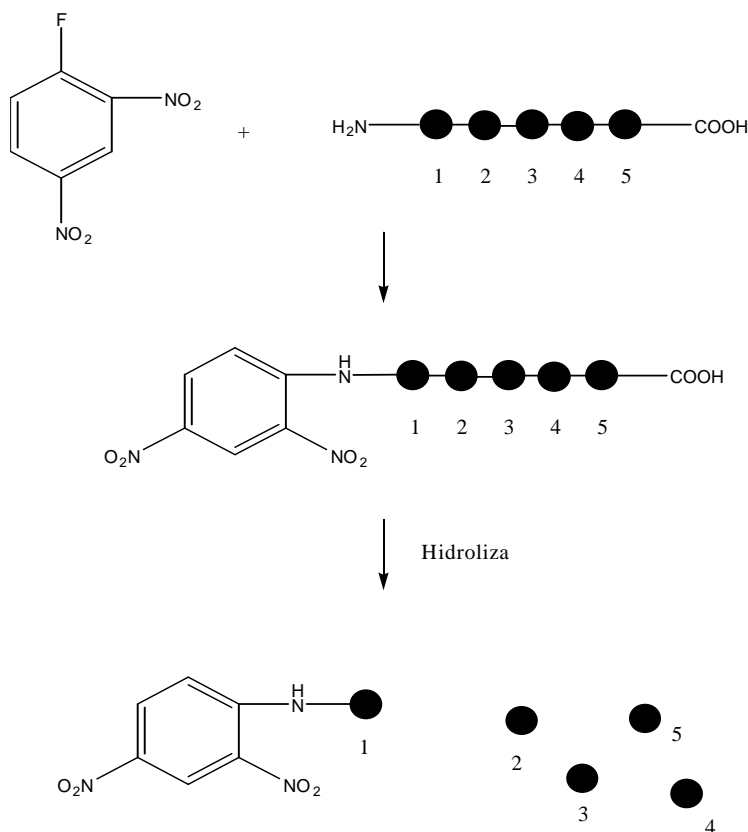
- Određivanje aminokiselina na N i C završetku istraživanog peptida.
- Hidroliza peptida na oligopeptide (upotreba proteolitičkog enzima) te njihovo razdvajanje nekom od kromatografskih metoda.
- Određivanje aminokiselina na N i C završetku svakog oligopeptida, a zatim određivanje redosljeda aminokiselina u svakom oligopeptidu.
- Hidroliza peptida u različitim uvjetima (upotreba drugačijeg proteolitičkog enzima) da se dobiju različiti oligopeptidi.
- Ponovno određivanje aminokiselina na N i C završetku svakog novonastalog oligopeptida i određivanje redosljeda aminokiselina.
- Povezivanje svih činjenica i određivanje cjelokupnog redosljeda aminokiselina u istraživanom peptidu.

Upotrebom proteolitičkog enzima peptidni lanac se cijepa na točno određenim mjestima:

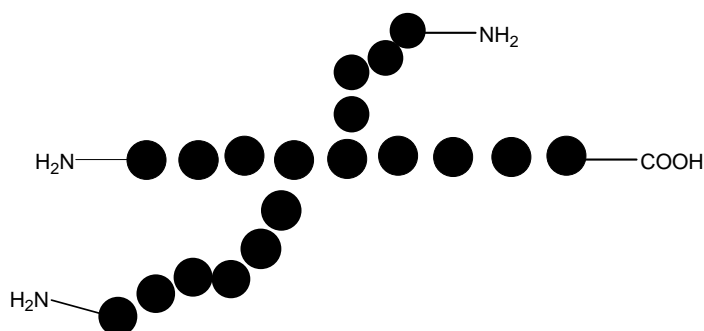


4.4. Određivanje aminokiselina na N završetku

4.4.1. Sangerova metoda. 1-Fluoro-2,4-dinitrofenol reagira sa slobodnom NH_2 skupinom, a zatim se izvrši hidroliza peptida i identificira aminokiselina povezana na 2,4-dinitrofenol.

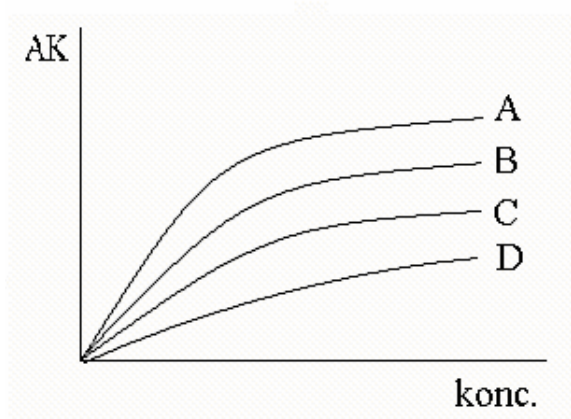
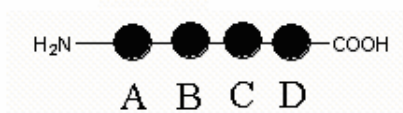


Ako se identificira više derivata dinitrofenola zaključak je da je peptid bio razgranat i imao više N završetaka:



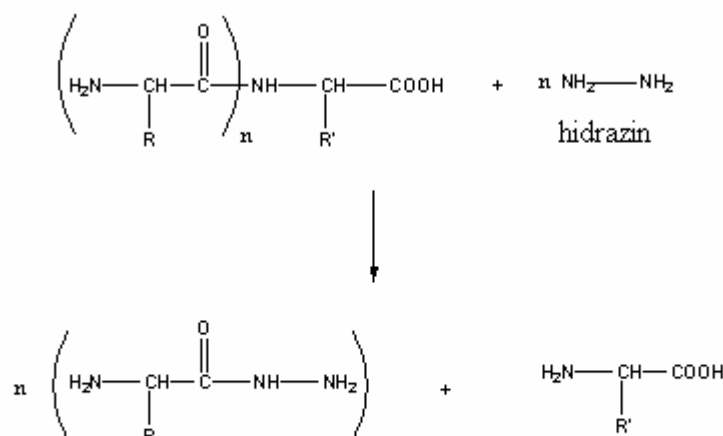
Nedostatak Sangerove metode je što je potrebno izvršiti kompletnu hidrolizu peptida da bi se oslobodili α -DNP-aminokiselinski derivati. Pošto je peptid razgrađen, određivanje slijedećih aminokiselina u nizu nije moguće.

4.4.2. Enzimska metoda (aminoegzopeptidaza). Enzimi egzopeptidaze su enzimi koji specifično kataliziraju oslobađanje krajnjih aminokiselina u nekom peptidu. Upotrebom enzima α -aminoegzopeptidaze oslobađa se aminokiselina na N završetku. Budući se njenim odvajanjem demaskira slijedeća amino skupina, moguće je oslobađati drugu, pa treću aminokiselinu u slijedu. Razlika je u brzini oslobađanja. Npr. za peptid ABCD ovisnost koncentracije oslobođenih aminokiselina u funkciji vremena će biti sljedeća:



4.5. Određivanje aminokiselina na C završetku

4.5.1. Kemijska metoda. Određivanje C-terminalne aminokiseline je moguće primjenom hidrazinolize koja podrazumijeva tretiranje peptida hidrazinom pri 100 °C. Peptidne veze se kidaju, a aminokiseline se javljaju u obliku hidrazida. Jedino aminokiselina na C-završetku je u slobodnom stanju.



Ostale aminokiseline u obliku hidrazida

Slobodna C terminalna aminokiselina

4.5.2. Enzimsko metoda (karboksiegzopeptidaza). Karboksiegzopeptidaza odcjepljuje krajnju C aminokiselinu na nekom peptidu, slično kao što to čine aminoegzopeptidaze.

4.6. Hidroliza peptidne veze unutar peptidnih lanaca

Ako je peptidni lanac predugačak potrebno ga je frakcionirati, tj. pocijepati određene peptidne veze u unutrašnjem dijelu peptidnog lanca s ciljem da se dobiju kraći peptidi. Važno je da se ova cijepanja izvrše na ponovljiv način uvijek na istim mjestima. U tu svrhu se koriste dvije metode: enzimsko i kemijsko cijepanje peptidnih veza.

4.6.1. Neselektivna hidroliza peptidnog lanca. Sve peptidne veze u nekom peptidnom lancu hidroliziraju ako se peptid tretira s 6M HCl na temperaturi 110°C tijekom 24 sata. Dobije se smjesa aminokiselina koje su izgrađivale peptidni lanac, bez ideje kojim redoslijedom su bile povezane. Neselektivno cijepanje peptidnog lanca je moguće i enzimski (enzim pepsin).

4.6.2. Selektivna hidroliza peptidnog lanca. Različiti proteolitički enzimi imaju specifičnost cijepanja peptidnih lanaca na točno lokaliziranom mjestu. Npr. enzim tripsin specifično cijepa peptidne veze koje uključuju karboksilnu skupinu lizina ili arginina. Ako jedan peptid ima (n) ostataka lizina ili arginina tripsin će učiniti sljedeće:

- pojavit će se n fragmenata na čijim će C-terminalima biti lizin ili arginin
- pojavit će se jedan fragment koji odgovara C-završetku polaznog peptidnog lanca.

Ala-Phe-His-Liz-Met-Glu-Arg-Tyr-Ser-Arg-Ala-Ala-His

Ala-Phe-His-Liz + Met-Glu-Arg + Tyr-Ser-Arg + Ala-Ala-His

Poslije ovakvog katalitičkog cijepanja, fragmenti peptidnog lanca se razdvajaju kromatografski ili elektroforetski, a zatim se Edmanovom metodom određuje redoslijed aminokiselina u svakom fragmentu. Ista procedura provodi se s drugim enzimom koji ima drugačiju specifičnost. Npr. kimotripsin cijepa peptidne veze u kojima je karboksilna skupina iz neke aromatske aminokiseline (tirozin, triptofan, fenilalanin).

Ala-Phe-His-Liz-Met-Glu-Arg-Tyr-Ser-Arg-Ala-Ala-His

Ala-Phe + His-Liz-Met-Glu-Arg-Tyr + Ser-Arg-Ala-Ala-His

Ovakva analiza s dva različita enzima omogućava određivanje redoslijeda fragmenata u peptidnom lancu. Određivanjem N- i C-terminalnih aminokiselina i određivanje redoslijeda aminokiselina u svakom fragmentu rezultira određivanjem redoslijeda aminokiselina u cjelokupnom inicijalnom peptidnom lancu.

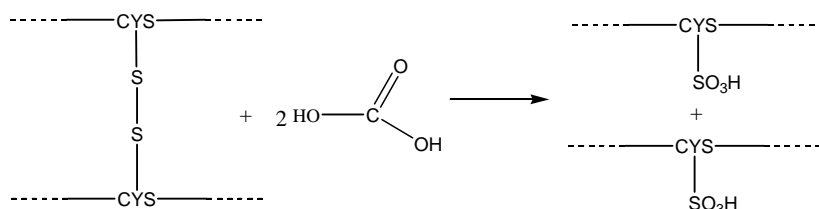
Kemijsko cijepanje i razdvajanje peptidnih lanaca. Selektivno enzimsko cijepanje peptidnog lanca može biti upotunjeno kemijskim cijepanjem. Npr. često se koristi BrCN koji cijepa peptidnu vezu kod metionina.

Ala-Phe-His-Liz-Met-Glu-Arg-Tyr-Ser-Arg-Ala-Ala-His

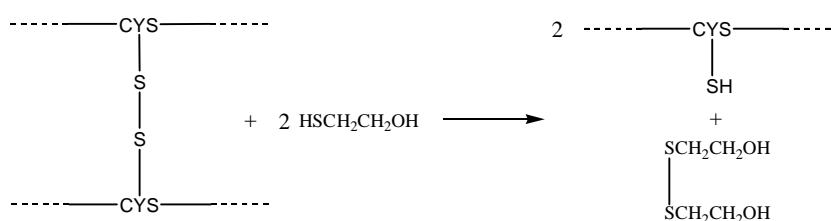
Ala-Phe-His-Liz-Met + Glu-Arg-Tyr-Ser-Arg-Ala-Ala-His

Unutar jednog peptidnog lanca ili između dva peptidna lanca često dolazi do povezivanja disulfidnim mostom. Za razaranje disulfidnog mosta koriste se dvije kemijske metode:

Oksidacija permravljom kiselinom :

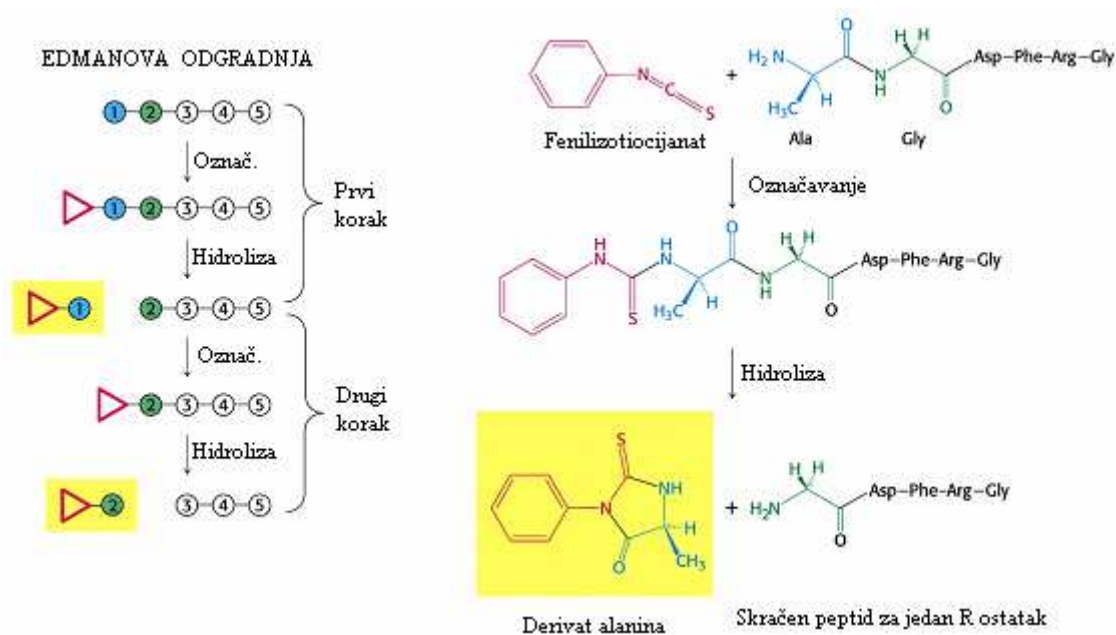


Redukcija β-merkaptoetanolom:



4.7. Određivanje redosljeda aminokiselina Edmanovom metodom

Edmanova metoda podrazumijeva odcjepljivanje aminokiselina s N-terminala, a da pri tome ne dolazi do razgradnje kompletnog peptida. Odvojena aminokiselina se identificira, a skraćeni peptid ide u daljnju proceduru te se jedna za drugom određuju aminokiseline u peptidnom lancu.

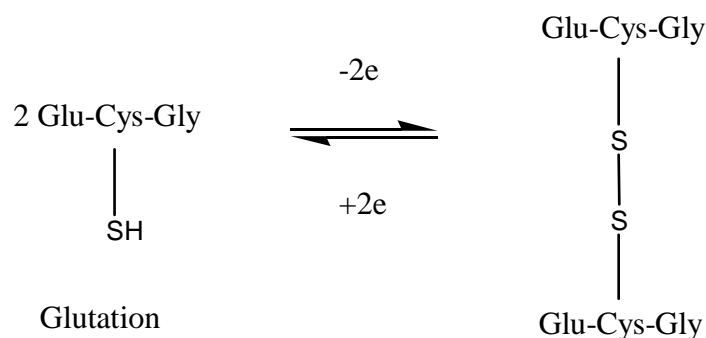


4.8. Biološka uloga peptida

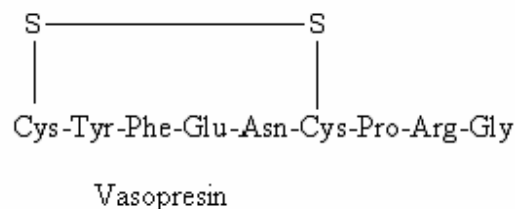
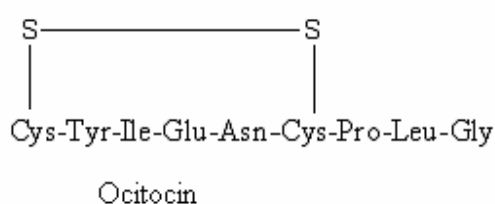
Peptidi imaju vrlo bitnu biološku ulogu. Najpoznatiji peptidi su s jedne strane hormoni, a s druge antibiotici. Pored toga mogu biti u ulozi moždanih neuroprijenosnika kao što su enkefalini ili koenzima kao što je glutation (oksidoredukcijski koenzim).

Tyr-Gly-Gly-Phe-**Met** (Met-enkefalin)

Tyr-Gly-Gly-Phe-**Leu** (Leu enkefalin)

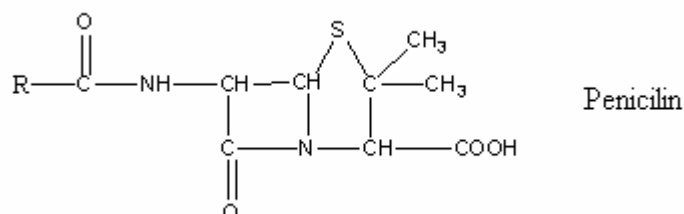


4.8.1. Hormonski peptidi. Mnogi hormoni su po kemijskoj građi peptidi. Npr. hormoni hipotalamusa i hipofize: ocitocin, vasopresin.



Adrenokortikotropin (ACTH) je peptid od 39 aminokiselina. Hormoni gušterače su također peptidi. Inzulin je peptid od dva lanca: lanac A ima 21 aminokiselinu, dok lanac B ima 30 aminokiselina. Peptid glukagon je izgrađen od 29 aminokiselina. Mnogi drugi hormoni su također kraći ili duži peptidi.

4.8.2. Peptidi antibiotici. Peptidi mogu imati ulogu antibiotika. Npr. penicilin je izmijenjeni dipeptid valina i cisteina.



4.8.3. Ostale biološke uloge peptida. Peptidi su često vrlo jaki otrovi. Npr. mnogi zmijski otrovi po kemijskom sastavu su peptidi. Konačno peptidi su citostatici te se upotrebljavaju u terapijama liječenja zloćudnih tumora.

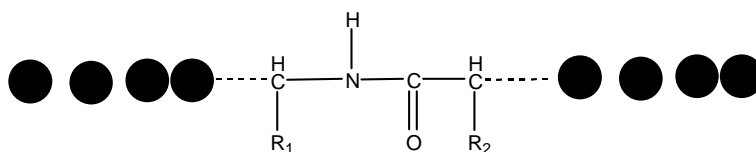
5. POGLAVLJE

PROTEINI

Proteini se od peptida razlikuju po kompleksnosti i veličini molekula. Općenito, peptidni lanci duži od 100 aminokiselina ubrajaju se u proteine. Ove makromolekule se dijele na jednostavne i složene. Jednostavni su izgrađeni samo od aminokiselina, a složeni imaju i druge građevne sastojke (prostetičke skupine). Prema prostetičkoj skupini složeni proteini se dijele na lipoproteine (sadrže lipide), glikoproteine (šećere), nukleoproteine (nukleotide), fosfoproteine (fosfornu kiselinu), metaloproteine (Fe, Cu, Zn i Ni) i kromoproteine (obojene skupine). Prema topljivosti u vodi proteini se dijele na netopljive skleroproteine (imaju vlaknastu strukturu i grade potporna tkiva) i topljive globularne ili sferoproteine (izuzetak su neki membranski proteini).

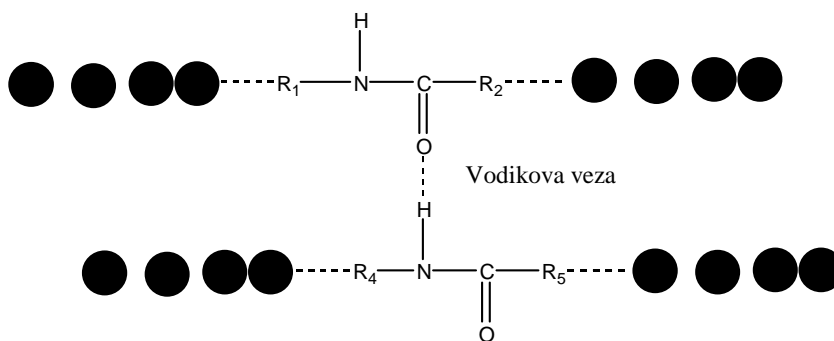
5.1. Podjela proteina prema strukturalnoj građi

5.1.1. Primarna struktura predstavlja redosljed aminokiselina povezanih peptidnim vezama u nekoj proteinskoj molekuli. Peptidni lanac je opružen u prostoru bez dodatnih povezivanja unutar peptidnog lanca. Takva struktura javlja se kod denaturiranih proteina i oni uglavnom nemaju biološki značaj.



Peptidno povezivanje između aminokiselina u nekom peptidnom lancu primarne strukture je preduvjet nastajanja složenijeg strukturalnog uređenja proteina (sekundarna i tercijarna struktura).

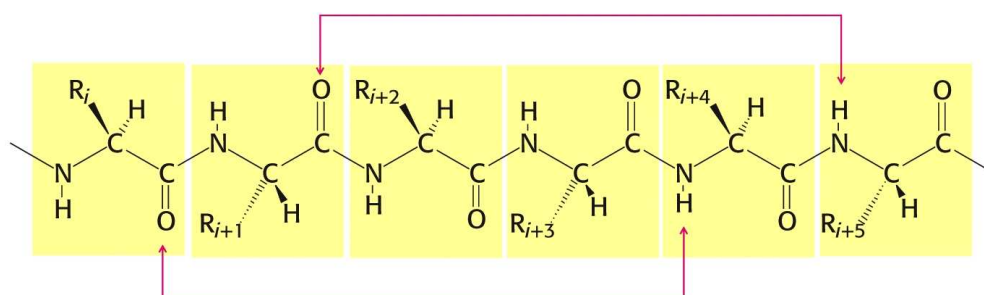
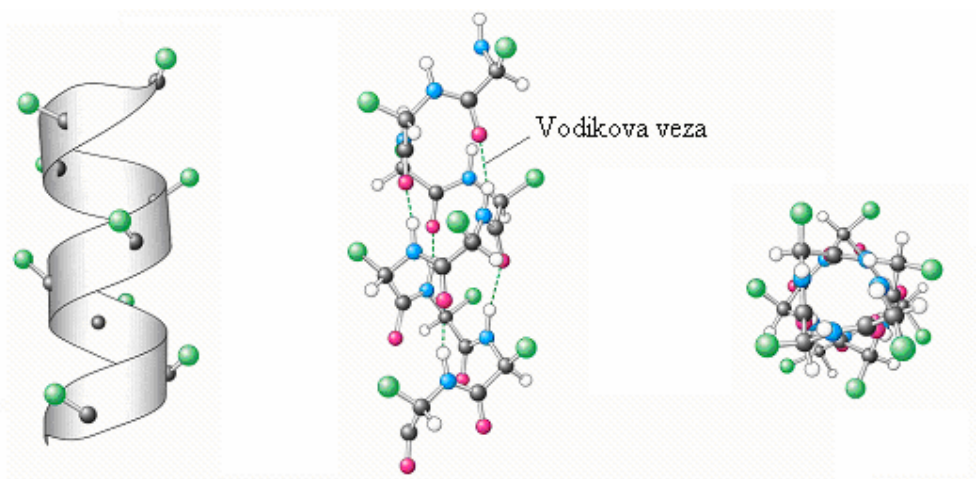
5.1.2. Sekundarna struktura nastaje uslijed vodikovih veza koje se stvaraju između kisika karbonilne skupine ($=CO$) jedne peptidne veze i amidnog vodika ($-NH$) druge peptidne veze. Ako dođe do približavanja na udaljenost od 0,28 nm dvije peptidne veze se povezuju vodikovom vezom i na tom mjestu stabiliziraju prostorno uređenje proteina.



Energija vodikove veze je 1/10 energije kovalentne veze, međutim budući da se u proteinskoj molekuli može nalaziti velik broj ovih veza, dobiva se ukupno znatan iznos energije koji

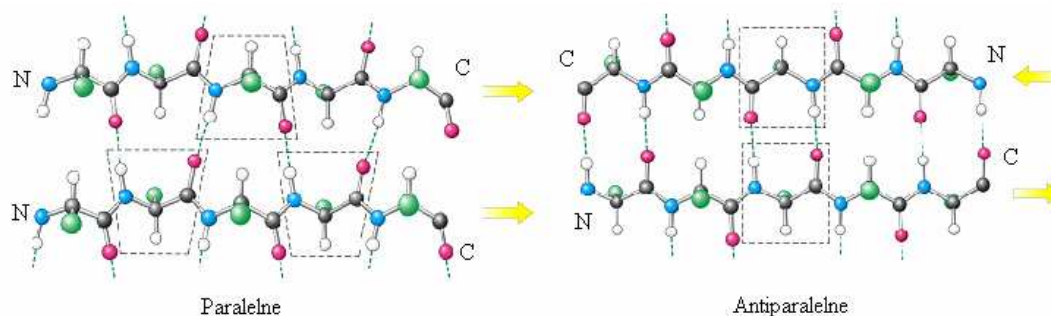
stabilizira prostorno uređenje cijele proteinske molekule. Postoje dvije vrste sekundarne strukture proteina: α -uzvojnica i β -nabrana ploča.

a) α -uzvojnica predstavlja strukturu kod koje se peptidni lanac smotava i u prostoru zauzima uređenje oblika opruge. Sve R skupine su smještene prema vani α -uzvojnice. Od navoja do navoja karboksilne i amino skupine iz peptidnih veza su međusobno raspoređene jedna iznad druge na udaljenosti od 0,28 nm. U prirodi je raširena α -uzvojnica koja sadrži u prosjeku 3,6 aminokiselina po uvojkju, jer se tako uspostavlja maksimalan broj vodikovih veza. Ako je većina R skupina hidrofobne naravi tada je α -uzvojnica netopiva u vodi.

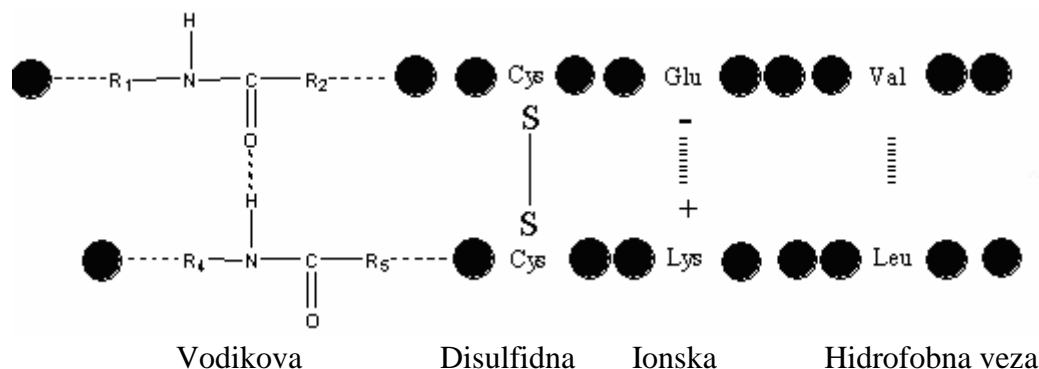


CO grupa n peptidne veze gradi vodikovu vezu sa NH grupom n+4 peptidne veze

b) β -nabrana ploča se izrazito razlikuje od α -uzvojnice. Peptidni lanac u β -nabranoj ploči je istegnut, a vodikove veze između -NH i =CO skupina nastaju unutar jednog te istog peptidnog lanca ili između različitih peptidnih lanaca. Ovisno o smjeru peptidnih lanaca, postoje paralelne i antiparalelne β -nabrane ploče.

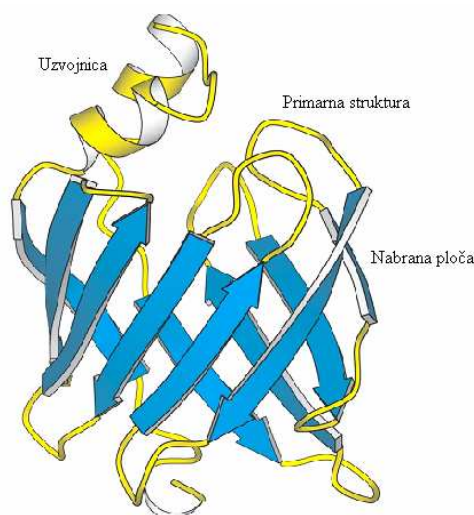


5.1.3. Tercijarna struktura je zastupljena kod globularnih proteina. Ona nastaje uslijed blizine aminokiselinskih R ostataka u samoj proteinskoj molekuli. Pod utjecajem vodikovih veza, hidrofobnih, disulfidnih i ionskih veza dolazi do povijanja peptidnog lanca, a proteinska molekula zauzima sferični izgled u prostoru. Prostorno uređenje je stabilizirano energijom navedenih veza.



- Vodikova veza kod tercijarne strukture može nastati između peptidnih veza osnovnog lanca, između polarnih grupa pobočnih R ostataka, te između peptidnih veza i polarnih grupa R-ostataka.
- Disulfidne veze nastaju dehidriranjem dvaju pobočnih cisteinskih R ostataka.
- Ionske veze nastaju između pozitivno i negativno nabijenih R-aminokiselinskih ostataka (lizin, histidin, arginin i asparginska i glutaminska kiselina)
- Hidrofobne veze nastaju približavanjem hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (valin, leucin, izoleucin itd.) Uz izuzetak membranskih proteina, hidrofobne veze djeluju prvenstveno u unutrašnjosti molekule proteina.

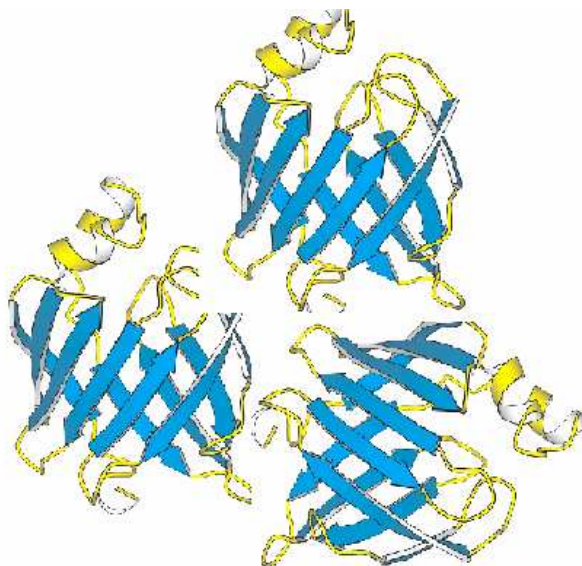
Tercijarna struktura ne znači isključivanje primarne i sekundarne strukture. Ona je u stvari kombinacija tih struktura.



Postoje proteini u kojima prevladava tercijarna struktura od α -uzvojnica, zatim proteini u kojima prevladava β -nabrana ploča. Zatim proteini u kojima se nalaze odvojene α -

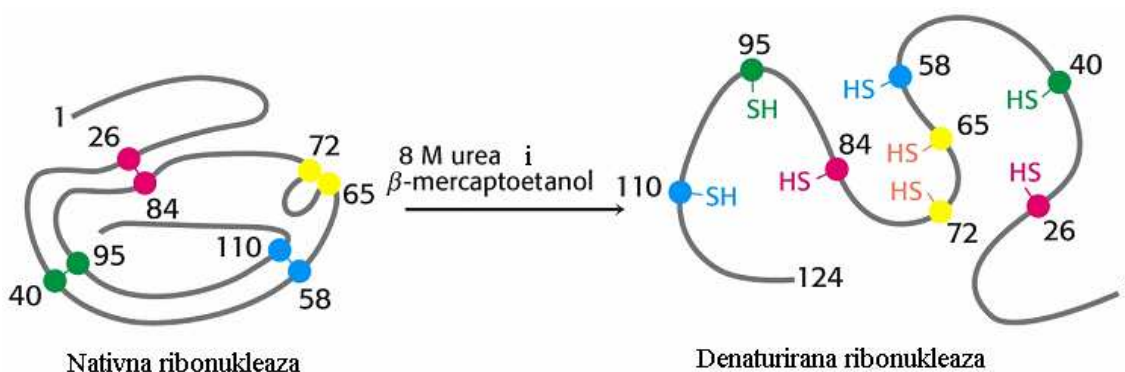
uzvojnice od β -nabranih ploča i proteini kod kojih se pravilno izmjenjuju odsječci α -uzvojnica i β -nabranih ploča ($\alpha\beta\alpha\beta$ strukture).

5.1.4. Kvarterna struktura nastaje međusobnim udruživanjem i polimerizacijom proteina tercijarne strukture. Ovo udruživanje se temelji na istim vezama koje se susreću i kod tercijarne strukture (vodikove, disulfidne, ionske i hidrofobne veze).



5.2. Konformacija proteina

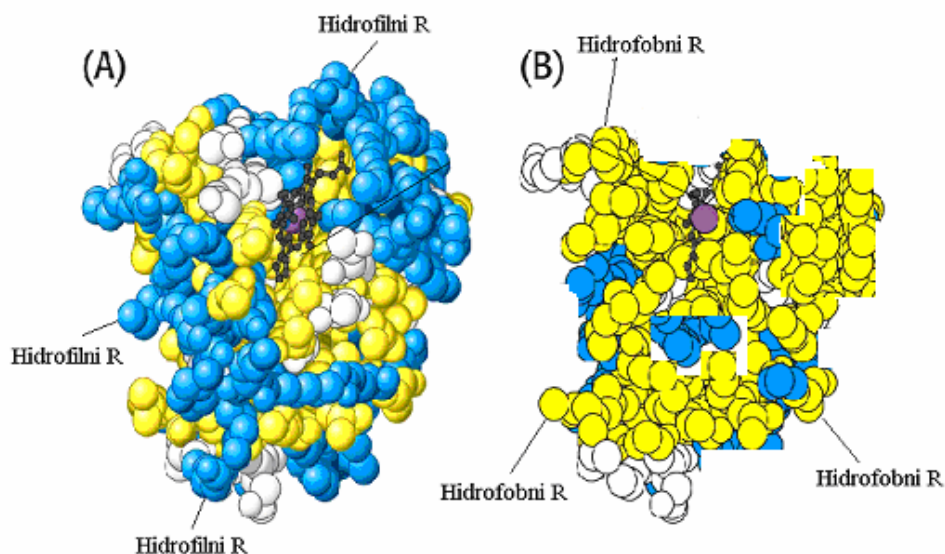
Konformacija proteina opisuje njegovo uređenje u prostoru. Do promjene uređenja u prostoru proteinske molekule može doći raskidanjem nekovalentnih i disulfidnih veza unutar molekule. Pri takvim promjenama kaže se da je protein promijenio svoju konformaciju, a da je konfiguracija ostala ista



5.3. Topljivost proteina u vodi

Topljivost proteina u vodi varira ovisno o prirodi proteina. Općenito, proteini čija je tercijarna struktura narušena manje su topljivi u vodi. Dakle svi fenomeni koji narušavaju

prostorno uređenje proteina dovode do smanjenja njihove topljivosti u vodi, tj. svi fenomeni koji utječu na kidanje vodikovih veza, disulfidnih, hidrofobnih i ionskih veza u strukturi proteina.



(A) Topljivi u vodi

R ostaci prema vani hidrofilni a prema unutra hidrofobni (enzimi, većina globularnih proteina)

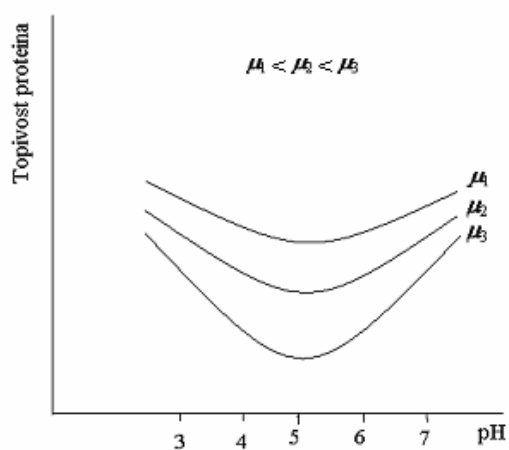
(B) Netopljivi u vodi

R ostaci prema vani hidrofobni, a prema unutra hidrofilni (membranski proteini).

5.3.1. Utjecaj pH. Topljivost nekog proteina je općenito minimalna pri pH izoelektrične točke (pH pri kojem je ukupan naboj proteinske molekule jednak nula).

5.3.2. Utjecaj ionske sile μ . Proteini su općenito bolje topljivi pri manjoj ionskoj jakosti tj. pri manjoj koncentraciji otopljenih soli.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 \quad c - \text{koncentracija svakog iona, } z_i^2 - \text{naboj svakog iona}$$



Utjecaj pH i ionske jakosti na topljivost proteina u vodi.

5.3.3. Utjecaj temperature. Povišenjem temperature se smanjuje topljivost proteina te dolazi do denaturiranja i njihovog taloženja.

5.3.4. Utjecaj organskih otapala. Proteini su vrlo malo topljivi u organskim otapalima. Npr. u alkoholima i acetonu proteini se gotovo ne otapaju.

5.3.5. Utjecaj nekih kemijskih spojeva. Npr. trikloroctena kiselina (5 %) dovodi do taloženja većine proteina (CCl_3COOH). Slično je i s perklornom kiselinom.

5.4. Puferska svojstva proteina

Proteini, kao peptidi i aminokiseline, imaju puferska svojstva. Pored terminalnih amino i karboksilnih skupina postoje i mnogi R ostaci (pozitivno i negativno nabijene aminokiseline) koji utječu na ukupan naboj proteina. Općenito pri određenom pH, neki proteini su pozitivno nabijeni, a neki negativno, ovisno o njihovom aminokiselinskom sastavu. Moguće je dobiti titracijsku krivulju proteina, ali ih je teško interpretirati jer su R ostaci mnogobrojni, a i njihove pK vrijednosti u proteinu su različite od pK vrijednosti aminokiseline u čistom stanju.

