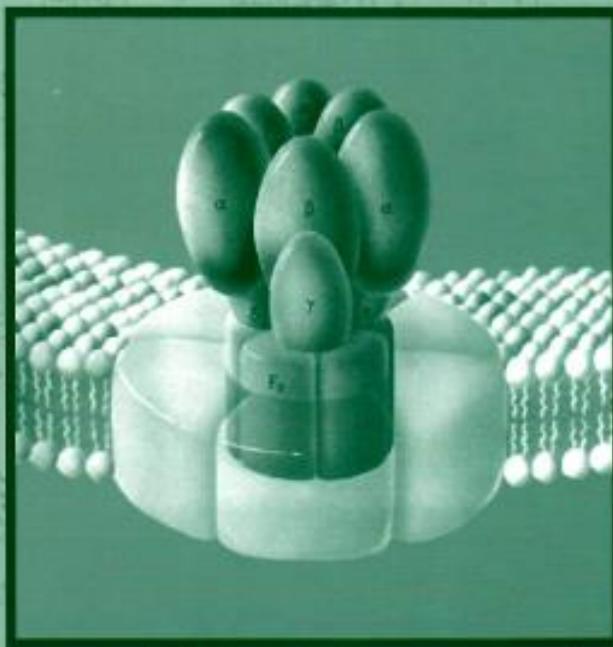


# BIOHEMIJA BILJAKA

MILAN T. POPOVIĆ



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Prof.dr Milan T. Popović

# BIOHEMIJA B I L J A K A

II izdanje



Novi Sad 2005.

Naziv udžbenika: "BIOHEMIJA BILJAKA"

Autor: *Dr Milan T. Popović*  
red. prof. Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti: *Dr Gordana Grubor-Lajšić*  
red. prof. Prirodno-matematičkog fak.u Novom Sadu  
*Dr Biljana Vučelić-Radović*  
vanr. prof. Poljoprivrednog fak.u Beogradu-Zemun

Grafički prilozi i  
kompjuterska priprema *Dr Milan Popović*

Izdavač: Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu

Glavni i odgovorni urednik: *Dr Milan Krajinović*  
dekan Poljoprivrednog fakulteta

---

*Odlukom Izdavačkog saveta Poljoprivrednog fakulteta br. 06-437/2  
od 12.04. 2001. godine, odobreno kao osnovni udžbenik,  
namenjen studentima osnovnih, diplomskih i poslediplomskih studija.*

---

Štampa: **VERZAL**, Novi Sad, tel.: 021/505-103

CIP – Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад  
577.1:581(075.8)

ПОПОВИЋ, Милан Т.  
Biohemija biljaka / Milan T.Popović. -2.-izd. –  
Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2005 (novi Sad:  
Verzal). – VII, 565 str.: ilustr.; 24 cm  
Tiraž 500. – Bibliografija. – Registar.  
ISBN 86-7520-052-8  
a) Biohemija biljaka  
COBISS.SR-ID 199233543

*Copyright © 2008 by Milan Popović*  
Knjiga ne sme biti reproducovana ni u delovima, niti u celini,  
bez izričite pismene saglasnosti autora

*(iz recenzije)*

Po sadržaju, obimu i rasporedu gradiva, pregledani rukopis odgovara važećem nastavnom planu i programu predmeta Biohemija biljaka koji slušaju studenti bioloških odseka biljne proizvodnje na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Rukopis u ovoj konačnoj verziji na koju se recenzija odnosi, uskladjen je sa savremenim naučnim dostignućima u ovoj oblasti, a potkrepljen je i brojnim literaturnim navodima novijeg datuma. Materija je izložena jasnim i konciznim jezikom, bez nepotrebnog ulaženja u detalje, ali ne zanemarujući ono što je bitno da student ovlada biohemijskom logikom i potrebnim znanjem iz oblasti biohemije biljaka.

S obzirom na izloženo smatram da rukopis udžbenika "Biohemija biljaka" autora M.T.Popovića predstavlja dobro koncipiran udžbenik za ovaj predmet i da ispunjava sve zahteve u pogledu pedagoškog i naučnog kriterijuma. Iz napred navedenog, predlažem Izdavačkom savetu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu da prihvati pozitivnu ocenu rukopisa "Biohemija biljaka" i omogući njegovo štampanje u formi univerzitetorskog udžbenika,... (dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu).

Rukopis udžbenika "Biohemija biljaka" je jasan i razumljiv. Sledi najsavremenija znanja o biohemiji biljne ćelije. Brojne formule i sheme doprinose lakšem i potpunijem razumevanju materije. Po sadržaju i obimu rukopis knjige odgovara programu predmeta Biohemija biljaka i na nivou je savremenih dostignuća u ovoj oblasti. Na osnovu izloženog smatram da pregledani rukopis "Biohemija biljaka" autora M.T.Popovića poseduje sve kvalitete univerzitetorskog udžbenika, ...

(dr Biljana Vučelić-Radović, vanredni profesor, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu-Zemunu).

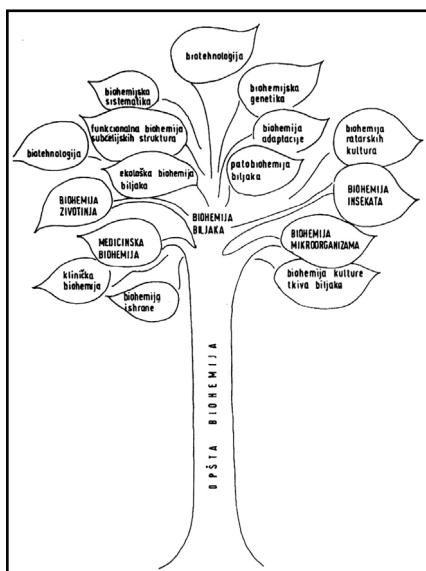
*(o autoru)*

**Milan T. Popović** je redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Sve vreme je angažovan u realizaciji nastave iz biohemijskih disciplina (Biohemija biljaka i Biohemija domaćih životinja) za studente bioloških odseka ovog fakulteta kako na osnovnim tako i na poslediplomskim studijama. Po osnivanju Veterinarske medicine angažovan je i u nastavi Biohemije i za studente ove studijske grupe. Autor je brojnih naučnih radova publikovanim kako u domaćim tako i u međunarodnim naučnim časopisima. Koautor je udžbenika Biohemija domaćih životinja, 1998; i monografije Biološki aktivna jedinjenja biljaka Fruške Gore, Tom I – Alkaloidi, 1997. Učestvovao je u izradi više projekata čiji su Koordinatori Poljoprivredni fakultet, Srpska akademija nauka i umetnosti i Matica srpska. Zasluzni je član Srpskog hemijskog društva i počasni član Hemijskog društva Vojvodine. Dobitnik je jubilarne medalje povodom proslave 100 godina Srpskog hemijskog društva.

# Predgovor I izdanju

**Biohemija** - kao nauka o životu, bavi se proučavanjima toka životnih procesa raznih organizama na molekularnom nivou. U odnosu na ostale prirodne nauke biohemija je relativno mlada naučna disciplina po vremenu nastanka, a široka po primenljivosti svojih naučnih rezultata. Ona se danas deli na više biohemijских disciplina od kojih važno mesto zauzima i

**Biohemija biljaka** (slika 1).



Slika 1.

Neke od biohemijских disciplina nastale iz opšte biohemije.

Protekle decenije u biohemiji bile su ispunjene brojnim otkrićima koja su se nizala velikom brzinom. Taj je napredak veoma obogatio razumevanje molekularnih osnova života i otvorio mnoga nova područja istraživanja. Među istaknute rezultate novijih istraživanja pripada određivanje sekvene nukleotida u DNA, kloniranje novih kombinacija gena, razjašnjenje mehanizma kontrole metabolizma i procesa membranskog transporta itd. na nivou različitih organizama pa i kod biljaka.

**Biohemija biljaka** - stasala je na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu pre dvadesetak godina kada je iz kursa Opšte biohemije izdvojena kao posebna nastavna disciplina, namenjena studentima Biljne proizvodnje. Po formi i sadržaju u saglasju je sa nastavnim planom i programom studijskih grupa ovog fakulteta kao i sa biohemijском literaturom na agronomskim fakultetima u zemlji i inostranstvu.

U toku pisanja udžbenika izbegavao sam detalje, vodeći računa da student ovlađa biohemijском logikom, neophodnom za razumevanje biohemijских procesa vezanih za kvalitetnu biljnu proizvodnju. Gde god je to bilo mogeće nastojao sam da izlaganjem novih podataka u kontekstu opštih tema knjiga bude što prikladnija za učenje. Uz sve to pokušao sam korisnicima knjige približiti i osećaj intelektualne snage i lepote biohemije.

Udžbenik je napisan prema postojećem Nastavnom planu i programu za studente bioloških odseka – biljne proizvodnje na Poljoprivrednom fakultetu u

Novom Sadu, koji dopunjeno novim člancima iz časopisa *Trends in Biochemical Sciences* (TIBS) i *Biochemical Education*, kao i sadržajima iz novije udžbeničke literature *Plant biochemistry* može koristiti i studentima poslediplomskih studija.

Ovom prilikom se zahvaljujem recenzentima dr Gordani Grubor-Lajšić, redovnom profesoru biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu i dr Biljani Vučelić-Radović, vanrednom profesoru biohemije na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu-Zemun na korisnim sugestijama, koje su doprinele da udžbenik dostigne univerzitetski nivo.

Zahvaljujem se mojim saradnicima i mojim studentima čije su mi opaske i primedbe, koristile, uveravale me i ohrabrike. Moja supruga Jelena, čerka Aleksandra i sin Aleksandar dopustili su da ovaj tekst postane članom naše porodice. Duboko sam im zahvalan na strpljenju i duhu koji je vladao tokom pisanja ovog udžbenika.

Zahvaljujem svima koji bi svojim savetima i primedbama pomogli da se nedostaci, kojih nesumnjivo ima, otklone u narednim izdanjima ovog udžbenika.

U Novom Sadu, aprila, 2001.

*Autor*

## Predgovor II izdanju

Posle 4 godine od pojave I izdanja i pokazanog interesa od strane studenata ne samo našeg fakulteta, odnosno univerziteta iznuđeno je bilo da se u relativno kratkom vremenskom intervalu pripremi za štampanje II izdanje ovog udžbenika.

Relativno kratka vremenska distanca nije mi dopuštala da pristupim korenitijim promenama osnovnog koncepta I izdanja, te ovo izdanje predstavlja samo neznatnu korekciju osnovnog izdanja na nivou ispravki uočenih grešaka bilo u tekstu ili strukturnim formulama molekula.

Biću veoma zahvalan svima onima koji svojim dobromamernim primedbama doprinesu da III izdanje ove knjige bude potpunije.

U Novom Sadu, januara, 2005.

*Autor*

# Sadržaj

UVOD .....	1
I Deo	
<b>PRIMARNI BIOMOLEKULI .....</b>	<b>3</b>
1. HEMIJSKI SASTAV ORGANA I TKIVA BILJAKA .....	5
1.1. Elementarni sastav .....	6
1.1.1. Osobine i funkcije pojedinih elemenata .....	9
1.1.2. Esencijalni metali kao kofaktori .....	12
1.2. Hemijske reakcije u biohemiji .....	13
1.3. Voda i njeni strukturni oblici .....	15
1.4. Hemijska jedinjenja u sastavu organa i tkiva biljaka .....	21
2. AMINOKISELINE .....	24
2.1. Hemijske reakcije aminokiselina .....	28
2.2. Klasifikacija aminokiselina i njihova funkcija .....	31
3. PEPTIDI .....	41
3.1. Nastajanje peptida .....	42
3.2. Važniji peptidi biljaka .....	44
4. PROTEINI .....	46
4.1. Osobine proteina .....	47
4.2. Strukture proteina .....	49
4.3. Klasifikacija proteina .....	65
5. ENZIMI .....	72
5.1. Hemijski sastav, strukture i funkcije enzima .....	73
5.2. Energija aktivacije i specifičnost enzima .....	77
5.3. Michaelis-Mentenov prilaz kinetici enzimskih reakcija .....	80
5.3.1. $V_{max}$ i $K_M$ i mogućnosti odredjivanja .....	85
5.3.2. Značenje vrednosti $K_M$ i $V_{max}$ .....	85
5.3.3. Kinetička savršenost enzimske katalize: $k_{cat}/K_{Modnos}$ .....	87

5.3.4. Mehanizam enzimske katalize .....	88
5.4. Faktori koji utiču na aktivnost enzima .....	90
5.5. Nomenklatura i klasifikacija enzima .....	105
5.6. Izoenzimi i multienzimski kompleks .....	107
5.7. Enzimi biljaka .....	111
5.8. Regulacija aktivnosti enzimskih reakcija .....	123
5.9. Značajne oznake u enzimologiji .....	124
 6. BIORREGULATORI .....	127
6.1. Koenzimi .....	128
6.1.1. Klasifikacija koenzima .....	128
6.1.2. Struktura i funkcija koenzima oksidoreduktaza .....	130
6.1.3. Struktura i funkcija koenzima transferaza .....	143
6.1.4. Struktura i funkcija koenzima liazna, izomeraza i ligaza ...	149
6.2. Vitamini .....	152
6.2.1. Vitamini koji imaju funkciju koenzima .....	153
6.2.2. Vitamini koji nemaju funkciju koenzima .....	161
6.2.3. Supstance slične vitaminima .....	165
6.2.4. Antivitamini .....	168
6.3. Fitohormoni .....	169
 7. UGLJENI HIDRATI .....	179
7.1. Monosaharidi i njihovi derivati .....	180
7.2. Disaharidi i oligosaharidi .....	193
7.3. Polisaharidi .....	197
7.3.1. Homopolisaharidi .....	198
7.3.2. Heteropolisaharidi .....	206
7.4. Funkcija ugljenih hidrata u biljkama .....	210
 8. LIPIDI .....	212
8.1. Biljne masne kiseline .....	213
8.2. Membranski lipidi .....	215
8.3. Rezervni lipidi .....	219
8.3.1. Neuobičajene masne kiseline u rezervnim lipidima biljaka .....	220
8.4. Kutini, suberini i voskovi .....	220
8.4.1. Površinski prekrivači .....	221
8.4.2. Hemijski sastav površinskih prekrivač .....	221
8.5. Analiza biljnih lipida .....	222
8.6. Lipidi kao miclele i bislojevi .....	224
8.7. Funkcija lipida u biljkama i primena .....	225

9. NUKLEINSKE KISELINE .....	228
9.1. Hemijski sastav nukleinskih kiselina .....	229
9.2. Vrste i strukture nukleinskih kiselina .....	236
9.2.1. Strukture DNA .....	237
9.2.2. Vrste RNA i njihove strukture .....	244
9.3. Nukleinske kiseline biljaka .....	250
<b>II Deo</b>	
<b>METABOLIZAM I BIOENERGETIKA .....</b>	<b>255</b>
10. METABOLIZAM AMINOKISELINA I BIOSINTEZA PROTEINA .....	257
10.1. Biosinteza aminokiselina .....	259
10.1.1. Biosinteza aminokiselina iz glutamata .....	262
10.1.2. Biosinteza aminokiselina iz aspartata .....	262
10.1.3. Biosinteza aminokiselina iz piruvata .....	265
10.1.4. Biosinteza aminokiselina iz 3-fosfoglicerata i ribulozo-1,5-difosfata .....	267
10.1.5. Biosinteza aminokiselina iz fosfoenolpiruvata i D-eritrozo-4-fosfata .....	269
10.1.6. Biosinteza histidina .....	270
10.1.7. Putevi pretvaranja aminokiselina u biljkama .....	271
10.2. Biosinteza proteina .....	273
10.2.1. Ekspresija gena .....	274
10.2.2. Genetički kod .....	276
10.2.3. Biosinteza proteina (translacija) .....	278
10.2.3.1. Aktivacija aminokiselina .....	278
10.2.3.2. Inicijacija .....	280
10.2.3.3. Elongacija .....	281
10.2.3.4. Terminacijai posttranslaciona modifikacija polipeptidnog lanca .....	283
10.2.3.5. Polizomi i simultana translacija nekoliko kopija istog lanca .....	284
11. METABOLIZAM UGLJENIH HIDRATA .....	286
11.1. Biohemija fotosinteze .....	287
11.1.1. Reakcije fotosistema I i II .....	290
11.1.2. Proton gradijent put stvaranja ATP u fotosintези .....	298
11.1.3. Reakcije fotosinteze u mraku – put CO <sub>2</sub> .....	301
11.1.4. Faktori koji utiču na fotosintezu .....	316
11.2. Fotorespiracija i produktivnost biljaka .....	317

11.3. Biosinteza saharoze, skroba i celuloze .....	318
11.4. Međusobna pretvaranja ugljenih hidrata .....	322
11.5. Katabolizam ugljenih hidrata .....	323
11.5.1. Glikoliza .....	324
11.5.2. Ciklus trikarbonskih kiselina (CTK) .....	330
11.5.2.1. Reakcije u CTK .....	332
11.5.2.2. Energetski bilans CTK .....	339
11.5.2.3. Kontrola pojedinih faza u CTK .....	341
11.5.3. Oksidativni pontozofosfatni put .....	342
11.5.4. Glioksalatni ciklus .....	346
 12. BIOSINTEZA LIPIDA .....	349
12.1. Biosinteza masnih kiselina .....	350
12.1.1. <i>De novo</i> sinteza .....	350
12.1.2. Aerobna desaturacija .....	353
12.1.3. Elongacija masnih kiselina .....	356
12.2. Biosinteza triacilglicerola .....	357
12.2.1. Akumulacija rezervnih lipida .....	357
12.2.2. Kenedijev put sinteze triacilglicerola .....	358
12.3. Biosinteza membranskih lipida .....	360
12.3.1. Biosinteza glikozilglicerida, glavnih membranskih lipida hloroplasta .....	361
12.3.2. Sinteza fosfoglicerida .....	362
12.3.3. Lipid-transportni proteini .....	364
12.4. Katabolizam lipida .....	365
12.4.1. Membranski lipidi, promene i analiza .....	365
12.4.2. Razlaganje rezervnih lipida .....	367
12.4.3. Lipidi kao sekundarni glasnici .....	367
12.4.4. Oksidacija masnih kiselina .....	369
12.4.5. Biljne lipoksigenaze i njihova funkcija .....	375
12.5. Biosinteza voskova, kutina i suberina .....	376
 13. BIOSINTEZA NUKLEINSKIH KISELINA .....	379
13.1. Tok genetičke informacije .....	380
13.2. Replikacija DNA- Neka opšta razmatranja .....	381
13.2.1. Semikonzervativna replikacija .....	381
13.3. Replikacija DNA- <i>polimeraze</i> .....	383
13.4. Replikacija DNA-kombinovana aktivnost nekoliko enzima ....	385
13.5. Replikacija DNA kod <i>eukariota</i> .....	388
13.6. Biosinteza RNA: Transkripcija genetičke poruke .....	388
13.7. Modifikacija RNA posle transkripcije .....	390

<b>14. BILJNE MEMBRANE .....</b>	<b>396</b>
14.1. Uvod u strukturu membrana .....	397
14.2. Funkcionalni aspekti biljnih membrana .....	401
14.3. Aspekti spoljašnje sredine mambrana sa posebnim osvrtom na temperaturu .....	404
14.4. Izolovanje organela i membrana .....	409
14.5. Herbicidi koji utiču na metabolizam membranskih lipida .....	410
<b>15. TRANSPORT ELEKTRONA I</b>	
OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA .....	413
15.1. Transport elektrona .....	414
15.1.1. Redukcioni potencijali biološih redoks sistema .....	419
15.2. Fosforilacija u respiratornom lancu - <i>oksidativna fosforilacija</i> ....	425
15.2.1. Inhibitori procesa oksidativne fosforilacije i transporta elektrona .....	428
15.3. Proizvodnja ATP pri potpunoj oksidaciji glukoze .....	430
<b>III Deo</b>	
<b>SEKUNDARNI BIOMOLEKULI .....</b>	<b>433</b>

<b>16. METABOLIZAM FENOLA .....</b>	<b>435</b>
16.1. Strukturne klase biljnih fenola .....	436
16.2. Funkcije fenola u biljkama .....	437
16.3. Šikimat-rogenat put .....	440
16.4. Fenilalanin-hidroksicinamat put	443
16.4.1. Fenilalanin amonijum-liaza .....	444
16.4.2. Biosinteza hidroksicinamata .....	445
16.4.3. Aktivacija hidroksicinamata .....	448
16.5. Fenilpropanoidni putevi .....	448
16.6. Konjugovani hidroksicinamati .....	450
16.6.1. Reakcije konjugacije .....	450
16.6.2. Konjugacija sa glukozom .....	451
16.7. Hidroksikumarini.....	452
16.8. Hidroksibenzoati .....	454
16.9. Flavonoidi .....	456
16.9.1. Sinteza halkona i izomera halkona .....	457
16.9.2. Biosinteza klasa flavonoida .....	459
16.9.3. Supstituisani flavonoidi .....	463
16.9.4. Konjugovani flavonoidi .....	465
16.9.5. Konjugovani antocijanidini .....	465
16.9.6. Promenjeni i degradirani flavonoidi .....	467

16.10. Lignini .....	468
16.11. Lignani i neolignani .....	471
16.12. Tanini .....	472
16.12.1. Hidrolizujući tanini .....	472
16.12.2. Kondenzujući tanini .....	474
16.13. Hinoni .....	476
16.13.1. Poliketidni put .....	478
16.13.2. Sukcinilbenzoat put .....	479
<b>17. METABOLIZAM IZOPRENOIDA .....</b>	<b>482</b>
17.1. Nomenklatura i klasifikacija .....	483
17.2. Osnovni putevi u biosintezi terpenoida .....	485
17.3. Monoterpenoidi .....	487
17.3.1. Biosinteza .....	489
17.3.2. Biološka aktivnost .....	490
17.3.3. Iridoidi .....	490
17.4. Seskviterpenoidi .....	490
17.4.1. Biosinteza i funkcija .....	492
17.4.2. Abscisinska kiselina .....	493
17.5. Diterpenoidi .....	495
17.5.1. Giberelini .....	496
17.6. Triterpenoidi .....	498
17.6.1. Čisti triterpenoidi .....	499
17.6.2. Fitosteroli .....	499
17.6.3. Saponini .....	501
17.6.4. Kardenolidi .....	502
17.7. Karotenoidi .....	504
17.7.1. Distribucija .....	505
17.7.2. Biosinteza i enzimologija .....	506
17.7.3. Regulacija biosinteze.....	510
17.7.4. Funkcije karotenoida .....	510
17.8. Politerpenoidi .....	511
17.9. Ređe zastupljeni terpenoidi .....	511
17.9.1. Degradirani terpenoidi .....	511
17.9.2. Sesterterpenoidi .....	512
<b>18. METABOLIZAM ALKALOIDA, CIJANOGENIH GLIKOZIDA I GLUKOZINOLATA .....</b>	<b>514</b>
18.1. Alkaloidi .....	516
18.1.1. Rasprostranjenost .....	516
18.1.2. Detekcija prisustva .....	517
18.1.3. Biosinteza .....	518

18.1.4. Akumulacija i skladištenje .....	526
18.1.5. Transport .....	528
18.1.6. Obnavljanje alkaloida .....	529
18.1.7. Funkcija .....	530
18.2. Cijanogeni glikozidi i glukozinolati .....	532
18.2.1. Cijanogeni glikozidi .....	533
18.2.2. Glukozinolati .....	536
<b>19. BIOHEMIJSKA EKOLOGIJA .....</b>	<b>541</b>
19.1. Odnos biljka-životna sredina .....	542
19.2. Reakcija biljaka u odnosu na biljojede:	
produkција toksina .....	545
19.2.1. Hemijska odbrana .....	545
19.2.2. Biljni toksini .....	547
19.2.3. Troškovi hemijske odbrane .....	548
19.3. Indukovani fitohemijski odgovor na biljojede .....	549
19.3.1. Indukcija fitohemijski supstanci u biljkama .....	549
19.3.2. <i>De novo</i> sinteza inhibitora proteinaza .....	550
19.3.3. Povećanje sinteze toksina .....	551
19.3.4. Isparljiva jedinjenja koja privlače predatore biljojeda....	552
<b>BIBLIOGRAFIJA .....</b>	<b>555</b>
<b>INDEX .....</b>	<b>559</b>

# Uvod

**Biohemija** - je hemija života, koja daje osnovu za razumevanje većeg broja biohemijских disciplina. Ona je neophodna osnova za razumevanje moderne biologije i zahteva posedovanje odredjenog hemijskog znanja neophodnog za razumevanje hemijske prirode živih organizama kao i reakcija koje se u njima odvijaju.

**Biohemija biljaka** - je jedna od novijih biohemijских disciplina. U svom *statičkom delu* ona se bavi proučavanjem hemijskih struktura i svojstava biomolekula, sastojaka svih biljaka (primarni biomolekuli) kao i onih koji su specifični za pojedine biljne vrste (sekundarni biomolekuli). U *dinamičkom delu* ona proučava hemijske izmene kako primarnih tako i sekundarnih biomolekula koje se odvijaju u biljkama, a poznate su pod nazivom metabolizam. Hemijske reakcije koje se odvijaju u biljkama u toku metabolizma su veoma brze i imaju dimenzije milisekunde ( $10^{-3}$  s), mikrosekunde ( $10^{-6}$  s) pa čak i nanosekunde ( $10^{-9}$  s). Biohemija biljaka se bavi studijom biohemijских procesa na subcelularnom i molekulskom nivou. Rezultati dobiveni navedenim studijama treba kod čitaoca da razviju biohemiju logiku, neophodnu za savladjivanje gradiva iz drugih bioloških disciplina kao npr. fiziologije biljaka, genetike i sl. Istovremeno biohemija biljaka treba da posluži i kao osnova raznim modernim poljoprivrednim disciplinama (ratarstvu, povtarstvu, zaštiti bilja), kao i novim disciplinama, ekološkoj biohemiji, patobiohemiji i dr. Stečena znanja iz biohemije biljaka treba da pomognu budućim stručnjacima da proizvedu kvalitetne biljne vrste, koje bi se mogle koristiti kao hrana ili sirovina za razne proizvode (npr. kukuruz se u svetu preredjuje u 554 različita proizvoda i to 272 u prehranbenoj industriji, 91 u industriji lekova i kozmetici, 25 u industriji livenja metala, 70 u industriji hartije, 58 u tekstilnoj industriji i 38 proizvoda za stočnu hranu).

Ovaj udžbenik je uskladjen sa savremenim naučnim disciplinama u biljnoj proizvodnji. Podeljen je u tri dela. Prvi deo poznatiji kao statička ili opisna (deskriptivna) biohemija daje prikaz hemijskih struktura, osobina i funkcija *Primarnih biomolekula*, kao osnovnih strukturnih i funkcionalnih molekula neophodnih za rast razvoj i reprodukciju biljaka. Drugi deo u krugovima biohemičara poznatiji kao dinamička biohemija posvećen je *Metabolizmu* primarnih biomolekula njihovoj sintezi (anabolizam) i razgradnji (katabolizam). Treći deo daje prikaz najvažnijih *Sekundarnih Biomolekula* biljaka njihovu biogenezu strukturu i funkciju. U svakom delu ovog udžbenika se nalazi po nekoliko poglavlja.

## PRIMARNI BIOMOLEKULI - su obrađeni u 9 poglavlja:

- Hemijski sastav biljaka
- Aminokiseline
- Peptidi
- Proteini
- Enzimi
- Bioregulatori
- Ugljeni hidrati
- Lipidi
- Nukleinske kiseline

## METABOLIZAM - je obradjen u 6 poglavlja:

- Metabolizam aminokiselina i biosinteza proteina
- Metabolizam ugljenih hidrata
- Metabolizam lipida
- Biosinteza nukleinskih kiselina
- Biološke membrane
- Oksidativna fosforilacija i transport elektrona

## SEKUNDARNI BIOMOLEKULI - su obrađeni u 3 poglavlja:

- Metabolizam fenola
- Metabolizam izoprenoida
- Metabolizam alkaloida, cijanogenih glikozida i glukozinolata

Posebno poglavje ovog udžbenika predstavlja kratak prikaz iz domena *Ekološke biohemije*, koja već danas predstavlja izdvojenu nastavno-naučnu disciplinu na mnogim Univerzitetima u svetu. Ovo tim preako se imaju u vidu trendovi civilizacije, sofisticirane tehnologije i stepen ugroženosti živih bića na našoj planeti.

Razvoj kompjuterske tehnike omogućio je brže prikupljanje naučnih informacija, te današnji udžbenici biohemije da bi dali odgovore na samo neka od napred pomenutih pitanja prerastaju u monografije koje po svom obimu prelaze na 100 stranica.

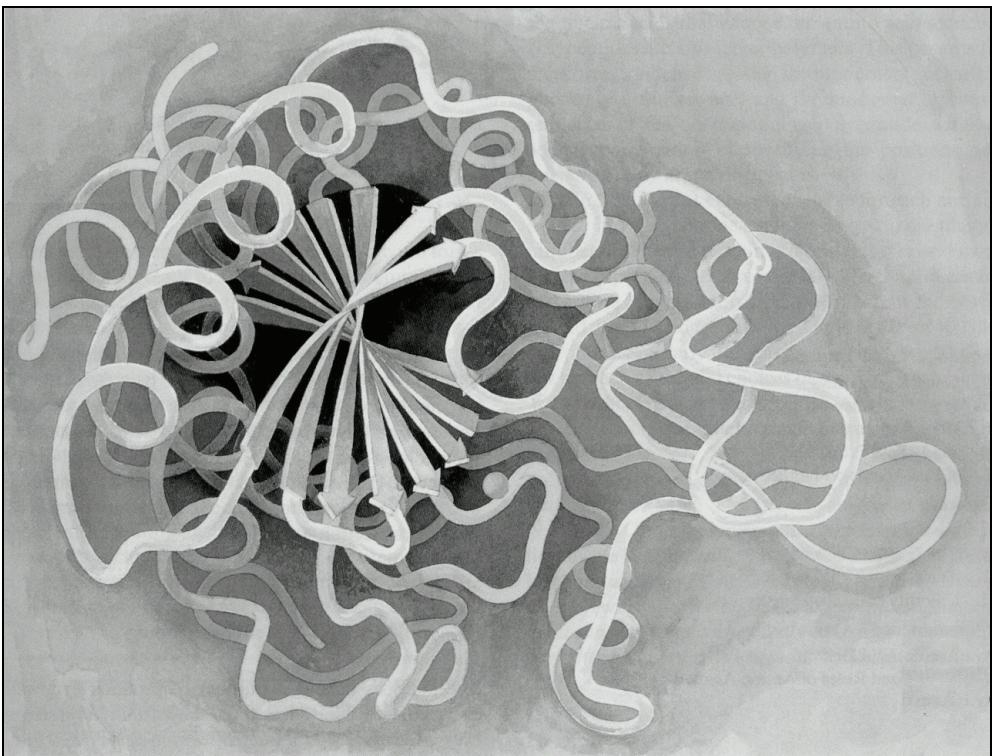
---

---

# I D E O

---

---

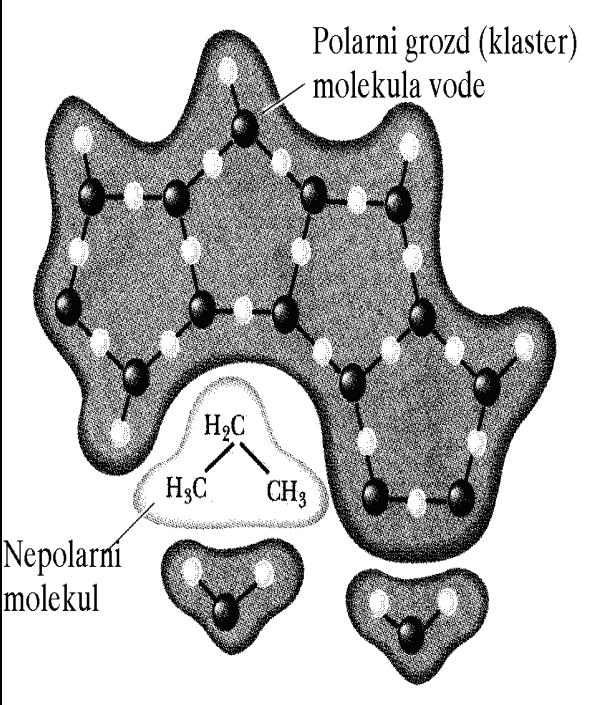


## Primarni Biomolekuli

Karboanhidraza sa naznačenom  $\beta$ -nabranom strukturom u centru (D. Voet, J.G. Voet,  
*Biochemistry 2<sup>nd</sup> ed.* John Wiley and Sons, Inc. New York, 1995. str. 55)



# 1. Hemijski sastav biljaka



The diagram shows a large, irregularly shaped cluster of water molecules at the top, labeled "Polarni grozd (klaster) molekula vode". Below this cluster, a non-polar molecule is shown as a central carbon atom bonded to three methyl groups ( $\text{CH}_3$ ). The methyl groups are represented by small, rounded shapes. The entire non-polar molecule is labeled "Nepolarni molekul". The water cluster has several protrusions that are interacting with the non-polar molecule, illustrating how non-polar molecules can dissolve in polar solvents.

- 1.1. Elementarni sastav**
  - 1.1.1. Osobine i funkcije pojedinih elemenata
  - 1.1.2. Esencijalni metali kao kofaktori
- 1.2. Hemiske reakcije u biohemiji**
- 1.3. Voda i njeni strukturni oblici**
- 1.4. Hemiska jedinjenja u sastavu organa i tkiva biljaka**

*Nepolarni molekul u polarnom okruženju*

U složenim sistemima eukariota uključujući i biljke odvijaju se najfiniji biohemski procesi, odgovorni za njihovu reprodukciju, rast i razviće, kao i život u celini. Biljke sa svojim zaštitnim sistemima i interakcijama sa okolinom, predstavljaju jednu kompleksnu organizaciono-funkcionalnu celinu koja je sastavljena od velikog broja različitih hemijskih elemenata. Biljke kao i drugi živi organizmi imaju specifičan hemijski sastav uslovljen bilnjom vrstom, staništem kao i čitavim nizom ekoloških faktora. Biljke se medjusobno razlikuju u kvalitativnom sastavu kao i kvantitativnom udelu elemenata i hemijskih jedinjenja. Razvoj biohemije biljaka uslovljen je upravo proučavanjem hemijskog sastava biljaka, njihovih biosintetičkih puteva, odn. celokupnim metabolizmom. Hemijski sastav biljaka je odgovoran za vrstu i tok biohemskih reakcija koje se odvijaju u ćelijama, organelama tkivima i organima biljaka. Biljke teže da održe svoj hemijski sastav i ova njihova osobina se naziva *homeostaza*. Vrste i količine pojedinih elemenata i molekula u organima i tkivima biljaka uslovljene su nizom genetskih, ekoloških i drugih faktora. Studija hemijskog sastava biljaka može se podeliti u tri dela i to proučavanje:

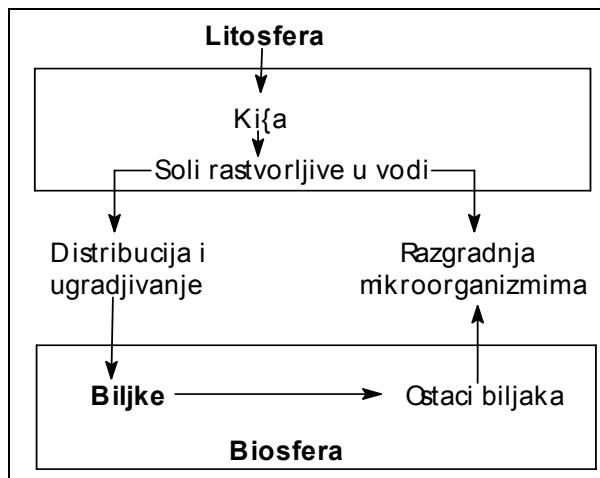
- ◆ *elementarnog sastava,*
- ◆ *vode i*
- ◆ *organских molekula u sastavu organa i tkiva biljaka.*

## 1.1. Elementarni sastav

Smatra se da su biljke izgradjene iz 107 elemenata periodnog sistema, što ukazuje da kvalitativan sastav biljaka, po broju prisutnih hemijskih elemenata, odgovara kvalitativnim sastavom nežive prirode. Ipak, biljke se bitno razlikuju od nežive prirode s obzirom na veoma različitu kvantitativnu zastupljenost pojedinih elemenata u tkivima biljaka, njihovu povezanost u prostije ili veoma složene molekulske jedinice, strukturno-organizacionu kompaktnost i funkciju u pojedinim organima biljaka. Danas se u biljkama proučava oko 60 elemenata, jer fizičko-hemijske metode poput atomske-apsorpcione spektroskopije i dr. još uvek nisu dovoljno precizne i za rutinsko određivanje ostalih elemenata koji se nalaze u tkivima biljaka.

Većina bioelemenata potiče iz litosfere i u biljke dospevaju prema sledećoj shemi (slika 1-1).

Izvor elemenata za biljke je neživa priroda i to pretežno zemljište. Koliko će biljka akumulirati elemenata zavisiće od biljne vrste, zemljišta, organa biljaka, ekoloških faktora i dr. Iako funkcija elemenata u biljkama još vek nije dorečena poznato je da su oni biljkama najpotrebniji u fazi rasta kada su biohemski procesi najintenzivniji.



Slika 1-1. Distribucija bioelemenata

Elementi koji ulaze u sastav biljaka mogu se klasifikovati na više načina. Najčešće se klasificuju prema kvantitativnoj zastupljenosti i funkciji u biljci. Prvi način klasifikacije je zastupljen pretežno u poljoprivrednim naukama. Prema *Kovaljskom* elementi prisutni u biljkama se mogu podeliti u tri grupe:

- ◆ elementi neophodni za izgradnju i normalan razvoj (I grupa),
- ◆ elementi čija biološka funkcija nije dovoljno proučena (II grupa) i
- ◆ elementi čije se prisustvo smatra slučajnim (III grupa elemenata).

Simboli nekih elemenata čije prisustvo je dokazano u biljkama kao i njihove funkcije date su u tabeli 1-1.

Tabela 1-1. Podela bioelemenata u grupe i njihova funkcija.

Grupa	Simbol elementa	Nalaženje i funkcija u biljkama
I	C, O, H, N, P, S, Ca, K, Cl, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, Co, Se i dr.	Sastoјци су ензима, хормона витамина и сматрају се незаменијивим.
II	Sr, Br, F, B, Si, Cr, Be, Ni, Li, Cs, Sn, Al, Ba, Rb, Ti, Ag, Ga, Ge, As, Sb, U, Th, V i dr.	Улазе у састав јединjenja чија функција у метаболизму nije dovoljno proučena.
III	Tl, Nb, In, Te, La, Pr, Nd, Eu, Tb, Er, W, Hg, Pb, Cd, Re i dr	Налазе се у билjkама, али нема података о њиховој функцији у метаболизму.

Od elemenata I grupe koji su neophodni za razvoj biljaka ubrajaju se najrasprostranjeniji elementi C,O,H,N,P i S tzv. *biogeni elementi*. Oni su kovalentno vezani u organskim biomolekulima kao npr. aminokiselinama, ugljenim hidratima, lipidima, nukleinskim kiselinama i dr. jedinjenjima i čine 99% biomase biljnog organizma. Ovi elementi imaju relativno malu atomsku masu, sposobni su da grade višestruke veze i da učestvuju u obrazovanju strukturnih i "energetskih" jedinjenja. U grupu elemenata čija funkcija u metabolizmu nije dovoljno proučena svrstani su elementi koji se u biljkama često nalaze u ionizovanom stanju. Elementi III grupe nazvani "slučajnim" elementima nalaze se u biljkama, ali nema podataka o njihovoj funkciji.

Funkcije pojedinih elemenata u biohemijskim procesima koji se odvijaju u biljkama su veoma različite. Tako npr. oni mogu biti:

- ◆ strukturne komponente hemijskih jedinjenja u biljkama,
- ◆ stabilizatori konformacije proteina,
- ◆ posrednici u katalitičkim reakcijama,
- ◆ oksidaciona i redukciona sredstva,
- ◆ aktivatori ili inhibitori enzima,
- ◆ regulatori kiselo-bazne ravnoteže i pH-vrednosti,
- ◆ regulatori propustljivosti celijskih membrana itd.

Njihova raspostranjenost i kvantitativna zastupljenost u organima i tkivima biljaka je veoma različita. Prema količini u kojoj se nalaze u biljkama dele se na *makroelemente*, *mikroelemente* i *ultramikroelemente* (slika 1-2). *Makroelementi* su zastupljeni u količini većoj od 0,001%, *mikroelementi* u količini od 0,001 do 0,000001%, a *ultramikroelementi* u količini manjoj od 0,000001% na apsolutno suvu biljnu masu.

Grupe i periode	I	II		III	IV	V	VI	VII	VIII
I	H								He
II	Li	Be		B	C	N	O	F	Ne
III	Na	Mg		Al	Si	P	S	Cl	Ar
IV	K	Ca		Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
V	Rb	Cs		In	Sn	Sb	Te	J	Xe

Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Y	Zr	Mb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd



Slika 1-2. Bioelementi i njihova zastupljenost u biljkama.

Za život biljaka su od posebnog značaja 15 elemenata čiji su simboli, prosečne količine u odnosu na absolutnu suvu masu i molibden (granični elemenat između makro i mikroelemenata) date u tabeli 1-2.

Tabela 1-2. Prosečne količine značajnijih elemenata u biljkama u odnosu na apsolutno suvu masu i molibden (%).

Naziv elementa	Simbol	Prosečna količina na suvu masu	Količina u odnosu na molibden
Ugljenik	C	36.05	35.000.000
Kiseonik	O	30.01	30.000.000
Vodonik	H	5.04	60.000.000
Azot	N	7.37	1.000.000
Kalijum	K	0.61	250.000
Kalcijum	Ca	0.33	125.000
Magnezijum	Mg	0.13	80.000
Fosfor	P	0.13	60.000
Sumpor	S	0.07	30.000
Hlor	Cl	8.07	2.000
Bor	B	6.83	2.000
Gvoždje	Fe	3.60	1.000
Mangan	Mn	1.33	300
Cink	Zn	0.40	100
Bakar	Cu	≤ 0.01	1
Molibden	Mo		

### 1.1.1. Osobine i funkcije pojedinih elemenata

**Ugljenik** - je dominantan i osnovni elemenat biljaka jer izgrađuje skelet svih organskih jedinjenja. Sa drugim bioelementima (H,O,N,P i S) se jedini gradeći veoma širok spektar lančastih, razgranatih i cikličnih organskih jedinjenja, koja imaju često, izuzetno značajnu ulogu u metabolizmu biljaka. Najpristupačniji oblik ugljenika za biljke je njegov oksidacioni oblik - ugljendioksid ( $\text{CO}_2$ ), to je gas slabog ukusa i mirisa, rastvaranjem u vodi daje  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , čest je proizvod biohemičkih reakcija kao na primer dekarboksilacije. Biljke ga vezuju i ne oštećuju

svoja tkiva. U ćelijama se može radukovati vodonikom, koji se oslobadja oksidacijom organskih molekula, ili se u njima stvara razgradnjom vode.

**Kiseonik** - je po rasprostranjenosti drugi elemenat koji se asimiluje u elementarnom stanju, vezivanjem za organska jedinjenja uz oslobođanje energije. U atmosferu dolazi kao proizvod fotosintetičkih reakcija biljaka. U respiratornom lancu u mitohondrijama oksiduje vodonik sa kojim daje vodu, pri čemu se oslobođaja energija neophodna za mnoge biohemijske procese. Kiseonik je gas (pri normalnim uslovima temperature i pritiska), bez boje, ukusa i mirisa, malo teži od vazduha. Rastvorljiv je u vodi. Dobar je akceptor elektrona. U nekim oblicima slobodnih radikala, (slobodni kiseonični radikali kao  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ) u kojima se pojavljuje, može biti i toksičan za živu ćeliju.

**Vodonik** - je zastupljen sa 8.0% u odnosu na ukupan elementaran sastav tkiva biljaka. Ima najmanju atomsku masu, a veliku redukcionu moć, što ga čini "podobnim" i ekonomičnim energetskim posrednikom. U redoks-reakcijama se pojavljuje kao glavni donator elektrona i učesnik u stvaranju različitih redukovanih koenzimskih oblika ( $NADH + H^+$ ,  $FADH_2$ ,  $FMNH_2$  i dr.). U sistemu respiratornog lanca sa kisonikom, kao samostalno nepostojanim  $O_2^-$ , daje vodu. Vodonik je gas bez boje, ukusa i mirisa, koji sagoreva plavičastim plamenom. U većini biohemijskih reakcija vodonik učestvuje sa svojim disosovanim oblicima protonom i elektronom ( $H^+$  i  $e^-$ ) dok su reakcije sa njegovim molekulskim oblikom veoma retke.

**Azot** - je veoma značajan bioelement iz sastava organskih jedinjenja i zastupljen je u količini od oko 11.5% u odnosu na apsolutno suvu masu biljaka. Lako prelazi iz jednog oksidacionog oblika u drugi. Najvažniji oksidacioni oblik je nitratni ( $NO_3^-$ ), dok je redukovani oblik azota amonijak ( $NH_3$ ), odnosno  $NH_4^+$  uključen, u prisustvu složenih enzimskih sistema, u mnoge biohemijske procese sinteze i metabolizma biljaka. Kao ćelijski otrov i u manjim količinama, amonijačni jon se *sintazama* sa drugim kosupstratima prevodi u oblike neophodne za funkcionalisanje života ćelija i tkiva u celin. Slobodan  $N_2$  biljke ne mogu koristiti jer su u njemu atomi N povezani veoma čvrsto trostrukim vezama. Raskidanje ove veze je moguće ako je ono katalizovano enzimom nitrogenazom, koja se nalazi u nodulama leguminoznih biljaka i azotofiksirajućih bakterija.

**Fosfor** - se nalazi u biljkama u obliku soli i estara sa fosfornom kiselinom. Sastojak je niza jedinjenja od značaja za biohemijske procese biljaka i to glukozo-1-fosfata, glukozo-6-fosfata, fosfolipida, fitina, nukleinskih kiselina, i više koenzima (AMP, ADP, ATP, NADPH, PAL, CoA i dr.). U Biljkama se nalazi i u obliku slobodne fosforne kiseline. Kao sastojak anhidridne veze (fosfatne veze) kod nukleozid-fosfata značajan je prenosilac energije.

**Sumpor** - je bioelement koji, iako malo zastupljen (0.1%), najčešće u obliku soli i estara sumporne kiseline, ima važnu ulogu u mnogim reakcijama metabolizma. Bitne funkcije ima u respiratornom lancu (redoks-reakcije u prisustvu

gvožđa - sumpor-proteina), zatim odgovoran je za stvaranje disulfidne veze u proteinima, i sastojak je aminokiselina cisteina, cistina i metionina kao i nekih enzima iz grupe dehidrogenaza, transaminaza i karboksilaza itd.

**Kalijum** - je zastupljen u količini od 1.0%. Nalazi se u jonskom obliku ( $K^+$ ) u ćelijskom prostoru. Smatra se da može biti kofaktor u nekim enzimskim reakcijama. Kalijum ne ulazi u sastav organskih jedinjenja koja sintetizuje biljna ćelija.

**Natrijum** - je ekstraćelijski katjon koji ne ulazi u sastav organskih jedinjenja.

**Magnezijum** – je najčešće prisutan u kompleksima sa ATP i drugim nukleozid-fosfatima u ribozomima gde učestvuje u biosintezi proteina. Aktivator je enzimskih sistema u kojima učestvuju fosfataze, kao i proteina *feritina* koji ima značajnu ulogu u skladištenju gvožđa.

**Kalcijum** - gradi soli sa organskim kiselinama i pektinskom kiselinom te je regulator aciditeta ćelijskog soka, komponenta ćelijskog zida, regulator količine vode u protoplazmi i starenja biljaka. Gradi helate sa proteinima i lipidima u ćelijskoj membrani. Aktivator je više enzima kao npr.  $\alpha$ -amilaze, ATP-aze, fosforilaze i dr. U biljkama može imati i funkciju drugog mesendžera.

**Hlor** - nije dovoljno proučen bioelemenat kod biljaka. Poznato je da učestvuje u transportu elektrona u reakcijama metabolizma i da verovatno ima uticaja na fotolizu vode, transport ugljenih hidrata i dr. biohemijske procese.

**Gvožđje** - predstavlja esencijalan mikroelemenat biljaka. Zbog svog prisustva u flavoproteinima i citohromima značajna je njegova funkcija u respiratornom lancu u mitohondrijama. Katalizator je mnogih redoks-reakcija u ćeliji. Ima ulogu kofaktora u mnogim enzimskim katalizama. Sastojak je *katalaze*, *peroksidaze*, *superoksid-dismutaze* i mnogih drugih enzima.

**Mangan** - je prenosilac elektrona neophodnih za fotolizu vode. Učestvuje u metabolizmu azota, dekarboksilaciji i hidrolitičkim reakcijama. Ulazi u sastav nekih biljnih *superoksid-dismutaza* i enzima koji prenose fosfatni ion.

**Cink** - je esencijalni bioelemenat za rastenje i razviće biljaka. Ima visok afinitet za azotne i sumporne ligande te se u ćelijama nalazi udružen sa različitim jedinjenjima i to proteinima, aminokiselinama i nukleinskim kiselinama. Veoma čvrsto je vezan za razne metaloenzime kao npr. dehidrogenaze, fosfataze, karboksipeptidaze, *karboanhidraze*, *polifenol-oksidaze* i dr. Aktivator je enzima u biosintezi triptofana, RNA, i skroba. Smatra se da povećava otpornost biljaka na bolesti. Sastojak je DNA i RNA-polimeraza kao i karboanhidraze (enzima koji katalizuje hidrataciju  $CO_2$  do  $H_2CO_3$ ).

**Bakar** - je značajan prenosilac elektrona u membranama i mitohondrijama. Neophodan je za sintezu hlorofila i sastojak je mnogih enzima iz grupe oksidaza kao npr. *citochrom-oksidaze* (koja u respiratornom lancu aktivira kiseonik dajući vodu sa prisutnim  $H^+$  u mitohondrijama), zatim *polifenol-oksidaze*,

*superoksid-dizmutaze* i dr. Osim navedenog Cu je i sastojak plastocijanina. U redoks procesima igra ulogu direktnog akceptora elektrona, pri čemu se sam redukuje ( $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- = \text{Cu}^+$ ).

**Kobalt** - je esencijalan za biosintezu aminokiseline metionina i leghemoglobina. Istovremeno je i sastojak nekih enzima kao npr. *peptidaze* i *peptid-hidrolaze*.

**Selen** - kao mikroelemenat prisutan je u tragovima, ali ga ima u svim ćelijama i tkivima. Ulazi u sastav enzima *glutation-peroksidaze* koja štiti nezaštićene membranske lipide od kiseoničnih radikala, a pre svih  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Bor** - je esencijalan bioelemenat za rastenje biljaka jer pri njegovom nedostatku dolazi do nekroze i uginuća biljaka. Odgovoran je za biosintezu jedinjenja koja sadrže fosfor. Sa giberelinskom kiselinom ( $\text{GA}_3$ ) povećava aktivnost  $\alpha$ -amilaze u semenu koje klija.

**Molibden** - je značajan bioelemenat, jer ulazi u sastav raznih molibden-enzima kao *nitrogenaze*, *nitrat-reduktaze*, *ksantin-oksidaze*, u kojima je deo redoks-sistema za prenos elektrona. Učestvuje u apsorpciji i translokaciji jona, metabolizmu auksina i dr. Može biti i aktivator nekih enzima kao *peroksidaze* i *katalaze*.

### 1.1.2. Esencijalni metali kao kofaktori

Esencijalni metali su najčešće kofaktori enzima u raznim enzimskim reakcijama metabolizma, te su zbog toga neophodni u mineralnoj ishrani biljaka. Ovo znači da dati enzim nebi obavio svoju katalitičku funkciju bez prisustva odgovarajućeg metala. Prethodno je diskutovan  $\text{Na}^+$  kao glavni ekstraćelijski katjon odn.  $\text{K}^+$  kao intraćelijski katjon. U tabeli 1-3 data su neka osnovna zapažanja i za druge esencijalne metale biljaka kao kofaktora enzima i konstituenata veoma važnih molekula tzv "molekula života", kao i neka fiziološko-biohemijska stanja koja nastaju njihovim nedostatkom.

Neki hemijski elementi, koji se inače u prirodi pojavljuju kao zagadivači životne sredine (Pb, Cd, Hg, Al, As i dr.) predstavljaju inhibitore pojedinih enzimskih sistema koji su od esencijalnog značaja jer katalizuju neke veoma važne biohemijske reakcije, koje se odvijaju u biljnoj ćeliji.

Tabela 1-3. Najznačajniji esencijalni metali biljaka.

Metal	Jonski oblici	Neki enzimi sa metalnim jonima	Zapažanja
Zn	Zn <sup>2+</sup>	Preko 200; kao npr. karboanhidraza, ptidaze itd.	Nedostatak Zn smanjuje otpornost biljaka na bolesti.
Cu	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Citohrom c oksidaza, superoksid-dizmutaze i td.	Nedostatak izaziva pojavu crvenih pega na listovima.
Se	-	Glutation-peroksidaza	Slično vitaminu E ima ulogu antioksidansa.
Mn	Mn <sup>2+</sup> , Mn <sup>3+</sup>	Superoksid-dizmutaza	Može zameniti Mg <sup>2+</sup> u mnogim reakcijama.
Mg	Mg <sup>2+</sup>	Najvažniji kod ATP-zavisnih enzima.	Mg zamenjuje jone kalci-juma.
Mo	-	Ksantin-dehidrogenaza, aldehid-oksidaza i dr.	Mo, čini se da je uvek vezan kao kofaktor.
B	B <sup>3+</sup>	Sa GA <sub>3</sub> povećava aktivnost α-amilaze.	Nedostatak dovodi do nekroze i uginuća biljaka
Fe	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Citohrom-oksidaze, katalaza, peroksidaza, itd.	Nedostatak Fe god biljaka izaziva hlorozu.

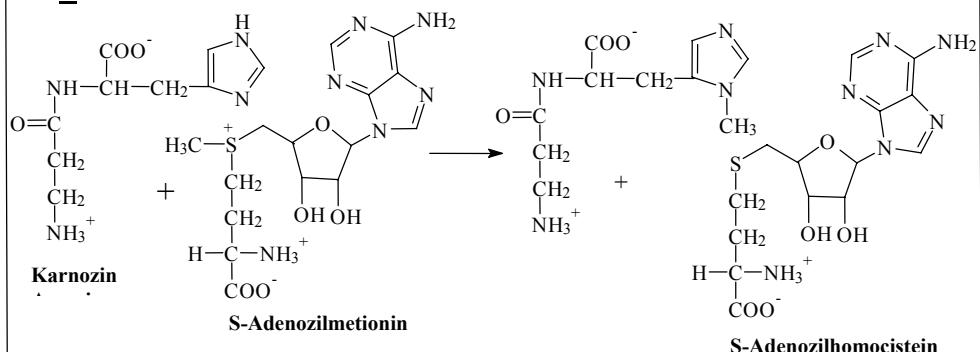
## 1.2. Hemijske reakcije u biohemiji

Kada se govori o hemijskim reakcijama u biohemiji može se zaključiti da većina reakcija nije kompleksna kako se u početku mislilo. Mnoge od njih su jednostavnije reakcije organske hemije u kojima se menjaju funkcionalne grupe, a zastupljene su u biosintezi proteina, nukleinskih kiselina, masnih kiselina kao i metabolizmu šećera, aminokiselina, nukleotida i dr. Međutim, skoro sve biohemijske reakcije odvijaju se u prisustvu i aktivno učešće enzimskih katalizatora. Sama kataliza se vrši u vodenoj sredini ili sredini pufera određene pH-vrednosti (najčešće oko neutralne) i u relativno uskom temperaturnom području, što obezbedjuje optimalnu aktivnost enzima.

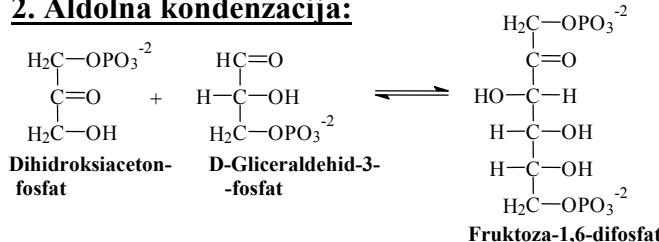
U biohemijskim procesima u ćelijama biljaka najvažniji tipovi hemijskih reakcija su:

- ◆ S<sub>N</sub>2 premeštanje,
- ◆ aldolna kondenzacija,
- ◆ fosforilacija i
- ◆ sinteza amida (slika 1-3).

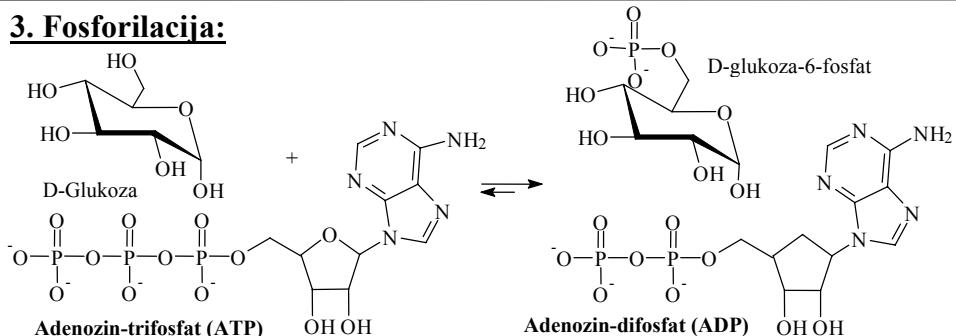
### 1. Sn 2 premeštanje:



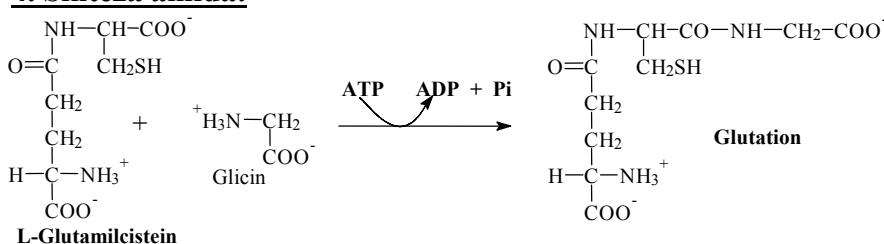
### 2. Aldolna kondenzacija:



### 3. Fosforilacija:



### 4. Sinteza amida:



Slika 1-3. Važnije hemijske reakcije u biohemijskim procesima.