5.5. Određivanje izoelektrične točke proteina

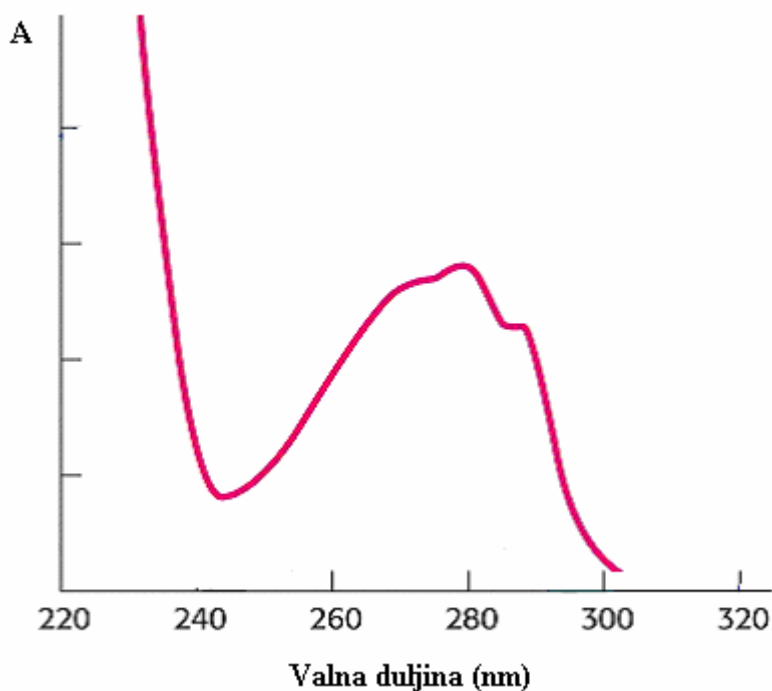
Proteini se pri određenom pH u električnom polju kreću prema katodi ili prema anodi (ovisno o ukupnom naboju proteina). Podešavanjem pH na onu vrijednost pri kojoj se protein ne kreće u električnom polju eksperimentalno (elektroforetski) se određuje izoelektrična točka pK_I proteina. Izoelektrična točka proteina predstavlja pH pri kojem je ukupan naboj proteina jednak nula.

5.6. Kemijska svojstva proteina

Kemijska svojstva nekog proteina su slična kemijskim svojstvima pojedinih aminokiselina koje ga izgrađuju, vodeći računa o činjenici da su one ovdje međusobno povezane u peptidni lanac. Ove reakcije omogućavaju određivanje pojedinih dijelova strukture proteina: određivanje terminalnih aminokiselina, određivanje aktivnog mjesta u enzimu itd. S raznim reagensima proteini daju obojene produkte. Kao i kod peptida, takve reakcije omogućavaju određivanje njihove koncentracije (reakcija s ninhidrinom, "biuret" reakcija itd.).

5.7. Apsorpcija proteina u ultraljubičastom području

Proteini posjeduju mogućnost apsorpcije UV svjetlosti pri valnoj duljini od 280 nm. Ova apsorpcija je povezana s prisutnošću tirozina i triptofana među R ostacima. Ovo svojstvo se može iskoristiti za procjenjivanje koncentracije proteina u nekoj otopini. Za precizno određivanje koncentracije potrebna je kalibracija s čistim proteinom. To je potrebno jer pojedini proteini u svome sastavu imaju promjenljiv sadržaj tirozina i triptofana, pa za istu molarnu koncentraciju dvaju različitih proteina mogu biti različite apsorpcije.

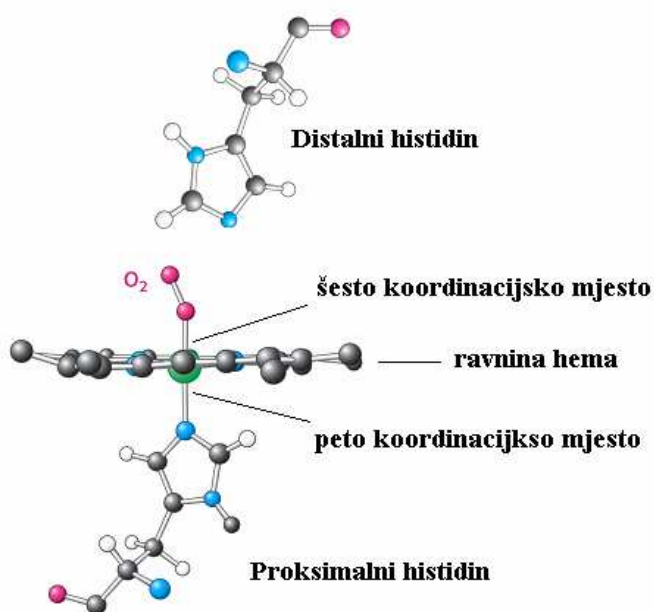
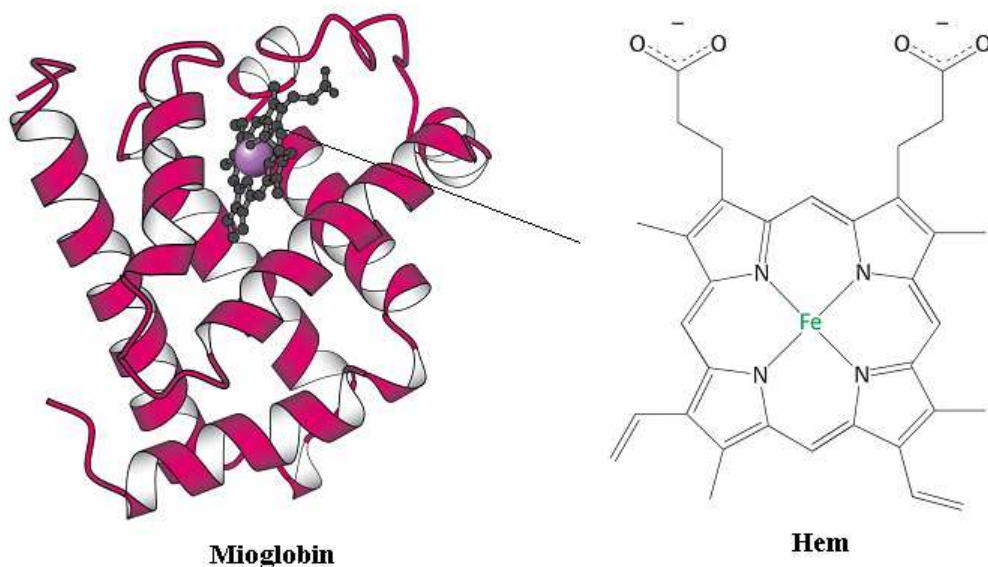


5.8. Biološka uloga proteina

Ime protein, izvedeno od grčke riječi proteno, znači zauzimanje prvo mjesto. Ovakvo ime je opravdano za spojeve koji imaju bitne uloge u gotovo svim biološkim procesima. Npr. enzimski kataliza, prijenos i pohrana molekula i iona, koordinirano pokretanje mišića, mehanička čvrstoća kože i kostiju, imunost zaštita, stvaranje i provođenje nervnih impulsa, kontrola rasta stanica itd.

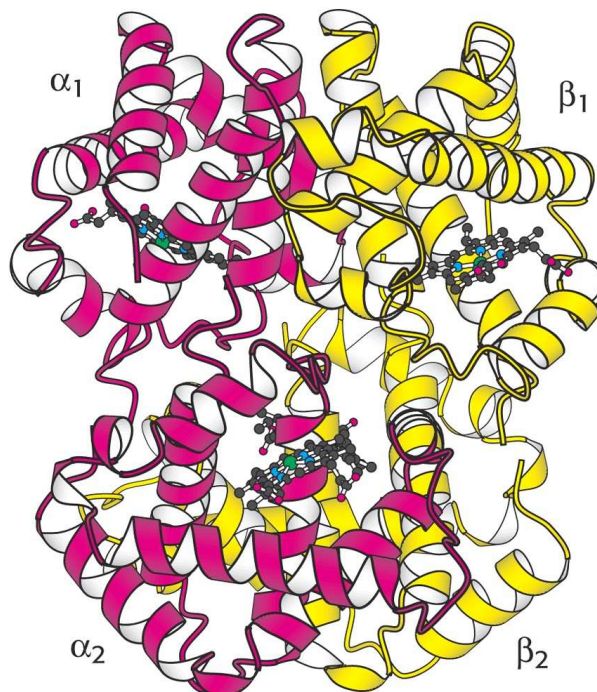
5.8.1. Mioglobin i hemoglobin. Mioglobin i hemoglobin su proteini koji prenose kisik u kralješnjaka. Mioglobin pospješuje prijenos kisika u mišićima i služi kao spremnik kisika u tom tkivu. Hemoglobin se nalazi u eritrocitima i služi za transport kisika u krvi. Ova dva proteina vežu kisik jer sadrže vezanu prostetičku skupinu hem. Hem je supstituirani porfirin s atomom željeza u sredini. Atom željeza može biti u željezo (II) ili željezo (III) stanju. Samo željezo (II) oblik veže i prenosi kisik.

a) Mioglobin je samostalni polipeptidni lanac od 153 R aminokiselinskih ostataka ($M_r = 17800$). To je globularni protein tercijarne strukture čija unutrašnjost se sastoji gotovo isključivo od nepolarnih ostataka, a površina sadrži i polarne i nepolarne ostatke. Otprilike 75% polipeptidnog lanca uvijeno je u osam α -uzvojnica vrlo kompaktnog oblika. Hem skupina je smještena u unutrašnjem nepolarnom procjepu. S jedne strane, preko petog koordinacijskog mjesta, atom željeza iz hema izravno je vezan na dušikov atom proksimalnog histidinskog ostatka iz peptidnog lanca. S druge strane, preko šestog koordinacijskog mjesta, na željezo se veže molekula kisika. U blizini mjesta vezanja kisika nalazi se distalni histidinski ostatak iz polipeptidnog lanca. Proksimalni histidin povećava afinitet hema za kisik, a distalni histidin sterički smanjuje mogućnost vezanja ugljik (II) dioksida i sprječava oksidaciju hema u željezo (III) oblik.



Od razmotanog apomioglobina i hema može se ponovno stvoriti djelatna molekula. Taj renaturacijski pokus pokazuje da aminokiselinski slijed mioglobina sadrži svu informaciju potrebnu za ispravno uvijanje molekule. Pretpostavlja se da je smještaj nepolarnih ostataka u unutrašnjosti mioglobina važna pokretačka sila za uvijanje te molekule.

b) Hemoglobin je protein kvarterne strukture koji se sastoji od četiri polipeptidna lanca od kojih svaki sadrži po jednu hem skupinu. Ima više vrsta hemoglobina od kojih je hemoglobin A, pretežni oblik hemoglobina u odraslih ljudi, izgrađen od $\alpha_2\beta_2$ podjedinica. Trodimenzijske tercijarne strukture α - i β -lanaca hemoglobina uvelike nalikuju strukturi mioglobina, iako se njihovi aminokiselinski sljedovi sasvim razlikuju.

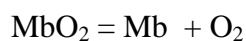


c) Sličnosti i razlike pri djelovanju mioglobina i hemoglobina. Hemoglobin je alosterički protein, a mioglobin nije. Ta razlika se očituje na tri načina:

1. Vežanje kisika na hemoglobin je kooperativno, a na mioglobin nije.
2. Afinitet vežanja kisika za hemoglobin ovisi o pH i koncentraciji CO_2 , a kod mioglobina ne ovisi.
3. Afinitet vežanja kisika za hemoglobin ovisi o koncentraciji difosfoglicerata, a kod mioglobina ne ovisi.

Vežanje kisika na mioglobin i hemoglobin može se definirati udjelom zaposjednutih vezivnih mjesta (Y). Vrijednost Y može varirati od 0 (sva mjesta prazna) do 1 (sva mjesta popunjena). Radi razlike vežanja kisika na mioglobin i hemoglobin, razlikuju se i njihove krivulje disocijanja. Mioglobin ima veći afinitet za kisik čiji parcijalni tlak kisika pri kojem je $Y=0,5$ (50% mjesta zaposjednuto) iznosi $P_{50} = 133,3 \text{ Pa}$, dok za hemoglobin $P_{50} = 3,47 \text{ kPa}$.

Vežanje kisika za mioglobin jednostavna je ravnoteža:



Konstanta kemijske ravnoteže K za disocijaciju oksimioglobina je

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]}$$

Udio zaposjednutih vezivnih mjesta Y (frakcijsko zasićenje) definira se kao:

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{([\text{MbO}_2] + [\text{Mb}])}$$

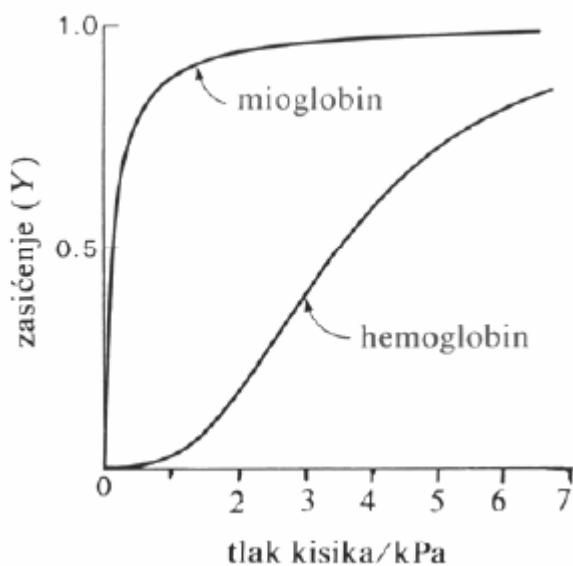
Kombiniranjem ovih dviju jednadžbi dobije se:

$$Y = [\text{O}_2] / ([\text{O}_2] + [\text{K}])$$

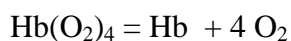
Budući da je kisik plin, njegova koncentracija može se izraziti preko parcijalnih tlakova $p(\text{O}_2)$ te je tada

$$Y = p(\text{O}_2) / (p(\text{O}_2) + P_{50})$$

Dijagram jednadžbe je hiperbola, a krivulja disociranja teoretski izračunata po jednadžbi podudara se s eksperimentalno izmjerenom krivuljom za mioglobin, uzimajući u obzir da je $P_{50} = 133,3 \text{ Pa}$.



Vežanje kisika za hemoglobin je kooperativno te za njega vrijedi druga jednadžba:



Konstanta kemijske ravnoteže K za disociranje oksid mioglobina je

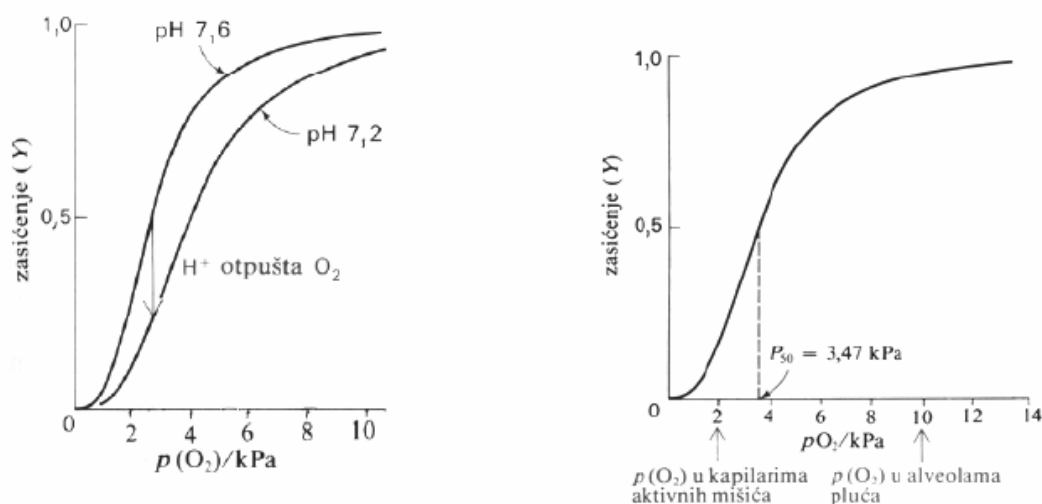
$$K = [\text{Hb}] [\text{O}_2]^4 / [\text{Hb}(\text{O}_2)_4]$$

$$Y = [\text{O}_2]^4 / ([\text{O}_2]^4 + [P_{50}]^4)$$

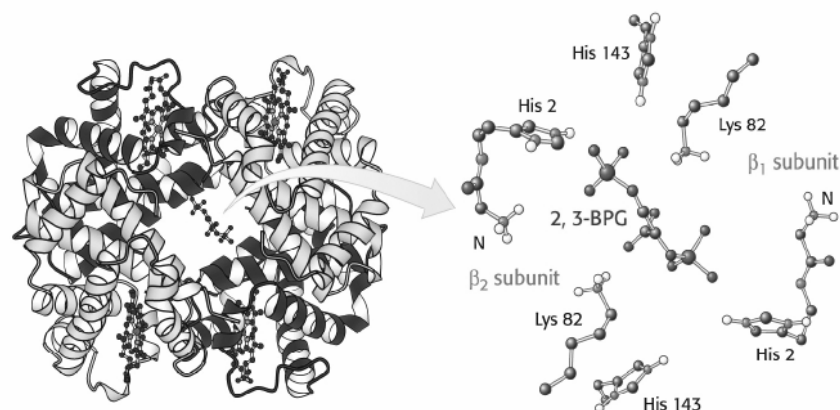
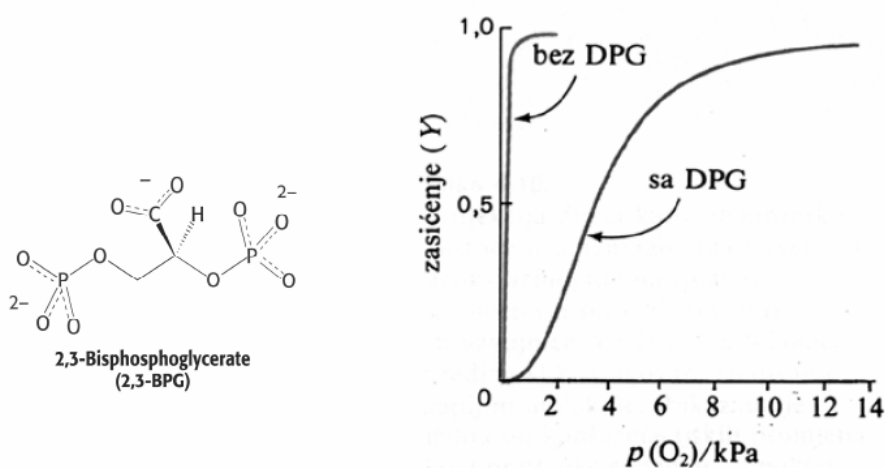
Dijagram takve jednadžbe je sigmoidalna krivulja koja pokazuje da vežanje prve molekule O_2 na hemoglobin potiče vežanje daljnjih molekula kisika na istu hemoglobinsku molekulu. Obratno, otpuštanje prve molekule kisika olakšava otpuštanje ostalih molekula kisika.

Koncentracija H^+ i CO_2 utječu na otpuštanje kisika s hemoglobina, dok ne utječu na vezu kisika i hemoglobina. U tkivu koje brzo metabolizira, npr. mišić koji se steže, proizvodi se mnogo CO_2 i H^+ koji potiču otpuštanje kisika sa oksihemoglobina. U plućnim kapilarama događa se suprotno, visoka koncentracija O_2 potiče otpuštanje H^+ i CO_2 . Ove međusobne

ovisnosti vezivanja O_2 , H^+ i CO_2 za hemoglobin poznate su kao Bohr-ov efekt, koji omogućava prijenos O_2 , H^+ i CO_2 kroz krvotok i njihovu razmjenu među tkivima.



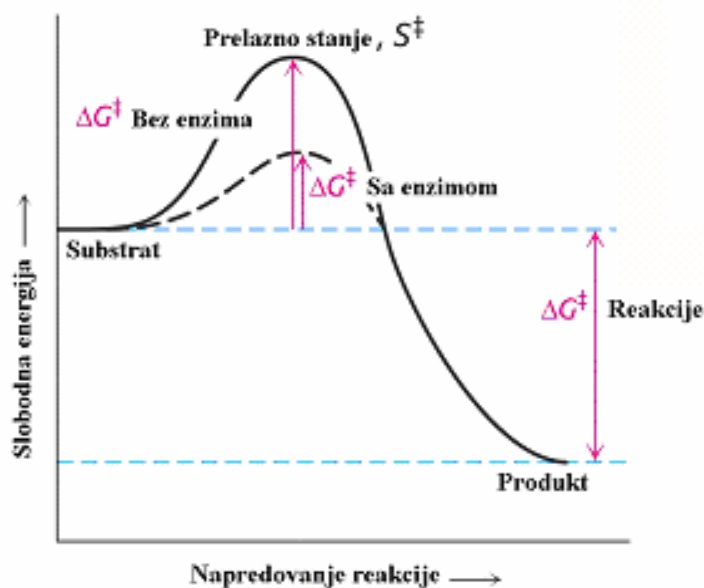
2,3-Difosfoglicerat (DPG) veže se na hemoglobin i znatno mijenja njegov afinitet za kisik. Bez DPG P_{50} hemoglobina iznosi 133,3 Pa isto kao kod molekule mioglobina. Očigledno da prisustvo DPG molekula u eritrocitima ima ključnu ulogu za kooperativno funkcioniranje hemoglobina.



6. POGLAVLJE

ENZIMI

Enzimi su globularni proteini tercijarne ili kvarterne strukture koji na površini imaju većinu polarnih aminokiselinskih ostataka, dok su nepolarni ostaci okrenuti prema unutrašnjosti molekule. Ovako organizirane proteinske molekule nazvane enzimi imaju visoku katalitičku moć i specifičnost za pojedine kemijske reakcije i supstrate u živim organizmima. Katalitička moć nekog enzima se očituje njegovom sposobnošću da smanjuje energiju aktivacije kemijskih reakcija.



Kinetika enzimskih reakcija

Enzimi ubrzavaju reakcije i preko milijun puta, a vrlo često kataliziraju samo jednu kemijsku reakciju ili skup vrlo srodnih reakcija, a specifičnost za supstrat najčešće je potpuna. Rijetki su primjeri da proteinski dio enzimske molekule samostalno djeluje kao biološki katalizator. Uglavnom proteinski dio enzimske molekule (apoenzim) treba udružiti s nekom neproteinskom molekulom (kofaktorom) da bi se postigla katalitička moć. Aktivni oblik enzima naziva se holoenzim:

$$\text{holoenzim} = \text{apoenzim} + \text{kofaktor}$$

Enzimski proteini uglavnom imaju svojstvo udruživanja više elementarnih struktura gradeći kvarterne strukture. Ako su sve podjedinice identične radi se o homopolimernom, a ako su različite o heteropolimernom enzimu.

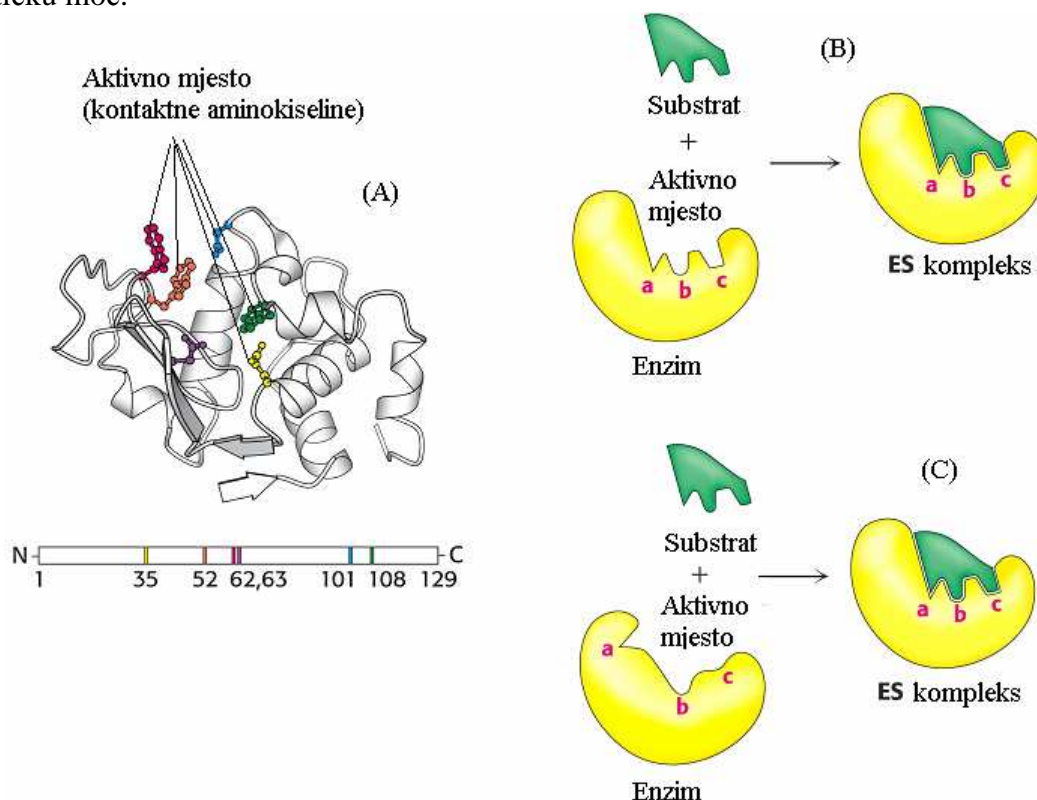
Izoenzimi predstavljaju posebne slučajeve heteropolimernih enzima u kojima su katalitičke aktivnosti različitih podjedinica identične.

Polienzimski sustavi ili polifunkcionalni enzimi su proteinske molekule sposobne da katalitički djeluju s više različitih kofaktora. Interes jedne takve organizacije je u koordinaciji više različitih enzimskih aktivnosti.

6.1. Definicija aktivnog mjesta

U trenutku katalitičke promjene supstrat je s enzimom povezan uglavnom slabim nekovalentnim vezama (vodikove, hidrofobne i Van der Walsove veze) što omogućava brzu izmjenu molekula supstrata na enzimu. Ta izmjena se događa u jednom dijelu enzima nazvanom aktivno mjesto.

Aktivno mjesto predstavlja mali broj aminokiselina smještenih u unutrašnjosti u hidrofobnom dijelu proteinske molekule, čije prostorno uređenje odgovara molekuli supstrata. Takav trodimenzijski prostor u hidrofobnoj unutrašnjosti enzima je odgovoran za njegovu katalitičku moć.

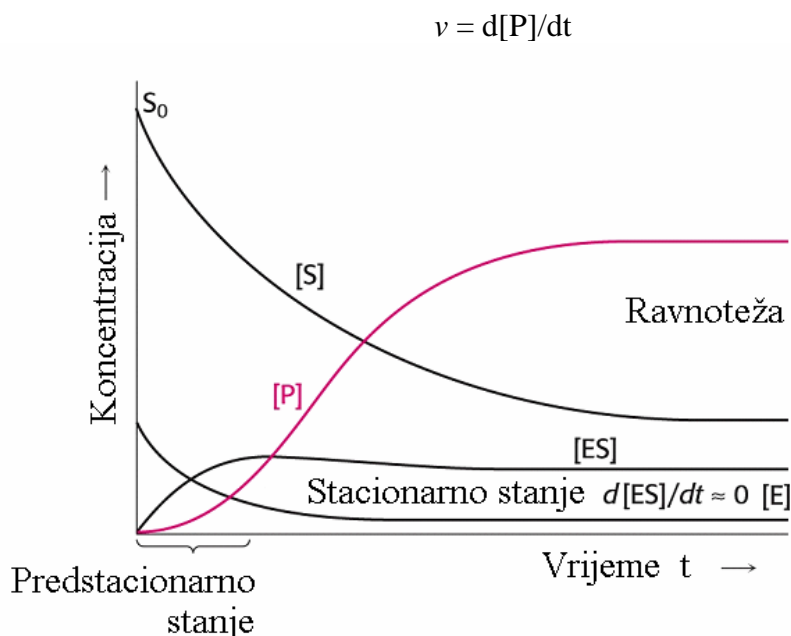


Aminokiseline koje izgrađuju aktivno mjesto ne moraju biti susjedne aminokiseline u peptidnom lancu (slika A). S druge strane aktivno mjesto kod nekog enzima može imati definirano prostorno uređenje prije i poslije vezanja supstrata (slika B), ali može i mijenjati prostorno uređenje nakon povezivanja sa supstratom (slika C). Općenito postoje četiri vrste aminokiselina u sastavu nekog enzima:

- *Indiferentne* ne sudjeluju u aktivnosti enzima. Može ih se odstraniti bez umanjenja enzimске aktivnosti.
- *Konformacijske* služe kao potpora funkcijskim aminokiselinama. Može ih se odstraniti, a enzimska aktivnost je i dalje prisutna, međutim enzim postaje vrlo osjetljiv i nepostojan.
- *Pomoćne* aminokiseline nemaju kontakt sa supstratom, ali pomažu pokretljivosti aminokiselinama u blizini aktivnog mjesta. Bez njih enzim uglavnom gubi katalitičku moć.
- *Kontaktne* aminokiseline izgrađuju aktivno mjesto i u direktnom su kontaktu sa supstratom. Ove aminokiseline osiguravaju katalitičku moć enzima.

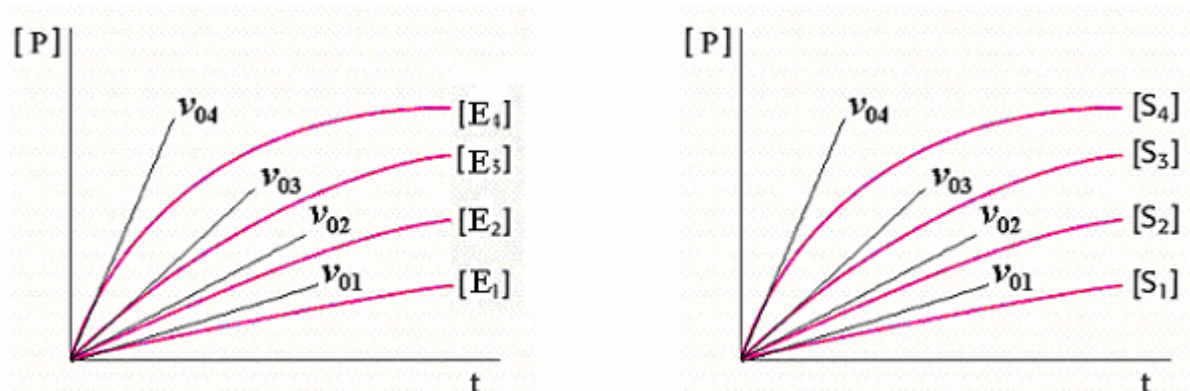
6.2. Enzimski kinetika

Brzina enzimske reakcije se izražava preko količine supstrata S promijenjenog u produkt P u jedinici vremena. Ova brzina ovisi o koncentraciji enzima [E], koncentraciji supstrata [S] i o afinitetu enzima za supstrat.



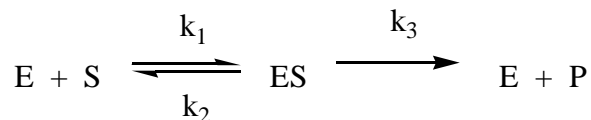
6.2.1. Utjecaj koncentracije enzima i supstrata na brzinu enzimske reakcije. Početna brzina enzimske reakcije (v_0) proporcionalno ovisi o koncentraciji enzima. Pri konstantnoj koncentraciji supstrata, maksimalna brzina enzimske reakcije raste s porastom koncentracije enzima do neke određene vrijednosti, nakon čega ostaje konstantna. Maksimalna brzina enzimske reakcije ovisi o prirodi i koncentraciji enzima.

Ako se povećava koncentracija supstrata ($[S_4] > [S_3] > [S_2] > [S_1]$), a da koncentracija enzima ostaje nepromijenjena, tada početna brzina nastajanja produkta enzimske reakcije v_0 raste analogno s porastom koncentracije supstrata.



Brzina enzimske reakcije raste progresivno da bi dostigla maksimalnu vrijednost koja ne ovisi o daljnjem povećanju koncentracije supstrata. Maksimalna brzina enzimske reakcije također ovisi o prirodi i koncentraciji enzima.

6.2.2. Michaelis-Mentenova pretpostavka. Michaelis i Menten su predložili jednostavan model za razrješenje kinetike enzimski kataliziranih kemijskih reakcija:



Enzim se spaja sa supstratom i stvara enzim-supstrat kompleks uz konstantnu brzinu reakcije k_1 . Enzim supstrat kompleks može disociirati na enzim i supstrat uz konstantu brzine k_2 ili nastaviti dalje prema stvaranju produkta uz konstantu brzine k_3 . U stacionarnom stanju brzina stvaranja enzim-supstrat kompleksa je jednaka brzini njegovog raspadanja

$$v_{\text{stvaranja}} = v_{\text{raspadanja}}$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

Iz dobivene jednadžbe može se izvesti

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

gdje je $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ nova konstanta, nazvana Michaelisova konstanta.

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Ako s $[E_T]$ označimo ukupnu koncentraciju enzima u sustavu, tada je koncentracija slobodnog enzima u reakcijskom sustavu jednaka:

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

pa se za Michaelisovu konstantu može pisati sljedeći izraz:

$$\begin{aligned} K_M &= \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{[ES]} \\ &= \frac{[E_T][S]}{[ES]} - \frac{[ES][S]}{[ES]} \\ &= \frac{[E_T][S]}{[ES]} - [S] \quad \Rightarrow \quad K_M + [S] = \frac{[E_T][S]}{[ES]} \end{aligned}$$

odnosno:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}$$

Ako se brzina enzimske reakcije izrazi preko brzine stvaranja produkta, odnosno brzine raspadanja enzim-supstrat kompleksa $v = k_3[ES]$ tada se dobije izraz:

$$v = k_3 \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}$$

U stacionarnom stanju kada je sav enzim zasićen supstratom ($[ES] = [E_T]$) postiže se maksimalna brzina enzimske reakcije ($v_{\max} = k_3 [E_T]$), a u svakom momentu enzimske reakcije za brzinu vrijedi takozvana Michaelis-Mentenova jednačba:

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

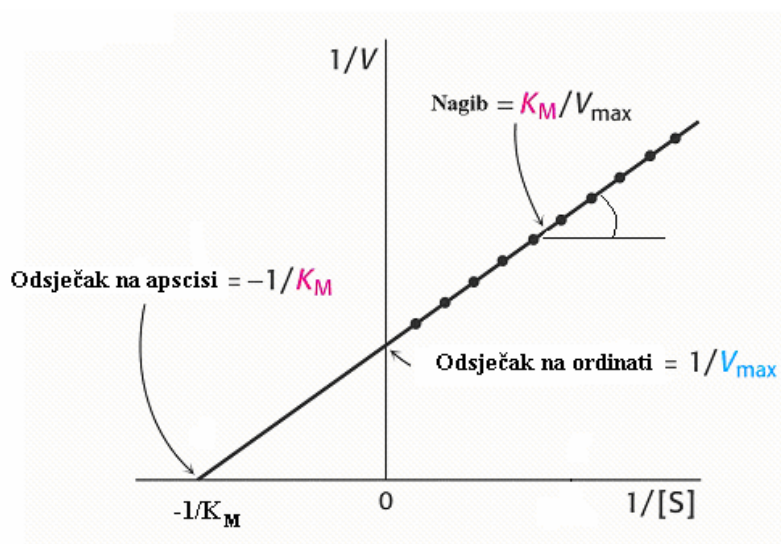
6.2.3. Grafičko određivanje Michaelisove konstante i maksimalne brzine. Michaelis-Mentenova jednačba može se pisati u obliku jednačbe pravca

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{\max}} \quad (y = ax + b)$$

To je Lineweaver i Burkov pravac koji predstavlja funkciju $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ u kojoj je

odsječak na ordinati $b = \frac{1}{v_{\max}}$, dok je nagib $a = \frac{K_M}{v_{\max}}$.

Grafički prikaz ove jednačbe omogućava određivanje Michaelisove konstante K_M i maksimalne brzine reakcije:



Praktično određivanje pravca je moguće kada se eksperimentalno odredi tri ili više vrijednosti brzine reakcije (v) u funkciji koncentracija supstrata (S).

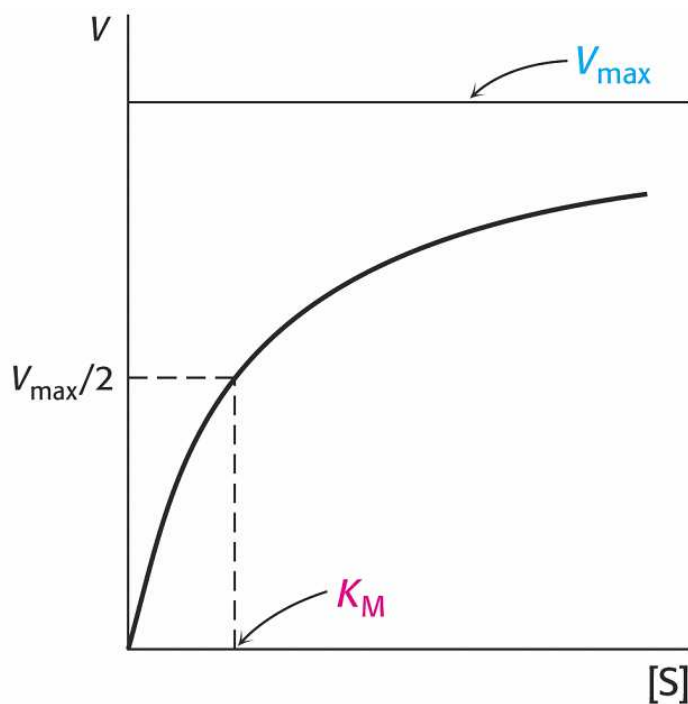
6.2.4. Značenje Michaelisove konstante. Prema definiciji Michaelisova konstanta je jednaka

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

k_2 i k_3 su konstante brzine reakcije prvog reda koje se izražavaju jedinicama s^{-1}
 k_1 je konstanta brzine reakcije drugog reda i ona se izražava jedinicama $L s^{-1} mol^{-1}$

$$K_M = \frac{s^{-1} + s^{-1}}{s^{-1} \cdot mol^{-1}} = \frac{1}{mol^{-1}} = mol L^{-1}$$

K_M predstavlja koncentraciju supstrata $[S]$ pri kojoj je pola aktivnih mjesta na enzimu ispunjeno supstratom i kada enzim postiže polovicu maksimalne brzine reakcije.



Kada se jednom odredi vrijednost K_M , tada se može izračunati frakcija popunjenih aktivnih mjesta na enzimu pri svakoj koncentraciji supstrata.

$$f_{ES} = \frac{v}{v_{max}}$$

K_M konstanta određuje koliki je afinitet enzima za supstrat. Kada je veći K_M tada je manji afinitet enzima za supstrat i obrnuto. Afinitet uglavnom ovisi o konstantama brzine reakcije k_1 i k_2 , dok brzina stvaranja produkta P, tj. brzina enzimske reakcije ovisi o konstanti brzine k_3 . Zato se konstanta k_3 naziva katalitička konstanta brzine i često označava s k_{kat} . Ona određuje

broj molekula supstrata promijenjenih u jedinici vremena na jednoj molekuli enzima. Poznata je kao prometni broj enzima.

6.3. Moduliranje enzimske aktivnosti

Pokretanje neke enzimske reakcije, njeno odvijanje i brzina kojom se odvija ovise o prirodi enzima i njegovog supstrata, ali i od uvjeta sredine u kojoj se odvija. Faktori koji utiču na enzimsku aktivnost dijele se na: enzimsku reverzibilnost, enzimsku specifičnost, fizičke uvjete sredine i utjecaj kemijskih tvari.

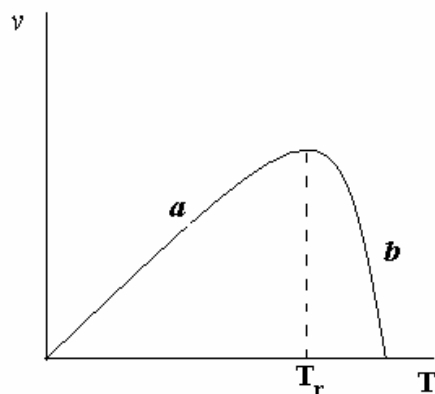
6.3.1. Reverzibilnost enzimskih aktivnosti. Sve biokemijske reakcije su reverzibilne, a enzimi kataliziraju reakcije u oba smjera i pri tome ubrzavaju uspostavljanje kemijske ravnoteže bez promjene konstante kemijske ravnoteže. Ako ova reverzibilnost nije uvijek uočljiva, razlog je što se produkti enzimskih reakcija uglavnom dalje koriste kao supstrati nekih drugih reakcija.

6.3.2. Specifičnost enzimskih reakcija. Neki enzim katalizira samo jednu određenu kemijsku reakciju ili grupu sličnih reakcija, a specifičnost prema supstratu je uglavnom potpuna, tolika da je potrebno zadovoljiti i stereospecifičnost. Enzim djeluje samo na određeni optički izomer. Npr. ako selektivno djeluje na L-alanin, tada ne djeluje na D-alanin. Enzimi se uglavnom dijele prema specifičnosti enzimskih reakcija u šest velikih grupa:

- a) *Oksidoreduktaze* kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije.
- b) *Transferaze* kataliziraju transport kemijskih grupa s molekule na molekulu.
- c) *Hidrolaze* kataliziraju povezivanje vode sa supstratom.
- d) *Liaze* kataliziraju transport kemijskih grupa na supstrat uz nastajanje dvostruke veze.
- e) *Izomeraze* kataliziraju međumolekularno preuređenje.
- f) *Ligaze* kataliziraju reakcije sinteze i nastajanje kemijskih veza C-C, C-O, C-S, C-N.

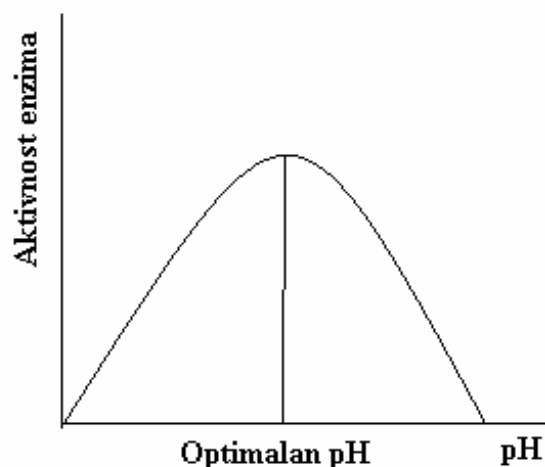
6.3.3. Fizički uvjeti sredine. Kao i druge kemijske reakcije, enzimske reakcije ovise o fizičkim uvjetima sredine u kojoj se odvijaju.

a) *Utjecaj temperature:* Enzimske reakcije se ubrzavaju s povišenjem temperature, ali samo do određene vrijednosti, jer na višim temperaturama počinje denaturacija apoenzima (proteinskog dijela). Dijagram temperaturene ovisnosti ima tipičan izgled.



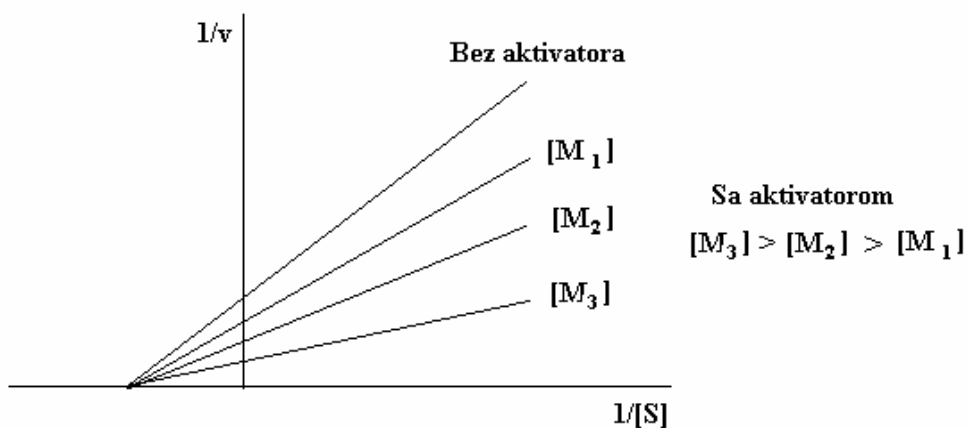
- a) Rastući dio krivulje je podložan Arrheniusovom zakonu $\left(\ln k = -\frac{\Delta G^0}{RT} \right)$ koji kaže da brzina kemijske reakcije raste u prosjeku dva puta pri porastu temperature za 10 °C.
- b) Opadajući dio krivulje odgovara progresivnoj inaktivaciji enzima radi razgradnje proteinskog dijela uslijed povišenja temperature (T_r - temperatura razgradnje)

b) Utjecaj pH: Ako se odredi brzina enzimske reakcije u ovisnosti o pH sredine u kojoj se odvija može se primijetiti da aktivnost enzima raste, prolazi kroz maksimum, a zatim opada. Može se zaključiti da za neku enzimsku reakciju postoji optimalan pH pri kojem je enzim najaktivniji.



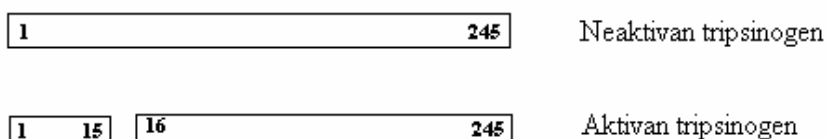
6.3.4. Utjecaj kemijskih tvari. Na enzimske reakcije mogu utjecati kemijske tvari koje se mogu naći u reakcijskoj smjesi.

a) Aktivatori enzimske aktivnosti po prirodi su vrlo različiti. Jedni su pravi aktivatori (npr. metalni ioni), a drugi su u stvari anti inhibitori (npr. cijanidni ion). Aktivatori uglavnom ubrzavaju enzimske reakcije, a da pri tom ne mijenjaju afinitet enzima za supstrat (Michaelisova konstanta ostaje nepromijenjena).

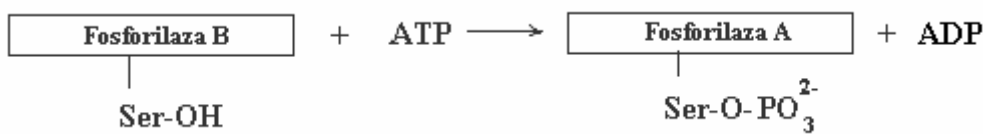


b) Aktivacija metalnim ionima. Mnogi enzimi se aktiviraju metalnim ionima. Praktično sve kinaze se aktiviraju s Mg^{2+} ionom koji se veže na ATP molekulu i pokreće enzimsku reakciju. Alkohol dehidrogenaze se aktiviraju sa Zn^{2+} , a piruvat dekarboksilaze s Mn^{2+} itd.

c) Zimogena aktivacija. Ova aktivacija je interesantna jer omogućava specijaliziranim stanicama da sintetiziraju enzime u neaktivnom obliku i tako se zaštite od autoproteolize. To je slučaj s proteolitičkim enzimima koji se poslije izlučivanja u ekstracelularni prostor mijenjaju iz neaktivnog enzima (zimogen) u aktivni enzim. Npr. enzimski neaktivni prekursor kimotripsinogen skraćivanjem peptidnog lanca cijepanjem samo jedne peptidne veze prelazi u aktivni π -kimotripsin.

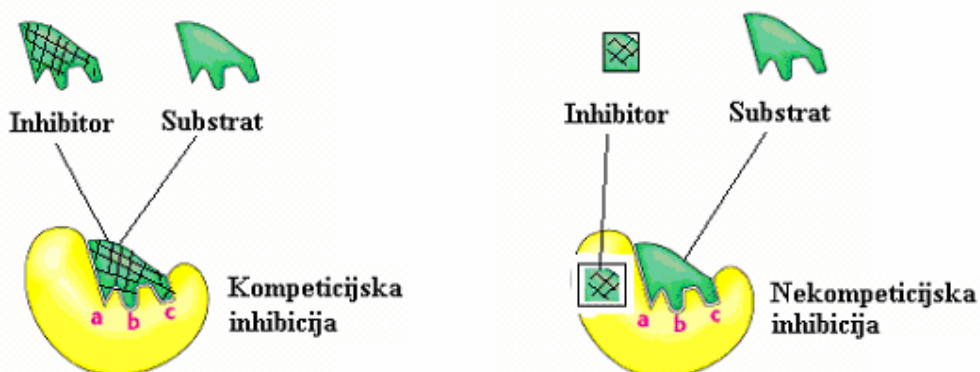


d) Kovalentna aktivacija. Aktivnost enzima se može regulirati kovalentnom ugradnjom neke kemijske skupine u neaktivan enzim. Npr. aktivacija fosforilaze, enzima koji katalizira metabolizam glikogena.

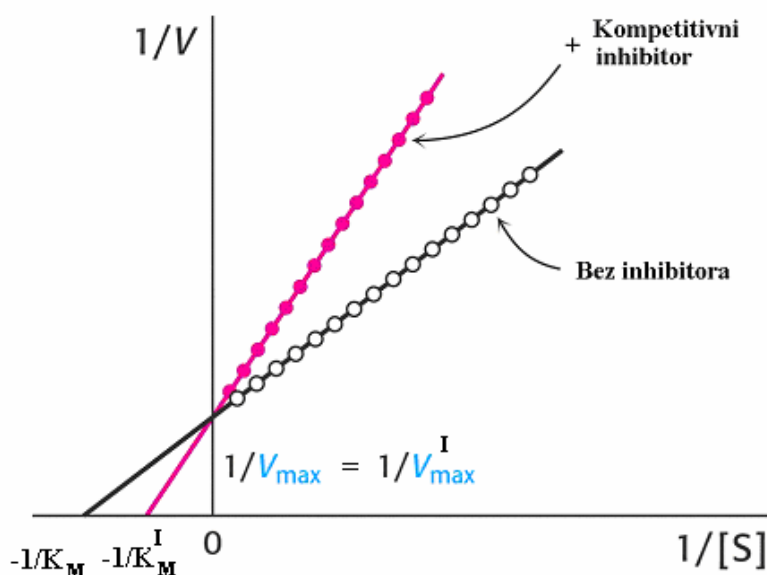


6.4. Inhibitori enzimske aktivnosti

Inhibitori enzimske aktivnosti djeluju na vrlo različite načine. Ireverzibilni inhibitori trajno denaturiraju enzim i prekidaju njegovu aktivnost. To su uglavnom kemijske tvari koje denaturiraju proteinski dio enzima i nemaju neki poseban značaj u biokemiji. Reverzibilni inhibitori utječu na enzimsku kinetiku i mogu čak zaustaviti kataliziranu reakciju, ali ova inhibicija može biti kontrolirana. Interes za reverzibilnim inhibitorima je vrlo velik jer omogućavaju mijenjanje enzimske aktivnosti nekog enzima u danom trenutku što omogućava mnoge praktične primjene. Razlikuju se dva tipa inhibitora: kompetitivni i nekompetitivni.



6.4.1. Kompetitivna inhibicija. Kompetitivni inhibitor je neki kemijski spoj po strukturi sličan supstratu koji se može smjestiti u aktivno mjesto enzima. Na nivou aktivnog mjesta enzima dolazi do natjecanja između supstrata i inhibitora.



U kompetitivnoj inhibiciji mijenja se Michaelisova konstanta, dok maksimalna brzina reakcije ostaje jednaka. Michaelis-Menten jednadžba ima sjedeći izraz

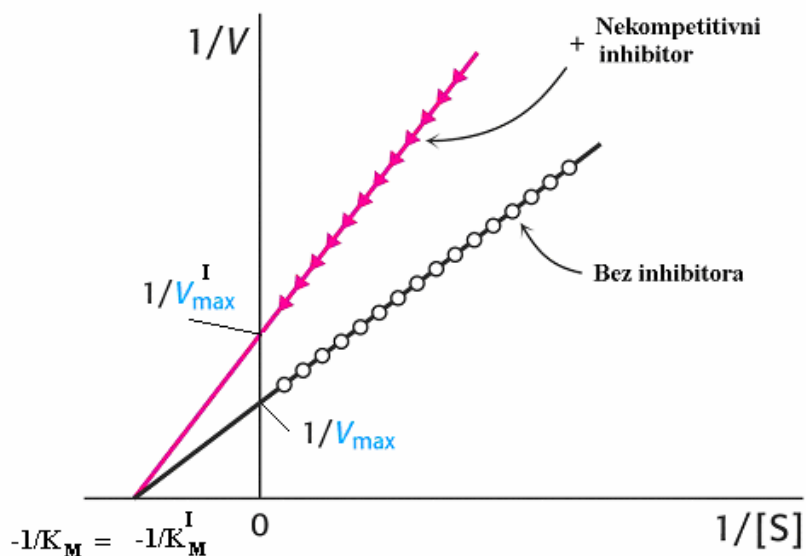
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{[S]}$$

gdje je $[I]$ koncentracija inhibitora, a K_I konstanta disociranja kompleksa enzim-inhibitor. Michaelisova konstanta (K_M^I) uz inhibitor se povećava pa se odsječak na x-osi smanjuje.

$$K_M^I = \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M^I}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{Lineweaver i Burkov pravac koji opisuje kompetitivnu inhibiciju.}$$

6.4.2. Nekompetitivna inhibicija. Pri ovoj inhibiciji inhibitor se ne veže na aktivno mjesto supstrata i nema natjecanja između supstrata i inhibitora. Inhibitor se veže izvan aktivnog mjesta i afinitet enzima za supstrat nije promijenjen. U ovakvim uvjetima inhibitor se može vezati na enzim-supstrat kompleks, kao što se i supstrat može vezati na enzim-inhibitor kompleks (na enzimu mogu istovremeno biti vezani i inhibitor i supstrat).



U nekompetitivnoj inhibiciji mijenja se maksimalna brzina reakcije dok Michaelisova konstanta K_M ostaje nepromijenjena. Maksimalna brzina se smanjuje pa se odsječak na osi y povećava.

$$v_{\max}^I = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}^I} + \frac{K_M}{v_{\max}^I} \cdot \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{[S]}$$

7. POGLAVLJE

KOFAKTORI I VITAMINI

Svi enzimi su proteinske naravi, jedni su izgrađeni samo od aminokiselina (npr. enzim ribonukleaza, lizozim itd.) i oni se nazivaju holoproteini. Drugi, heteroproteini su izgrađeni od proteinskog dijela apoenzima i neproteinskog dijela kofaktora. Povezivanje apoenzima s kofaktorom daje aktivni enzim koji se naziva holoenzim.

7.1. Zajednička svojstva svih kofaktora

- Kofaktori nisu proteini.
- To su termo-stabilni spojevi za razliku od apoenzimskog proteinskog dijela koji je termo-labilan.
- Kofaktori sudjeluju u enzimskoj reakciji reagirajući sa supstratom u aktivnom mjestu.
- Kofaktori nisu odgovorni za specifičnost enzimske reakcije.
- Kofaktori se potpuno razlikuju od reakcijskog supstrata.
- Većina kofaktora su izgrađeni od cikličkih i heterocikličkih jezgri. Najčešće, ovi se spojevi ne mogu sintetizirati u ljudskom organizmu i moraju se unositi s hranom. Mnogi kofaktori su derivati u vodi topljivih vitamina

7.2. Podjela kofaktora

- koenzimi
- metalni ioni (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} itd).

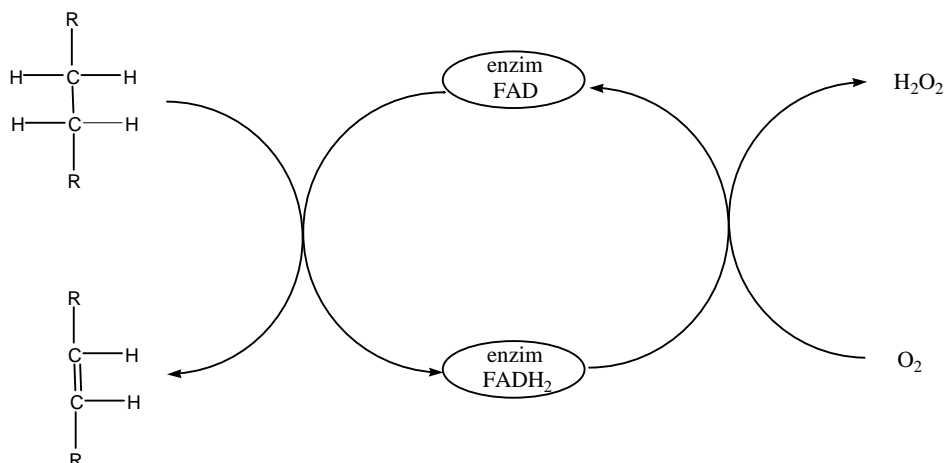
7.3. Podjela koenzima po načinu djelovanja

- prostetičke skupine
- kosupstrati

7.3.1. Specifična svojstva prostetičkih skupina. Posebna svojstva prostetičkih skupina su:

- prostetička skupina je kovalentnim vezama trajno vezana na apoenzim
- prostetička skupina djeluje u okviru jedinstvene enzimske reakcije koja se odvija u dva dijela:
 - promjena strukture
 - povratak u početno stanje

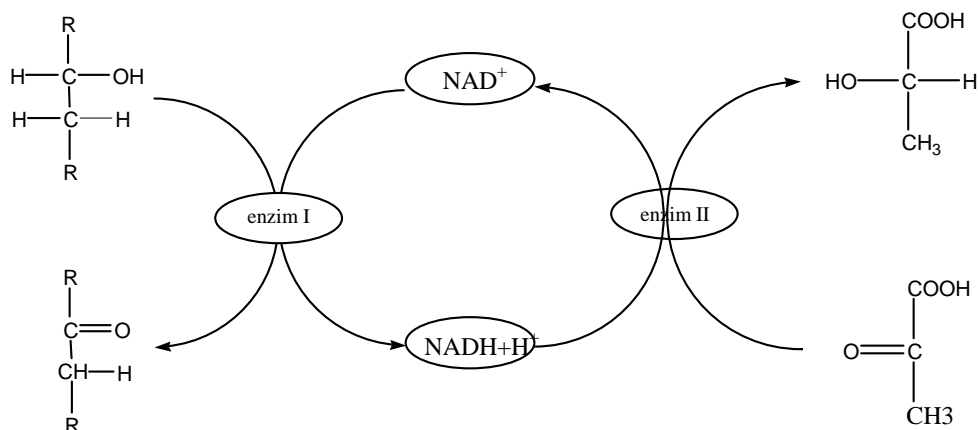
pri tome prostetička skupina ne disocira s apoenzima.



Djelovanje FAD (flavin-adenin dinukletid) kao prostetičke skupine

7.3.2. Specifična svojstva kosupstrata. Posebna svojstva prostetičkih skupina su:

- Kosupstrati su slabo vezani za apoenzimski dio i lako disociraju.
- Kosupstrati se nikad ne vraćaju u početno stanje, a da ostaju udruženi s apoenzimom s kojim su sudjelovali u enzimskoj reakciji. Oni disociraju s tog apoenzima i vežu se na drugi apoenzim gdje se regeneriraju.

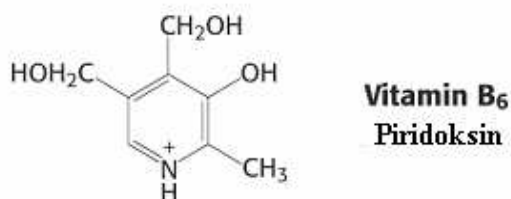


Djelovanje NAD^+ (nikotinamid-adenin dinukleotid) kao kosupstrata

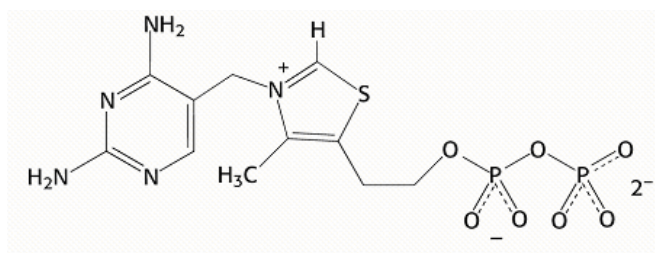
7.4. Podjela koenzima po biološkoj funkciji

7.4.1. Koenzimi prijenosnici funkcijskih skupina. Prijenos funkcijskih skupina je jedan od osnovnih biokemijskih procesa. Enzimi transferaze kataliziraju ove procese u kojima je uloga koenzima da privremeno prihvati metaboliziranu frakciju nekog supstrata i da je prenese na drugi supstrat. Tijekom ovog intermedijernog stanja, dio supstrata koji se prenosi je u aktiviranom ili koenzimskom obliku. Koenzimi kao prijenosnici funkcijskih skupina su relativno malobrojni i imaju vrlo bitnu ulogu u metabolizmu. Većina su derivati u vodi topljivih vitamina (vitamin B₆, B₁, koenzim A, folna kiselina, vitamin B₁₂, biotin) te nukleozidi, nukleotidi ili polinukleotidi.

a) **Vitamin B₆** igra bitnu ulogu pri prijenosu aminokiselina u njihovom metabolizmu. Funkcionalna struktura ovog koenzima je piridoksal fosfat koji je u stvari esterski derivat vitamina B₆ i fosforne kiseline.

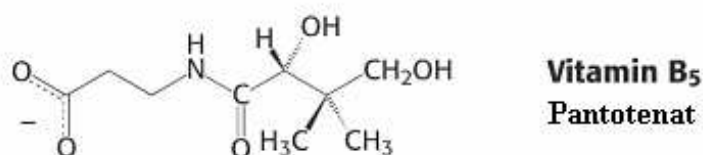


b) **Vitamin B₁** ili tiamin djeluje u metaboličkim promjenama raznih molekula. Njegova funkcionalna struktura je aktivni derivat fosforne kiseline tiamin pirofosfat:

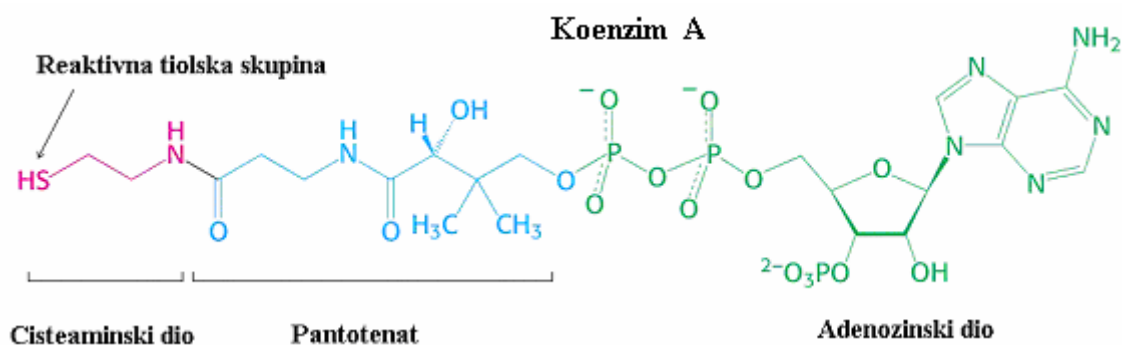


Djelovanje tiamin pirofosfata se uvijek svodi na prijenos aldehidne skupine s tri glavna supstrata: piruvat, α -ketoglutarat i ksiluloza-5-fosfat. Uz djelovanje enzima piruvat-dekarboksilaze, α -ketoglutarat dekarboksilaze i transketolaze omogućena je metabolička transformacija ovih supstrata. Tiamin pirofosfat je uvijek čvrsto vezan za navedene apoenzime s kojima funkcionira kao prostetička skupina.

c) **Koenzim A** u svome sastavu ima molekulu pantotenske kiseline (vitamin B₅) i cisteamina (aktivni dio molekule). Uloga koenzima A je da pri metaboličkim promjenama prenosi acilne skupine. Tu ulogu obavlja pomoću reaktivne tiolne SH skupine u cisteaminu.



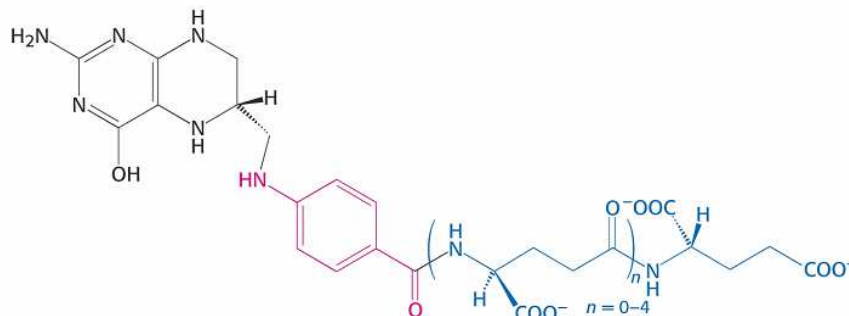
Od svih uloga, najvažnija uloga koenzima A je prijenos acetilne jedinice i njeno uvođenje u ciklus limunske kiseline.



Na sličan način prenosi i ostale acilne jedinice (npr. pri metaboličkim promjenama masnih kiselina). Koenzim A ima bitnu ulogu u biosintezi i katabolizmu masnih kiselina, dekarboksilaciji piruvata, metabolizmu cisteina, biosintezi biotina itd.

d) Folna kiselina ili tetrahidrofolat također pripada vitaminima grupe B. Koenzimi folne kiseline imaju dvostruku ulogu:

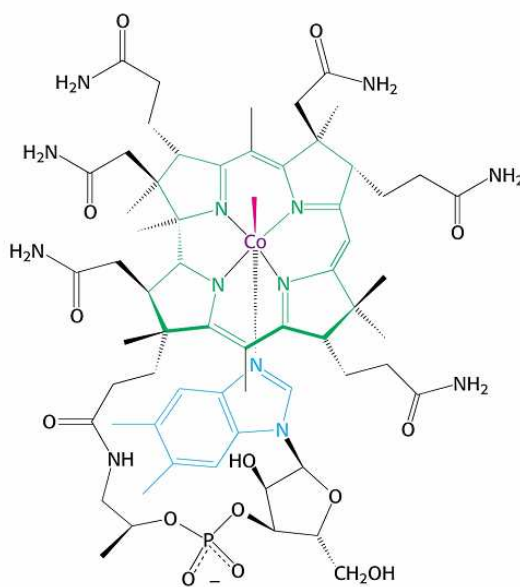
- prenose monougljikove skupine sa supstrata na supstrat
- kataliziraju njihove međusobne transformacije



Koenzimi folne kiseline prenose formil (-CHO), formimino (-CH=NH) i hidroksi-metil (-CH₂OH) skupine.

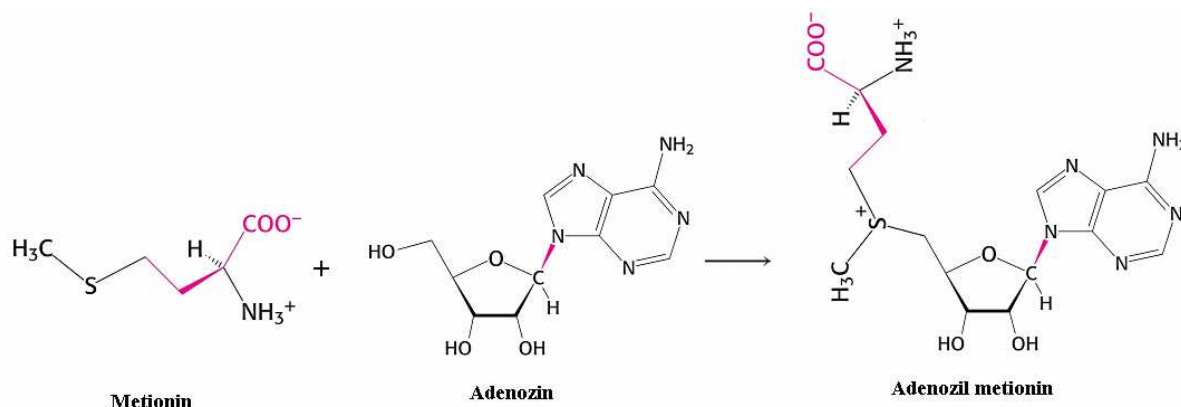
e) Vitamin B₁₂ je koenzim koji ima kompleksnu molekulu čiji aktivni dio sadrži Co ion koji u trenutku aktivnosti mijenja oksidacijsko stanje $\text{Co}^{3+} \rightleftharpoons \text{Co}^{2+}$. Ovaj koenzim reagira na tri različita načina, ovisno o apoenzimu:

- katalizira reakcije izomerizacije monougljikovih skupina
- katalizira redukcije radikala
- katalizira transport metil radikala

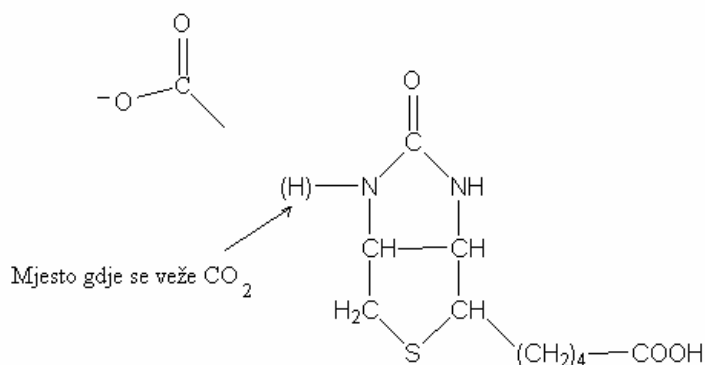


vitamin B₁₂

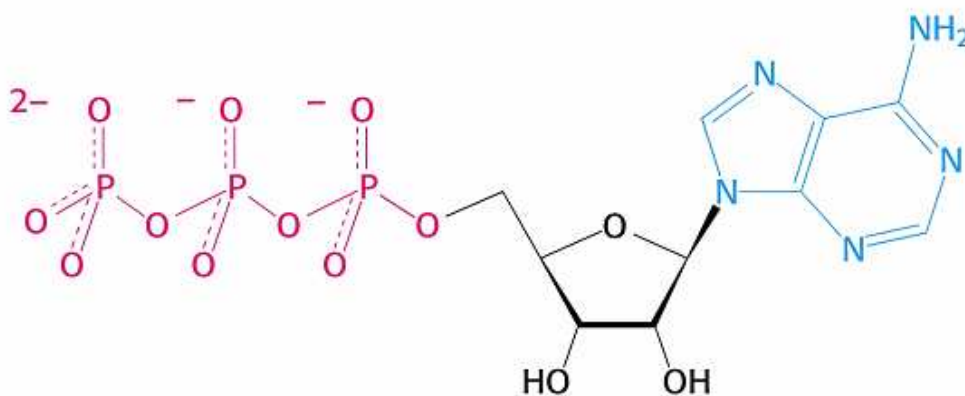
f) **Adenozil metionin** je specifičan koenzim koji ima važnu ulogu u intermedijernom metabolizmu prijenosa metilne skupine $-\text{CH}_3$.



g) **Biotin ili vitamin H** je koenzim koji prenosi CO_2 . S apoenzimom je povezan amidnom vezom između njegove karboksilne skupine i lizinskog R ostatka na apoenzimu.

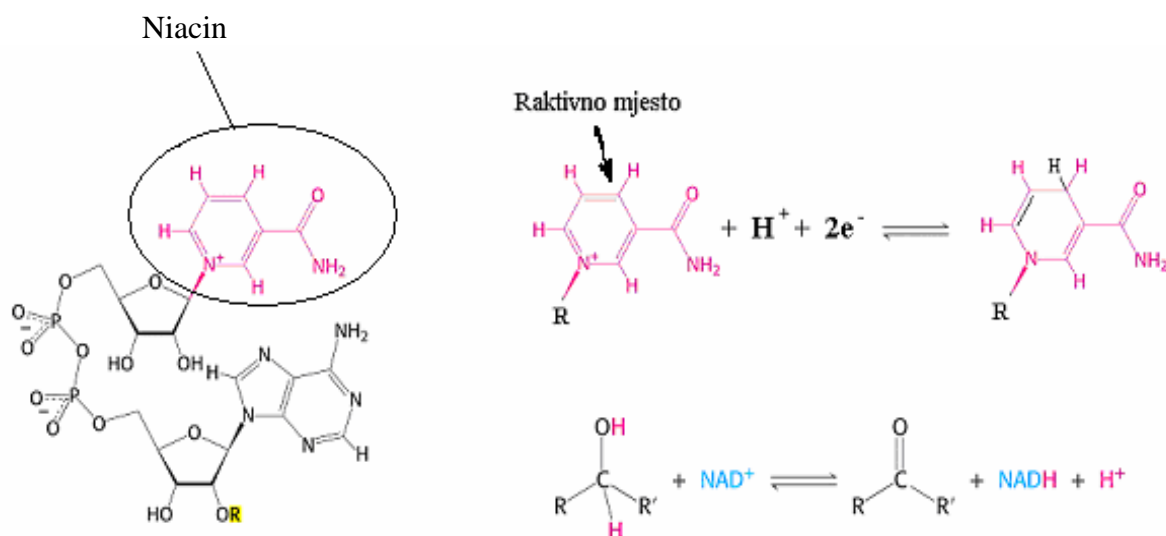


h) **Adenozin trifosfat u ulozi koenzima.** Pored energetske uloge, ATP ima visok potencijal za prijenos raznih skupina. Tijekom kataliziranih reakcija, ovisno o apoenzimu, može prenositi ortofosfatnu i pirofosfatnu skupinu, adenozilni ostatak i adenozin monofosfat.



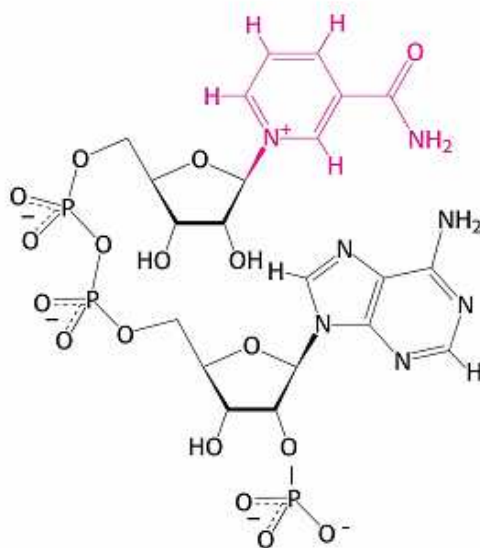
7.4.2. Oksidoredukcijski koenzimi. Ovi koenzimi su povezani s biološkim procesima oksidacije i redukcije. U većini slučajeva djeluju u mitohondrijima u procesu disanja i oksidacijske fosforilacije.

a) Niacin ili nikotinat je vitaminski prekursor vrlo važnog piridinskog koenzima nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD^+), koji igra vrlo važnu ulogu pri prijenosu elektrona u biološkim oksido-redukcijskim procesima. Nikotinamidski dio molekule prenosi elektrone i protone.