## 1.3. Voda i njeni strukturalni oblici

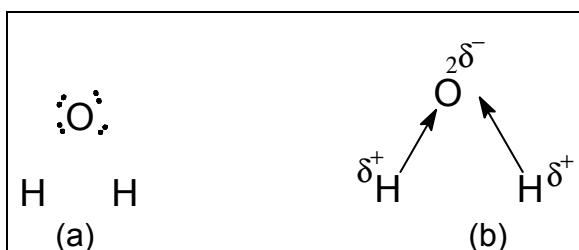
Voda prekriva preko 70% zemljine kugle i najrasprostranjenije je jedinjenje u biosferi. Svi živi organizmi u sebi sadrže od 70-90% vode. Visoka koncentracija vode u njima znak je da se većina reakcija odvija u vodenoj sredini. Biljke sadrže 70-80% vode i to najvećim delom u protoplazmi u kojoj služi kao sredina za sve biohemski procese. Najbogatiji biljni organi u vodi su sočni plodovi i listovi, a najsiromašniji se semenke uljarica i drvenasti delovi biljaka. Život bi bio nemoguć bez vode, te je za biohemski tumačenja života neophodno razumeti hemijski i fizički svojstva ovih jedinstvenih molekula. Hemski, voda je hidrid kiseonika i ima neka neuobičajena svojstva u poređenju sa hidridima S, F ili N. Ona ima znatno veću tačku ključanja u poređenju sa drugim hidridima što je iznenadjuće za tako mali molekul (tabela 1-4).

Tabela 1-4. Tačke topljenja i ključanja  $\text{H}_2\text{O}$  i hidrida S, F i N.

Hidridi ( $t_l/t_k$ )	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{S}$	HF	$\text{NH}_3$
Tačka topljenja ( $^{\circ}\text{C}$ )	0	-85	-83	-78
Tačka ključanja ( $^{\circ}\text{C}$ )	100	-61	20	-33

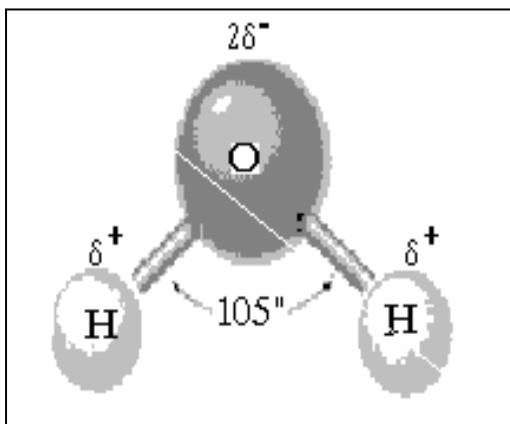
Voda je neophodna tečnost u ishrani za razliku od hidrida S, F i N koji su jako toksični.

Anomalna fizička ponašanja vode u odnosu na druge hidride se mogu objasniti njihovom molekulskom strukturu. Osam elektrona između atoma grade veoma stabilnu konfiguraciju. Atom kiseonika je jako elektronegativan i privlači vezivni elektronski par O-H od atoma H (slika 1-4). Molekul vode ima slabu asimetriju nanelektrisanja i gradi se vodonična veza, ako slabo negativno nanelektrisanje kiseonikovog atoma privuče slabo pozitivno nanelektrisanje atoma vodonika susednog molekula vode. Navedena struktura vode se naziva *dipolarnom strukturu vode*.



Slika 1-4.  
Molekulska struktura vode: (a) stabilna ljuska sa  $8 e^-$  (jaka kovalentna veza); (b) vezivni elektroni usmereni ka kiseonikovom atomu.

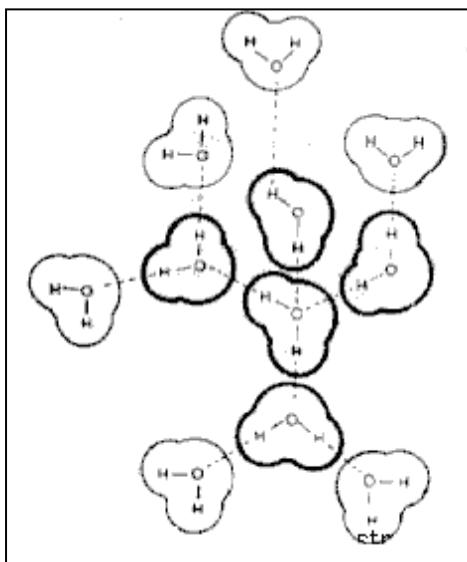
Zahvaljujući izraženoj polarnosti molekula, voda se ponaša kao univerzalni i veoma dobar rastvarač za mnoga organska i neorganska jedinjenja i kao pogodan reaktant u mnogim biohemijskim reakcijama. Ugao izmedju dva vodonika u dipolu vode iznosi  $105^{\circ}$ . Struktura dipola vode prikazana je na slici 1-5.



Slika 1-5. Struktura dipola vode.

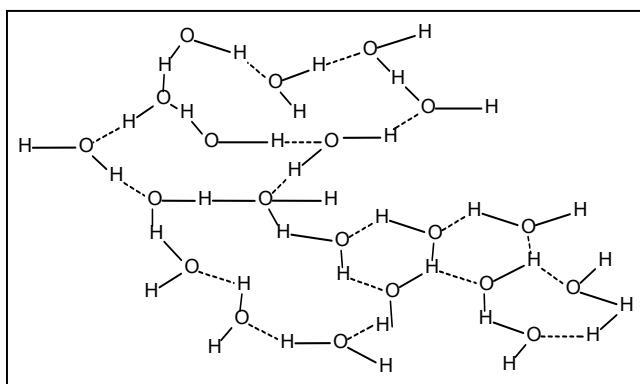
proteinima i nukleinskim kiselinama i grade hidratisane slojeve.

Pored dipolarne teorije o strukturi vode postoji i teorija o *tetrahidrolnoj* i *grozdastoј* strukturi vode. U tečnom agregatnom stanju molekuli vode su medjusobno povezani u tetrahidrolnu strukturu u kojoj su dipoli vode rasporedjeni na temenima pravilnog tetraedra (slika 1-6).



Slika 1-6.  
Tetrahidrolna struktura vode.

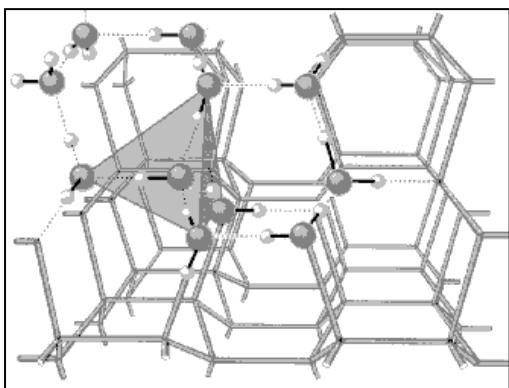
Zagrevanjem vode pojačava se kinetička energija njenih molekula, raskidaju se vodonične veze, udaljuju slabodni molekuli jedan od drugog i smanjuje gustina. Daljim zagrevanjem slobodni molekuli se izdvajaju i voda isparava. Povremeno molekuli vode se povezuju u obliku grozda odnosno mreže (slika 1-7), ali je poluživot ovakve strukture veoma kratak svega oko  $10^{-11}$  sekundi.



Slika 1-7.  
Struktura vode oblika grozda ili mreže.

U čvrstom agregatnom stanju – *ledu*, molekuli vode obično formiraju heksagonalnu (tetraedarsku) strukturu jer su rasporedjeni na temenima pravilnog **tetraedra**. Više heksaagonika,

nanizanih jedan iza drugog, grade šestougaone kanale koji su ispunjeni vazduhom te je, zbog toga, led lakši od vode i pliva na površini. Ovo svojstvo molekula vode od posebnog je značaja jer u akvatičnim sistemima na ovaj način se štiti živi svet (flora i fauna) u tim sistemima od niskih temperatura. Heksagonalna struktura leda sa naznačenim vdoničnim “mostovima” prikazana je na slici 1-8.



Slika 1-8.  
Heksagonalna (tetraedarska) struktura vode. Molekuli  $\text{H}_2\text{O}$  u kristalu leda raspoređeni su na uglovima tetraedra.

Voda je u biljkama rastvarač za većinu neorganskih i organskih jedinjenja koja ionizuje zbog svoje visoke dielektrične konstante. Snaga privlačenja ( $F$ ) izmedju dva jednovalentna jona je data jednačinom:

$$F = e^+ e^- / Dr^2 \quad (1-1)$$

$e^+ e^-$  = nanelektrisanje,  $r$  = rastojanje,  $D$  = dielektrična konstanta

U čvrstom stanju,  $D$  ima malu vrednost tako da je privlačna sila izmedju jona ( $F$ ) velika. U vodi  $D$  je veliko ( $F$  je znatno manje) te se joni odvajaju i disperguju kroz tečnost. Rastvorljivost soli se povećava hidratacijom jona u vodi te je ona dobar rastvarač za organska jedinjenja (koja ne ionizuju) ako sadrže dovoljan broj polarnih grupa. U ovom slučaju rastvorljivost je uslovljena asocijacijom polarnih grupa jedinjenja sa molekulima vode pomoću vodoničnih veza. Grupe koje teže da se udruže sa vodom se nazivaju **hidrofilnim grupama**.

Neka od specifičnih fizičko-hemijskih svojstva molekula vode odgovorna su za biološki značaj vode su navedena u tabeli 1-5.

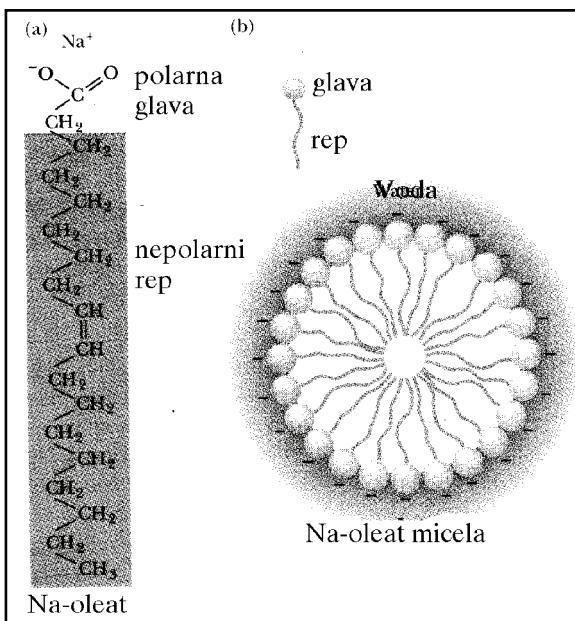
Tabela 1-5. Neka fizičko-hemijska svojstva vode i njen biološki značaj.

Fizičko-hemijska svojstva vode	Biološki značaj vode
Visoka specifična toplota; visok površinski napon; visoka gustina na $+4^{\circ}\text{C}$ ; visoka temperatura isparavanja, visok dipolni moment, itd.	Adsorpcija ili zračenje toplote u živim organizmima se obavlja sa malom izmenom u temperaturi; Kapilarna akcija uslovljava transpiraciju vode u biljkama; Led formiran na površini ribnjaka i jeze-ra štiti život u vodi; Isparavanjem vode sa lisnih površina biljaka snižava temperaturu u uslovima sušnog stresa itd.

Težnja molekula vode da se medjusobno udruže je pogonska snaga **hidrofobnih interakcija** koje spajaju nepolarne molekule i grupe. Ako se nepolarno jedinjenje (odn. molekul ovog jedinjenja) doda u vodenu sredinu, molekuli vode koji su se kretali bez reda započeće da se kreću po nekom redu. Medutim po II zakonu termodynamike sistem teži da postigne maksimalnu vrednost entropije ili stepen nereda. Da bi ovo ostvario nepolarni molekuli se spajaju tako da se dobija minimalni broj uredjenih molekula vode a samim tim i maksimalna entropija.

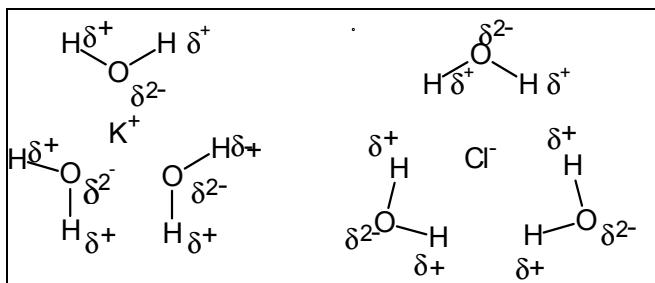
Molekuli koji sadrže hidrofilne i hidrofobne delove nazivaju se **amfipatični molekuli**. Oni mogu graditi uredjene strukture kao *monoslojeve* i *micele*. Na slici 1-9 data je struktura amfipatičnog molekula Na-oleata koji ima polaran (hidrofilan) i nepolaran (hidrofoban) deo. U micelama hidrofilna negativno nanelektrisana karboksilna grupa je okrenuta vodenoj fazi i vezuje se za nju vodoničnim mostovima. Hidrofobni ugljovodonici lanac je okrenut prema unutrašnjoj strani micle i vezuje se za nju *Van der Waalsovim silama*. Fosfolipidi, proteini i nukleinske kiseline su takodje amfipatična jedinjenja i grade micle odgovorne za strukture bioloških membrana.

**Miceli** - su loptasti agregati u kojima je negativno nanelektrisana  $-\text{COO}^-$  grupa povezana sa molekulima vode vodoničnim vezama. Nepolarni ugljovodonici ostatak je okrenut prema unutrašnjosti micle i povezan je *Van der Waalsovim silama*. Jedinjenja koja sa vodom grade micle nazivaju se **amfipatičnim** jedinjenjima.



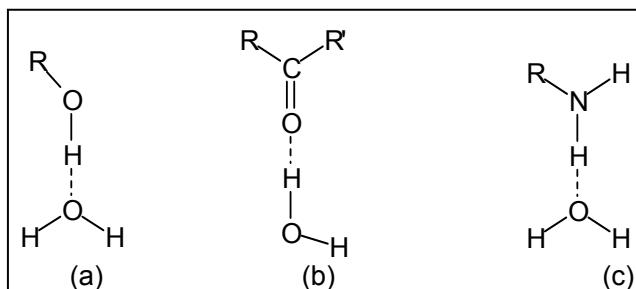
Slika 1-9.  
Monosloj (a) i micela (b).

Voda je rastvarač za veliki broj jedinjenja (koja mogu biti hranljive materije, metaboliti i proizvodi razmene materije). Veoma je značajna za biohemijske procese kao npr. biosinteze, razgradnje, asimilacije i sl. Ona čini sponu izmedju ćelija dva tkiva i osnovnu cirkulatornu tečnost, koja kao pokretna traka prenosi elektrolite, enzime, mineralne materije i druga jedinjenja. Voda veoma malo disosuje jer joj je konstanta disocijacije  $K_a = 10^{-14}$ , a koncentracija jona  $\text{SH}^+ \text{C}^- = \text{SOH}^- \text{C}^- = 10^{-7}$  (na  $295^\circ\text{K}$ ). U jednom  $\text{dm}^3$  se nalazi  $10^{-7}$  g jona  $\text{H}^+$  i isto toliko g jona  $\text{OH}^-$ , odnosno od 555 miliona molekula vode disosuje samo jedan. Iako voda slabo disosuje, elektroliti disosiju u njoj pri čemu se molekuli dipola vode rasporedjuju oko jona elektrolita tako da se prema katjonu orientišu negativan, a prema anjonu pozitivan kraj dipola vode. Jon-dipol interakcije pri rastvaranju kristala KCl u vodi prikazane su na slici 1-10.



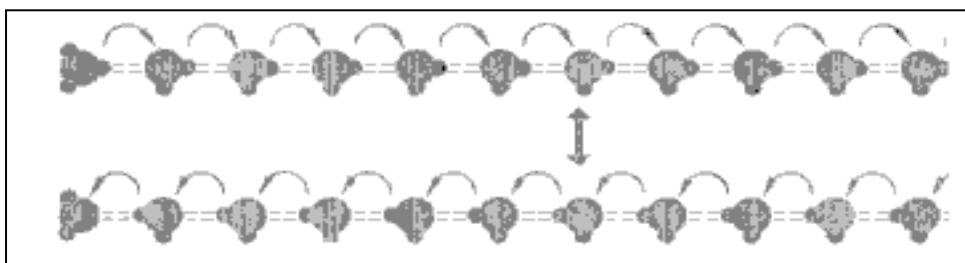
Slika 1-10. Rastvaranje kristala KCl u vodi (jon-dipol interakcija  $\text{K}^+, \text{Cl}^- / \text{H}_2\text{O}$ ).

Na slici 1-11 prikazani su primeri nastajanja vodoničnih veza imedju polarnih grupa nekih organskih molekula tipa alkohola, ketona i amina i molekula vode. Na osobini uspostavljanja intermolekulskih interakcija sa različitim molekulskim vrstama zasnovana je jedna od osnovnih karakteristika molekula vode kao univerzalnog rastvarača.



Slika 1-11.  
Primeri vodoničnih veza između polarnih grupa i vode: a – hidroksilna grupa alkohola; b - karbonilna grupa ketona i c - amino grupa amina.

Voda je kiselina, jer je donator  $\text{H}^+$  jona, a može se smatrati i konjugovanom bazom, jer sa porotonima gradi  $\text{H}_3\text{O}^+$  jone. Pojava  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona tumači se činjenicom da H koji je kovalentno vezan za O "preskače" na atom O susednog molekula vode sa kojim se vezuje vodoničnim vezama. Prenošenje protona preko vodonične veze naziva se "tunelovanje" i može biti veoma značajan fenomen u biološkim sistemima (slika 1-12).



Slika 1-12. Transport protona u vodenim rastvorima.

Kada se govori o vodi u biljkama mora se imati u vidu da prema poreklu biljke sadrže dve vrste vode i to onu koju dobijaju iz spoljne sredine i metaboličku vodu iz respiratornog lanca. No bez obzira na poreklo smatra se da je u svim živim organizmima pa samim tim i biljkama voda nosilac života iz više razloga jer je:

- ◆ supstrat za fotosintezu,
- ◆ pokretna "traka" za prenos metabolita i mineralnih materija,
- ◆ aktivni učesnik u biohemijskim reakcijama od kojih su najrasprostranjenije hidrolitičke,
- ◆ sredstvo koje se adira na polimere pri čemu dolazi do njihove razgradnje na monomerne jedinice,
- ◆ dobar je "termostat" pri egzotermnim procesima i dr.

Biljna ćelija je podeljena na delove (kompartmente) pomoću bioloških membrana koje su za većinu biomolekula i jona teško prolazne barijere (zbog hidrofobnog karaktera unutrašnje strane mizele odn. negativnog naielktrisanja na graničnoj površini). Voda difunduje kroz membrane pri čemu ih ne modificuje

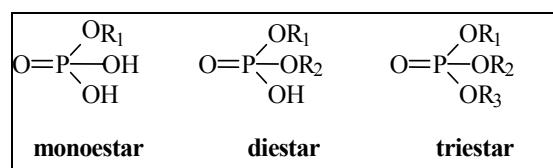
hemski. Zbog svega navedenog se smatra da je život nastao u vodi, mada ima i tumačenja prema kojima je on nastao u kosmosu.

## 1.4. Hemijska jedinjenja u sastavu organa i tkiva biljaka

Ako se posmatraju sa fiziološkog aspekta, biljke bi se mogle predstaviti kao "gradjevine" izgradjene iz više organa. Međutim, ako se one posmatraju sa biohemiskog aspekta, onda one predstavljaju skup astronomskog broja individualnih bioloških jedinica - **ćelija**, vidljivih samo pod mikroskopom. Svaka od ovih ćelija i njenih podjedinica, koje ih sačinjavaju, predstavlja skup velikog broja elemenata, mikro- i makromolekula u veoma različitim, manje ili više poznatim, organizacionim strukturama i funkcionalnim odredjenjima. Hemijska jedinjenja u sastavu biljaka, iako brojna i raznolika mogu se podeliti, prema vrsti i njihovoj složenosti u dve grupe i to:

- ◆ *neorganska jedinjenja* i
- ◆ *organska jedinjenja*.

**Neorganska jedinjenja** - iako manje brojna u odnosu na organska, imaju veoma bitne uloge u opštem funkcionisanju biljaka, pre svega u biohemiskim procesima. Posebno treba istaći fosfatni jon ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), koji je najčešće prisutan u obliku estara. Imajući u vidu tri prisutne hidroksilne grupe u fosfornoj kiselini moguće je njihovom odgovarajućom zamenom dobiti mono-, di- i triestre.



Zbog izražene elektronegativnosti fosfatni ion je veoma reaktiv. Izuzetno lako reaguje sa  $\text{H}^+$  te je, zbog toga u ćelijama uvek prisutna  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , koja gradi odgovarajuće soli sa katjonima

(npr. sa  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  i dr.), dok sa alkoholima gradi fosfatne estre. Estre gradi i sa prisutnim šećerima (šećerni fosfati), aminokiselinama (aminoacil-fosfati), nukleozidima (nukleozid fosfati) i sl.

Fosfatni estri adenozintrifosfat (ATP) i adenozindiofosfat (ADP), sadrže energijom bogate **anhidridne veze**, zbog čega se nazivaju i "visokoenergetski" fosfati. Oni služe, pored ostalog, i za energetsko aktiviranje relativno inertnih molekula, koje učestvuju u nekim važnim biohemiskim procesima kao što su glikoliza, oksidacija i sinteza masnih kiselina i sl.

**Organska jedinjenja** - raznovrsnija i prisutnija u organima i tkivima biljaka, mogu se podeliti u dve podgrupe:

- ♦ *osnovna organska jedinjenja* (manji molekuli; Mr 100 - 300) i
- ♦ *proizvedena organska jedinjenja* (makromolekuli; Mr  $10^3$  -  $10^6$ ).

Osnovna organska jedinjenja - koja imaju manje složenu strukturu i manju molekulsku masu od 100 do 300, obuhvataju jedinjenja kao što su: - aminokiseline, monosaharidi, nukleotidi, masne kiseline i izopren. Manje prisutna jedinjenja ove podgrupe u biljkama su pojedine vrste alkohola, aldehida, ketona, mono- i heterocikličnih ugljovodonika i dr.

Proizvedena organska jedinjenja - (niskomolekulska i visokomoleku-lska) nastaju hemijskim vezivanjem osnovnih jedinjenja glikozidnim, estarskim, peptidnim i drugim vezama.

U grupi *niskomolekulske* jedinjenja pojavljuju se oligosaharidi, glikozidi, nukleotidi, nukleozidi, estri karbonskih kiselina, estri fosforne kiseline, vitamini, koenzimi, steroidi i druga.

Jedinjenja čija molekulska masa prelazi 10.000 predstavljaju grupu *visokomolekulske* proizvedenih *biopolimera* (*biopolikondenzata*), od kojih se u biljkama biosintetizuje samo manji broj kao što su: proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi, lipidi i sl.

Biopolimeri (makromolekuli) biljaka čine veći deo njihove suve materije i pored vode su najzastupljeniji biomolekuli u biljkama. U zavisnosti da li nastaju polimerizacijom jedne ili više vrsta monomernih jedinica delimo ih na *homopolimere* i *heteropolimere*. *Homopolimeri* su najčešće rezervne ili strukturne materije biljaka, a *heteropolimeri* imaju funkcije vezane za životne procese biljaka. Individualnosti ćelija u raznim vrstama organa potiču od različitih struktura biopolimera. Makromolekuli različitih klase međusobno se vezuju, gradeći **supramolekulske strukture** kao što su: lipoproteini (kompleks lipida i proteina), ribozomi (kompleks nukleinskih kiselina i proteina), enzimski kompleksi itd. Makromolekuli u supramolekulske strukturama međusobno su vezani nekovalentnim vezama. Na najvišem nivou organizacije u hijerarhiji strukture ćelije razni supramolekuli kompleksi se međusobno sastavljaju u ćelijske organele (jedro, mitohondrije, hloroplaste itd.)

Organska jedinjenja, prisutna u strukturi organa biljaka, najvećim delom su *primarni biomolekuli*, a manjim delom su *sekundarni biomolekuli*.

*Primarni biomolekuli* su jedinjenja neophodna za rastenje i razviće i reprodukciju kao npr. aminokiseline, proteini, nukleinske kiseline ugljeni hidrati i lipidi, a *sekundarni biomolekuli* su veoma rasprostranjena raznovrsna jedinjenja koja se najviše nalaze u biljkama (npr. biljni fenoli, terpenoidi, alkaloidi, pigmenti, biljni hormoni, steroidi itd), ali direktno ne učestvuju u primarnim biohemijskim aktivnostima.

## Izvod

♣ Biljke kao i drugi živi organizmi imaju specifičan hemijski sastav uslovjen biljnom vrstom, staništem kao i čitavim nizom ekoloških faktora. Biljke se međusobno razlikuju u kvalitativnom sastavu kao i kvantitativnom udelu elemenata i hemijskih jedinjenja.

♣ Razvoj biohemije biljaka uslovjen je upravo proučavanjem hemijskog sastava biljaka, njihovih biosintetičkih puteva, odn. celokupnim metabolizmom.

♣ Hemijski sastav biljaka je odgovoran za vrstu i tok biohemijskih reakcija koje se odvijaju u ćelijama, organelama tkivima i organima biljaka. Biljke teže da održe svoj hemijski sastav stalnim i ta osobina se naziva *homeostaza*.

♣ Pod hemijskim sastavom biljaka podrazumeva se *elementarni sastav, voda i hemijska jedinjenja*.

♣ Biljke u svom sastavu sadrže sve elemente periodnog sistema (ukupno do vremene pisanja ovog udžbenika 109), ali je do sada pažnja naučnika usmerena samo na oko 60 elemenata koji su nazvani *bioelementima*. Oni se prema zastupljenosti u biljkama dele u tri grupe

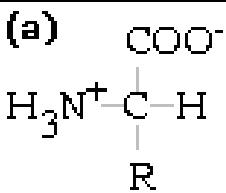
i to - *makroelemente* ( $<0.001\%$ ), *mikroelemente* (0.001-0.000001%) i *ultramikroelemente* ( $>0.000001\%$ ) u odnosu na absolutno suvu masu biljke.

♣ Voda je najzastupljenije i najvažnije jedinjenje u biljkama zbog raznovrsnih funkcija u biohemijskim procesima. Ona je medijum za brojne reakcije u metabolizmu, reaktant, transporter metabolita, termostat za proteine i nukleinske kiseline, donator vodonika u fotosintezi itd.

♣ Biljke sadrže u svom sastavu osnovna i polimerna organska jedinjenja. Ona se prema funkciji koju obavljaju u biljkama dele na *primarne* i *sekundarne biomolekule*. Primarni biomolekuli biljaka su slični sa istim jedinjenjima u ostalim organizmima, dok su sekundarni biomolekuli specifičnost biljne ćelije i specifični su za svaku biljnu vrstu.

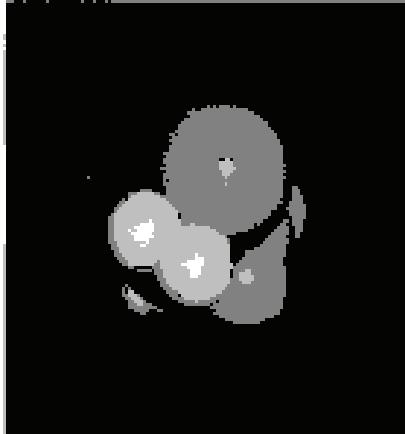
♣ *Primarni biomolekuli* su jedinjenja neophodna za rastenje i razviće i reprodukciju kao npr. aminokiseline, proteini, nukleinske kiseline ugljeni hidrati i lipidi, a *sekundarni biomolekuli* su veoma rasprostranjena raznovrsna jedinjenja koja se najviše nalaze u biljkama (npr. biljni fenoli, terpenoidi, alkaloidi, pigmenti, biljni hormoni, steroidi itd), ali direktno ne učestvuju u primarnim biohemijskim aktivnostima.

## 2. Aminokiseline



2.1. Hemijske reakcije  
aminokiselina  
2.2. Klasifikacija aminokiselina  
i njihova funkcija

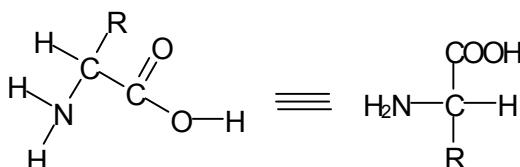
(b)



*Aminokiselina u rastvoru,  
pH 7 (a) i aminokiselina u  
prostoru (b).*

Aminokiseline su, po hemijskom sastavu, organske kiseline kod kojih je na  $\alpha$ -C atomu (prvi atom ugljenika do karboksilne grupe) došlo do supstitucije jednog vodonikovog atoma amino-grupom ( $-\text{NH}_2$ ), a drugog vodonikovog atoma alifatičnim ili aromatičnim ostatkom (R).

Aminokiseline većinom predstavljaju strukturne jedinice proteinskih molekula i od njihovih osobina uglavnom zavise i osobine proteina. Što se tiče elementarnog sastava aminokiseline su izgradjene od C, H, N i O, a neke sadrže i atome S (cistein i metionin). Ostaci R na  $\alpha$ -C atomu se međusobno razlikuju po veličini, prostornoj strukturi, prisustvu funkcionalnih grupa i dr., što određuje i sam identitet svih 20 aminokiselina koje se nalaze u strukturi proteina. Na slici 2-1 prikazana je opšta formula nenaelektrisanog oblika aminokiseline.

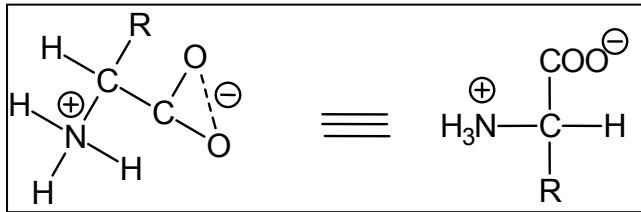


Slika 2-1.  
Model nenaelektrisane  
aminokiseline.

Predstavljena struktura pokazuje da je tetraedarski  $\alpha$ -C atom kovalentno vezan sa karboksilnom grupom ( $-\text{COOH}$ ), aminogrupom ( $-\text{NH}_2$ ), ostatkom R i vodonikovim atomom (H). Izuzetak je glicin, po strukturi najjednostavnija aminokiselina, gde je R atom vodonika, te ne postoji mogućnost optičke aktivnosti, odnosno asimetričnosti supstituenata na  $\alpha$ -C atomu. Ostale proteinske aminokiseline imaju asimetričan  $\alpha$ -ugljenikov centar vezan za četiri različita supstituenta. On daje aminokiselinu hiralan izgled i naziva se *hiralnim* centrom. Jedinjenja koja sadrže hiralni centar su optički aktivna i obrću ravan polarizovane svetlosti levo (-) ili desno (+). Ekvimolekulska smeša navedenih oblika gradi *racemat*. Stereoizomeri hiralnih jedinjenja, koji odgovaraju po konfiguraciji L-glicerolaldehidu označavaju se velikim slovom L, a oni koji odgovaraju D-glicerolaldehidu označavaju se slovom D nezavisno od pravca obrtanja ravni polarizovane svetlosti. Prema tome slova L i D su oznake *apsolutne konfiguracije* četiri supstituenta na hiralnom atomu ugljenika. Sve proteinske aminokiseline, osim glicina, se javljaju u obliku L-stereoizomera.

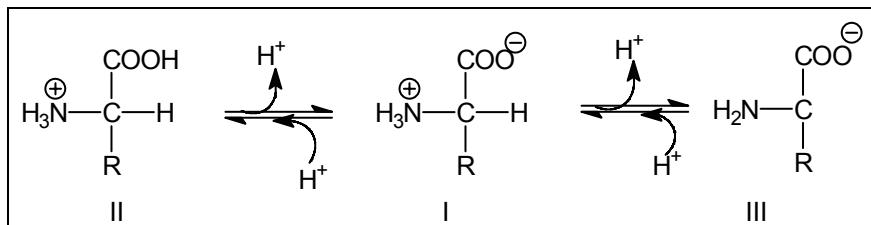
Mikrobi i neki fosili sadrže aminokiseline D- niza, te na osnovu njihove zastupljenosti moguće je odrediti starost fosila.

U neutralnim rastvorima ( $\text{pH} \approx 7$ ) kisela karboksilna grupa aminokiseline može disocijacijom oslobođiti  $\text{H}^+$  jone koje prima bazna amino-grupa iste kiseline analogno amonijaku. Ovim putem neutralna aminokiselina dobija dvojno (+ i -) nenaelektrisanje u rastvoru. Ovakvi dipolarni oblici aminokiselina nazvani su *zwitter joni* (dipolarni joni). Aminokiseline u ovom obliku su, zbog povećane elektrostabilnosti, veoma malo rastvorljive. Dipolarni oblici aminokiselina prikazani su na slici 2-2.



Slika 2-2. Dipolarni model aminokiselina.

U obliku *dipolarnog jona* (zwitter jona) aminokiseline se nalaze na pH-vrednostima 4-9, struktura I. U sredini u kojoj je pH-vrednost niža aminokiseline se nalaze u *katjonskom* obliku - struktura II za razliku od baznih sredina u kojima se aminokiseline nalaze u obliku *anjona* - struktura III.



**Izoelektrična tačka:** pH-vrednost na kojoj se aminokiseline nalaze skoro potpuno u dipolarnom obliku (zwitter jonskom obliku) naziva se *izoelektričnom* tačkom, koja ima oznake pH<sub>i</sub>, pI ili samo I. U tabeli 2-1 date su izoelektrične tačke nekih aminokiselina.

Tabela 2-1. Izoelektrične tačke (pHi) nekih proteinskih aminokiselina.

Aminokiseline					
Neutralne	pHi	Kisele	pHi	Bazne	pHi
fenilalanin	5.48	asparaginska	2.77	arginin	10.76
serin	5.68	glutaminska	3.22	lizin	9.74
valin	5.96			histidin	7.59

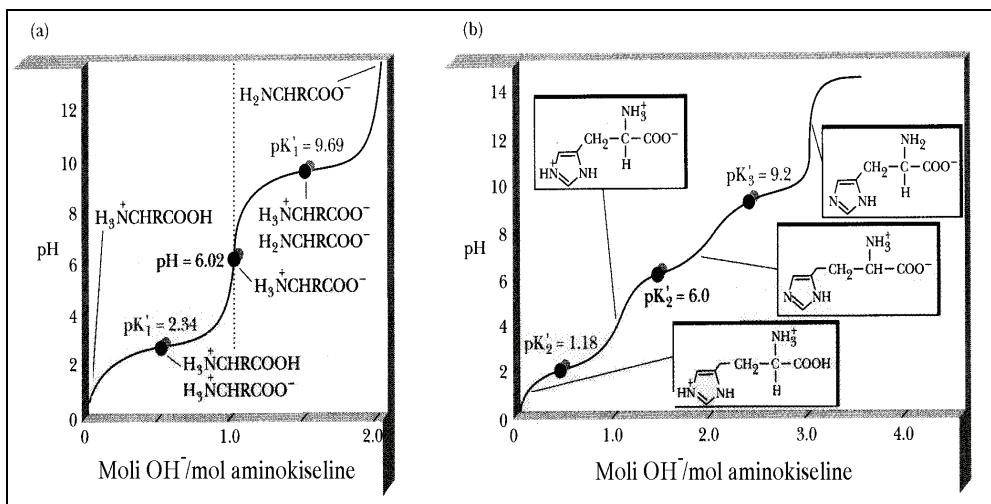
*Izoelektrična tačka* (I) se može matematički izračunati kod monoaminomonokarboksilnih kiselina iz konstanti disocijacije karboksilne i amino-grupe po sledećoj jednačini:

$$I = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

pK<sub>1</sub> - negativan logaritam konstante disocijacije karboksilne grupe  
pK<sub>2</sub> - negativan logaritam konstante disocijacije amino-grupe

U cilju što boljeg razumevanja oblika u kojima se nalaze aminokiseline u sredinama različitih pH-vrednosti na grafikonu prikazani su dijagrami krivih

titracija alanina (neutralna aminokiselina) i histidina (bazna aminokiselina) (slika 2-3a i b).

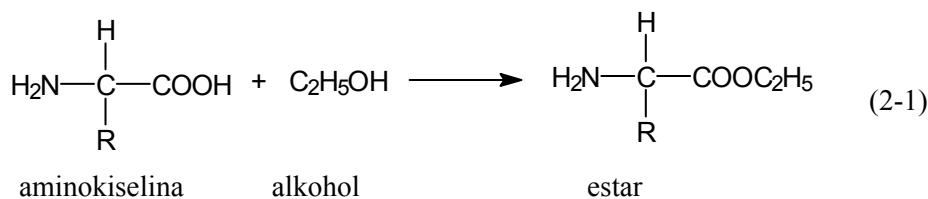


Slika 2-3. Titracione krive alanina (a) i histidina (b).

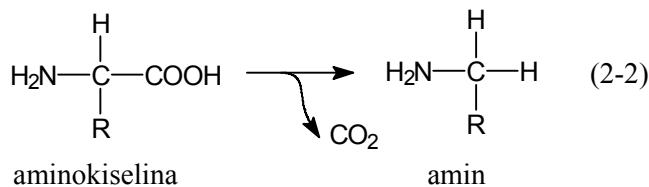
Titraciona kriva alanina ima karakter dvobazne kiseline (slika 2-3a). U alaninu, se nalaze dve titracione grupe, karboksilna i amino grupa. Pri vrlo niskim pH (kisela sredina) alanin ima protonovanu i nenaelektrisanu karboksilnu grupu i pozitivno naelektrisanu amino-grupu koja je takođe protonovana. Pod ovim uslovima alanin ima pozitivan naboj (naelektrisanje) i svojstva katjona. Dodavanjem baze karboksilna grupa gubi svoj proton i postaje negativno naelektrisana i pH rastvora se povećava. *Ala* je sada bez naelektrisanja sa karakteristikama dipolarnog jona. Ova pH vrednost označava izoelektričnu tačku alanina i ima vrednost 6.02. Isto tako pH raste sve više sa daljim dodavanjem baze, protonovane amino-grupe gube protone, molekul *Ala* sada ima ukupan negativan naboj koji potiče od negativno naelektrisane karboksilne grupe te kao molekul poprima osobine anjona (bazna sredina). U histidinu, promeni na strani imidazola doprinose titracione grupe. Pri veoma niskim pH (kisela sredina) molekul *His* ima dva pozitivna naelektrisanja, a nose ih imidazolska i amino-grupa, i svojstva katjona. Dodavanjem baze pH se povećava, karboksilna grupa gubi proton i postaje negativno naelektrisana. *His* je i dalje pozitivno naelektrisan. Daljim dodavanjem baze deprotonuje se imidazolska grupa te *His* postaje nenaelektrisan. (izoelektrična tačka, PI = 7.69), a sa više baze deprotonuje se i amino-grupa te *His* postaje negativno naelektrisan (anjon). Tako, titraciona kriva *His* poprima oblik titracione krive trobazne kiseline (slika 2-3b).

## 2.1. Hemijske reakcije aminokiselina

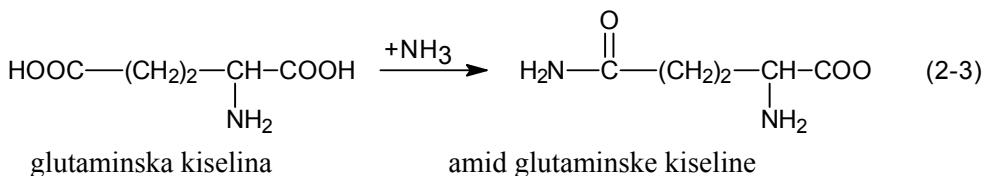
Aminokiseline kao organska jedinjenja sa dve osnovne funkcionalne grupe, (-COOH, -NH<sub>2</sub>), mogu stupati u reakciju sa različitim jedinjenjima dajući nove, biohemski veoma značajne proizvode. Među njima posebno mesto zauzimaju razne soli, zatim amidi i često veoma složeni estri i druga jedinjenja koja nastaju pri ovim reakcijama. Pri reakcijama karboksilne grupe aminokiselina i OH-grupe alkohola nastaju estri izrazito baznog karaktera (reakcija 2-1):



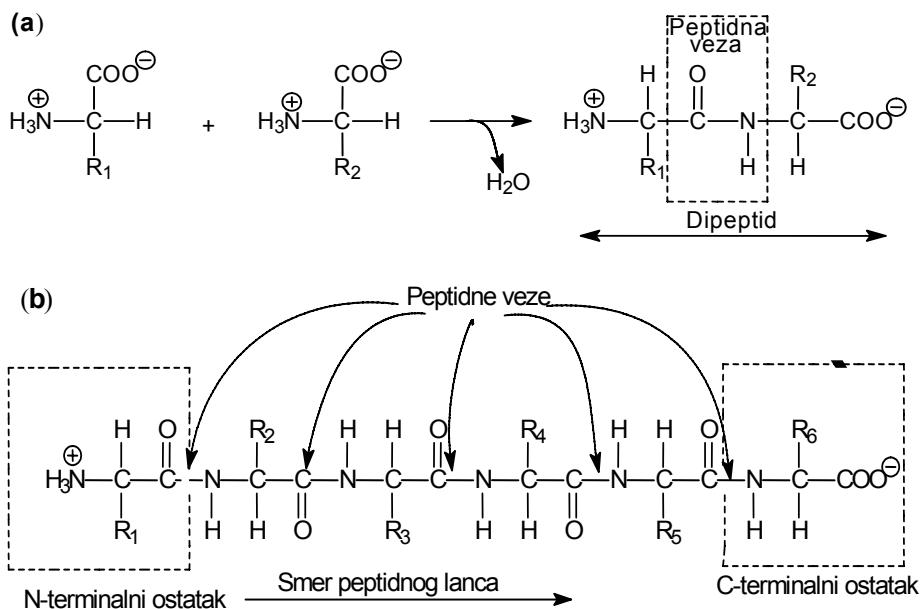
Aminokiseline u prisustvu sprecifičnih enzimskih katalizatora, koji uslovjavaju dekarboksilaciju, prelaze u odgovarajuće amine (reakcija 2-2):



Kisele aminokiseline u prisustvu amonijaka daju odgovarajućeamide (reakcija 2-3):

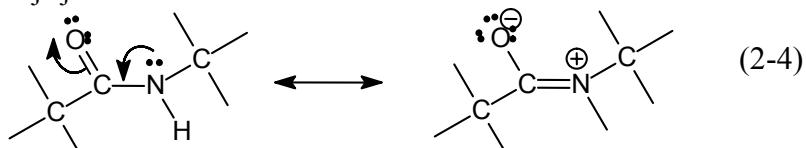


U medjusobnim reakcijama aminokiselina - stupa u reakciju karboksilna grupa jedne aminokiseline sa amino-grupom druge aminokiseline pri čemu uz izdvajanje molekula H<sub>2</sub>O nastaje *peptidna veza* kao tip kovalentne veze koja povezuje ostatke aminokiselina dajući peptide i više polimere (slika 2-4 a i b).



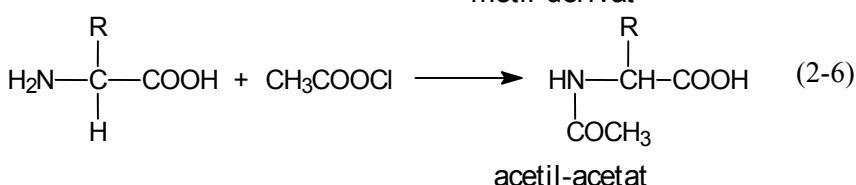
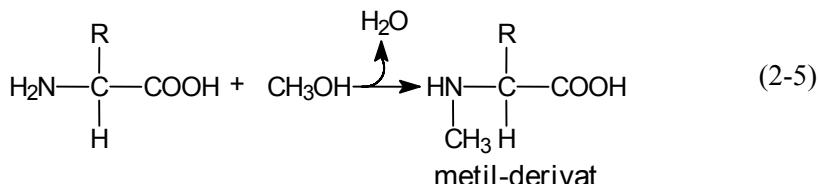
Slika 2-4 .Nastajanje peptidne veze: (a) dipeptid, (b) mali peptidni lanac.

Sama peptidna veza, posmatrajući internu preraspodelu elektrona između C i N predstavlja jednu rezonantnu strukturu:



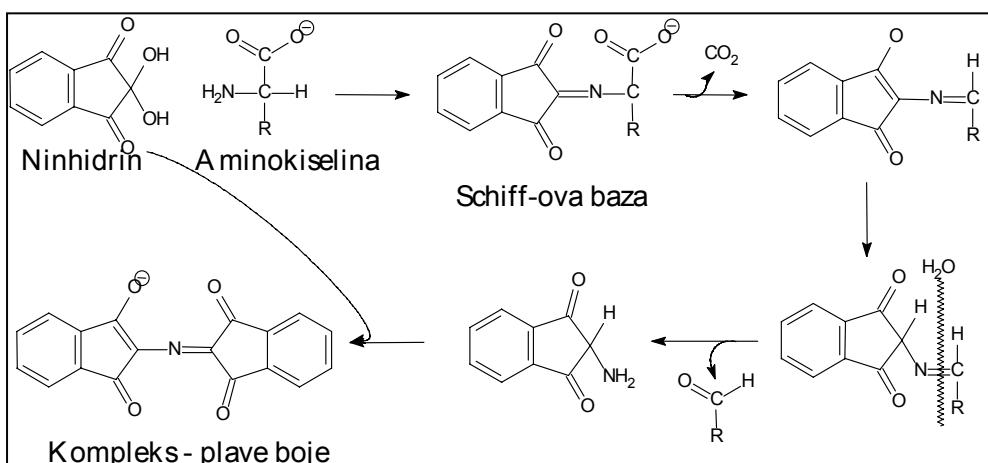
Rezonantne strukture peptidne veze

Amino-grupa aminokiselina može stupiti u reakciju metilovanja i acetilovanja pri čemu nastaju metil- i acetil-derivati (jednačine 2-5 i 2-6):



Pored karboksilne i amino-grupe u strukturi aminokiselina postoje i druge za reakciju sposobne funkcionalne grupe kao što su: imino-grupa, tiol-grupa, alkoholna grupa alifatičnog ostatka, fenolna grupa, guanidinska grupa, disulfidna grupa i druge. Reakcije navedenih grupa sa odgovarajućim reagensima su veoma česte pri analizi aminokiselinskog sastava polipeptidnog lanca. Aminokiseline iz kojih se protein sastoji analiziraju se posle kisele hidrolize proteina. Aminokiseline se analiziraju i kao slobodne (npr. u krvnoj plazmi, urinu, bilnjim ekstraktima itd.). Cilj aminoanalize je identifikacija i određivanje aminokiselina u datom uzorku.

*Stanford Moore* i *William Stein* sa saradnicima su razvili metodu za analizu aminokiselina koje se zasnivaju na njihovom razdvajaju jonoizmenjivačkom hromatografijom na koloni sulfonovanog polistirena. Aminokiseline se u eluatu sa kolone detektuju i određuju posle reakcije sa *ninhidrinom*. Detekcija se vrši na osnovu elucione zapremine, a koncentracija se određuje na osnovu merenja apsorbance rastvora posle reakcije sa ninhidrinom. Postupak je automatizovan u instrumentu koji se zove *aminoanalizator*. Tok *ninhidrinske reakcije* prikazan je na slici 2-5.

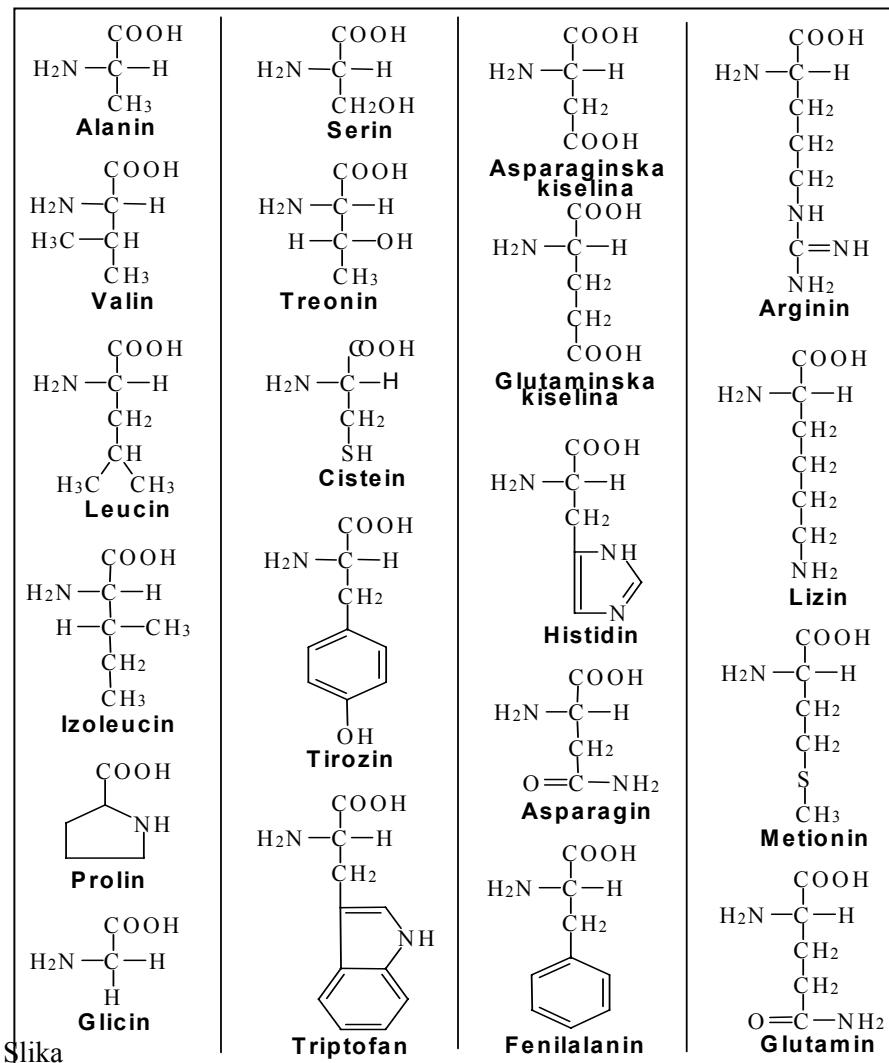


Slika 2-5. Ninhidrinska reakcija aminokiselina.

U navedenoj reakciji ninhydrin daje sa aminokelinom kao među proizvod veoma labilno jedinjenje poznato pod nazivom *Schiffova* baza koja se potom dekarboksilyje. Pri tome se dvostruka veza hidrolitički cepa, a iz vezane aminokiseline nastaje aldehid koji ima jedan C atom manje. Nastali amin reaguje sa još jednim molekulom ninhydrina dajući jedinjenje tipa kompleksa plave boje tzv. purpurni pigment. Purpurnu boju u ninhidri-nskoj reakciji daju sve aminokiseline koje imaju slobodnu  $\alpha$ -amino grupu. Prolin i hidroksiprolin u ovoj reakciji daju žutu boju.

## 2.2. Klasifikacija aminokiselina i njihova funkcija

U proteinima se, po pravilu nalazi dvadesetak različitih aminokiselina, često nazvane i proteinskim aminokiselinama, koje su kodirane različitim genima i koje shodno genetskom zapisu izraženom kroz redosled baza određuju sekvencu polipeptidnog lanca. Strukture ovih aminokiselina su date na slici 2-6.



2-6. Strukture proteinskih aminokiselina.

Proteinske aminokiseline se mogu klasifikovati na više načina, a najčešće prema:

- ◆ *polarnosti ostatka R,*
- ◆ *hemijskoj strukturi,*
- ◆ *biohemijskoj funkciji i*
- ◆ *degradacionim proizvodima.*

**Prema polarnosti ostatka R** - proteinske aminokiseline se klaskifikuje u četiri grupe i to:

- ◆ *aminokiseline sa neopolarnim (hidrofobnom) ostatkom R,*
- ◆ *aminokiseline sa polarnim (hidrofilnim) ostatkom R,*
- ◆ *aminokiseline sa negativno naelektrisanim ostatkom R i*
- ◆ *aminokiseline sa pozitivno naelektrisanim ostatkom R.*

Nazivi aminokiselina, simboli za njihovo obeležavanje, struktura formula, kao i njihova rasprostranjenost u organizmima biljaka i biohemijska funkcija dati su u tabelama 2-2 do 2-5.

*Aminokiseline sa nepolarnim (hidrofobnim) ostatkom R* - obuhvataju četiri aminokiseline sa alifatičnim ostatkom R (*alanin, valin, leucin i izoleucin*), jednu sa heterocikličnim ostatkom (*prolin*), dve sa aromatičnom ostatkom (*fenilalanin i triptofan*, koji u strukturi sadrži indolski prsten) i jednu aminokiselinu sa sumporom (*metionin*).

Alanin je najmanje hidrofobna aminokiselina i nalazi se u granicama izmedju nepolarnih aminokiselina i aminokiselina sa nenaelektrisanom polarnom grupom. Prolin, koji ima cikličnu strukturu, razlikuje se od ostalih aminokiselina i može se smatrati kao  $\alpha$ -aminokiselina u kojoj je N amino-grupe povezan sa dva C-atoma u prstenu.

Navedene aminokiseline se medjusobno razlikuju po obliku i veličini R ostatka. Alanin, valin, leucin i izoleucin imaju alifatične ugljovodonicične ostatke, od metil grupe u alaninu, do izo-butil grupe u leucinu i izoleucinu. Metionin je tioetar čiji bočni ostatak liči po mnogim osobinama na n-butil grupu (atomi C i S imaju skoro istu elektronegativnost, a atom S po zapremini približno odgovara metilenskoj grupi). U poređenju sa drugim aminokiselinama prolin, pokazuje, zbog svog prstena, jedinstvene konformacione osobine. Za benzenov prsten u fenilalaninu, i indolov prsten u triptofanu zajednička je aromatična struktura, nepolarnost i voluminoznost. U tabeli 2-2 dati su nazivi, simboli, karakteristike strukture hidrofobnog ostatka R, kao i rasprostranjenost u biljnim proteinima.

Tabela 2-2. Proteinske aminokiseline sa nepolarnim ostatkom R.

br.	Naziv	Simbol	Struktura ostatka R	Rasprostranjenost u biljnim proteinima
1.	Alanin	Ala(A)		<i>Alanin</i> se nalazi u proteinima kukuruza i drugih biljaka, a najviše u fibroinu svile (40%).
2.	Valin	Val(V)		<i>Valin</i> je <b>esencijalna</b> * amino-kiselina. Nalazi se slobodna u pasulju ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ), i drugim biljkama.
3.	Leucin	Leu(L)		<i>Leucin</i> je <b>esencijalna</b> aminokiselina. Nalazi se u kukuruzu do 21%, glijadinu pšenice 12% a slobodna u semenu pasulja, graška, lupine, pšenice i dr.
4.	Izoleucin	Ile(I)		<i>Isoleucin</i> je <b>esencijalna</b> aminokiselina biljnih proteina, ali je zastupljena manje od prethodno navedenih kiselina.
5.	Prolin	Pro(P)		<i>Prolin</i> se u znatnoj količini nalazi u proteinima pšenice, glijadinu i zeinu.
6.	Fenilalanin	Phe(F)		<i>Fenilalanin</i> je <b>esencijalna</b> aminokiselina koja se najviše nalazi u fazeolinu, edestinu i globulinu.
7.	Triptofan	Trp(W)		<i>Triptofan</i> je takođe <b>esencijalna</b> aminokiselina koja se nalazi u glijadinu do 7%, zeinu i edestinu.
8.	Metionin	Met(M)		<i>Metionin</i> je <b>esencijalna</b> aminokiselina, koja ulazi u sastav vitamina U. Donor je metil-grupe u metabolizmu.

Aminokiseline sa polarnim (hidrofilnim) ostatkom R - su glicin (jedina aminokiselina koja nema asimetričan  $\alpha$ - C atom), serin i treonin (imaju polarnu -OH grupu vezanu za alifatični niz), tirozin (polarna -OH grupa vezana je za aromatični prsten), cistein (polarna -SH grupa koja stvara disulfidnu vezu u proteinima), glutamin i asparagin (sadrže amidnu -NH<sub>2</sub> grupu).

Glicin ima najmanji mogući R-ostatak (H atom). Serin i treonin imaju hidroksilnu grupu, ali se međusobno razlikuju po veličini R ostatka. Serin i treonin se često nalaze u aktivnim centrima enzima. Tirozin ima fenolnu grupu. Cistein ima tiolnu (sulfhidrilnu) grupu koja je jedinstvena po tome što gradi disulfidnu vezu sa drugim ostatkom cisteina. Ovaj dimer cisteina naziva se (naročito u starijoj literaturi) cistin. Zbog sličnosti naziva (cistein i cistin), cistin se ponekad naziva i polu-cistin. Kako genetski kod postoji samo za cistein, a cistin nastaje oksidacijom cisteina posle translacije, naziv cistin se u novijoj biohemijskoj literaturi redje koristi.

Treba imati u vidu da svrstavanje pojedinih aminokiselina u navedene grupe nije isključivo. Tako glicin i alanin sa svojim malim bočnim ostacima mogu da se svrstaju i u polarne nenaelektrisane aminokiseline, dok tirozin i cistein sa svojim grupama koje jonizuju (na višim pH vrednostima) mogu da se svrstaju i u polarne naelektrisane aminokiseline.