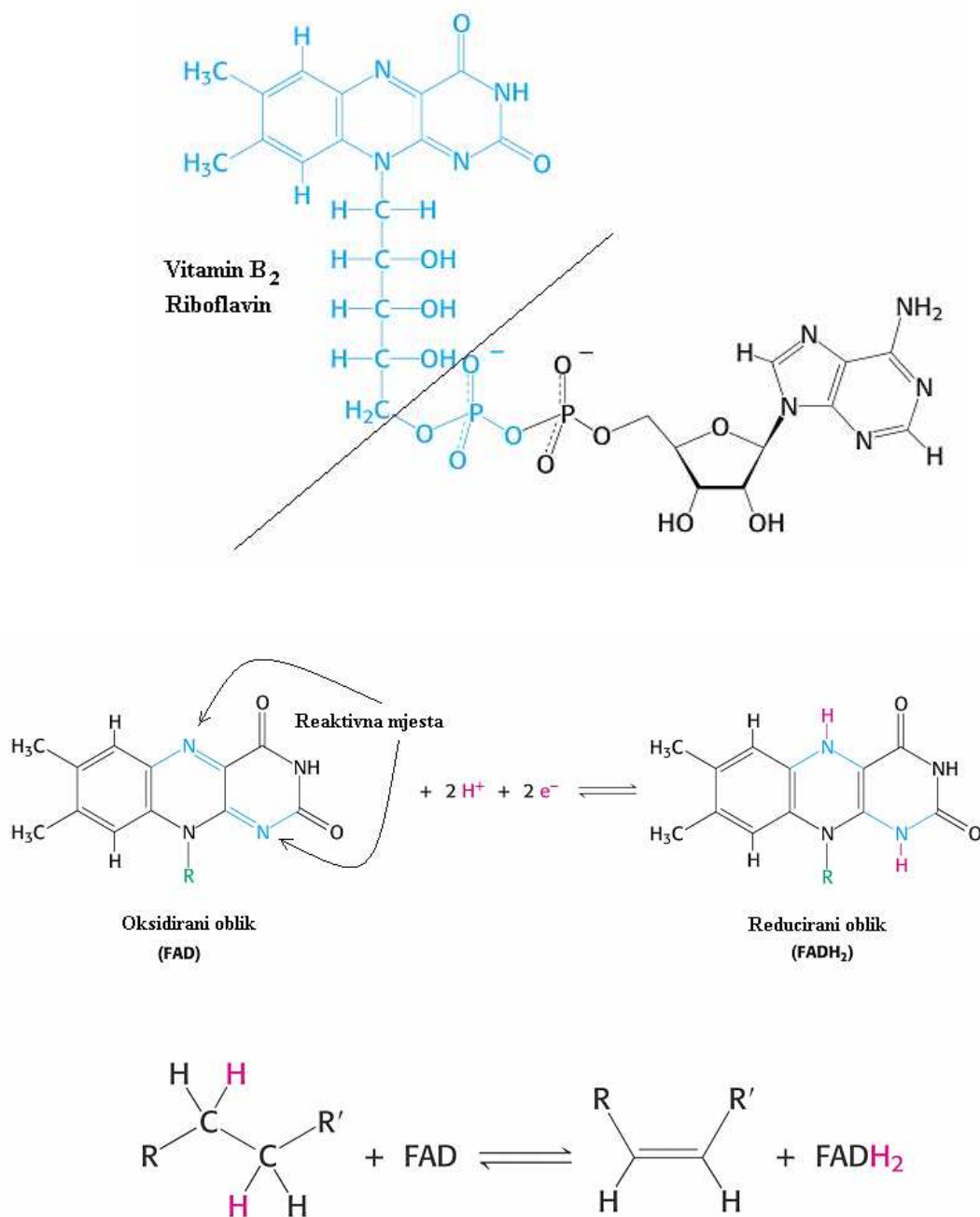
Nikotinamid-adenin dinukleotid je koenzim koji se uglavnom ponaša kao kosupstrat, a sudjeluje u kataboličkim procesima dehidrogenacije različitih supstrata.

b) Nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat ($NADP^+$). Razlikuje se od NAD^+ samo po fosfatnoj skupini koja se nalazi vezana na drugom C atomu u ribози.

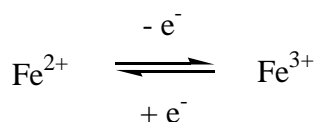


$NADP^+$ sudjeluje u oksido-redukcijskim procesima na sličan način kao i NAD^+ , međutim on ne sudjeluje u kataboličkim, već se uglavnom susreće u biosintetskim procesima.

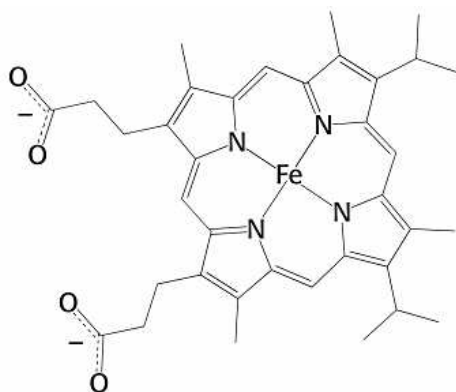
c) **Vitamin B₂ ili riboflavin** je prekursor drugog važnog oksido-redukcijskog koenzima flavin adenin dinukleotida (FAD), koji je u katalitičkim procesima uglavnom čvrsto vezan na apoenzim i ponaša se kao prostetička skupina. Flavinski dio molekule prima elektrone i protone.



d) **Oksido-redukcijski koenzimi koji u sastavu imaju skupinu hem.** Oksido-redukcijski koenzimi, koji u sastavu imaju skupinu hem, prenose elektrone pri biološkim procesima tako da željezo iz porfirinske jezgre hema pri tome može mijenjati oksidacijsko stanje ili ostati nepromijenjeno. Kod različitih citokroma oksidacijsko stanje željeza se mijenja



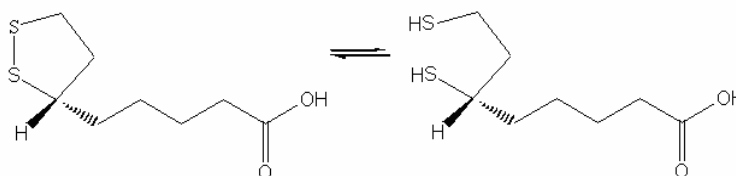
dok kod katalaze, peroksidaze i raznih oksidaza željezo je uvijek u trovalentnom stanju (Fe^{3+}). Porfirinske jezgre kod svih ovih enzima su uglavnom čvrsto vezane za apoenzim i ponašaju se kao prostetičke skupine.



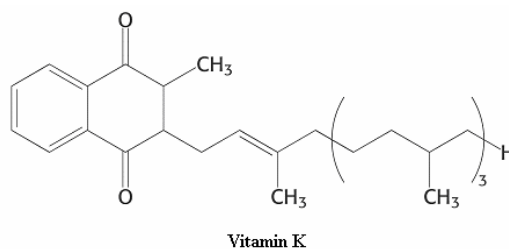
Ovi oksido-redukcijski koenzimi imaju vrlo važnu ulogu u procesu disanja, u respiracijskom lancu, prilikom konačnog sagorijevanja hranjivih sastojaka i prijenosa elektrona te stvaranja molekule vode i oslobađanja energije.

7.4.3. Ostali oksido-redukcijski koenzimi

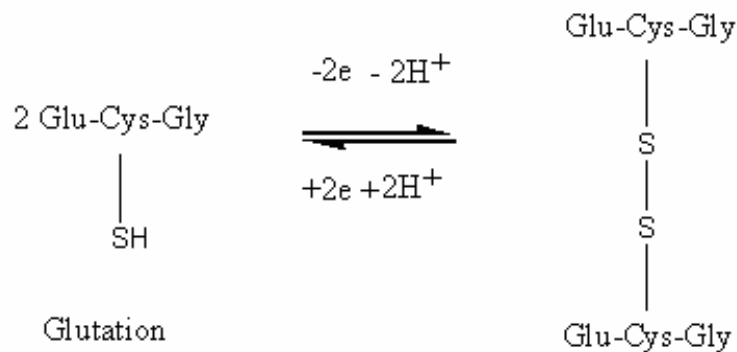
a) *Lipoidna kiselina* je koenzim koji prenosi vodik i acetilne skupine. U svome sastavu sadrži dva atoma sumpora koji su aktivni dijelovi molekule.



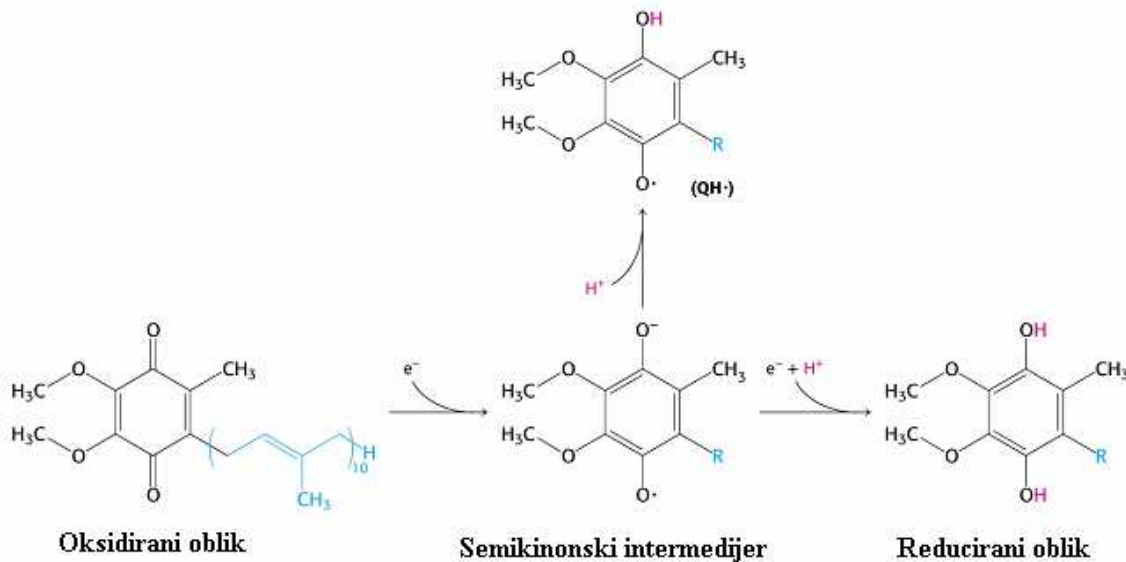
b) *Vitamin K* ili filokinon igra bitnu ulogu pri koagulaciji krvi. Njegova oksido-redukcijska aktivnost nije još poznata.



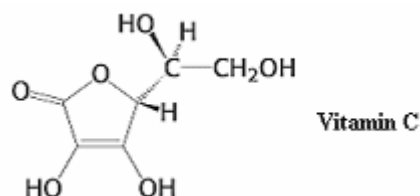
c) *Glutation* je tripeptid (Glu-Cys-Gly) koji lako i reverzibilno može otpustiti elektron i s drugom molekulom izgraditi disulfidni most



d) **Kinonski koenzimi** su derivati ubikinona ili koenzima Q koji se nalaze u mitohondrijima. To su reverzibilni oksido-redukcijski sustavi koji prenose vodik i elektrone, ali imaju bitnu ulogu u procesu oksidacijske fosforilacije pri sintezi ATP molekula. Oni djeluju između flavinskih enzima i citokroma C₁.

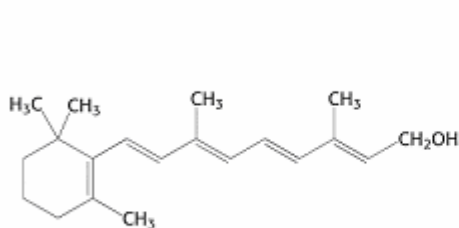


e) **Askorbinska kiselina ili vitamin C** je također reverzibilan oksido-redukcijski sustav za kojeg je poznato da u biljnom svijetu funkcionira kao koenzim, dok u životinjskom svijetu ta mu uloga još nije precizirana.

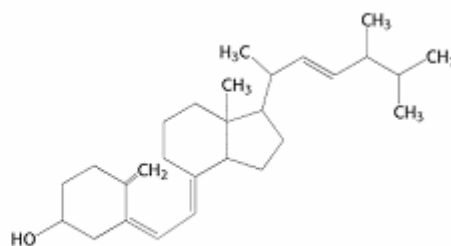


f) **Vitamin A i vitamin D** su nekoenzimski vitamini koji sudjeluju i u oksido-redukcijskim procesima i u prijenosu funkcijskih skupina. Vitamin A ima važnu biološku ulogu u mehanizmu biokemijskih procesa koji omogućavaju vid, dok je mehanizam

djelovanja vitamina D još nedovoljno istražen. Poznato je da igra bitnu ulogu u procesima okoštavanja i metabolizmu fosfora i kalcija. Prema sadašnjim spoznajama nije utvrđeno da vitamin A i vitamin D imaju koenzimsku ulogu.



Vitamin A



Vitamin D₂

8. POGLAVLJE

ŠEĆERI

Šećeri su organske molekule izgrađene od lanca ugljikovodika na kojem je vezano više hidroksilnih skupina i po jedna aldehidna ili keto skupina. Najmanji šećeri su trioze: dihidroksiacetone i gliceraldehid.



Šećeri su vrlo rasprostranjeni u prirodi i imaju višestruke biološke uloge:

- strukturni elementi: npr. celuloza u biljnom svijetu, a u životinjskom svijetu polisaharidi izgrađuju zaštitne opne i oklope
- energetska rezerva: glikogen kod životinja i škrob u biljnom svijetu
- osnovni intermedijeri metabolizma: npr. šećer riboza koja ulazi u izgradnju RNA, DNA i raznih koenzima
- uloga receptora raznih signala: na površini stanice glikoproteini i glikolipidi svojim šećernim dijelom molekule imaju ulogu receptora raznih kemijskih i električnih signala.

8.1. Podjela šećera

8.1.1. Jednostavni šećeri ili monosaharidi se dijele na aldoze i ketoze. Lanac od n C atoma ima $n-1$ hidroksilnu skupinu i ovisno o vrsti šećera, jednu aldehidnu ili jednu keto skupinu. Prema broju C atoma dijele se na trioze, tetroze, pentoze, heksoze i heptoze.

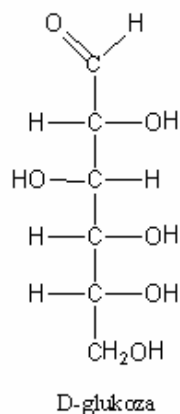
8.1.2. Složeni šećeri se dijele na holozide i heterozide. *Holozidi* su izgrađeni od više međusobno povezanih monosaharidnih jedinica koje se povezuju glikozidnom vezom. Prema složenosti dijele se na oligosaharide 2-10 jedinica i polisaharide više od 10 monosaharidnih jedinica. *Heterozidi (glikozidi)* su spojevi monosaharida ili oligosaharida s nekom nešećernom frakcijom koja se naziva aglikon.

8.2. Linearna struktura monosaharida

Od najjednostavnijih trioza gliceraldehida i dihidroksiacetona produživanjem C lanca dobivaju se tetroze, zatim pentoze i heksoze. U prirodi se uglavnom susreću samo D-oblici šećera.

Epimeri su strukture koje se međusobno razlikuju po prostornom uređenju samo jednog asimetričnog C atoma. Molekule ovih šećera razlikuju se samo po položaju OH skupine na

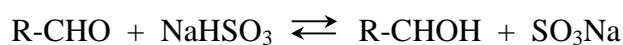
nekom C atomu. S druge strane, strukturni oblici L i D prema dogovoru određuju se prema položaju OH skupine na predzadnjem C atomu i to u usporedbi sa L i D gliceraldehidom.



8.3. Ciklična struktura monosaharida

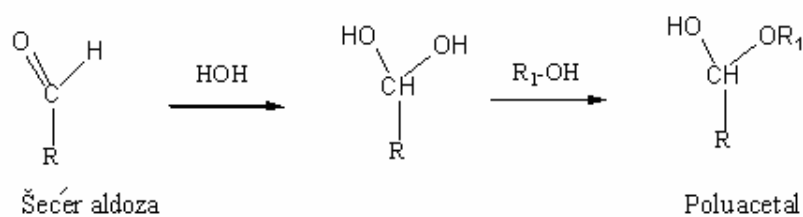
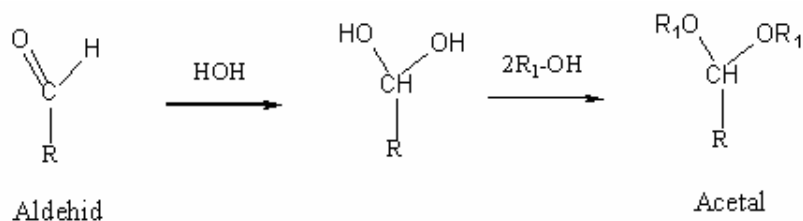
Linearno predstavljanje strukture monosaharida je zgodno, međutim nije kompletno. Određen broj svojstava monosaharida je moguće objasniti jedino imajući u vidu cikličnu strukturu:

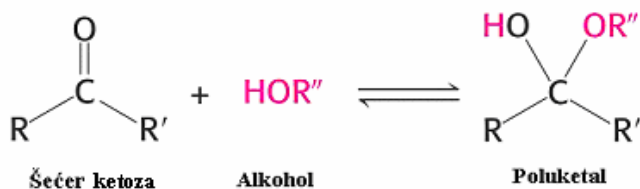
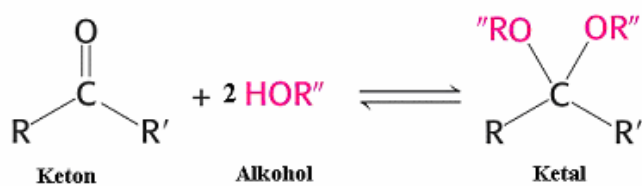
- Svi poznati aldehidi i ketoni pokazuju pozitivnu reakciju s natrijevim bisulfitom, dok šećeri ne pokazuju tu reakciju:



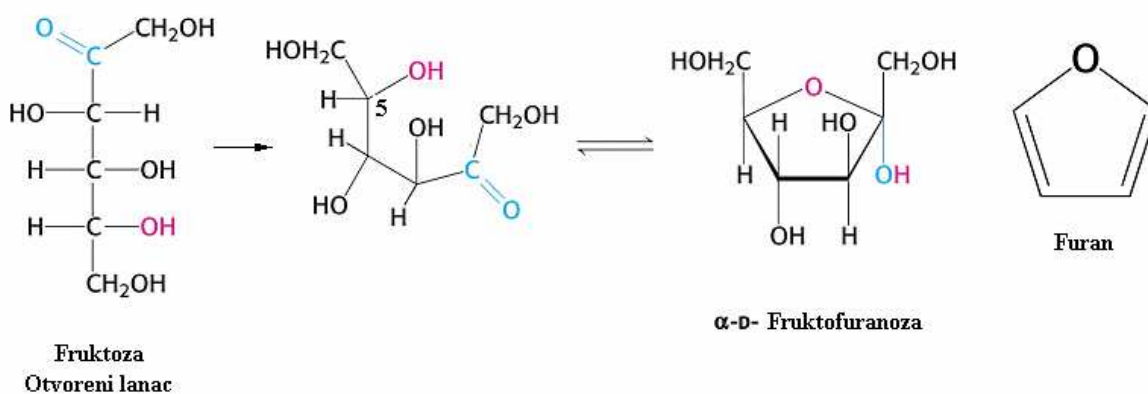
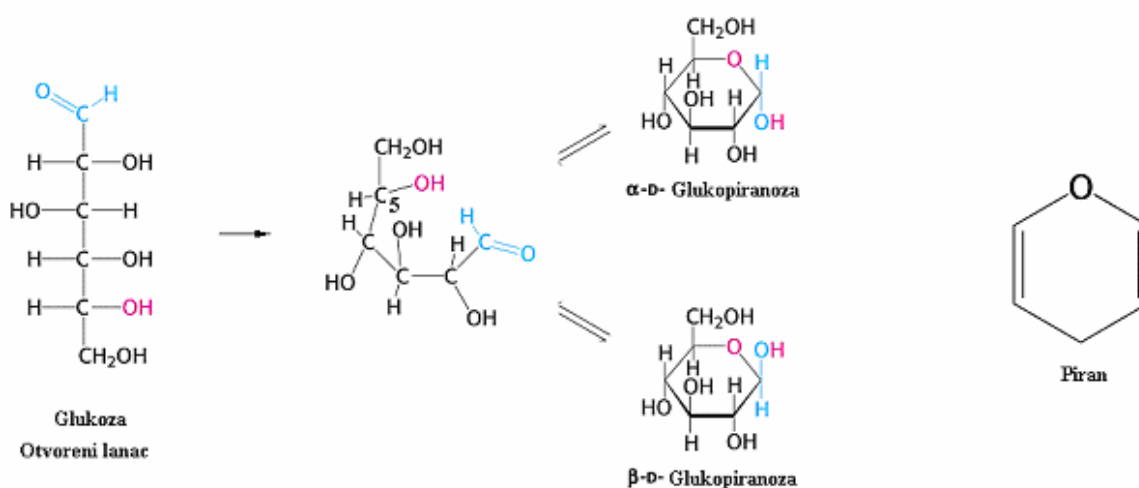
Očigledno je da aldehydne i keto skupine u šećerima nisu slobodne kao u ostalim aldehydima i ketonima, te stoga ne mogu reagirati s Na-bisulfitom.

- Aldehydi i ketoni u reakcijama s alkoholima grade acetale i ketale, dok šećeri mogu izgraditi samo poluacetale i poluketale.



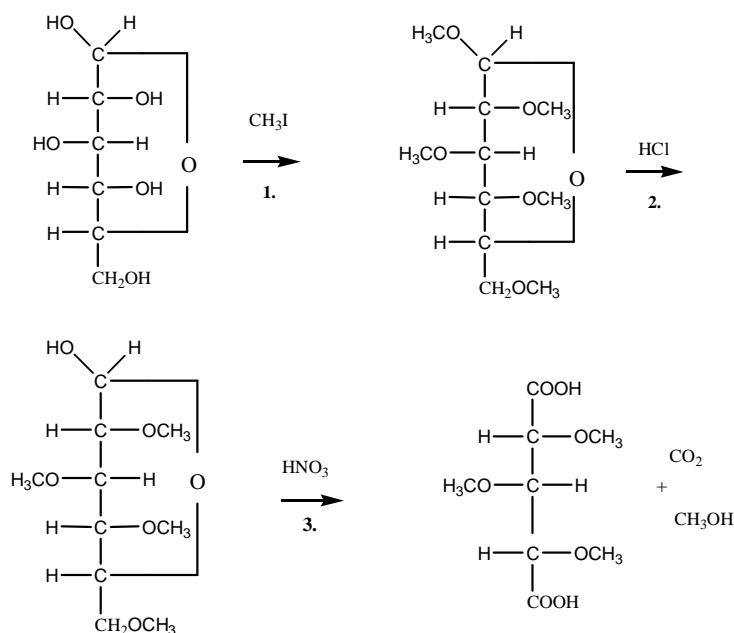


Postoje i drugi dokazi da aldehidna i keto skupina u šećerima nisu potpuno slobodne kao u ostalim aldehydima i ketonima. Razlog tome je što unutar molekule monosaharida postoji mogućnost reakcije aldehidne ili keto skupine s nekom od alkoholnih skupina. U toj reakciji dolazi do izgradnje cikličke strukture. Haworth je pokazao da kod heksoza zatvaranje prstena ide u reakciji s alkoholnom skupinom na petom C atomu, odnosno predzadnjem C atomu u lancu kod ostalih monosaharida.



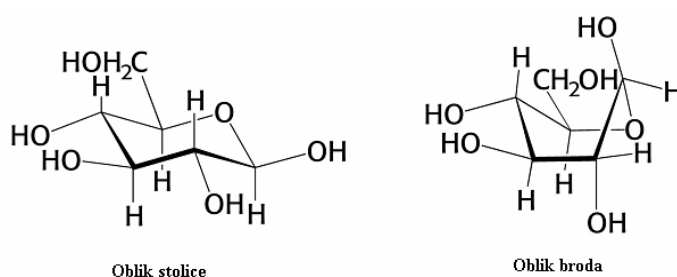
8.3.1. Haworth-ov eksperimentalni dokaz na sljedeći način pokazuje poziciju zatvaranja prstena:

1. Metiliranje slobodnih OH skupina. Hidroksilna skupina koja zatvara prsten ne reagira.
2. Hidroliza razrijeđenom HCl, regenerira se samo aldehidna OH skupina, ostale OH skupine ostaju metilirane
3. Oksidacija s HNO_3 nastaje trimetoksi glutarna kiselina kao dokaz 1-5 veze, inače bi nastala neka druga dikarboksilna kiselina s manje C atoma. Trimetoksi glutarna kiselina može nastati samo ako je poluacetalna veza između prvog i petog C atoma u glukozi.



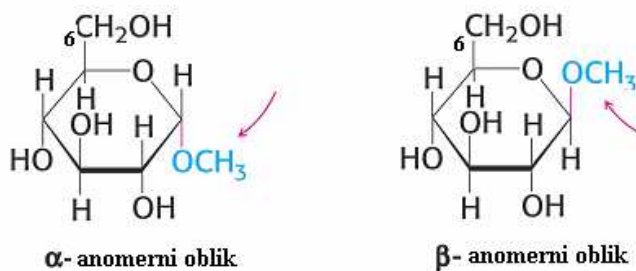
8.4. Prostorno uređenje cikličnih monosaharida

Osnovni načini prostornog uređenja monosaharida su oblici stolice i broda.



Kao posljedica povezivanja monosaharida u cikličku strukturu javlja se novi asimetričan C atom s mogućnošću stvaranja dvaju različitih izomera. Ovi izomeri se nazivaju *anomeri*, a razlikuju se samo po stereokemijskoj konfiguraciji na prvom asimetričnom C atomu koji prilikom izgradnje poluacetalala može imati OH skupinu iznad ili ispod osnovne ravnine. Strukture α anomera imaju OH skupinu s različite strane od šestog C atoma, a β anomera imaju OH skupinu s iste strane na kojoj se nalazi šesti C atom. Ove anomerne strukture imaju važan biološki značaj. Npr. u celulozi je zastupljen β -anomerni oblik, a u škrobu i glikogenu

α -anomerni oblik glikozidne veze. Budući da čovjek posjeduje enzime koji mogu razgraditi samo α -anomerni oblik, celuloza je neprobavljiva u ljudskom organizmu.

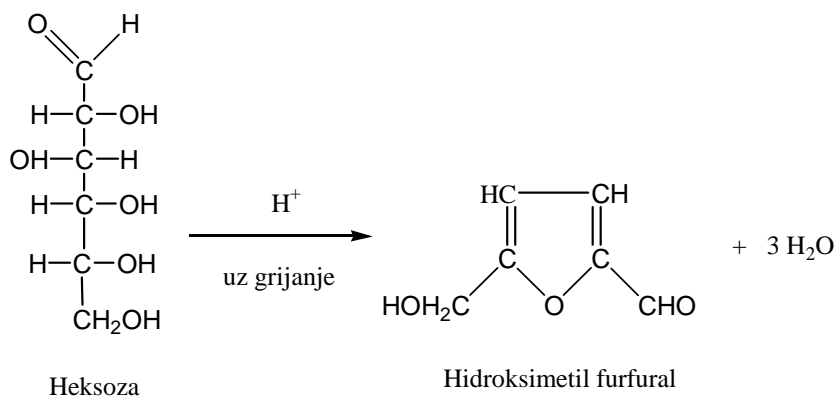
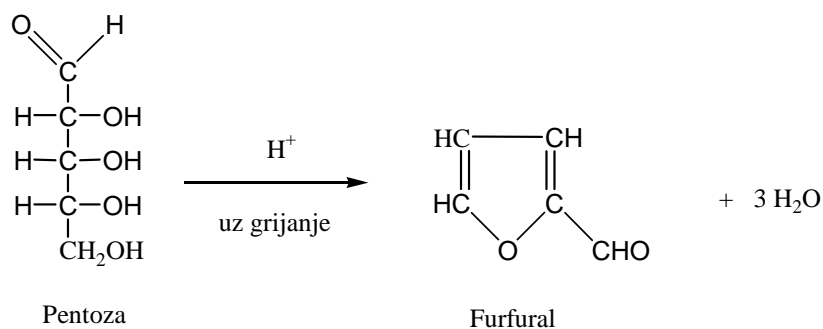


8.5. Svojstva šećera

Šećeri su topljivi u vodi, međutim teško kristaliziraju iz vodenih otopina. Kristalizaciju šećera iz vodenih otopina može se poboljšati dodatkom alkohola. Za identifikaciju šećera koriste se njihova dva osnovna svojstva: specifična moć zakretanja polarizirane svjetlosti i kromatografsko ponašanje.

8.5.1. Optička aktivnost šećera. Budući da imaju najmanje jedan asimetričan C atom, svi šećeri imaju moć zakretanja polarizirane svjetlosti. Svjetlost mogu zakretati u lijevo ili u desno, ali kao kod aminokiselina, zakretanje polarizirane svjetlosti nema nikakve veze s L i D strukturnim oblicima.

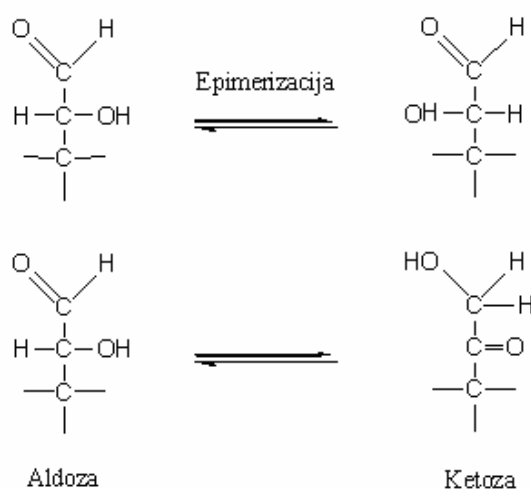
8.5.2. Kemijska stabilnost šećera. Šećeri se cikliziraju u kiseloj sredini, a pri tome nastaju odgovarajući furfurali.



Furfurali koji se dobiju ciklizacijom šećera u kiseloj sredini imaju svojstvo da reagiraju s fenolima, s cikličkim aminima ili heterocikličkim spojevima dušika. Produkti ovih reakcija su razni obojeni derivati. Različita obojenja se dobiju za različite šećere, a ako su obojenja stabilna, reakcije se mogu koristiti za kvalitativno i kvantitativno dokazivanje šećera. U tu svrhu koriste se:

- α -naftol (Molish-ova reakcija)
- rezorcinol (Selimanoff-ova reakcija)
- orcinol (plavo-ljubičast derivat služi za identifikaciju riboze)
- difenil amin (Dische-ova reakcija)

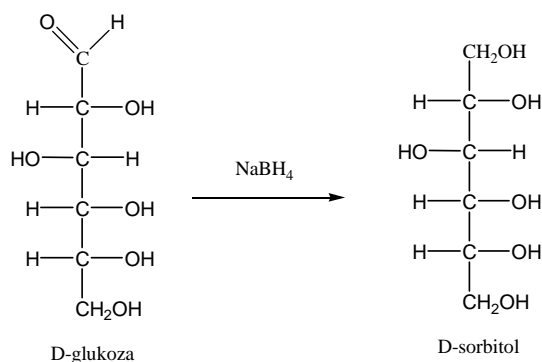
U lužnatoj sredini šećeri se bez zagrijavanja epimeriziraju ili mijenjaju iz aldo oblika u keto oblik.



Pored ovih kemijskih svojstava koja ograničavaju stabilnost šećera, oni posjeduju i karakteristične kemijske reakcije povezane s karbonilnom skupinom i s prisutnošću alkoholnih skupina.

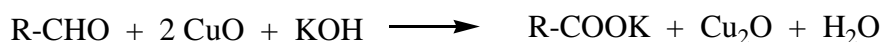
8.5.3. Kemijska svojstva povezana s karbonilnom skupinom

a) **Redukcija šećera.** Slobodnu karbonilnu skupinu može se reducirati kemijski ili enzimski. Enzimaska redukcija šećera je reverzibilna, a kemijska nije. Redukcijom šećera nastaju polialkoholi.

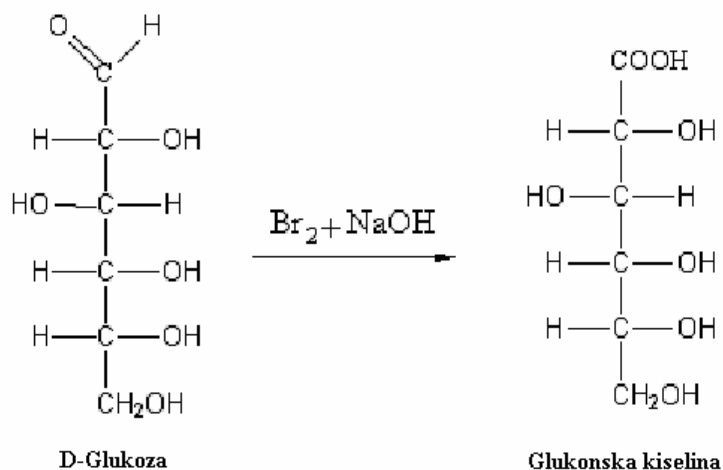


b) Oksidacija šećera. Oksidacija šećera je moguća na više načina:

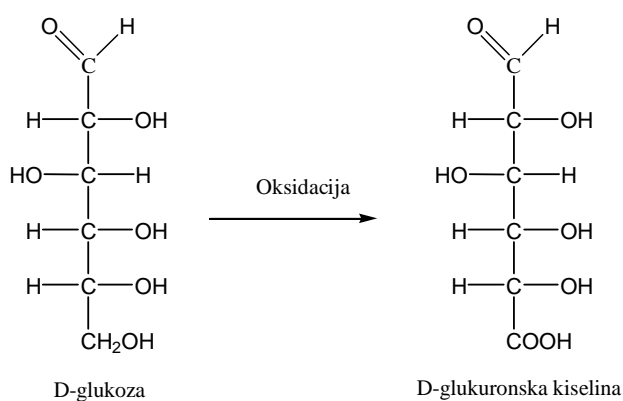
- U lužnatoj sredini mnogi metalni kationi oksidiraju šećere (Fehling-ova otopina).



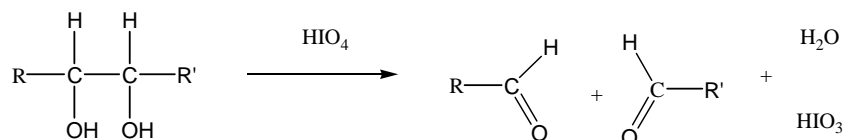
- Blagi oksidansi, kao brom i jod, u lužnatoj otopini oksidiraju aldehidnu skupinu šećera u karboksilnu skupinu i nastaju aldonske kiseline.



- Ova oksidacija je moguća i enzimskim putem. Npr. enzim glukozaoksidaza oksidira glukožu u glukonsku kiselinu. Ova reakcija se susreće u metabolizmu šećera kod svih živih organizama.
- Oksidacija samo primarne alkoholne skupine dovodi do nastajanja uronskih kiselina

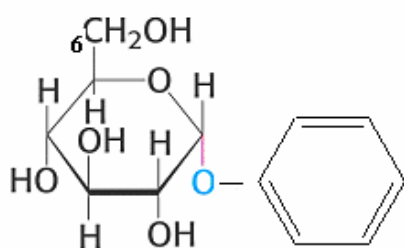


- Oksidacija perjodnom kiselinom i kod aldoza i kod ketoza dovodi do cijepanja α -glikolnih skupina.

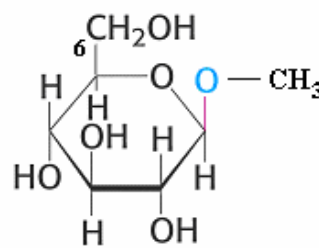


c) **Reakcija adicije i supstitucije na aldehidnoj skupini.** U reakcijama s alkoholima, fenolima, aminima i organskim kiselinama poluacetalni prelaze u acetale. Takvi acetali nazivaju se glikozidi, a nastala veza između šećera i nešećernog dijela molekule naziva se glikozidna veza. Prema anomernom konfiguraciji može biti α - i β -glikozidna veza. Pored O-glikozida, odcjepljenjem vode između poluacetalne OH skupine šećera i amino skupine nekog amina mogu nastati takozvani N-glikozidi.

d) **Djelovanje alkohola i fenola.** Poluacetiliranje unutar molekule šećera ograničava reakcije adicije na karbonilnu skupinu. S alkoholima i fenolima šećeri grade glikozidnu vezu C_1-O-R na prvom C atomu. Prema konfiguraciji na anomernom C-atomu postoji α i β -glikozidna veza. Npr.

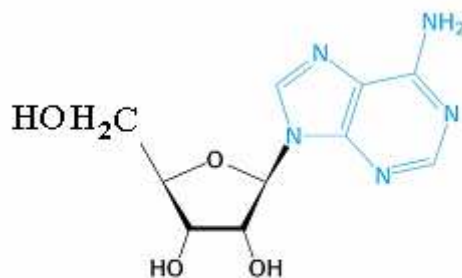


α -fenil glukozid



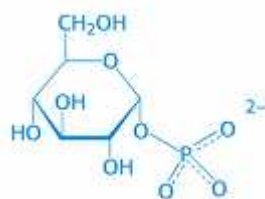
β -metil glukozid

e) **Djelovanje amonijaka i amina.** Reakcija aldehidne skupine iz šećera (poluacetal) s aminima je vrlo teško izvediva u laboratoriju. Ipak u prirodi se nalaze vrlo važni spojevi u kojima je prvi C atom nekog šećera povezan s dušikovim atomom iz amino skupine (N-glikozidna veza). To je slučaj kod svih nukleozida. Npr.



Adenozin

f) **Djelovanje fosforne kiseline.** Fosforna kiselina reagira s poluacetalnom ili poluketalnom skupinom šećera. Npr. vrlo važan prirodan spoj glukoza-1-fosfat ima bitnu ulogu u metabolizmu glikogena:



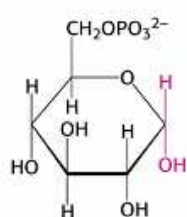
Glukoza-1-fosfat

8.5.4. Kemijska svojstva povezana s alkoholnom skupinom

a) *Izgradnja estera anorganskih kiselina* Poznati su esteri HNO_3 kiseline koji se koriste kao lijekovi za bolesti kardiovaskularnog sustava čovjeka. Esteri sulfatne kiseline se susreću kod glikokonjugata koji u živim organizmima imaju ulogu vezivnih tkiva. Esteri borne kiseline uglavnom se koriste u metodama elektroforetskog razdvajanja šećera, jer se mnogo lakše kreću u električnom polju od čistog šećera.

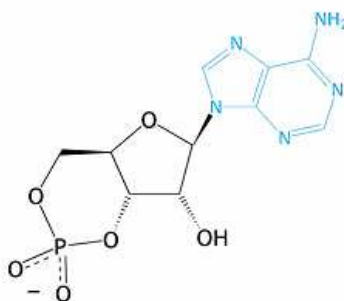
Posebnu skupinu čine esteri fosforne kiseline. Ovi esteri su vrlo rasprostranjeni u prirodi i imaju bitnu biološku ulogu. Poznati su:

- Monofosforni esteri najčešće na primarnoj alkoholnoj skupini šećera. Npr. α -D-glukozil-6-fosfat

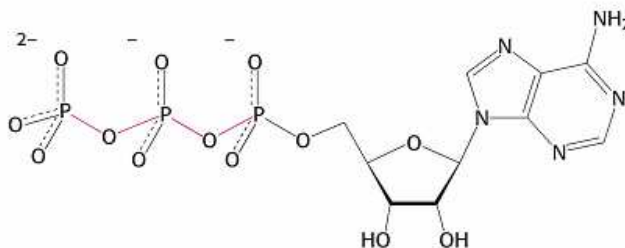


Glukoza 6-fosfat

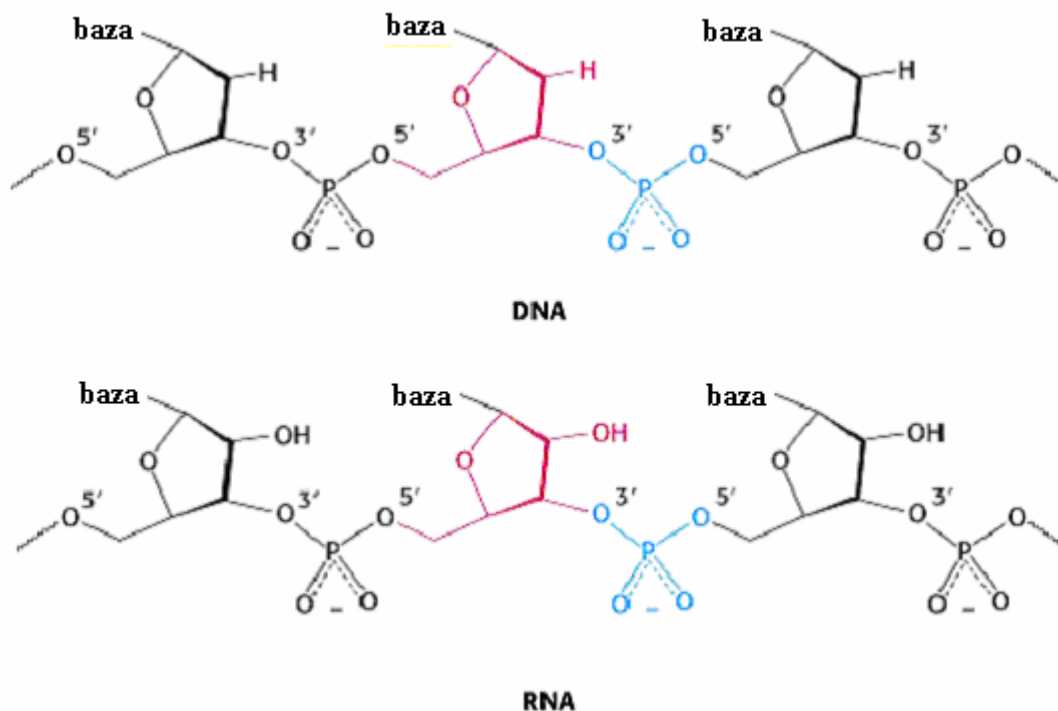
- Ciklički monofosforni esteri. Npr. adenzin 3'-5' ciklički monofosfat ima vrlo bitnu ulogu u regulaciji metaboličkih procesa.



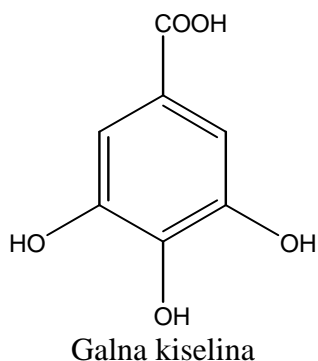
- Polifosfatni esteri kao adenzin trifosfat (ATP). Molekula ATP ima veliki značaj kao kemijska energija živih organizama, ali i u ulozi koenzima raznih enzimskih kompleksa.



- Esteri fosforne kiseline koji povezuju dvije ili više molekula šećera preko esterske veze. Ova struktura je u osnovi svih nukleinskih kiselina.



b) Esteri organskih kiselina Organske kiseline sa šećerima također grade estere. Poznati su esteri octene kiseline, esteri benzojeve kiseline, esteri fenolnih kiselina (npr. esteri galne kiseline su u osnovi prirodnih tanina).



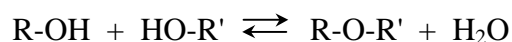
8.6. Biološki važni monosaharidi

U prirodi su zastupljene dvije *trioze*, D-gliceraldehid i Dihidroksi aceton, i to uglavnom u fosforiliranom obliku. Samo jedna *tetroza*, D-4-fosfoeritroza, ima biološki značaj u metabolizmu šećera. *Pentoze* imaju poseban biološki značaj: D-Riboza je osnovni sastojak nukleozida, nukleotida i ribonukleinskih kiselina. Pored toga nalazi se u sastavu mnogih koenzima. 2-deoksi-D-Riboza je homolog D-Riboze u kojoj je alkoholna skupina na drugom C atomu izostavljena. Ona je osnovni sastojak deoksiribonukleinskih kiselina. D-Ribuloza je ključni intermedijer u metabolizmu šećera. D- i L-Araboza su vrlo rasprostranjene u prirodi. Inače, L-Araboza je rijetki prirodni L-šećer s određenom biološkom ulogom. D-Araboza

je prekursor dvije vrlo raširene heksoze: D-glukoze i D-manoze. *Heksoze* koje imaju biološki interes su aldoze (D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza) i ketoze (D-fruktoza i levuloza). D-Glukoza je najrasprostranjeniji šećer u prirodi. Nalazi se u slobodnom stanju, ali i u polisaharidima škrobu, celulozi i glikogenu. Kod čovjeka se nalazi slobodna u krvi, a kao rezerva pohranjena je u jetri i mišićima u obliku glikogena. D-Galaktoza ulazi u sastav oligosaharida. Pored toga galaktoza ulazi i u sastav polisaharida, heterozida, glikoproteina i glikolipida. D-Manoza je važan sastojak glikoproteina. D-Fruktoza je prisutna u slobodnom stanju u voću i medu, a sastojak je disaharida saharoze. Od *heptoza* jedino sedoheptuloza ima biološki značaj (važan intermedijer u metabolizmu šećera).

8.7. Oligosaharidi

Oligosaharidi nastaju glikozidnim povezivanjem dviju do deset monosaharidnih jedinica.



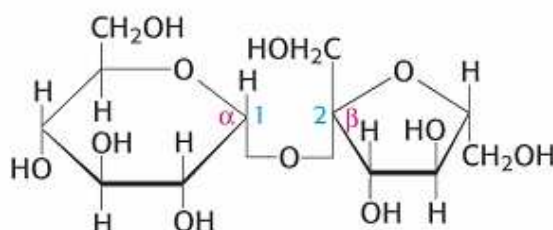
Glikozidna veza je stabilna u baznoj sredini, ali vrlo lako može biti raskinuta kiselom ili enzimskom hidrolizom. Prema broju monosaharidnih jedinica oligosaharidi se dijele na disaharide, trisaharide itd.

8.7.1. Određivanje strukture nekog oligosaharida. Prepoznavanje strukture nekog oligosaharida podrazumijeva: određivanje njegove prirode, načina povezivanja monosaharidnih jedinica i konfiguracije glikozidne veze.

a) Određivanje prirode oligosaharida. Hidrolizom glikozidne veze, bilo kiselinom bilo enzimom, oligosaharid se može rastaviti na sastavne monosaharide. Kod nekog disaharida moguće je dobiti dvije identične monosaharidne jedinice (homogeni disaharid) ili različite (heterogeni disaharid). Priroda hidroliziranih monosaharida može se jednostavno odrediti zakretanjem polarizirane svjetlosti ili tankoslojnom kromatografijom.

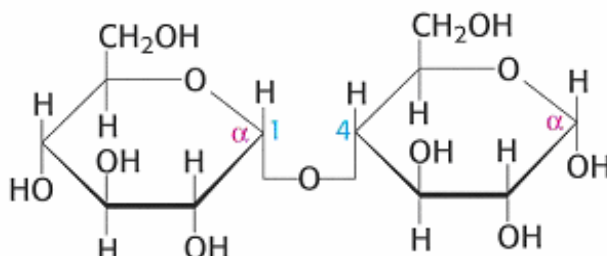
b) Određivanje vrste glikozidne veze. Nastajanje nekog disaharida moguće je spajanjem monosaharidnih jedinica na dva različita načina:

- Moguće je povezivanje preko poluacetalnih i poluketalnih skupina kod obje monosaharidne jedinice:



u tom slučaju nastali disaharid gubi reducirajuća svojstva jer nema slobodnu ni jednu aldehidnu ni keto skupinu.

- Moguće je povezivanje poluacetalne ili poluketalne skupine jedne monosaharidne jedinice s alkoholnom skupinom druge monosaharidne jedinice. U tom slučaju disaharid zadržava reducirajuća svojstva jer mu uvijek ostaje slobodna druga aldehidna ili keto skupina.



Eksperimentalno je lako odrediti ima li neki disaharid reducirajuća svojstva ili nema, te prema tome odrediti vrstu glikozidne veze. S druge strane, potrebno je precizirati alkoholnu skupinu koja sudjeluje u stvaranju veze, ako se radi o disaharidu koji zadržava reducirajuća svojstva.

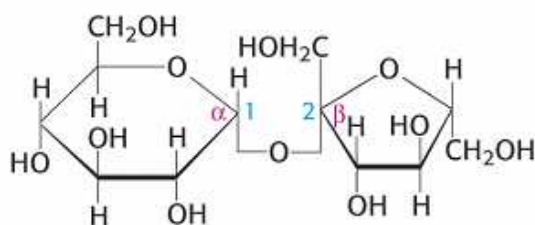
c) Konfiguracija glikozidne veze. Neki disaharid može postojati u dva anomerna oblika α i β . Prema tome raspoznaju se α i β glikozidne veze. Postoje dvije vrste metoda da se odredi anomerna konfiguracija disaharida:

Kemijske metode podrazumijevaju reakcije disaharida s nekim polihidroksilnim alkoholom (npr. glicerolom). Djelovanje olovo acetata poslije reakcije s NaBH_4 dovodi do cijepanja disaharida i do stvaranja glikozida s glicerolom. Ovako dobiveni produkt može se usporediti s glikozidom glicerola poznate anomerne konfiguracije te zaključiti o vrsti nepoznate konfiguracije.

Enzimske metode podrazumijevaju specifično cijepanje glikozidnih veza. Npr β -glukozidaza cijepa samo β -glikozidne veze. Ako se poslije djelovanja β -glukozidaze na neki disaharid glukoze među produktima javlja slobodna glukoza, zaključak je da se radilo o β -glikozidnoj vezi.

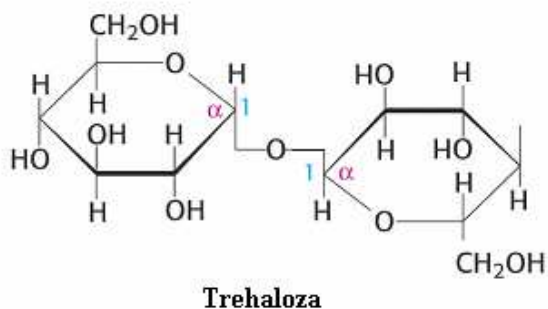
8.7.2. Biološki važni oligosaharidi

a) Nereducirajući disaharidi. Saharoza ili kuhinjski šećer je disaharid glukoze i fruktoze, koje su povezane (1α - 2β) glikozidnom vezom. Saharoza nema reducirajućih svojstava, jer su i aldehidna i keto skupina uključene u nastanak glikozidne veze.

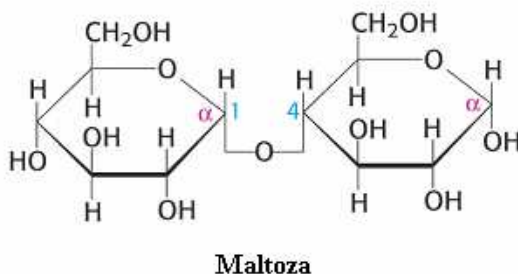


Saharoza

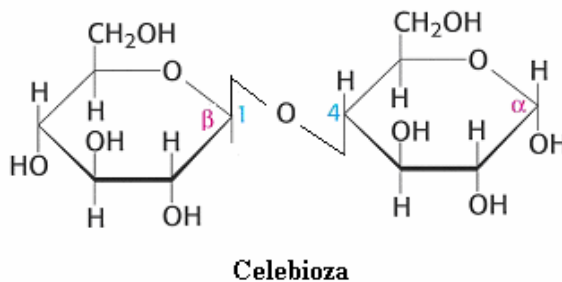
Trehaloza je disaharid koji se nalazi u šampinjonima i nekim insektima. Ovaj disaharid nastaje povezivanjem dviju glukoza preko njihovih aldehidnih skupina gradeći (1α - 1α) glikozidni vez.



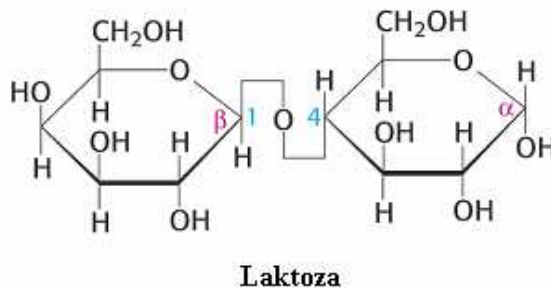
b) Reducirajući disaharidi. Maltoza je produkt razgradnje polisaharida škroba i glikogena. Ona nastaje povezivanjem dviju glukoza gradeći (1 α -4) glukozidnu vezu, što znači da je osjetljiva na djelovanje α -glukozidaze.



Celebioza je produkt razgradnje polisaharida celuloze. Nastaje povezivanjem dvije glukoze (1 β -4) glukozidnom vezom, što znači da je osjetljiva na djelovanje β -glukozidaze.



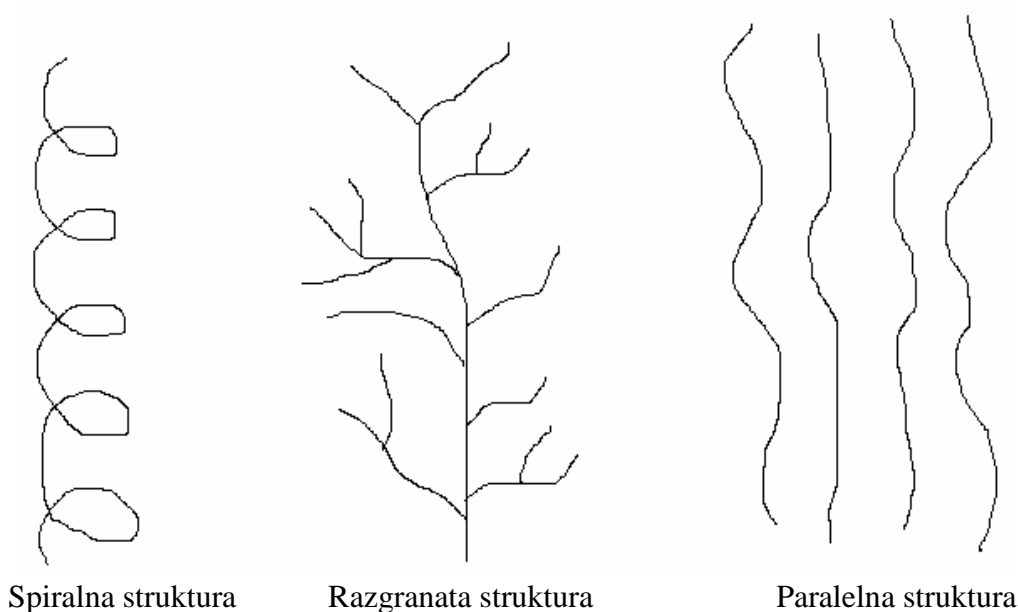
Laktoza je mliječni šećer koji nastaje povezivanjem galaktoze i glukoze gradeći (1 β -4) glikozidnu vezu, koja je osjetljiva na djelovanje β -galaktozidaze.



8.8. Polisaharidi

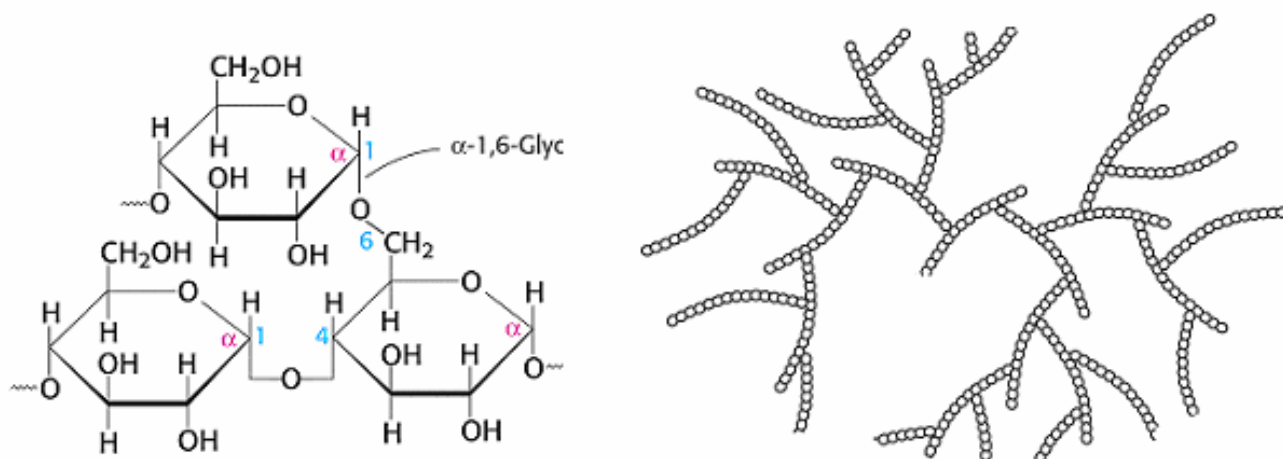
Polisaharidi su spojevi koji hidrolizom oslobađaju veliki broj monosaharidnih jedinica. Razlikuju se homogeni i heterogeni polisaharidi. Homogeni polisaharidi su izgrađeni od iste vrste monosaharidnih jedinica, a heterogeni od različitih vrsta.

8.8.1. Struktura polisaharida. Polisaharidi imaju primarnu strukturu čije prepoznavanje podrazumijeva određivanje prirode polisaharidne molekule (heterogeni ili homogeni), određivanje vrste i konfiguracije glikozidnih veza. Metode određivanja primarne strukture su iste kao kod oligosaharida. Pored primarne strukture, polisaharidi mogu imati više strukturalne redove koji određuju njihovo prostorno uređenje.



Složene strukture polisaharida nastaju uslijed vodikovih veza među monosaharidnim prekursorima i specifičnih glikozidnih veza na mjestima grananja.

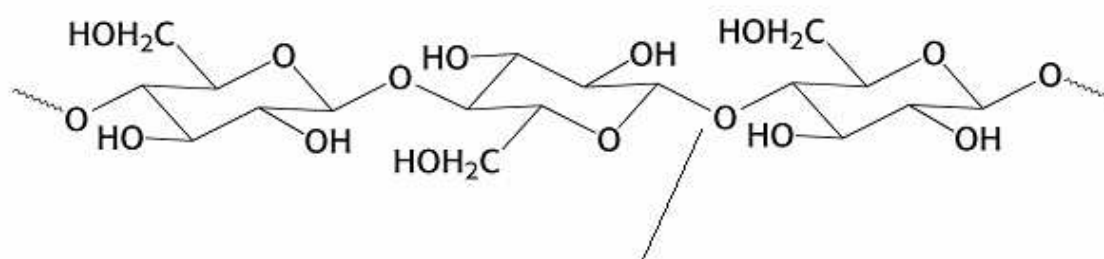
8.8.2. Homogeni polisaharidi. Svi monosaharidni šećeri mogu izgrađivati odgovarajuće polisaharide. Npr. glukoza gradi glukozane, fruktoza fruktozane, manoza manane, galaktoza galaktane itd. *Glukozani* su najčešći prirodni polisaharidi glukoze. Najvažniji za čovjeka su škrob, glikogen i celuloza. Škrob je važna rezerva glukoze biljnog porijekla koja ima veliku važnost za prehranu ljudi. Škrob je netopljiv u hladnoj vodi, dok je u vrućoj vodi parcijalno topljiv. U prisutnosti joda škrob daje karakteristično plavo obojenje koje se koristi za njegovo titrimetrijsko određivanje. Škrob je izgrađen od 15-30% amiloze i 70-85% amilopektina. Amiloza je linearni polimer koji nastaje povezivanjem D-glukoza ($1\alpha-4$) glikozidnim vezama. Broj glukoza u amilozi je 200-3000. Ona ima spiralnu konformaciju u kojoj je 6-7 glukoznih jedinica u jednoj spirali. Stabilizacija prostornog uređenja je rezultat vodikovih veza među glukoznim jedinicama u disaharidu maltozi. Amilopektin je izgrađen od glukoznih lanaca u kojima je zastupljena ($1\alpha-4$) glikozidna veza, koji su međusobno razgranati ($1\alpha-6$) glikozidnim vezama. Hidroliza amilopektina uz enzim amilazu daje smjesu disaharida maltoze i izomaltoze. Daljnja hidroliza kiselinom ili maltazom daje osnovni sastojak D-glukozu. U amilopektinu postoji jedno grananje na prosječno 25 jedinica glukoze.



Grananje glikogena i amilopektina

Glikogen je životinjski ekvivalent amilopektina iz škroba. Ovaj homogeni polisaharid glukoze je važan skladišni oblik glukoze kod svih viših životinjskih vrsta. Za razliku od amilopektina, glikogen je mnogo razgranatija molekula. U središtu makromolekule grananje je na 3-5 jedinica glukoze, a na perifernim dijelovima prosječno grananje je na 10-15 jedinica glukoze. U glikogenu su identificirane i ($1\alpha-3$) glukozidne veza i poneka fruktoza. Biološka uloga ovih strukturalnih anomalija još uvijek nije poznata. Broj glukoza u glikogenu ovisi o porijeklu. Npr. glikogen iz jetre čovjeka je izgrađen od približno 30 000 jedinica glukoze.

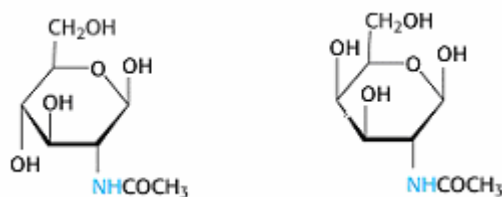
Celuloza je biljni polisaharid koji nastaje linearnim povezivanjem više od 10 000 jedinica glukoze. Vrsta glukozidne veze je ($1\beta-4$), što celulozu čini neprobavljivom u ljudskom organizmu jer ne posjeduje enzime β -glukozidaze. Stabilnost prostornog uređenja se temelji na vodikovim vezama između hidroksilne skupine na trećem C atomu jedne glukoze i heterocikličkog kisika susjedne glukoze.



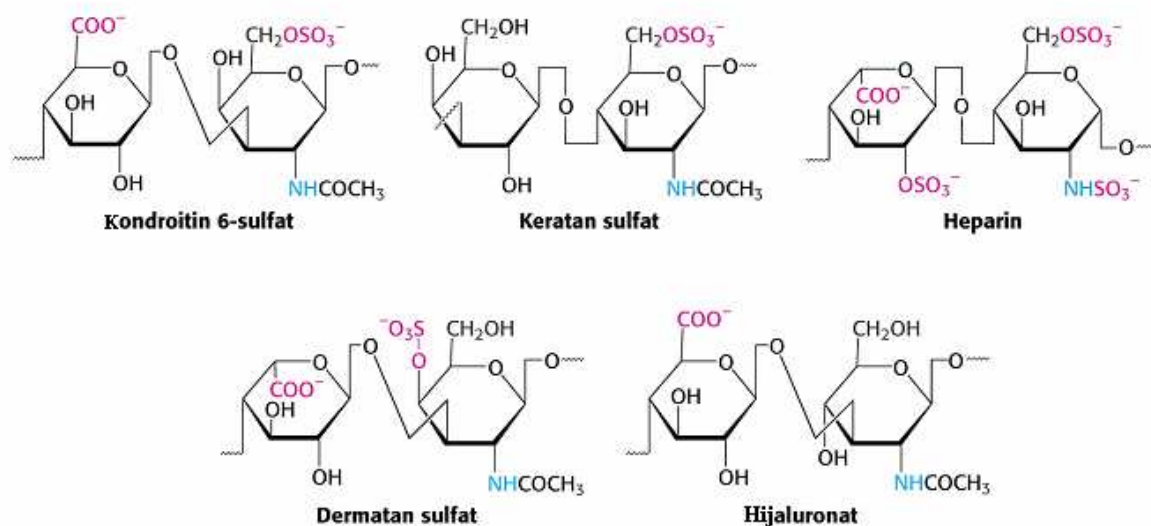
Celuloza ($\beta-1,4$ veza)

Tako se stvaraju paralelni lanci koji se organiziraju u mikrovlakna čiji je presjek prosječno 350 nm. *Dekstrani* su polisaharidi koji nastaju ($1\alpha-6$) glukozidnim povezivanjem D-glukoza (molarna masa dekstrana je između 50 000 i 100 000).

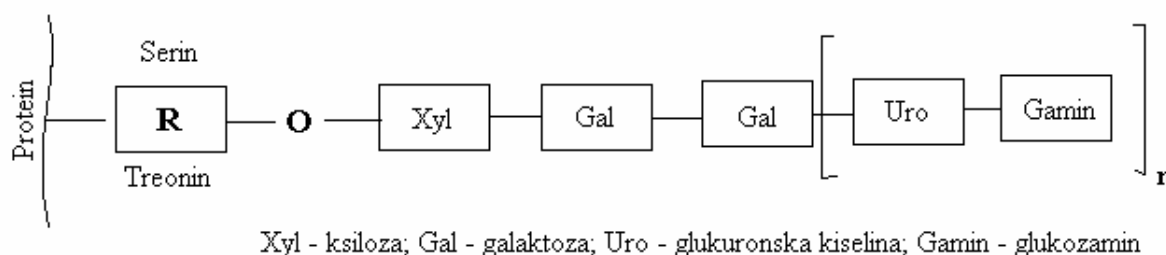
8.8.3. Heterogeni polisaharidi. Heterogeni polisaharidi se nalaze i u biljnom i u životinjskom svijetu gdje uglavnom imaju ulogu izgradnje potpornih i zaštitnih tkiva. Npr. glikozaminoglikani su heterogeni polisaharidi izgrađeni od ponavljanih disaharidnih jedinica koje sadrže derivat jednog od amino šećera (glukozamina ili galaktozamina).



Jedan od šećera u disaharidu sadrži negativno nabijenu karboksilnu ili sulfatnu skupinu. Glavni glikozaminoglikani su hijaluronat, kondroitin sulfat, keratan sulfat, heparan sulfat i heparin. Ovi spojevi se ne nalaze slobodni u tkivima, već su povezani s proteinima gradeći vrlo različite složene makromolekule koje izgrađuju viskoelastična tkiva podložna mehaničkoj deformaciji (zglobovi, hrskavica, koža itd.). U proteoglikanskim makromolekulama glikozaminoglikani su kovalentno vezani na polipeptidnu okosnicu preko aminokiselina serina ili treonina.



U proteoglikanskim makromolekulama uvijek se ponavlja struktura veze ksiloza-galaktoza-galaktoza-glikozaminoglikan koje se dalje mogu umrežavati nekovalentnim vezama.

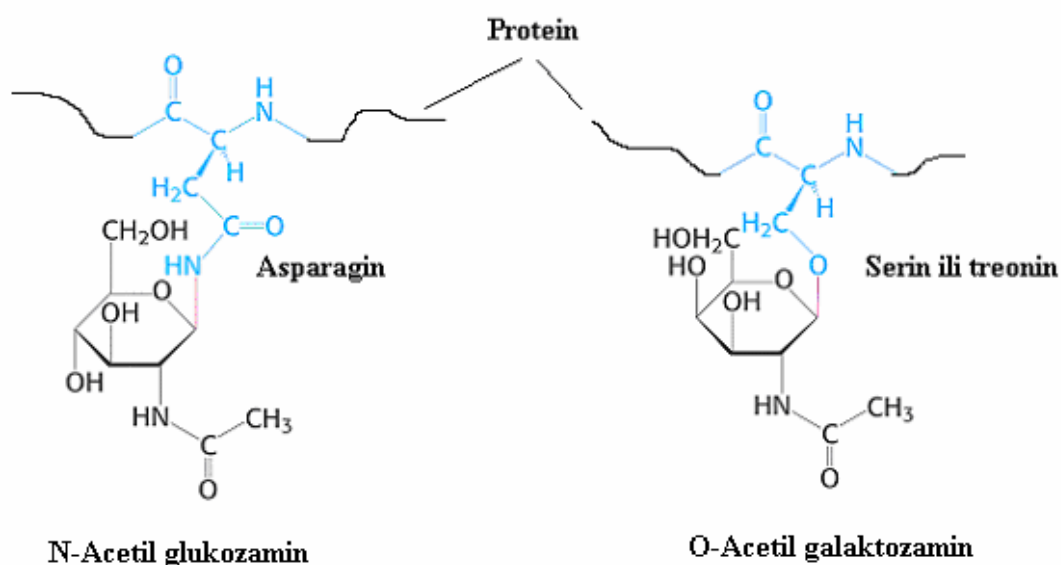


8.9. Glikokonjugati

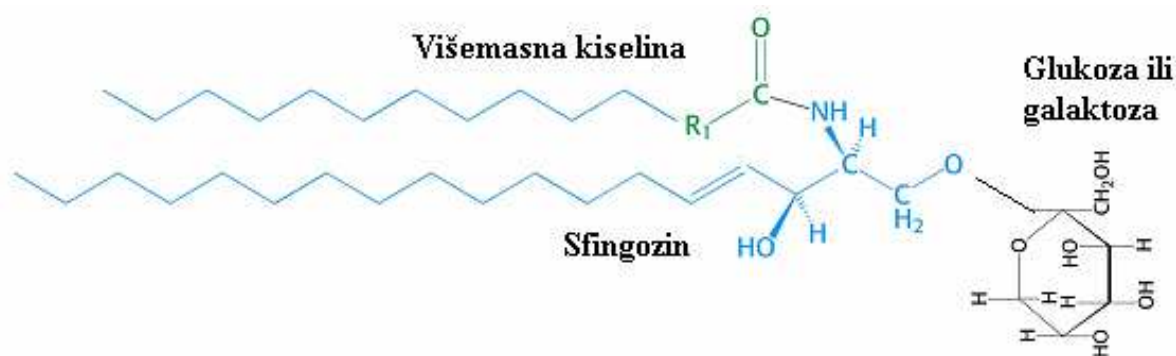
Glikokonjugati su heterogeni spojevi izgrađeni od oligosaharidne šećerne jedinice s jedne strane i proteina ili lipida s druge strane. Šećerni ostaci glikokonjugata su smješteni obično na vanjskoj strani staničnih membrana i imaju bitnu ulogu receptora raznih signala u

procesu prijenosa informacija u unutrašnjost stanice. U staničnim membranama eukariotskih stanica maseni udio šećera u obliku glikoproteina obično je između 2 i 10%.

8.9.1. Glikoproteini. Ovi složeni proteini se razlikuju od proteoglikana. Kao što je već pokazano, proteoglikani su manji peptidni lanci povezani s dugačkim polisaharidima i sudjeluju u izgradnji potpornih tkiva, a glikoproteini nastaju spajanjem male oligosaharidne šećerne jedinice na veliku proteinsku molekulu. Postoje dva načina povezivanja proteinske molekule i šećerne jedinice: *O-* i *N-glikozidne veze*. Prilikom izgradnje glikoproteinske molekule, oligosaharid se preko N-acetil glukoamina ili N-acetil galaktozamina povezuje sa serinskim, treoninskim ili asparaginskim R ostacima u proteinima. Hidrofobni dio proteina je ugrađen u dvosloj stanične membrane, a hidrofilni dio s oligosaharidnom jedinicom je s vanjske strane stanične membrane gdje ima ulogu receptora raznih signala.



8.9.2. Glikolipidi. Glikolipidi su spojevi koji imaju jedan hidrofobni lipidni i jedan hidrofilni šećerni dio. Hidrofilna šećerna jedinica je glukoza ili galaktoza na koju se dalje nadovezuju razgranati oligosaharidi, dok hidrofobni dio molekule čine diacil glicerol ili aminoalkohol sfingozin i na njega vezana višemasna kiselina.



9. POGLAVLJE

LIPIDI

Lipidi su prirodni derivati koji nastaju u reakcijama masnih kiselina s alkoholima ili aminima. Jednostavni lipidi su izgrađeni samo od atoma ugljika, vodika i kisika. Tu se ubrajaju gliceridi kod kojih je alkohol glicerol, drugi složeni spojevi kod kojih je alkoholna skupina neki alifatski alkohol s više C atoma i steroidi u kojima je alkohol sterol. Složeni lipidi pored C, H i O atoma mogu sadržavati i N, P ili S atome. Lipidi imaju dvostruku biološku ulogu: kao rezerva hranljivih sastojaka u vrijeme gladovanja (jednostavni lipidi) i kao strukturni elementi za izgradnju bioloških membrana (složeni lipidi).

Rezerva hranljivih sastojaka Jednostavni lipidi su osnovni sastojci masnih tkiva u živim organizmima i imaju ulogu rezerve hranljivih sastojaka za energetske potrebe nekog organizma, ali i kao izvor prekursora za izgradnju složenih lipida. Većinski hranljivi sastojci su jednostavni lipidi tipa glicerida i esterificiranog kolesterola.

Strukturni elementi Stanične membrane su po kemijskoj građi složeni lipidi. Prepoznaju se vanjska stanična membrana, zatim unutrašnje stanične membrane: jezgrina membrana, mitohondrijska membrana, endoplazmatska mrežica itd. Većinski sastojci navedenih membrana su uglavnom fosfolipidne i sfingolipidne molekule.

9.1. Prekursori lipida - više masne kiseline

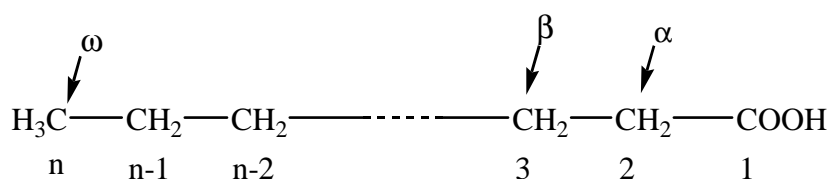
Više masne kiseline koje izgrađuju lipide su uglavnom monokarboksilne organske kiseline s ukupnim brojem C atoma većim od četiri. Pored karboksilne skupine mogu imati i druge funkcijske skupine. Mogu biti zasićene i nezasićene masne kiseline, ali gotovo uvijek s nerazgranatim lancem. Velika većina prirodnih masnih kiselina ima paran broj C atoma. Masne kiseline se obilježavaju prema broju C atoma i prema broju i položaju dvostrukih veza:

$C_{n:x}$ n - broj C atoma
 x - broj dvostrukih veza

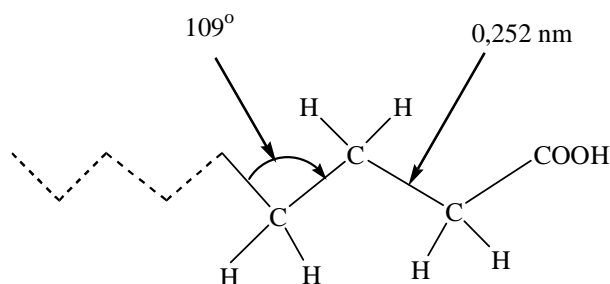
Na primjer:

$C_{14:0}$ - miristinska kiselina ima 14 C atoma i nema dvostrukih veza
 $C_{18:2}$ (*cis,cis*- Δ^9, Δ^{12}) - linoleinska kiselina ima 18 C atoma i dvije *cis* dvostruke veze iza devetog i dvanaestog C atoma.

9.1.1. Zasićene više masne kiseline. Nerazgranate zasićene masne kiseline su najraširenije u prirodi. Opća formula je $C_nH_{2n}O_2$, gdje je n broj C atoma uglavnom paran.



Vodeći računa o tetraedarskoj strukturi C atoma zasićene masne kiseline sadrže C atome udaljene 0.252 nm i pod kutom od 109° .

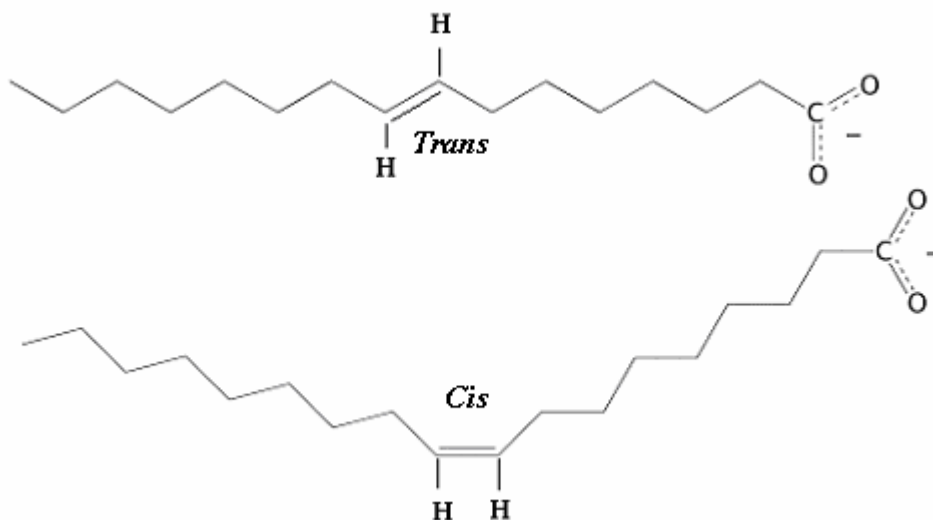


Glavne zasićene masne kiseline u prirodi su: palmitinska (16 C atoma) i stearinska (18 C atoma) i u manjem postotku miristinska (14 C atoma) i lignocerična (24 C atoma).