Tabela 2-3. Aminokiseline sa polarnim (hidrofilnim) ostatkom R.

br.	Naziv	Simbol	Struktura ostatka R	Rasprostranjenost u biljnim proteinima
9.	Glicin	Gly(G)	H	<i>Glicin</i> je <b>uslovno esencijalna</b> aminokiselina i nalazi se u svim biljnim proteinima.
10.	Serin	Ser(S)	CH <sub>2</sub> OH	<i>Serin</i> se nalazi u svim proteinima a najviše u zeinu 7.1% i fibroinu svile 14%.
11.	Treonin	Thr(T)	H—C(OH)—CH <sub>3</sub>	<i>Treonin</i> je <b>esencijalna</b> aminokiselina, nalazi se u znatnoj količini u gliadinu i zeinu.
12.	Cistein	Cys(C)	CH <sub>2</sub> SH	<i>Cistein</i> je <b>uslovno esencijalna</b> aminokiselina najviše rasprostranjena je u zeinu.

13.	Tirozin	Tyr(Y)		<i>Tirozin</i> je jedna od najrasprostranjenijih <b>uslo-vno esencijalnih</b> amino-kiselina. U fibroinu svile se nalazi u količini od 13%, zeinu 6.3% i gliadinu 3.3%.
14.	Asparagin	Asn(N)		<i>Asparagin</i> se u biljkama na-lazi pretežno slobodan. Naj-više ga ima klicama, izolo-vana je prvi put iz klice šar-garepe ( <i>A.officinalis</i> )
15.	Glutamin	Gln(Q)		<i>Glutamin</i> se nalazi u životinjama u manjoj količini od asparagina. Značajan je intermedijer u metabolizmu azota.

Bočni ostaci pet aminokiselina su nanelektrisani pri fiziološkim pH. Kisele aminokiseline (asparaginska i glutaminska) su negativno, a bazne aminokiseline (lizin, arginin i histidin) su pozitivno nanelektrisane na fiziološkim pH.

*Aminokiseline sa negativno nanelektrisanim polarnim ostatkom R* - su asparaginska i glutaminska kiselina, koje imaju po jednu  $-COO^-$  grupu vezanu na kraju alifatičnog R ostatka. Simboli i strukture ostatka R, kao i njihovo rasprostranjenje u biljkama su date u tabeli 2-4.

Tabela 2-4. Aminokiseline sa negativno nanelektrisanim ostatkom R.

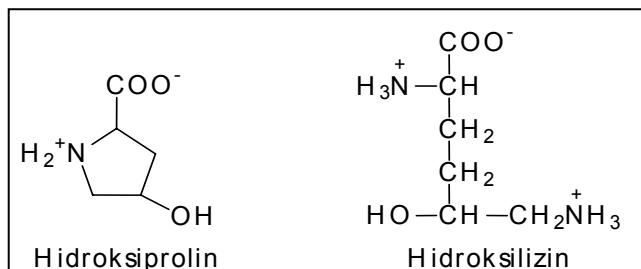
br.	Naziv	Simbol	Struktura ostatka R	Rasprostranjenost u biljkama
16	Asparaginska kiselina	Asp(D)		<i>Asparaginska aminokiselina</i> se nalazi kao sastojak svih biljnih proteina, a u slobodnom obliku u semenu žitarica, voću i povréu.
17.	Gluta-minska kiselina	Glu(E)		Iako nije esencijalna, gluta-minska kiselina je značajna kao donor aminogrupe u reakcijama transaminacije i biosintezi proteina. U znatnim količinama se nalazi u gliadinu (45.7%), zeinu (27%) i edestinu (21%).

Aminokiseline sa pozitivno naelektrisanim ostatkom R - su bazne: *lizin*, koji ima pozitivno naelektrisanu  $-NH_3^+$  grupu na kraju alifatičnog R ostatka, *arginin* sa pozitivnom gvanidinskom grupom i *histidin* sa slabo baznom imidazolskom grupom. Lizin i arginin imaju najduže bočne ostatke od svih standardnih aminokiselina. Histidin se često nalazi u aktivnim centrima enzima. U tabeli 2-5 date su neke karakteristike ovih aminokiselina.

Tabela 2-5. Aminokiseline sa pozitivno naelektrisanim ostatkom R.

br.	Naziv	Simbol	Struktura ostatka R	Rasprostranjenost u biljnim proteinima
18.	Lizin	Lys(K)	$  \begin{array}{c}    \\  CH_2 \\    \\  CH_2 \\    \\  CH_2 - CH_2 - NH_3^+  \end{array}  $	<i>Lizin</i> nije esencijalna aminokiselina i nalazi se skoro u svim proteinima, ali u malim količinama npr. gliadinu (0.65%) i zeinu (0.2%).
19.	Arginin	Arg(R)	$  \begin{array}{c}    \\  CH_2 \\    \\  CH_2 \\    \\  CH_2 - NH - C = NH_2^+  \end{array}  $	<i>Asparagin</i> takođe nije esencijalna aminokiselina i nalazi se u biljnim proteinima kao gliadinu iz duvana ( <i>Nicotinum tabacum</i> , 16%) i zeinu (1.7%).
20.	Histidin	His(H)	$  \begin{array}{c}    \\  CH_2 \\     \\  NH^+ \\    \\  CH \\    \\  HC - NH  \end{array}  $	<i>Histidin</i> se nalazi u svim biljnim proteinima, a najviše u gliadinu (2.5%) i zeinu (1.8%).

Pored navedenih aminokiselina biljke sadrže i njihove derivate kao npr. hidroksiprolin i hidroksilizin.



Prema hemijskoj strukturi - proteinske aminokiseline se dele u tri grupe i to:

- ◆ *alifatične aminokise-line* (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Met, Lis, Arg, Asn, Glu i Gln),
- ◆ *aromatične aminokiseline* (Phe, Trp i Tyr) i
- ◆ *heterociklične aminokiseline* (Pro i His).

**Prema biohemijskoj funkciji** - aminokiseline se klasificuju takodje u tri grupe i to:

- ◆ *esencijalne aminokiseline*,
- ◆ *uslovno esencijalne* i
- ◆ *neesencijalne aminokiseline*.

*Esencijalne (nezamenljive) aminokiseline* - sintetizuju biljke, ali ne čovek i životinje. Oni ih moraju unositi hranom da bi obezbedili normalan rast i razviće. U ovu grupu svrstane su aminokiseline: Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Met, Thr i Lys. Za stakore je još i histidin esencijalna aminokiselina.

*Uslovno esencijalne aminokiseline* - sintetizuju pored biljaka i heterotrofni organizmi. Medutim u odredjenim fiziološkim stanjima kao npr. u toku intenzivnog rasta, bolesti i sl., moraju se unositi u organizam hranom. U ovu grupu aminokiselina svrstane su Cys, Tyr, Arg i His.

*Neesencijalne (zamenljive) aminokiseline* - sintetizuju svi organizmi u dovoljnim količinama, a to su Ala, Gly, Asn, Gln, Asp i Glu.

Osnovna funkcija proteinskih aminokiselina da služe kao osnovna "sirovina" u sintezi proteina kao i nekih sekundarnih biomolekula biljaka.

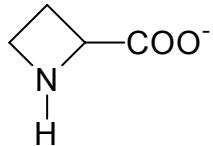
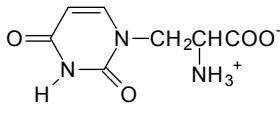
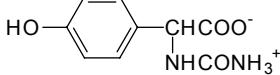
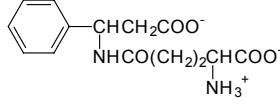
**Neproteinske aminokiseline** - pored proteinskih aminokiselina iz biljaka je izolovano oko 400 neproteinskih aminokiselina koje se u njima nalaze slobodne ili u obliku peptida. Prema hemijskom sastavu neproteinske aminokiseline se klasificuju na više načina. Jedan od načina hemijske klasifikacije je podela neproteinskih aminokiselina u osam grupa (tab.2-6).

Funkcija neproteinskih aminokiselina nije još dovoljno proučena. Smatra se da su rezervoari azota koji u uslovima, kada biljka nema dovoljno azota, omogućuju sintezu proteinskih aminokiselina. Pojedine aminokiseline mogu imati i druge funkcije. Tako npr. citrulin je značajan metabolit u biosintezi arginina,  $\alpha$ -aminoacidinska kiselina je prekursor u biosintezi većine proteinskih aminokiselina, kanavanin rezervoar azota, betain je donator metil-grupe, homoserin intermedijer u biosintezi i metabolizmu treonina i asparaginske kiseline i sl.

Sem nekoliko izuzetaka aminokiseline su rastvorne u vodi, amonijaku i drugim polarnim rastvaračima, a veoma malo u nepolarnimi slabo polarnim rastvaračima kao što su etanol, metanol i aceton. Aminokiseline sa hidrofilnim bočnim lancem su rastvorljive u vodi. Rastvorljivost u vodi je niža na njihovoj izoelektričnoj tački jer dominantni oblik *zwitter* ion smanjuje hidrofilna svojstva amino i karboksilne grupe.

Strukture, nazivi i nalaženje u biljkama nekikh neproteinskih aminokiselina kao predstavnika strukturnih grupa date su u tabeli 2-6.

Tabela 2-6. Neproteinske aminokiseline biljaka: strukturne grupe, nazivi, hemijske formule i nalaženje u nekim vrstama biljaka.

	<b>Grupa</b>	<b>Naziv</b>	<b>Formula</b>	<b>Nalaženje</b>
1.	Neutralne aminokiseline	L-2-amino-buterna kiselina	$\text{H}_3\text{CCH}_2\underset{\text{NH}_3}{\overset{ }{\text{CH}}} \text{COO}^-$	žalfija ( <i>Salvia officinalis</i> )
2.	Aminokiseline sa sumporom	S-metil-L-Cys	$\text{H}_3\text{CSCH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\overset{ }{\text{CH}}} \text{COO}^-$	pasulj ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
3.	Iminokiseline	azetidin-2-karbonska kiselina		šećerna repa ( <i>Beta vulgaris</i> )
4.	Kisele aminokiseline	L-2-amino-adipinska kiselina	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\underset{\text{NH}_3^+}{\overset{ }{\text{CH}}} \text{COO}^-$	u mnogim biljkama
5.	Bazne aminokiseline	citrulin	$\text{H}_2\text{NC}\text{NH}(\text{CH}_2)_3\underset{\text{NH}_3^+}{\overset{\text{O}}{\text{CH}}} \text{COO}^-$	lubenica ( <i>Citrullus lanatus</i> )
6.	Heterociklične aminokiseline	L-alanil-uracil (vilaridin)		dinja ( <i>Cucumis melo</i> )
7.	Aromatične aminokiseline	N-karbamil-L-hidroksifenil-glicin		bob ( <i>Vicia faba</i> )
8.	Ostale aminokiseline	$\gamma$ -glutamil-L- $\beta$ -fenil- $\beta$ -alanin		pasulj ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )

Sve aminokiseline su bezbojna kristalna jedinjenja slatkog okusa (izuzev Gly) i visoke tačke topljenja sa raspadanjem (220-315°C).

Za biohemijske procese je od posebne važnosti poznavanje reakcija kojima podležu aminokiseline u toku metabolizma. Osnovni tipovi metaboličkih reakcija aminokiselina dati su u tabeli 2-7.

Tabela 2-7. Neke metaboličke reakcije aminokiselina.

Vrsta reakcije	Hemiska jednačina
Transaminacija	$\begin{array}{c} \text{RCHCOOH} + \text{R}'\text{CCOOH} \rightarrow \text{RCCOOH} + \text{R}'\text{CHCOOH} \\   \qquad \qquad \qquad \qquad    \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad   \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
Dekarboksilacija	$\begin{array}{c} \text{RCHCOOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{RCH}_2\text{NH}_2 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Aminacija	$\begin{array}{c} \text{RCCOOH} + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{RCHCOOH} + \text{NAD}^+ \\    \qquad \qquad \qquad   \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
Deaminacija	$\begin{array}{c} \text{RCHCOOH} \xrightarrow{-2/\text{H}/} \text{RCCOOH} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{RCCOOH} \\   \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad   \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{NH}_3 \end{array}$

O funkciji slobodnih  $\alpha$ -aminokiselina u biljkama se još uvek malo zna. Neka istraživanja upućuju de se neke od njih kao npr. prolin mogu koristiti kao biohemski marker u programu selekcije odabranih genotipova otpornih na sušu. Pored navedenih  $\alpha$ -aminokiselina koje ulaze u sastav proteina biljke sadrže i druge aminokiseline koje nisu  $\alpha$ - već  $\beta$ - i  $\gamma$ , a nastaju u metabolizmu na relativno jednostavan način iz  $\alpha$ -aminokiselina. One su prisutne u tkivu biljaka u malim količinama, a njihova uloga u metabolizmu još uvek nije dovoljno proučena. Neke od ovih aminokiselina date su u tabeli 2-8.

Tabela 2-8. Strukture i biohemski funkcije nekih  $\beta$ - i  $\gamma$ -aminokiselina.

	Naziv	Strukturalna formula	Biohemski funkcija
1.	$\beta$ -alanin	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Sastojak je CoA
2.	$\beta$ -taurin	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Ima malo podataka o funkciji $\beta$ -taurin u biljkama
3.	$\gamma$ -aminobuterna kiselina	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Nastaje u metabolizmu glutamata

## Izvod

♣ Aminokiseline, monomerne jedinice proteina, imaju u osnovi svoje strukture amino grupu i karboksilnu grupu vezane za isti ugljenikov atom tzv.  $\alpha$ -C. Priroda bočnog lanca, označena kao R grupa, je osnova za utvrđivanje razlika u strukturi izmedju različitih aminokiselina.

♣ Izuvez glicina, aminokiseline mogu egzistirati i dva stereoizomerna oblika označena L i D. Ova dva stereoizomera se odnose kao predmet i njegov lik u ogledalu. Aminokiseline nadjene u proteinima tzv. proteinske aminokiseline su sve L oblika, mada se u prirodi nalaze i neke aminokiseline D oblika. Klasifikacija aminokiselina se zasniva pre svega na prirodi bočnog ostatka tzv. R ostatka. Dva praktično najvažnija kriterijuma su polarna ili nepolarna priroda R ostatka i prisustvo kiselih ili baznih grupa u bočnom ostatku.

♣ U slobodnim aminokisinama pri neutralnim pH, karboksilna grupa je disosovana (ima negativan naboј), a amino grupa je asosovana (ima pozitivan naboј). Aminokiseline bez nanelektrisanih grupa u bočnom ostatku egzistiraju u neutralnim pH rastvorima kao *zwitter joni* (dipolarni joni ili nenanelektrisani molekuli). Titraciona kriva aminokiselina pokazuje pH-opseg u kojem titraciona grupa prima ili otpušta protone. Bočni ostatak aminokiselina može takodje doprineti titracionim grupama; nanelektrisanje na ostatku R mora biti uzeto u obzir u odredjivanju ukupnog nanelektrisanja na aminokiselini.

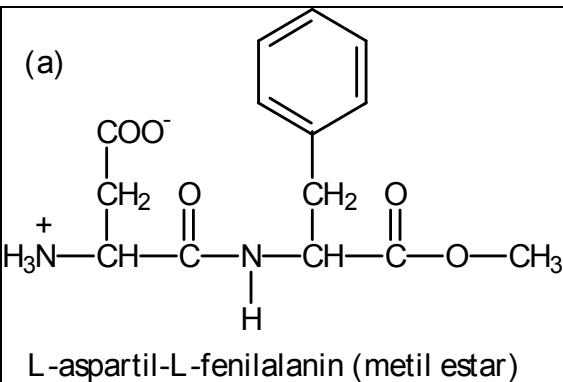
♣ Prema biohemijskoj funkciji aminokiseline se klasificuju na *esencijalne, uslovnoesencijalne i neesencijalne* aminokiseline. Prvu grupu aminokiselina (Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Met, Thr i Lys) sintetizuju samo biljke, dok ostale dve pored heterotrofnih sintetizuju i autotrofni organizmi.

♣ Pored 20 proteinskih biljke sintetizuju daleko veći broj (oko 400) tzv. neproteinskih aminokiselina koje su na bazi hemijske strukture svrstane u osam strukturnih grupa.

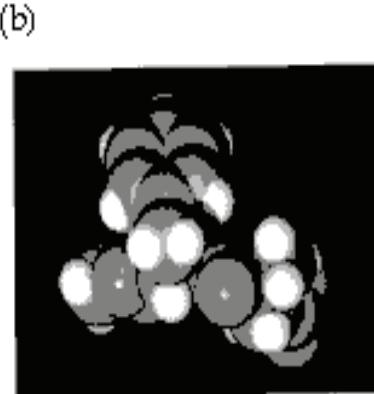
♣ O funkciji slobodnih  $\alpha$ -aminokiselina u biljkama se još uvek malo zna. Neka istraživanja upućuju de se neke od njih kao npr. prolin mogu koristiti kao biohemijski marker u programu selekcije odabranih genotipova otpornih na sušu.

♣ Pored  $\alpha$ -aminokiselina biljke sintetizuju i  $\beta$ - i  $\gamma$ -aminokiseline čija funkcija ni do danas nije potpuno jasna.

### 3. Peptidi



3.1. Nastajanje peptida  
3.2. Važniji peptidi  
biljaka

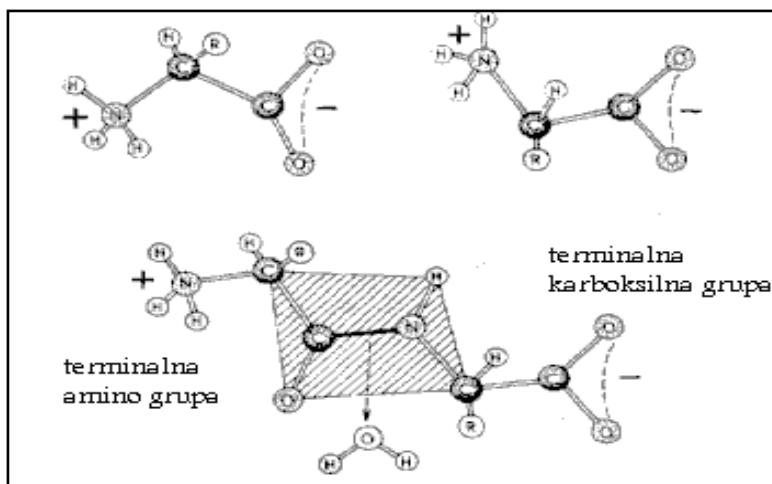


**Aspartam** - sladak peptid:  
(a) -struktura,  
(b) -prostorni oblik).

Peptidi su amidi aminokiselina. Nastaju polimerizacijom aminokiselina, to jest njihovim povezivanjem **peptidnom vezom** stvarajući tako peptide sa dve i više u lancu vezane aminokiseline. Zbog toga se prema broju aminokiselinskih ostataka obično peptidi dele na *oligopeptide* (2-10 aminokiselinskih ostataka) i *polipeptide* (do 100 aminokiselinskih ostataka). Peptidi koji imaju više od 100 aminokiselina nazivaju se *proteini*. Peptidi se razlikuju od proteina po tome što dijalizuju kroz prirodne membrane, za razliku od proteina, koji to ne mogu zbog velike molekulske mase sa graničnim vrednostima do 10.000 Daltona za peptide i preko 10.000 za proteine.

### 3.1. Nastajanje peptida

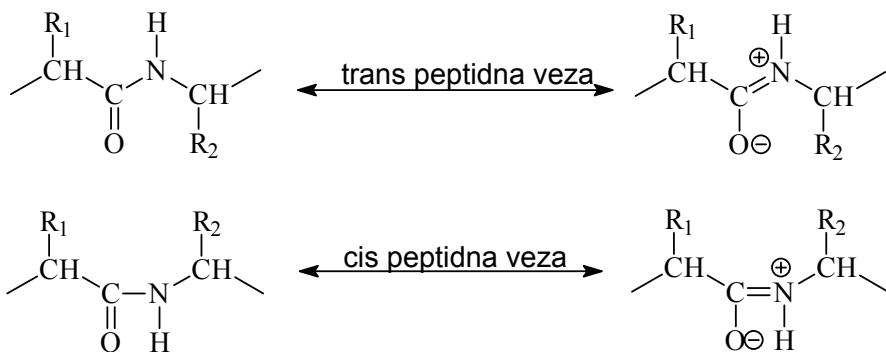
Nastajanje peptida povezivanjem samo dve aminokiseline peptidnom vezom dat je na slici 3-1.



Slika 3-1. Nastajanje dipeptida vezivanjem dve aminokiseline peptidnom vezom.

Na osnovu ispitivanja kristalnih struktura aminokiselina, amida i dipeptida, koja su vršili u periodu od 1930 do 1940, godine Luis Pauling i Robert Corey su zaključili da peptidna grupa ima *rigidnu-planarnu* strukturu. Ovo stereohemijsko ograničenje ima važnu ulogu u određivanju trodimenzionalne strukture peptida.

Oko peptidne veze nije moguća slobodna rotacija te postoje dve planarne konfiguracije peptidne veze i to cis i trans peptidna veza čije strukture su date na slici 3-2.



Slika 3-2. Planarne konfiguracije peptidne veze -*cis* i *trans*.

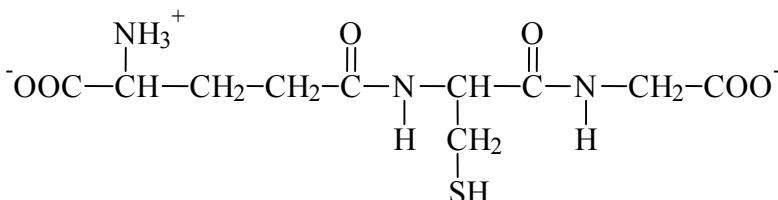
U peptidima biljnog porekla i drugim prirodnim peptidima je najviše zastupljena *trans* peptidna veza, tj. susedni  $C_\alpha$  atomi se nalaze sa suprotne strane peptidne veze. *Cis* peptidna veza je, zbog sternih smetnji (slika 3-1), za oko 8 kJ/mol manje stabilna od *trans* peptidne veze. Ona se u proteinima, izuzev u slučaju peptidne veze u kojoj učestvuje prolin, i ne nalazi. Postojanje *cis* peptidne veze, u ovom slučaju, objašnjava se manjom energetskom barijerom za rotaciju *trans* u *cis* oblik. U biljnoj ćeliji postoje dve vrste peptida i to:

- ◆ peptidi koji se dobijaju hidrolizom proteina i
- ◆ peptidi koji se nalaze slobodni.

Peptidi prve grupe se nazivaju još "otpadnim peptidima", jer nastaju delimičnom hidrolizom proteina pomoću proteolitičkih enzima. Pored tzv. "otpadnih proteina" postoji i veliki broj "slobodnih peptida" koji mogu imati različite fiziološko-biohemijske funkcije. Oni mogu delovati kao redoks sistemi, hormoni, otrovi ili biti sastojci ćelijskih zidova.

Kako se aminokiselinski ostaci u peptidima nalaze u obliku *acila* u nomenklaturi oni dobivaju nastavak - *il*, a nazivi aminokiseline sa slobodnom - COOH grupom ostaju neizmenjeni. *Naziv peptida se formira od aminokiseline koja ima slobodnu amino grupu.*

Kao primer navodimo jedan peptid od tri aminokiseline (slika 3-3):



Slika 3-3. Redukovani glutation (GSH)  
( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin) ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly).

## 3.2. Važniji peptidi biljaka

Pored aminokiselinskog sastava, za poznavanje funkcije peptida neophodno je poznavanje redosleda aminokiselina odn. *sekvencu* peptida. Do danas je za mali broj biljnih proteina odredjena sekvenca. Neki važniji peptidi biljaka dati su u tabeli 3-1.

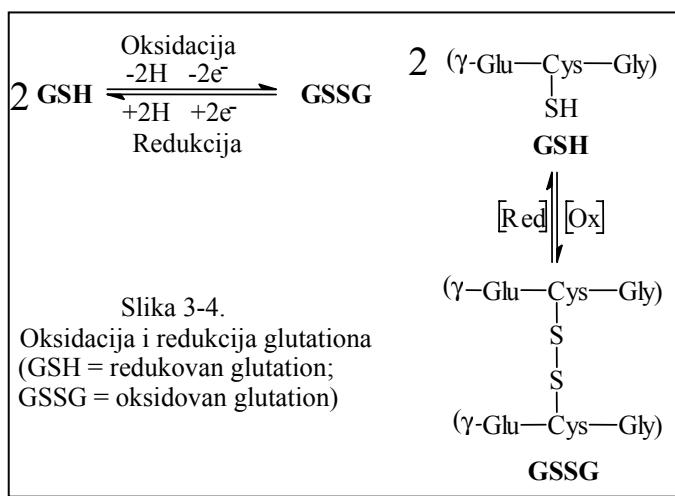
Tabela 3-1. Važniji peptidi biljaka (oznaka i nalaženje).

Naziv	Oznaka	Nalaženje
γ-glutamil-fenilalanin	γ-Glu-Phe	soja
γ-glutamil-cisteinil-glicin <b>(glutation)</b>	γ-Glu-Cys-Gly	sve biljke
Glutamil-glutamil-glutamin(fastigmatin)	Glu-Glu-Gln	mlado lišće pasulja
Leucil-leucin	Leu-leu	većina biljaka
Leucil-valin	Leu-val	krmno bilje
Integerin	N-dimetil-Val-Phe-Ser	većina biljaka
α-amanitin (toksin)	biciklični peptid	većina biljaka

Peptidi izgradjeni isključivo iz aminokiselina nazivaju se *homomerni* peptidi, a oni koji sadrže u svom sastavu i neki drugi ostatak nazivaju se *heteromerni* peptidi.

**Glutation** - je tripeptid γ-Glu-Cys-Gly (γ-glutamil-cisteinil-glicin). To je veoma rasprostranjen čelijski peptid koji se javlja u redukovanim (GSH) i oksidovanim (GSSG) obliku. Za njegove oksidoreduktione osobine odgovorne su tiolne grupe.

Oksidoredukcija glutationa može se napisati jednačinom iz koje se vidi da 2GSH oksidacijom daju GSSG (slika 3-4).



Glutation ima značaj kao "gasioč" kiseoničnih radikala (toksični oblici O<sub>2</sub>). Osim navedenog glutation može imati i funkciju koenzima kod nekih dehidrogenaza kao npr.

*glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (EC 1.2.1.12), formalde-hid dehidrogenaze (EC 1.2.1.17)* i dr.

Peptidi biljaka mogu biti i fiziološki aktivna jedinjenja i na osnovu toga se klasifikuju u četiri grupe i to:

- ♦ peptidne alkaloide,
- ♦ peptidne antibiotike (dekapetid gramicidin S),
- ♦ peptidne toksine (heptapeptidi amanitin i taloidin) i
- ♦ peptidne hormone.

Neki peptidi imaju sladak ukus kao saharin, dulcitol i dr. Sladak ukus imaju peptidi koji sadrže asparaginsku kiselinu. Tipičan je *aspartam* (L-aspartil-L-fenilalanin metil estar) oko 300 puta sladji od saharoze. Postoje i peptidi sa gorkim ukusom. Oni se mogu naći u pivu i graditi u toku zrenja sira. Intenzitet gorskog ukusa zavisiće od vrste i broja hidrofobnih bočnih lanaca. Neutralizacija gorskog ukusa vrši se uvodjenjem jedne polarne i jedne nehidrofobne grupe u odredjenu sfernu konformaciju molekula peptida.

## Izvod

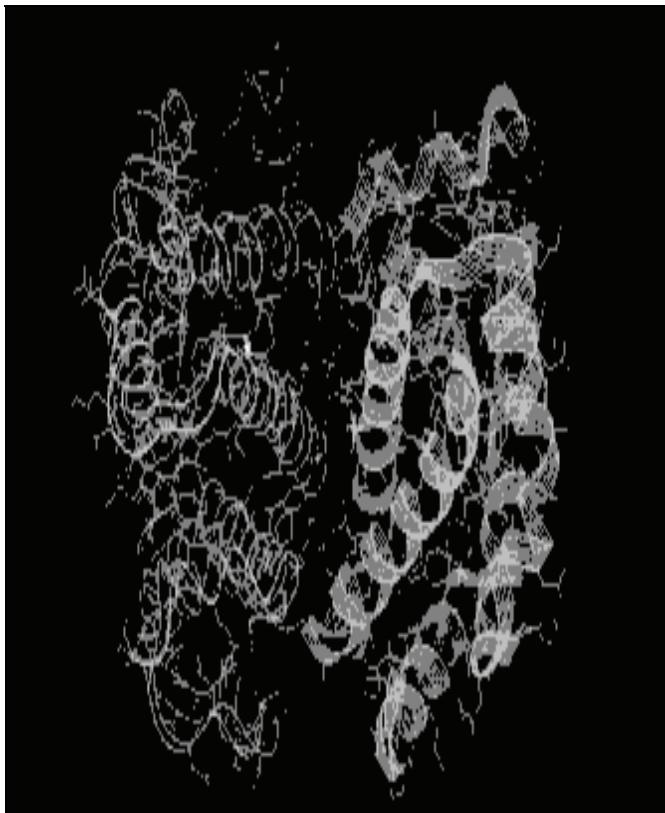
♣ Peptidi nastaju vezivanjem karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe druge aminokiseline kovalentnom (amidnom) odnosno *peptidnom* vezom. Peptidna grupa je planarna pa ovo stereohemijsko ograničenje ima važnu ulogu u određivanju trodimenzionalne strukture peptida. Ona može zauzimati *cis* i *trans* položaj. U biljnim peptidima i dr. prirodnim peptidima preovladjuje *trans* položaj peptidne veze. Prema broju aminokiselinskih ostataka peptidi se dele na *oligopeptide* (2-10 aminokiselina) i *polipeptide* (10-100 aminokiselina).

♣ Peptidi mogu ispoljavati i odgovarajuće fiziološke efekte pa ih shodno tome delimo na:

- ♦ peptidne alkaloide,
- ♦ peptidne antibiotike,
- ♦ peptidne toksine i
- ♦ peptidne hormone.

♣ Peptidi sa asparaginskom kiselinom u sekvenci uglavnom imaju sladak ukus poput saharina ili dulcitola. Takav peptid je *aspartam* (L-aspartil-L-fenilalanil metil estar). Postoje i peptidi sa gorkim ukusom (gorak ukus piva potiče iz ekstrakta hmelja ili ječma obogaćenih peptidima gorskog ukusa).

## 4. Proteini



- 4.1. Osobine proteina**
- 4.2. Strukture proteina**
- 4.3. Klasifikacija proteina**

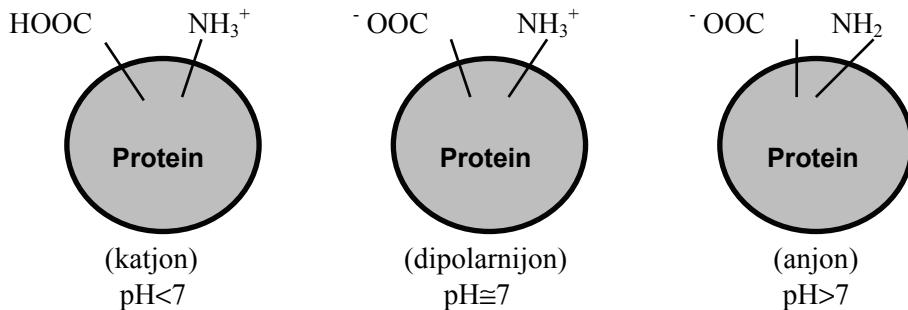
*α-heliks  
(α-uzvojnica)*

Proteini su biopolimeri velikih molekulskih masa izgradjeni iz aminokiselina (od 100 do približno 1.000) povezanih peptidnim vezama, što odgovara relativnoj molekulskoj masi ( $Mr$ ) od 10.000 do 100.000 Daltona i više. Ime *protein* dao je *Berzelius*, a prvi put u literaturi se spominje daleke 1840. godine u udžbeniku Muldera. Ime se izvodi iz grčke reči *proteios* - zauzima prvo mesto i ono je potpuno opravdano za proteine. Kod svih živih sistema pa time i biljaka proteini imaju dve esencijalne i različite uloge: oni predstavljaju strukturalni materijal i pokazuju karakterističnu aktivnost i funkciju pa su samim tim i nosioci osnovnih životnih funkcija u ćeliji. Svi životni procesi ćelije se odvijaju u strukturama proteina ili uz njihovo učešće. Oni su i katalizatori brojnih biohemijskih procesa u ćeliji. Može se reći da ne poznajemo život bez proteina. Njihove fizičko-hemiske osobine su zasnovane na koloidnom karakteru molekula proteina (*geli-, soli*) koji je uslovлен njihovim izuzetno velikim molekulima. Proteini biljaka se razlikuju međusobno u broju i redosledu aminokiselinskih ostataka, polipeptidnih lanaca, molekulskoj masi itd. U biljkama se nalazi u proseku oko 30% organske materije od čega na proteine kod pojedinih biljnih vrsta otpada u proseku 15-20%. Proteini se nalaze ili slobodni u citoplazmi ili su asosovani sa drugim makromolekulama u ćelijskim organelama.

## 4.1. Osobine proteina

Biološka funkcija proteina je u tesnoj vezi sa njihovim fizičko-hemiskim osobinama te se one intenzivno proučavaju. Relativne molekulске mase ( $Mr$ ) proteina se određuju na više različitih načina. Jedan od njih je diferencijalno centrifugovanje po kojem se  $Mr$  određuje na osnovu brzine taloženja proteina. Relativne molekulске mase proteina su veoma različite, a njihove brojne vrednosti su uslovljene metodom određivanja. Hordein iz ječma ima  $Mr$  2.700, edestin iz konoplje 31.000, a ureaza iz soje 48.000. Proteini disosuju kao katjoni ili anjoni i mogu se smatrati polielektrolitima sa visoko izraženim *amfolitnim svojstima* (slika 4-1). U zavisnosti od pH rastvora reaguju kao kiseline ili baze. Povećanjem pozitivnog i negativnog naielktrisanja proteina povećava se njihova hidratacija i rastvorljivost. Stepen hidratacije je uslovlen ukupnim naielktrisanjem i nije zavisan od oznake naielktrisanja. Suprotno navedenom, pravac kretanja proteina u električnom polju (ka anodi ili ka katodi) uslovlen je naielktrisanjem proteina. Kao i kod aminokiselina, (u slučaju ravnoteže između pozitivnih i negativno naielktrisanih grupa) koristi se *izoelektrična tačka* (pI) kao parametar za karakterizaciju proteina. Tako npr. izoelektrična tačka gliadina iz pšenice je na pH 7.1, zerna na 6.2, a edestina 5.5. Veličina izoelektrične tačke je uslovljena vrstom aminokiselina, prisustvom hidrofilnih i hidrofobnih grupa na površini molekula, veličinom pH rastvora, koncentracijom, prirodom prisutnih elektrolita, strukturom

itd. Na izoelektričnoj tački kada proteini nisu nanelektrisani rastvorljivost proteina, viskoznost i stepen hidratacije imaju najmanje vrednosti.



Slika 4-1. Shematski prikaz jonskih vrsta proteina na različitim pH .

Kao polimeri aminokiselina proteini u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze mogu imati istovremeno i pozitivno i negativno nanelektrisane grupe. Pozitivno nanelektrisane grupe obrazuju  $\epsilon$ -amino grupa lizina, imidazolski ostatak histidina i gvanidilna grupa arginina, a negativne  $\beta$ - i  $\gamma$ -karboksilne grupe asparaginske i glutaminske kiseline, fenolna grupa tirozina i tiolna grupa cisteina.

Proteini sa vodom grade koloidne rastvore. Stabilnost ovih koloida je različita i uslovljena je afinitetom prema vodi. Rastvori proteina u biljci imaju funkciju puferskih sistema velikog kapaciteta, a stabilnost u rastvoru je uslovljena njihovim afinitetom prema vodi odn. prisustvom hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu. U tabeli 4-1 dati su neki primeri ovih grupa.

Tabela 4-1. Hidrofilne i hidrofobne grupe u molekulu proteina.

Hidrofilne grupe proteina	Hidrofobne grupe proteina
Karboksilna (-COOH)	Metil (-CH <sub>3</sub> )
Karbonilna (>C=O)	Metilenska (-CH <sub>2</sub> -)
Hidroksilna (-OH)	Etil (-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )
Aldehidna (-CHO)	Propil (-C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )
Amino (-NH <sub>2</sub> )	Fenil (-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )
Imino (>NH)	Izopropenska (-C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> )
Amidna (-CONH <sub>2</sub> )	
Sulfhidrilna (-SH)	

Hidrofilni proteini su okruženi slojem vode (hidratacioni sloj), mogu da okluduju hidrofobne supstance i spreče njihovo izdvajanje iz rastvora. Ova protektivna koloidna funkcija proteina je odgovorna za stabilnost mnogih tečnosti u

živim organizmima. Dodavanjem polarnog rastvarača kao npr. alkohola ili acetona, ili visoke koncentracije neutralnih soli gubi se hidratacioni sloj i proteini se talože (isoljavaju).

Taloženje proteina iz rastvora se može obaviti na različite načine. Najčešće se u laboratoriji proteini talože *isoljavanjem* (taloženje sa solima). Za taloženje sa solima su odgovorni katjoni i anjoni. Oni se prema sposobnosti isoljavanja svrstavaju i *lipotropne nizove* u kojima se sposobnost taloženja smanjuje sleva na desno.

katjoni:  $\text{Cs}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,

anjoni:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{J}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ .

Proteinski rastvori se pri određenim uslovima pretvaraju u *koloidne sisteme - gele* čija su svojstva uslovljena hemijskom strukturom proteina. Osušeni gel može da veže mnogo više vode i to vezivanje vode se naziva *bubrenjem gela* (ono je od posebnog značaja za prehrambenu industriju).

Proteini mogu biti ekstremno nerastvorljivi ili dobro rastvorljivi. Pri višim temperaturama (kuvanjem) proteini se denaturišu (narušava se njihova nativna trodimenzionalna struktura), pri čemu se povećava njihova nerastvorljivost u vodi. Zbog relativno velike molekulske mase proteini mogu graditi *sole i gele*.

Pomoću polarnih grupa proteini mogu vezati i do 30 g vode na 100 g proteina (vezana voda se na niskim temperaturama ne može smrznuti). Kada se vezuju sa drugim jedinjenjima grade kompleksne koji su od velikog značaja za celijске i međucelijске strukture. Može se reći da je individualnost svakog organizma uslovljena proteinima koji ga izgrađuju.

## 4.2. Strukture proteina

Molekul proteini u prostoru može biti organizovani u 4 strukture i to: *primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternarnu strukturu*.

**Primarna struktura (1<sup>0</sup>)** - proteina predstavlja redosled (sekvencu) aminokiselina i položaj disulfidnih mostova ( $-\text{S}-\text{S}-$  veza), a po novijem i udeo pojedinih aminokiselina u polipeptidnom lancu. Naziva se još i sekvencom. Peptid  $\text{H}_2\text{N-Leu-Gly-Thr-Val-Arg-Asp-His-COOH}$  se razlikuje u primarnoj strukturi od peptida  $\text{H}_2\text{N-Val-His-Asp-Leu-Gly-Arg-Thr-COOH}$ , čak i ako oba imaju isti broj i iste vrste aminokiselina, ali se razlikuju u njihovom redosledu. Primarna struktura je stabilizovana peptidnim vezama. Primarna struktura je genetski predodređena i ona se prenosi sa generacije na generaciju i započinje aminokiselinom sa N-terminalnom amino-grupom, a završava se aminokiselinom sa C-terminalnom karboksilnom grupom. Najmanja izmena u primarnoj strukturi može imati značajan efekat na svojstva proteina. Genetskim studijama je utvrđeno da biljke sintetizuju veliki broj ( $10^5$ - $10^6$ ) strukturno različitih proteina. Utvrđeno je da povezivanjem 20

aminokiselina (bez ponavljanja) mogu se dobiti  $2,4 \times 10^{18}$  različitih polipeptidnih molekula. Ako se aminokiseline u nizu ponavljaju, broj mogućih polipeptida je skoro beskonačan. Proteini koji imaju slične sekvene nazivaju se *homologi* proteini. Oni imaju često i sličnu funkciju. Homologija proteina se može objasniti činjenicom da su se oni u toku evolucije sintetizovali iz istog prekursora. Do danas je odredjena primarna struktura kod nekoliko stotina proteina (~700). Prvi *polipeptid* kod koga je određena primarna struktura bio je *insulin* (Sanger, 1953), a prvi *protein, ribonukleaza* iz pankreasa (Hirs, Stein i Moor, 1959). Ribonukleaza iz pankreasa sadrži 124 aminokiselinska ostatka. Primarna struktura proteinskog dela citochroma C pšenice data je na slici 4-2.

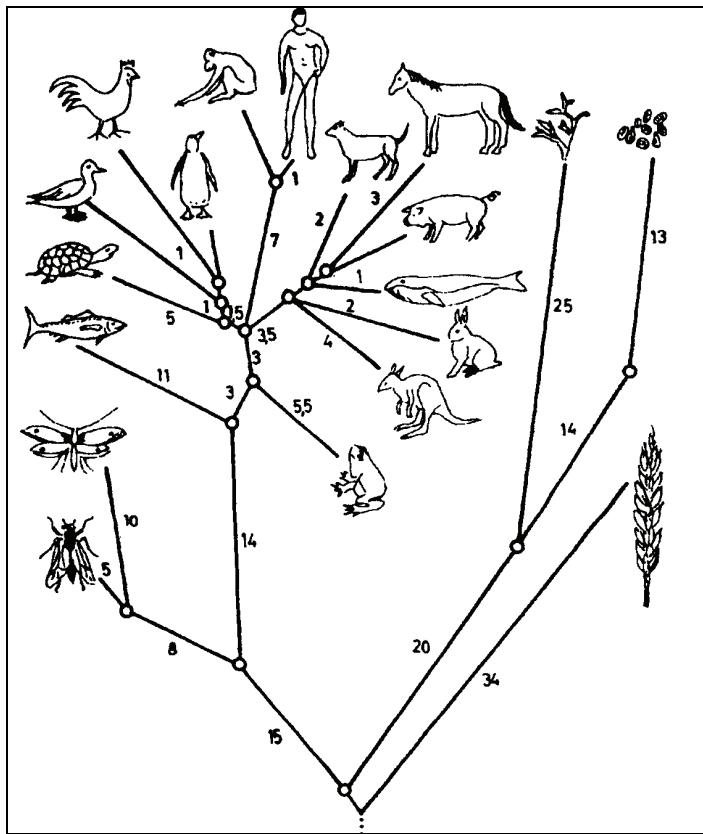
1	10
H <sub>2</sub> N-Ala-Ser-Phe-Ser-Glu-Ala-Pro-Pro-Gly-Asn-Pro-Asp-Ala-Gly-	
20	30
Ala-Lys-Ile-Phe-Lys-Thr-Lys-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Asp-Ala-	
40	
Gly-Ala-Gly-His-Lys-Gln-Gly-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-	
50	60
Arg-Gln-Ser-Gly-Thr-Thr-Ala-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Ala-Ala-Asn-Lys-	
70	
Asn-Lys-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Glu-Asn-Thr-Leu-Tyr-Asp-Tyr-Leu-	
80	90
Leu-Asn-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-Val-Phe-Pro-Gly-	
100	
Leu-Lys-Lys-Pro-Gln-Asp-Arg-Ala-Asp-Leu-Ile-Ala-Tyr-Leu-Lys-	
110	
Lys-Ala-Thr-Ser-Ser-COOH	

Slika 4-2. Primarna struktura proteinskog dela citochroma c iz pšenice.

Pored pšenice primarna struktura citochroma je odredjena iz 40 organizama što je omogućilo da se načini (kompjuterom) hipotetično filogenetsko stablo, u kojem su dužine linija između vrsti proporcionalne dužini evolucije (slika 4-3).

Navedeno filogenetsko stablo citochroma c se u potpunosti slaže sa biološkim filogenetskim stablom, jer se razlike u morfološkoj strukturi pojavljuju kao posledica izmene u primarnoj strukturi. Izmene u primarnoj strukturi se vrše veoma sporo. Da bi do izmena došlo na 1 mestu u primarnoj strukturi proteina potrebno je da prodje 280 miliona godina.

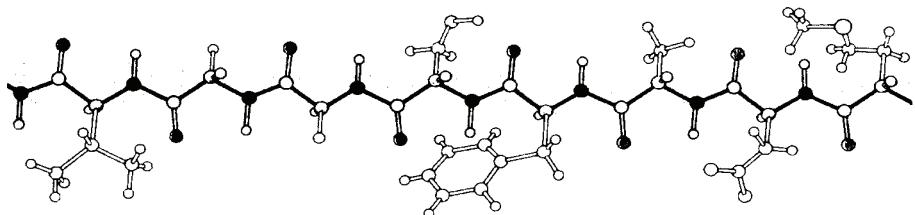
U primarnoj strukturi proteina sadržano je obilje informacija na osnovu kojih su formirani moderni koncepti u biohemiji. Određivanje primarne strukture proteina je prevashodan zadatak biohemičara.



Slika 4-3. Hipotetično filogenetsko stablo citochroma c po L.Harperu i P.Weissu, iz Physiologisce Cheime 1979, Springer Verlage, Berlin.

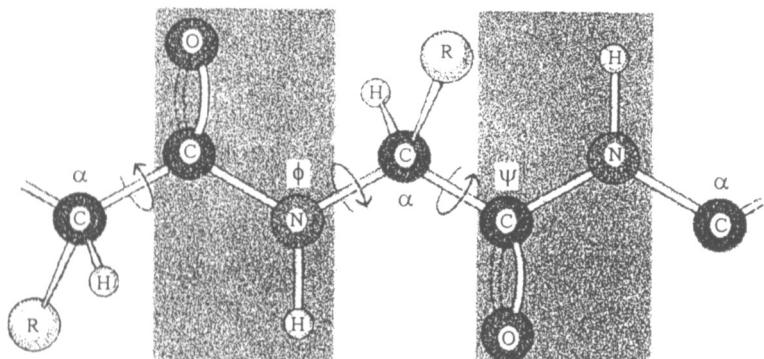
Dva aspekta prostorne (trodimenzionalne) strukture prostog polipeptidnog lanca nazvane *sekundarna* i *tercijarna* struktura mogu biti razmatrane odvojeno. Ovi nivoi struktura, pa samim tim i biološke aktivnosti, direktna su posledica primarne strukture.

**Sekundarna struktura ( $2^0$ )** - predstavlja dobro definisane i lako prepoznatljive lokalno uredjene strukture (konformacije) polipeptidne kičme pri čemu se priroda bočnih ostataka i njihova konformacija ne uzimaju u obzir. Drugim rečima ona predstavlja način nabiranja polipeptidnog lanca u prostoru, kao i uvrtanje amidnih ravni oko veze koja spaja  $\alpha$ -C atome proteinskih lanaca. Polipeptidna kičma predstavlja povezanu sekvencu rigidnih planarnih peptidnih grupa (slika 4-4), tako da svaki aminokiselinski ostatak u polipeptidnom nizu ima dva stepena slobode, tj. moguće su rotacije oko dve veze:  $C_{\alpha}$ -C' ( $\psi$ ) i  $C_{\alpha}$ -N ( $\phi$ ) (slika 4-4). Ovi uglovi se nazivaju i rotacioni ili torzioni uglovi.



Slika 4-4. Polipeptidni niz u svojoj maksimalnoj istegnutoj konformaciji.

Uglovi  $\phi$  i  $\psi$  se definišu kao  $180^0$  kada je peptidni niz u planarnoj, *trans* konformaciji, povećava se kada se vrši rotacija oko  $C_\alpha$ -C, odnosno  $C_\alpha$ -N veze u smjeru kretanja kazaljke na satu, gledajući sa  $C_\alpha$  atoma u pravcu  $C_\alpha$ -C ili  $C_\alpha$ -N (slika 4-5). Po ranijoj konvenciji ova potpuno istegnuta konformacija bi se definisala sa  $\phi = \psi = 0^0$ . Oduzimanjem  $180^0$  od ovih vrednosti dobijaju se uglovi definisani po sadašnjoj konvenciji.

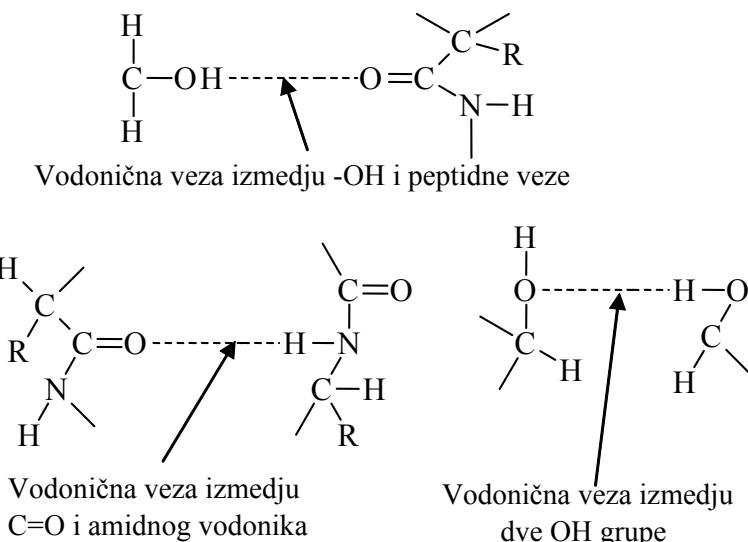


Slika 4-5. Segment polipeptidnog niza sa obeleženim torzionim (rotacionim) uglovima oko veza  $C_\alpha$ -N ( $\phi$ ) i  $C_\alpha$ -C ( $\psi$ ).

Konformacija polipeptidne kičme u potpunosti se definiše navodjenjem svih  $\phi$  i  $\psi$  uglova za svaki aminokiselinski ostatak u nizu.

Način nabiranja polipeptidnog lanca je uslovljen sekvencom aminokiselinskih ostataka kao i "silama" koje povezuju različite odsečke polipeptidnog lanca (vodonične, jonske, hidrofobne veze i Van der Waalsove sile).

*Vodonična veza* - je nekovalentna veza koja se gradi izmedju elektronegativnih atoma (obično kiseonika i azota) i vodonika vezanog za drugi elektronegativan atom istog ili različitog molekula. U proteinima vodonične veze se grade izmedju C=O jedne peptidne veze i amidnog vodonika -NH grupe druge peptidne veze ako se približe na udaljenosti 0.28 nm. U sekundarnoj strukturi proteina vodonične veze se grade na način prikazan slikom 4-6.



Slika 4.6. Vodonične veze u sekundarnoj strukturi proteina.

Vodonične veze se označavaju tačkastom crtom i poseduju osobinu da molekule ili grupe fiksiraju u specifičan geometrijski položaj. Energija vodonične veze iznosi 1/10 energije kovalentne veze.

*Jonska veza* - se gradi izmedju elektronegativnih i elektropozitivnih grupa, koje se medjusobno privlače.

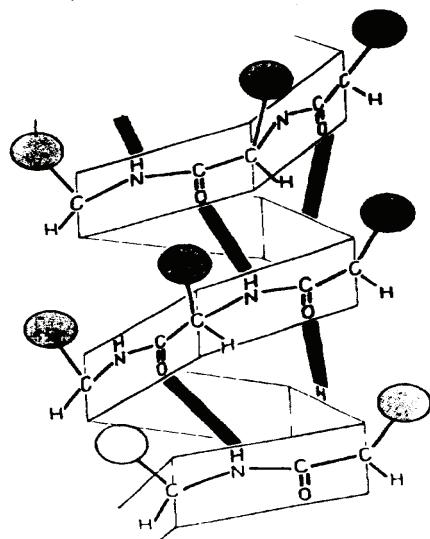
*Disulfidna veza* - je vrsta kovalentne veze koja se uspostavlja izmedju dehidrogenovane tiolne -SH grupe dva cisteinska ostatka (-S-S-).

*Hidrofobne nepolarne veze* - su najslabije kovalentne veze koje se grade izmedju nenaelektrisanih grupa kao npr. -CH<sub>3</sub> i -CH<sub>2</sub>OH.

*Van der Waalove sile* - deluju na malom razmaku izmedju pozitivno nenaelektrisanog jezgra jednog atoma i negativnog elektrona drugog atoma odn. nepolarnih grupa kao što su metilna, ugljovodonični radikali, benzolovo jezgro i dr.

Proteini se sintetizuju sekvencijskom adicijom aktiviranih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac i umotavaju u strukturu nativnog proteina. Način umotavanja uslovljen je primarnom strukturom koja omogućuje stvaranje određenih hemijskih veza. Umotavanje polipeptidnog lanca se realizuje u tri tipa sekundarnih struktura i to: *α-heliks*(*α-uzvojnica*), *β-plisirana struktura* (*nabrana β-konformacija*) i *β-obrt*. Delovi proteina koji se ne umotavaju ni u jedan oblik sekundarne strukture nazvani su "random coil" ili struktura slučajnog namotavanja klupčeta odn. *neuređena struktura*. Najrasprostranjeniji oblik sekundarne strukture je *α-uzvojnica* koja je energijom najsiromašnija i najstabilnija konformacija proteina.

$\alpha$ -Heliks - je najpoznatiji oblik sekundarne strukture proteina koju je identifikovao Linus Pauling 1951 g. i ona uključuje strukturu u prostoru samo jednog polipeptidnog lanca. "Kičma" lanca je aranžirana u heliks sa 3,6 aminokiselinskih ostataka u svakom obrtu. U  $\alpha$ -heliksu svaka peptidna NH-grupa je povezana vodoničnom vezom za peptidnu karbonilnu grupu. Vodonične veze se stvaraju između pojedinih navoja što daje ovoj strukturi posebnu stabilnost (slike 4-7 i 4-8).

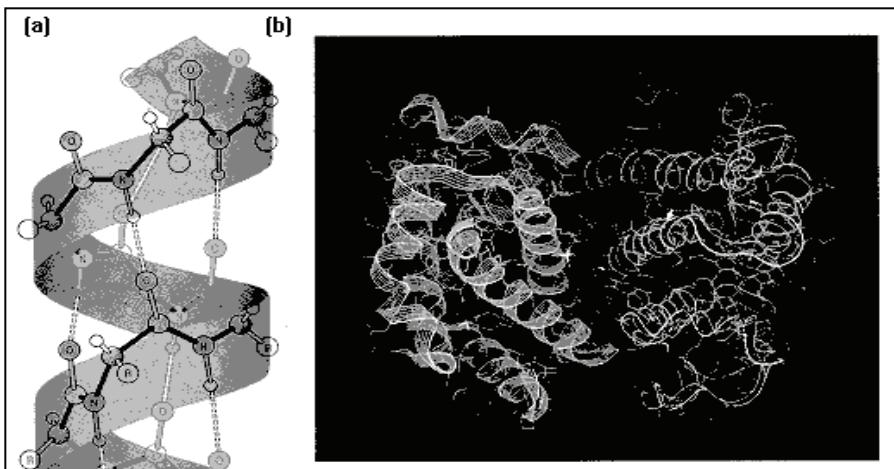


Slika 4-7. Model  $\alpha$ -uzvojnice

- vodonični mostovi,
- - ostaci R.

Ostaci R u datom modelu, koji možemo konstruisati kao *levu* i *desnu spiralu* su pretežno orijentisani ka spoljnoj strani, i mogu međusobno reagovati kao i sa rastvorom u kojem se nalaze. U uzvojnici svaki aminokiselinski ostatak doprinosi usponu navoja za 0.15 nm u smeru osovine valjka. Svaki navoj je izgradjen iz 3.6

aminokiselinskih ostataka te se po jednom navoju dobija period identičnosti od 0.54 nm. Heliks je asimetričan (hiralan) i može da bude desni i levi. Desni heliks se navija u pravcu prstiju desne ruke kada se palac upravi u pravcu ose heliksa u smeru njegovog rasta. Polipeptidni niz zauzima konformaciju  $\alpha$ -heliksa jer se  $\phi$  i  $\psi$  uglovi koji karakterišu  $\alpha$ -heliks nalaze u okviru sterno dozvoljene oblasti. Medutim, ta konformacija ne bi bila trajna (postojana) da nije dodatno stabilizovana. Stabilnost  $\alpha$ -heliksa potiče od više faktora, a pre svih  $\alpha$ -heliks je stabilizovan intramolekulskim vodoničnim vezama koje se uspostavljuju između N-H i C=O grupe peptidnih veza iz polipeptidne kičme. Za razumevanje stabilnosti heliksa relevantna su i razmatranja konformacione stabilnosti proteina.



Slika 4-8. Loptasto-štapićast model desne  $\alpha$  - heliks spirale:  
**(a)** u kojoj su vodonične veze između N-H grupe iz n-tog aminokiselinskog ostatka i C=O iz n+4-tog aminokiselinskog ostatka obeležene isprekidanim linijama i  
**(b)** model strukture proteina sa naznačenim heliksnim regionima.

Prosečna dužina  $\alpha$ -heliksa u globularnim proteinima iznosi 17 Å (11 aminokiselinskih ostataka ili 3 zavoja). U pojedinim globularnim proteinima nadjeni su heliksi od 53 aminokiselinska ostatka. Neke aminokiseline teže da poremete strukturu  $\alpha$ -heliksa kao npr. prolin kija se ne može uklopiti u strukturu  $\alpha$ -heliksa.. Slično se ponašaju i aminokiseline sa nanelektrisanim i voluminoznim grupama. Biljni proteini najvećim delom imaju strukturu u prostoru koja zauzima oblik  $\alpha$ -heliksa.