Zasićene masne kiseline

Broj C atoma	Naziv	Formula
12	Laurat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$
14	Miristat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$
16	Palmitat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$
18	Stearat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$
20	Arahidat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$
22	Behenat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$
24	Lignocerat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COO}^-$

9.1.2. Nezasićene masne kiseline. Nezasićene masne kiseline sadrže jednu ili više dvostrukih veza. Prisustvovanje dvostrukih veza uvodi mogućnost *cis* i *trans* izomerije koja ima važnu strukturnu ulogu jer dovodi do prelamanja molekule.





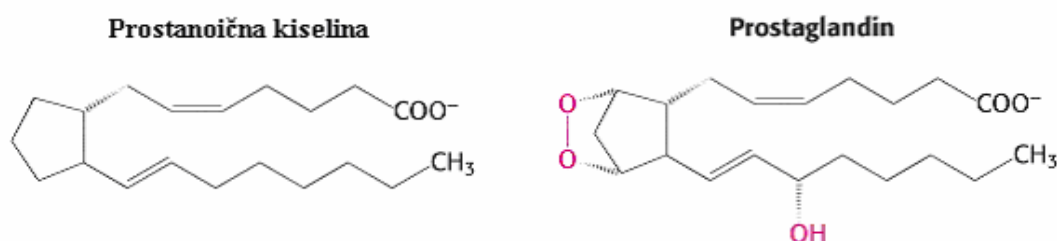
Cis konfiguracija je mnogo češća i važnija s biološkog aspekta.

Nezasićene masne kiseline

C atoma	Dvostrukih veza	Naziv	Formula
16	1	Palmitoleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	1	Oleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	2	Linoleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
18	3	Linolenat	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
20	4	Arahidonat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$

Oleinska kiselina je najrasprostranjenija nezasićena masna kiselina. Prisutna je u svim prirodnim mastima i uljima (40% u svinjskoj masti, a 80% u maslinovom ulju). Tekućina je na sobnoj temperaturi ($T_f = +16\text{ }^\circ\text{C}$).

9.1.3. Prostaglandini. Ciklične masne kiseline izolirane iz prostate, zatim iz pluća i iz mozga, ponašaju se kao tvari s hormonskim svojstvima i djeluju na kontrakcije glatkih mišića. Prostaglandini su kemijski derivati prostanoične kiseline.

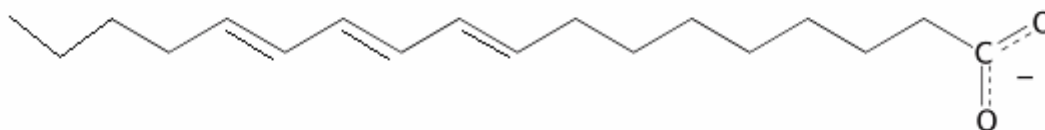


Ovisno o maloj strukturalnoj promjeni molekule prostanoične kiseline, prostaglandini mogu imati vrlo različite fiziološke funkcije. Mogu djelovati na organe reprodukcije, na glatke mišiće, nervni i kardiovaskularni sustav. Medicinski interes za ovim spojevima je vrlo veliki. Npr. mehanizam djelovanja vrlo popularnog aspirina odvija se preko inhibicije biosinteze prostaglandina.

9.1.4. Fizička svojstva masnih kiselina

a) **Temperatura taljenja i ključanja** Prisustvovanje dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama snižava temperaturu taljenja u odnosu na odgovarajuću zasićenu masnu kiselinu. S druge strane temperatura ključanja je utoliko viša što je lanac C atoma duži, dok prisustvovanje dvostrukih veza praktično nema utjecaja na temperaturu ključanja.

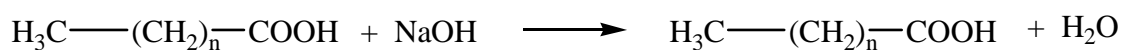
b) **Spektroskopska svojstva** U čistom stanju kiseline su bezbojne i ne apsorbiraju svjetlost ni u vidljivom ni u UV području valnih duljina. Izuzetak su nezasićene masne kiseline koje imaju više konjugiranih dvostrukih veza. Npr. oleoestearinska kiselina ima tri konjugirane dvostruke veze i apsorbira pri $\lambda_{\max} = 268$ nm.



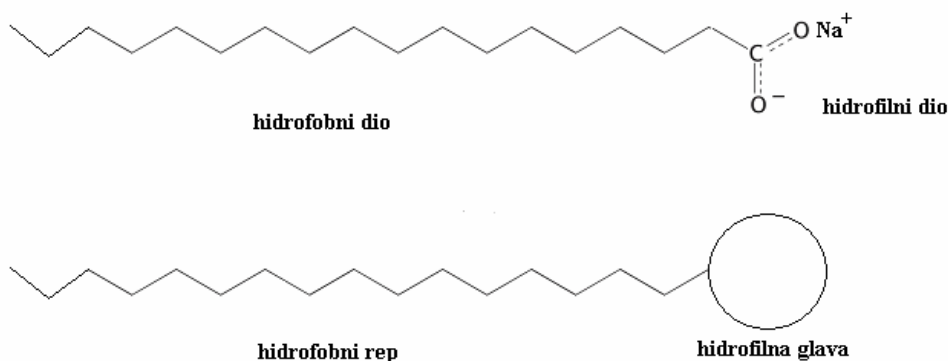
Prostaglandini apsorbiraju UV zračenje pri $\lambda_{\max} = 217$ nm i pri $\lambda_{\max} = 278$ nm što omogućava spektralno određivanje njihovih koncentracija.

9.1.5. Kemijska svojstva višemasnih kiselina povezana s karboksilnom skupinom

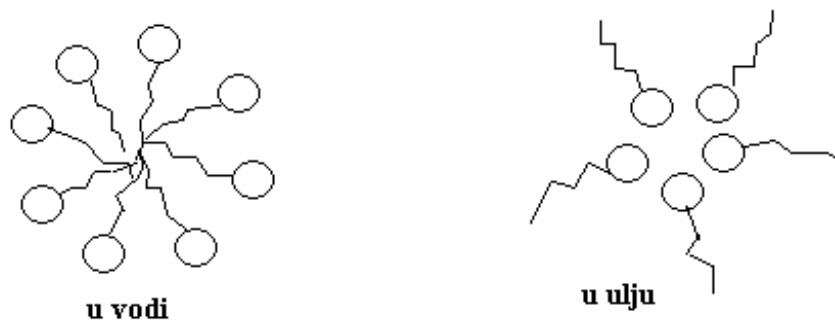
a) **Stvaranje soli** Višemasne kiseline grade soli u reakcijama s alkalnim metalima (KOH, NaOH) gradeći pri tome sapune. Za razliku od masnih kiselina, sapuni su topljivi u vodi. Oni imaju svojstva stvaranja pjena i emulzija odakle potiče njihova primjena.



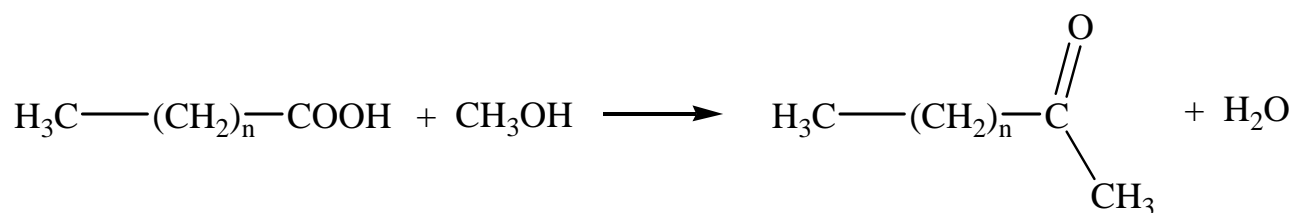
Molekula sapuna u stvari ima dva pola: hidrofilni anionski dio $-\text{COO}^-$ i hidrofobni alifatski lanac C atoma u R ostatku



Prema vrsti otapala u kojem se nađe neka molekula sapuna, ona se ponaša na dva različita načina:

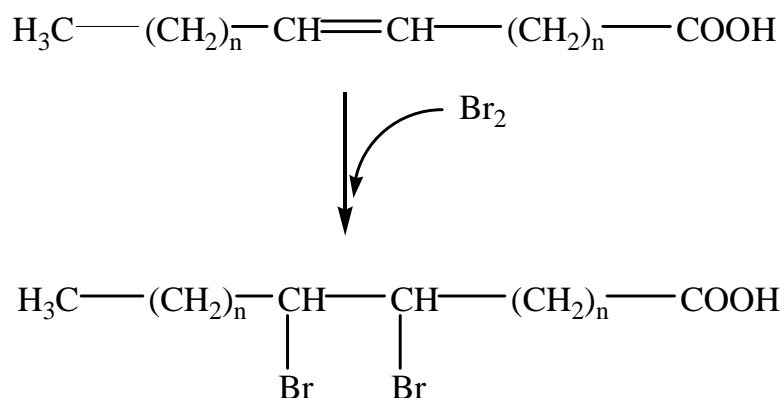


b) Stvaranje estera Više masne kiseline reagiraju s alkoholima i izgrađuju estere. U svrhu frakcioniranja i određivanja masnih kiselina često se koristi reakcija stvaranja metil-estera masnih kiselina koji su isparljivi spojevi i mogu se istraživati plinskom kromatografijom.



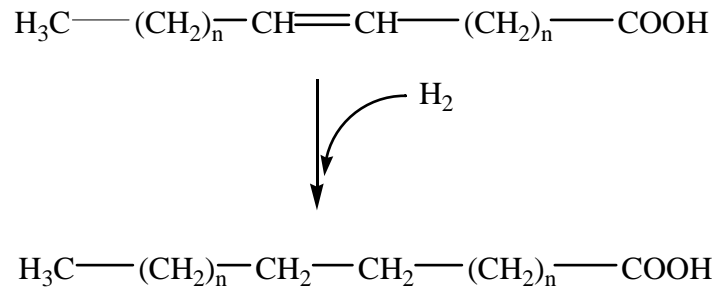
9.1.6. Kemijska svojstva masnih kiselina povezana s dvostrukim vezama

a) Reakcija adicije Ako se nazasićena masna kiselina tretira bromom ili jodom, adicijom ovih halogenih elemenata na dvostruku vezu dobije se odgovarajući derivat.

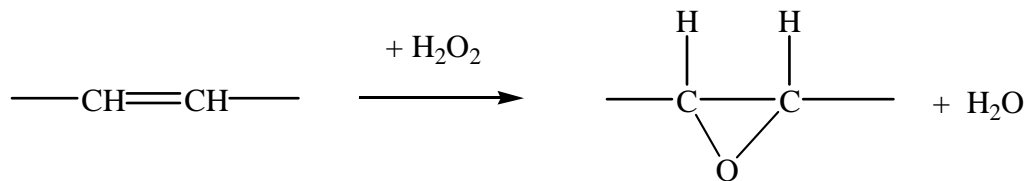


Gubljenje crveno-smeđe boje ukazuje na trošenje Br_2 u reakciji adicije i može biti dokaz dvostruke veze u nezasićenoj masnoj kiselini. Zasićene kiseline ne daju ovu reakciju.

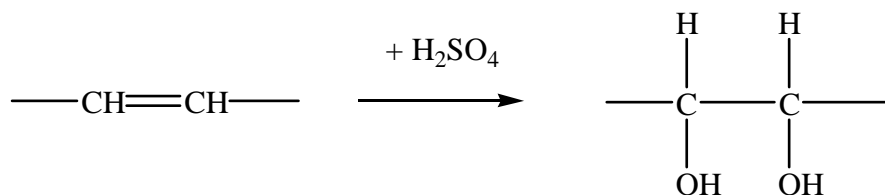
Hidrogeniranjem nezasićenih masnih kiselina nastaju odgovarajuće zasićene masne kiseline. Ova reakcija je našla praktičnu primjenu u proizvodnji margarina iz biljnih ulja.



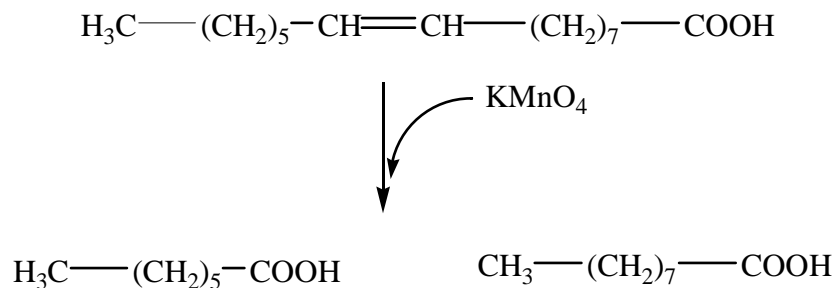
b) Oksidacija dvostruke veze Tretiranjem nezasićenih masnih kiselina peroksidima ili sličnim oksidansima nastaju toksični spojevi epoksidi:



Pri djelovanju neorganskih kiselina pri 50°C nezasićene masne kiseline s jednom dvostrukom vezom daju odgovarajući glikol.



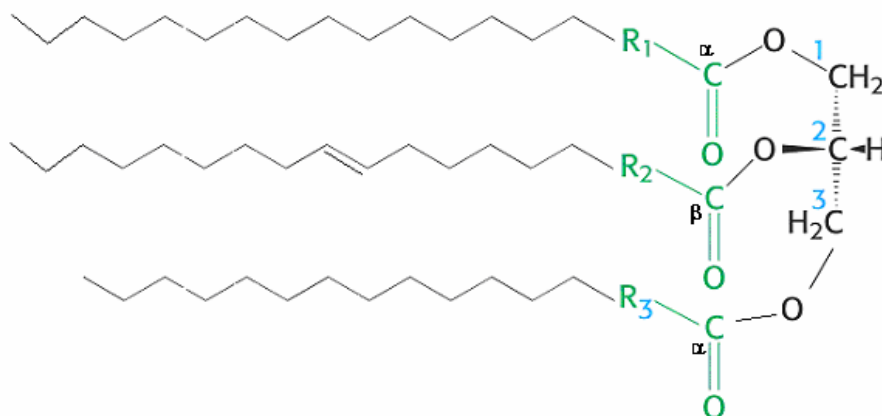
Ako se nezasićenu masnu kiselinu tretira s jakim oksidansom (koncentrirana otopina KMnO_4) dolazi do cijepanja molekule i stvaranja dvije kiseline:



c) **Autooksidacija masnih kiselina** Autooksidacija masnih kiselina je proces koji se normalno odvija pod djelovanjem kisika iz zraka. Masne kiseline poprimaju karakterističan ranketljiv miris. Ovaj proces se aktivira prisustvom enzima lipoksidaza pri čemu nastaju toksični aldehidi i razni derivati neugodnog mirisa. Parcijalno i privremeno autooksidacija masnih kiselina može se spriječiti upotrebom prirodnih ili sintetskih antioksidansa.

9.2. Jednostavni lipidi

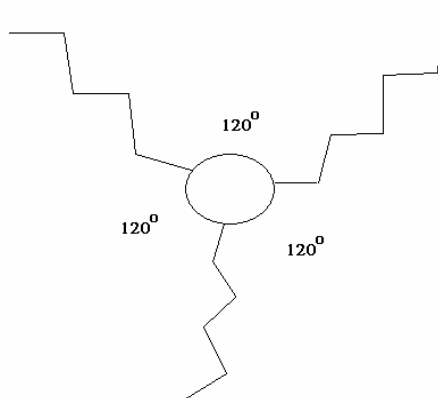
9.2.1. **Gliceridi ili masti.** Gliceridi su neutralne masti i kvantitativno su najrasprostranjenije u prirodi. To su esteri glicerola i masnih kiselina. Na glicerolu postoje tri mjesta esterifikacije dva (α) i jedno (β).



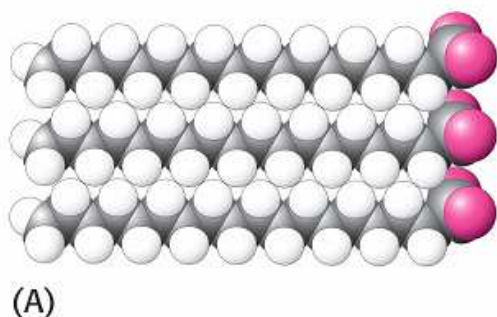
Heterogeni triglicerid

Heterogeni gliceridi su oni u kojima se na glicerolu nalaze vezane različite masne kiseline. Gliceridi mogu biti mono-, di- i trigliceridi ovisno o broju vezanih masnih kiselina. U prirodi se uglavnom nalaze heterogeni trigliceridi, ali nerijetko se susreću i homogeni trigliceridi.

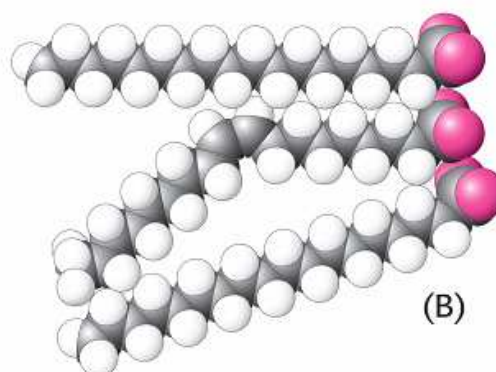
a) **Prostorno uređenje triglicerida** U tekućem stanju tri više masne kiseline na glicerolu se raspoređuju tako da je kut među njima 120° . Na takav način hidrofobni repovi su ravnomjerno okrenuti prema vani i čine čitavu molekulu hidrofobnom.



b) Fizička svojstva triglicerida *Topljivost* Radi izrazite hidrofobnosti, gliceridi su netopivi u vodi, a dobro topivi u organskim otapalima benzenu, kloroformu, eteru, vrućem alkoholu te u acetonu. *Temperatura taljenja glicerida* ovisi o količini vezanih nezasićenih *cis* masnih kiselina. *Cis* dvostruke veze lome alifatske repove i sprječavaju kompaktne hidrofobne strukture, što za posljedicu ima sniženje temperature taljenja. Stoga su gliceridi, s više nezasićenih masnih kiselina u sustavu, u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi i nazivaju se ulja, dok su gliceridi s više zasićenih masnih kiselina u sustavu na sobnoj temperaturi krutine i nazivaju se masti.

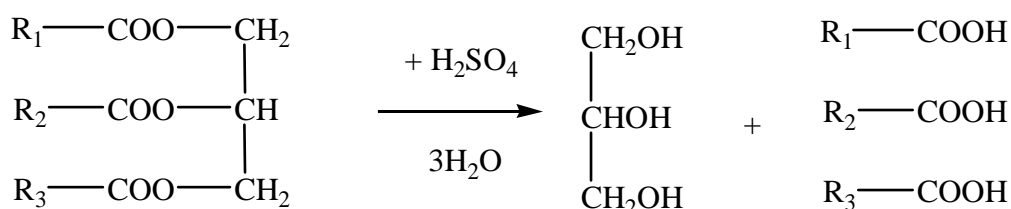


Zasićene masne kiseline i nezasićene masne kiseline s *trans* dvostrukom vezom omogućavaju kompaktne strukture.

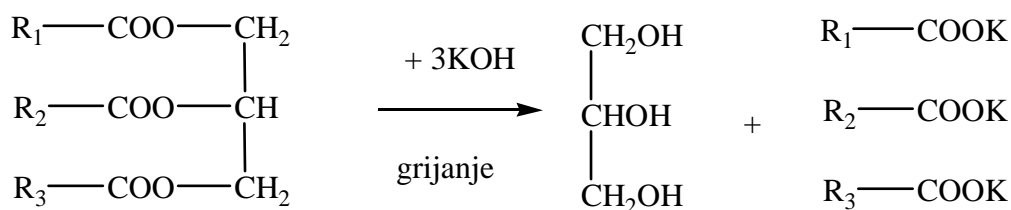


Nezasićene masne kiseline s *cis* dvostrukom vezom dovode do prelamanja alifatskih lanaca što onemogućava kompaktne strukture.

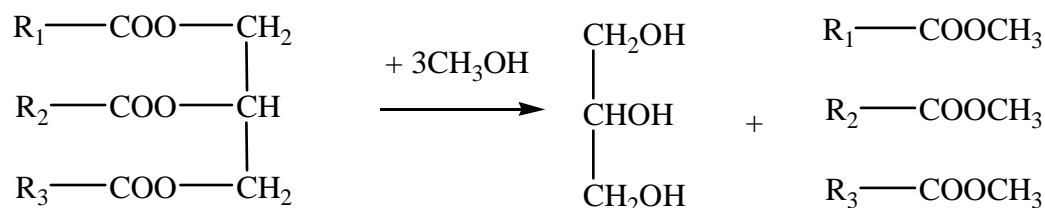
c) Kemijska svojstva glicerida. Hidroliza *glicerida* U kiseljoj sredini (5% H_2SO_4) kidaju se esterske veze i dobije se smjesa glicerola i masnih kiselina.



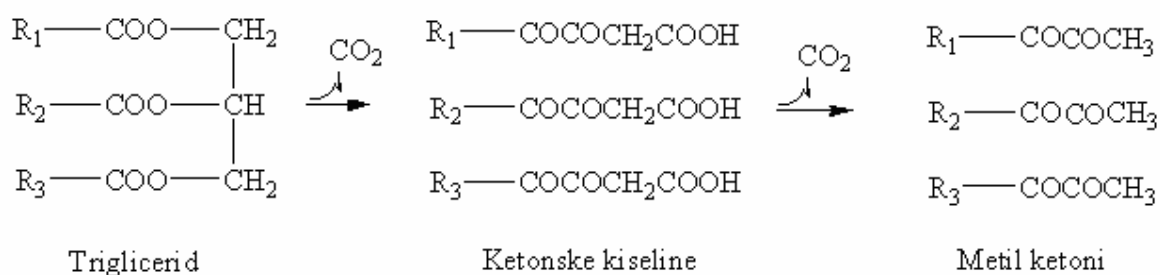
Saponifikacija glicerida Ako trigliceridi reagiraju s KOH ili NaOH oni se rastavljaju na osnovne sastojke glicerol i masne kiseline, a masne kiseline istovremeno reagiraju stvarajući sapune. Taj proces je poznat kao saponifikacija i našao je primjenu u kozmetičkoj industriji. Saponifikacijski broj je količina KOH (izražena u mg) potrebna za saponificiranje 1 g triglicerida.



Alkoholiza glicerida Gliceridi reagiraju s alkoholima (npr. metanol ili etanol). Pri tome se oslobađa glicerol i više masne kiseline u obliku metil- ili etil-estera.

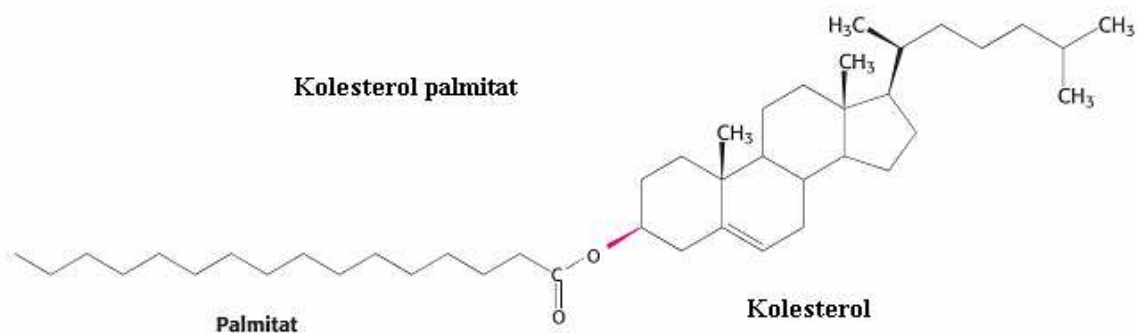


Ranketljivost glicerida je posljedica oksidacije dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama. Prvo nastaju odgovarajući peroksidi, a zatim može doći do cijepanja masnih kiselina na mjestima dvostrukih veza. Oslobađaju se aldehidi i isparljive organske kiseline. Ovi spojevi su uzrok neugodnog mirisa i ukusa. Međutim slična razgradnja može uzrokovati nastajanje ketonskih kiselina koje oslobađaju u procesu dekarboksilacije metil-ketone.



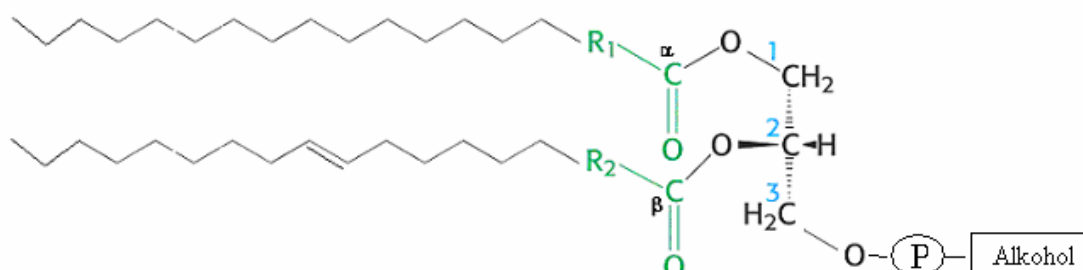
Metil-ketoni imaju točno definiran ukus i miris, a oslobađaju se u metabolizmu mikroorganizama *Penicillium* roda, te su našli široku primjenu u proizvodnji poznatih sireva Camambert i Roquefort.

9.2.2. Steroidi su esteri masnih kiselina i sterolskih alkohola. Sve masne kiseline mogu graditi steroide, koji kod čovjeka imaju vrlo važnu ulogu pri transportu masnih kiselina.

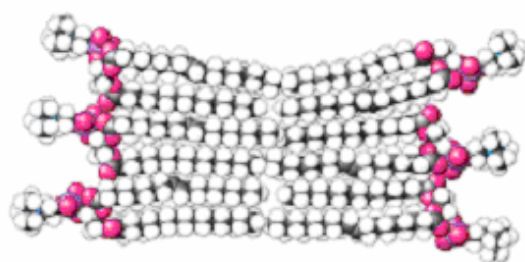
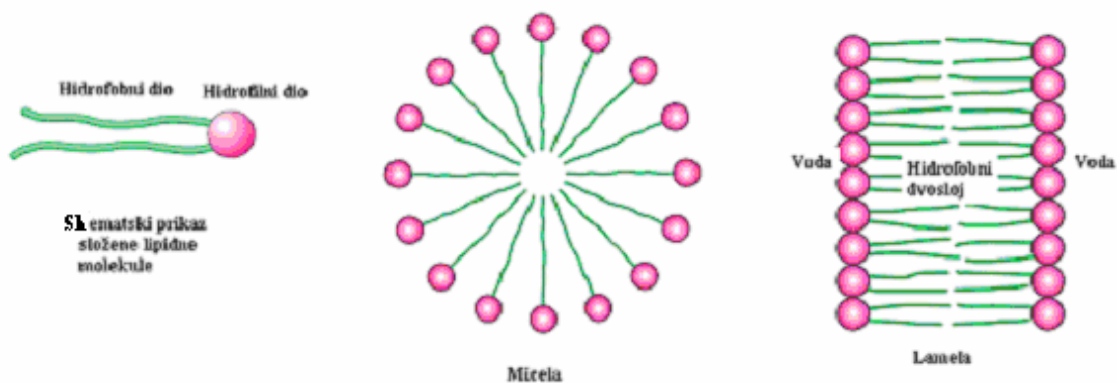


9.3. Složeni lipidi

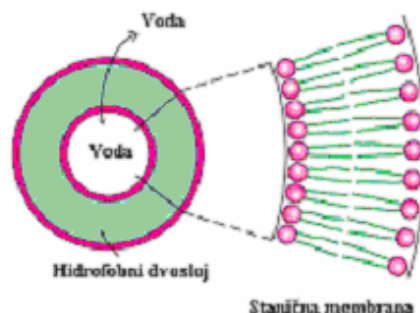
Složeni lipidi imaju važnu strukturnu ulogu u izgradnji bioloških membrana. Pored strukturne uloge imaju važnu ulogu u stanicama mozga i nervnog sustava u izgradnji mijelinskih ovojnica i prijenosu nervnih impulsa.



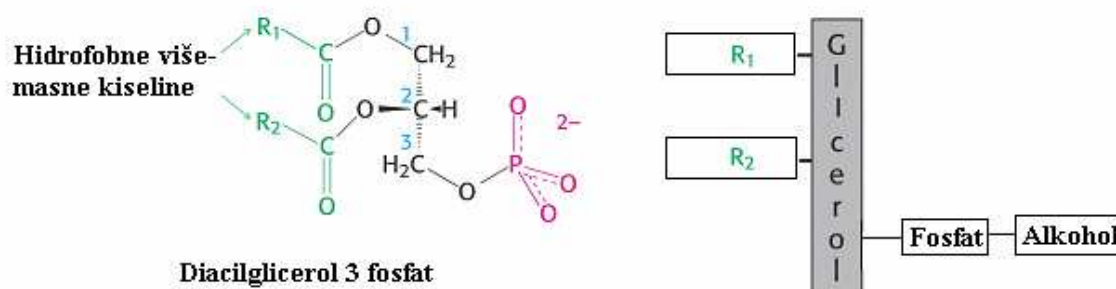
Složeni lipidi u svojoj kemijskoj građi imaju polarni i nepolarni dio. Zahvaljujući ovoj strukturnoj građi, u vodi zauzimaju točno određene strukture (micele i lamele) gdje se polarni dijelovi okreću prema vodi, a nepolarni se međusobno udružuju hidrofobnim vezama.



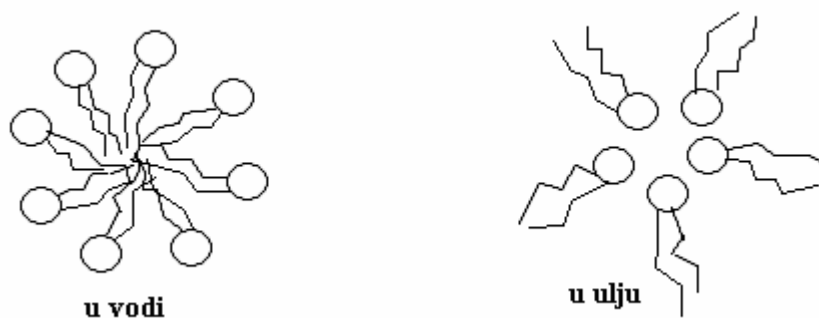
Skematski prikaz udruživanja složene lipidnih molekula



9.3.1. Glicerofosfolipidi. Glicerofosfolipidi su esteri fosforne kiseline i diglicerida. Fosforne kiseline se uglavnom veže na α -položaj L-glicerola. Ovi spojevi nisu topljivi u acetonu te se to svojstvo može iskoristiti pri njihovom odvajanju od običnih glicerida.



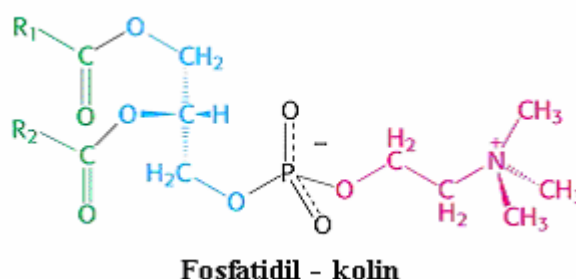
Glicerofosfolipidi imaju dipolnu molekulu te stoga imaju slična svojstva kao sapuni, točno se zna njihova orijentacija kada se nađu u različitim otapalima.



- hidrofilna glava (fosforne kiseline + alkohol)
- hidrofobni repovi (R ostaci višemasnih kiseline).

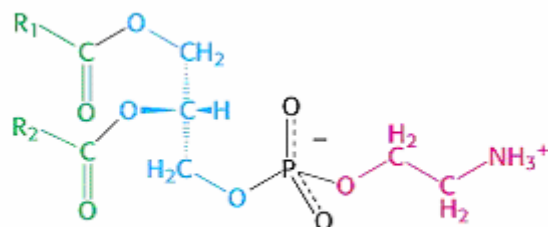
Na fosforne kiseline mogu biti vezani različiti alkoholi određujući glicerofosfolipidnoj molekuli različite biološke uloge.

a) Fosfatidil-kolin (Lecitin) U fosfatidil-kolinu na fosforne kiseline je vezan kolin, a na glicerol su vezane dvije masne kiseline, uglavnom R₁ je nezasićena a R₂ zasićena masna kiselina.



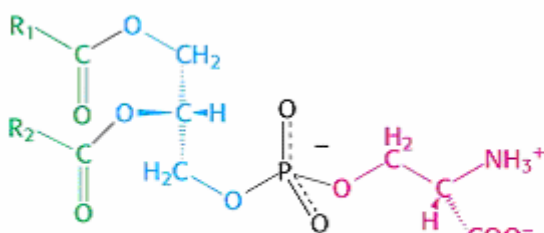
Lecitini su žuti spojevi koji imaju puferska svojstva: kisela radi fosforne kiseline i bazična radi amonijeve skupine u kolinu. Inače su jako rasprostranjeni u prirodi, posebno ih mnogo ima u plućima, jetri, mozgu, žumancu jaja itd.

b) Fosfatidil-etanolamin (kefalin) U fosfatidil-etanolaminu na fosforu je vezan etanolamin. Pri pH 7 ovi spojevi su nešto kiseli od lecitina. Postoje strukture u kojima je vezana samo jedna masna kiselina (lizo kefalini).



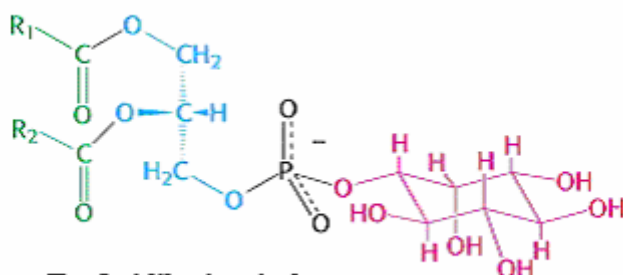
Fosfatidil - etanolamin

c) Fosfatidil-serin Fosfatidil-serin predstavlja 50% glicerofosfolipida mozga kod kojeg su masne kiseline u položaju R₁ i R₂ uglavnom stearinska i oleinska kiselina.



Fosfatidil - serin

d) Fosfatidil-inoziti To su spojevi izgrađeni od glicerola, masnih kiselina, fosforne kiseline i različitih izomera inozitola.



Fosfatidil - inozitol

Na inozitol se mogu vezati monosharidne ili oligosaharidne jedinice šećera. Fosfatidil inozitidi se nalaze u sastavu staničnih membrana i u životinjskom (mozak) i u biljnom svijetu (soja, kikiriki i pšenica), a identificirani su i kod bakterija. Često imaju ulogu receptora bioloških signala te su važna karika u prijenosu bioloških signala.

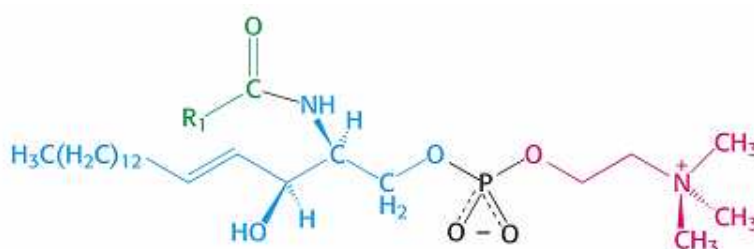
9.3.2. Sfingolipidi. Sfingolipidi su složeni lipidi koji u svojoj strukturi umjesto glicerola imaju nezasićeni aminoglikolni alkohol sfingozin (1,3-dihidroksi-2-amino-oktadeka-4-en). Dvostruka veza može biti hidrogenirana, pa takvi sfingolipidi imaju višu temperaturu taljenja.



Sfingozin

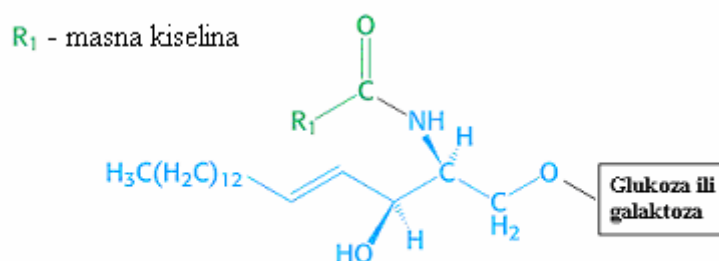
Sfingolipidi se razlikuju od glicerofosfolipida i po tome što masna kiselina nije vezana esterski već amidnom vezom preko amino skupine sfingozina. Takvi spojevi nazivaju se ceramidi koji imaju sličnu strukturu kao glicerofosfolipidi. S jedne strane polarna hidroksilna skupina na koju se može vezati fosforna kiselina, a s druge strane hidrofobni rep od ugljikovodikovog lanca i vezane više masne kiseline. Na polarni dio, preko fosforne kiseline, mogu se vezati kolin ili monosaharidne ili oligosaharidne šećerne jedinice. Višemasna kiselina uglavnom ima 24 C atoma ali može biti i palmitinska ili stearinska.

a) Fosfosfingolipidi Kada se na primarnoj alkoholnoj skupini ceramida veže fosforna kiselina a na nju kolin tada nastaje sfingomijelin.



Sfingomijelin

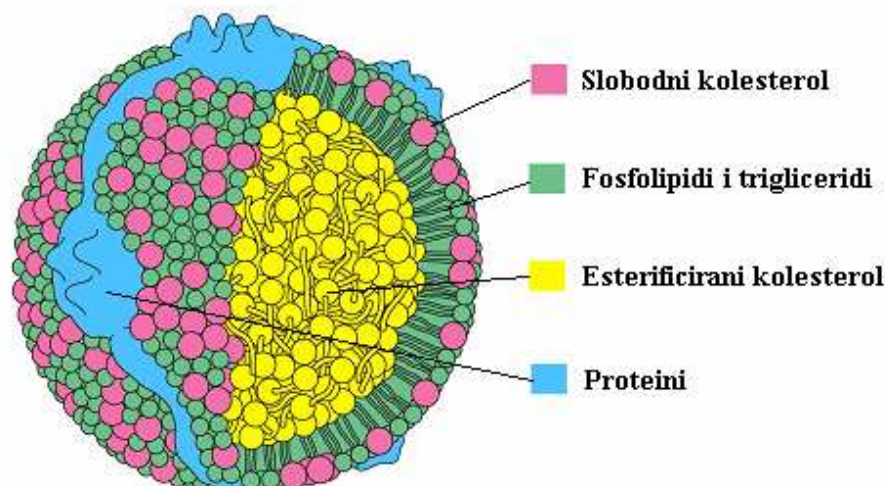
b) Glikosfingolipidi Kod glikosfingolipida na alkoholnoj skupini je vezan jednostavni šećer ili oligosaharid.