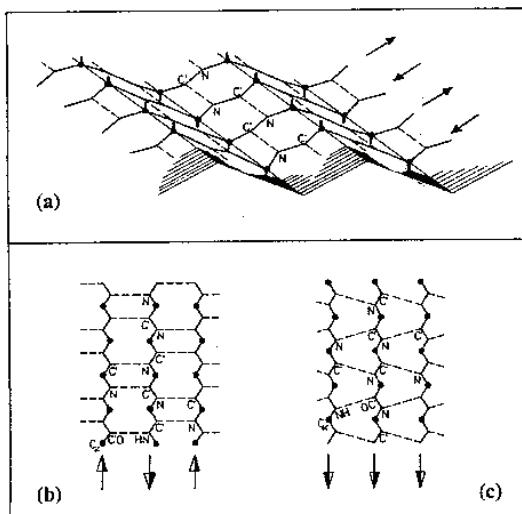
Istraživanja L.Paulinga su takođe pokazala da proteini pored  $\alpha$ -heliksa mogu imati i  $\beta$ -strukturu koja je dobila čitav niz imena kao npr. struktura presavijenih površina, nabrana, plisirana struktura itd.

$\beta$ -plisirana struktura ( $\beta$ -nabrana struktura,  $\beta$ -niz,  $\beta$ -pločica) – obuhvata paralelne nizove nekoliko polipeptidnih molekula međusobno povezanih intermolekulskim vodoničnim vezama (N–H...O=C) iz peptidnih veza u polipeptidnim lancima. Polipeptidni nizovi su u ravni dok su bočni nizovi orijentisani iznad ili ispod te ravni. Konformacija polipeptidnog niza u  $\beta$ -pločici nešto se razlikuje (slika 4-9) od konformacije  $\alpha$ -heliksa što daje polipeptidnom nizu nabranu strukturu.  $\beta$ -nabrana struktura može biti:

- ◆ *antiparalelna* - u kojoj su susedni, vodonično vezani, polipeptidni nizovi suprostavljenih smerova i
- ◆ *paralelna* - u kojoj su susedni, vodonično vezani, polipeptidni nizovi istog smera (slika 4-9).

Mešovite paralelne i antiparalelne pločice takođe su moguće, mada u tom slučaju mora da dodje do devijacije  $\phi$  i  $\psi$  torzionih uglova. Posledica  $\beta$ -strukture su razlike u orijentaciji aminokiselinskih ostataka R. U  $\beta$ -keratinu lanci leže paralelno na razmaku od 0.71 nm, za razliku od *fibroina* svile koji ima antiparalelnu  $\beta$ -strukturu sa međusobno uplenim polipeptidnim lancima, koji se paralelno pružaju i međusobno povezuju *intermolekulskim* vodoničnim vezama.

Nabrana  $\beta$ -konformacija se često javlja u proteinima. U globularnim proteinima one se sastoje od 2 do 15 segmenata polipeptidnih nizova. Jedan segment polipeptidnog niza u  $\beta$ -pločici sadrži 15 aminokiselinskih ostataka (prosečno 6 ostataka, što odgovara dužini od 21 Å ili 0.21 nm). U globularnim proteinima podjednako se javljaju paralelna i antiparalelna  $\beta$ -struktura. Mešovite  $\beta$ -pločice se redje javljaju. Paralelne  $\beta$ -strukture sa manje od 5 nizova retko se nalaze u proteinima. Ovo moguće ukazuje da su paralelne  $\beta$ -strukture manje stabilne od antiparalelnih, što se može objasniti razlikama u vodoničnom vezivanju (slika 4-9).

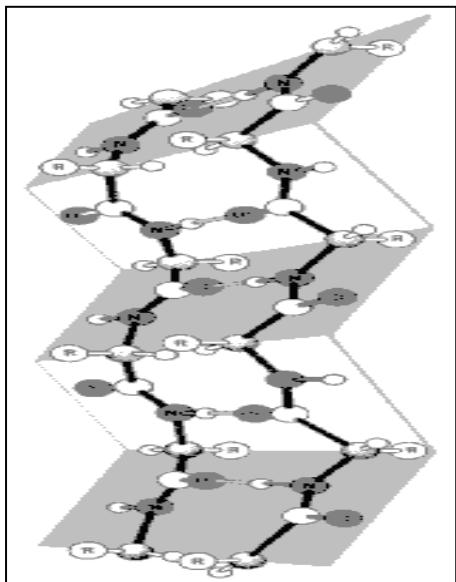


Slika 4-9.

$\beta$ -nabrana pločica. Vodonične veze su prikazane isprekidanom linijom, a smer peptidnog niza strelicom.  $C_\alpha$  atomi su obeleženi tačkama: (a) antiparalelna, planarna  $\beta$ -pločica  $C_\alpha-C_\beta$  veza prikazana je kratkom crtom na  $C_\alpha$  atomu; (b) vodonične veze u antiparalelnoj i (c) paralelnoj  $\beta$ -pločici sastavljenoj iz tri niza.

Planarne  $\beta$ -pločice retko se nalaze u proteinima. Takve strukture su nadjene npr. u glutation-reduktazi. Većina  $\beta$ -pločica nije planarna, nego je (kada se gleda duž ravni pločice u smeru peptidnog niza) izvijena udesno. Polipeptidni niz u izvijenoj  $\beta$ -pločici predstavlja vrlo istegnuti levi heliks sa dozvoljenom sternom performansom. Kao i  $\alpha$ -heliks tako i  $\beta$ -pločica je stabilizovana vodoničnim vezama koje se uspostavljaju između *imino* i *karbonilne peptidne grupe* jednog ili više polipeptidnih lanaca (slika 4-10).  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -pločica mogu biti levo i desno usmerene i određuju se metodama optičke rotacione disperzije i cirkularnog dihroizma. Na koji način će neki proteinski lanac započeti da se orijentiše u prostoru biće uslovljeno prisustvom aminokiselina (Glu, Met i Ala će graditi prvenstveno  $\alpha$ -heliks, a Val i Ile  $\beta$ -pločicu).

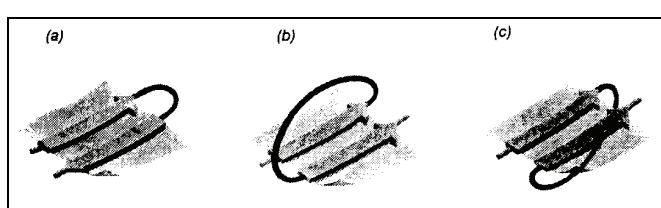
pločica nije planarna, nego je (kada se gleda duž ravni pločice u smeru peptidnog niza) izvijena udesno. Polipeptidni niz u izvijenoj  $\beta$ -pločici predstavlja vrlo istegnuti levi heliks sa dozvoljenom sternom performansom. Kao i  $\alpha$ -heliks tako i  $\beta$ -pločica je stabilizovana vodoničnim vezama koje se uspostavljaju između *imino* i *karbonilne peptidne grupe* jednog ili više polipeptidnih lanaca (slika 4-10).  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -pločica mogu biti levo i desno usmerene i određuju se metodama optičke rotacione disperzije i cirkularnog dihroizma. Na koji način će neki proteinski lanac započeti da se orijentiše u prostoru biće uslovljeno prisustvom aminokiselina (Glu, Met i Ala će graditi prvenstveno  $\alpha$ -heliks, a Val i Ile  $\beta$ -pločicu).



Slika 4-10.

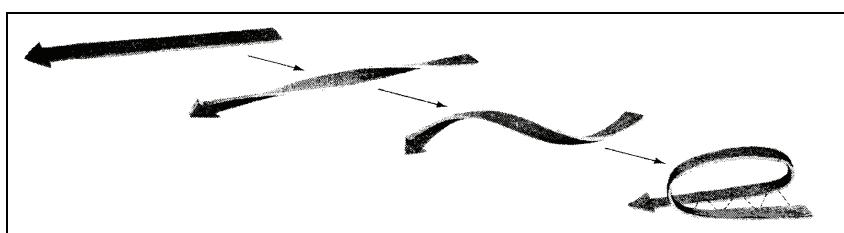
Trodimenzionalni oblik  $\beta$ -strukture.

Povezivanje peptidnih nizova u  $\beta$ -pločici može da bude veoma komplikovano: često su dva susedna niza povezana dugim intermedijernim nizom koji može da sadrži i heliks. Najjednostavnije povezivanje susednih antiparalelnih nizova je peptidnim zavojem koji je u istoj ravni sa pločicom i koji se naziva ukosnicom (slika 4-11). Uzastopni paralelni nizovi u  $\beta$ -pločici povezuju se peptidnom petljom koja mora da bude iznad ili ispod ravni pločice. Petlja može da bude desna i leva (slika 4-11). Antiparalelni nizovi u pločici skoro uvek su povezani desnom petljom (slika 4-11). Ovo se objašnjava lakin nastajanjem desne petlje iz izvijenog niza  $\beta$ -pločice (slika 4-12).



Slika 4-11.

Povezivanje susednih nizova u  $\beta$ -pločici: (a) povezivanje susednih antiparalelnih peptidnih nizova tipa ukosnice; (b) desna petlja medju paralelnim nizovima i (c) leva petlja medju paralelnim nizovima.



Slika 4-12. Shematski prikaz uvijanja polipeptidnog niza u desnu petlju (probajte ovo da napravite sa trakom od hartije).

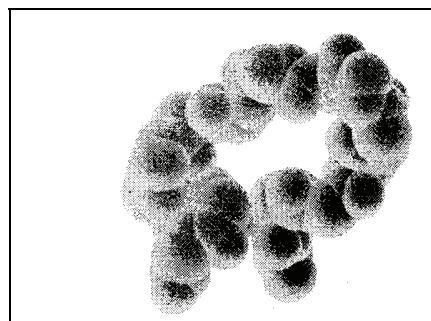
Pored  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -pločice u globularnom proteinu preostali deo strukture se nalazi u obliku  $\beta$ -obrta ( $\beta$ -zavijutka).

**$\beta$ -zavijutak** - oko polovine polipeptidnog niza u prosečnom globularnom proteinu uvijeno je u obliku  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -pločice, dok se preostali deo većinom nalazi u obliku  $\beta$ -zavijutka.

Polipeptidni niz može da napravi oštar zavoj u kojem učestvuju 4 uzastopna aminokiselinska ostatka. Ovaj zavoj, pošto često povezuje nizove u  $\beta$ -pločicama, naziva se i  $\beta$ -zavijutak, a javlja se kao tip I, tip II i tip III. U njemu se nalaze ostaci glicina, prolina, asparagina i serina. Ovaj tip prostorne strukture proteina se javlja u globularnim proteinima.

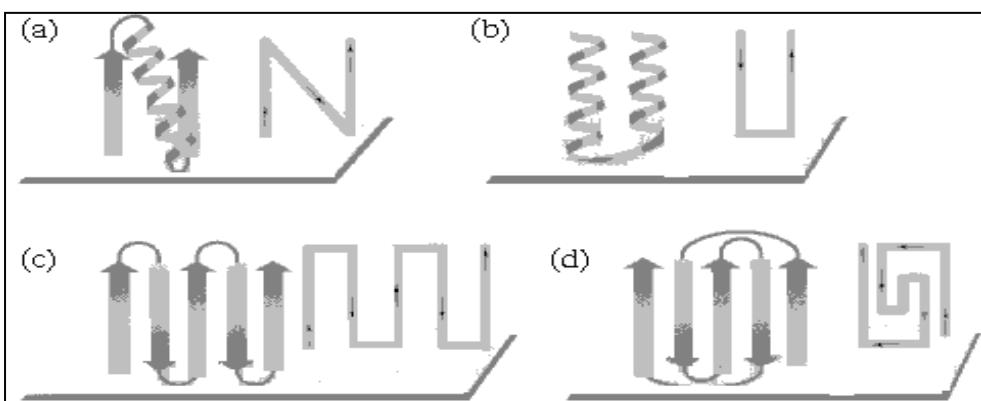
**Omega petlja** - Skoro svi globularni proteini koji sadrže više od 60 aminokiselinskih ostataka sadrže jednu ili više petlji koje se sastoje iz 6 do 16 aminokiselinskih ostataka u kojima se ne nalaze  $\beta$ -pločice i  $\alpha$ -heliksi i kod kojih je rastojanje medju krajevima polipeptidnog niza manje od 0.1 nm. Takva petlja koja

često sadrži i  $\beta$ -zavijutke, a koja se zbog svog oblika naziva i *omega petlja*, predstavlja kompaktnu strukturu u kojoj su bočni ostaci aminokiselina na takvom rastjanju da mogu medjusobno da interaguju (slika 4-13).



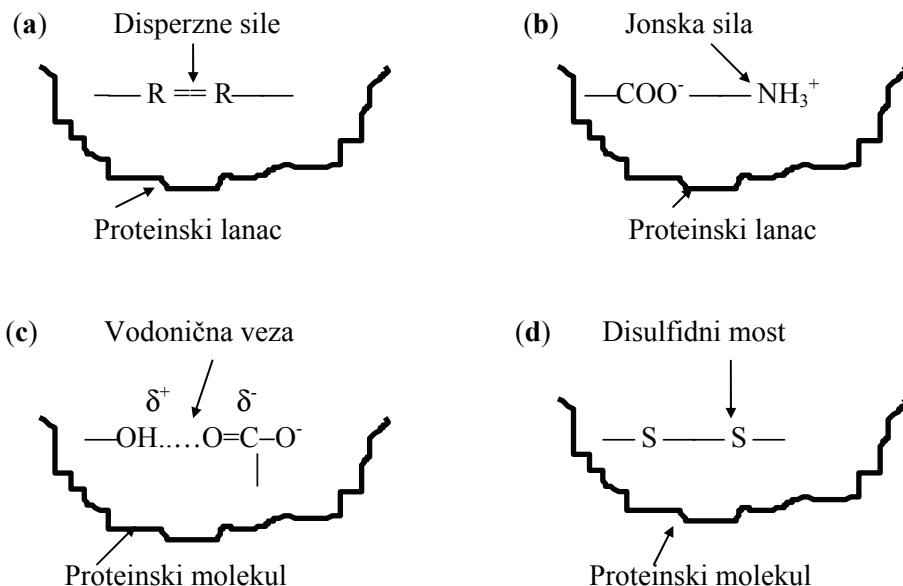
Slika 4-13.  
Model ispunjenih sfera omega petlje.

Kombinacijom  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -pločice mogu nastati različiti oblici **supersekundarne strukture** proteina (slika 4-14).



Slika 4-14.  
Shematski dijagrami supersekundarnih struktura proteina. Strelice pokazuju smer polipeptidnog lanca. (a)  $\beta\alpha\beta$  jedinica, (b)  $\alpha\alpha$  jedinica, (c)  $\beta$ -obrt i (d) grčki ključ.

**Tercijarna struktura ( $3^0$ )** - predstavlja viši oblik organizacije proteina u prostoru u kojoj se nabiraju segmenti heliksa, plisirane strukture i  $\beta$ -obrta peptidnog lanca u trodimenzionalnu strukturu nativnog proteina ili proteinske subjedinice stvarajući globule ili fibrile. Može se reći da tercijarna struktura predstavlja način organizacije (rasporeda) sekundarnih struktura i položaj bočnih ostataka aminokiselina u molekulu datog proteina. Kod proteina koji se sastoje iz samo jedne globule to je najviši oblik strukture. Tercijarna struktura proteina zahteva potpuno uređen trodimenzionalni raspored svih atoma u molekulu proteina. Ova struktura stabilizovana je pored vodonične i drugim energetski još povoljnijim hemijskim vezama između R ostataka aminokiselina u polipeptidnom lancu kao što su jonske, kovalentne, hidrofobne, disulfidne veze i disperzne sile uslovljene *intramolekulskim* interakcijama funkcionalnih grupa iz bočnih nizova. Primeri napred navedenih veza dati su na slici 4-15.



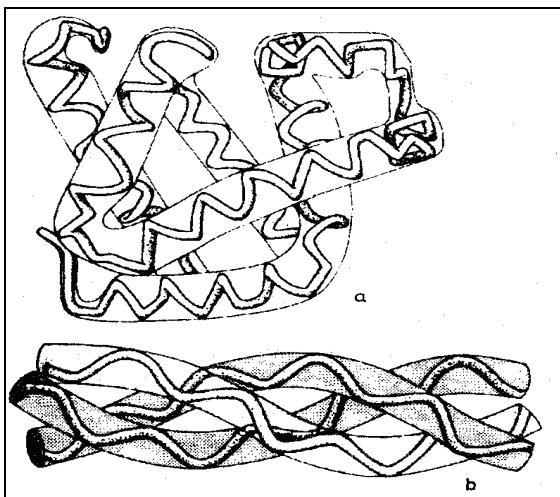
Slika 4-15. Intramolekulske veze u tercijarnoj strukturi proteina: **a** - disperzne sile, **b** - jonska veza, **c** - vodonična veza, **d** - disulfidni most.

Način stvaranja tercijarne strukture. I danas se smatra da nabiranje peptidnog lanca počinje već u toku njegove biosenteze na ribozomima. Način nabiranja određen je sekvencom. Određene aminokiseline (Glu, Ala, Leu, Met) posebno su sklone da grade  $\alpha$ -heliks. Ako se u redosledu nalaze 4 takve aminokiseline ili ih je pet, tada se one raspoređuju u  $\alpha$ -heliku, koja dalje raste dok se u sekvenci ne pojavi aminokiselina sa malom sklonostu stvaranja  $\alpha$ -heliksa (Gly, Pro, Asn, Tyr, Lys, Val i dr.) koja prekida heliks. Slično se ponašaju aminokiseline

Tyr, Val, Ile sklone stvaranju  $\beta$ -nabране strukture, suprotno Ser, Gly, Lys, Glu, Pro i Asp koje su naznačene kao aminokiseline koje prekidaju nabranu strukturu. Kako je sekvenca genetski determinisana to je i prostorna struktura genetski definisana.

Tercijarna struktura je termodinamički pogodnija od sekundarne, jer hidrofobni ostaci R na kraju peptidnog lanca imaju znatno manje izraženu tendenciju za narušavanje strukture vode.

Proteini se klasifikuju na osnovu tercijarne strukture u *globularne* koji mogu biti loptasti ili elipsoidni i *fibrilarne* koji mogu biti jednostruki, dvostruki ili višestruki (slika 4-16).



Slika 4-16.

Tercijarna struktura proteina:  
(a) *globularna*, (b) *fibrilarna*.

Globularni - su oni proteini kod kojih su odnosi njihovih osa (dužina : širina) manji od 10:1. Sastoje se iz peptidnih lanaca koji su izuvijani i namotani na kompaktan način. Međusobni odnos njihovih osa nije veći od 3:1 ili 4:1. Kod biljaka globularni proteini su pre svega biološki aktivni proteini.

Fibrilarni (fibrilni) proteini - su strukturni proteini kod kojih su odnosi osa veći od 10. Nastaju preplitanjem nekoliko polipeptidnih lanaca. Fibrilarni proteini su jako izduženi (sl. 4-16b) i pretežno se javljaju u obliku sekundarne strukture. Oni grade vlakna, od kojih su neka ugrađena u matrice od organskog ili neorganskog materijala, što dodatno doprinosi čvrstoći bioloških struktura u kojima se ovi molekuli nalaze. Fibrilni proteini, imaju strukturnu i zaštitnu ulogu, a predstavljaju ključne komponente u biološkim strukturama.

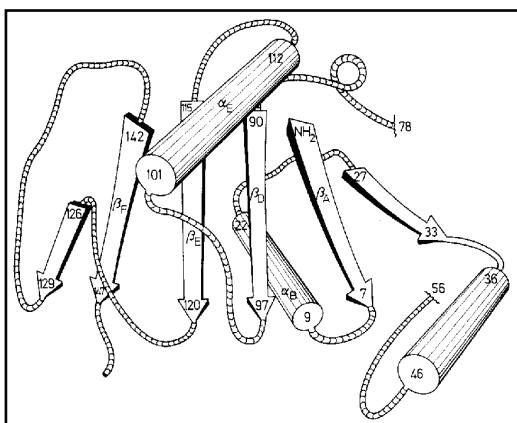
Fibrilarni proteini su nerastvorni, i ne mogu se dobiti u kristalnom stanju, što znatno otežava njihovo izolovanje i ispitivanje. Međutim na osnovu difrakcije X-zraka vlakna fibrilnih proteina mogu da se dobiju osnovni podaci o strukturi ovih molekula. Zbog svoje relativno jednostavne strukture ovi proteini su pogodni za izučavanje odnosa između strukture, svojstava i funkcije proteina.

Navedeni oblici strukture proteina nastaju umotavanjem  $\alpha$ -uzvojnica sekundarne strukture. Novija istraživanja su pokazala da se u većini globularnih proteina globula ne sastoji samo iz  $\alpha$ -heliksa već sadrži i domene  $\beta$ -strukture (paralelne i antiparalelne) koji se naizmenično smenjuju. Ovi domeni su od posebnog značaja za specifičnost delovanja aktivnog centra biološki aktivnih

proteina (enzima). Prema vrsti domena koje sadrže proteini tercijarne strukture se mogu klasifikovati u 4 grupe:

- ◆ proteine u kojima preovladava struktura  $\alpha$ -uzvojnica,
- ◆ proteine u kojima preovladava  $\beta$ -nabrana struktura,
- ◆ proteine u kojima se  $\alpha$ -uzvojnica nalazi u jednom delu strukture, a u drugom  $\beta$ -nabrana struktura i
- ◆ proteine u kojima se naizmenično smenjuju  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -pločica.

Princip izmenjivosti  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -supersekundarne struktura je karakteristika mnogih do danas ispitanih *dehidrogenaza* (enzima) kod kojih se pravilno izmenjuju odseči  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -nabrane strukture. Na slici 4-17 prikazan je isečak tercijarne strukture *gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenaze* na kojoj se prepoznaće princip izmenjivosti  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -supersekundarne strukture.



Slika 4-17.

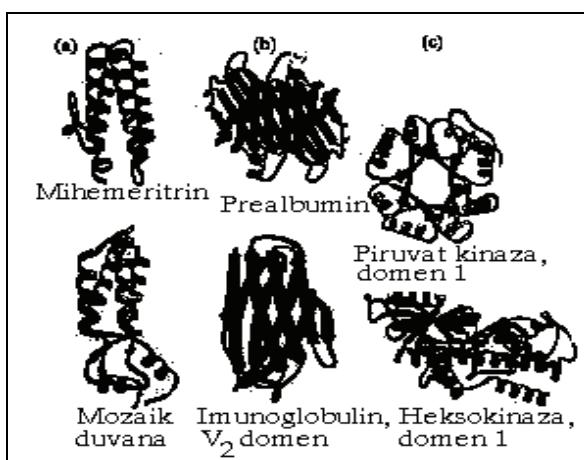
Tercijarna struktura gliceraldehyd 3-fosfat dehidrogenaze (pojednostavljen prikaz  $\alpha\beta\alpha\beta$  supersekundarne strukture enzima).

Kod mnogih dehidrogenaza nađena je slična tercijarna struktura što filogenetski posmatrano pokazuje da su ovi molekuli proizašli iz istog praoblika. Postoje, očigledno, homologne tercijarne strukture, isto

kao što postoje i homologne sekvene. Što su proteini više divergirali od zajedničkog pretka i razlike u njihovoj aminokiselinskoj sekvenci su veće. Ideničnost aminokiselinske sekvene od 25-30% smatra se visoko značajnom, tako da se proteini, kod kojih se utvrdi ovaj nivo identičnosti aminokiselinske sekvene, nedvosmisleno svrstavaju u homologe. Pošto se sličnost u funkciji smatra takodje indikacijom da su proteini divergirali od zajedničkog pretka, kao kriterijum za utvrđivanje homologije medju proteinima uzima se i (u najširem smislu) sličnost u njihovim funkcijama. Na osnovu poređenja kristalnih struktura i aminokiselinskih sekveni, utvrđeno je da se polipeptidni nizovi u domenima kod kojih je > 30% aminokiselinske sekvene identično, uvijaju na isti način, a oni kod kojih je < 25% aminokiselinske sekvene identično, uvijaju se (ali ne neophodno) na različit (nov) način.

Sve je više podataka, koji ukazuju, da se i polipeptidni nizovi kod kojih sličnosti u aminokiselinskim sekvencama nisu statistički značajne (< 25%), uvijaju na sličan način. Tako npr. citohromi koji imaju < 30% identične sekvene imaju

očigledno slične tercijarne strukture. Slična je situacija i sa drugim sličnim (homologim) proteinima. Postavlja se pitanje da li kod ne-homologih proteina mogu da se javе slične tercijarne strukture. Ovo bi ukazivalo da su neki načini uvijanja polipeptidnog niza (neke topologije) periferne u odnosu na druge. Analizom uvijanja ne-homologih polipeptidnih nizova (identičnost sekvene <25%, sličnost tercijarne strukture <80%, bez funkcionalne sličnosti) utvrđeno je da se 46% ne-homologih domena (koji se trenutno nalaze u proteinskoj bazi podataka) uvija na jedan od načina prikazanih na slici 4-14. Sličan način uvijanja polipeptidnih nizova koji se javlja kod tri ili više proteina koji nisu homologi naziva se *super uvijanje*. Različiti oblici tercijarnih struktura nekih globularnih proteina sa domenima  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -plisirane strukture dati su na slici 4-18.



Slika 4-18.

Tipovi struktura nekih globularnih proteina  
 (a) dominira  $\alpha$ -heliks;  
 (b) dominira  $\beta$ -plisirana struktura;  
 (c) mešana  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -nabran struktura.

Promena tercijarne strukture uslovjava promenu bioloških (na primer enzimsko ili hormonsko delovanje) i fizičkih osobina proteina. Ona

se menja pod uticajem genetskih mutacija pri kojima dolazi do konformacionih izmena i stvaranja manje aktivnih i neaktivnih proteina.

**Kvaternarna struktura** - je finalni oblik strukture proteina nastala interakcijom različitih polipeptidnih lanaca. Veliki proteini (npr. globularni proteini mase veće od 100 kD) skoro po pravilu se javljaju u obliku agregata koji se sastoje iz subjedinica asosovanih na geometrijski određen način. Naziv kvaternarna struktura za proteine koji se sastoje iz *nekovalentno* vezanih subjedinica, uveo je Bernal, 1958 godine, kao dopunu nešto ranije uvedenim terminima primarna, sekundarna i tercijarna. Mnogi rastvorljivi proteini, a i neki nerastvorljivi, su izgrađeni iz dva ili više (*dimer, trimer* ili *tetramer*) polipeptidnih lanaca ili subjedinica koje mogu biti iste ili različite. Ove subjedinice se mogu izolovati iz koncentrovanog rastvora soli ili pod blagim uslovima denaturacije. U tabeli 4-2 dat je pregled nekih proteina koji su izgrađeni iz dve i više subjedinica.

Tabela 4-2. Proteini sa dve i više subjedinica.

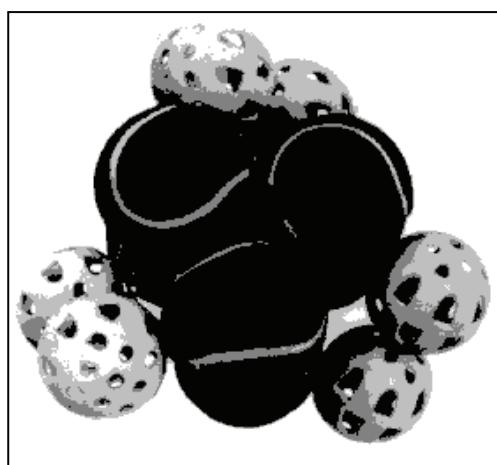
Vrsta proteina	Mr proteina	Broj subjedinica
Nitrat-reduktaza	197.000	2
Aldolaza	142.000	3
Heksokinaza	96.000	4
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	140.000	4
Ureaza	483.000	6
Glutamat-dehidrogenaza	2.000.000	8
Mozaik virus duvana	40.000.000	2130

Subjedinice nisu uvek identične. Kod ne-homologih proteina, enzimi i drugi biološki aktivni molekuli kombinovanjem subjedinica u kvaternarnu strukturu štite se od proteolitičkog ataka.

Subjedinice proteina mogu uticati jedna na drugu prilikom vezivanja manjih molekula. Ta pojava se naziva *kooperativnost*. Veza subjedinica može biti jača uz učešće manjih molekula (*pozitivna kooperativnost*) ili slabija (*negativna kooperativnost*).

Kvaternarna struktura proteina je stabilizovana Van der Waalsovim silama, vodoničnim, hidrofobnim i jonskim vezama uspostavljenim između različitih subjedinica (*intermolekulske interakcije*).

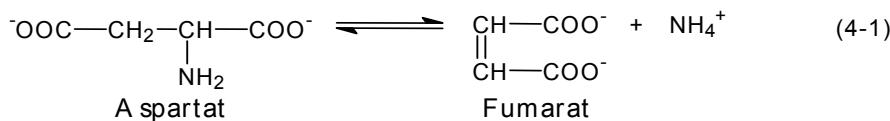
Uopšten oblik kvaternarne strukture proteina može se pri-kazati pomoću modela enzima *aspartat-amonijumliaze* (EC 4.3.1.1) u kojem je svaka podjedinica predstavljena posebnom loptom (slika 4-19).



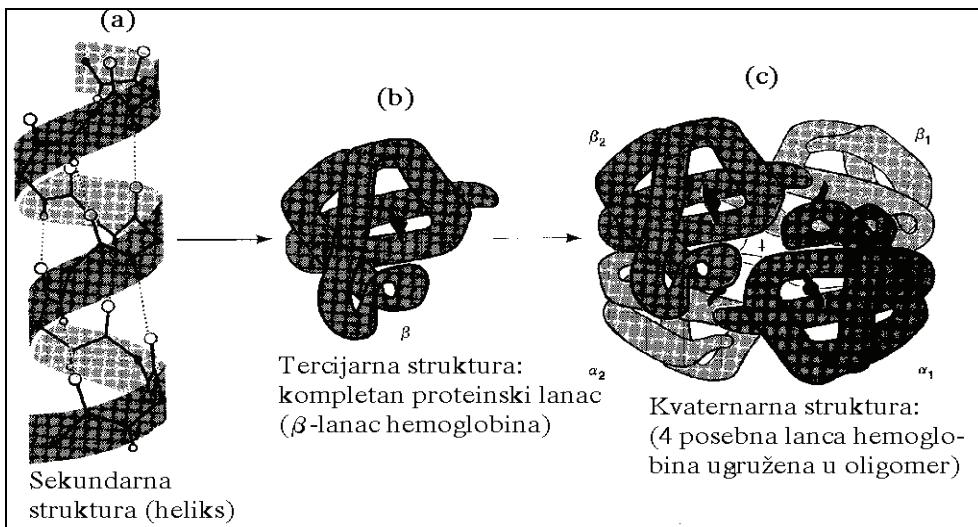
Slika 4-19.

Model kvaternarne strukture aspartat-amonijumliaze.

Dovoljno je da se samo jedna subjedinica izdvoji iz agregata kvaternarne strukture molekula proteina pa da enzim izgubi svoju biološku funkciju. Aspartat-amonijumliaza ili aspartaza (EC 4.3.1.1) katalizuje reversnu konverziju aspartata u fumarat (jednačina 4-1)



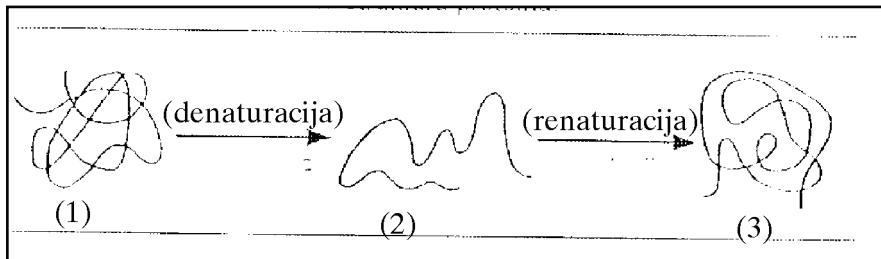
Strukture proteina u prostoru (sekundarna, tercijarna i kvaternarna) date su na slici 4-20.



S1.4-20. Strukture proteina: sekundarna (a), tercijarna (b) i kvaternarna (c).

Napred navedene strukture proteina se nazivaju *nativne* ili *visokoorganizovane* strukture. One su odgovorne za njihova biološka svojstva, a samim tim i funkcije u biljkama i dr. živim organizmima. Nativnu strukturu mogu menjati mnogi faktori. Protein kome je promenjena nativna struktura naziva se *denaturisanim* proteinom. U toku denaturacije *globularni* proteini se izdužuju u *fibrilarne* da bi potom dobili neuredjenu strukturu (koja se definiše još i kao stanje nereda) i nastaje kao posledica izmena u disperznim silama, vodoničnim i jonskim vezama itd. U prisustvu redukcionih agenasa raskidaju se i disulfidne veze (*reduktivna* denaturacija). Reduktivna denaturacija ribonukleaze u 8 M urei sa tioetanolom prikazana je na slici 4-21. U nekim slučajevima denaturacija može biti reversna pa dobija naziv *renaturacija*. Proces u kojem se ireversnom denaturacijom dobija čist proizvod naziva se *koagulacijom*. Denaturacija proteina je našla primenu u pripremi hrane odnosno povećanju svarljivosti i u medicini.

Denaturaciju proteina mogu izazvati različiti agensi kao npr. visoka temperatura, UV-zračenje, kiseline i baze, organski rastvarači, soli teških metala, X-zraci, detergenti, urea i dr.



Slika 4-21. Reduktivna denaturacija i renaturacija ribonukleaze: (1) nativni protein, (2) denaturisan i (3) renaturisan protein.

Denaturacijom proteina se gube njihova biološka svojstva, menja njihova rastvorljivost u vodi, rastvorima soli, alkoholu, zatim viskoznost rastvora, oblik i izgled molekula, hidrofilnost, povećava se osetljivost na delovanje proteolitičkih enzima i dr. Denaturacijom proteina se istovremeno vrši i njihova promena u hidrofilnosti. Starenje je jedna vrsta ireverzibilne denaturacije proteina. Procesi koji rezultiraju u ireverzibilnoj denaturaciji mogu biti konformacioni (agregiranje i nastajanje pogrešnih struktura) i kovalentni (hidroliza peptidnih veza, nastajanje S-S veza, deamidovanje itd.).

### 4.3. Klasifikacija proteina

Proteini biljaka su osnovna hrana ljudi i životinja jer su jedini izvor esencijalnih aminokiselina. U ishrani ljudi biljni proteini su zastupljeni sa 80%, proteini životinja sa 15%, a riba sa 5%. Do danas je iz biljaka izolovan veliki broj proteina, te se javlja potreba za njihovom klasifikacijom. Zbog nepoznavanja primarne strukture većine proteina, nije se mogla uvesti hemijska klasifikacija te je pokušano da se biljni proteini klasifikuju prema:

- ◆ *složenosti,*
- ◆ *subcelularnoj lokacij,*
- ◆ *funkciji,*
- ◆ *elektroforetskoj pokretljivosti i dr.*

Nijedna od navedenih klasifikacija nije kompletna i one se medjusobno mogu dopunjavati. Medutim u praksi se najčešće koristi klasifikacija proteina prema *složenosti* (u širem smislu), na osnovu koje se proteini mogu podeliti u dve grupe i to:

- ◆ proste (nekonjugovane) proteine i
- ◆ složene (konjugovane) proteine.

**Prosti (nekonjugovani) proteini** - daju hidrolizom samo aminokise-line i dele se na *globularne* i *fibrilarne* proteine. Još je Osborn 1924. godine globularne proteine biljaka klasifikovao na osnovu njihove rastvorljivosti i osobina koja je još i danas u upotrebi u četiri grupe (tabela 4-3).

Tabela 4-3. Prosti (globularni) proteini biljaka.

Naziv proteina	Rastvorljivost	Sastav	Nalaženje
<b>Albumini</b>	Rastvorni u destilovanoj vodi pri neutralnim ili slabo kiselim pH, zagrevanjem lako koagulišu.	Sadrže pretežno Glu, Lys, Leu (15%) i ne sadrže Gly.	U biljkama se nalaze u količini 0.6-2.0% i to manje u zelenim delovima, a više u zrnu kao <i>leukozin</i> u pšenici, raži, ječmu i <i>legumelin</i> u grašku.
<b>Globulini</b>	Nerastvorni u vodi, a rastvorni u razblaženim rastvorima soli, zagrevanjem teško koagulišu	Sadrže pretežno Leu(4%)Val, Lys, Ser, Glu, a ne sadrže Gly.	Veoma su rasprostranjeni u biljkama i to kao <i>legumin</i> u grašku, <i>fazeolin</i> u pasulju, <i>konglutin</i> u lupini, <i>glicinin</i> u soji i <i>edestin</i> u konoplji.
<b>Glutelini</b>	Nerastvorni u vodi, rastvorima soli i EtOH, a ras-tvorni u jakim ki-selinama i bazama	Ne sadrže Lys ali su bogati u Pro, Asp i Glu.	U biljkama se nalaze od 1-3% i to: <i>orizenin</i> u pirinču, <i>vicilin</i> u grašku, <i>glutenin</i> u pšenici i kukuruzu.
<b>Prolamini</b>	Rastvorni su u 90% etanolu, ali ne i u vodi..	Sadrže najviše Pro i Glu.	U zrnastim kulturama i to: <i>avein</i> u ovsu, <i>gliadin</i> u pšenici, <i>hordenin</i> u ječmu.

Zastupljenost navedenih globularnih proteina u semenu nekih biljnih vrsta prikazana je u tabeli 4-4.

Tabela 4-4. Udeo globularnih proteina (% u odnosu na ukupne proteine).

Biljna vrsta	Albumin (%)	Globulin (%)	Glutelin (%)	Prolamin (%)
<i>Avena sativa (Ovas)</i>	u tragu	80	5	15
<i>Zea mays (Kukuruz)</i>	14	0	31	48
<i>Oryza sativa (Pirinač)</i>	5	10	80	5
<i>Pisum sativum (Grašak)</i>	40	60	0	0
<i>Cucurbita pepo (Bundeva)</i>	u tragu	92	malo	u tragu

**Složeni (konjugovani) proteini ili proteidi** - sadrže pored proteinskog i neproteinski deo koji se naziva *prostetičnom grupom*. Ona je obično vezana za proteinski deo molekula kovalentnim, heteropolarnim ili koordinativnim hemijskim vezama. Prostetična grupa može biti neki ugljeni hidrat, lipid, nukleinska kiselina, metal, pigment, fosfatni ostatak i dr. Prema prirodi prostetične grupe složeni proteini (konjugovani proteini ili proteidi) se mogu podeliti u nekoliko grupa i to:

- ◆ *nukleoproteine,*
- ◆ *glikoproteine,*
- ◆ *lipoproteine*
- ◆ *metaloproteine i dr.*

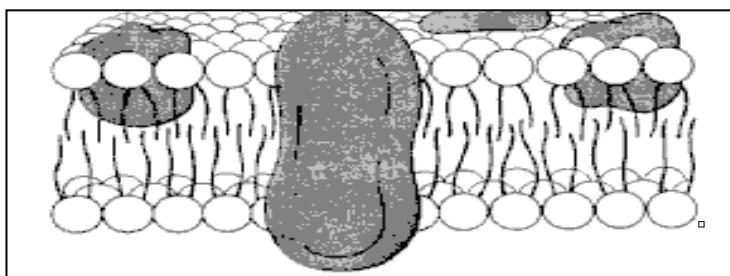
**Nukleoproteini** - su složeni proteini jedra, hromozoma, ribozoma i mitohondrija. Oni kao neproteinsku komponentu sadrže nukleinske kiseline. Sastoje se iz baznog proteina *histona* ili *prolamina* čije se relativne molekulske mase kreću od 10.000 do 20.000 pa i više. U biljkama histoni se javljaju u osnovna tri strukturalna oblika i to kao:

- histoni bogati Lys,
- histoni sa manjim sadržajem Lys i
- histoni bogati Arg.

Obično u svojoj strukturi histoni sadrže više stotina aminokiselinskih ostataka (najčešće od 100 - 250) i sa nukleinskim kiselinama grade jedinjenja tipa soli koja omotavaju spiralu DNA.

**Lipoproteini** - sadrže lipid kao neproteinsku komponentu koji je veoma čvrsto vezan za ostatak proteina tako da se ova dva dela molekula veoma teško razdvajaju elektroforezom, ultracentrifugovanjem i taloženjem solima teških metala. Lipidna komponenta je najčešće *lecitin*, *kefalin* ili *holsterol*. Odnosi proteinskog dela prema lipidnom variraju od 20:80 do 75:25. Lipoproteini se najvećim delom nalaze u ćelijskoj membrani, mitohondrijama i sl.

Lipoproteini su od posebnog značaja za strukturu i funkciju ćelijskih membrana. Postoji više modela kojima se predstavljaju ćelijske membrane. Na slici 4-22 dat je jedan od njih nazvan fluidno-mozaični model, koji je postavio Singer 1971.g.



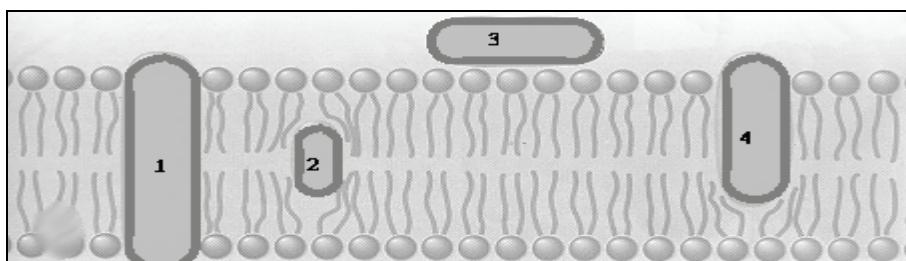
Slika 4-22. Fluidno-mozaični model membrane po Singeru.

**Glikoproteini** - sadrže ugljene hidrate od kojih najčešće oligosaharide kao prostetičnu grupu. Oni mogu biti sastojci célijskih membrana, enzimi (kao npr. peroksidaza), lektini (fitohemaglutin koji izaziva aglutinaciju eritrocita), hormoni, otrovni proteini (ricin iz semena ricinusa) komponente sluzi i dr. Mnogi glikoproteini transportuju supstance kroz membrane.

**Metaloproteini** - su konjugovani proteini sa metalima. U metaloproteinima metali su funkcionalni sastojci ovih molekula i obično nosioci njihovih katalitičkih i regulatornih funkcija. Značajniji metaloproteini koji sadrže gvožđe su citohromi, respiratorni pigmenti, enzimi (npr katalaza i dr) itd. Cink je prisutan u karboanhidrazama, a neki glikolitički enzimi i proteaze sadrže magnezijum. Bakar je prisutan u nekim oksidoreduktazama. U grupu metaloproteina se ubrajaju i Na-zavisne ATP-aze kao i enzimima sa Mo tzv. Moenzimi. Kako su ova jedinjenja često obojena kao npr. citohromi i dr. mogu se svrstati i u *hromoproteine*. Od navedenih najrasprostranjeniji su metaloproteini sa gvožđem. Pored napred navedenih klasifikacija proteini se mogu klasifikovati i po osnovu njihove *biološke funkcije* na više grupe koje obuhvataju:

- ◆ enzime,
- ◆ rezervne proteine (proteini semena),
- ◆ metaboličke proteine (proteini citoplazme),
- ◆ membranske proteine (periferni i integralni proteini) itd.

Kako su već neke od navedenih grupa proteina obrađene ranije u ovom poglavlju ili će biti u poglavljima koja slede (enzimi) to na ovom mestu navodimo samo neke karakteristike i biološke funkcije **membranskih proteina**. Proteini u biološkim membranama mogu biti udruženi sa lipidnim slojem na dva načina: kao **periferni proteini** - na površini membrane, ili kao **integralni proteini** (slika 4-23).



Slika 4-23. Neki tipovi proteina udruženi sa membranama.

Proteini na slici 4-23 označeni brojevima 1, 2 i 4 su integralni proteini, dok je protein 3 periferni protein. Kao što je i pokazano integralni proteini mogu biti udruženi sa lipidnim slojem membrane na više načina kao npr. poprečni-tunelski (protein 1), sasvim ležeći u membrani (protein 2) i projektovan u membrani (protein 4). Membranski proteini imaju različite funkcije u biološkim membranama

bilo kao pomagači u transportu supstanci u ili izvan ćelije tzv. transportni proteini ili pak u "hvatanju" specifičnih biološki aktivnih supstanci što je specifičnost receptorskih proteina.

U novije vreme se proteini klasificuju i prema *subcelularnoj* lokaciji. Njihov procentni udeo u nekim značajnim organelama je sledeći: 40-60% u hloroplastima, 35-40% u mitohondrijama i 1-2% u jedru.

Proteini se mogu klasifikovati i prema elektroforetskoj pokretljivosti. Elektroforeza je kretanje nanelektrisanih molekula proteina u rastvoru pod uticajem jakog električnog polja koje je uslovljeno nanelektrisanjem i molekulskom masom proteina.

Od biljnih proteina od posebnog su značaja proteini ratarskih kultura. Neki od njih mogu biti inhibitori proteolitičkih enzima sisara (kao npr. *trypsin inhibitor soje*, TIS) i tako smanjiti hranljivu vrednost biljnih proteina. Ovi inhibitori nisu još dovoljno proučeni ali rezultati koji postoje ukazuju da se o njima mora voditi računa pri korišćenju biljnih proteina u ishrani. Procentni udeo proteina u nekim ratarskim kulturama je različit i dat je u tabeli 4-5.

Tabela 4-5. Procentni udeo proteina u odnosu na suvu masu.

Kultura	Udeo proteina (%)
Kukuruz ( <i>Zea mays</i> )	10
Pšenica ( <i>Triticum vulgare</i> )	12
Ricinus ( <i>Ricinus communis</i> )	16-24
Suncokret ( <i>Helianthus annuus</i> )	15-30
Soja ( <i>Glycine max</i> )	30-40

Povrće sadrži relativno malo proteina te je uobičajeno da se oni obračunavaju u odnosu na sirovu masu. Krompir (*Solanum tuberosum*) sadrži 2%, kupus (*Brassica oleraceae*) 1.5%, mrkva (*Dactyl carota*) i krastavac (*Cucumis sativus*) 0.01%, a paprika (*Capsicum annum*) 1.2-1.6%.

Kvalitet proteina biljaka se ceni prema količini esencijalnih aminokiselina i njihovoј svarljivosti. Oni mogu biti "nepotpuna hrana" ukoliko su deficitarni u nekim aminokiselinama. Tako npr. proteini trava su deficitarni u svim aminokiselinama, zrna kukuruza u Lys, graška u Trp i Met, pasulja u Lys i sl. Proteini pšenice sadrže polovinu potrebnog Lys za čoveka, a proteini krompira i graška trećinu Met i Cys. Procentni udeo esencijalnih aminokiselina u proteinima suncokreta, lucerke i spanaća dat je u tabeli 4-6.

Tabela 4-6. Udeo esencijalnih aminokiselina u proteinima ratarskih kultura.

Aminokiselina (%)	Zein kukuruza	Gliadin pšenice	Suncokret	Lucerka	Spana
Valin	1.9	3.0	5.1	5.0	6.1
Leucin	2.9	6.0	6.4	6.3	9.5
Izoleucin	-	-	4.3	3.7	4.9
Fenilalanin	7.6	2.5	4.5	3.3	6.1
Metionin	2.4	2.3	1.5	1.0	2.1
Triptofan	1.8	1.4	1.4	-	-
Lizin	-	8.2	3.6	7.9	7.3

Kvalitet proteina pre svega zavisi od aminokiselinskog sastava i njihove zastupljenosti, što određuje njihovu "nutritivnu" i "energetsku" vrednost, kao i fiziološko-biohemiju funkciju u ćeliji. U tabeli 4-7 dat je aminokiselinski sastav dominantnih proteina nekih ratarskih kultura.

Tabela 4-7. Aminokiselinski sastav nekih proteina ratarskih kultura (%).

Amino-kiselina	Edestin iz konoplje	Zein iz kukuruza	Gliadin iz pšenice	Kukurbitin iz tikve
Gly	-	-	1.0	5.1
Ala	4.3	9.8	2.5	5.7
Val	5.7	1.9	3.0	5.6
Leu i Ile	4.7-7.5	25.0	6.0	13.3
Phe	5.5	7.6	2.5	8.3
Pro	4.3	9.0	13.2	5.4
Met	2.4	2.4	2.3	2.5
Cys	0.9	0.9	2.3	0.8
Ser	6.3	1.0	0.1	5.7
Thr	3.9	-	3.0	3.0
Tyr	4.3	5.9	3.1	3.7
Trp	1.5	0.2	0.9	-
Asp	12.0	1.9	1.4	6.8
Glu	20.7	31.3	46.0	24.2
Arg	16.7	1.6	3.2	15.2
Lys	2.4	-	0.6	4.0

Proteini biljaka biće i u budućnosti glavna hrana za čoveka i životinje i pored toga što se planiraju novi izvori proteina - sintetički proteini kao i proteini iz parafina nafte, planktona mora i dr. Osim za ishranu proteini su značajni za primenu kao antimetaboliti (toksični proteini) i kao zaštitna sredstva protiv.

## Izvod

♣ Proteini su najrasprostranjeniji, a pored nukleinskih kiselina i najvažniji makromolekuli biljaka. Po hemijskom sastavu su *polimeri aminokiselina*, specifični za odredjene biljne vrste. Proteini disosuju kao katjoni ili anjoni i mogu se smatrati polielektrolitima sa visoko izraženim *amfolitnim svojstima*.

♣ Kod svih živih sistema pa time i biljaka proteini imaju dve esencijalne i različite uloge: oni predstavljaju *strukturni materijal* i pokazuju karakterističnu *aktivnost* i *funkciju* pa su samim tim i nosioci osnovnih životnih funkcija u ćeliji. Svi životni procesi ćelije se odvijaju u strukturama proteina ili uz njihovo učešće. Oni su i katalizatori brojnih biohemijskih procesa u ćeliji.

♣ Može se reći da ne poznajemo život bez proteina. Njihove fizičko-hemijske osobine su zasnovane na koloidnom karakteru molekula proteina (*geli-soli*) koji je uslovljen njihovim izuzetno velikim molekulima. Proteini biljaka se razlikuju međusobno u broju i redosledu aminokiselinskih ostataka, polipeptidnih lanaca, molekulskoj masi itd.

♣ Proteini sa vodom grade koloidne rastvore. Stabilnost ovih koloida je različita i uslovljena je afinitetom prema vodi. Rastvori proteina u biljci imaju funkciju puferskih sistema velikog kapaciteta, a stabilnost u rastvoru je uslovljena njihovim afinitetom prema vodi odn. prisustvom hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu.

♣ *Nativna* ili *visokoorganizovana* struktura proteina pored primarne (redosled aminokiselina) podrazumeva i prostornu odn. trodimenzionalnu strukturu koja je definisana sekundarnom, tercijarnom i kvaternarnom strukturom proteina.

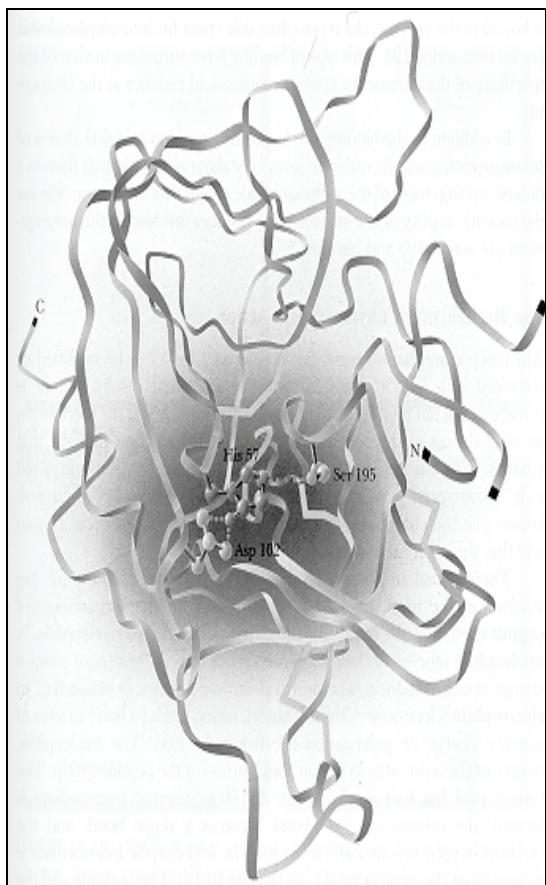
♣ Proteini biljaka se klasifikuju prema *složenosti strukture, funkciji, subcelularnoj lokaciji i elektroforetskoj pokretljivosti*.

♣ Kvalitet biljnih proteina je uslovljen prisustvom esencijalnih aminokiselina (Val, Leu, Ile, Phe, Met, Trp i Lys).

♣ Neki proteini biljaka mogu biti štetni za čoveka i životinje jer inhibitorno deluju na proteolitičke enzime organa za varenje, npr. tripsin-inhibitor soje (TIS). To je protein relativno male molekulske mase (Mr 21.100) izgradjen iz 181 aminokiselinskog ostatka poznate sekvene sa  $\alpha$ -heliksnom strukturom u prostoru.

♣ Zadatak stručnjaka biljne proizvodnje je stvaranje proteinskih sorti i hibrida (soja i dr.) bez proteolitičkih inhibitora, kako bi njihova hranjiva vrednost bila što veća.

## 5. Enzimi



Trodimenzionalna struktura enzima

- 5.1. Hemski sastav, strukture i funkcije enzima**
- 5.2. Energija aktivacije i specifičnost enzima**
- 5.3. Michaelis-Mentenov prilaz kinetici enzimskih reakcija**
  - 5.3.1.  $V_{max}$  i  $K_m$  i mogućnosti određivanja
  - 5.3.2. Značenje vrednosti  $K_m$  i  $V_{max}$
  - 5.3.3. Kinetička savršenost enzimske katalize:  $k_{cat}/K_m$  odnos
  - 5.3.4. Mehanizam enzimske katalize
- 5.4. Faktori koji utiču na aktivnost enzima**
- 5.5. Nomenklatura i klasifikacija enzima**
- 5.6. Izoenzimi i multienzimski kompleks**
- 5.7. Enzimi biljaka**
- 5.8. Regulacija aktivnosti enzimskih reakcija**
- 5.9. Značajne oznake u enzimologiji**

Razmena materija i svih životnih procesa odvija se biohemijskim reakcijama katalizovanim sa nekoliko hiljada proteinskih katalizatora - **enzima**. Enzimi su specifični prosti ili složeni globularni proteini (sa izuzetkom nekih skoro otkrivenih ribonukleaza-RNaza koje katalizuju sopstveno uplitanje) koji ubrzavaju, ili regulišu brzinu termodinamički mogućih reakcija, smanjivanjem energije aktivacije na relativno niskoj temperaturi i normalnom pritisku. U ćelijama se nalaze u količini od 90% u odnosu na ukupne proteine, ali je samo mali broj enzima aktivan u posmatranom trenutku.

## 5.1. Hemijski sastav, strukture i funkcije enzima

Proučavanje hemijskog sastava enzima započelo je izolovanjem prvog enzima ureaze (1926. godine) u kristalnom stanju, iako su procesi katalizovani enzimima bili poznati od davina. Smatra se da je do danas izolovano i hemijski determinisano oko 3.000 enzima čije realativne molekulske mase ( $M_r$ ) imaju vrednost od 12.000 do preko 1.200 000.

Prema hemijskom sastavu enzimi se mogu klasifikovati u 3 grupe i to:

- ◆ *proste proteinske enzime*,
- ◆ *metalo-proteinske enzime* i
- ◆ *složene proteinske enzime*.

Prosti proteinski enzimi - su izgradjeni isključivo iz proteina, odnosno polimerizovanih aminokiselina i imaju sve hemijske osobine čistih proteina. Oni se prema složenosti to jest broju polipeptidnih lanaca u molekulu mogu podeliti na *monomerne* i *oligomerne* enzime.

**Monomerni enzimi** - su enzimi izgradjeni isključivo od prostog polipeptidnog lanca i ne mogu disosovati u manje jedinice. Najčešće katalizuju hidrolitičke reakcije i obično su izgradjeni od 100-300 aminokiselinskih ostataka. Vrednosti  $M_r$  se kreću od 13.000 do 30.000. Monomerni enzimi su neke proteinaze i peptidaze.

**Oligomerni enzimi** - su izgradjeni iz dva ili više polipeptidnih lanaca koji su povezani nekovalentnim interakcijama (ali ne i peptidnim vezama), pa se nazivaju *dimernim*, *trimernim* ili *tetramernim enzimima* čije  $M_r$  imaju vrednosti iznad 35.000. Enzimi glikolaze su oligomerni i izgradjeni su od 2 ili 4 subjedinice.

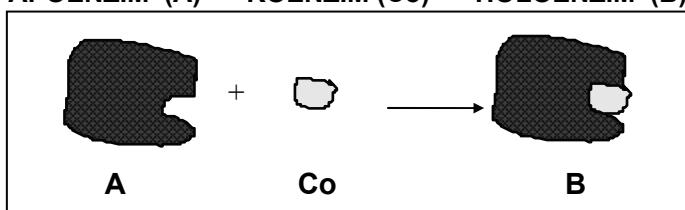
Metalo-proteinski enzimi - kao biokatalizatori pored proteina u svojoj strukturi imaju i *metalni jon* (kao kofaktor) koji olakšava enzimu da obavi katalitičku funkciju. Neki od enzima koji u svojoj strukturi sadrže metalni ion dati su u tabeli 5-1.

Tabela 5-1. Enzimi sa metalnim jonom kao kofaktorom.

Naziv enzima	Metalni joni (kofaktori)
Katalaza, peroksidaza	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Tirozinaza, citochrom-oksidaza	Cu <sup>2+</sup>
Arginaza, fosfotransferaza	Mn <sup>2+</sup>
Alkohol-dehidrogenaza	Zn <sup>2+</sup>
Fosfo-hidrolaza	Mg <sup>2+</sup>
Piruvat-kinaza	K <sup>+</sup>
Glutation-peroksidaza	Se <sup>2+</sup>

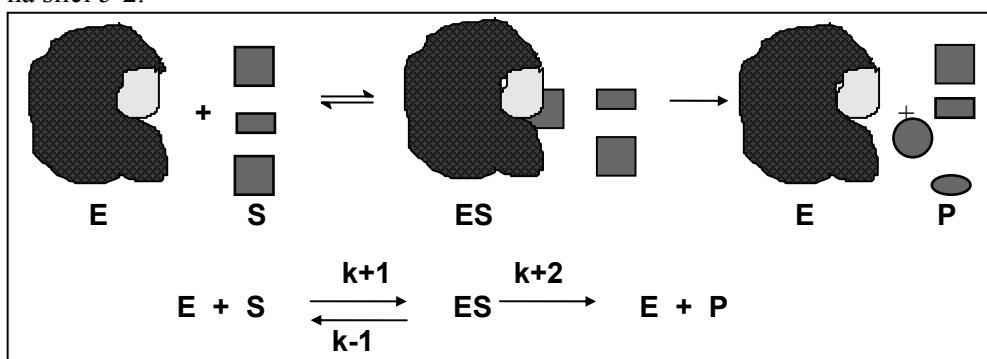
Složeni proteinski enzimi - pored proteinskog dela u svom sastavu imaju **koenzim** (Co) ili **prostetičnu grupu** (vidi poglavlje 6). Proteinski deo enzima se naziva **apoenzim**, a složeni enzim **holoenzim**. Tako npr. složeni proteinski enzim je *piruvat-dekarboksilaza* koja kao koenzim u svojoj strukturi sadrži vitamin B<sub>1</sub>.

Šematski prikaz prostih i složenih enzima dat je na slici 5-1. Prost enzim A se jedini sa koenzimom (Co) ili prostetičnom grupom u složeni dvokomponentni enzim ili holoenzim B.



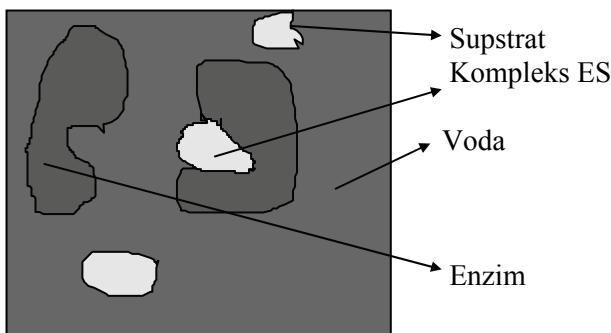
Slika 5-1. Prosti (A) i složeni (dvokomponentni) enzim (B).

Shematski prikaz opšte enzimske reakcije dvokomponentnog enzima dat je na slici 5-2.



Slika 5-2. Shematski - enzimska reakcija sa dvokomponentnim enzimom.

Na slikama 5-1 i 5-2 se vidi da molekul enzima nije aktivan celom svojom površinom već samo njenim manjim delom koji je sposoban da se spaja sa supstratom. Navedeni deo enzimske površine se naziva **aktivnim centrom**. On je kod prostih jednokomponentnih enzima zamršeno *trodimenzionalno udubljenje* (pukotina ili džep) definisane strukture koja nastaje nabiranjem aminokiselinskih ostataka proteinskog lanca. Zauzima samo oko 5% od celokupne površine enzima. Kod složenih dvokomponentnih enzima u aktivnom centru se nalazi koenzim ili metalni ion odn. *prostetična grupa*. Kako se enzimske reakcije odvijaju u vodenoj sredini u kojoj enzimi "plivaju" to je aktivan centar enzima ispunjen molekulima vode. U momentu kada se enzim vezuje sa supstratom, supstrat istiskuje vodu iz aktivnog centra enzima (i tako utiče da sredina oko njega bude manje polarna). Odnosi veličine molekula E, S i vode dati su na slici 5-3.



Slika 5-3.  
Enzim, supstrati i enzim-supstrat kompleks (ES) u vodenoj sredini.

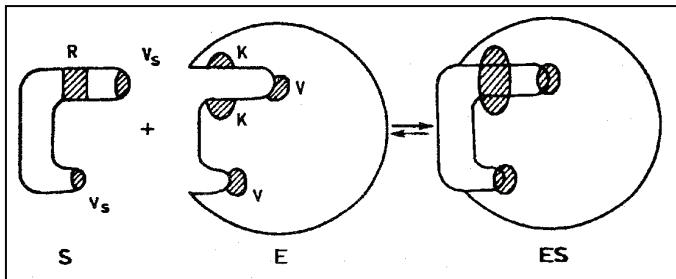
U aktivnom centru enzima postoje mesta za vezivanje supstrata i katalitičko mesto. Funkcionalne grupe aktivnog centra mogu učestovati u vezivanju supstrata ili sudelovati u enzimskoj reakciji kao katalitičke grupe.

Enzimi se vezuju za supstrat uspostavljanjem hemijskih veza između funkcionalnih grupa enzima, (koenzima ili prostetičnih grupa) sa funkcionalnim grupama supstrata. Reaktivne funkcionalne grupe mogu reagovati kao **elektrofilne** (siromašne elektronima) ili kao **nukleofilne** grupe (bogate elektronima), pri čemu jedna grupa reaguje sa drugom grupom. U enzimima metalni joni  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ , kao i  $NH_4^+$  grupa proteina deluju kao elektrofilne, a -OH grupa Ser, -HS grupa Cys, imidazolska grupa His i sl. kao nukleofilne grupe te omogućavaju uspostavljanje kovalentnih veza. Osim navedenog, enzim i supstrat se mogu spajati *jonskim, vodoničnim, koordinativnim vezama kao i Van der Waals-ovim silama*.

Spajanje enzima i supstrata se može prikazati pomoću nekoliko modela kao npr. :

- ◆ *model ključa i brave po E. Fisher-u,*
- ◆ *model indukovanih prilagođavanja po D. Koshland-u,*
- ◆ *model fluktacionog prilagođavanja.*

Model ključa i brave - po kojem je aktivno mesto enzima samo po sebi oblikom komplementarno obliku supstrata (slika 5-4). Supstrat se vezuje u dve tačke aktivnog centra enzima dovodeći reaktivne grupe u blizinu dva katalitička mesta. Ovaj model je postavljen u vreme kada strukture enzima nisu bile poznate (1890. g.).

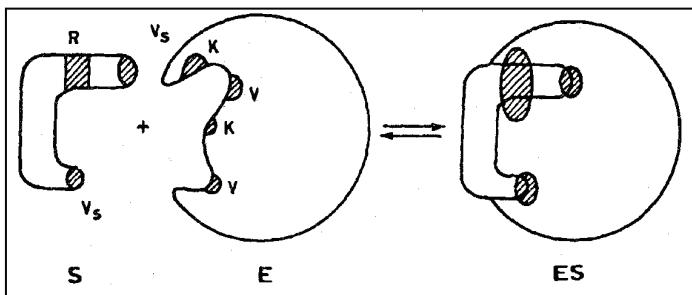


Slika 5-4.

Model ključa i brave po *Emili Fisheru*. V-mesto vezivanja na enzimu; K - katalitičko mesto; Vs - mesto za vezivanje na supstratu; R - reaktivna grupa.

Navedeni model je pogodan samo za tumačenje vezivanja dva ili više supstrata, kao i tumačenje kinetike enzimskih reakcija, ali nije pogodan za tumačenje fleksibilnosti enzima. Prema modelu ključa i brave u toku vezivanja E sa S ne dolazi do konformacionih promena, jer sve strukture ostaju fiksirane.

Model indukovanih prilagodavanja - je noviji model, kojeg je 1958. godine formulisao Koshland. On je analizom X-zracima, i drugim spektroskopskim metodama utvrdio da postoji razlika između slobodnog enzima i enzima vezanog za supstrat. Vezivanje supstrata za enzim može dovesti do konformacionih promena tj. izmena u trodimenzionalnoj, ali ne i u primarnoj strukturi enzima (slika 5-5).



Slika 5-5.

Model indukovanih prilagodavanja, aktivnog centra enzima obliku "supstrata" po *Danijelu Koshlandu*.

Aktivno mesto enzima "labavo visi" u prostoru prema krutom supstratu i tako omogućava da se enzim omota oko supstrata i približi katalitičkim reaktivnim grupama. Supstrat se u ovom slučaju može porebiti sa rukom, a aktivno mesto enzima sa gumenom rukavicom. Supstrat (ruka) ostaje fiksirana, a aktivan centar (rukavica) menja konformaciju da bi bio komplementaran vezujućem supstratu. Pomoću modela indukovanih prilagodjavanja može se ostvariti visok stepen specifičnosti enzima. Prema napred navedenom modelu reakcije katalizuju enzimi heksokinaze i karboksipeptidaze.

Model fluktacionog prilagođavanja - postavljen je zato što prethodna dva modela nisu mogla da objasne specifičnost enzima. U nekim slučajevima struktura aktivnog mesta je komplementarna, ali ne egzaktno u odnosu na supstrat. Ako je struktura aktivnog mesta kruta, supstrat se mora "iskriviti" (deformisati) da bi se vezao za enzim. Navedena deformacija biće rezultat razvlačenja i slabljenja veza koje se potom kidaju i omogućavaju enzimsku reakciju.

Pored napred navedenih modela u literaturi se pominju i neke alternativne konformacione promene indukovane supstratima i drugi modeli vezivanja enzima i supstrata. Veze između E i S su relativno slabe i kreću se u rasponu 12,55 - 50,25 kJ/mol. Gradjenje kompleksa ES se može eksperimentalno odrediti pomoću:

- elektronske mikroskopije,
- promene fizičkih svojstava enzima (rastvorljivosti, stabilnosti na topotu i dr.),
- gubitkom stereospecifičnosti,
- promenom spektroskopskih veličina i dr.

**Enzimske reakcije** - se mogu nazvati reakcijama aktivnog centra. Ukoliko je enzimska reakcija višesupstratna onda na enzimu može postojati više aktivnih centara. Da bi se bolje razumela funkcija enzima mora se poznavati dobro i sredina u kojoj on deluje i to pH rastvora, temperatura, koncentracija supstrata i enzima, prisustvo aktivatora i inhibitora i dr.

Enzimi su katalizatori sa velikom efikasnošću jer katalizuju pretvaranje  $10^2$  -  $10^6$  molekula supstrata u minutu. Tako npr. reakcija čije poluvreme bez enzima iznosi 300 godina ubrzala bi se sa enzimom sa faktorom  $10^{10}$  i poluvreme reakcije bi iznosilo 1 sekundu. Smatra se da se reakcije katalizovane enzimima u protoplazmi odvijaju  $10^6$  -  $10^{12}$  puta brže od spontanih reakcija u vodenim rastvorima. Za razliku od neorganskih katalizatora koji katalizuju razne hemijske reakcije (npr. razni metalni joni) i pri tome trpe hemijske promene, enzimi izlaze iz reakcije nepromjenjeni. Zbog navedenog jednu istu reakciju mogu da katalizuju i 1.000 puta sa istom efikasnošću. Napred navedene osobine enzima su našle primenu u industriji gde se **imobiliziraju** veštačkim membranama, kroz koje prolazi kontinualno supstrat, dajući proizvod reakcije u industrijskim razmerama (enzim celulaza hidrolizuje celulozu do glukoze).

## 5.2. Energija aktivacije i specifičnost enzima

Većina hemijskih jedinjenja je nestabilna *in vitro* na sobnoj temperaturi. Nasuprot tome, pod ovim uslovima glukoza može stajati i više godina a da se u prisustvu kiseonika ne oksiduje u  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Isto tako u nekoj drugoj reakciji reaktanti A i B

neće dati proizvod P, jer pri njihovim sudsarima znatno porastu odbojne sile između elektronskih oblaka. Da bi se oni "zgnječili" mora se obaviti rad uz pomoć povećane energije sistema, (pre početka reakcije potencijalna energija sistema je ravna zbiru potencijalne energije reaktanata). Povećanje potencijalne energije reaktanata sistema može se postići na više načina kao npr.:

- ◆ povećanjem temperature (kod termohemijskih reakcija),
- ◆ osvetljavanjem ( kod fotohemskihs reakcija) i
- ◆ dodavanjem katalizatora.

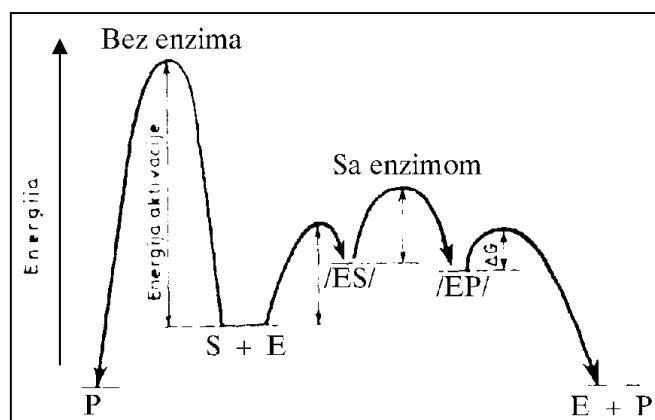
U prva dva slučaja dodavanjem energije se povećava kinetička energija reaktanata i tako savladava energetska barijera na putu građenja proizvoda P prema jednačini 5-1a.



Početna energija koja se dovodi reaktantima A i B da bi dali proizvod P naziva se **energija aktivacije**. Vrednosti energije aktivacije su male kod reaktivnih reaktanata a visoke kod slabo reaktivnih reaktanata. Katalizatori smanjuju energiju aktivacije i time omogućavaju uspostavljanje ravnoteže. Reakcije katalizovane enzimima se odvijaju prema principu *katalize međuproizvoda*. U ovom slučaju enzim se kratkotrajno veže sa supstratom u međuproizvod ES koji ima nižu energiju aktivacije u odnosu na istu reakciju bez katalizatora. Kompleks ES ima dovoljno energije za građenje kompleksa EP a potom i proizvoda P (jednačina 5-1b).



Dijagrami promene energije u reakcijama katalizovanim enzimima i bez njih dati su na slici 5-6.



Slika 5-6. Dijagram promene energije.

Prema tome osnovna funkcija enzima u biohemiskim procesima je sniženje energije aktivacije. Vrednosti energije aktivacije nekih katalizovanih i nekatalizovanih reakcija date su u tabeli 5-2.

Tabla 5-2. Vrednosti energije aktivacije kod nekih reakcija izražene u kJ/mol.

Vrsta reakcije	Bez katalizatora	Sa neorganskim katalizatorom	Sa enzimom
Razlaganje $\text{H}_2\text{O}_2$	75.10	( $\text{H}^+$ ); 54.70 (Pt); 49.50	katalaza; 27.20
Hidroliza saharoze	133.80	( $\text{H}^+$ ); 107.90	saharaza; 39.70
Hidroliza uree	140.20	( $\text{H}^+$ ); 117.34	ureaza; 48.50

Oksidacija glukoze u  $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$  obavlja se u biljkama u toku respiracije bez dodavanja energije jer enzimi koji katalizuju ovaj multistepni proces snižavaju energiju aktivacije. Ova i druge biohemiske reakcije odvijaće se do uspostavljanja ravnoteže koju karakteriše konstanta ravnoteže (K).

Enzimi, za razliku od neorganskih katalizatora, poseduju osobinu koja se naziva **specifičnost**. Razlikujemo dve vrste specifičnosti enzima i to:

- ◆ *specifičnost prema supstratu* i
- ◆ *specifičnost delovanja*.

Specifičnost prema supstratu - uslovjava njegovu veliku selektivnost u izboru supstrata. Ona je jedna od značajnijih svojstava žive materije, jer omogućava povezivanje enzimskih reakcija u metaboličke puteve. Enzimi mogu imati nekoliko vrsta specifičnosti prema supstratu i to:

**Apsolutnu specifičnost** - kada enzim katalizuje pretvaranje samo jednog supstrata (npr. većina dehidrogenaza, ureaza, arginaza itd.).

**Grupnu specifičnost** - enzim katalizuje reakcije sa nizom supstrata (npr. aldoheksoze se mogu fosforilisati sa kinazama i ATP).

**Stereohemiju specifičnost** - kada enzim katalizuje pretvaranje samo jednog stereoizomernog oblika supstrata (npr. D-aminoooksidaza ili L-aminoooksidaza itd.).

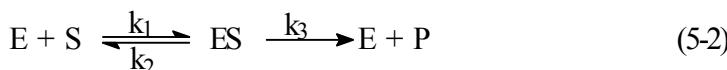
**Optičku specifičnost** - enzim katalizuje razlaganje celog molekula ili samo jednog njegovog dela ( $\alpha$ -glukozidaza hidrolizuje samo  $\alpha$ -, ali ne i  $\beta$ -glikozidnu vezu).

Specifičnost delovanja - je sposobnost enzima da reaktivna grupa u aktivnom centru enzima može da katalizuje samo jednu reakciju.

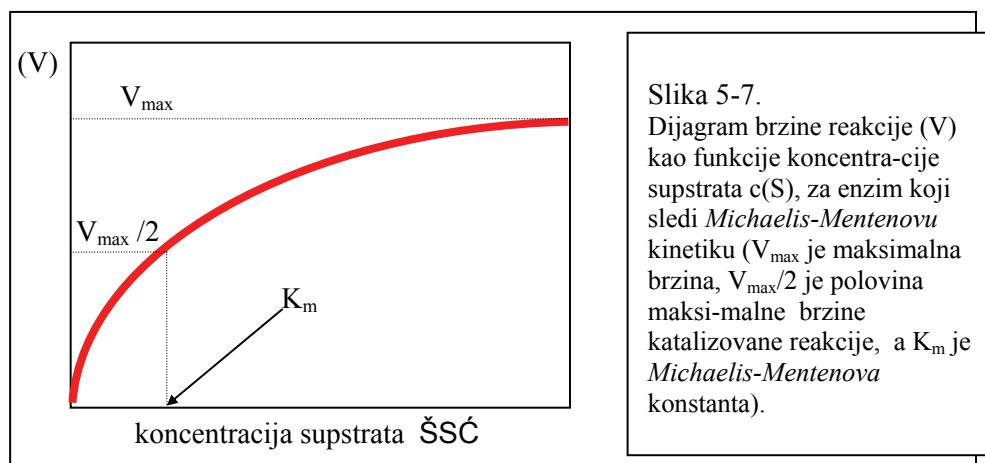
### 5.3. Michaelis-Mentenov prilaz kinetici enzimskih reakcija

Kvantitativna određivanja enzima su veoma teška, jer je njihova koncentracija u ćeliji veoma niska. Zbog navedenog se enzimi uglavnom određuju na bazi efekata koje oni pokazuju u odnosu na supstrat odn. nestajanju supstrata i građenjem proizvoda.

Za mnoge se enzime brzina katalize ( $V$ ) tj. aktivnost enzima, menja sa promenom koncentracije supstrata  $c(S)$  i može se predstaviti hiperbolom nazvanom *krivom zasićenja*, kako je prikazano na slici 5-7. Pri stalnoj koncentraciji enzima  $c(E)$  i niskoj  $c(S)$ ,  $V$  je gotovo linearno proporcionalna  $c(S)$ . Pri visokoj  $c(S)$ ,  $V$  gotovo i ne zavisi od  $c(S)$ . Godine 1913. Leonor Michaelis i Maud Menten predložili su jednostavan model za razjašnjenje tih kinetičkih osobina. U tom modelu intermedijer je specifičan kompleks enzima i supstrata (ES). Taj najjednostavniji model koji razjašnjava kinetička svojstva mnogih enzima predstavljen je jednačinom 5-2:



Enzim E se spaja sa supstratom S i stvara kompleks ES uz konstantu brzine reakcije  $k_1$ . Kompleks ES mogu zadesiti dve sudbine. Može se disosovati u E i S uz konstantu disocijacije  $k_2$  ili nastaviti prema proizvodu (P) i uz konstantu  $k_3$ . Model prepostavlja da se nimalo proizvoda reakcije ne vraća u ishodni supstrat; taj uslov važi samo u početnoj fazi reakcije, odnosno pre nego što koncentracija proizvoda znatno poraste.



Ukoliko želimo dobiti izraz koji dovodi u vezu brzinu enzimske katalize s' koncentracijom supstrata i koncentracijom enzima (sl.5-7) kao i brzinama pojedinih faza reakcije, moramo poći od činjenice da je brzina reakcije katalizovane enzimom jednaka proizvodu koncentracije kompleksa ES i  $k_3$ :

$$V = k_3 c(ES) \quad (5-3)$$

Brzine stvaranja i razlaganja ES kompleksa date su jednačinama 5-4 i 5-5:

$$\text{brzina stvaranja: } ES = k_1 c(E) c(S) \quad (5-4)$$

$$\text{brzina razlaganja: } ES = (k_2 + k_3) c(ES) \quad (5-5)$$

Zanima nas brzina katalize uz uslov *stabilnog stanja* (dinamička ravnoteža). U stabilnom stanju koncentracije intermedijera se ne menjaju, dok se koncentracije reaktanata i proizvoda menjaju. To se događa u slučaju kad su brzine stvaranja i raspadanja kompleksa ES jednake. Izjednačavanjem desnih strana jednačina 5-4 i 5-5 dobija se jednačina 5-6:

$$k_1 c(E) c(S) = (k_2 + k_3) c(ES) \quad (5-6)$$

Rešavanjem jednačine 5-6 po  $c(ES)$  dobija se

$$c(ES) = \frac{c(E) c(S)}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (5-7)$$

Jednačina 5-7 se može pojednostaviti uvođenjem nove konstante  $K_m$  nazvane *Michaelisova konstanta*.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (5-8)$$

Uvrštavajući je u jednačinu 5-7 dobijamo

$$c(ES) = \frac{c(E) c(S)}{K_m} \quad (5-9)$$

Uz prepostavku da je koncentracija enzima mnogo manja od koncentracije supstrata, koncentracija nevezanog supstrata  $c(S)$  će biti gotovo jednaka ukupnoj koncentraciji supstrata. Koncentracija nevezanog enzima  $c(E)$  jednaka je razlici ukupne koncentracije enzima  $E_\tau$  i koncentracije kompleksa ES:

$$c(E) = c(E_\tau) - c(ES) \quad (5-10)$$

Ako se dobijeni izraz uvrsti u jednačinu 5-9 dobija se jednačina 5-11

$$c(ES) = (c(E_\tau) - c(ES)) \frac{c(ES)/K_m}{c(S)/K_m} \quad (5-11)$$

Rešenje jednačine 5-11 za  $c(ES)$  daje

$$c(ES) = c(E_\tau) \frac{c(S)/K_m}{1 + c(S)/K_m} \quad (5-12)$$

ili

$$c(ES) = c(E_\tau) \frac{c(S)}{c(S) + K_m} \quad (5-13)$$

Uvrštavanjem tog izraza za  $c(ES)$  u jednačinu 5-3, dobija se izraz za brzinu katalizovane reakcije (jednačina 5-14):

$$V = k_3 c(E_\tau) \frac{c(S)}{c(S) + K_m} \quad (5-14)$$

Maksimalna brzina reakcije  $V_{max}$  dobija se kada je enzim zasićen supstratom, tj. kad je  $c(S)$  mnogo veća od  $K_m$ , pa se  $c(S)/(c(S) + K_m)$  približava brojnoj vrednosti 1. Tada je

$$V_{max} = k_3 c(E_\tau) \quad (5-15)$$

Uvrštavanjem jednačine 5-15 u jednačinu 5-14 dobija se *Michaelis-Mentenova jednačina* kojom se definišu kvantitativni odnosi između  $V$  i  $c(S)$  kada su  $V_{max}$  i  $K_m$  poznate vrednosti (jednačina 5-16):

$$V = V_{max} \frac{c(S)}{c(S) + K_m} \quad (5-16)$$

*Michaelis-Mentenova jednačina* definiše kinetičke parametre date na slici 5-7. Pri niskoj koncentraciji supstrata, kada je  $c(S)$  mnogo manja od  $K_m$ ,  $V = c(S)V_{max}/2$ , brzina reakcije je direktno proporcionalna koncentraciji supstrata. Suprotno, kada je  $c(S)$  mnogo veća od  $K_m$ ,  $V = V_{max}$ , tj. brzina je najveća i nezavisna od koncentracije supstrata.

Značenje  $K_m$  vidi se i iz jednačine 5-16. Kada je  $c(S) = K_m$ , tada je  $V = V_{max}/2$ . Dakle,  $K_m$  je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj je postignuta polovina maksimalne brzine reakcije (jednačina 5-17):

$$K_m = c(S) V_{max} / 2 \quad (5-17)$$

Enzimi koji reaguju sa jednim supstratom (tzv. *jednosupstratne reakcije*) obično imaju prostu kinetiku, u oblasti niskih koncentracija supstrata, koja se naziva kinetikom I reda, te se eksperimentalnim putem može odrediti  $K_m$ . Da bi se mogla dobiti tačna vrednost  $K_m$  preparat enzima mora biti dobro prečišćen. Kinetika jednosupstratnih reakcija se može opisati krivom zasićenja po Michaelisu i Mentenu (slika 5-7).

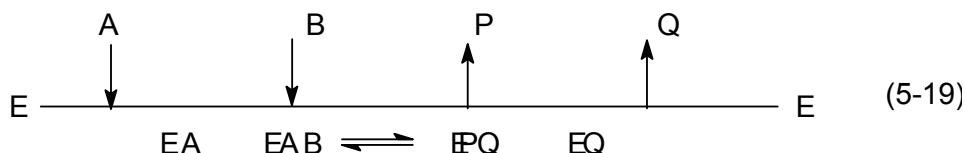
U biljkama mali broj enzima katalizuje reakcije u kojima učestvuje samo jedan supstrat. Većina enzima katalizije reakcije u kojima učestvuju dva ili više supstrata pa se takve reakcije nazivaju *multisupstratnim reakcijama*. Kako njihova kinetika nije jednostavna, kao kod jednosupstratnih reakcija, one se proučavaju posebno. Utvrđeno je da se kinetika multisupstratnih reakcija može odvijati po tri različita mehanizma i to:

- ◆ *uredjenom mehanizmu* (svi supstrati učestvuju u reakciji po specifičnom redosledu pre oslobadjanja prvog proizvoda),
- ◆ *slučajnom mehanizmu* (svi supstrati učestvuju u reakciji po slučajnom redosledu pre oslobadjanja prvog proizvoda) i
- ◆ *ping-pong mehanizmu* (jedan do dva proizvoda se oslobadaju pre nego što se svi supstrati dodaju enzimu).

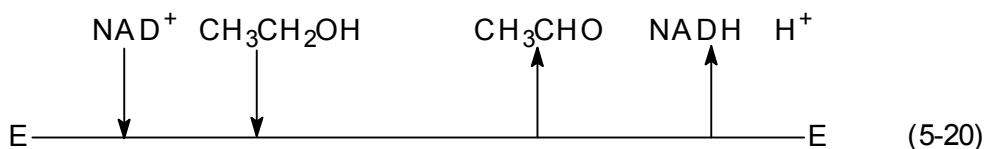
**Uredjeni mehanizam** - precizno definiše kako se supstrat vezuje za aktivni centar enzima (jednačina 5-18).



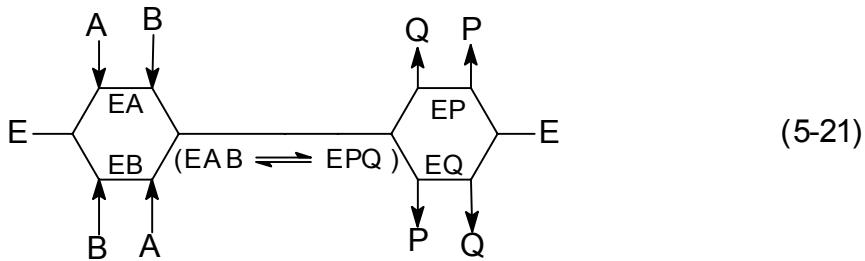
Po ovom mehanizmu svi proizvodi se oslobadaju po specifičnom redosledu, ali tek nakon vezivanja oba supstrata za enzim. U jednačinama 5-18 i 5-19 dato je gradjenje kompleksa prvog supstrata sa enzimom (EA) kao i trojnog aktivnog kompleksa sa drugim supstratom B (EAB). Posle gradjenja trojnog kompleksa započinje kataliza u kojoj se oslobadja prvo proizvod P, a potom Q.



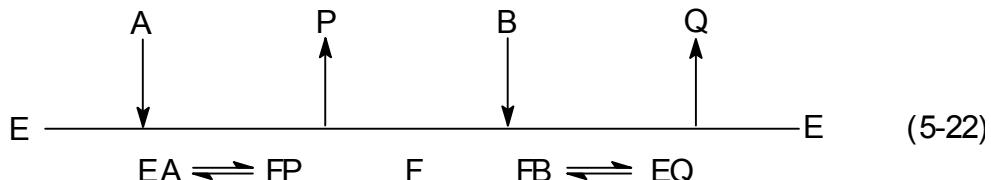
Enzim alkohol-dehidrogenaza katalizuje izmenu dva supstrata i to etanola i  $NAD^+$  prema uredjenom mehanizmu. Proizvodi reakcije su acetaldehid i  $NADH$  (jednačina 5-20).



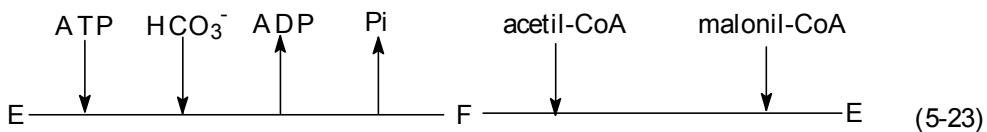
**Slučajni mehanizam** - označava kinetiku reakcije kod kojih su supstrati A i B dodani enzimu po slučajnom redosledu te se naziva još i *slučajnim* ili Bi Bi - *mehanizmom* (jednačina 5-21).



**Ping-pong mehanizam** - se odvija kod reakcije u kojoj E prvo gradi kompleks sa supstratom A i njegovim proizvodom P, a potom sa supstratom B i njegovim proizvodom Q. F je modifikovan E koji sa supstratom B gradi drugi proizvod Q posle čega se regeneriše E (jednačina 5-22).



Primer reakcije za ping-pong mehanizam je reakcija katalizovana sa acetil-CoA-karboksilazom. U ovoj reakciji se prvo dva supstrata dodaju enzimu, oslobođe dva proizvoda, pa se tek onda dodaje drugi supstrat i oslobadja finalni proizvod (jednačina 5-23).

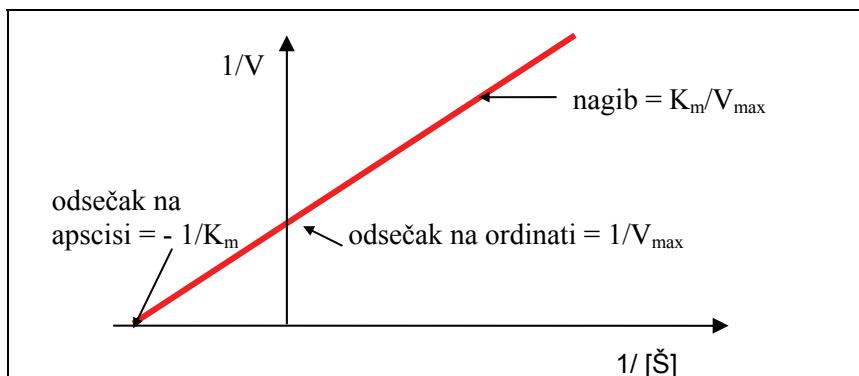


### 5.3.1. $V_{\max}$ i $K_m$ i mogućnosti određivanja

Michaelisova konstanta  $K_m$  i najveća brzina  $V_{\max}$  mogu se lako odrediti iz brzina katalize pri različitim koncentracijama supstrata ako enzim deluje prema jednostavnoj šemi danoj u jednačini 5-2. Zbog toga je pogodno Michaelis-Mentenovu jednačinu preuređiti u izraz koji daje pravolinijski dijagram što su 1934.g. učinili Lineweaver i Burk koristeći recipročne vrednosti obeju strana Michaelis-Mentenove jednačine što daje

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (5-24)$$

Dijagram  $1/V$  prema  $1/c(S)$  daje pravu liniju sa odsečkom na ordinati  $1/V_{\max}$  i koeficijentom smera odnosno nagibom prave  $K_m/V_{\max}$  (slika 5-8).



Slika 5-8. Dvostruko recipročni Lineweaver-Burk dijagram enzimske kinetike:  $1/V$  u funkciji  $1/c(S)$ . Nagib pravca je  $K_m/V_{\max}$ , odsečak na ordinati je  $1/V_{\max}$ , a na apscisi -  $-1/K_m$ .

### 5.3.2. Značenje vrednosti $K_m$ i $V_{\max}$

Vrednosti  $K_m$  - raznih enzima tako se razlikuju (tabela 5-3). Za većinu enzima vrednosti  $K_m$  leže između  $10^{-1}$  i  $10^{-6}$  mol/l. Vrednosti  $K_m$  za neki enzim zavise od koncentracije i prirode supstrata kao i uslova u kojima reakcija teče kao što su temperatura i jonska jačina. Michaelisova konstanta  $K_m$  ima dva značenja.

Prvo, to je koncentracija supstrata pri kojoj je pola aktivnih mesta enzima ispunjena, tj. pri kojoj je postignuta polovina maksimalne brzine reakcije. Kad se jednom zna  $K_m$ , može se izračunati frakcija ispunjenih mesta ( $f_{es}$ ) pri svakoj koncentraciji supstrata:

$$f_{es} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{c(S)}{c(S) + K_m} \quad (5-25)$$

Tabela 5-3.  $K_m$  vrednosti nekih enzima.

Enzim	Supstrat	$K_m$ (mol dm <sup>-3</sup> )
glukokinaza	glukoza	$1 \times 10^{-4}$
fruktokinaza	fruktoza	$7 \times 10^{-4}$
katalaza	vodonikperoksid ( $H_2O_2$ )	$6 \times 10^{-6}$
karboanhidraza	$CO_2$	$8 \times 10^{-3}$
"	$HCO_3^-$ (bikarbonat)	$5 \times 10^{-5}$
piruvat-karboksilaza	piruvat	$1 \times 10^{-3}$
treonin-deaminaza	treonin	$5 \times 10^{-3}$

Drugo, konstanta  $K_m$  srođna je konstantama brzina pojedinih faza u katalitičkoj shemi prikazanoj jednačinom 5-2. U jednačini 5-8  $K_m$  je definisana kao  $(k_2 + k_3)/k_1$ .

Posmatrajmo granični slučaj kada je  $k_2$  mnogo veća od  $k_3$ . To znači da je disocijaciju kompleksa ES u E i S mnogo brža od stvaranja E i P. Uz taj uslov ( $k_2 > k_3$ ) sledi da je

$$K_m = k_2/k_1 \quad (5-26)$$

Konstanta disocijacije kompleksa ES glasi:

$$K_{ES} = \frac{c(E) \cdot c(S)}{c(ES)} = \frac{k_2}{k_1} \quad (5-27)$$

Drugim rečima,  $K_m$  je jednaka konstanti disocijacije kompleksa ES ako je  $k_3$  mnogo manja od  $k_2$ . Kada je taj uslov ispunjen  $K_m$  je mera jačine kompleksa ES: velika  $K_m$  znači slabo vezivanje, a mala  $K_m$  pokazuje jako vezivanje. Treba naglasiti da  $K_m$  pokazuje afinitet vezivanja kompleksa ES samo kada je  $k_2$  mnogo veća od  $k_3$ . To je slučaj kod mnogih, ali ne i kod svih enzima.

Michaelis-Mentenova konstanta je značajna ze enzimologiju iz više razloga i to:

- ◆ kao merna veličina afiniteta enzima prema supstratu,
- ◆ procjenjivač metaboličke reakcije *in vivo*,
- ◆ za identifikaciju enzima iz raznih izvora,
- ◆ za izračunavanje koncentracije supstrata pri kojoj se može postići maksimalna brzina reakcije itd.

Najveća brzina  $V_{max}$  - pokazuje broj izmena (turnover number) enzima ako je poznata koncentracija aktivnih mesta  $c(E_t)$ , jer je

$$V_{max} = k_3 c(E_t) \quad (5-28)$$

Tako npr., rastvor karboanhidraze ( $c = 10^{-6}$  mol/L) katalizuje stvaranje  $H_2CO_3$  ( $c = 0.6$  mol  $dm^{-3} s^{-1}$ ) kada je potpuno zasićena supstratom. Dakle,  $k_3$  je  $6 \times 10^5 s^{-1}$ . Kinetička konstanta  $k_3$  naziva se *brojem izmena* enzima i predstavlja *broj molekula supstrata pretvorenih u molekule proizvoda u jedinici vremena kada je enzim potpuno zasićen supstratom*. Za katalazu ovaj broj iznosi  $40.000.000 s^{-1}$  i jedan je od najvećih poznatih brojeva enzima. Brojevi izmena većine enzima za njihove fiziološke supstrate nalaze se u rasponu između  $1$  i  $10^4 s^{-1}$  (tabela 5-4).

Tabela 5-4. Maksimalni brojevi izmena nekih enzima.

Enzimi	Broj izmena ( $s^{-1}$ )
katalaza	40.000.000
karboanhidraza	800.000
DNA-polimeraza I	15
triptofan-sintetaza	2
lizozim	0.5

### 5.3.3. Kinetička savršenost enzimske katalize: $k_{cat}/K_m$ odnos

Kada je koncentracija supstrata mnogo veća od  $K_m$ , brzina katalize jednaka je  $k_3$ , tj. broju izmena. No u fiziološkim uslovima većina enzima nije zasićena supstratom. Odnos  $c(S)/K_m$  najčešće je između 0.01 i 1.0. Kada je  $c(S) < K_m$ , brzina enzimske katalize mnogo je manja od  $k_3$ , jer većina aktivnih mesta enzima nije zauzeta (jednačina 5-29):

$$V = \frac{k_3}{K_m} \cdot c(E) \cdot c(S) \quad (5-29)$$

Kad je  $c(S) < K_m$ , koncentracija slobodnog enzima  $c(E)$  gotovo je jednaka ukupnoj koncentraciji enzima  $c(E_\tau)$ , pa je

$$V = \frac{k_3}{K_m} \cdot c(S) \cdot c(E_\tau) \quad (5-30)$$

Postoje li bilo kakva ograničenja vrednosti  $k_3/K_m$ ? Taj odnos zavisi pre svega od konstanti brzina  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$ , što se može pokazati supstitucijom  $K_m$  (v.jednačinu 5-8):

$$\frac{k_3}{K_m} = \frac{k_3 k_1}{k_2 + k_3} \quad (5-31)$$

Krajnju granicu vrednosti  $k_3/K_m$  postavlja  $k_1$ , brzina stvaranja kompleksa ES. Ta brzina ne može biti veća od brzine difuzije kontrolisanog susretanja enzima i njegovog supstrata. Vrednost  $k_1$  ograničava difuziju, pa ona ne može biti veća od  $10^8$  do  $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ ; zato je i gornja granica  $k_3/K_m$  između  $10^8$  i  $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ . To se ograničenje odnosi i na enzime kompleksnijih reakcijskih puteva od onog u jednačini (5-2). Najveća brzina katalize pri zasićenju supstrata, označena kao  $k_{\text{cat}}$ , zavisna je od nekoliko konstanti brzina reakcije, a ne samo od  $k_3$ . Kod tih enzima potrebno je uzeti u obzir parametar  $k_{\text{cat}}/K_m$ . Vrednost  $k_{\text{cat}}/K_m$  određenog broja enzima poput karboanhidraze i triozofosfat-izomeraze su između  $10^8$  i  $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ , što pokazuje da su postigli kinetičku savršenost. Njihovu brzinu katalize ograničava samo brzina kojom susreću supstrat u rastvoru. Bilo kakvo dalje povećavanje brzine katalize može se postići samo smanjivanjem vremena difuzije što je moguće kod enzima organizovanih u takozvane multienzimske komplekse.

### 5.3.4. Mehanizam enzimske katalize

Preduslov za studije mehanizma enzimske katalize je poznavanje enzimskih reakcija koje se odvijaju u četiri faze (jednačina 5-32).



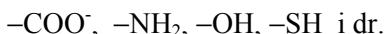
U prvoj fazi E se pravilno približava supstratu (da bi se za njega vezao jonskom, kovalentnom ili nekom drugom vezom). U drugoj fazi se indukovano

menja S pod uticajem enzima da bi se omogućila odgovarajućaenzimska reakcija (III faza). U četvrtoj fazi se oslobadja proizvod reakcije (P) i regenerisan enzim je sposoban da stupi u narednu reakciju.

Mehanizmi enzimskih reakcija su često isti. Oni se mogu tumačiti samo ako je poznata primarna struktura aktivnog centra enzima. Neki ostaci aminokiselina su predodredjeni za katalitičko delovanje. Smatra se da su za enzimsku katalizu odgovorna tri mehanizma zastupljena u:

- ◆ kovalentnoj katalizi,
- ◆ kiselo-baznoj katalizi i
- ◆ katalizi metalnim jonima.

**Kovalentna kataliza** - nastaje ukoliko se E i S vezuju kovalentnom vezom. U ovoj katalizi učestvuje veliki broj nukleofilnih funkcionalnih grupa bočnih ostataka amino kiselina koje sa elektrofilnim grupama supstrata mogu uspostaviti kovalentan tip vezivanja u prelaznom stanju ES kompleksa. Tipične nukleofilne grupe u R ostacima aminokiselina su tipa:



Navedene grupe mogu reagovati sa elektrofilnim grupama supstrata i graditi kovalentne veze.

**Kiselo-bazna kataliza** - nastaje ako se u toku odredjene enzimske reakcije prenose protoni. Dobri akceptorji protona u R ostacima aminokiselina su ostaci His, Glu, Asp, Cys i dr.

**Kataliza metalnim jonica** - je jedan od vrlo značajnih mehanizama u enzimskoj katalizi jer su oko 1/4 izolovanih enzima metaloenzimi, ili se aktiviraju metalnim jonica. Kataliza pomoću metalnih jona odvija se najverovatnije gradjenjem tzv. ternernog E-Me-S kompleksa. Ovaj kompleks se može graditi na nekoliko načina kao npr.:

- ◆ gradjenjem kompleksa sa supstratnim mostom (E-S-Me),
- ◆ gradjenjem kompleksa sa enzimskim mostom (Me-E-S) i
- ◆ gradjenjem kompleksa sa metalnim mostom (E-Me-S).

Mehanizmi katalize metalnim jonica u biljkama su veoma oskudno proučeni za razliku od čoveka i životinja. Posebno je dobro proučen mehanizam katalitičkog delovanja himotripsina u reakcijama degradacije polipeptidnog lanca.

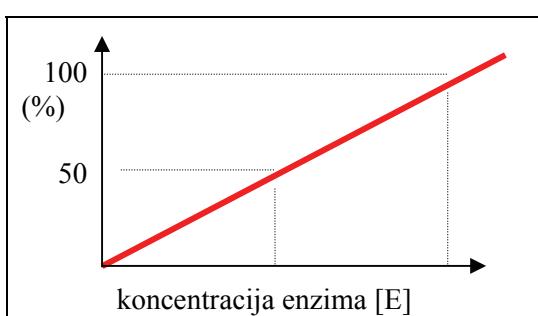
## 5.4. Faktori koji utiču na aktivnost enzima

Čitav niz faktora utiče na aktivnost enzima, a samim tim i na tokove biohemijских reakcija u biljkama. Jedan deo ekološke biohemije bavi se i proučavanjima faktora spoljne sredine koji utiču naenzimske sisteme tako što svojim prisustvom aktiviraju ili inhibiraju tokove metaboličkih procesa u biljnoj ćeliji. Od faktora koji utiču na aktivnosti enzima posebno su značajni:

- ◆ koncentracija supstrata,
- ◆ koncentracija enzima,
- ◆ temperatura,
- ◆ pH,
- ◆ koenzimi i prostetične grupe,
- ◆ aktivatori i inhibitori,
- ◆ alosterični efektori i interkonverzija i dr.

**Efekat koncentracije supstrata** - Kod nekatalizovanih hemijskih reakcija povećanjem koncentracije, reaktanata pri konstantnoj temperaturi reakcije, povećava se i brzina nastajanja proizvoda to jest brzina hemijske reakcije u jedinici vremena. Isti slučaj je i kod reakcija katalizovanih enzimima. Ako se koncentracija supstrata poveća, pri konstantnoj koncentraciji enzima, povećava se i brzina reakcije i svoj maksimum postiže pri određenoj koncentraciji supstrata tzv. *optimalnoj koncentraciji* nakon čega daljim povećanjem koncentracije supstrata brzina reakcije se ne menja ili čak opada. Ovi odnosi su dati krivom zasićenja, koja je grafički prikazana na slici 5-7 (strana 112).

**Efekat koncentracije enzima** - Brzina reakcije razlaganja supstrata katalizovane enzimom je proporcionalna koncentraciji enzima pri konstantnoj koncentraciji supstrata, što znači da se brzina reakcija povećava linearno sa povećanjem koncentracije enzima pri konstantnim drugim uslovima. Efekat koncentracije enzima na brzinu katalizovane reakcije prikazan je dijagramom na slici 5-9.

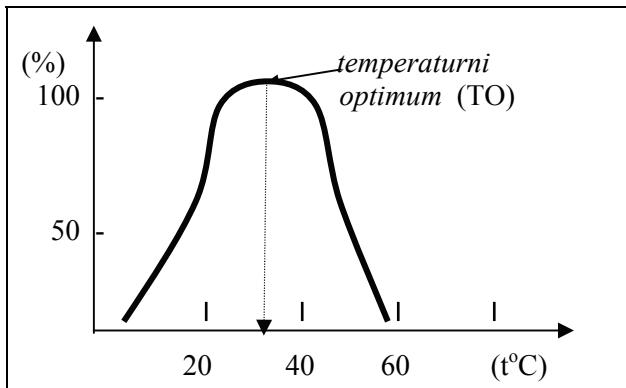


Slika 5-9.  
Uticaj koncentracije enzima na brzinu katalizovane reakcije.

### Efekat temperature –

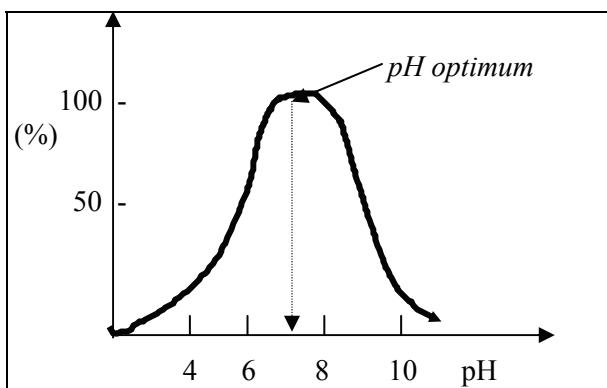
Povećanjem temperature povećava se i brzina katalizovane reakcije do jednog

maksima posle čega brzina opada jer se enzim denaturiše. Za svaku enzimsku reakciju postoji *temperaturni optimum (TO)* pri kojem je relativna aktivnost enzima najveća (slika 5-10). U živim ćelijama temperaturni optimumi imaju različite vrednosti i oni se kreću u granicama fizioloških temperatura. Temperaturni optimumi biljaka se kreću u intervalu  $10^0$  -  $50^0$  (npr. hlorofilaz ima TO na  $25^0$ , amilaza na  $46^0$  itd.).



Slika 5-10.  
Uticaj temperature na  
aktivnost enzima.

**Efekat pH** – Izmenom pH vrednosti sredine u kojoj enzim deluje menja se konformacija enzima odn. njegovog aktivnog centra (usled kidanja vodoničnih i drugih veza). Istovremeno se ionizuju funkcionalne grupe, odstranjuju  $H^+$  sa R ostataka aminokiselina u polipeptidnom lancu čime u određenom stepenu može započeti i denaturacija enzima. Ona pH vrednost na kojoj je aktivnost enzima najveća naziva se *pH optimum*. Ona ne može biti identična sa njegovom normalnom pH vrednosti u ćeliji. Iz navedenog proizilazi da pH vrednosti mogu biti značajni faktori u intracelularnoj kontroli enzimske aktivnosti. Zavisnost aktivnosti enzima od pH vrednosti može se prikazati grafički pri čemu je dobivena kriva u suštini rezultanta disociacione krive pratećih anjonskih i katjonskih grupa koje učestvuju u katalitičkoj reakciji (slika 5-11).



Slika 5-11.  
Uticaj pH na brzinu reakcije  
(aktivnost enzima).

Većina enzima imaju pH optimume u slabo kiseloj ili neutralnoj sredini, kada je aktivnost enzima najveća. pH optimumi nekih enzima biljaka i odgovarajući supstrati na koje deluju dati su u tabeli 5-5.

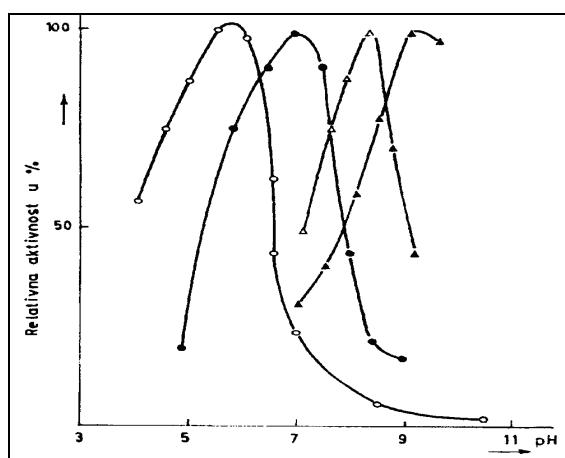
Tabela 5-5. pH optimumi nekih enzima.

Enzimi	Odgovarajući substrati	pH optimum
Katalaza	$\text{H}_2\text{O}_2$	7.0
Amilaza	skrob	4.5-5.0
Papain	protein	5.0
Glutamat-dehidrogenaza	glutamat	6.0
Piruvat-karboksilaza	piruvat	4.8

Optimum aktivnosti jednog enzima istog organa biljke može biti različita ukoliko je izolovan iz različitih organela tako npr. polifenol-oksidaza jabuke iz mitohondrija ima pH optimum na pH 7.2, a iz hloroplasta na pH 5.1.

Aktivnost enzima se uvek u laboratoriji određuje na njegovim pH optimumima što se postiže upotrebom odgovarajućih pufernih sistema. Ukoliko se aktivnost enzima ne bi odredjivala u puferima, usled niskih ili visokih pH vrednosti, dolazilo bi do denaturacije ili inaktivacije enzima.

pH vrednosti su veoma važne i za regulaciju aktivnosti enzima. Biljna ćelija ima oko 3000 enzima od kojih je samo određeni broj aktivan u posmatranom trenutku. Primer zavisnosti aktivnosti nekih enzima korena graška od pH vrednosti dat je na slici 5-12. Povećanjem pH od 3.5 do 5.0 raste aktivnost peroksidaze do maksimalne vrednosti. Daljim povećanjem pH aktivnost peroksidaze se smanjuje, a raste aktivnost ATP-aze itd.



Slika 5-12.  
Zavisnost aktivnosti enzima korena graška od pH vrednosti (o - operoksidaza, • - ATP-aza, Δ - triozofosfat-dehi-drogenaza) iz knjige Plant Cell Structure and Metabolism, Lnoghman, London 1974.

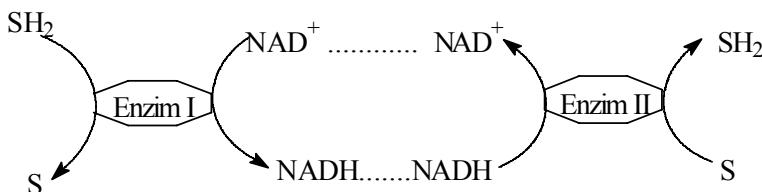
katalitičke funkcije. Još su Joung i Harden dokazali da enzimi pod određenim uslovima, dijalizom i slično gube svoju katalitičku aktivnost. Ali, ako se ove dve fizički odvojene frakcije ponovo spoje, enzim postaje ponovo katalitički sposoban. To znači da je deo enzimskog sistema koji se može odvojiti dijalizom - **kofaktor** od esencijalnog značaja za katalitičku funkciju enzima. Po hemijskoj prirodi to su

neproteinske supstance, gotovo redovno organski molekuli relativno male molekulske mase ( $<1 \times 10^3$ ) i termostabilne, koje su nazvane **koenzimi**. (Opširnije o koenzimima u poglavlju 6).

Pored ovih kofaktora otkriven je i veliki broj enzima koji najčešće kao neproteinsku komponentu sadrže neko organsko jedinjenje male molekulske mase, neophodne za ispoljavanje katalitičke aktivnosti enzima, ali koja se ne može običnom dijalizom odvojiti od proteinskog molekula, već se to postiže energičnim hemijskim dejstvom npr. upotrebom  $(NH_4)_2SO_4$ . Ova komponenta naziva se **prostetičnom grupom** enzima.

Prema P.Karlsonu (1988) postoji više razloga na osnovu kojih se mogu napraviti razlike između koenzima i prostetične grupe. Obe ove funkcije učestvuju hemijski u katalizovanom procesu, u toku kojeg i same podležu hemijskim promenama.

Koenzimi povezuju najmanje dva enzima u katalizi neke metaboličke reakcije. Ovo se može ilustrovati sledećom shemom koja objašnjava funkciju koenzima NAD u prenosu vodonika:



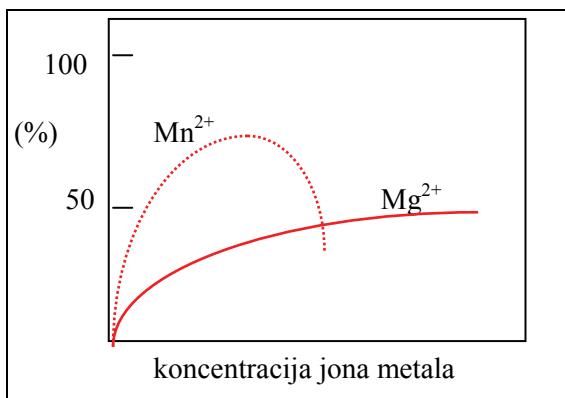
Za razliku od koenzima koji je spona između najmanje dva enzima, enzim sa prostetičnom grupom (holoenzim) može reagovati sa dva različita supstrata, npr. sa donatorom i akceptorom vodonika. Ovaj proces se odvija simultano. U toku hemijske reakcije prostetična grupa se menja (npr. vezuje vodonik ili neku grupu), ali se na kraju reakcije vraća u prvobitno stanje. Treba međutim napomenuti da je često vrlo teško odrediti šta je koenzim, a šta prostetična grupa.

Aktivnost enzima u mnogome zavisi od prisustva aktivatora i inhibitora u katalizovanoj reakciji.

**Aktivatori** - Pored organske prirode prostetične grupe enzima, katalitička aktivnost velikog broja enzima ne može se često zamisliti bez prisustva neorganskih komponenata. Tako npr., enzimi polifenoloksidaze, sadrže  $Cu^{2+}$  koji je čvrsto vezan za protein i koji verovatno obezbeđuje katalitičku aktivnost ovog enzima. S druge strane, enzimi kao što su citohromi, katalaze, peroksidaze i drugi sadrže kao prostetičnu grupu porfirinski tetrapirolni prsten u čijem se centru nalazi  $Fe^{2+}$ . Karboanhidraza, koja ima važnu ulogu u transportu  $CO_2$  je takođe metaloenzim sa  $Zn^{2+}$ , koji je čvrsto vezan za proteinski deo enzima. Navedeni primeri metalnih jona kao aktivatora enzimskih sistema odnose se na teške metale, koji se od proteina dosta teško mogu odvojiti. Osim njih i laci metali učestvuju u građi enzimskih molekula, odakle se mogu relativno lako izdvojiti kao npr. kod raznih fosfataza, za čiju je aktivnost potrebno prisustvo  $Mn^{2+}$  ili  $Mg^{2+}$ . Pored jona metala u katalizi

enzimskih reakcija ne retki su i joni nemetala tipa  $\text{Cl}^-$  i sl, kao i to da većina enzima ispoljava svoj optimum dejstva u prisustvu samo jednog jona. Pored toga ima ih gde je učešće više jona jednak vredno. U prisustvu aktivatora početna brzina enzimske reakcije raste, pri čemu se dobijaju reakcione krive koje se međusobno manje ili više razlikuju u zavisnosti od vrste aktivatora, vremena aktivacije, pH, temperature, antagonizma jonova, kao i prirode i mehanizma aktivacije itd.

Na slici 5-13 je prikazana aktivacija NAD-zavisne fosfokinaze sa  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  jonica metala u funkciji kofaktora.



Slika 5-13.  
Uticaj jona metala na brzinu  
enzimske katalize.

Pored toga što se metalni joni ponašaju kao aktivatori enzima mnogi od njih imaju i suprotan, dakle *efekat inhibicije*. Primeri metalnih jona kao aktivatora i inhibitora enzimskih reakcija dati su u tabeli 5-6.

Tabela 5-6. Metalni joni kao aktivatori i inhibitori nekih enzima.

Enzimi	Aktivatori	Inhibitori
nitrat-reduktaza	$\text{Mo}^{2+}$	$\text{W}^{2+}$ i $\text{V}^{2+}$
alkohol dehidrogenaza	$\text{K}^+$ , $\text{NH}_4^+$ ili $\text{Rb}^+$	$\text{Na}^+$ , $\text{Li}^+$ ili $\text{Cs}^+$
fosforilaza	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Rb}^+$ ili $\text{Cs}^+$	$\text{Na}^+$
enolaza	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ ili $\text{Mn}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$ ili $\text{Sr}^{2+}$
glutamin-sintetaza	$\text{Mg}^{2+}$ ili $\text{Mn}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$ i $\text{Pb}^{2+}$
glutamat-dehidrogenaza	$\text{Mg}^{2+}$ ili $\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$ i $\text{Pb}^{2+}$

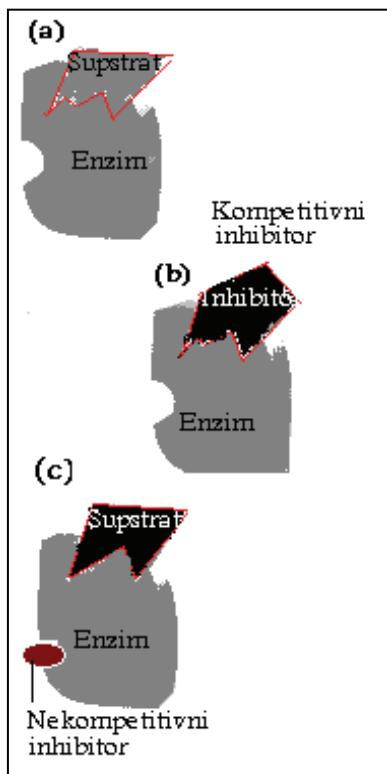
**Inhibitori** - su jedinjenja ili metalni joni u većoj koncentraciji, koji smanjuju brzine enzimskih reakcija. Na toj pojavi zasnovaju se važni kontrolni mehanizmi u biološkim sistemima. Mnogi lekovi kao i otrovi deluju upravo inhibiranjem enzima. Enzimska inhibicija može pružiti uvid i u mehanizam enzimskog delovanja. Ta inhibicija može biti ili reverzibilna ili ireverzibilna.