Cerebrozid

Šećerni dio glikosfingolipida ima važnu ulogu kao receptor raznih signala na površini s vanjske strane stanične membrane.

9.3.3. Lipoproteini. Budući su netopljivi u vodi lipidi se udružuju s proteinima kako bi se mogli transportirati krvotokom. Takve molekulske nakupine nazivaju se lipoproteini. Lipoproteini se međusobno razlikuju po veličini, gustoći, kemijskom sastavu i biološkoj ulozi.



a) Teški lipoproteini HDL (High density lipoprotein). Teški lipoproteini osiguravaju transport fosfolipida i manjim dijelom kolesterola u krvotoku. Imaju gustoću $\rho = 1,063 - 1,210 \text{ g/mL}$. Dimenzija 5 - 10 nm. Molekulska masa $M_r = 100\ 000 - 400\ 000$. Sadrže približno 50% proteina, 25% fosfolipida, 12% esterificiranog kolesterola, 10% triglicerida i 3% slobodnih masnih kiselina.

b) Lagani lipoproteini LDL (Low density lipoprotein). Ovi lipoproteini su glavni prijenosnici kolesterola od jetre do perifernih tkiva. Kolesterol je vezan na fosfolipidnu frakciju. Srednja gustoća im je $\rho = 1,035 \text{ g/mL}$, $M_r = 3\ 300\ 000$. Dimenzija 17 - 26 nm. Oni sadrže 25% proteina i 75% lipida, a lipidna frakcija je izgrađena od 20% fosfolipida, 15% triglicerida, 50% esterificiranog kolesterola, 12% slobodnog kolesterola i ostatak su slobodne masne kiseline.

c) Vrlo lagani lipoproteini VLDL (Very low density lipoprotein). Ovi lipoproteini su glavni prijenosnici triglicerida od jetre do perifernih tkiva. Enzimski sustav lipoprotein lipaza hidrolizira lipoproteine i oslobađa višemasne kiseline iz triglicerida. Gustoća $\rho = 0,96 - 1,006 \text{ g/mL}$, dimenzije 40 - 100 nm. Molekulska masa nije precizno određena. Izgrađeni su od 10% proteina i 90% lipida. Sami lipidi su izgrađeni od 20% fosfolipida, 8% kolesterola u slobodnom stanju, 15% esterificiranog kolesterola, 50% triglicerida i ostatak su slobodne više masne kiseline.

d) Kilomikroni i lipomikroni. Kilomikroni se pojavljuju u krvi poslije apsorpcije lipida u crijevima (egzogeni lipidi), a lipomikroni su sintetizirani u jetri. Kilomikroni i lipomikroni su čestice male gustoće $\rho < 0,96 \text{ g/mL}$, velikih dimenzija $>500 \text{ nm}$, neodređene molekulske mase. Izgrađeni su od samo 1% proteina i 99% lipida. Lipidni dio sadrži 85% triglicerida, 10% fosfolipida i 5% slobodnog kolesterola. Osnovna uloga kilomikrona i lipomikrona je prenošenje bilo egzogenih bilo endogenih lipida do perifernih tkiva.

9.4. Biološke membrane

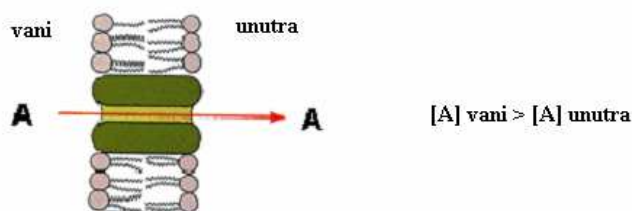
Biološke membrane su zapreke visokoselektivne propusnosti koje stvaraju zatvorene odjeljke poput cijelih stanica ili organela unutar stanice. Membranske crpke i propusti reguliraju molekularni i ionski sastav tih odjeljaka. Pored toga membrane kontroliraju tijek informacija između stanica i njihove okoline. Važnu ulogu pri tome imaju specifični membranski proteini koji kao receptori prihvaćaju i prenose vanjske poticaje. U biološkim membranama odvijaju se i dva najvažnija procesa pretvorbe energije; fotosinteza i oksidacijska fosforilacija. Fotosinteza koja pretvara energiju svjetlosnog zračenja u energiju kemijske veze odvija se na unutrašnjoj membrani kloroplasta, a oksidacijska fosforilacija pri kojoj nastaje ATP odvija se na unutrašnjim membranama mitohondrija.

9.4.1. Građa bioloških membrana. Građa bioloških membrana je raznolika kao i njihove funkcije. Ipak one imaju određeni broj zajedničkih svojstava:

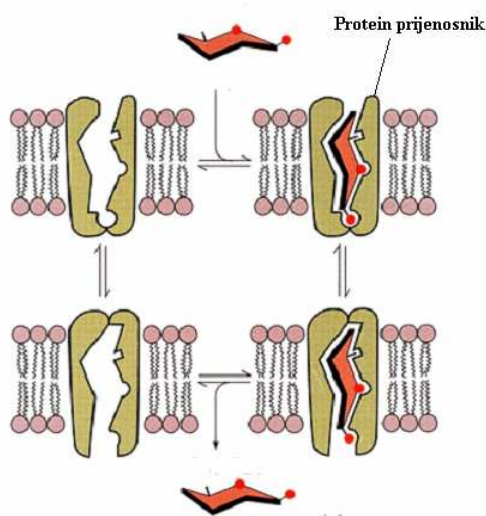
- Membrane su pločaste tvorevine debele samo nekoliko molekula, koje izgrađuju odjeljke različitog sastava. Debljina membrana iznosi 6-10 nm.
- Membrane se uglavnom sastoje od lipida i proteina. Maseni omjer proteina i lipida većine membrana je između 1:4 i 4:1. Membrane često sadrže i ugljikohidrate vezane na lipide i proteine. Funkcije bioloških membrana su neophodne za održavanje životnih procesa.
- Membranski lipidi su razmjerno male molekule koje imaju i hidrofилni i hidrofobni dio. U vodenim otopinama ti lipidi spontano stvaraju zatvorene dvoslojeve molekula koji sprečavaju protok polarnih molekula.
- U posebnim funkcijama membrane sudjeluju specifični proteini koji imaju funkciju receptora, kanala, katalizatora, provodnika energije ili crpki. Membranski proteini su ugrađeni u lipidne dvoslojeve pomoću hidrofobnih aminokiselinskih ostataka.
- Molekule proteina i lipida u membranama drže se zajedno nekovalentnim vezama (uglavnom hidrofobne). Kemijska građa membrana je asimetrična, tj. unutrašnja i vanjska strana su različite.
- Biološke membrane nemaju fiksno uređenje u prostoru, one su uglavnom tekuće tvorevine i mogu se smatrati gustim dvodimenzijskim otopinama međusobno povezanih proteina i lipida.

9.4.2. Propusnost i prijenos tvari kroz staničnu membranu. Radi hidrofobnosti lipidne membrane su izolatori čiji električni otpor iznosi oko $10^9 \Omega/\text{cm}^2$. Hidrofobne molekule relativno lako prolaze kroz stanične membrane, međutim električni otpor membrana sprječava slobodan prolaz iona i drugih hidrofилnih spojeva. Iznimka su molekule vode koje prolaze u malim skupinama molekula i to kroz šupljine u membranama koje nastaju uslijed konformacije njenih nezasićenih masnih kiselina. Takvi paketi molekula vode su manji od hidratiziranih iona te mogu prolaziti kroz nastale šupljine. Ostale hidrofилne tvari zahtijevaju membranske proteine koji sudjeluju u njihovom prijenosu. Postoje različiti prijenosni mehanizmi kroz stanične membrane:

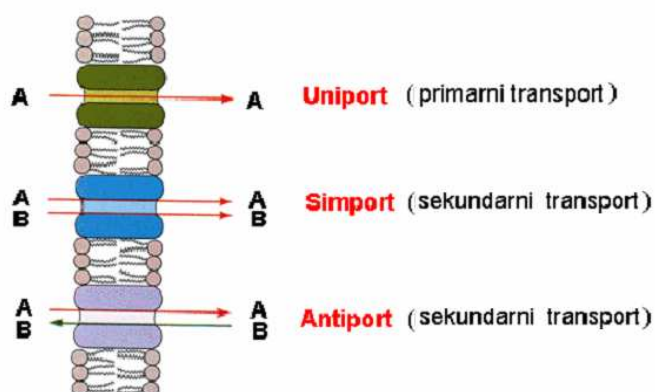
a) Pasivna difuzija podrazumijeva slobodan prolaz tvari za koje postoje pore ili kanali (membranski proteini). Prijenos tvari se odvija spontano sa strane veće koncentracije na stranu manje koncentracije tvari.



b) Prijenos pomoću nosača temelji se na specifičnom djelovanju molekule koja se prenosi s nekim prijenosnikom (integralnim membranskim proteinom) koji olakšava prijenos. I ovaj proces prijenosa je pasivan i odvija se spontano sa strane veće koncentracije na stranu manje koncentracije tvari. Radi potrebe sudjelovanja specifičnog prijenosnika naziva se olakšana difuzija.



c) Aktivni prijenos podrazumijeva prijenos iona ili hidrofilnih molekula suprotno gradijentu koncentracije. Potrebna je energija da bi došlo do prijenosa. Izvor energije je uglavnom hidroliza ATP molekula. Tada se govori o primarnom aktivnom prijenosu. Ako je aktivni prijenos neke tvari povezan s istovremenim spontanom prijenosom neke druge hidrofilne molekule ili iona, tada se govori o sekundarnom aktivnom prijenosu. U ovom slučaju energiju za aktivni transport daje spontani prijenos ove druge hidrofilne molekule ili iona.



10. POGLAVLJE

BIOENERGETIKA

Kemijski procesi u živim organizmima odvijaju se po istim principima i zakonitostima kao i svi drugi kemijski procesi. Postavljaju se pitanja kako stanice crpe energiju iz okoline i kako je koriste za svoje potrebe. Odgovore na ova pitanja daje posebna grana biokemije koja se temelji na termodinamici, a naziva se bioenergetika.

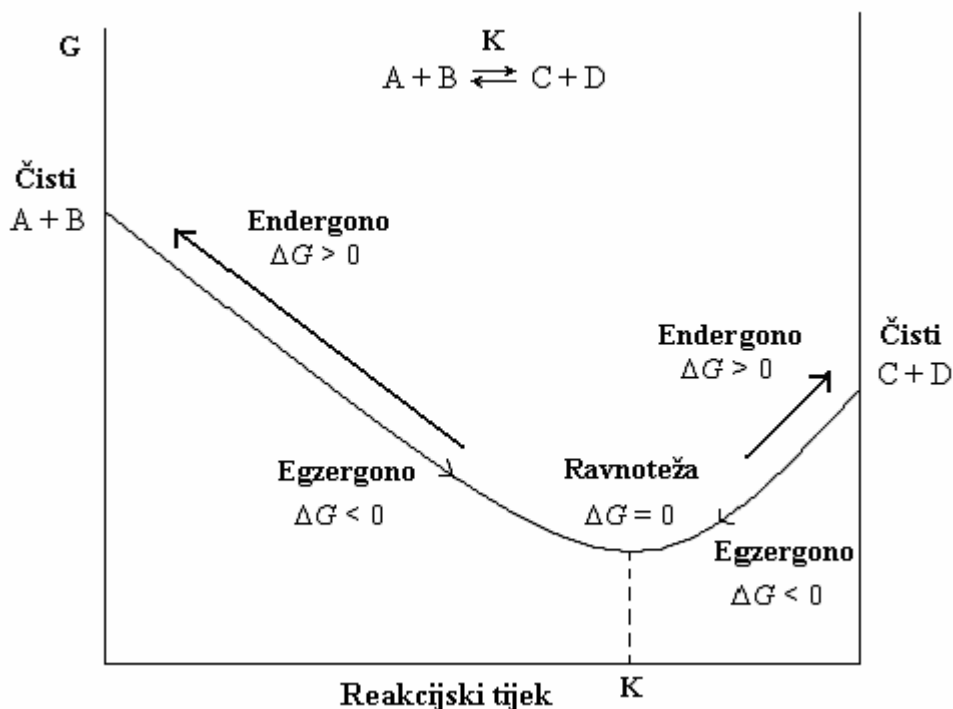
10.1. Slobodna entalpija i spontani procesi

Za objašnjenje i razumijevanje energetike živih organizama, najkorisnija termodinamička funkcija je slobodna entalpija ΔG . Ova funkcija je vrijedan kriterij po kojem se zna hoće li neka biokemijska reakcija teći spontano (bez utroška energije).

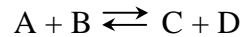
- $\Delta G < 0$ spontana reakcija (**egzergoni proces**)
- $\Delta G = 0$ sustav je u ravnoteži
- $\Delta G > 0$ potrebno je utrošiti energiju (**endergoni proces**)

Pojmове egzergon i endergon treba razlikovati od pojmova egzoterman ($\Delta H < 0$) i endoterman ($\Delta H > 0$) proces koji se odnose na termodinamičku funkciju entalpiju.

Spontano događanje neke kemijske reakcije ovisi o konstanti kemijske ravnoteže i početnim koncentracijama reaktanata.



Za jednu opću kemijsku reakciju



vrijedi izraz za slobodnu entalpiju

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C][D]}{[B][A]} - RT \ln \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[B]_{eq}[A]_{eq}}$$

[] - bilo koje početne koncentracije

[]_{eq} - ravnotežne koncentracije

Ovisno o početnim koncentracijama proces može biti i egzergon i endergon, a ako se krene od ravnotežnih koncentracija očigledno je $\Delta G = 0$. Ako se reakcija odvija u standardnim uvjetima (početne koncentracije svih reaktanata su 1 mol/L) tada vrijedi izraz:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[B]_{eq}[A]_{eq}} = -RT \ln K$$

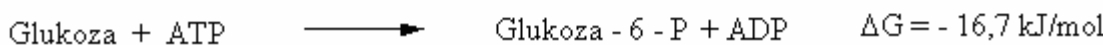
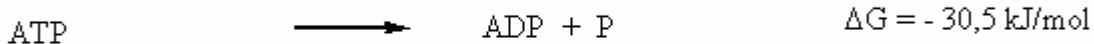
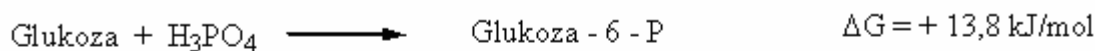
Uvođenjem ovog izraza u gornju jednadžbu za opći slučaj dobije se izraz:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[B][A]}$$

Spontanost kemijske reakcije ne ovisi o vrijednosti ΔG^0 , nego o vrijednosti ΔG . Npr. ΔG^0 može biti veće od nule, ali upotrebom većih koncentracija reaktanata u odnosu na ravnotežne koncentracije, postiže se $\Delta G < 0$, odnosno postiže se spontan proces.

10.2. Endergone reakcije

Endergone reakcije ($\Delta G > 0$) se ne odvijaju spontano, međutim termodinamički nepovoljnu reakciju može pokrenuti termodinamički povoljnija kemijska reakcija. Npr.

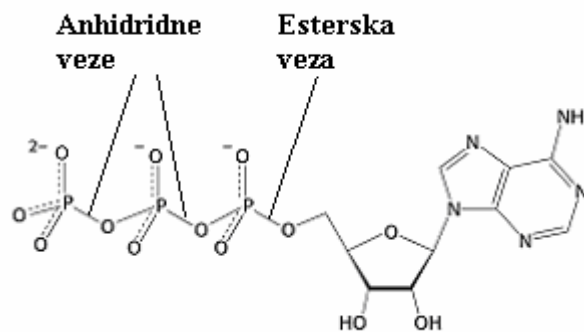


U standardnim uvjetima glukoza ne može spontano reagirati s fosfornom kiselinom jer je ΔG te reakcije veće od nule (endergona reakcija). Međutim, uz egzergonu reakciju hidrolize ATP, moguća je pretvorba glukoze u glukoza-6-P. Može se zaključiti da termodinamički povoljna reakcija može pokrenuti termodinamički nepovoljnu reakciju.

10.3. Metastabilnost živog sustava

Živim organizmima potreban je neprestan dotok slobodne energije za tri osnovna procesa: mehanički rad stezanja mišića i drugih staničnih pokreta, za aktivni prijenos molekula i iona kroz stanične membrane i za biosintezu biomolekula. Ovi procesi održavaju neki živi organizam u stanju koje je daleko od termodinamičke ravnoteže, a slobodna energija potrebna za to održavanje potiče iz okoline. Kemotrofna bića dobivaju tu energiju oksidacijom kemijskih tvari iz hrane, a fototrofna bića pretvorbom svjetlosne energije. Prije nego se uloži u pokretanje mišića, aktivni prijenos tvari ili u biosintezu, energija se pretvara u posebne oblike prijenosne energije: adenzin trifosfat ili protonski i ionski gradijent

10.3.1. Adenzin trifosfat (ATP) kao izvor energije Molekula ATP je bogata energijom jer sadrži dvije fosfoanhidridne veze koje hidrolizom oslobađaju svaka za sebe 30,5 kJ/mol. Oslobođena energija može se iskoristi za pokretanje endergonih procesa.



U živim organizmima postoje i druge molekule koje posjeduju visok potencijal za prijenos fosfatne skupine i oslobađanje energije za pokretanje endergonih procesa. Npr. fosfoenol piruvat ($\Delta G^{\circ} = -61,9$ kJ/mol) ili karbamoil fosfat ($\Delta G^{\circ} = -51,5$ kJ/mol).

10.3.2. Protonski i ionski gradijent kao izvor energije Biološke membrane su zapreke s visokoselektivnom propusnošću. Između ostalog one nadziru protonske i ionske gradijente općenito. O promjeni slobodne energije prenošene tvari kroz staničnu membranu ovisi hoće li transportni proces biti aktivan ili pasivan. Ako se promatra nenabijenu molekulu u otopini, promjena slobodne entalpije pri prijenosu te tvari s jedne strane gdje je njezina koncentracija c_1 , na drugu stranu, gdje je njezina koncentracija iznosi c_2 je zadana jednačzbom:

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_2}{c_1} = 2,303RT \log \frac{c_2}{c_1}$$

Kada je riječ o nabijenim česticama mora se misliti i na električni potencijal preko membrane. Zbroj koncentracijskog i električnog člana zove se elektrokemijski potencijal. U tom slučaju promjena slobodne entalpije ionskog ili protonskog gradijenta iznosi:

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_2}{c_1} + zF\Delta E$$

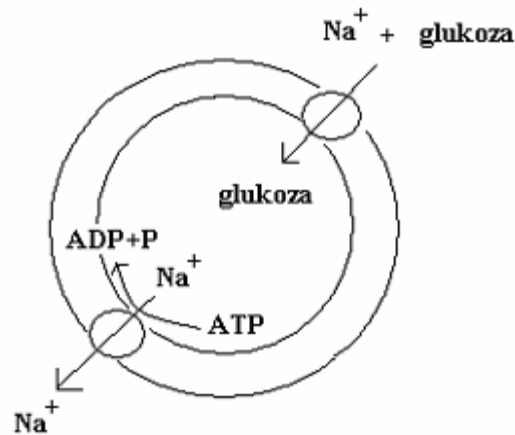
Z – broj naboja prenesene tvari

F – Faradayeva konstanta ($F = 9,648 \times 10^4$ C mol⁻¹)

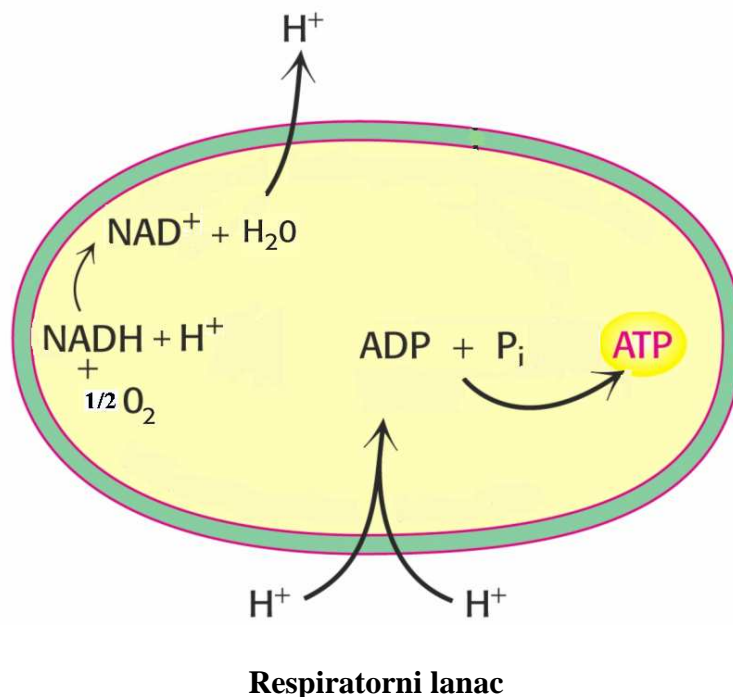
ΔE – električni potencijal s različitih strana biološke membrane

Oslobođena energija pri spontanom egzergonnom prolasku neke tvari kroz staničnu membranu može se iskoristiti za pokretanje nekog endergonog procesa (npr. biosinteza ATP ili aktivni

transport neke tvari kroz staničnu membranu). Izravni pogon mnogih transportnih procesa kroz staničnu membranu u svezi je s protokom iona niz elektrokemijski gradijent. Tako npr. glukoza ulazi u stanice uz istovremeni ulazak Na^+ iona. Brzina i opseg transporta glukoze ovise o egzergonom koncentracijskom gradijentu Na^+ iona kroz membranu. S druge strane hidroliza ATP molekula se koristi za ponovno izbacivanje Na^+ iona iz stanice.



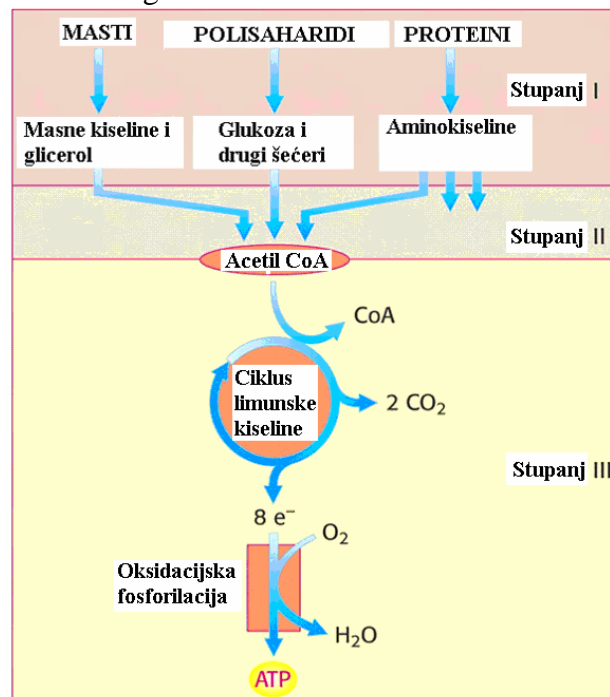
Konačno sinteza ATP molekula je omogućena energijom protonskog gradijenta na unutrašnjoj membrani mitohondrija u procesu oksidacijske fosforilacije. U respiracijskom lancu protoni se izbacuju iz matriksa mitohondrija, preko unutrašnje membrane u međumembranski prostor. Prilikom povratka protona u matriks, energija protonskog gradijenta se koristi za sintezu ATP molekula. Očigledno je da je moguća pretvorba energetske valute jedne u drugu, međutim dok je živi organizam na životu mora se održavati trajna neravnoteža u korist ATP molekula i membranskog potencijala s različitih strana stanične membrane. Ravnoteža $\text{ADP} + \text{P} \rightleftharpoons \text{ATP}$ je uvijek pomaknuta u korist ATP. Za održavanje ovakve neravnoteže ATP molekula i ionskog gradijenta (cca 60mV), živa stanica mora stalno crpiti energiju od okoline.



11. POGLAVLJE

METABOLIZAM

Metabolizam (izmjena tvari) predstavlja mrežni sustav tisuća kemijskih reakcija pri kojima stanice nekog organizma crpe energiju iz svoje okoline (katabolizam) i sintetiziraju osnovne preteče za izgradnju vlastitih makromolekula (anabolizam). Broj reakcija u organizmu je velik, ali broj vrsta reakcija i molekula koje u njima sudjeluju je razmjerno malen. U svim oblicima života središnju ulogu ima skup od stotinjak molekula. U ovim predavanjima izložena samo opća načela crpljenja energije iz hrane (katabolizam). Osnovna zadaća katabolizma je stvaranje ATP koji se troši za pokretanje mišića, aktivni transport tvari i biosintetske procese u nekom organizmu.



11.1. Crpljenje energije iz hrane

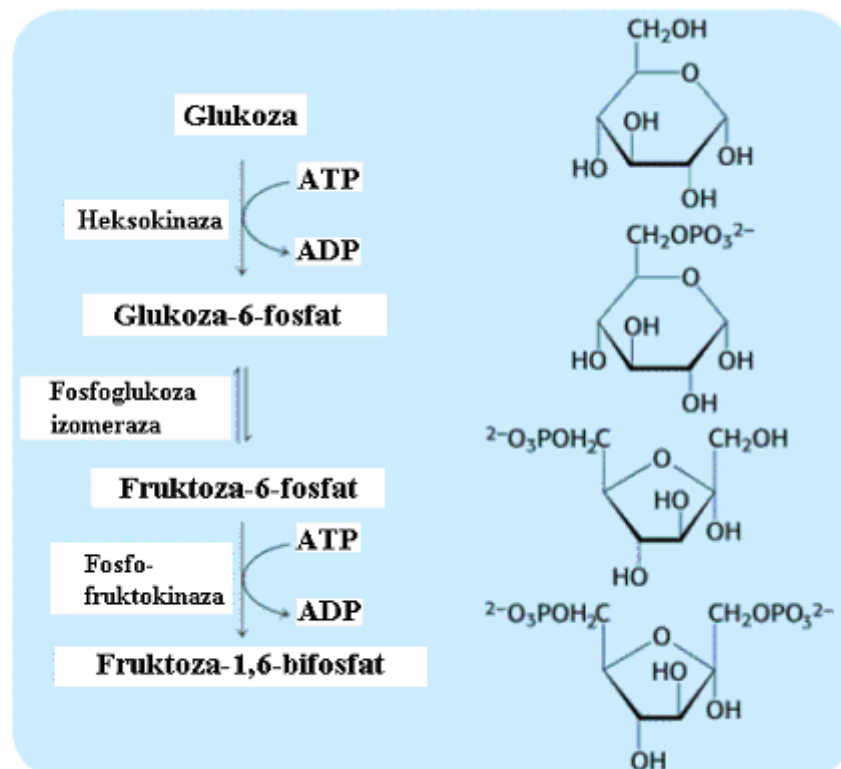
Stvaranje energije oksidacijom hranljivih tvari može se podijeliti u tri stupnja: Prvi stupanj se odvija u želudcu i crijevima gdje se velike molekule iz hrane cijepaju na manje. Proteini se hidroliziraju u dvadeset vrsta aminokiselina, polisaharidi u jednostavne šećere poput glukoze i fruktoze, a masti u glicerol i masne kiseline. U ovoj fazi ne nastaje energija. Drugi stupanj se odvija u stanicama gdje se nastale male molekule dalje razgrađuju do nekoliko jednostavnih jedinica koje imaju središnju ulogu u metabolizmu. Iz većine ovih molekula (šećera, masnih kiselina i nekih aminokiselina) stvara se acetilna jedinica koja se povezuje s koenzimom A. U ovoj fazi nastaje nešto korisne energije u obliku ATP. Treći stupanj se odvija u mitohondrijama i sastoji se od ciklusa limunske kiseline (Krebsov ciklus) i oksidacijske fosforilacije. To su krajnji koraci oksidacije molekula iz hranljivih tvari. Acetilna jedinica se na ovom stupnju oksidira u CO₂ i H₂O. Za svaku acetilnu jedinicu koja se oksidira u ciklusu limunske kiseline prenesu se četiri elektrona na koenzime NAD⁺ i FAD. Pri oksidaciji reduciranih koenzima NADH i FADH₂, u procesu oksidacijske fosforilacije nastaje ATP. Većina ATP stvorenog razgradnjom hranljivih tvari nastaje na ovom stupnju.

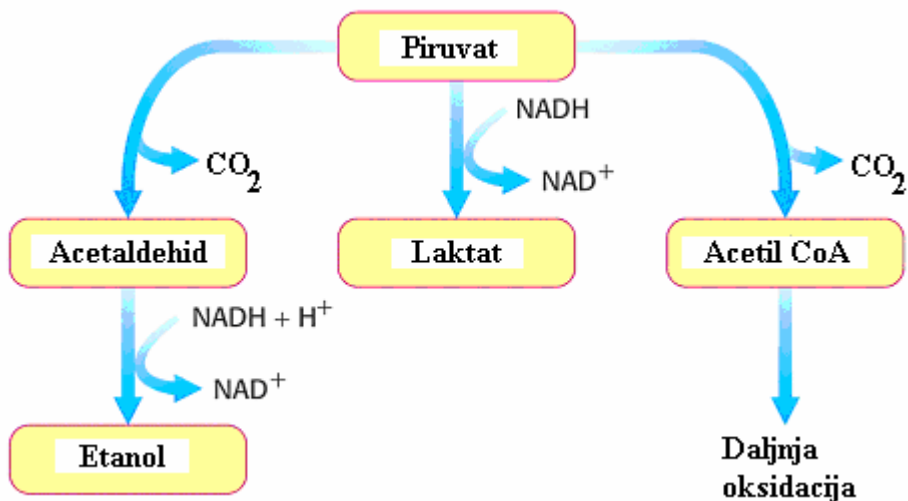
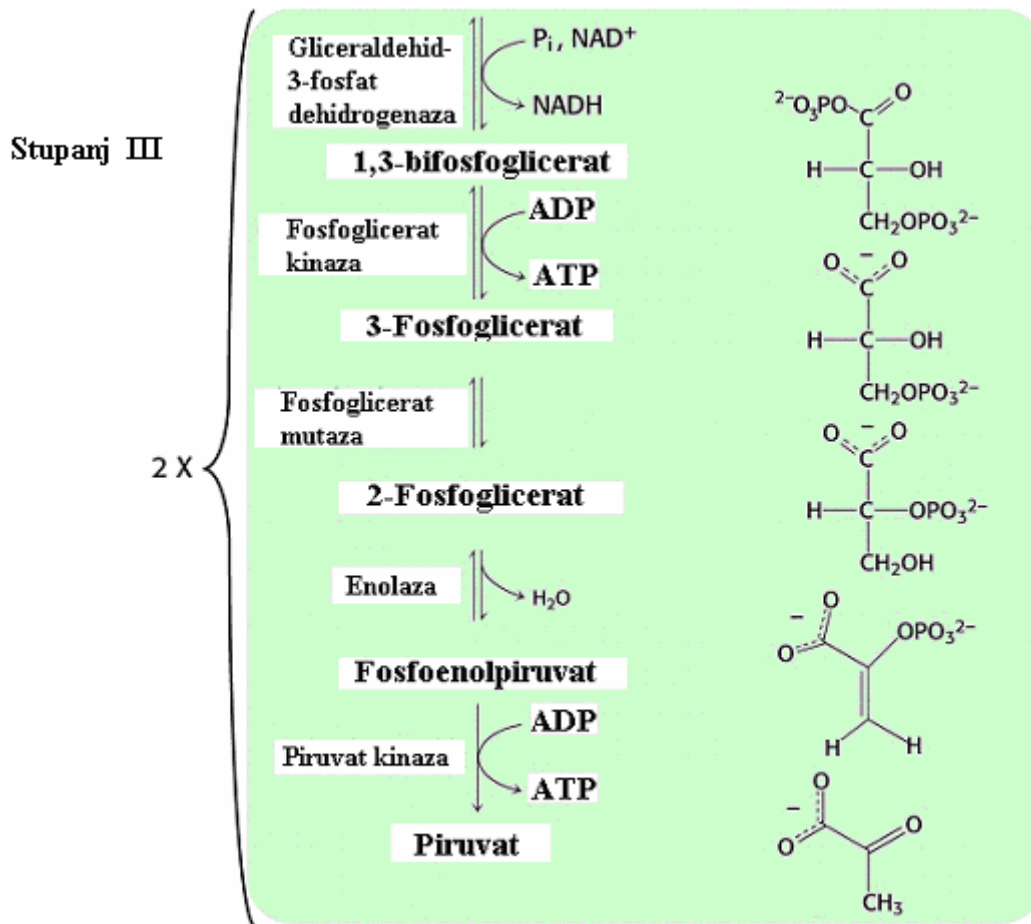
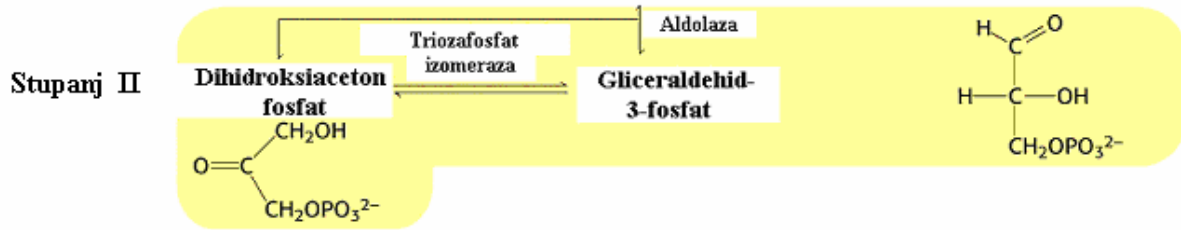
11.2. Razgradnja glukoze (glikoliza)

Glikoliza ima dvojaku ulogu, da razgrađuje glukozu u svrhu stvaranja ATP ali i osiguravanja građevnih osnovnih jedinica za sintezu staničnih sastojaka. Npr. iz nastalih acetilnih jedinica mogu se sintetizirati masne kiseline. Glikoliza predstavlja slijed kemijskih reakcija u kojima se glukoza transformira u piruvat uz istovremeno stvaranje ATP. Kod aerobnih organizama glikoliza je predigra ciklusu limunske kiseline. U aerobnim uvjetima piruvat ulazi u mitohondrije gdje se pretvara u acetilnu jedinicu koja se potpuno oksidira u CO_2 i H_2O . Ako nema dovoljno kisika, kao u mišiću koji se aktivno steže, piruvat se pretvara u laktat koji ulazi krvotok i vraća se u jetru. U nekih anaerobnih organizama poput kvasaca piruvat prelazi etanol. Na sličan način u nekim anaerobnim mikroorganizmima glukoza se pretvara u piruvat koji prelazi u laktat. Stvaranje etanola i laktata iz glukoze naziva se proces vrenja (fermentacije).

Deset reakcija glikolize odvijaju se u citosolu i mogu se podijeliti u tri stupnja. U prvom stupnju glukoza se pretvara u fruktoza-1,6-difosfat fosforilacijom, izomerizacijom i ponovnom fosforilacijom. U tim reakcijama glukoza se aktivira i obogaćuje energijom potrebnom za daljnju transformaciju. Za svaku molekulu glukoze utroše se dvije ATP molekule. U drugom stupnju aldolaza cijepa fruktoza-1,6-difosfat u dihidroksiaceton fosfat i gliceraldehid-3-fosfat koji lako prelaze jedan u drugi tako da u daljnje pretvorbe od jedne glukoze odlaze dva gliceraldehid-3-fosfata. Dvije molekule gliceraldehid-3-fosfata se oksidiraju i fosforiliraju u dvije molekule 1,3-difosfoglicerata. Zatim se pretvaraju u dvije molekule 3-fosfoglicerata pri čemu nastaju dvije molekule ATP. U trećem stupnju glikolize dvije molekule 3-fosfoglicerata se prevode u dva piruvata i nastaju još dvije molekule ATP. Pri oksidaciji gliceraldehid-3-fosfata akceptor elektrona je NAD^+ . Da bi se glikoliza dalje odvijala taj koenzim se mora obnoviti. U aerobnim uvjetima glikolizom stvoreni NADH se oksidira u procesu disanja i pri tome se regenerira NAD^+ . U anaerobnim uvjetima NAD^+ se regenerira redukcijom piruvata u laktat, dok u nekim mikroorganizmima NAD^+ se obnavlja sintezom etanola ili laktata iz piruvata. Ta dva procesa se zovu vrenje.