**Ireverzibilna inhibicija** - je takva vrsta inhibicije kod koje se inhibitor kovalentno veže za enzim tako čvrsto da je disocijaciju vrlo spora ili se uopšte ne dešava. Delovanje nervnih bojnih otrova na *acetilholin-esterazu* (EC 3.1.1.7), enzim čija je uloga važna u prenosu nervnih impulsa, primer je ireverzibilne inhibicije.

Nasuprot tome, **reverzibilna inhibicija** - nastaje brzim uspostavljanjem ravnoteže inhibitora i enzima i njihovim labavim vezivanjem tako da ih je moguće odvojiti lako dijalizom ili razblaživanjem. Ova vrsta inhibicije ima značajnu ulogu u regulaciji metabolizma. Postoji više vrsta inhibicije koje se razlikuju u parametrima definisanim *Lineweaver-Burkovom* dijagramu od kojih navodimo sledeće:

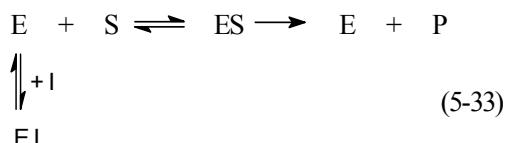
- ◆ konkurentna (kompetitivna) inhibicija,
- ◆ nekonkurentna (nekompetitivna) inhibicija,
- ◆ inhibicija supstratom i proizvodom i
- ◆ alosterična inhibicija i interkonverzija

Neki od navedenih tipova reverzibilne inhibicije enzima prikazani su na slici 5-14.

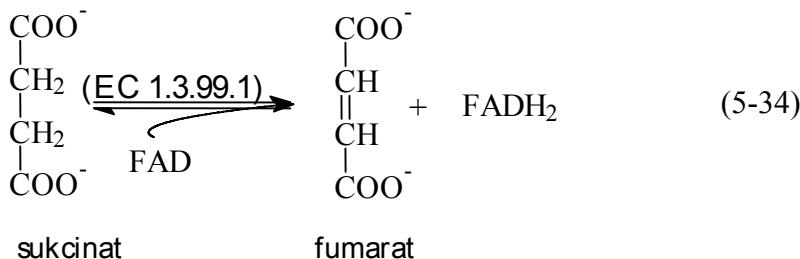


Slika 5-14.  
Kompetitivna i nekompetitivna inhibicija:  
(a) ES-kompleks bez inhibitora, (b) kompetitivni i (c) nekompetitivni inhibitor.

**Konkurentna (kompetitivna) inhibicija** - je najjednostavniji oblik reversne inhibicije. Javlja se u slučajevima kada je inhibitor sličan supstratu i veže se kao i supstrat za isto aktivno mesto enzima. Ako je za aktivno mesto enzima vezan supstrat onda enzim ne može vezati inhibitor i obrnuto. Drugim rečima, vezivanje supstrata i kompetitivnog inhibitora međusobno se isključuju, pa jednačina enzimske reakcije glasi:

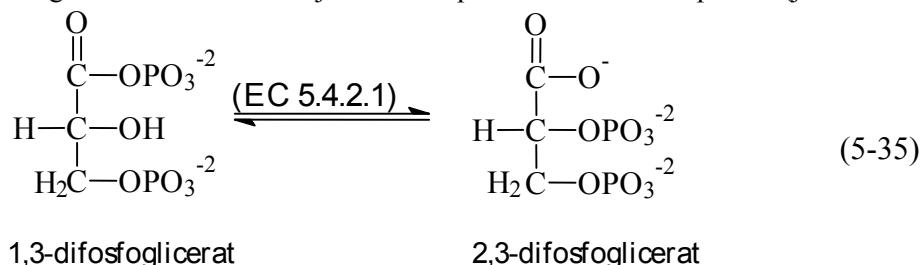


Kompetitivna inhibicija usporava katalizu smanjivanjem broja enzimskih molekula na koje je vezan supstrat. Klasičan primer kompetitivne inhibicije je delovanje malonata na *sukcinat-dehidrogenazu* (EC 1.3.99.1) enzim koji oksiduje (dehidrogenuje) sukcinat (jednačina 5-34).



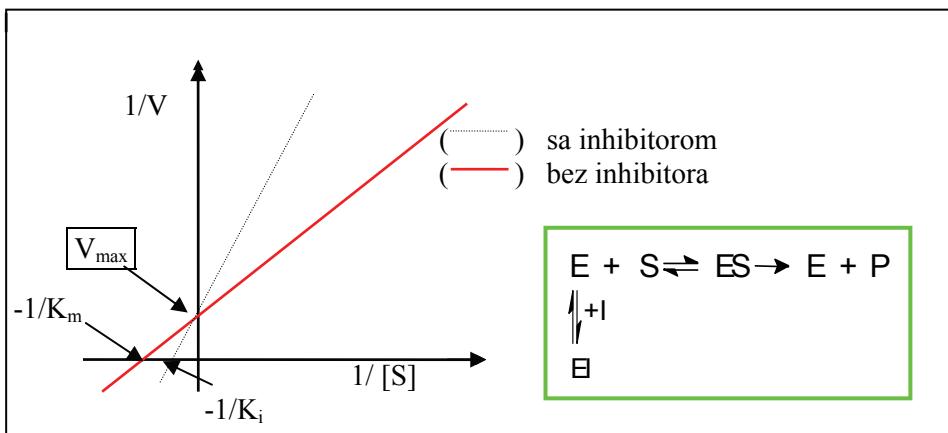
Ako se reakcionaloj smeši doda malonat brzina građenja fumarata se smanjuje jer se sada malonat veže za aktivno mesto enzima. Navedeni molekuli se razlikuju po tome što suksinat ima dve, a malonat jednu metilensku grupu.

Fiziološki značajan primer kompetitivne inhibicije je stvaranje 2,3-difosfoglicerata od 1,3-difosfoglicerata. *Difosfoglycerat-mutaza* (EC 5.4.2.1) je enzim koji katalizuje ovu izomerizaciju. Nije neobično što je proizvod ove reakcije zbog strukturne sličnosti ujedno i kompetitivni inhibitor supstrata (jednačina 5-35).



**Nekonkurentna (nekompetitivna) inhibicija** - predstavlja takođe reverzibilni tip inhibicije u kojoj se inhibitor i supstrat mogu istovremeno vezati za enzim. To znači da se njihova veziva mesta ne prekrivaju (slika 5-14). Nekompetitivni inhibitor deluje prvenstveno smanjivanjem broja izmena enzima, a ne udelom enzimskih molekula s vezanim supstratom što je slučaj kod kompetitivne inhibicije.

**Kinetika kompetitivne i nekompetitivne inhibicije** - Kompetitivna i nekompetitivna inhibicija mogu se razlikovati merenjem brzina katalize pri različitim koncentracijama supstrata i inhibitora. U *kompetitivnoj inhibiciji* odsečak na dijagramu  $1/V$  prema  $1/c(S)$  jednak je i kad ima i kad nema inhibitora, premda je nagib različit (slika 5-15), jer se  $V_{max}$  ne menja kompetitivnim inhibitorom.



Slika 5-15.

Dvostruko recipročni (Lineweaver-Burk) dijagram enzimske kinetike u prisustvu (*isprekidana linija*) i odsustvu (*puna linija*) kompetitivnog inhibitora:  $V_{\max}$  se ne menja, a  $K_m$  raste.

*Ključni značaj kompetitivne inhibicije jeste da se može nadvladati dovoljno visokom koncentracijom supstrata.* Supstrat i inhibitor se takmiče u vezivanju za isto mesto na enzimu, pa će pri dovoljno visokoj koncentraciji supstrata gotovo sva aktivna mesta biti zauzeta supstratom i enzim će delovati u potpunosti. Porast nagiba dijagrama  $1/V$  prema  $1/c(S)$  srazmeran je energiji vezanja kompetitivnog inhibitora. U prisustvu kompetitivnog inhibitora jednačina 5-24 se zamenjuje i glasi:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{c(I)}{K_i}\right) \left(\frac{1}{c(S)}\right) \quad (5-36)$$

gde je  $c(I)$  koncentracija inhibitora, a  $K_i$  konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor i glasi :

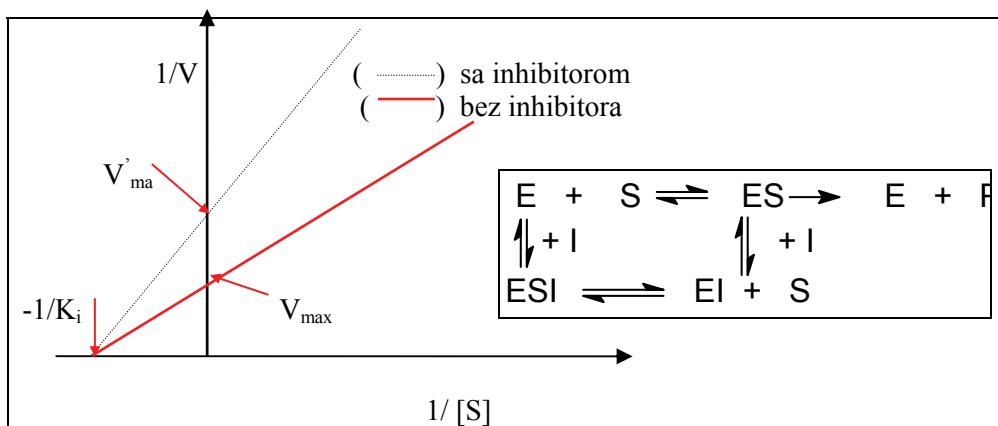


$$K_i = \frac{c(E)c(I)}{c(EI)} \quad (5-37)$$

Drugim rečima, u prisustvu kompetitivnog inhibitora nagib pravca povećava se za faktor  $(1 + \frac{c(I)}{K_i})$ .

*U nekompetitivnoj inhibiciji* (slika 5-16)  $V'_{\max}$  se smanjuje, pa se odsečak na osi y povećava. Za isti faktor povećava se i nagib koji je jednak  $K_m/V'_{\max}$ . Za razliku od  $V'_{\max}$  ovaj tip inhibicije ne menja  $K_m$ . *Nekompetitivna inhibicija se ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata.* Maksimalna brzina u prisustvu nekompetitivnog inhibitora  $V'_{\max}$  je

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + c(I)/K_i} \quad (5-38)$$



Slika 5-16.

Dvostruko recipročni (Lineweaver-Burk) dijagram enzimske kinetike u prisustvu (-----) i odsustvu (—) nekompetitivnog inhibitora:  $K_i$  se ne menja, a  $V_{\max}$  se smanjuje.

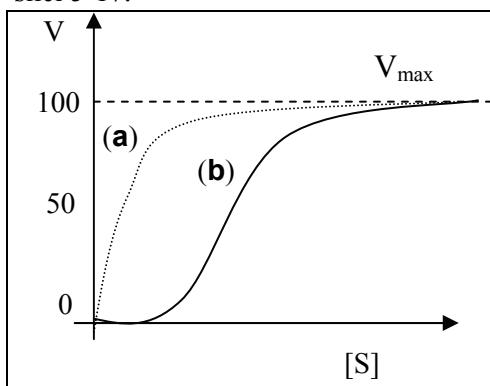
Iz navedenog sledi da se *kinetika enzimskih reakcija inhibiranih kompetitivnim i nekompetitivnim inhibitorima pokorava Michaelis-Mentenovoj kinetici.*

**Inhibicija supstratom i proizvodom** - Od ranije opisane zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije supstrata ima izuzetaka. Neki enzimi reaguju sporije pri visokim koncentracijama supstrata što se označava pojmom inhibicije supstratom, jer se prepostavlja da se tada veže više od jednog molekula supstrata za aktivno mesto enzima te se brzina reakcije smanjuje. Na sličan način mogu i proizvodi reakcije, koji se nakupljaju u većoj koncentraciji tokom reakcije inhibirati enzim tako što proizvod postaje supstrat za povratnu reakciju koja će biti favorizovana pri visokim koncentracijama proizvoda, zbog čega se ovaj tip inhibicije označava pojmom inhibicije proizvodom. Ukoliko iz energetskih razloga (npr. nepovoljan položaj ravnoteže) ne dođe do reakcije, proizvod reakcije se može

vezati za enzim i tako sprečiti pristup supstratu. Inhibicija proizvodom stoga kinetički odgovara konkurentnoj inhibiciji.

Neki enzimi su biološki prilagođeni da u metabolizmu pored katalitičke funkcije, imaju i regulatornu ulogu pa se nazivaju **regulatornim enzimima**. Postoje dve glavne grupe regulatornih enzima : 1. *alošterični enzimi*, čija se katalitička aktivnost menja nekovalentnim vezivanjem specifičnih metabolita za molekul enzima izvan aktivnog mesta i 2. *kovalentno modulirani* (promenjeni) enzimi koji prelaze iz aktivnih u neaktivne oblike delovanjem drugih enzima. Ove dve grupe regulatornih enzima deluju na promene u metabolizmu ćelije veoma brzo; alošterični enzimi u toku nekoliko sekundi, a kovalentno regulisani enzimi u toku nekoliko minuta.

**1. Alošterični enzimi i alošterični efektori** – Jednostavnošću i širokom primenljivošću Michaelis-Mentenov model je uveliko doprineo razvoju enzimske hemije. Ipak kinetička svojstva mnogih enzima ne mogu se razjasniti Michaelis-Mentenovim modelom. Mnogi biološki katalizatiri su *alošterični enzimi* sa *sigmoidnim dijagramima* odnosa brzine reakcije V i koncentracije supstrata c(S); time se oni razlikuju od enzima sa *hiperboličnim dijagramima* te zavisnosti prema Michaelis-Mentenovoj jednačini (5-16). Kod alošteričnih enzima jedno aktivno mesto u enzimu može delovati na drugo aktivno mesto istog molekula. Mogući ishod tog međudelovanja podjedinica istog molekula jeste vezivanje supstrata koje postaje kooperativno i daje sigmoidni dijagram zavisnosti V od c(S). Osim toga, aktivnost alošteričnih enzima može se menjati takozvanim regulacijskim molekulima vezanim za nekatalitička mesta. Zbog navedenog se na alošterične enzime ne može primeniti Michaelis-Mentenova jednačina (5-16). Uporedni prikaz kinetike enzimske reakcije sa hiperboličnim i sigmoidnim dijagramom dat je na slici 5-17.



Slika 5-17.  
Kriva zasićenja  
**(a)** po Michaelis-Menten-u i  
**(b)** sigmoidna kriva

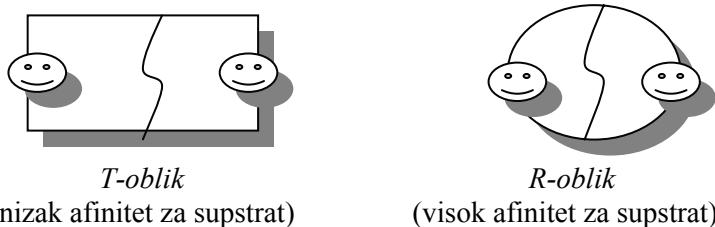
Postoji više prepostavki koje objašnjavaju mehanizam alošterične regulacije tj. međusobnog pretvaranja neaktivnog i aktivnog oblika alošteričnih enzima.

Jacques Monod, Jeffries Wyman i Jean-Pierre Changeux, su 1965 godine

predložili elegantan pristup tumačenju delovanja alošteričnih enzima i uobičili ga u formi dva modela:

- ◆ **skladnim (harmoničnim) modelom i**
- ◆ **sekvencijskijalni model**

Primenimo skladni model na alosterični enzim sastavljen od dve jednakе podjedinice sa po jednim aktivnim mestom. Prepostavimo da podjedinica može postojati u jednoj od dve konformacije, nazvane R i T. Stanje R (relaksirano) ima veliki afinitet za supstrat, a stanje T (napeto) nizak (slika 5-18).



Slika 5-18. Shematski prikaz T i R konformacije alosteričnih enzima

Oblici R i T mogu preći jedan u drugi. Važna prepostavka ovog prelaza jeste isto konformaciono stanje obeju podjedinica zbog očuvanja simetrije dimera. RR i TT su dopuštene konformacije, ali RT nije dopuštena. Dva dopuštena stanja bez supstrata označavaju se sa  $T_0$  i  $R_0$ , a L je odnos njihovih koncentracija:

$$R_0 \leftrightarrow T_0 \quad (5-39)$$

$$L = c(T_0)/c(R_0) \quad (5-40)$$

Prepostavimo zbog jednostavnosti da se supstrat ne veže za T-konformacioni oblik enzima. R-stanje dimera može vezati jedan ili dva molekula supstrata (ti oblici označavaju se sa  $R_1$ , odnosno  $R_2$ ):



$$K_R = \frac{2c(R_0)c(S)}{c(R_1)} = \frac{c(R_1)c(S)}{2c(R_2)} \quad (5-43)$$

U navedenom modelu je tzv. mikroskopska konstanta disocijacije ( $K_R$ ) za vezivanje prvog i drugog molekula supstrata na R-oblik dimernog enzima jednak. Faktor 2 u jednačini 5-43 potiče od činjenice da se supstrat može vezati na svako od dva mesta na  $R_0$  i tako dati  $R_1$ , kao što se može i otpustiti sa svakog od dva mesta u  $R_2$ , čime opet nastaje  $R_1$ .

Često je potrebno izraziti zavisnost *frakcijskog zasićenja* Y od koncentracije supstrata (jednačina 5-44):

$$Y = \frac{(zauzetamesta)}{(ukupnamesta)} = \frac{c(R_1) + 2c(R_2)}{2(c(T_0) + c(R_0) + c(R_1) + c(R_2))} \quad (5-44)$$

Uvrštavanjem jednačina 5-39 do 5-43 u jednačinu 5-44 dobija se izraz za Y:

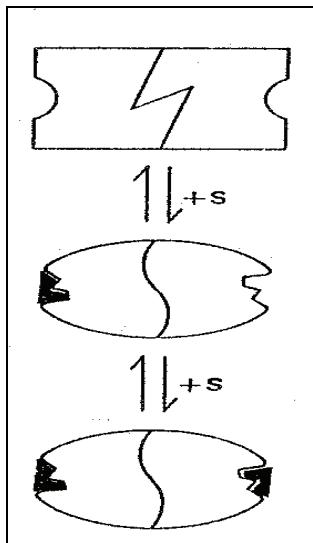
$$Y = \left( \frac{c(S)}{K_R} \right) \frac{1 + c(S)/K_R}{L + (1 + c(S)/K_R)^2} \quad (5-45)$$

Prikažimo grafički jednačinu 5-45 sa  $K_R=10^{-5}$  mol/L i  $L=10^4$ . Takav je dijagram Y u zavisnosti od  $c(S)$  sigmoidan, a ne hiperboličan (slika 5-21). Drugim rečima, *vezivanje supstrata je kooperativno*.

Ako je broj izmena enzima po aktivnom mestu isti za kompleks ES u  $R_1$  i  $R_2$  tada će i dijagram brzine reakcije prema koncentraciji supstrata biti sigmoidan jer je:

$$V = Y V_{\max} \quad (5-46)$$

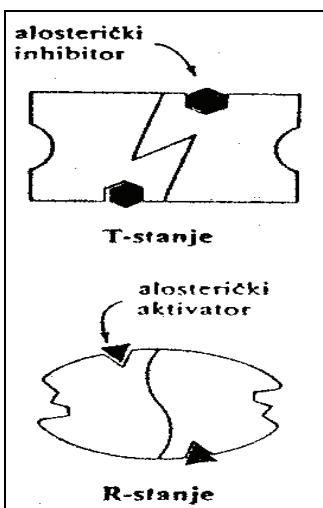
Prikažimo taj proces vezivanja slikom 5-19. Bez supstrata gotovo su svi molekuli enzima u obliku T. Tačnije, u gornjem primeru na svakih  $10^4$  molekula enzima u obliku T postoji samo jedan molekul u obliku R. Dodatkom supstrata pomera se ta konformacijska ravnoteža prema obliku R, jer se supstrat veže samo na taj oblik. Prema osnovnom postulatu modela kada se supstrat veže na jedno mesto, drugo mesto istog enzimskog molekula takođe mora biti u obliku R, tj. prelaz iz T u R i obrnuto je *skladan, harmoničan (concerted)*. Vidimo dakle da ideo enzimskih molekula u obliku R progresivno raste sa dodavanjem supstrata, pa je vezivanje supstrata *kooperativno*. Kada se aktivna mesta potpuno zasite, svi su enzimski molekuli u R konformaciji.



Slika 5-19.

*Skladni (harmonični) model* kooperativnog vezivanja supstrata na alosterični enzim. Niskoafinitetni oblik TT "preskače" nakon vezivanja prvog molekula supstrata u visokoafinitetni oblik RR (L.Stryer, *Biochemistry 3<sup>rd</sup> ed.*, W.N.Freeman and Company, New York, 1988. str.104, sl.6.21).

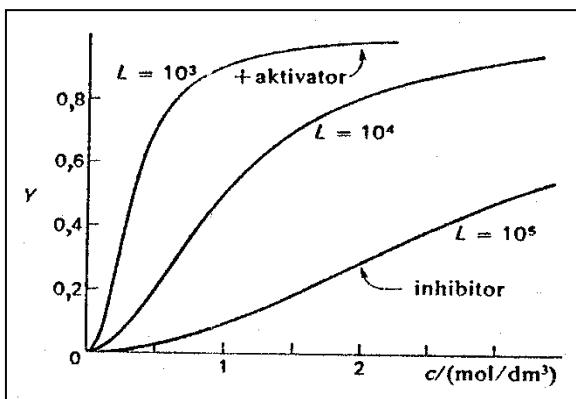
Napred navedenim modelom mogu se lako razjasniti učinci *alosteričnih efektora* (aktivatora i inhibitora). Alosterični inhibitor se veže prvenstveno na oblik T, a alosterični aktivator prvenstveno na oblik R enzima (slika 5-20).



Slika 5-20.

U skladnom modelu alosterični inhibitor (šestougaon) stabilizuje stanje T, a alosterični aktivator (trougao) stabilizuje konformacioni oblik R (L.Stryer, *Biochemistry 3<sup>rd</sup> ed. W.N.Freeman and Company, New York, 1988. str.105, sl.6.22).*

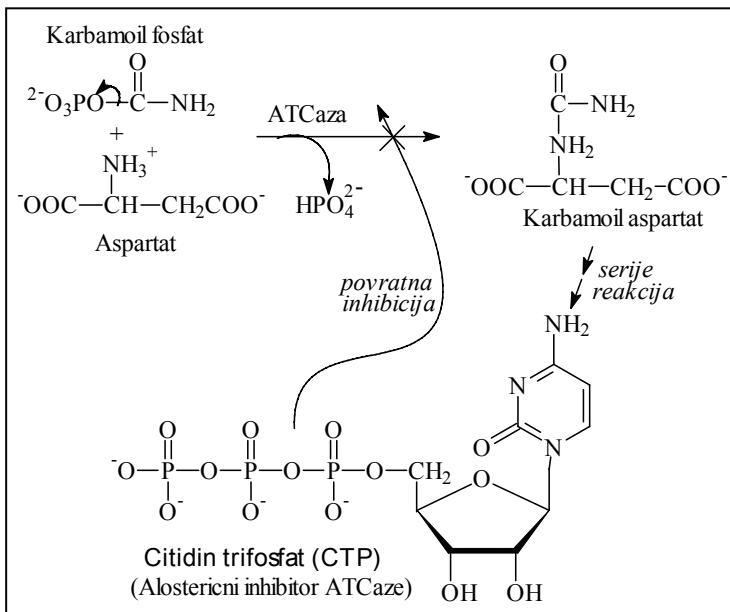
Zbog toga alosterični inhibitor pomera konformacionu ravnotežu  $R \leftrightarrow T$  prema T, a alosterični aktivator prema obliku R. Ti se efekti mogu kvantitativno izraziti promenom alosterične ravnotežne konstante L koja je promenljiva u jednačini 5-45. Alosterični inhibitor povećava L, a alosterični aktivator smanjuje L. Ti su učinci prikazani na slici 5-21 dijagromom zavisnosti Y od c(S) za vrednosti  $L = 10^3$  (uz aktivator),  $L = 10^4$  (bez aktivatora i inhibitora) i  $L = 10^5$  (uz inhibitor). Frakcijsko zasićenje Y pri svim vrednostima c(S) smanjuje se u prisustvu inhibitora, a povećava u prisustvu aktivatora.



Slika 5-21.

Frakcijsko zasićenje Y kao funkcija koncentracije supstrata prema skladnom modelu (jednačina 5-38). Prikazani su i uticaji alosteričnog aktivatora i inhibitora

Alosterična inhibicija ima posebno značenje kod *retroaktivne inhibicije* (eng. feedback inhibition) sekvenčijalnih metaboličkih reakcija, kao što je enzimska reakcija katalizovana *aspartat-karbamoil-transferazom* (AKTaza; EC 2.1.3.2) (slika 5-22). Ova reakcija je prva u nizu reakcija koje vode formiranju citidin-trifosfata (CTP) i uridin-trifosfata (UTP), koji su neophodni u biosintezi nukleinskih kiselina. U navedenoj reakciji kondenzacijom karbamoil-fosfata i aspartata uz defosforilaciju enzimom aspartat-karbamoil-transferazom stvara se karbamoil-aspartat kao prvi intermedijer koji u nizu sekvenčijalnih reakcija koje slede daje krajnji proizvod CTP. Nastali CTP kao značajan metabolit u navedenoj reakciji predstavlja tipičan primer reakcije inhibirane proizvodom.



Slika 5-22. CTP kao allosterični inhibitor AKTaze.

Citidin-trifosfat, kao krajnji proizvod serije reakcija povratno inhibira AKTazu, kao što je pokazano i samom reakcijom.

Važno je, na ovom mestu, razgraničiti dva pojma allosteričnih efektora. Pojam *homotropni efektori* odnosi se na allosterične interakcije identičnih liganada (vezanih molekula ili jona), dok su *heterotropni efektori* interakcije različitih liganada. Kooperativno vezivanje supstrata na enzim u prethodnom primeru je homotropni efektor. Nasuprot tome, učinak aktivatora ili inhibitora na vezivanje supstrata je heterotropni efektor, jer dolazi do interakcija različitih vrsta molekula.

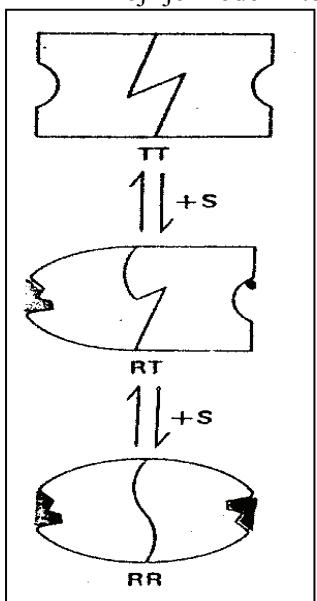
**Sekvencijski model allosteričnih interakcija** - je postavio Danijel Koshland mlađi. Za tumačenje najjednostavnijeg oblika tog modela pretpostavlja se da postoje samo dva konformaciona oblika enzima (R i T) koje može zauzeti bilo koja podjedinica:

- ◆ supstrat menja oblik podjedinice za koju se vezao (konformacije drugih podjedinica u enzimu ne menjaju se znatno) i
- ◆ konformaciona promena izazvana vezivanjem supstrata na jednu podjedinicu može povećati ili smanjiti afinitet vezivanja za supstrat drugih podjedinica istog enzimskog molekula.

Na slici 5-23 prikazan je sekvencijski model procesa vezivanja u allosteričnom enzimu. Vezivanje je kooperativno ako je afinitet oblika RT za supstrat veći od afiniteta oblika TT.

Jednostavni *sekvencioni model* razlikuje se od *skladnog modela* u nekoliko svojstava. *Prvo*, u sekvencionom modelu se ne prepostavlja ravnoteža stanja R i stanja T. Taj model prepostavlja da upravo vezivanje supstrata izaziva konformacioni prelaz iz T u R. *Drugo*, konformacione promene različitih podjedinica enzima iz stanja T u stanje R odvijaju se u nizu, a ne harmonično. Hibridni oblik RT u sekvencionom modelu ima značajnu ulogu, a u skladnom nije moguć. Skladni model prepostavlja da je za interakciju podjedinica u oligomernim proteinima bitna simetrija i zato traži da se pri alosteričnim prelazima to svojstvo sačuva. Nasuprot tome, sekvencionim model prepostavlja da podjedinice mogu delovati jedna na drugu čak i u različitim konformacionim stanjima. Na kraju, ti se modeli razlikuju i po tome što su u skladnom modelu homotropne interakcije nužno pozitivne, a u sekvencionom modelu mogu biti ili pozitivne ili negativne. Hoće li se drugi molekul supstrata vezati za alosterični enzim jače ili slabije od prvog, zavisi od nastale konformacione promene oblika enzima prouzrokovane vezivanjem prvog molekula supstrata.

Koji je model interakcija verovatniji? Nekim alosteričnim proteinima više odgovara skladni model, a za druge je sekvencionim primenljiviji. No postoji grupa enzima koju ne zadovoljava ni jedan od ova dva modela. Pretpostavka da za te enzime postoje samo dva značajna konformaciona stanja (R i T) previše je ograničena. Za razumevanje alosteričnih osobina tih enzima potrebni su kompleksniji modeli.



Slika 5-23.

*Sekvencioni model* kooperativnog vezivanja supstrata na alosterični enzim. Prazno aktivno mesto u obliku RT ima veći afinitet vezivanja supstrata nego mesta u obliku TT.

**2. *Kovalentno modulirani (promenjeni) regulatorni enzimi*** – Kod ove grupe regulatornih enzima, međusobno pretvaranje neaktivnih i aktivnih oblika vrši se kovalentnim promenama (moduliranjem) specifične grupe u molekulu enzima pomoću drugog enzima. Kovalentna modulacija je fiziološki

mehanizam za "uključivanje" i "isključivanje" enzima. Modifikacijom proteinskog dela molekula (npr. fosforilacijom) enzim može izgubiti svoju aktivnost. Enzim može ponovo postati aktivan ako se fosfatna grupa odstrani tj. enzim se demodifikuje. Kovalentna modulacija regulatornih enzima može se postići ne samo prenošenjem fosfatne grupe sa ATP na enzim, kao što je slučaj kod fosforilaza. Takođe može se vršiti i prenošenjem adenil grupe sa ATP na enzim. Primer navedenog tipa je regulacija glutamin sintetaze.

## 5.5. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Većina enzima poseduje jedno ili više trivijalnih imena koja se izvode na četiri načina i to prema nazivu:

- ◆ *supstrata*,
- ◆ *reakcije*,
- ◆ *supstrata i reakcije ili*
- ◆ *nečega drugog (neinformativni nazivi)*.

Trivijalni nazivi nekih enzima koji su izvedeni prema prethodno opisanim načinima dati su u tabeli 5-7.

Tabela 5-7. Trivijalni nazivi nekih enzima.

Nazivi nekih enzima	Supstrat i reakcija
<b>Ime substrata + aza</b>	
fumaraza	fumarna kiselina
peroksidaza	peroksid
saharaza	saharoza
glukoza-6-fosfataza	glukoza-6-fosfat
<b>Ime reakcije + aza</b>	
dekarboksilaza	dekarboksilacija
dehidrogenaza	dehidrogenacija
esteraza	esterifikacija
oksidaza	oksidacija
reduktaza	redukcija
<b>Ime substrata i reakcije + aza</b>	
alkohol-dehidrogenaza	oksidacija alkohola
glukozo-oksidaza	oksidacija glukoze
aspartat-sintaza	sinteza aspartata
<b>Neinformativna imena</b>	
katalaza	razgradnja peroksida
papain	hidroliza proteina

Klasifikacija enzima započeta je još 1961. godine. Tada je Internacionala unija za biohemiju (IUB) uvela katalog za nekoliko hiljada enzima čije su funkcije poznate. Enzimi su u katalogu klasifikovani po numeričkom sistemu u šest glavnih grupa. Unutar svake grupe enzimi su podeljeni u podgrupe (tabela 5-8).

Tabela 5-8. Klasifikacija enzima prema katalogu IUB.

Grupa	Podgrupa	Podpodgrupa	Vrsta enzima
<b>1. Oksidoreduktaze</b> (Katalizuju prenošenje elektrona sa jednog molekula na drugi).	1. deluje na = CH-OH 2. deluje na aldehidnu i keto-grupu donora	1. akceptor NAD ili NADH 2. akceptor O <sub>2</sub>	1. alkohol-dehidrogenaza 2. glukozooksidaza
<b>2. Transferaze</b> (Enzimi koji prenose funkcionalne grupe. Oni odstranjuju grupe sa jednog molekula i vezuju ih za drugi molekul).	1. prenos C-1 grupe 2. prenos grupa koje sadrže azot	1. metil-transferaze 2. amino-transferaze	1. guanidinacetat-metiltransferaza 2. aspartat-aminotransferaza
<b>3. Hidrolaze</b> (Enzimi koji razlažu biomolekule pomoću vode).	1. hidrolizuju estarske veze 2. hidrolizuju peptidne veze	1. karboksil-esteraza 2. fosfodiesteraza 3. SH-proteinaza	1. glukoza-6-fosfataza 2 fosfo-diesteraza 3. papain
<b>4. Liazе (sintaze)</b> (Katalizuju reakcije odstranjivanja grupe sa supstrata, ali ne hidrolizuju supstrat).	1. ≡C-C≡ liaze	1. karboksilaze 2. aldehyd-liazе	1. piruvat-dekarboksilaza 2. aldolaza
<b>5. Izomeraze</b> (Katalizuju reakcije izomerizacije, odnosno, strukturne, geometrijske i stereoizomerne promene).	1. racemizacije i epimerizacije	1. epimeraze ugljenih hidrata	1. ribuloza-5-fosfat epimeraza

<b>6. Ligaze (sintetaze)</b> (Katalizuju povezivanje dva molekula uz učešće ATP).	1. stvaranje $>\text{C}=\text{O}$ veze	1. aminoacil-tRNA-sintaza	1. tirozil-tRNA-sintaza
--	--	---------------------------	-------------------------

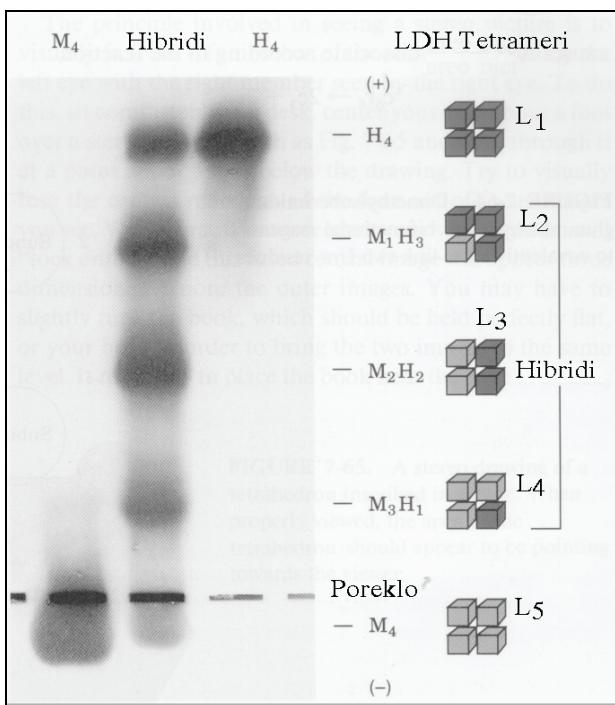
Pored trivijalnog naziva za svaki enzim je uveden *radni naziv* i *šifra (kodni broj ; EC)* enzima, a čine ga 4 broja.

Prvi broj označava tip reakcije ili *grupu*, kojoj enzim pripada drugi vrstu katalizovane reakcije (npr. kod oksidoreduktaza drugi kodni broj označava tip redukcionog ekvivalenta), a treći detaljnije objašnjava katalizovanu reakciju i daje vrstu akceptora. Za drugi kodni broj još se kaže da označava *podgrupu*, a treći *podpodgrupu* enzima. Četvrti kodni broj definiše supstrat, te se označava još i individualnim brojem enzima. Klasifikacija enzima po kodnim brojevima od 1 do 6 data je u tabeli 5-8. Danas se u biohemijskoj literaturi pored imena enzima obavezno mora naznačiti i enzimska klasifikacija sa kodnim brojevima (npr. *alkohol-dehidrogenaza*; EC 1.1.1.1).

## 5.6. Izoenzimi i multienzimski kompleksi

**Izoenzimi** (izozimi) - su složeni globularni enzimi izgrađeni iz dva ili više oblika jednog enzima iste supstratne specifičnosti koji katalizuju istu reakciju. Tako npr., kombinovanjem dve osnovne podjedinice (A i B) u različitim odnosima nastaju tetramerni enzimi koji se razlikuju u primarnoj i kvaternarnoj strukturi, pH i temperaturnom optimumu, izoelektričnoj tački, molekulskoj masi, naelektrisanju i imunohemiskim osobinama. Izoenzimi nastaju kao posledica kodiranja podjedinica globularnog proteina različitim genima. Studija izoenzima se obavlja uz pomoć metoda proteinske hemije kao što su gel filtracija, elektroforeza i dr.

Nomenklatura izoenzima je zasnovana na njihovim trivijalnim nazivima uz uvođenje dopunskog obeležavanja slovima abecede ili brojevima. Prvi izolovani izoenzimi bili su NAD ili NADP-zavisne-laktat- *dehidrogenaze* (EC 1.1.1.27), (LDH), koja u glikolizi katalizuje oksidaciju mlečne kiseline u pirogroždanu kiselinu. Molekulska masa LDH je 134.000 i izgrađen je iz 4 podjedinice, sa  $M_r$  33.500. Prema strukturi podjedinice ovog enzima razlikuju se dva strukturna tipa (koji su kodirani različitim genima) i označavaju se slovima M i H. Hibridizacijom ovih oligomera nastaje pet elektroforetski razdvojenih izozima koji pokazuju da je LDH tetramer (slika 5-25).



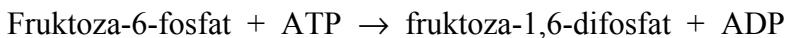
Slika 5-25.

Elektroforeogram laktat-dehidrogenaze. M i H su oblici LDH koji imaju različitu pokretljivost. (D. Voet, J. Voet, Biochemistry 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1995. str. 183; sl. 7-62).

Prva dva izoenzima L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub> pri elektroforezi putuju ka anodi (anodne frakcije), poslednja dva L<sub>4</sub> i L<sub>5</sub> ka katodi (katodne frakcije) dok L<sub>3</sub> zauzima srednji položaj na elektroforeogramu. Pored toga što se izoenzimi

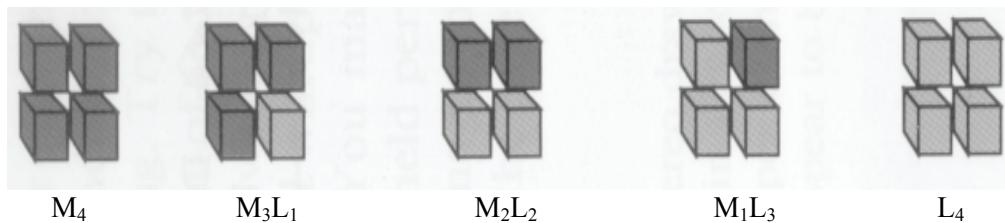
razlikuju po elektrofo-retskoj pokretljivosti i nanelektrisanju navedene frakcije izoenzima se razlikuju i po biološkoj funkciji. Anodne frakcije katalizuju pretvaranje pirogrođane kiseline u aerobnim uslovima, a katodne u anaerobnim, dok srednja frakcija i u jednim i u drugim.

Reakcija u kojoj se fruktoza-6-fosfat fosforilacijom prevodi u fruktozu-1,6-difosfat je jedna od ključnih u metabolizmu ćelije:



Fosforilovanje fruktoze je visoko egzogena i ireverzibilna reakcija koju katalizuje *fosfruktokinaza* (EC 2.7.1.11) čija je uloga u glikolizi ključna.

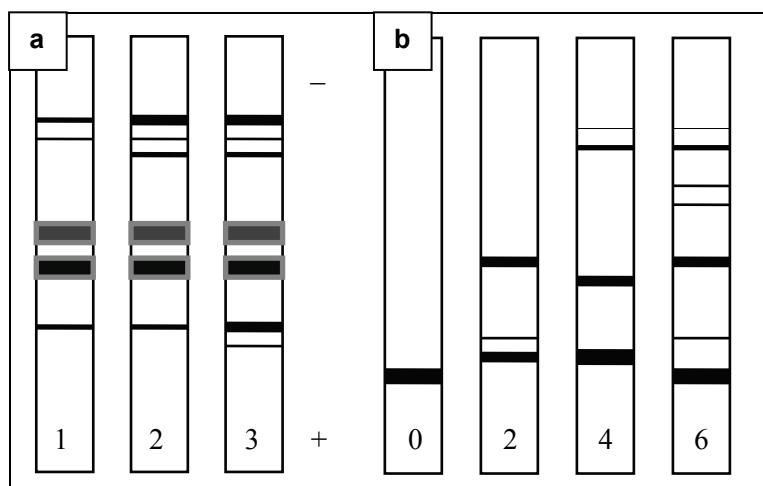
**Fosfruktokinaza** - je tetramer (drugacije rečeno, to je enzim izgrađen iz 4 podjedinice) sa alosteričnim tipom interakcija. Ovaj enzim egzistira u dva neznatno različita oblika označena kao M i L, kao što su moguće i različite kombinacije monomera ovog enzima (kao npr. M<sub>3</sub>L<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>L<sub>3</sub>) kada grade tetramere (slika 5-26). Razlika u aminokiselinskom sastavu ovih podjedinica je veoma mala tako da dva izoenzima mogu biti odvojena jedan od drugog i elektroforezom.



Slika 5-26. Mogući izoenzimi fosfofruktokinaze.

Esteraza iz kukuruza je izgradjena iz dve različite podjedinice kodirane različitim genima. Označavaju se  $E_1$  i  $E_2$  pa se njihovom kombinacijom mogu dobiti tri izoenzima i to:  $E_1E_1$ ,  $E_1E_2$  i  $E_2E_2$ .

Proučavanje enzima biljaka je postalo veoma intenzivno kako u genetičkim studijama tako i u selekciji. Utvrđeno je da se izoenzimski sastav menja u toku nicanja semena i da je značajan za rastenje i razviće biljaka. Izoenzimska slika peroksidaze se menja i nakon infekcije biljaka pri čemu dolazi do povećanja broja izoenzimskih traka sa 4 na 9. U toku nicanja kukuruza broj izoenzimskih traka glutamat-dehidrogenaze se povećava od 5 do 9 za 72 časa. Slični rezultati su dobijeni i određivanjem izoenzimskog sastava glutamat-dehidrogenaze u tikvi (slika 5-27).



Slika 5-27.

Izenzimi peroksidaze iz kukuruza (a): 1-suvo seme, 2-nakvašeno seme 48 h, 3-nakvašeno seme kukuruza 72 h i glutamat-dehidrogenaze iz tikve (b): 0-seme, i 2,4 i 6 dan nakon nicanja.

Spektar izoenzima se može izmeniti u različitim periodima ontogeneze kao i faktorima spoljašne sredine te je njihovo određivanje našlo primenu u biohemijskoj dijagnostici od interesa za biljnu proizvodnju.

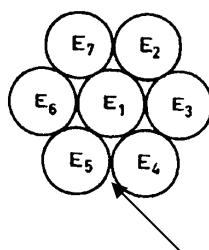
Pored toga što enzimi u intaktnoj biljnoj ćeliji katalizuju reakcije samostalno, ima i slučajeva kada se oni udružuju u aggregate koji se nazivaju *multienzimski kompleksi*.

**Multienzimski kompleks** - predstavlja grupu enzima udruženih zajedno u jednu asocijaciju (mozaik), koji katalizuje sekvencu metaboličkih reakcija kao što je pokazano jednačinom 5-47.

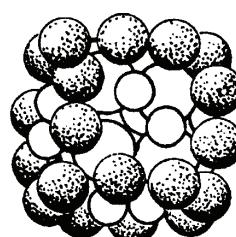


Primer multienzimskog kompleksa je sinteza masnih kiselina koja se odvija u citoplazmi uz učešće 7 udruženih enzima tako što proizvod jedne reakcije postaje supstrat za drugu reakciju. Takav kompleks iz kvasca ima relativnu molekulsku masu od  $2.3 \times 10^4$ , i sastoji se iz samo dva tipa polipeptidnih lanaca, a svaki od njih je kodiran jednim genom. Podjedinica A ( $M_r=185.000$ ) sadrži acil-nosač-protein, kondenzirajući enzim i  $\beta$ -ketooacil-reduktazu, dok podjedinica B ( $M_r=175.000$ ) sadrži acetil-transacilazu, malonil-transacilazu,  $\beta$ -hidroksiacil-dehidratazu i enoil-reduktazu. Sintetaza masnih kiselina sisara ( $M_r=400.000$ ) takođe se sastoji iz dve vrste podjedinica, sličnih onima kod kvasca. Zapravo se mnogi eukariotski multienzimski kompleksi sastoje od multifunkcionalnih proteina, u kojima su različiti enzimi kovalentno povezani u samo jedan polipeptidni lanac. Na taj je način sinteza različitih enzima u potpunosti koordinirana, što predstavlja veliku prednost. Osim toga multienzimski kompleks sastavljen od kovalentno vezanih enzima je mnogo stabilniji od kompleksa stvorenog nekovalentnim udruživanjem.

Multienzimski kompleksi mogu biti izgradjeni od 2-20 podjedinica. Utvrđeno je da se multienzimski kompleks sinteze masnih kiselina kod kvasca i životinja sastoji iz 7 podjedinica koje su povezane u obliku grozda (slika 5-28 i 5-29).

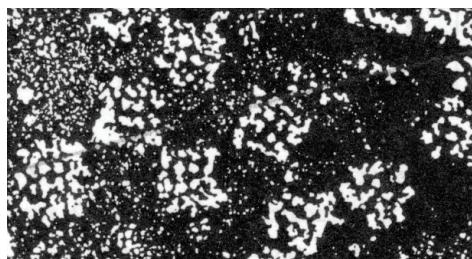


Slika 5-28 Shematski prikaz multienzimskog kompleksa sinteze masnih kiselina.



Slika 5-29.  
Model multienzimskog kompleksa piruvat-dehidrogenaze.

Na slici 5-29 dat je model multienzimskog kompleksa piruvat-dehidrogenaze koja ima ukupno 60 subjedinica. Piruvat-dehidrogenaza uvećana 520.000 hiljada puta i posmatrana na elektronском mikroskopu data je na slici 5-30.



Slika 5-30.  
Elektronski snimak enzima  
piruvat-dehidrogenaze.

Organizaciona struktura biosinteze masnih kiselina kod kvasaca i viših organizama povećava uspešnost celokupnog procesa, jer se međuproizvodi

u reakciji direktno prenose sa jednog aktivnog mesta enzima na drugo. Reaktanti se ne razređuju u citosolu. Nadalje, oni se medusobno ne moraju pronalaziti difuzijom, tj. nasumice. Još jedna prednost ovakvog multienzimskog kompleksa jeste u tome što su kovalentno vezani međuproizvodi izdvojeni iz okoline i tako zaštićeni od drugih mogućih reakcija.

Multienzimski kompleksi su veoma oskudno proučeni kod biljaka i nije još poznato kako se reguliše agregacija podjedinica.

## 5.7. Enzimi biljaka

Biljke su bogatije u enzimima od čoveka i životinja što im omogućuje da sintetizuju više hiljada jedinjenja kako primarnih tako i sekundarnih biomolekula. Zbog navedenog se smatra da 90% ukupnih globularnih proteina biljaka čine enzimi. Najveći broj enzima u biljnoj ćeliji je organizovan po organelama, a samo mali broj "pliva" bez reda. Svaka organela pojedinačno sadrži enzime koji joj omogućavaju da obavi funkciju za koju je "zadužena". Najbogatije enzimima su mitohondrije. One imaju i do 25% ukupnih ćelijskih enzima koji katalizuju veoma značajne biohemijske reakcije u metabolizmu ugljenih hidrata, lipida, organskih kiselina i dr. jedinjenja. U zavisnosti od funkcije koju obavljaju mogu biti locirani u spoljnim ili unutrašnjim membranama mitohondrija. Najznačajniji enzimi ostalih organeli su enzimi sinteze nukleinskih kiselina (jedro), enzimi sinteze proteina (ribozomi), enzimi anaerobne razgradnje skroba (citoplazma) itd.

Kakva će biti aktivnost pojedinačnih enzima zavisiće od niza faktora kao npr. vrste i starosti biljke, načina ishrane, vodnog režima, hemijskog sastava zamljišta i ekoloških faktora koji mogu delovati kao aktivatori ili inhibitori itd.

Ranije je bilo naglašeno da biljna ćelija "sadrži" oko hiljadu enzima. Od tog mnoštva u ovom udžbeniku biće obradjeni samo neki koji se intenzivno istražuju u

raznim biljnim vrstama. Posebno su značajni oni čije se aktivnosti koriste kao biohemski parametri za unapredjenje biljne proizvodnje i to:

- ◆ enzimi metabolizma azota,
- ◆ enzimi metabolizma ugljen-dioksida,
- ◆ enzimi "gasioci" kiseoničnih radikala
- ◆ amilaze,
- ◆ enzimi regulatori temperaturnog stresa i dr.

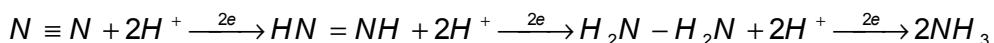
**Enzimi metabolizma azota ( $N_2$ ,  $NO_3^-$ )** - čine grupu enzima koji katalizuju reakcije fiksacije i asimilacije azota do njegovog ugradjivanja u aminokiseline (nitrogenaza, nitrat-reduktaza, nitrit-reduktaza, glutamin-sintetaza, glutamat-sintaza, glutamat-dehidrogenaza i transaminaze).

***Nitrogenaza (NG, EC 1.18.2.1)*** - je grupno-specifični enzim koji katalizuje ATP-zavisne redukcije više supstrata sličnih molekulskih masa kao npr.  $N_2$ , azide, okside azota, cijanide i acetilen. Za biljke je od posebnog značaja supstrat  $N_2$  u kojem nitrogenaza katalizuje raskidanje trostrukе veze u molekulu  $N_2$  ( $N≡N$ ). Na taj način nitrogenaza omogućuje da se "rudnik" N iz atmosfere (čije su rezerve oko  $3.75 \times 10^{15}$  tona) eksploatiše. No i pored navedenog iz atmosfere se koristi samo oko 10% atmosferskog N<sub>2</sub>, a razlika u potrošnji se dopunjaje veoma skupim azotnim djubrivismima.

Nitrogenaza je dimerni enzim izgradjen iz proteina I i II zastupljenih u odnosu 1:2. Protein I je Mo-Fe protein (molibden-feredoksin) izgradjen iz dve α- i dve β-subjedinice tzv.  $\alpha_2\beta_2$ -subjedinice od kojih svaka sadrži Mo. Mr proteina I je 200.000 - 270.000. Protein II je Fe-protein izgradjen iz dve α-subjedinice ( $\alpha_2$ ), a Mr ovog proteina je oko 60.000. Aktivnost nitrogenaze je uslovljena udruženim delovanjem oba proteina.

Nitrogenaza se nalazi u nodulama (kvržicama) leguminoznih biljaka i čitavom nizu mikroorganizama kao npr. u zemljšnjim bakterijama (*Klebsiela clostridium*), nekim aerobima (*Azotobacter*) i "bakteroidima" (*Rhizobium*) koje se razvijaju na korenovim sistemima biljaka. I pored toga što se samo 10% atmosferskog azota fiksira na ovaj način smatra se da se zemljšta godišnje fiksacijom obogaćuju za 175 miliona tona azota. Aktivnost nitrogenaze uslovljena je količinom Fe i Mo u zemljštu.

Redukcija molekulskog azota do amonijaka se odvija uz učešće 6 elektrona koji se prenose od redukovanih feredoksina (nastalog fotosintezom ili respiracijom) do amonijaka po sledećom redupcionom putu:

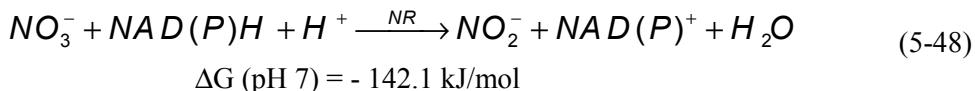


Reakcija je moguća uz učešće ATP koji povećava redukcionu potencijal. Prva proučavanja nitrogenaze započeta su 1970. na travama, a potom su se proširila i na druge leguminozne biljke kao npr. na *Alfaalfa* i *Phaseolus*. Pre petnaestak

godina započeta su istraživanja azotofiksacije i kod neleguminoznih biljaka (pšenica, repa i sl.) inokulisanih sa raznim simbiotskim i asimbiotskim azotofiksatorima. Utvrđeno je da se u njima aktivnost nitrogenaze povećava zavisno od biljne vrste i soja mikroorganizma.

Zbog navedenog danas su veoma aktuelna istraživanja vezana za unošenje azotofiksirajućeg Nif-gena u biljke koje ga nemaju kako bi se u njima sintetizovala nitrogenaza.

**Nitrat-reduktaza (NR, EC 1.6.6.1)** - je oksido-reduktaza koja katalizuje prvu fazu redukcije nitrata do nitrita (jednačina 5-48). Izvori elektrona za ovu reakciju mogu biti feredoksin i redukovani NAD(P). Kod biljaka prvi davalac elektrona je NAD(P)H. Elektroni se od NAD(P)H prenose preko FAD, citohroma b<sub>557</sub> na krajnji akceptor elektrona Mo koji se redukuje. Kod većine biljaka ovaj enzim je lociran u citoplazmi. Nitrat-reduktaza je prvi put 1953. godine identifikovana i karakterisana u ekstraktima viših biljaka. Od tog vremena vršena su mnoga istraživanja strukture i katalitičkih osobina enzima. Danas se zna da NR predstavlja jedan multi-komponentni enzimski kompleks, molekulske mase od 200 do 300 kDa, koji sadrži flavin (FAD), hem (cit b<sub>557</sub>) i Mo kao komponente strukture esencijalne za aktivnost enzima.



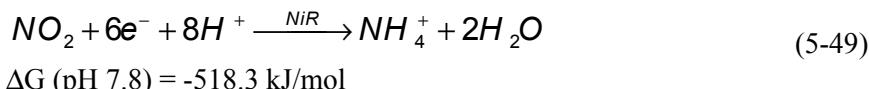
Redukcija nitrata se može vršiti u različitim delovima biljaka i to listovima (pšenica, kukuruz, i dr. ratarske kulture) ili korenju (jabuka). Procesom reduktivne asimilacije azota može se redukovati više od  $2 \times 10^{10}$  tona azota godišnje. Redukcija nitrata je energetski veoma ekonomičan proces jer nije potrebno učešće ATP.

Nitrat-reduktaza se koristi za merenje tzv. *asimilacionog kapaciteta* biljaka. Smatra se da se aktivnost NR povećava kod visokoprinosnih ratarskih kultura povišenjem količine azota do odredjene koncentracije, a kod niskoprinosnih samo u početku vegetacije.

Iako je nitrat-reduktaza enzim koji se indukuje supstratom njegova aktivnost može biti supresirana i različitim ekološkim faktorima kao herbicidima, teškim metalima, UV-zračenjima i sl.

**Nitrit-reduktaza (Nir, EC 1.6.6.4)** - je oksido-reduktaza koja katalizuje redukciju nitrita do amonijaka (jednačina 5-49). Mr ovog enzima se kreće od 60 do 70 kDa, a prostetične grupe su Fe-centar i sirohem (Fe-tetrahidroporfirin izobakteriochlorinskog tipa) sa 11 karboksilnih grupa u bočnom lancu koje vezuju supstrat. Nitrit-reduktaza je kod većine biljaka locirana u hloroplastima, a kod kukuruza je dokazana i u mezofilnim ćelijama. Pominje se njeno nalaženje kod nekih biljaka i u spoljnoj strani tilakoidne membrane. Izvor elektrona za redukciju

nitrita u fotosintetičkim tkivima biljaka je redukovani *ferredoksin* (*Fd*), što upućuje na zaključak da su redukcija nitrita i fotosinteza dva medjusobno vezana procesa.

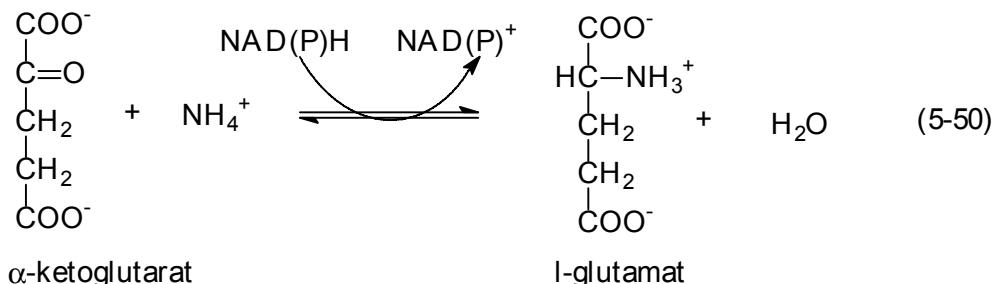


Prenos elektrona od redukovanih *Fd* do nitrita u fotosintetičkom tkivu viših biljaka se odvija posredstvom elektron-transportnog lanca nitrit-reduktaze. Proces konverzije nitrita do amonijaka je stehiometrijski, jer se ne stvaraju slobodni intermedijeri u *in vivo* redukciji nitrita.

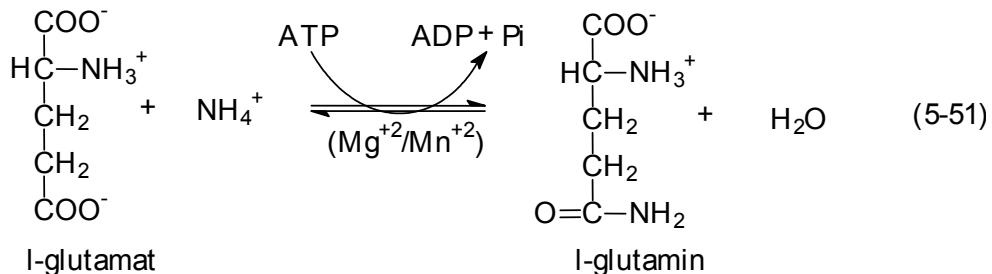
Kako je NiR, slično NR, adaptibilan enzim i sintetiše se samo u prisustvu supstrata to ima osnova za tvrdnju o širokoj rasprostranjenosti nitrit-reduktaze u biljkama, kao što postoje i izuzeci, jer u nekim segmentima genetski potencijal biljaka za sintezi NiR može biti inhibiran.

**Glutamat-dehidrogenaza (GDH, EC 1.4.1.2)** - katalizuje sintezu glutamata reduktivnom aminacijom  $\alpha$ -ketoglutarata sa amonijakom i redukovanim nikotinamidskim dinukleotidom (NADH ili NADPH) jednačina 5-50. To je dimerni enzim sa Mr 210-250 kDa. Disociacionom elektroforezom (SDS) GDH iz proklijalog semena graška su dobijene podjedinice GDH sa molekulskom masom od 51 kDa, a iz proklijalog semena ječma su iznosile 46 kDa. Izoenzimi GDH su konformeri čija regulacija sastava podjedinica heksamera može da se javi na nivou sinteze podjedinica ili na nivou njihovog spajanja u aktivni heksamer. Lokalizovan je najvećim delom u mitohondrijama i hloroplastima.

Mnogobrojni dokazi ukazuju na to da je GDH metaloprotein, da je dimer i da je grupno specifičan enzim, jer katalizuje reduktivnu aminaciju mnogih ketokiselina kao i deaminaciju glutamata.



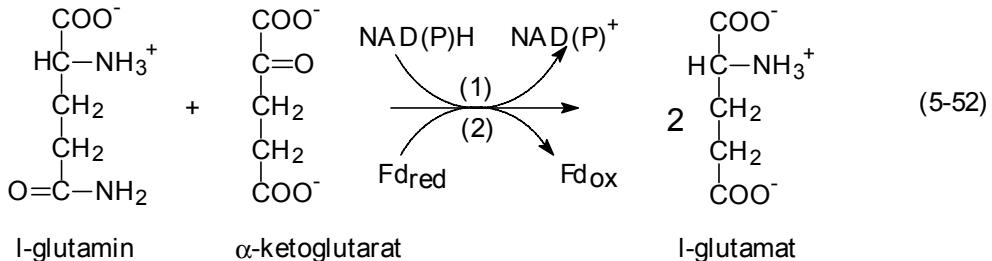
**Glutamin-sintetaza (GS, EC 6.3.1.2)** - katalizuje endergonu reakciju primarne asimilacije azota odn. amonijaka u glutamin uz učešće ATP (jednačina 5-51). Kako je afinitet enzima prema supstratu ( $\text{NH}_4^+$ ) visok, to se ugradjivanje  $\text{NH}_4^+$  može odvijati čak i pri niskim koncentracijama u ćeliji. Amonijak se normalno ne transportuje u list već se u njemu stvara redukcijom nitrata, ili pak u listu nastaje kao proizvod nekih reakcija metabolizma (npr. konverzijom glicina u serin i sl.).



Molekulska masa enzima GS je 300 kDa, a izgradjen je iz 8 monomera udruženih u dva planarna tetramera. Glutamin-sintetaza iz viših biljaka za razliku od drugih organizama ne sadrži jone metala u svojoj strukturi. Međutim za aktivnost enzima su neophodni dvovalentni joni metala kao npr.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ili  $\text{Co}^{2+}$ . Drugi katjoni metala kao  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  i sl. su inhibitori aktivnosti GS.

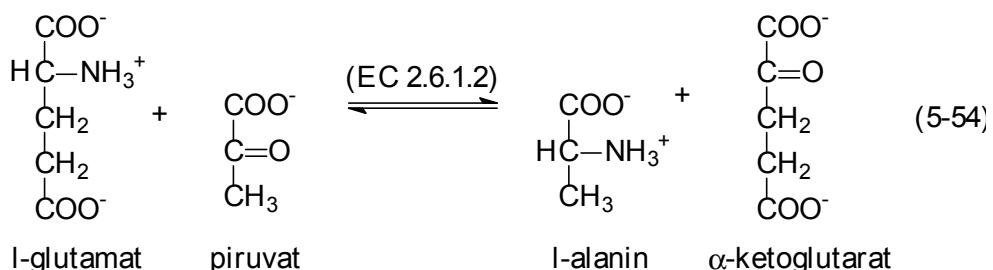
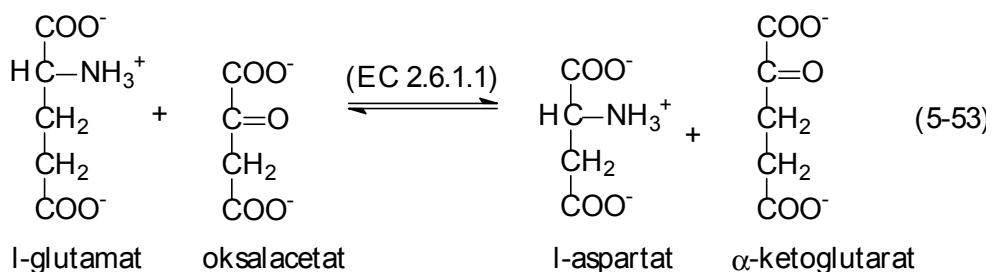
Glutamin-sintetaza ima dva izoenzima ( $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_2$ ), od kojih se prvi nalazi u citoplazmi, a drugi u hloroplastima. Smatra se da  $\text{GS}_1$  katalizuje reasimilaciju amonijaka, a  $\text{GS}_2$  primarnu asimilaciju amonijaka. Biljke koje se medjusobno razlikuju u metabolizmu  $\text{CO}_2$  (tzv.  $\text{C}_3$  i  $\text{C}_4$ -biljke) imaju i različite aktivnosti GS.

**Glutamat-sintaza (GOGAT, EC 1.4.1.13)** - katalizuje prenošenje amino-grupe sa glutamina na  $\alpha$ -ketoglutarat pri čemu nastaju dva molekula glutamata (jednačina 5-52).



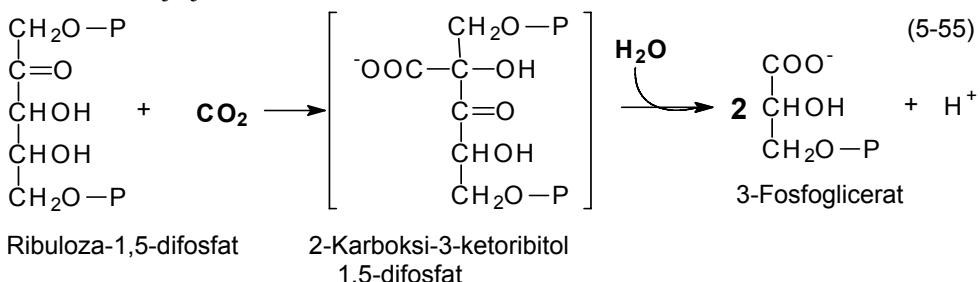
GOGAT iz biljaka je izgradjena od jednog polipeptidnog lanca, a Mr se kreće od 140 kDa (*Glicia faba*) do 250 kDa kod drugih biljaka.

**Transaminaze** - su enzimi koji katalizuju prenošenje amino-grupe sa jednog amino-donatora na mesto karbonilne grupe amino-akceptora. Proizvodi ovih reakcija su nove amino i ketokiseline. Kod biljaka su njajviše proučavane *aspartatamino-transferaza* (EC 2.6.1.1) i *alaninamino-transferaza* (EC 2.6.1.2), a reakcije koje katalizuju ovi enzimi su date jednačinama 5-53 i 5-54).



**Enzimi metabolizma CO<sub>2</sub>** - Najznačajniji enzimi ove grupe su ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza(Ribisko, RuDP-karboksilaza, EC 4.1.1.39) kod C<sub>3</sub> i fosfoenolpiruvat-karboksilaza (PEP-karboksilaza, EC 4.1.1.31) kod C<sub>4</sub> tipa biljaka.

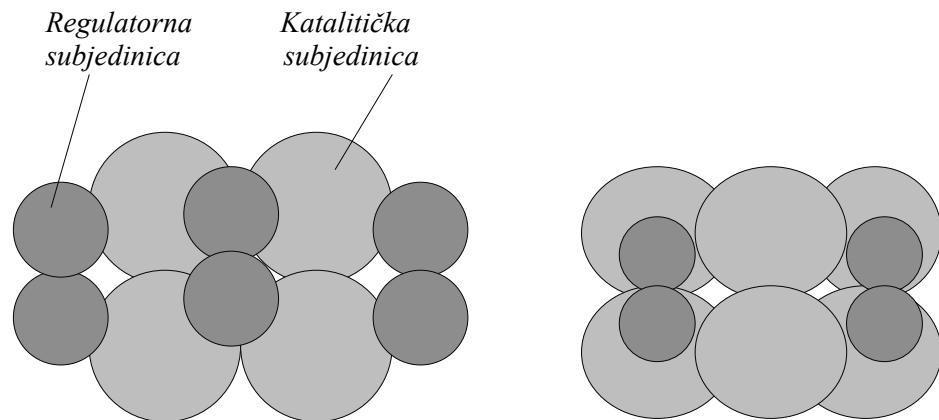
**Ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza (Ribisko, EC 4.1.1.39)** - je enzim koji katalizuje prvu reakciju u *Kalvinovom ciklusu* tj. kondenzaciju ribuloze-1,5-difosfata sa CO<sub>2</sub> iz atmosfere u prelazni oblik 6-C intermedijera koji brzo hidrolizuje dajući dva molekula 3-fosfoglicerata. Karboksilacija ribulozo-1,5-difosfata data je jednačinom 5-55.



Pomoću prve reakcije koja je osnovna reakcija fotosinteze kod C<sub>3</sub>-biljaka, (vidi poglavlje 11) Ribisko katalizuje vezivanje oko 5 × 10<sup>14</sup> kg CO<sub>2</sub> godišnje u organsku materiju.

Ovaj enzim je lokalizovan na strani stroma tilakoidne membrane i verovatno je najzastupljeniji protein u prirodi i čini oko 15% ukupnih proteina hloroplasta. Molekulska masa Ribiska je oko 560 kDa, i sadrži 8 velikih subjedinica

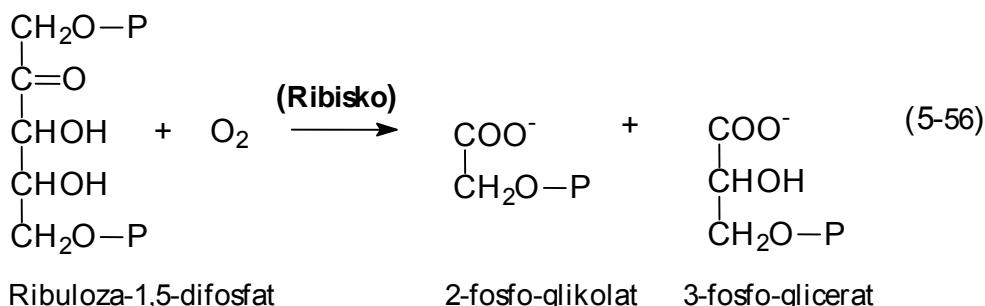
(Mr 55 kDa) i 8 malih subjedinica (Mr 15 kDa) (slika 5-31). Sekvenca velike subjedinice je kodirana genima hloroplasta, dok je sekvenca male subjedinice kodirana genima jedra. Velika subjedinica ima *katalitičku*, dok mala subjedinica ima *regulatornu ulogu*.



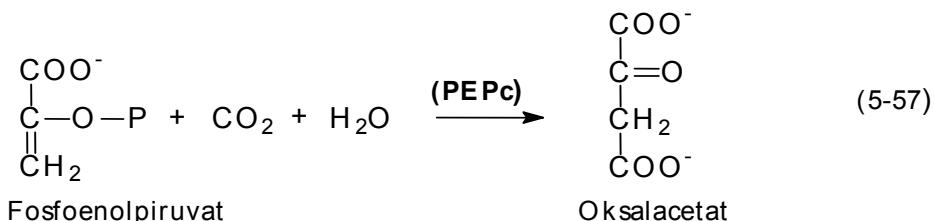
Slika 5-31. Raspored podjedinica ribiska u prostoru.

Različiti ekološki činioci, a posebno teški metali (Pb, Hg, Cd, Cu idr.) mogu inaktivirati Ribisko.

Ribisko pored *karboksilazne* može imati i funkciju *oksigenaze* (kada O<sub>2</sub> deluje kao antagonist CO<sub>2</sub>) koja je ključna u procesu fotodisanja. U tom slučaju proizvodi reakcije su 2-fosfoglikolat i 3-fosfoglicerat (jednačina 5-56). Oksigenazna funkcija Ribiska je štetna po biljke jer može i do 30% smanjiti prinos biljaka.



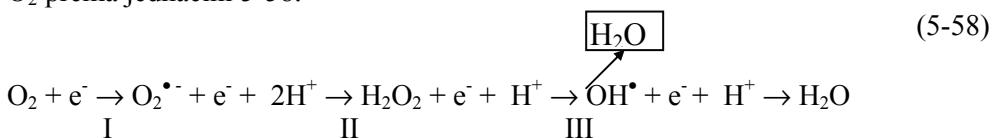
**Fosfoenolpiruvat-karboksilaza (PEP-karboksilaza, PEPC, EC 4.1.1.31)** - je enzim koji katalizuje prvu reakciju fotoasimilacije odn. fiksacije CO<sub>2</sub> kod C<sub>4</sub> biljaka koje imaju karakterističnu anatomiju listova u tzv. *Hatch-Slack-Kortshakovom ciklusu*. PEP-karboksilaza katalizuje reakciju karboksilacije fosfoenolpiruvata (PEP) do oksalacetata (jednačina 5-57)



**Enzimi "gasioci" kiseoničnih radikala** - U biljkama kao proizvod normalnog ćelijskog metabolizma, delovanja jonizujućeg zračenja, pesticida, herbicida, teških metala i sl. nastaju reaktivne vrste kiseonika - tzv. *kiseonični radikali*. Kod nekih biljaka koncentracija ovih reaktanata je minimalna, dok je kod drugih uvećana i može izazvati različite metaboličke poremećaje. Zbog navedenog stanje živog i neživog dobilo je pre nekoliko godina još jednu definiciju od nobelovca Szent-Gyorgi-a po kome se živo stanje organizma može definisati proteinima koji su nezasićeni elektronima, a neživo stanje proteinima zasićenim elektronima.

Kiseonični radikali - su štetni, jer uništavaju strukture ćelijskih membrana peroksidacijom lipida, te se merenjem nagrađenih peroksida i njihovih degradacionih proizvoda može indirektno utvrditi, da li je količina kiseoničnih radikala u pojedinim tkivima ili organima uvećana ili ne. Na taj način kiseonik značajan za biljke postaje štetan ukoliko ćelije ne aktiviraju svoje odbrambene mehanizme.

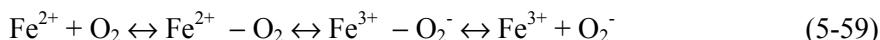
Kiseonični radikali i njihovi intermedijeri nastaju postepenom redukcijom  $\text{O}_2$  prema jednačini 5-58.



Superoksid-radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) - je prvi u nizu simultanih redukcija molekulskog kiseonika. On vrši depolimerizaciju ugljenih hidrata delovanjem *ksantin-oksidaze* (EC 1.2.3.2), i reaguje sa proteinima - te je zbog toga toksičan. Oslobođeni superoksid-radikal ostaje u ekstraćelijskom prostoru ili difunduje kroz ćelijske membrane u intraćelijski prostor, gde postaje supstrat prvom tzv. antioksidantnom enzimu *superoksid-dizmutazi* (SOD; EC 1.15.1.1).

Superoksid-radikal u biljkama može nastati na više različitih načina kao npr.:

- ◆ reakcijom  $\text{O}_2$  i prelaznih metala koji (sa izuzetkom cinka) imaju nesparene elektrone te se mogu smatrati radikalima. Oni imaju sposobnost da se oksiduju ili redukuju primanjem samo jednog elektrona pri čemu daju  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Tako npr.  $\text{Fe}^{2+}$  reaguje sa  $\text{O}_2$  prema jednačini 5-59.



◆ prenosom elektrona sa različitih jedinjenja na  $\text{O}_2^-$ . U ovu grupu jedinjenja spadaju enzimi (ksantin oksidaza), aminokiseline (triptofan), kao i neki molekuli (riboflavin i dr.);

Superoksid-radikal sam retko izaziva oštećenje ćelije, ali se smatra toksičnim, jer gradi  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{OH}^\bullet$ .

Vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) - nastaje primanjem drugog elektrona u istu molekulsku orbitalu kiseonika kao i  $\text{O}_2^-$ . Na taj način nastaje peroksidni jon  $\text{O}_2^{2-}$  koji nema nesparenih elektrona i nije radikal. U fiziološkim uslovima  $\text{O}_2^{2-}$  se odmah protonuje i daje  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$\text{H}_2\text{O}_2$  nastaje u svim biološkim sistemima koji proizvode  $\text{O}_2^-$  reakcijom dizmutacije, dok ga enzim glikolat- i urat-oksidaza u reakciji sa  $\text{O}_2^-$  proizvode direktno.

Hidroksil-radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) - nastaje raskidanjem O — O veze u molekulu  $\text{H}_2\text{O}_2$  najčešće pod uticajem toplote, ionizujuće radijacije; ultraljubičaste svetlosti i polutanata.



Može nastati u sledećim reakcijama:

◆ reakcijom  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa  $\text{Fe}^{2+}$  (*Fentonova reakcija*) i  $\text{Cu}^+$  jonomima.



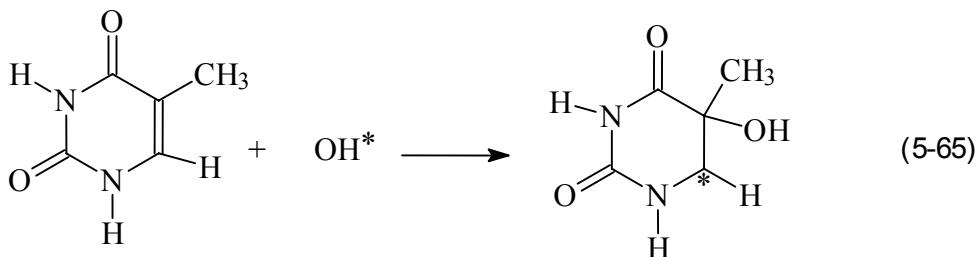
◆ reakcijom  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa  $\text{O}_2^-$  (*Haber-Weissova reakcija*).



(Ovu reakciju joni gvožđa, koji služe kao katalizator, višestruko ubrzavaju).

Hidroksil-radikal je jedno od najreaktivnijih jedinjenja poznatih u biohemiji koje može izazvati niz lančanih reakcija, kao npr. može se:

◆ adirati na purinske i pirimidinske baze DNA i RNA:



◆ prenosi elektrone na različite organske i neorganske molekule:



U ovim reakcijama nastaju slobodni radikali koji su manje reaktivni od  $\text{OH}^{\bullet}$  ali mogu biti štetni po ćeliju.

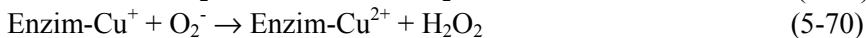
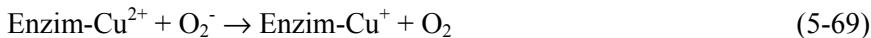
Biljke preživljavaju iako su izložene delovanju kiseoničnih radikala, jer su razvile odgovarajući odbrambeni sistem koji razgrađuje redukovane i aktivirane oblike kiseonika. On se sastoji iz antioksidantnih enzima (superoksid-dizmutaze, katalaza, različite peroksidaze, glutation-reduktaza itd.) i antioksidantnih jedinjenja (karotenoida, redukovanih glutationa, askorbinske kiseline itd.), koji zajednički "čiste" organizam od toksičnih radikala.

Superoksid-dizmutaza (SOD; EC 1.15.1.1) - je složen enzim kojeg su Mann i Kellin još 1938. godine izolovali iz goveđe krvi. SOD je zajednički naziv za više metaloenzima koji katalizuju reakciju dizmutacije  $\text{O}_2^-$  do  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ :



Na fiziološkim pH vrednostima ova reakcija se odvija i bez enzimske aktivnosti veoma brzo, dok je SOD ubrzava do  $2 \times 10^9$  mol/s. Svi SOD enzimi su metaloproteini koji u aktivnom centru sadrže različite metalne jone. U zavisnosti od prisutnog metalnog jona dele se na Cu/Zn-SOD, Mn-SOD i Fe-SOD.

Cu/Zn-SOD (plava SOD) - je dimerni protein sastavljen iz dve identične subjedinice gde svaka u aktivnom mestu sadrži jedan ion  $\text{Cu}^{2+}$  i jedan ion  $\text{Zn}^{2+}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  menja valentno stanje između +2 i +1 katalizujući reakcije dizmutacije:



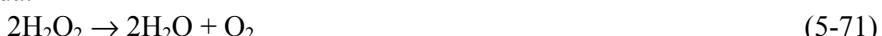
$\text{Zn}^{2+}$  utiče na stabilnost ovog enzima. Mr Cu/Zn-SOD je 33 kDa sa identičnim podjedinicama od po 16.5 kDa. Inhibira se ireverzibilno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a

reverzibilno  $\text{CN}^-$ . Enzim je aktivan u opsegu pH od 5.3-10.5. Za plavu SOD se kaže da je enzim eukariota.

Mn-SOD (ružičasta SOD) - je enzim eukariota i prokariota sa Mr od 36-45 kDa, izgrađen iz dve ekvivalentne subjedinice. Ovaj enzim ima optimum delovanja pri pH 7.8-10. Inhibira se  $\text{H}_2\text{O}_2$  ali ne i cijanidom.

Fe-SOD (žuta SOD) - je pretežno enzim prokariota sa jednim  $\text{Fe}^{2+}$  jonom u aktivnom mestu. Fe-SOD se javlja kao dimerni i tetramerni protein, Mr 38-48 kDa i optimalne pH 7.8-9.0.

Katalaza (EC 1.11.1.6) - je enzim kojeg je prvi izolovao Thenard 1918. godine iz goveđe jetre i dokazao da katalizuje reakciju razlaganja vodonik peroksida:



Ukoliko enzim nije aktivan  $\text{H}_2\text{O}_2$  će se delom razgrađivati u toksičan hidroksil-radikal, a delom će ostati u ćeliji i delovati toksično. Mr katalaze je 25 kDa i izgrađena je od 4 podjedinice koje sadrže protoporfirinske grupe sa  $\text{Fe}^{3+}$ . Mada je katalaza visokospecifična u odnosu na supstrat ona ima takozvana "peroksidazna" svojstva. Katalaza je aktivna u intervalu pH 5-10 i može se inhibirati cijanidom. Primarna struktura katalaze izolovane iz različitih izvora je veoma slična i sadrži aminokiselinu arginin koja je odgovorna za njenu katalitičku aktivnost.

Peroksidaza (EC 1.11.1.7) - je pratilec katalaze u peroksisomima biljaka. Ona je oligomerna oksidaza koja katalizuje dehidrogenaciju različitih supstrata prema reakciji:



Postoje različite vrste peroksidaza koje reaguju sa različitim supstratima kao što je mrvlja i askorbinska kiselina, glutathion, citohrom c, NADH itd. Mr peroksidaze se kreće oko 200 kDa i izgradjena je iz 3 podjedinice. Peroksidaze biljaka sadrže crveni, a peroksidaze životinja zeleni hemin. Peroksidaza je aktivna u intervalu pH 4-10 i ima različitu primarnu strukturu zavisno od izvora.

**Amilaze** -su hidrolitički enzimi veoma značajne u metabolizmu skroba. Prema funkciji koju obavljaju razlikuju se  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -amilaze. Od navedenih je posebno značajna  $\alpha$ -amilaza.

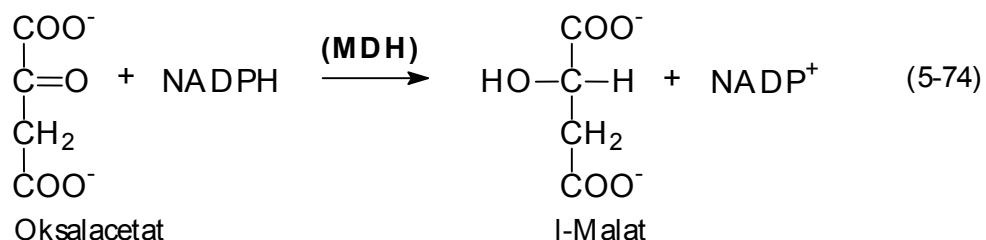
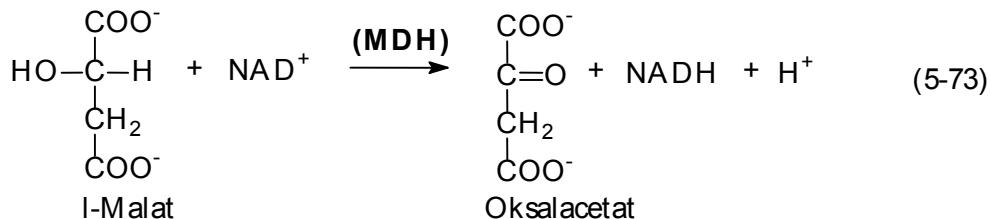
$\alpha$ -amilaza (dekstrinogen-amilaza, glukogenaza EC 3.2.1.1) - je dominantan enzim u semenu ratarskih kultura u toku kljanja. Po hemijskom sastavu je metaloenzim sa Mr oko 25 kDa. Hidrolizuje skrob, kao endohidrolaza, prvo do dekstrina, potom ga razlaže u maltozu (87%), glukozi (10%) i razgranati oligosaharid (3%), cepajući pri tome  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glikozidne veze u molekulu skroba. Nakuplja se u aleuronskom sloju koji okružuje endosperm. Sintezu  $\alpha$ -amilaze stimuliše giberelinska kiselina.

Aktivnost  $\alpha$ -amilaze može biti korištena kao biomarker u programu selekcije sorti i hibrida. Dokazano je da kod genotipova u kojima aktivnost ovog enzima raste u odnosu na voštanu zrelost u nepovoljnim klimatskim uslovima žetve (velike vlage) moglo bi doći do kljanja zrna na klasu, a samim timi dom smanjenja prinosa kvalitetnog zrna.

**Enzimi indikatori temperaturnog stresa** - Biljke su često tokom vegetacije izložene uslovima stresa (usled izmene klimatskih i drugih ekoloških faktora) koji mogu izazvati ogromne ekonomske gubitke. Zbog navedenog započeta su intenzivna proušavanja enzima na osnovu kojih bi se mogli odabrati otporni genotipovi, kao npr. galakto-lipaza, malat-dehidrogenaza i dr.

Galakto-lipaza (3.1.1.26) - je hidrolitički enzim koji katalizuje hidrolizu galaktolipida (sastojaka lipida tilakoidne membrane hloroplasta). Aktivnost ovog enzima je tri puta veća u hloroplastima kukuruza neotpornih na hladnoću, u odnosu na otporne genotipove. Zbog navedenog se u neotpornim biljkama nakupljaju slobodne masne kiseline. Slični rezultati su dobijeni i u eksperimentima sa krompirom, paradajzom, i dr. biljkama.

Malat-dehidrogenaza (MDH, EC 1.1.1.40) - je oksidoreduktaza koja u citratnom ciklusu katalizuje konverziju fumarata u malat (jednačina 5-73) ili pak u Hatch-Slack-ovom ciklusu redukciju oksalacetata do malata (jednačina 5-74).



Aktivnost MDH je najčešće određivana kod biljaka gajenih u uslovima temperaturnog stresa. Utvrđeno je da aktivnost ovog enzima opada ako se pšenica gaji na povećanoj temperaturi u uslovima suše. Ovo ukazuje da se MDH može koristiti kao biomarker u programu selekcije sorti i hibrida otpornih na sušu.

## 5.8. Regulacija aktivnosti enzimskih reakcija

Enzimi biljaka su još uvek nedovoljno proučeni, te se u poslednje vreme posebna pažnja poklanja studijama sekvence enzima, strukture aktivnih centara kao i mehanizma reakcija koje oni katalizuju, što treba da doprinese boljem poznavanju mehanizama regulacije enzimske aktivnosti, a posebno onih koji su od značaja za ekonomičnu biljnu proizvodnju. Od posebnog je značaja tzv. **samoregulacija** aktivnosti enzima, kao posledica izmene uslova sredine u kojoj enzim deluje. Ona se može ostvariti na dva načina i to:

- ◆ *regulacijom aktivnosti enzima i*
- ◆ *regulacijom biosinteze enzima.*

**Regulacija aktivnosti enzima** - podrazumeva brojnost faktora od kojih zavisi aktivnost enzima. Ona je uslovljena količinom supstrata, prisustvom aktivatora i inhibitora, količinom metabolita, vezivanjem enzima za različite ćeljske strukture itd., ali i uticajem gasnog, temperaturnog, vodenog, svetlosnog i drugih režima spoljne sredine.

Regulacija aktivnosti enzima može se postići i tzv. *kovalentnom modifikacijom* strukture enzima koja nastaje kovalentnim vezivanjem raznih radikala kao npr. fosfatnog, metilnog, acetilnog, adenilnog i dr. Kod multienzimskih sistema regulacija aktivnosti mora biti koordinirana. To znači da aktivnost jednog enzima u sistemu koji daje proizvod mora predstavljati etapu u kojoj će se stvarati uslovi za aktivnost drugog enzima. U ovakvim sistemima sve reakcije su spregnute (npr. u pentoza-fosfatnom ciklusu, glikolizi,  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina i dr.).

**Regulacija biosintezom enzima** - jedan je od najznačajnijih problema enzimologije. Brzina biosinteze enzima uslovljena je brojnim činiocima kao npr. vrstom tkiva, fazom ontogeneze, ekološkim uslovima itd. mada je duže vreme poznato da je sinteza enzima pod kontrolom gena što je potvrđeno brojnim eksperimentima pre svega na mikroorganizmima. Proučavanjem regulacije biosinteze enzima utvrđeno je postojanje dve vrste enzima i to:

- ◆ *konstitucioni i*
- ◆ *indukovani enzimi.*

*Konstitucioni enzimi* - su enzimi koji su uvek prisutni u ćelijama, za razliku od njih enzimi koji se indukuju supstratom (tj. čija biosinteza započinje prisustvom supstrata u ćeliji) ili nekim drugim jedinjenjem na koje enzim ne deluje nazivaju se *indukovani enzimi*. Neka jedinjenja ne indukuju biosintezu enzima već deluju represivno, a ako su to enzimi nazivaju se *represivnim enzimima*.

Biohemijsko-genetičkim istraživanjima utvrđeno je da jedinjenja koja indukuju ili represiraju biosintezu enzima deluju pre svega na strukture DNA u jedru, odnosno na njen određeni deo (gen) u kojem se nalazi nasledna informacija za sintezu određenog enzima. Napred navedeni putevi regulacije biosinteze enzima su detaljno proučavani na mikroorganizmima.

## 5.9. Značajne oznake u enzimologiji

Enzimologija je biohemijska nauka koja proučava mehanizme delovanja visokoefektivnih bioloških katalizatora. Ona upotrebljava oznake od kojih su neke od posebnog značaja i kod proučavanja enzima kao npr.:

- ◆ *jedinica enzimske aktivnosti,*
- ◆ *specifična aktivnost enzima,*
- ◆ *broj izmena,*
- ◆ *aktivnost katalitičkog centra i*
- ◆ *molarna katalitička aktivnost.*

**Jedinica enzimske aktivnosti** - označava količinu jednog enzima koji će katalizovati transformaciju specifične količine supstrata u proizvod pod definisanim uslovima. Kako je u SI sistemu mera jedinica za vreme sekund, a za količinu materije mol, to je za jedinicu enzimske aktivnosti uvedena jedinica *katal (kat)*. *Katal je definisan količinom enzima koja pretvara 1 mol supstrata u sekundi u specifičnim uslovima.* U praksi se pored katala upotrebljavaju i manje jedinice kao mikrokatal ( $\mu\text{kat}$ ;  $1\mu\text{kat}=10^{-6}\text{kat}$ ) i nanokatal ( $\eta\text{kat}$ ;  $1\eta\text{kat}=10^{-9}\text{kat}$ ). Pored katala često je u upotrebi i starija jedinica tzv. *internacionalna jedinica (IU).* Ona označava količinu enzima koja transformiše  $1\mu\text{mol}$  supstrata u minuti pod specifičnim uslovima (npr. zasićenosti, optimalne pH, temperature itd.).

**Specifična aktivnost enzima** - označava broj jedinica enzima po jedinici mase proteina, obično miligrama proteina ili u odnosu na proteinski azot, težinu uzorka, broj ćelija i sl. Kako je specifična aktivnost izvedena jedinica iz enzimske aktivnosti to se obično izražava u katalima po kg proteina ili u delovima katala.

Pored navedenih jedinica u praktičnim određivanjima se upotrebljavaju i druge kao *molarna aktivnost* - koja daje zavisnost specifične aktivnosti u odnosu na količinu enzima u molima.

**Broj izmene** - označava broj mola supstrata koji se pretvore u proizvod u minuti po molu enzima. Odgovarajuće veličine su i **aktivnost katalitičkog centra** - koja označava broj izmene po aktivnom centru proteina-enzima i odnosi se na

enzime koji imaju više od jednog aktivnog mesta. U tabeli 5-9 dati su brojevi izmena i funkcije nekih tipičnih enzima.

Tabela 5-9. Brojevi izmena nekih tipičnih enzima biljaka.

Enzim	Funkcija	Broj izmena*
Katalaza	Skevendžer slobodnih radikala	40.000.000
Karbo-anhidraza	Katalizuje hidrataciju $\text{CO}_2$ do $\text{HCO}_3^-$	800.000
DNA-polimeraza I	Stvara nove kopije DNA	15
Triptofan-sintetaza	Katalizuje finalni stepen u biosintezi aminokiselina	2

\* Jedinica broja izmena (mol supstrata/molu enzima) sec.<sup>-1</sup>

**Molarna katalitička aktivnost** - označava broj izmena u jedinici vremena odnosno u sekundi.

## Izvod

♣ Enzimi su specifični globularni proteini, sa izuzetkom nekih RNAs koje katalizuju sopstveno uvrtanje, koji ubrzavaju ili regulišu brzine termodinamički mogućih reakcija. Oni su najefikasniji biološki katalizatori jer katalizuju pretvaranje  $10^2\text{-}10^6$  molekula supstrata u minuti.

♣ Enzimi ubrzavaju hemijsku reakciju, snižavanjem energije aktivacije kao kinetičkog parametra. Enzimi ne utiču na termodinamiku reakcije. Prvi stepen u enzimskoj katalizi je vezivanje enzima za supstrat u oblik kompleksa kao prelaznog stanja, koji potom prelazi u proizvod. Mesto vezivanja supstrata za enzim se naziva "aktivno mesto" ili "aktivni centar" enzima, a koji iznosi samo oko 5% površine enzima. Vezivanje enzima za supstrat se tumači pomoću tri modela i to: model ključa i brave, *model indukovanih prilagodjavanja* i *model fluktacionog prilagodjavanja*.

♣ Kinetika enzimskih reakcija je matematički tretman reakcije katalizovane enzimom. Ona se posebno određuje za jedno, a posebno za dvo i višesupstratne reakcije. Kinetika mnogih jednosupstratnih reakcija može biti opisana po *Michaelis-Mentenovom* modelu. Ovaj model bazira na konceptu "stabilnog stanja" u kojem ključnu ulogu ima konstantna koncentracija enzim-supstrat kompleksa. Kako se ne može direktno meriti ES u enzimskim reakcijama to je uvedena  $K_m$  vrednost (*Michaelis-Mentenova konstanta*) koja se koristi kao mera afiniteta enzima prema supstratu.

♣ Michaelis-Mentenovim modelom se ne mogu opisati ponašanja alosteričnih enzima.

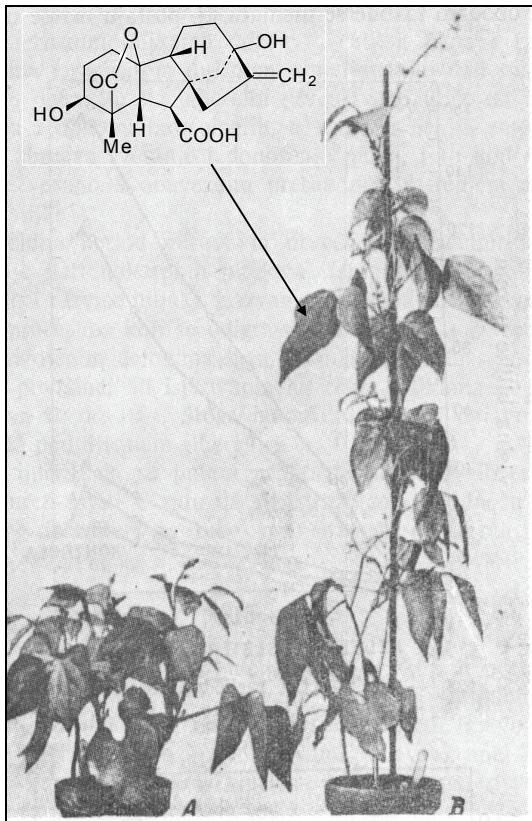
♣ Inhibitori mogu dati važne informacije o karakteru enzimskih reakcija. Reverzibilni inhibitor se može vezati za enzim, a zatim biti oslobođen. Irreverzibilni inhibitor sa enzimom stvara protein koji nije enzimski aktivran. Razlikujemo dva tipa reverzibilnih inhibitora. *Kompetitivni* inhibitor se vežu za aktivno mesto enzima i tako blokiraju supstrat. *Nekompetitivni* inhibitor se vež za enzim, ne za aktivno mesto, menjajući strukturu aktivnog mesta, a time otežava i pristup supstratu.

♣ Regulacija enzimske aktivnosti predstavlja jedan od najvažnijih puteva metaboličke aktivnosti ćelije. Uopšteno govoreći ona se može obaviti na dva načina i to regulacijom aktivnosti enzima i regulacijom njihove sinteze

♣ Izoenzimi su oligomerni enzimi, iste supstratne specifičnosti, koji se genetički razlikuju u primarnoj strukturi

♣ Utvrđeno je da se metabolički potencijal biljaka može najbolje pratiti studijom njihovih enzima.

## 6. Bioregulatori



Uticaj giberelina na rastenje biljaka  
pasulja: A-kontrola, B-tretman

### 6.1. Koenzimi

- 6.1.1. Klasifikacija koenzima
- 6.1.2. Struktura i funkcija koenzima oksidoreduktaza
- 6.1.3. Struktura i funkcija koenzima transferaza
- 6.1.4. Struktura i funkcija koenzima liazza, izomeraza i ligaza

### 6.2. Vitamini

- 6.2.1. Vitamini koji imaju funkciju koenzima
- 6.2.2. Vitamini koji nemaju funkciju koenzima
- 6.2.3. Supstance slične vitaminima
- 6.2.4. Antivitamini

### 6.3. Fitohormoni

Mnogi biohemijski procesi u biljkama zavise od strukture i funkcije specifičnih molekula koji se nalaze u ćeliji. Neki od njih su nazvani **bioregulatorima**. To su najčešće organski biomolekuli koji na različite načine “regulišu” ili “stimulišu” brojne biohemijske reakcije u metabolizmu. U grupu bioregulatora su svrstani *koenzimi*, *vitamini* i *fitohormoni*. **Koenzimi** ulaze u sastav enzima, najčešće kao deo aktivnog centra, te na taj način direktno stimulišu katalitičku aktivnost enzima. **Vitamini** uglavnom ulaze u sastav koenzima, a **fitohormoni** regulišu rastenje i razviće i utiču na pravac i intenzitet metaboličkih procesa biljaka.

## 6.1. Koenzimi

Koenzimi su niskomolekularna organska jedinjenja, male molekulske mase, koji omogućavaju da proteinski deo enzima obavi katalitičku funkciju. Oni mogu biti aktivni centar enzima ili njegov deo te pomažu enzimu da se veže za supstrat i pripremi (orientacijom ili polarizacijom) za pretvaranje u proizvod. Koenzimi ostaju nepromjenjeni posle reakcije u kojoj je enzim promenio supstrat (mogu se vezati ponovo za isti supstrat, osloboditi u prvobitnom obliku, ili koristiti za neku drugu reakciju) te ih je Bücher nazvao *transportnim metabolitima*. Neki autori ih nazivaju “kopčama” jer posreduju izmedju različitih grupa i tako omogućavaju razmenu materija bilo da je to vodonik, fosfatna grupa ili neka druga grupa organskih molekula.

Većina enzima obavlja svoju katalitičku funkciju uz “pomoć” molekula ili jona - kofaktora koji su nazvani **koenzimima** i ili **prostetičnim grupama**. Oni se razlikuju samo u stepenu afiniteta prema enzimima u toku enzimskih reakcija (koenzimi se lako, a prostetične grupe teško odvajaju dijalizom od proteinskog dela enzima). Danas se prostetičnom grupom nazivaju takve grupe (molekuli ili joni) koje se hemijski menjaju, a koenzimima grupe odnosno jedinjenja, koja se ne menjaju u biohemijskim reakcijama. Oni svoju funkciju biostimulatora obavljaju uglavnom kao posrednici u vezivanju enzima za supstrat, čineći ga tako dostupnom enzimu da ga po mehanizmu enzimske katalize transformiše do krajnjih proizvoda reakcije.

### 6.1.1. Klasifikacija koenzima

Većina koenzima sadrži u svojoj strukturi fosfornu kiselinu koja je često povezana u obliku nukleozid-fosfata ili nukleotida. Neki koenzimi sadrže u svojoj strukturi i vitamine te ih nazivamo i derivatima vitamina. Koenzimi se prema vrsti enzima u čiji sastav ulaze mogu podeliti u tri grupe:

- ◆ koenzimi oksidoreduktaza,
- ◆ koenzimi transferaza i
- ◆ koenzimi liaza, izomeraza i ligaza.

Jedino enzimi iz grupe *hidrolaza* katalizuju u vodenoj sredini biohemijske reakcije bez koenzima i obično kao aktivatore koriste metalne jone. Koenzimi napred navedenih grupa, njihovo skraćeno obeležavanje, grupe koje prenose i vitamini koji ulaze u njihov sastav dati su u tabeli 6.1-1.

Tabela 6.1-1. Klasifikacija koenzima prema funkciji.

Naziv koenzima	Oznaka	Grupa	Derivati vitamina
<b>I KOENZIMI OKSIDOREDUKTAZA</b>			
Nikotinamid-adenin-dinukleotid	NADH	H <sup>+</sup> ili e <sup>-</sup>	amid nikotinske kiseline
Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat	NADPH	H <sup>+</sup> ili e <sup>-</sup>	amid nikotinske kiseline
Flavin-mononukleotid	FMNH <sub>2</sub>	H <sup>+</sup> ili e <sup>-</sup>	riboflavin
Flavin-adenin- dinukleotid	FADH <sub>2</sub>	H <sup>+</sup> ili e <sup>-</sup>	riboflavin
Ubihinoni i plastohinoni	Q	H <sup>+</sup> ili e <sup>-</sup>	-
Liponska kiselina	Lip(S <sub>2</sub> )	H <sup>+</sup> i acil-	-
Hem proteini	Cyt	e <sup>-</sup>	-
Ne-hem proteini	Fd	e <sup>-</sup>	-
<b>II KOENZIMI TRANSFERAZA</b>			
Adenozin-trifosfat	ATP	fosfatna	-
Uridin-difosfat	UDP	uronati	-
Citidin-trifosfat	CTP	fosfatna	-
S-adenozilmetyonin	SAM	metil- (C <sub>1</sub> )	-
Tetrahidrofolna kiselina	FH <sub>4</sub>	formil-C <sub>1</sub> )	folna kiselina
Biotin	-	C <sub>1</sub> (CO <sub>2</sub> )	biotin
Koenzim A	CoA	acetil- (C <sub>2</sub> )	pantotenska kis.
<b>III KOENZIMI LIAZA, IZOMERAZA I LIGAZA</b>			
Tiamin-difosfat	TPP	aldehidna	tiamin
Piridoksal-fosfat	PALP	amino -	piridoksal
Fosfoadenozin-fosfo-sulfat	PAPS	“aktivni sulfat”	-

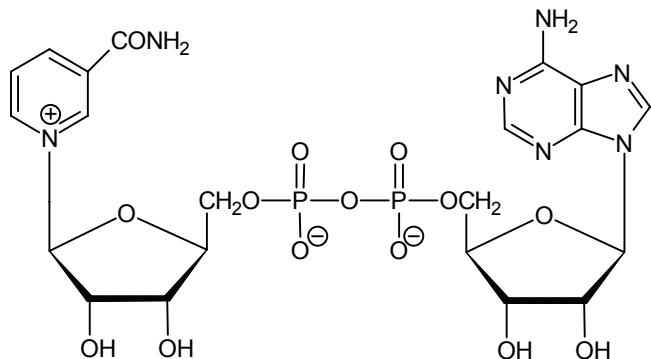
### 6.1.2. Struktura i funkcija koenzima oksidoreduktaza

Koenzimi oksidoreduktaza su sastojci preko stotinu specifičnih enzima, koji katalizuju oksidoredukcione procese u ćeliji biljaka. Najznačajniji su:

- ◆ *nikotinamidski nukleotidi,*
- ◆ *flavinski nukleotidi,*
- ◆ *ubihinoni,*
- ◆ *liponska kiselina,*
- ◆ *citohromi (hem-proteini) i*
- ◆ *ne-hem-proteini.*

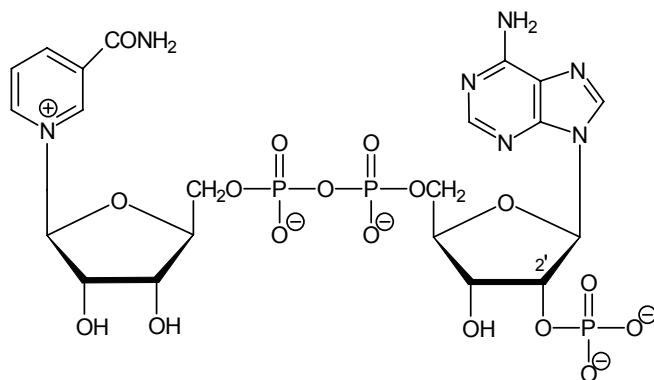
NIKOTINAMIDSKI NUKLEOTIDI - su koenzimi *nikotinamid-adenin-dinukleotid* ( $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ ) i *nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat* ( $\text{NADP}^+$ / $\text{NADPH}$ ), koji prenose vodonik ( $\text{H}_2$ ), odnosno elektrone i protone ( $\text{H}^+$ ), pri oksidacijama supstrata sa dehidrogenazama. Dokazani su u svim ćelijama. Njihovi redukovani oblici su sastojci mnogih dehidrogenaza u mitohondrijama, citosolu i endoplazmatičnom retikulumu ćelija. Rastvorni su u vodi i obično slobodno difunduju od enzima.

**Nikotinamid-adenin-dinukleotid** ( $\text{NAD}^+$ ) - ima funkciju koenzima u mnogim reakcijama metabolizma. Kao koenzim brojnih oksidoreduktaza on je akceptor elektrona pri eliminaciji vodonika od specifičnih supstrata. Struktura ovog koenzima je data na slici 6.1-1.



Slika 6.1-1.  
Nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ).

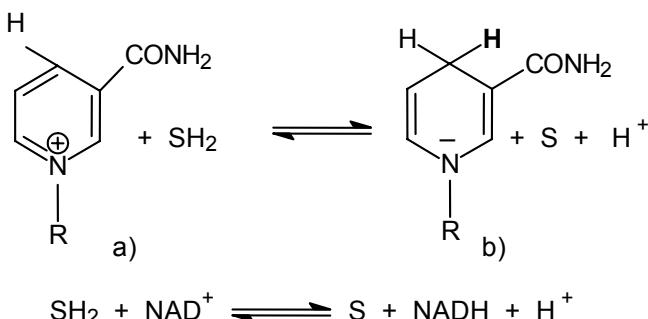
**Nikotinamid-adenin-dinukleotod-fosfat** ( $\text{NADP}^+$ ) – je fosforilovan adenozin i od nikotinamid-adenin-dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) razlikuje se po prisustvu ostatka fosforne kiseline u položaju 2' adenozina. Struktura  $\text{NADP}^+$  data je na slici 6.1-2.



Slika 6.1-2.  
Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP<sup>+</sup>).

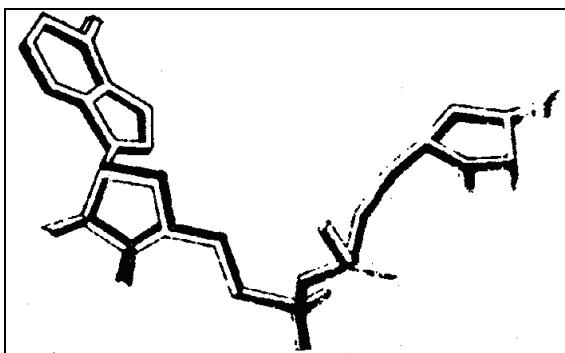
Reaktivno mesto u NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> je nikotinamidski prsten (vitamin PP; niacin). Da bi se redukovao potrebna su 2H po

molekulu piridinskog prstena nikotinamida. Prvi atom H se razlaže na H<sup>+</sup> i e<sup>-</sup>. Proton odlazi u rastvor, a elektron neutrališe pozitivno nanelektrisanje piridinijum katjona. Drugi hidridni H atom će se vezati za piridinski prsten čime on gubi aromatičnu (a) i dobija hinoidnu (b) strukturu (slika 6.1-3).



Slika 6.1-3. Oksidovani (a) i redukovani (b) oblik koenzima.

Kristalografskim proučavanjem struktura NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> dokazano je da imaju rastegnutu konformaciju u kojoj se H atom može vezati za obe strane prstena (slika 6.1-4).

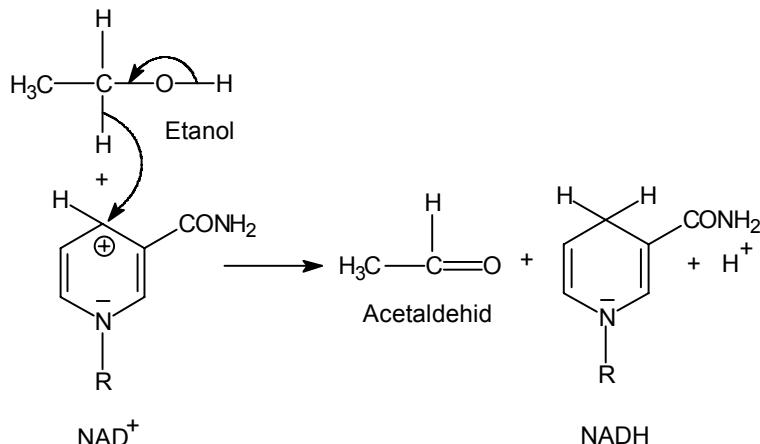


Slika 6.1-4.  
Rastegnuta konformacija NAD<sup>+</sup> odnosno NADP<sup>+</sup>.

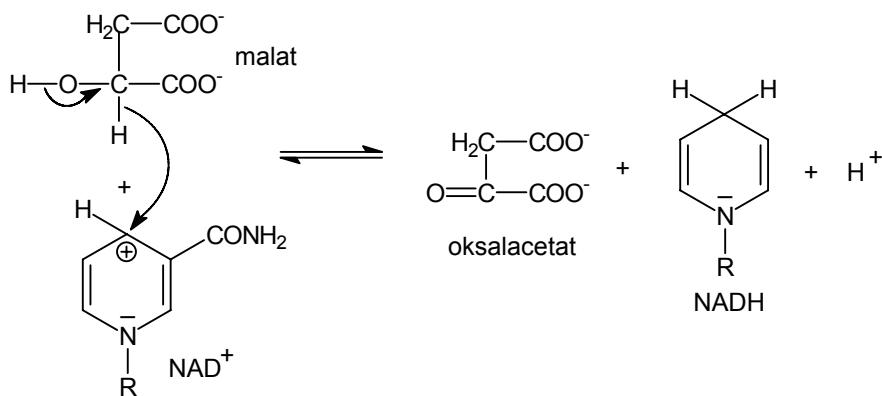
Koenzimi NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> su, kako je dokazano, pre svega sastojci oko 50 dehidrogenaza i oksidoreduktaza sa kodnim

brojevima od EC 1.1.1.1 do EC 1.1.1.50, koje imaju različite funkcije. Dehidrogenaze su tetramerni enzimi i svaka subjedinica sadrži po jedan nikotinamidski koenzim. One učestvuju u glikolizi, ciklusu trikarbonskih kiselina, respiratornom lancu, biosintezi masnih kiselina i steroida. Tipične reakcije katalizovane dehidrogenazama sa  $\text{NAD}^+$  su:

- a) dehidrogenovanje etanola u acetaldehid (slika 6.1-5) i
- b) dehidrogenovanje malata u oksalacetat (slika 6.1-6).



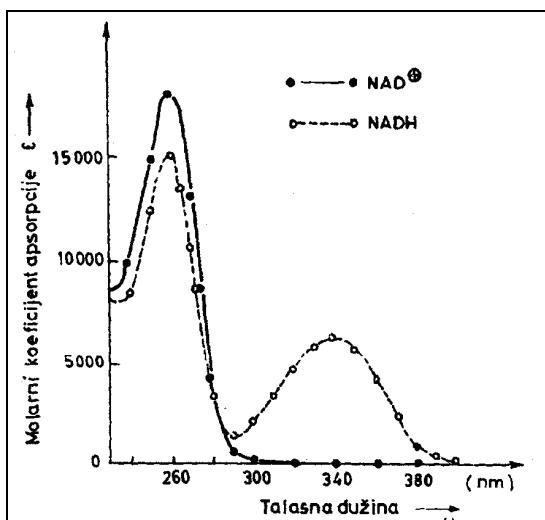
Slika 6.1-5. Dehidrogenovanje etanola.



Slika 6.1-6. Dehidrogenovanje malata.

Redukovani nikotinamidski nukleotidi lako disosuju od dehidrogenaza i mogu se oksidovati drugim enzimima.  $\text{NAD}^+$  prenosi H pretežno u oksidacionim procesima (npr. oksidacijama u respiratornom lancu) dok je  $\text{NADP}^+$  redukciona snaga u sintetičkim reakcijama.

Redukovani piridinski nukleotidi se razlikuju po maksimumu apsorpcije od neredukovanih, koji se kao "optički test" primenjuje za merenje brzine reakcije enzimskih reakcija pri visokim koncentracijama supstrata i enzima. Ultraljubičasti spektri NAD<sup>+</sup> i NADH dati su na sl.6.1-7.

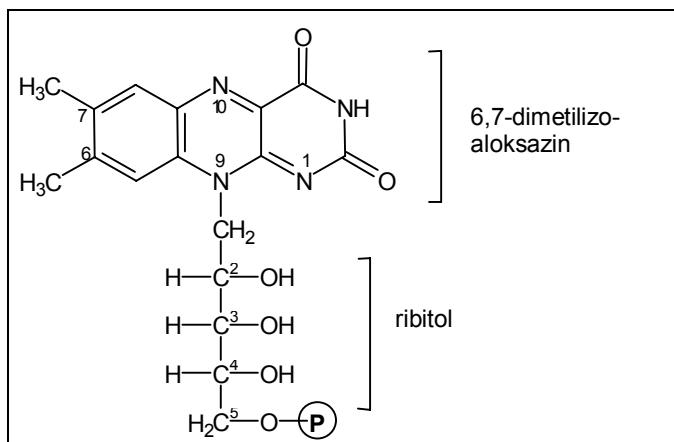


Slika 6.1-7.  
UV spektri NAD<sup>+</sup> i NADH.

**FLAVINSKI NUKLEOTIDI** su koenzimi *flavin-mononukleotid* (FMN) i *flavin-adenindinukleotid* (FAD), derivati riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>). Oni su koenzimi i /ili prostetične grupe dehidrogenaza poznatiji pod nazivom flavoproteini.

#### Flavin-mononukleotid

(FMN) - je izgradjen iz 6,7-dimetilizoaloksazina (flavina), i ribitolskog ostatka vezanog za N u položaju 9. Ribitol je u položaju 5' esterifikovan fosfornom kiselinom (slika 6.1-8).