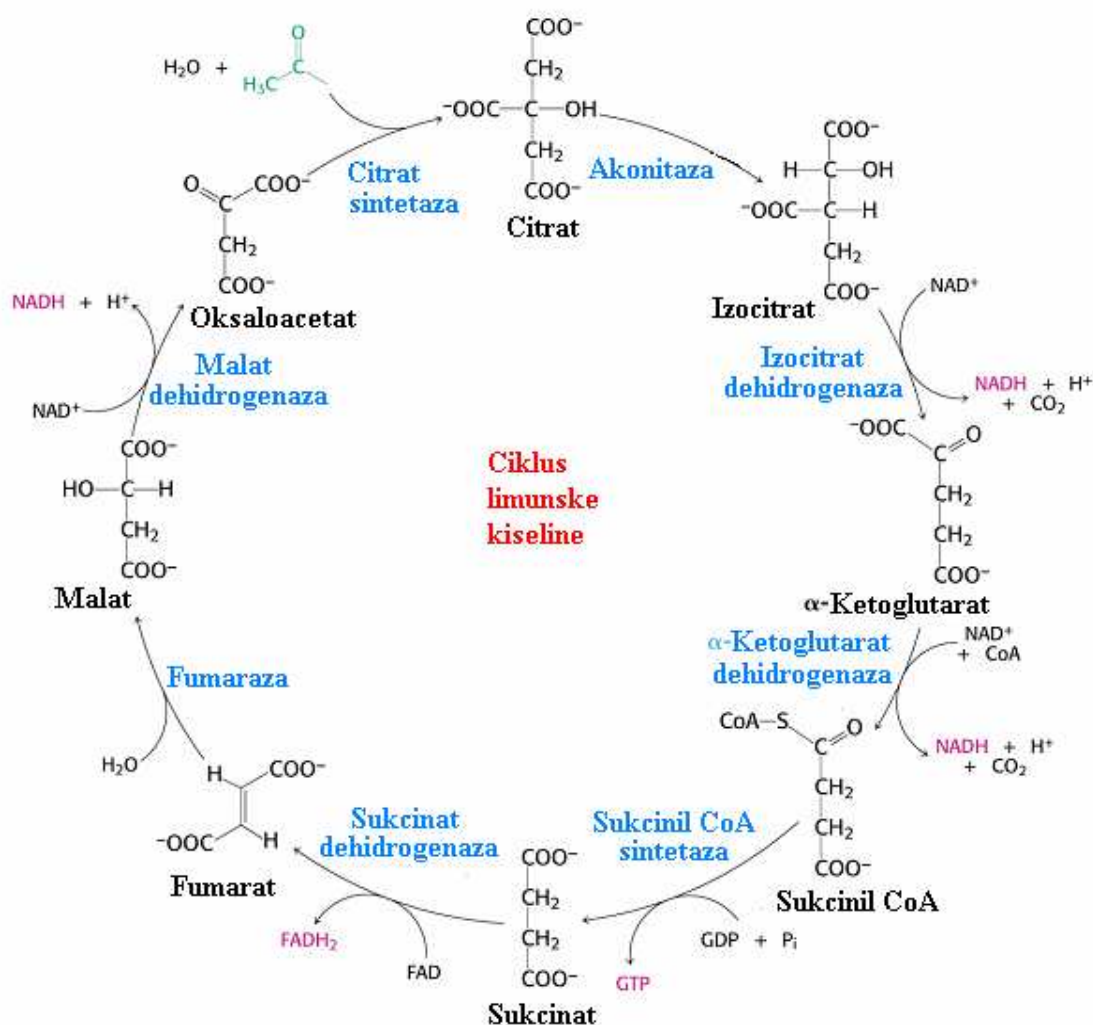
Stupanj I



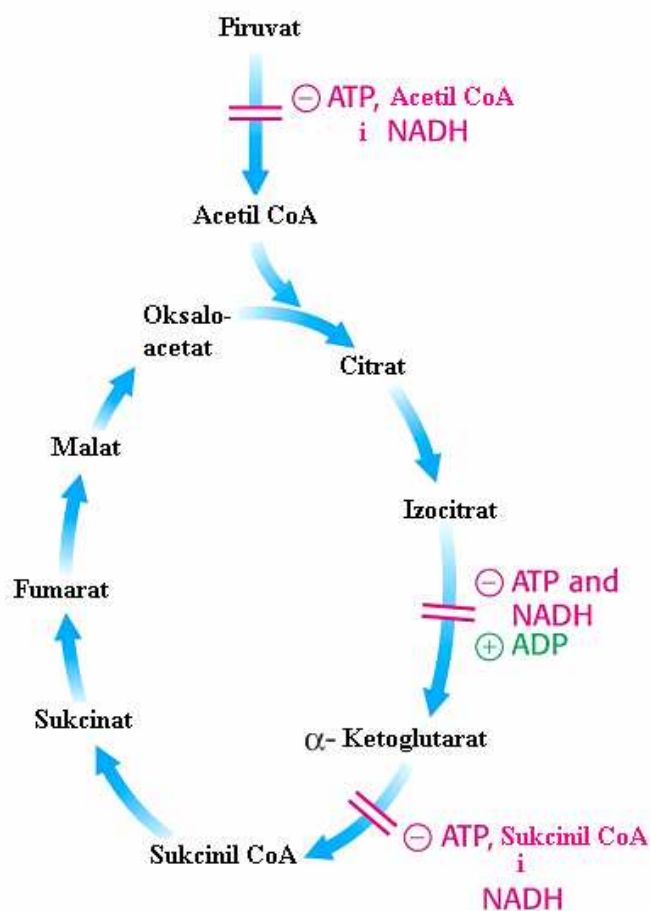


11.3. Ciklus limunske kiseline

Ciklus limunske kiseline je konačni opći put oksidacije hranljivih sastojaka. Većina molekula ulazi u ciklus u obliku acetil-CoA. Veza glikolize i ciklusa limunske kiseline je oksidacijska dekarboksilacija piruvata čime se stvara acetil-CoA. Ta reakcija i reakcije ciklusa odvijaju se u mitohondrijama za razliku od glikolize koja se događa u citosolu. Ciklus počinje kondenzacijom oksaloacetata (C₄) i acetil-CoA (C₂) što daje citrat (C₆) koji se izomerizira u izocitrat (C₆). Oksidacijska dekarboksilacija tog intermedijera daje α-ketoglutarat (C₅). U narednoj reakciji odvaja se i druga molekula CO₂, tu se α-ketoglutarat dekarboksilira do kompleksa sukcinil-CoA. Zatim se ovaj spoj cijepa i nastaje sukcinat (C₄) i oslobađa se visokoenergijski GTP. Sukcinat se zatim oksidira do fumarata (C₄) koji se tada hidrogenira u malat (C₄). Konačno se malat oksidira i time se regenerira oksaloacetat (C₄). Time dva atoma ugljika iz acetil-CoA ulaze u ciklus, a dva izlaze u obliku CO₂ u uzastopnim dekarboksilacijama koje kataliziraju izocitrat-dehidrogenaza i α-ketoglutarat dehidrogenaza. U četiri redukcijsko-oksidacijske reakcije ciklusa tri se para elektrona prenesu na tri molekule NAD⁺, a jedan par na jednu molekulu FAD. Ti se reducirani nosači elektrona zatim oksidiraju u elektron-transportnom lancu i daju jedanaest molekula ATP. Uz to, izravno nastaje jedan visokoenergijski fosfat (GTP) u ciklusu limunske kiseline. Zato se za svaku acetilnu jedinicu koja se u ciklusu potpuno oksidira u H₂O i CO₂ stvori ukupno dvanaest visokoenergijskih fosfatnih veza.



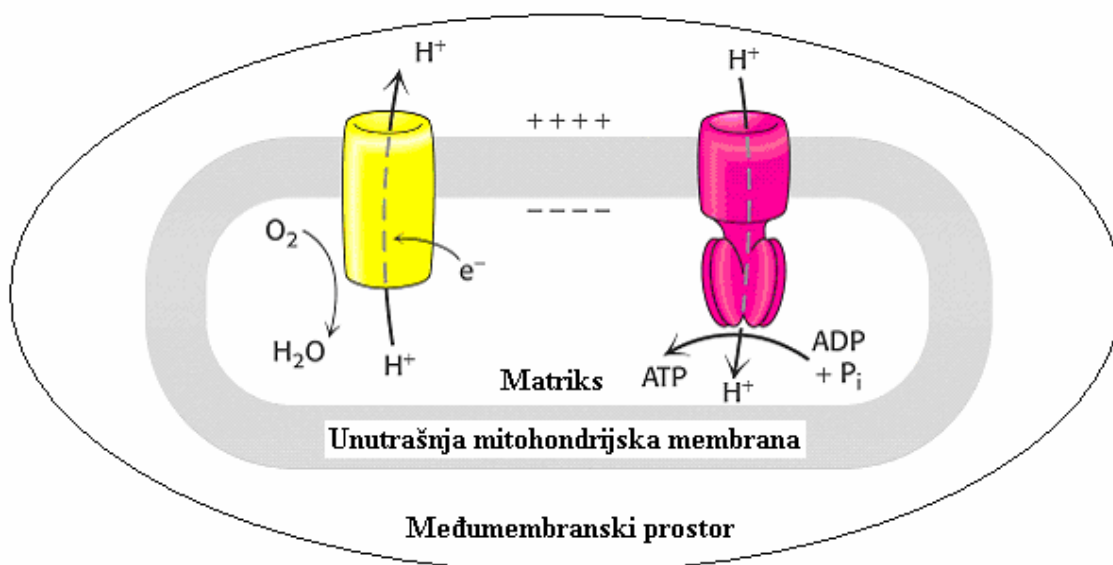
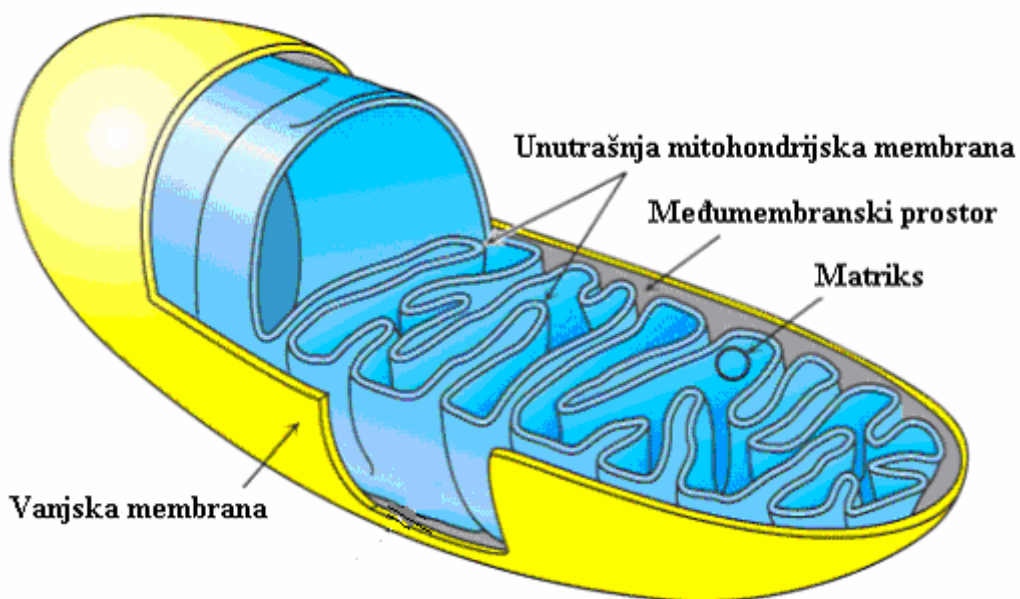
Ciklus limunske kiseline funkcioniira samo u aerobnim uvjetima jer su mu potrebni NAD^+ i FAD . Ti se nosači elektrona regeneriraju kad NADH i FADH_2 prenesu svoje elektrone elektron-transportnim lancem na O_2 , pri čemu se stvara ATP. Ciklus se kontrolira regulacijom triju enzima koji u njemu sudjeluju. Visokoenergijski naboj smanjuje aktivnost citrat-sintetaze, izocitrat dehidrogenaze i ketoglutarat dehidrogenaze. Drugo važno regulacijsko mjesto je stvaranje acetil-CoA iz piruvata. Aktivnost kompleksa piruvat dehidrogenaze kontroliraju povratno sprežna regulacija nukleotidima (ATP i GTP) i kovaletno mijenjanje. Ovi mehanizmi imaju za svrhu smanjivanje brzine stvaranja acetil-CoA kada je visoka koncentracija ATP. S druge strane, kada je energijski naboj stanice nizak, tj. koncentracija ADP visoka, tada je stimulirana izocitrat dehidrogenaze i ubrzan ciklus limunske kiseline.



11.4. Oksidacijska fosforilacija

Molekule NADH i FADH_2 nastale u glikolizi, oksidaciji masnih kiselina i ciklusu limunske kiseline mogu se smatrati molekulama bogatim energijom, jer svaka od njih ima par elektrona čijim prijenosom na druge molekule se oslobađa velika energija. Oksidacijska fosforilacija je proces u kojem nastaje ATP kad se elektroni prenose s NADH i FADH_2 na molekularni kisik O_2 . Ovaj proces se događa putem serije respiratornih nosača elektrona

smještenih na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Ciklus limunske kiseline i oksidacija masnih kiselina odvijaju se u susjednom matriksu miohondrija.



U procesu oksidacije, pri postupnom prijenosu elektrona s NADH i FADH₂ na kisik, oslobađa se energija



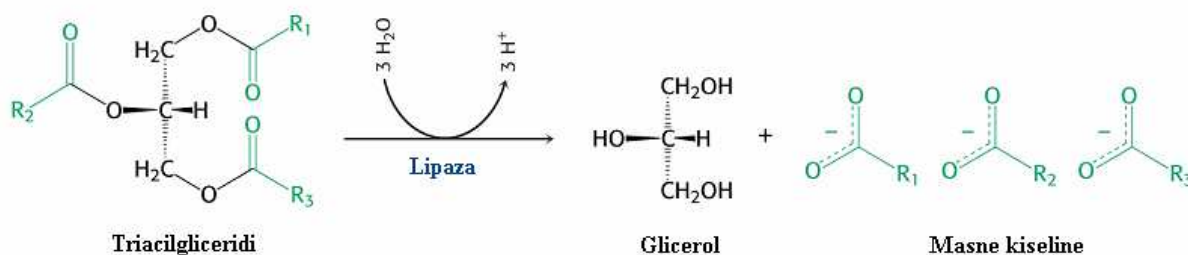
Slobodna entalpija oslobođena u ovim oksidacijama koristi se za crpljenje protona iz matriksa mitohondrija i stvaranje membranskog potencijala (proton-motorne sile), koji nastaje uslijed razlike u koncentraciji protona s različitih strana unutrašnje mitohondrijske membrane. Tri vrste kompleksa za prijenos elektrona djeluju kao crpke protona. Za vrijeme prijenosa elektrona stvara se gradijent protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu. Izvana je pH niži za 1,4 jedinice nego unutra, a membranski potencijal je $\Delta E = 0,14 \text{ V}$ pri čemu je vanjska strana pozitivna. Ukupni elektrokemijski potencijal Δp sastoji se od doprinosa što daju membranski potencijal ΔE i gradijent koncentracije H^+ (ΔpH)

$$(\Delta p = \Delta E - RT/F \Delta \text{pH} = -0,14 \text{ V} - 0,6 (-1,4) = 0,224 \text{ V})$$

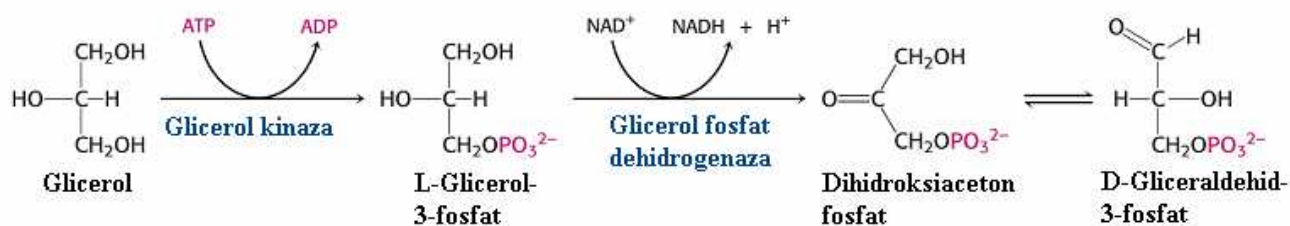
Ova ukupna proton-motorna sila od 0,224 V odgovara slobodnoj entalpiji protona od -21,8 kJ/mol koja se može iskoristiti za sintezu ATP u procesu fosforilacije. U tom procesu ATP se sintetizira kada protoni kroz specifični enzimski kompleks spontano teku natrag u matriks mitohondrija. Oslobođena energija se koristi za fosforilaciju ADP ($\Delta G^\circ = + 30,5 \text{ kJ/mol}$). Prema tome, oksidacija i fosforilacija su međusobno povezani gradijentom protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu. Prilikom oksidacije jedne molekule NADH nastaje 3 molekule ATP, a oksidacijom jedne molekule FADH_2 nastaju 2 molekule ATP.

11.5. Razgradnja masnih kiselina

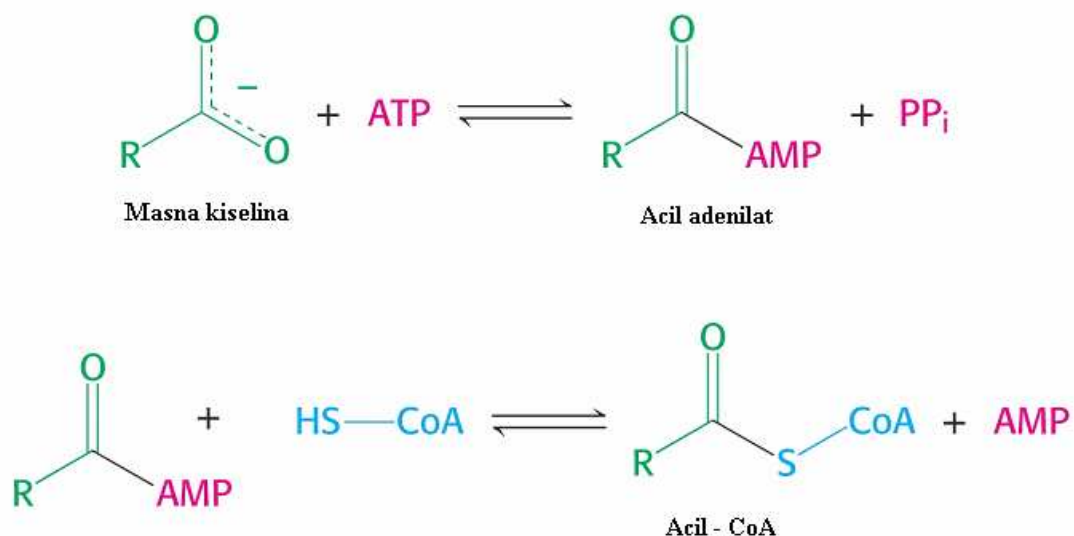
Masne kiseline u obliku triacilglicerola potiču iz hrane ili su uskladištene u masnom tkivu, a iz tih izvora mogu se mobilizirati hidrolitičkim djelovanjem enzima lipaza.



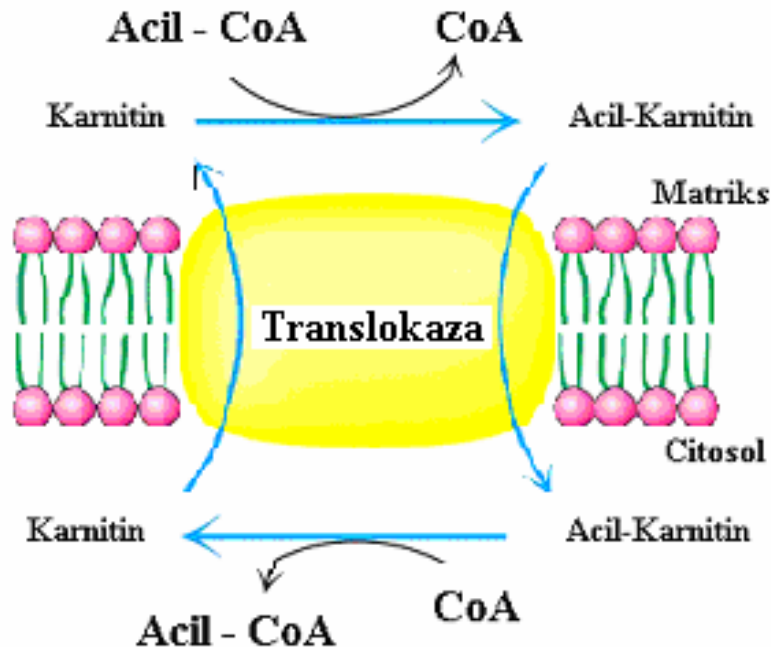
S jedne strane, oslobođeni glicerol se pretvara u D-Gliceraldehid-3-fosfat koji odlazi u glikolizu i dalje se razgrađuje do piruvata.



S druge strane, oslobođene masne kiseline se aktiviraju pomoću ATP i CoA. Aktivirani oblik masnih kiselina je odgovarajući Acil-CoA.

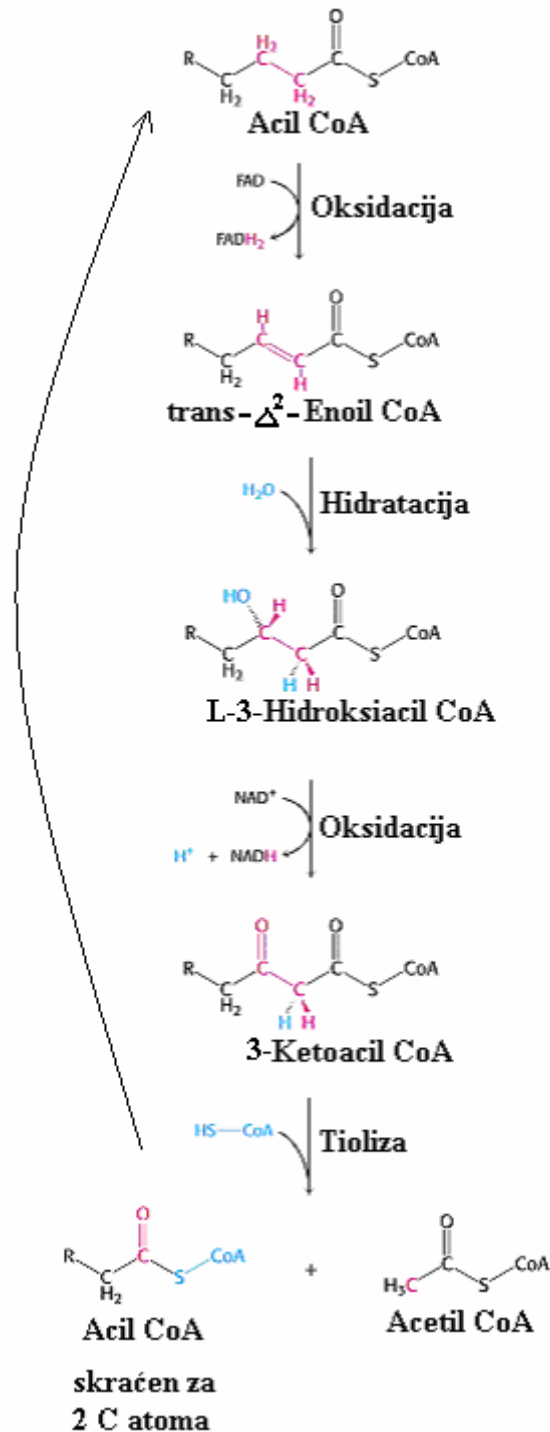


Acil-CoA u citosolu se pretvara u Acil-karnitin koji prolazi kroz mitohondrijske membrane i tako unosi masnu kiselinu u matriks mitohondrija. Karnitin ponovno izlazi iz matriksa mitohondrija i odlazi u citosol.



U mitohondrijskom matriksu masne kiseline se razgrađuju ponavljanjem slijeda od četiri reakcije (β - oksidacija masnih kiselina): oksidacija vezana na FAD, hidratacija, oksidacija vezana na NAD^+ , te tioliza pomoću CoA. Poslije svakog ciklusa masna kiselina je skraćena za dva C atoma, a reducirane molekule FADH_2 i NADH nastale u oksidacijskim koracima se regeneriraju u procesu oksidacijske fosforilacije. Acetil-CoA nastao u tiolitičkom cijepanju,

kondenzacijom s oksaloacetatom ulazi u ciklus limunske kiseline i dalje se razgrađuje do CO_2 i H_2O .

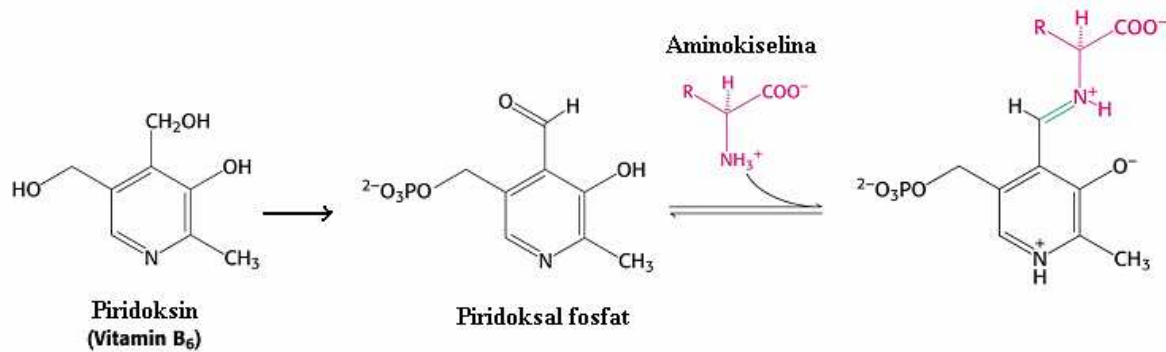


11.6. Razgradnja aminokiselina

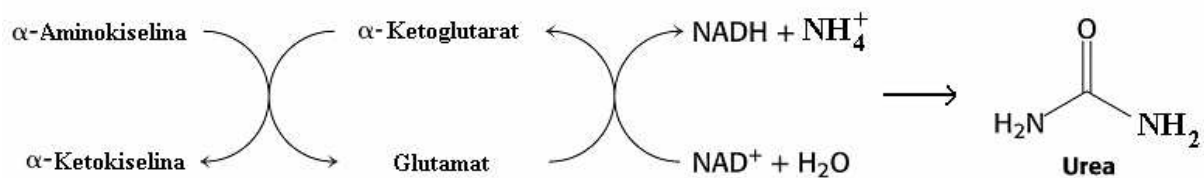
Proteini i peptidi iz hrane se razgrađuju u želudcu i crijevima pod djelovanjem proteolitičkih enzima. Oslobođene aminokiseline se krvotokom raznose do tkiva gdje se u citosolu stanica ugrađuju u vlastite proteine ili transformiraju u druge biomolekule. Višak se

aminokiselina iznad količine potrebne za biosintezu proteina i drugih biomolekula ne može ni uskladištiti u organizmu ni direktno izlučiti iz organizma. Višak se aminokiselina upotrebljava kao metaboličko gorivo. Amino skupine se odstranjuju u obliku amonijeva iona koji se u ciklusu uree pretvara u ureu, a ona se izlučuje preko bubrega i mokraćevine. Preostali ugljikovi atomi u obliku odgovarajuće ketokiseline se prevode u osnovne metaboličke jedinice acetil-CoA i piruvat ili direktno u neke međuprodukte ciklusa limunske kiseline.

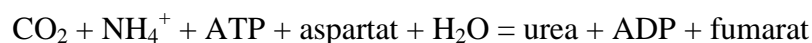
Razgradnja aminokiselina počinje uklanjanjem njihove amino skupine. Piridoksal fosfat (Vitamin B₆) je ključni koenzim za sve transaminaze koje kataliziraju ove reakcije.

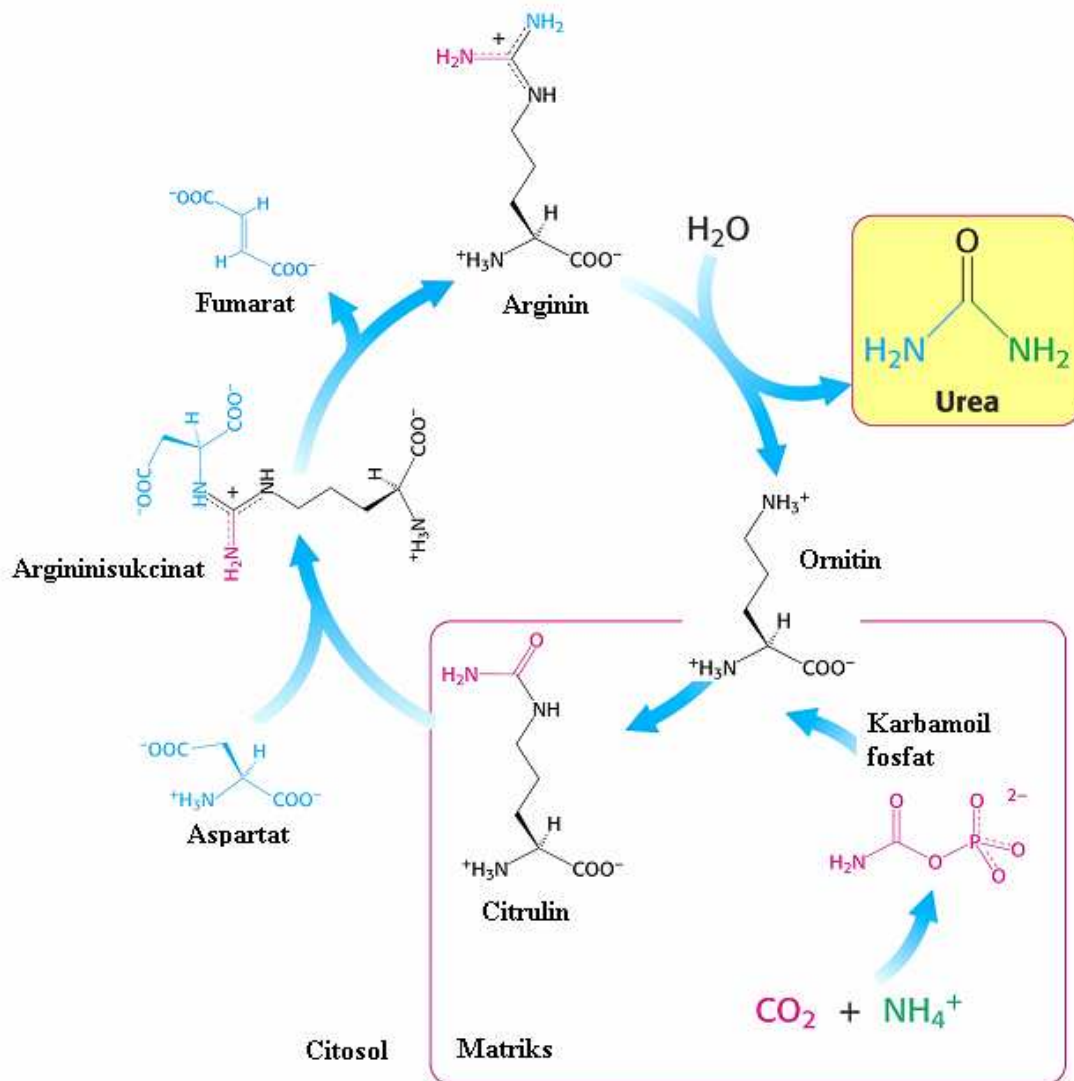


Većina se amino skupina slijeva u α-ketoglutarat dajući glutamat koji se zatim oksidacijski deaminira pri čemu nastaje amonijev ion i regenerira se α-ketoglutarat.

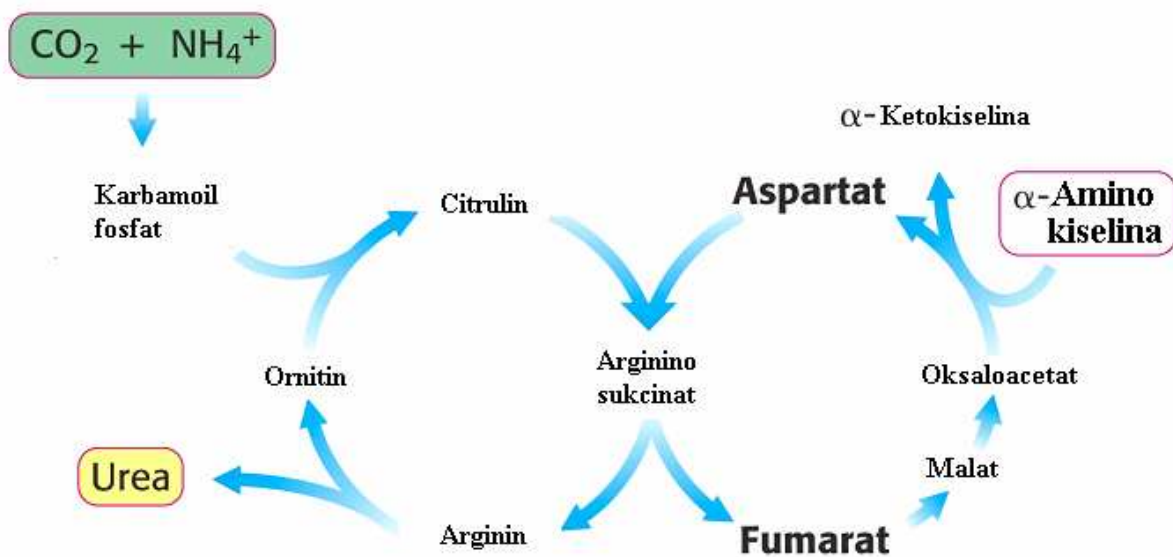


11.6.1. Ciklus uree. Dio nastalog amonijeva iona nastalog razgradnjom aminokiselina troši se za biosinteze dušikovih spojeva. Višak amonijeva iona, budući da je otrovan za stanicu, kod većine kopnenih kralješnjaka se pretvara u ureu, a zatim izlučuje iz organizma. Urea se sintetizira u takozvanom ciklusu uree. To je serija reakcija u kojoj nastaje urea iz amonijeva iona i ugljičnog dioksida. Neposredna preteča uree je aminokiselina arginin koju enzim arinaza hidrolizira na ureu i ornitin. Ostale reakcije ciklusa uree služe sintezi arginina iz ornitina. Na ornitin se najprije prenosi karbamoilna skupina, pa nastaje citrulin. Nakon toga dolazi do kondenzacije citrulina i aspartata i nastajanja argininosukcinata. Na kraju argininosukcinat se cijepa na arginin i fumarat. Ciklus reakcija uree se jednim dijelom odvija u matriksu mitohondrija, a drugim dijelom u citosolu. Gledajući zbirnu reakciju stehiometrija sinteze uree je:

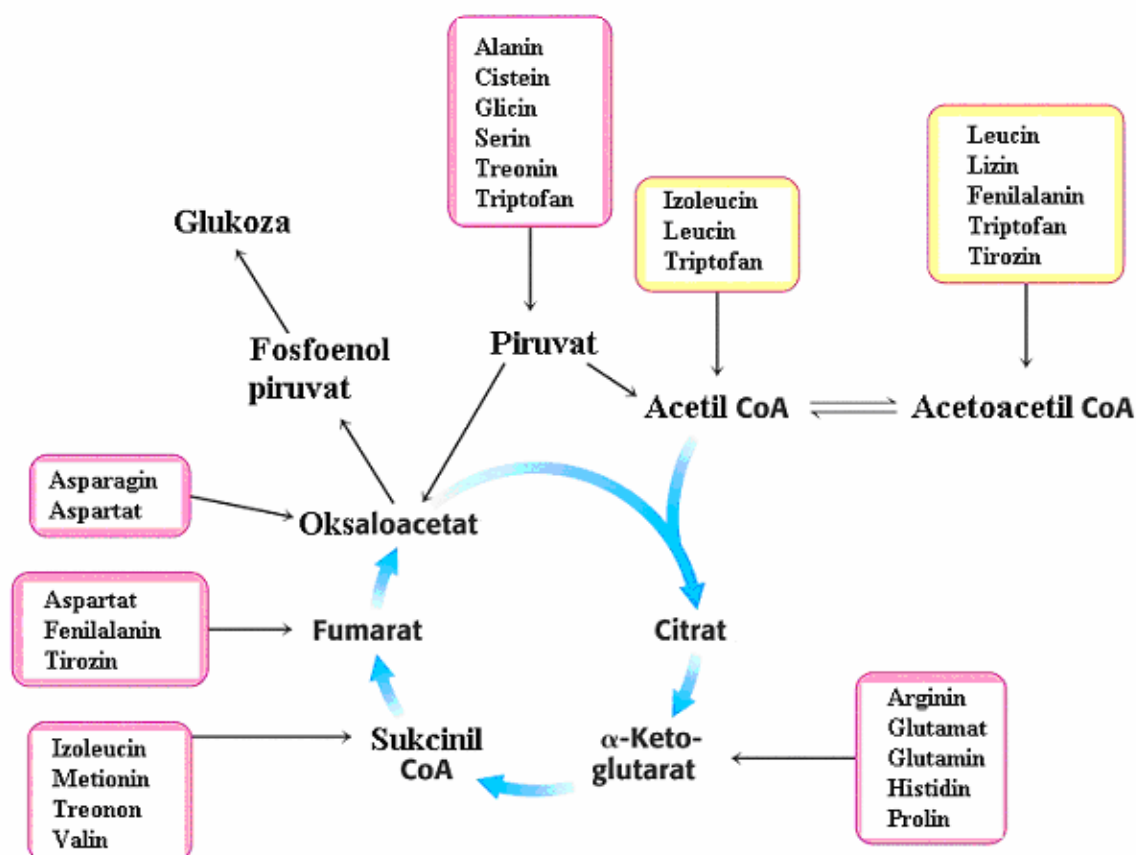




Nastanak fumarata u ciklusu uree ja važan zato što on povezuje ciklus uree s ciklusom limunske kiseline. Potrošeni aspartat se regenerira iz fumarata u ciklusu limunske kiseline.



11.6.2. Razgradnja ugljikovih okosnica. Preostale ugljikove okosnice aminokiselina, nakon odvajanja amino skupina, se dalje razgrađuju i koriste kao metaboličko gorivo. Strategija razgradnje ugljikovih okosnica jest u tome da se načine glavni međuprodukti metabolizma, koji se mogu prevesti u glukozu ili se oksidirati u ciklusu limunske kiseline. Zapravo se ugljikove okosnice raznolikog niza od dvadeset aminokiselina slijevaju u samo sedam molekula: piruvat, acetil-CoA, acetoacetyl-CoA, α -ketoglutarat, sukcinil-CoA, fumarat i oksaloacetat.



LITERATURA

- L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1991 (prijevod II. izdanja)
- L. Stryer, Biochemistry, Freeman and Comp., San Francisko, 1995 (IV. izdanje)
- J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, Freeman and Comp., New York, 2002 (V. izdanje)
- J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, Freeman and Comp., New York, 2006 (VI. izdanje)
- P. Karlson, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1993