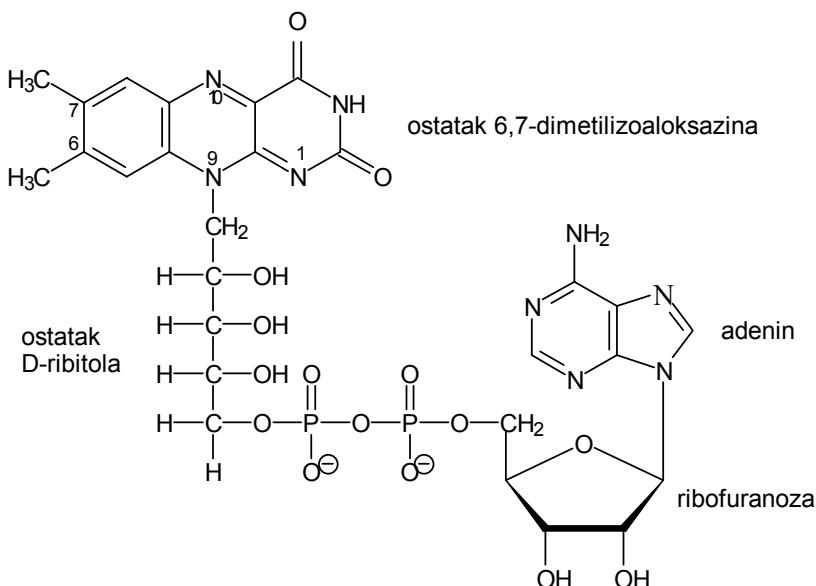
Slika 6.1-8. Flavin-mononukleotid (FMN).

FMN nije pravi nukleotid jer umesto riboze sadrži ribitol. On je koenzim raznih oksidoreduktaza i ima maksimum fluorescencije na 530 nm.

**Flavin-adenindinukleotid** (FAD) - je izgradjen iz dva nukleotida (riboflavin-fosfata i adenozin-monofosfata) povezanih difosfatnom vezom. FAD je aktivna grupa mnogih enzima. Sintetizuje se iz FMN i ATP u reakciji katalizovanoj *pirofosfatazom* (PPi-aza; EC 3.6.1.1) (reakcija 6.1-1).

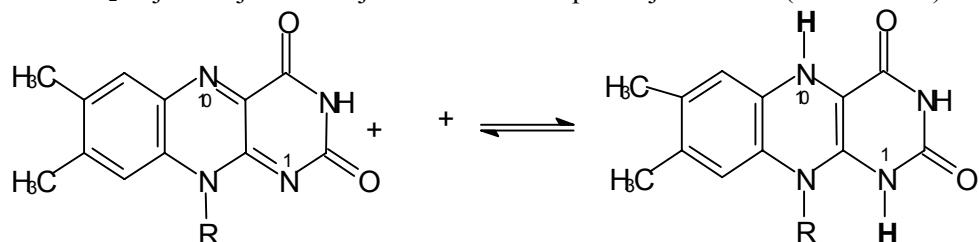


Struktura FAD data je na slici 6.1-9.



Slika 6.1-9. Flavin-adenindinukleotid (FAD).

Flavinski nukleotidi kao koenzimi oksidoreduktaza mogu vezivati vodonikove atome na način prikazan na slici 6.1-10. Proizvodi reakcije su  $\text{FMNH}_2$  ili  $\text{FADH}_2$  koji nastaju vezivanjem 2 vodonika u položajima 1 i 10 (slika 6.1-10).

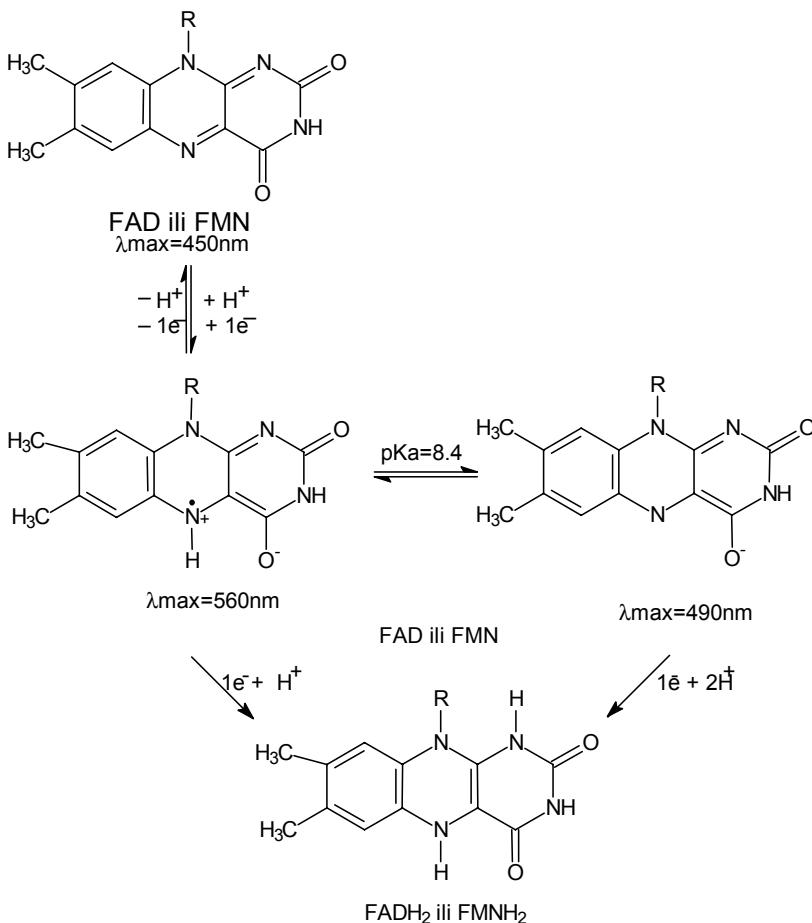


Slika 6.1-10. Oksidovani (hinon) i redukovani (hidrohinon) oblik koenzima.

Enzimi zavisni od flavinskih koenzima se nazivaju flavin-zavisnim enzimima, jer sadrže čvrsto vezane FMN ili FAD, zbog čega ove koenzime često ubrajamo i u prostetične grupe. U toku katalize flavinskim enzimima postoje tri oksidaciona stepena flavinskih struktura:

- oksidovan - flavohinon (žuto obojen)
- poluredukovan - flavosemihinon (plavo obojen) i
- redukovan - flavohidrohinon (bezbojan).

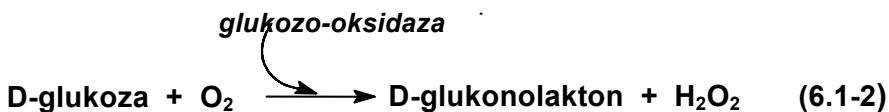
Oksidacioni stepeni flavinskih koenzima dati su na slici 6.1-11.



Slika 6.1-11. Oksidacioni stepeni flavinskih koenzima

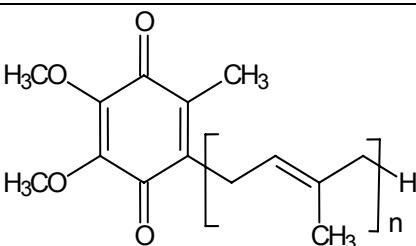
Flavinski koenzimi se vezuju za enzime sulfhidrilnom, imidazolskom i metil-grupom u C-8 a ređe u C-6, i ostaju reversno vezani za proteinski deo enzima. Pomoću flavinskih nukleotida se prenose redukcioni ekvivalenti od donora preko flavina na specifične akceptore. Tako npr. oksidacija glukoze u glukonolakton

(važna reakcija u pentozo-fosfatnom ciklusu, poglavljje 11) katalizovana je *glukozo-oksidazom* (EC 1.1.3.4) sa FAD kao prostetičnom grupom i O<sub>2</sub> kao akceptorom H (jednačina 6.1-2)



Molekulska masa enzima koji koriste flavinske koenzime za svoju katalitičku funkciju se kreće od 7 do 12 KD.

**UBIHINONI (KOENZIMI Q; CoQ) I PLASTOHINONI** - su niskomolekularna redoks jedinjenja respiratornog lanca. Po hemijskom sastavu su benzohinonski derivati koji u bočnom lancu sadrže 6-10 izoprenskih jedinica (slika 6.1-12). Nalaze se najviše u hloroplastima. Razlažu se sporo kiseonikom, UV zracima i sunčevom svetlosti, ali se zato veoma brzo razlažu u alkalnim rastvorima.



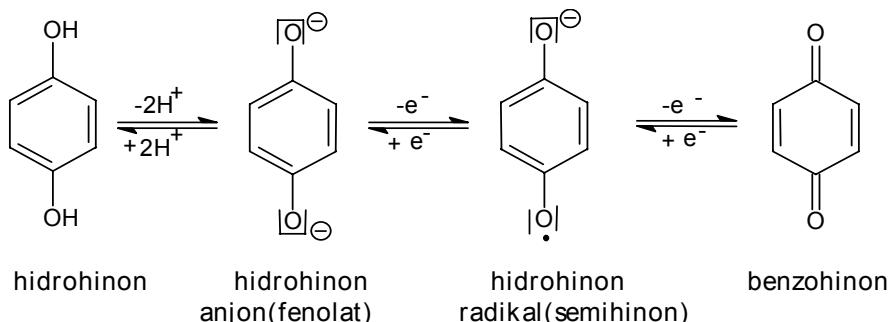
Slika 6.1-12. Struktura ubihinona (n=6-10)

U raznim živim organizmima nalaze se različiti oblici koenzima Q od Co Q1 do Co Q10. Smatra se da samo CoQ10 je oblik sposoban da inicira i modulira ćelijske energetske procese. Ovaj koenzim služi kao prenosilac H koji dobija od redukovanih nikotinamid-adenin-dinukleotida

(NADH).

**Ubihinon (Co Q10)** - čini osnovu redoks sistema respiratornog lanca. U hemijskom pogledu najvažnija osobina Co Q10, jeste sposobnost da se s' lakoćom podvrgava oksido-redukcionim procesima. Redukcija ubihinona u hidrohinon je reversna i vešefazna reakcija. Redukcijom sa jednim elektronom se gradi prvo hidrohinonski radikal (semihinon), sa još jednim elektronom hidrohinonski anjon (fenolat), koji sa dva protona gradi hidrohinon (slika 6.1-13). Lakoća kojom ubihinon otpušta odnosno prima elektrone jeste osnova njegove antioksidativne funkcije, identične mehanizmu delovanja ostalih antioksidanasa, kao što su redukovani odnosno oksidovani oblici tzv. malih molekula kao što su vitamin-E, A, C, redukovani glutation, sekundarni metaboliti i dr. Reversna priroda ove reakcije omogućava da koenzim Q10 prenese elektrone (ali i protone) sa jednog jedinjenja na drugo, i u suštini taj mehanizam pokreće procese stvaranja energije u mitohondrijama (ćelijskim "energanama"), uz istovremeno odvijanje ćelijskog disanja. U mitohondrijama, u tzv. procesu prenosa elektrona, koenzim Q10 pokreće i konstantno održava procese sagorevanja (tzv. oksidativne fosforilacije) glukoze i

ostalih hranljivih materija. U tom procesu nastaju velike količine ATP koje ćelije neposredno koriste kao "energetsko gorivo". Pored toga, jedna od najvažnijih antioksidantnih uloga koenzima Q10 jeste, sprečavanje lipidne peroksidacije, koja se danas smatra osnovnim patogenetskim mehanizmom nastanka većine hroničnih degenerativnih bolesti organizma.



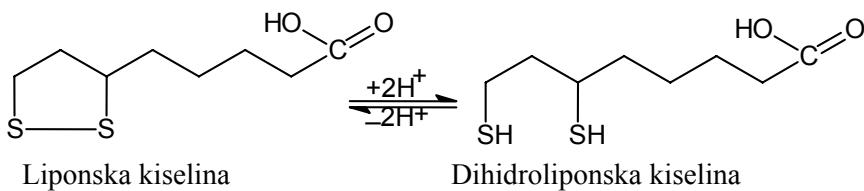
Slika 6.1-13. Redukcija hinona.

Reversna reakcija je dehidrogenovanje hidrohinona u hinon, koja započinje disocijacijom hidrohinona u hidrohinonski anjon uz oslobadjanje dva protiona. Dalja oksidacija se odvija u tri stepena odstranjivanja elektrona.

Izoprenski lanac ubihinona ima lipofilan karakter koji mu omogućava ugradjivanje u lipofilne delove membrane mitohondrija.

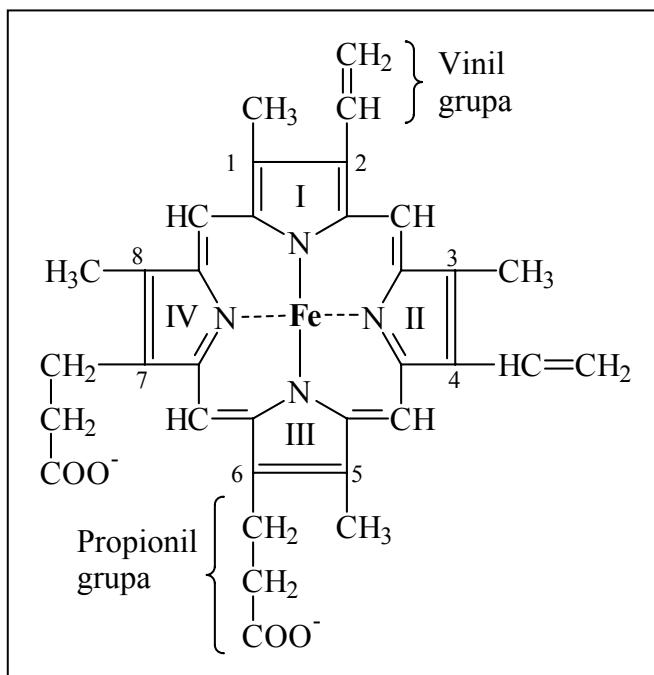
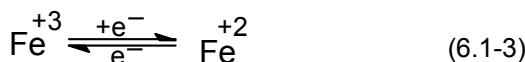
**Plastohinoni** - su poliizoprenski ubihinoni. Po strukturi su slični ubihinonu ali se od njega razlikuju po tome što umesto metoksi grupe sadrže metil grupu u aromatičnom prstenu. Izolovani su iz hloroplasta u kojima prenose elektrone i protone u fotosintezi.

**Liponska kiselina ŠLip(S<sub>2</sub>)Č** – ili tioksična kiselina je ciklični disulfid koji u bočnom lancu sadrži karboksilnu grupu. Ona je koenzim u reakcijama u kojima se prenose vodonik i acil-grupe. Vezuje se karboksilnom grupom za dehidrogenaze (npr. dihidrolipoil- dehidrogenaza) ili neke transferaze (npr. dihidrolipoil-transferaza) i gradi amidnu vezu sa ε-grupom ostatka lizina. Redukcijom gradi dihidroliponsku kiselinu (slika 6.1-14).



Slika 6.1-4. Oksidovana (liponska) i redukovana (dihidroliponska) kiselina.

**CITOCHROMI (HEM PROTEINI)** - su porfirinski hromoproteini (hem-proteini) koji služe kao redoks katalizatori u respiraciji (prenose elektrone od dehidrogenaza na molekulski kiseonik), konverziji energije i dr. Sastojeći su svih ćelija i vezani su za mitohondrije ili druge ćelijske organele. Hem je po hemijskom sastavu tetraapiolski helat sa gvožnjem. Četiri pirola povezana metinskim vezama ( $-\text{CH}=$ ) grade tetrapirol ili porfirin u kojem H atomi mogu biti supstituisani alkilnom, hidroksilnom, vinilnom, karbonilnom ili karboksilnom grupom (slika 6.1-15). Oni deluju kao donori ili akceptori elektrona reversnom izmenom valence atoma gvožnja koji se nalaze u centru porfirinskog kompleksa (jednačina 6.1-3).



Slika 6.1-15.  
Hem-grupa citochroma.  
Struktura hema citochroma b.

Citochromi su veoma stari proteini (oko 2 biliona godina) što ukazuje da su oni veoma značajna jedinjenja. Oni se međusobno razlikuju u apsorpcionim spektrima i srodstvu u odnosu na molekulski kiseonik. Međunarodna komisija za biohemiju i molekularnu biologiju (IUB-MB) klasifikovala

je izolovane citochrome prema strukturi hema u tri grupe i to:

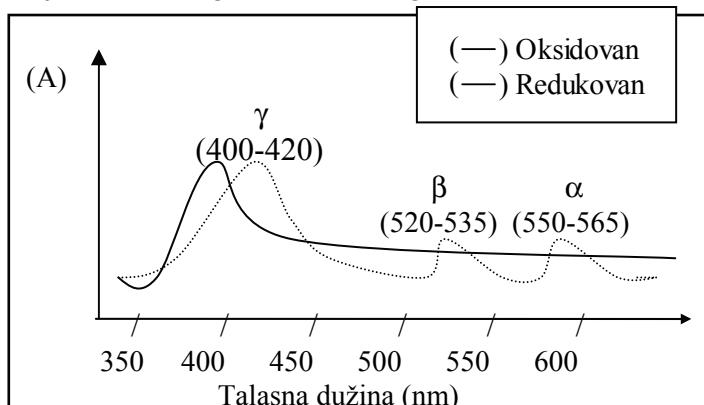
- ◆ *citochrom a* (sadrži gvoždje-formilporfirin),
- ◆ *citochrom b* (sadrži gvoždje-protoporfirin) i
- ◆ *citochrom c* (sadrži supstituisan gvoždje-mezoporfirin sa kovalentno vezanim ostatkom proteina).

Priroda i položaj supstituisanih grupa *citochroma a i c* u poređenju sa strukturom i položajem supstituenata *citochroma b* prikazan je u tabeli 6.1-2.

Tabela 6.1-2. Položaj i priroda supsticenata citochroma **a** i **c**.

Položaj	Citochrom a	Citochrom c
1	Isto	Isto
2(u a)	$\text{---CHCH}_2\text{CH(CH}_2)_3\text{CH(CH}_2)_3\text{CHCH}_3$ $\text{OH} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3$	Isto
2(u c)	$\text{---CHCH}_2\text{CH(CH}_2)_3\text{CH(CH}_2)_3\text{CHCH}_3$ $\text{OH} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3$	$\text{---CHCH}_3$ $\text{S---PROTEIN}$
3	Isto	Isto
4	Isto	$\text{---CHCH}_3$ $\text{S---PROTEIN}$
5	Vodonik (-H)	Isto
6	Isto	Isto
7	Isto	Isto
8	>C = O (formil-grupa)	Isto

Apsorpcioni spektri redukovanih citochroma se razlikuju od apsorpcionih spektara oksidovanih citochroma. Spektri redukovanih citochroma obično sadrže tri pika, označenih kao  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ .  $\alpha$  i  $\beta$  pikovi nisu nađeni u spektrima oksidovanih citochroma (slika 6.1-16). Prisustvo ili odsustvo  $\alpha$  ili  $\beta$  pikova omogućava razlikovanje oksidovanog od redukovanih oblika citochroma.



Slika 6.1-16. Karakteristični apsorpcioni pikovi citochroma.

**Citochrom a (Cyt a)** - je složen kompleks sastavljen iz citochroma a i  $a_3$  koji do danas još nisu razdvojeni, a neki autori ih nazivaju "kompleks citochrom-oksidaza". Prepostavlja se da su izgrađeni iz šest subjedinica koje sadrže hem sa Cu. Citochrom a ne reaguje sa  $O_2$ , CO i cijanidom, dok  $a_3$  reaguje. Kombinacija ova dva citochroma predstavlja poslednji član u elektron-transportnom lancu.

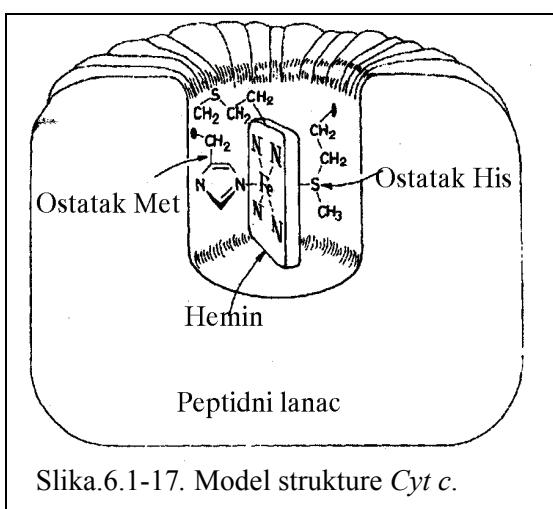
Redukovani oblici ovog kompleksa citohroma se mogu reoksidovati molekulskim kiseonikom. U elektron-transportnom lancu citohromi a i a<sub>3</sub> se vezuju za jedan oligomerni protein i primaju elektrone od citohroma c. Elektrone vezuje prvo citohrom a, a potom citohrom a<sub>3</sub>. Na kraju ih citohrom a<sub>3</sub> predaje molekulskom kiseoniku kao poslednjem akceptoru elektrona u respiratornom lancu mitohondrija.

**Citohrom b (Cyt b)** - je veoma sličan hemoglobinu, jer je po hemijskoj strukturi Fe(II)-protoporfirin (slika 6.1-15). On u respiratornom lancu ima najniži redoks potencijal te zbog toga leži između ubihinona i citohroma c. Za razliku od citohroma c veoma je čvrsto vezan za membranu mitohondrija i može se ekstrahovati samo pomoću detergenata. To je dimerni protein Mr oko 60.000 koji sadrži jednu hem-grupu po monomeru. Njegov centralni atom Fe kao i kod citohroma c nije autooksidativan i ne može reagovati sa CO ili cijanidom. U mikrozomalnoj frakciji biljaka izolovan je citohrom b<sub>5</sub>, a iz hloroplasta i citohrom b<sub>559</sub>, ali njihove funkcije nisu dovoljno proučene.

**Citohrom c (Cyt c)** - je jedini od citohroma izolovan u kristalnom stanju iz pšenice i njegova primarna struktura je detaljno proučena. To je konjugovani hemoprotein s porfirinskim helatnim kompleksom gvožđa. Sastoji se iz monomernog lanca od 112 aminokiselinskih ostataka. Mr je relativno mala i za većinu biljnih vrsta iznosi oko 13.000, dok npr. Mr citohroma c iz pšenice iznosi 24.000. Jedan molekul citohroma sadrži jedan porfirinski prsten sa Fe-atomom u centru (slika 6.1-15). Porfirinski prsten je kovalentno vezan za proteinski lanac preko sulfhidrilne grupe cisteina. Citohrom c je stabilna supstanca, postojan je pri ekstremnim vrednostima pH i u čistoj vodi. Rastvorljiv je koenzim tako da može

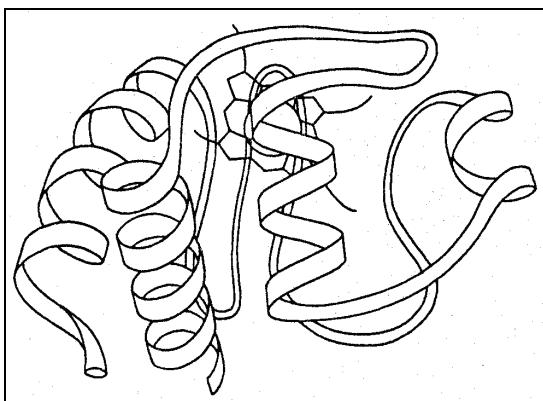
biti ekstra-hovan iz ćelije sa trihlorisirćetnom kiselinom, a potom refrakcionisan do struktura monokristala.

Model strukture citohroma c u prostoru dat je na slici 6.1-17 iz koje se vidi da je hemijski deo citohroma c "uronjen" u proteinski "đžep", kao polarniji deo strukture ovog molekula.



Slika 6.1-17. Model strukture Cyt c.

Tercijarna struktura *citohroma c* u kojoj preovlađuju domeni heliksa ( $\alpha$ -spirala) data je na slici 6.1-18. Ovakva trodimenzionalna struktura olakšava citohromu c brojne katalitičke funkcije u kojima kao koenzim učestvuje.

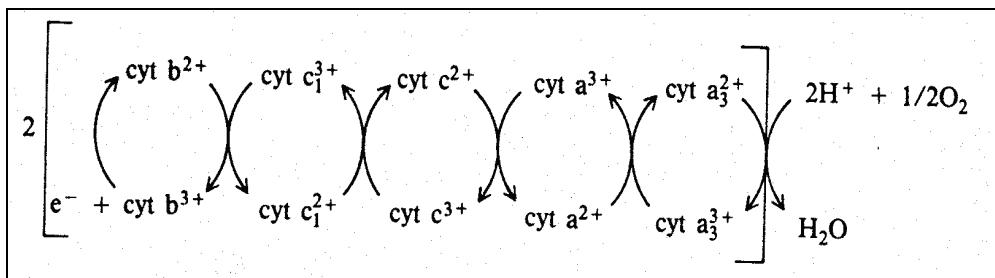


Slika 6.1-18.

Tercijarna struktura *citohroma c* u kojoj dominiraju domeni  $\alpha$ -heliksa.

Kako su citohromi, i različitog redoks potencijala to rezultira da se u toku prenosa elektrona sa oksidovanog substrata do kiseoonika istovremeno ponašaju kao akceptor i kao donori elektrona u elektron-transporntnom

lancu u mitohondrijama. Tok elektrona od supstrata do  $O_2$  posredstvom sistema citohroma (od cyt b do cyt  $a_3$ ) saglasno svom redoks potencijalu prikazan je slikom 6.1-19.



Slika 6.1-19. Citohromi - članovi elektron-transportnog lanca mitohondrija.

Uloga citohroma u biohemijskim procesima je značajna i višestruka. Sastavni su deo respiratornog lanca, učestvuju pri enzimskim reakcijama hidroksilovanja, posreduju kod fiksacije  $N_2$  u bakterijama itd.

Citohromi su nazvani i redoks katalizatorima, jer u oksidovanom obliku oduzimaju elektrone od vodonika i prenose ga u lancu disanja (procesu u kojem se oslobađa energija i skladišti u obliku ATP).

**Ne-hem proteini (Fe-S-proteini)** - su posebna grupa redoks jedinjenja koja sadrže Fe-S-centre i učestvuju u prenosu elektrona. Kako u svojoj strukturi ne sadrže hem nazivaju se još i ne-hem proteini. Mnogi najvažniji proteini iz ove grupe sadrže i sumpor, kao što je slučaj sa ne-hem proteinima uključenim u transport elektrona; to su Fe-S-proteini kao komponente respiratornog kompleksa.

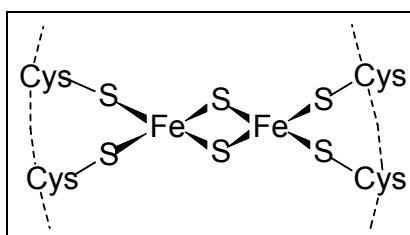
Prosti Fe-S-proteini su feredoksini (Fd). To su niskomolekularni specifični proteini sa  $Mr$  6.000-24.000. Prenose elektrone od jednog enzimskog sistema na drugi, a da sami ne poseduju aktivnost enzima. Izolovani su iz biljaka i fotosintetičkih algi u kristalnom stanju. Primarna struktura je određena kod malog

broja feredoksina, a struktura aktivnog centra samo kod nekoliko. Većina *Fd* ima nizak potencijal oksidacije koji je po vrednosti blizak vodoničnoj elektrodi.

Feredoksini se prema kvantitativnom udelu atoma Fe i S klasifikuju u četiri grupe i to:

- ◆ 1Fe-1S (bakterijski rubredoksin),
- ◆ 2Fe-2S (biljni, bakterijski i životinjski),
- ◆ 4Fe-4S (nefotosintetički bakterijski) i
- ◆ 8Fe-8S (bakterijski).

Gvožđe je obično vezano disulfidnom vezom za ostatke cisteina (Cys) u proteinskom delu molekula feredoksina, odnosno za  $S^{2-}$  ion, kao što pokazuje slika 6.1-20.

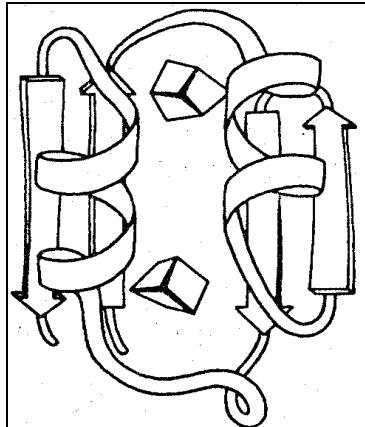


Slika 6.1-20. Struktura feredoksina 2Fe-2S.

To je rastvorljivi Fd koji se u zavisnosti od biljne vrste međusobno razlikuju u molekulskoj masi, redoks potencijalu i rastvorljivosti.

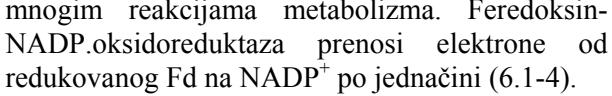
Feredoksini su veoma stara jedinjenja koja potiču iz perioda kada su se na zemlji stvarali prvi oblici života.

Biljni Fd su lokalizovani u hloroplastima u kojima prenose elektrone za fiksaciju  $N_2$ , redukciju H, fotosintetičku redukciju  $NADP^+$ , sintezu ketokiselina I i fosforilaciju. Pored hloroplasta nalaze se I u mitohondrijama gde učestvuju u mnogim reakcijama metabolizma. Feredoksin-NADP-oksidoreduktaza prenosi elektrone od redukovanih Fd na  $NADP^+$  po jednačini (6.1-4).



Slika 6.1-21.

Tercijarna struktura feredoksina.



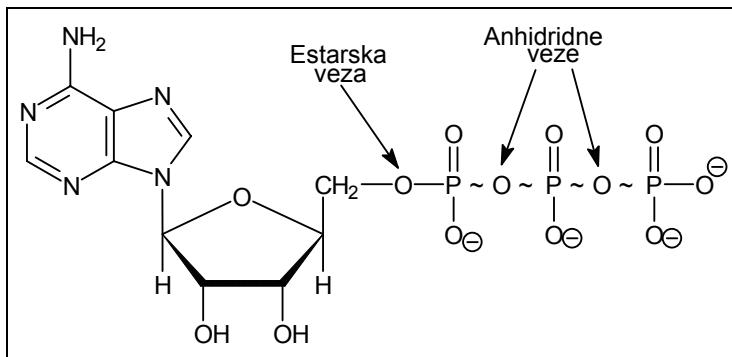
Određivanjem tercijarne strukture Fd utvrđeno je da ona sadrži domene  $\alpha$ -heliksa,  $\beta$ -plisirane strukture i neuredene strukture (slika 6.1-21).

### 6.1.3. Struktura i funkcija koenzima transferaza

Transferaze prema rasprostranjenosti spadaju u drugu grupu enzima posle oksidoreduktaza. Neki koenzimi ove grupe enzima su dati u tabeli 6.1-1.

**ADENOZIN-FOSFATI** - su koenzimi koji u obliku *adenozin-trifosfata* (ATP), *adenozin-difosfata* (ADP) i *adenozin-monofosfata* (AMP) u metabolizmu učestvuju kao prenosioci orto- i difosfata (često pisani kao Pi i PPi). Od navedenih posebno je značajan adenosin-trifosfat.

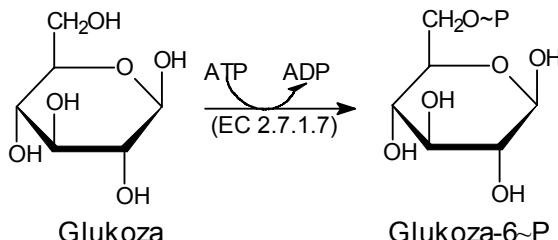
**Adenosin-trifosfat** (ATP) - kao prototip jedinjenja bogatog energijom (oslobađa 34.5 kJ/mol kada prenosi orto-, odnosno 37.4 kJ/mol kada prenosi difosfat), pripada i grupi koenzima transferaza, jer je sastojak enzima koji prenose fosfatne grupe: orto (Pi) i difosfat (PPi) na različite akceptore. Njegova struktura je data na slici 6.1-22.



Slika 6.1-22.  
Struktura (ATP).

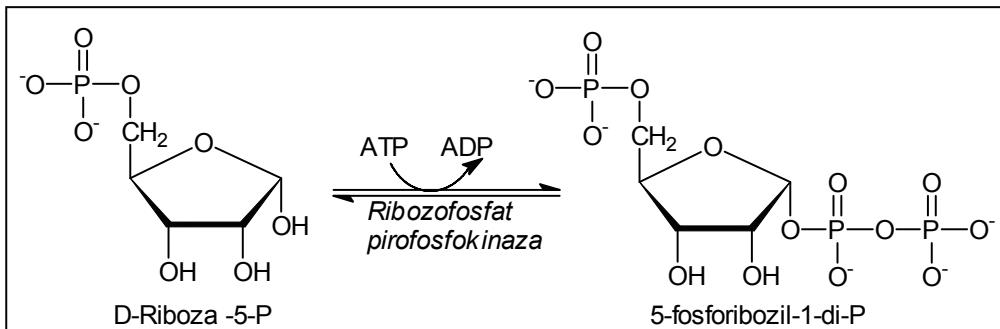
Strukturu ATP karakteriše prisustvo estarske veze i veza bogatih energijom tzv talasastih veza (anhidridnih veza). Kao koenzim ATP ima katalitičku i regulatornu funkciju u brojnim reakcijama sa različitim enzimima, koji u zavisnosti od tipa reakcije odnosno substrata mogu biti kinaze, ATP-aze, nukleotidil-transferaze itd.

**Kinaze** -su enzimi koji uz "pomoć" ATP prenose fosfatne grupe na različite akceptore. Ako je supstrat neka heksoza nazivaju se heksokinaza-ma, kao što pokazuje reakcija fosforilacije glukoze katalizovana enzimom *glukokinazom* (slika 6.1-23).



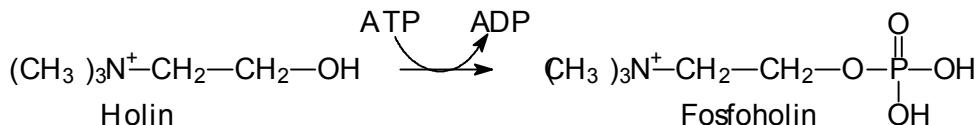
Slika 6.1-23. Fosforilovanje glukoze

ATP može prenositi i difosfatne grupe (mnogo ređe) kao npr. u sintezi 5-fosforibozil-1-difosfata iz ribozo-5-fosfata i tiamin-pirofosfata iz tiamina. Prva navedena reakcija je data na slici 6.1-24. Delovanjem enzima ribozofosfat pirofosphokinaze i ATP prenosi se pirofosphatna grupa ATP na C1 atom riboze 5-fosfata i nastaje 5-fosforibozil pirofosphat. Fosforibozil-pirofosphat je prekursor pirimidinskih nukleotida, histidina i triptofana.



Slika 6.1-24. Fosforilovanje riboze-5-fosfata *ribozofosfat pirofosphokinazom*.

Najtipičniji akceptori fosfatnih grupa su alkoholi, kao što je pokazano reakcijom između holina i ATP (slika 6.1-25). Mesto nukleofilnog napada na molekulu ATP, uvek određuje aktivni centar (odgovarajućeg) enzima. Kod navedene reakcije dolazi do nukleofilnog napada hidroksilne grupe alkohola na atom fosfora u molekulu ATP. Zbog toga se kidaju P-O veze, pa se stvara estar fosforne kiseline, na slici je to O-fosfoholin.



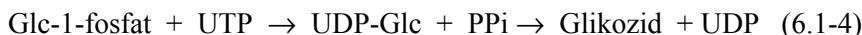
Slika 6.1-25. Fosforilovanje holina.

**ATP-aze.** Ako se fosfatni ostatak, umesto na alkohol, prenese na vodu, to je hidroliza. Enzimi koji katalizuju tu reakciju zovu se adenozin-trifosfataze ili *ATP-aze*.

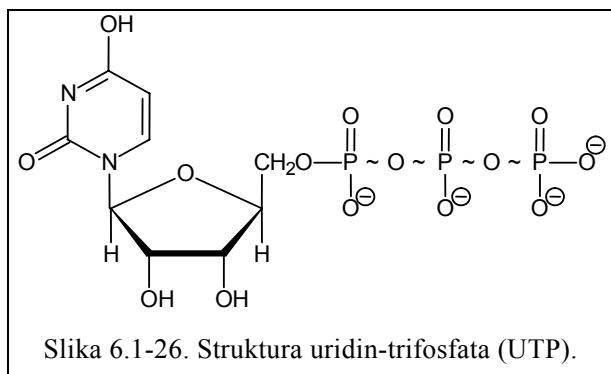
**Nukleotidil-transferaze.** Enzimi koji katalizuju prenos AMP ostatka na supstrat uz oslobađanje pirofosfata (PPi) nazivaju se nukleotidil-transferaze. Najvažnija reakcija ovoga tipa je biosinteza nukleinskih kiselina. Prenos nukleotidilnih ostataka važan je i kod biosinteze NAD i FAD.

**URIDIN-FOSFATI -** (*uridin-trifosfat*, *uridin-difosfat*, *citidin-trifosfat* i dr.) su koenzimi u biosintetičkim reakcijama šećera. Posebno je značajan uridin-trifosfat.

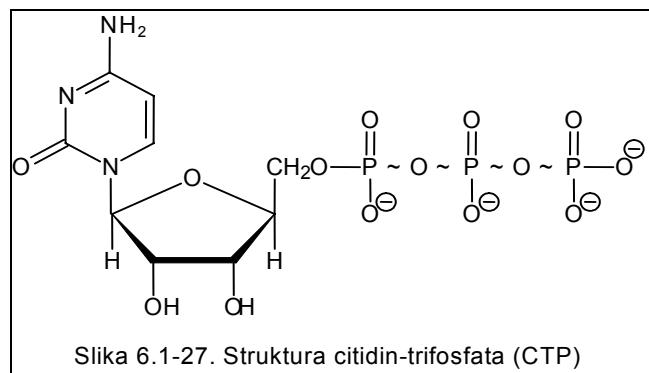
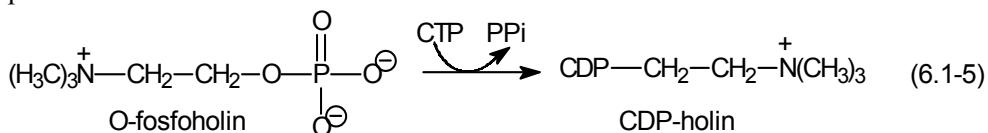
**Uridin-trifosfat** (UTP) - je koenzim enzima *glukozo-1-fosfat-uridintransferaze* (EC 2.7.7.1) koji prenosi ostatke glukoze (Glc) u biosintezi saharoze. U prvoj fazi reakcije stvara se uridindifosfat-glukoza (UDP-Glc) koja poseduje veliki potencijal za prenos grupe. Može se preneti na nukleofilne reaktante pre svega one sa hidroksilnim funkcionalnim grupama dajući glikozide (reakcija 6.1-4).



Struktura UTP je data na slici 6.1-26.



ostali nukleozid-fosfati kao npr. *guanozin-trifosfat* (GTP), ali je ona manje proučena.



### Citidin-trifosfat

(CTP) - je koenzim koji je veoma značajan u biosintezi fosfatida. Kao što reaguju UTP i glukoza-1-fosfat, tako i CTP i fosfoholin reakcijom daju citidin-difosfat-holin koji dalje reaguje s odgovarajućim hidroksilnim molekulima (npr. diacilglicerolom) dajući fosfatidilholin (reakcija 6.1-5). Sličnu funkciju imaju i

Struktura CTP je data na slici 6.1-27.

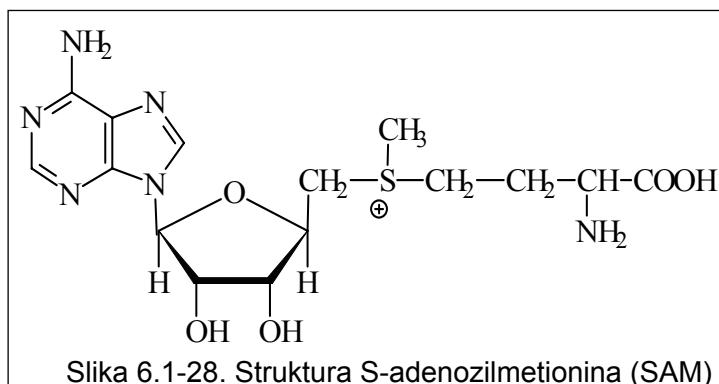
**KOENZIMI C<sub>1</sub>**  
**METABOLIZMA.** U nekim reakcijama metabolizmu se pojavljuju različiti fragmenti sa jednim ugljenikovim atomom kao npr.:

- a) metil-grupa (-CH<sub>3</sub>) od metanola (HO-CH<sub>3</sub>),
- b) hidroksimetil-grupa (-CH<sub>2</sub>OH) od formaldehida (H<sub>2</sub>C=O),

- c) formil-grupa ( $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ ) od mravlje kiseline ( $\text{HCOOH}$ ) i  
d) karboksilna grupa ( $\text{COOH}$ ) od karbonatne kiseline ( $\text{HO-COOH}$ ).

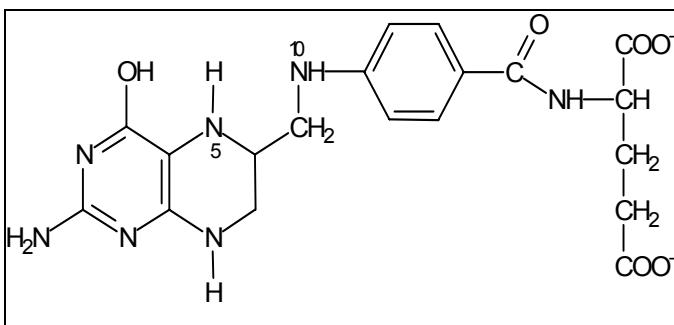
Prenos navedenih grupa omogućuju sledeći koenzimi i prostetične grupe:

**S-adenozilmletonin (SAM)** - je reaktivno sulfonijum jedinjenje koje ima funkciju koenzima prenosioča metil-grupe u  $\text{C}_1$ -metabolizmu i kao takav spada u grupu najznačajnijih metilirajućih agenasa u ćelijskom metabolizmu. Metilirajući agens je i metionin. Međutim ova aminokiselina nema dovoljno velik potencijal prenosa grupe pa je vezana sa adenozinom iz ATP. Metil grupa vezana za S u SAM-u se prenosi na neki atom sa slobodnim elektronskim parom (npr. atom azota). Struktura ovog koenzima je data na slici 6.1-28.



Slika 6.1-28. Struktura S-adenozilmletonina (SAM)

u kojima se ove grupe prenose sa jednog metabolita na drugi i obrnuto. Poznata je pod nazivom pteroilglutaminska kiselina. Koenzim sadrži supstituisan pteridinski prsten, zatim 4-aminobenzoevu kiselinu i za nju vezanu glutaminsku kiselinu (slika 6.1-29). Naziv joj potiče od latinske reči folium = list. Najpre je otkrivena u listu spanaća a kasnije u mnogim drugim biljkama.

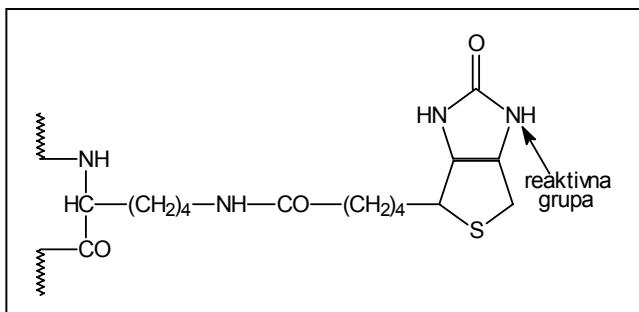


Slika 6.1-29.  
Struktura  $\text{FH}_4$

Svoju koenzimsku funkciju obavlja u nizu kompleksnih reakcija.  $\text{C}_1$ -jedinice prenosi tako što ih veže za atome azota ( $\text{N}_5$  i  $\text{N}_{10}$ ). Kao donor  $\text{C}_1$ -jedinica

učestvuje u biosintezi aminokiselina glicina, serina i metionina te purina, komponenata DNK i intermedijera u sintezi tiamin-pirofosfata itd.

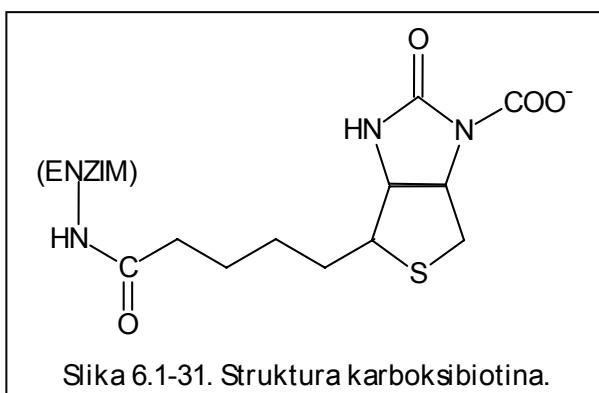
**Biotin** - je mobilni nosač karboksilne grupe odnosno aktiviranog CO<sub>2</sub>. On je prostetična grupa karboksilaza, *karboksil-transferaze* te tako katalizuje reakcije karboksilovanja. U svojoj strukturi sadrži imidazolski prsten koji je u *cis* položaju fuzionisan sa tetrahidrotiofrenom. Za enzim se veže kovalentno preko ε-grupe lizina koja ga spaja sa aktivnim centrom enzima i gradi biotinil-lizilprotein (biocitin) (slika 6.1-30).



Slika 6.1-30.  
Struktura biocitina.

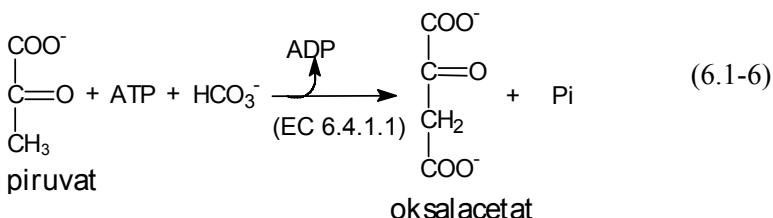
U reakciji karboksilova-nja učestvuje reaktivna grupa biotina u imidazolskom

prstenu pri čemu se gradi N-karboksiderivat biotina kao međuproizvod (slika 6.1-31).



Slika 6.1-31. Struktura karboksibiotina.

Karboksilovanje biotina je endogena reakcija i može teći samo u prisustvu i hidrolizi ATP. Veoma značajna reakcija u biosin-tezi glukoze je karboksilovanje piruvata do oksalace-tata koja se odvija uz učešće enzima *piruvat karboksilaze* (EC 6.4.1.1), (reakcija 6.1-6).

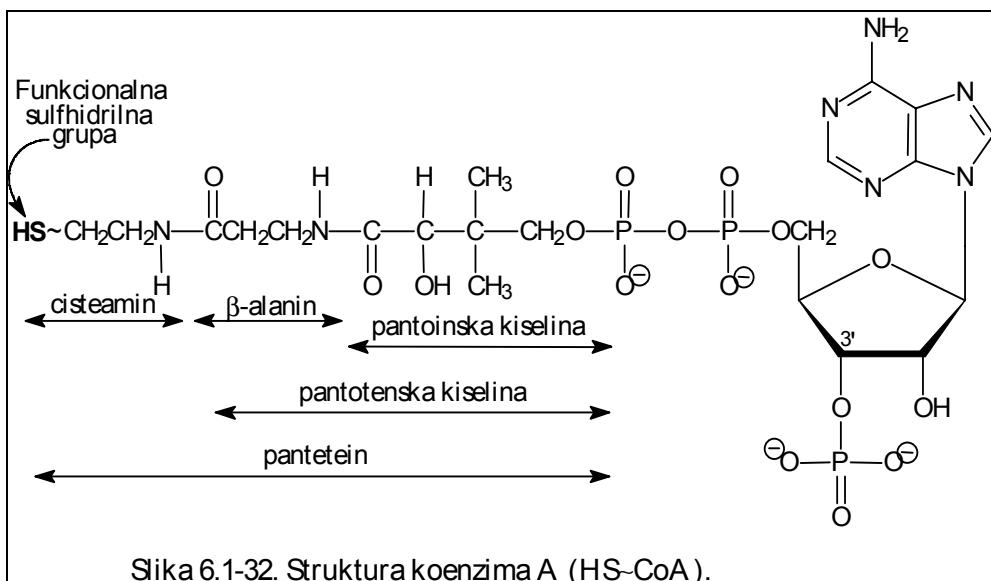


Karboksilovanje enzimima zavisnim od biotina se odvija i u drugim biohemijskim procesima kao npr. biosintezi i degradaciji masnih kiselina, aminokiselina leucina i izoleucina i dr.

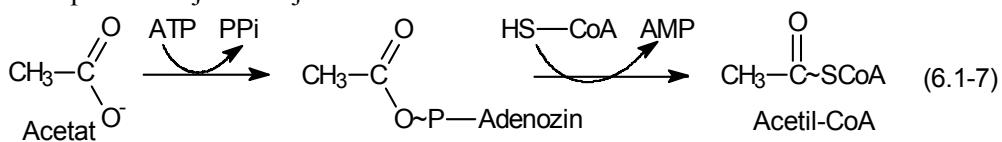
**KOENZIMI C<sub>2</sub> METABOLIZMA.** Veći značaj u metabolizmu imaju tri C<sub>2</sub>-fragmenta: acetilni ostatak koji "aktivira" koenzim A ("aktivirani acetat"),

acetaldehid i glikolaldehid (hidroksiacetaldehid) koje prenosi tiamin-difosfat. Samo je prenos glikolaldehida stvarna transferazna reakcija koju katalizuje transketolaza. Nasuprot tome, aktivirani acetaldehid nastaje u toku dekarboksilacije piruvata. Zbog toga ćemo tiamin-difosfat opisati kao koenzim liaza.

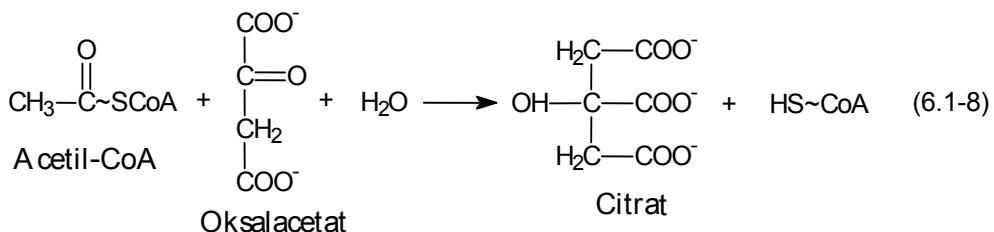
**Koenzim A (HS-CoA)** - je kompleksan molekul koji sadrži reaktivnu sulfhidrilnu grupu (tiolna grupa) koja može reagovati sa karboksilnom grupom i graditi *tioestre*. Izgrađen je iz pantotenske kiseline (vitamin B<sub>5</sub>), cisteamina, β-alanina i adenozilnog ostatka koji je fosforilovan u položaju 3'. Struktura CoA je data na slici 6.1-32.



Tiolni estri mogu biti uključeni u mnoge transferazne reakcije kao npr. prenos acetil i acil-grupa. Za najvažniji acil-derivat, *acetil-CoA (aktivirana sirćetna kiselina)* postoji u metabolizmu spremište (pool) u koje on može na različite načine "pricicati", a isto tako i "oticati" (vidi poglavlje metabolizma ugljenih hidrata i lipida). U biološkim sistemima on uglavnom funkcioniše kao acetil-CoA, i učestvuje u reakcijama sinteze masnih kiselina, fitosterola itd. Acetil-CoA nastaje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata i β-oksidacijom masnih kiselina. Takođe može nastati iz slobodnog acetata uz katalizu enzimom acetil-CoA sintetaza. Acetil-CoA je značajan kao izvor acetata u ciklusu limunske kiseline. Nastajanje acetil-CoA prikazano je reakcijom 6.1-7.



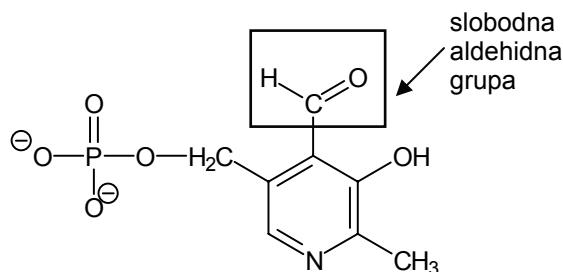
Za prevodenje acetata (ili neke druge karboksilne kiseline) u to jedinjenje sa visokim potencijalom prenošenja grupe potrebna je energija. Kao izvor može poslužiti ATP ili neke druge egzogene reakcije (oksidativna dekarboksilacija i slično). Metabolički aktivan oblik acetil-CoA ima funkciju donatora acetil-grupe. U reakciji sinteze citrata acetil-CoA svoju acetil-grupu prenosi na oksalacetat i gradi citrat (reakcija 6.1-8).



#### 6.1.4. Struktura i funkcija koenzima liaza, izomeraza i ligaza

**LIAZE** - su enzimi koji katalizuju razlaganje nekog jedinjenja (supstrata) ili obrnuto-spajanje dva jedinjenja u neko treće (sintaze). Ta poslednja reakcija poklapa se često sa prenosom grupe i dok kod enzima još možemo povući neku granicu, to nije moguće kod koenzima. Mnogobrojne grupe, aktivirane koenzimima, učestvuju u reakcijama sintaza, npr. acetil-CoA, karboksibiotin itd. Važna podgrupa liaza su *dekarboksilaze*. Kod dekarboksilacije aminokiselina deluje *piridoksal-fosfat* kao prostetična grupa. Pri dekarboksilaciji piruvata u acetaldehid učestvuje *tiamin-difosfat* kao kofaktor, a u reakcijama nastajanja tioestara ulogu koenzima ima *fosfoadenozin-fosfatosulfat*.

**Piridoksal-fosfat** (PALP) - je najznačajniji koenzim enzima aminotransferaza (koje katalizuju prenošenje amino grupe sa aminokiseline-davaoca na  $\alpha$ -ketokiseline), aminodekarboksilaza i različitih liaza koje učestvuju u metabolizmu aminokiselina. Enzimi koji katalizuju racemizaciju aminokiselina takođe imaju PALP kao koenzim. On je i primer da ista prostetična grupa može biti koenzim različitih enzima (što dokazuje da je specifičnost delovanja enzima uslovljena njihovim proteinskim delom). Po hemijskom sastavu PALP je fosforilovan piridoksal (slika 6.1-33).

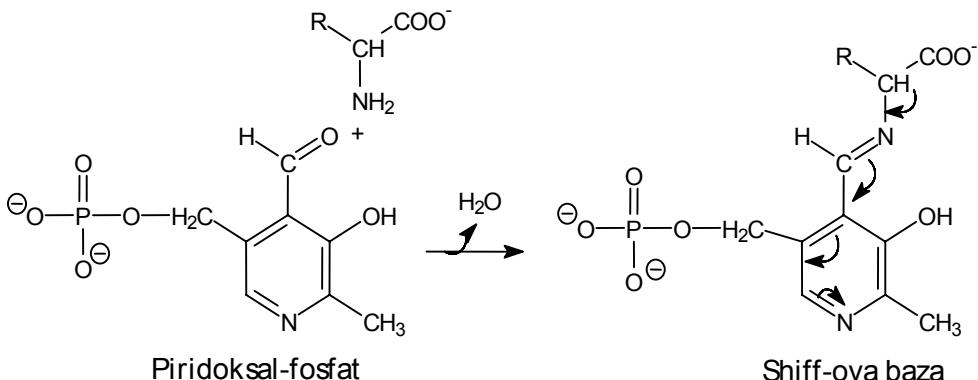


Slika 6.1-33.  
Struktura piridoksal-fosfata  
(PALP).

Kao što se iz formule vidi piridoksal-fosfat ima slobodnu aldehidnu grupu koja se sa amino-grupom neke

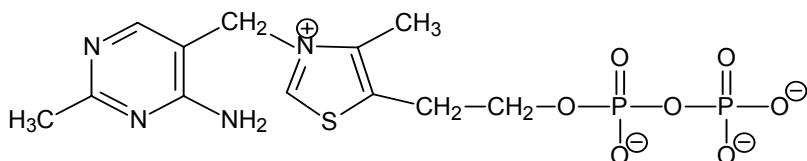
aminokiseline povezuje u *Shiff*-ovu bazu (slika 6.1-34).

U *Shiff*-ovoj bazi azot piridinskog prstena privlači elektrone sa  $\alpha$ -ugljenikovog atoma aminokiseline preko C=N dvostrukе veze, što olakšava eliminaciju jednog od supstiteuna u obliku pozitivno nanelektrisane grupe. Zavisno od grupe koja se eliminiše nastaju različite mogućnosti reakcije. Kod transaminacije aminokiseline se transformiše u ketokiselinu, a piridoksal-fosfat u piridoksamino-fosfat koji prenosi  $\text{NH}_4^+$  ion na drugu ketokiselinu.



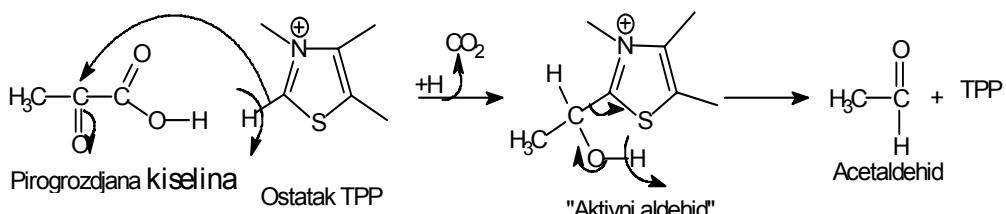
Slika 6.1-34. Nastajanje *Shiff*-ove baze.

**Tiamin-pirofosfat** (TPP, tiamin-difosfat) - je koenzim u više enzimskih reakcija u kojima se aldehidna grupa prenosi od donora akceptoru. Po hemijskom sastavu je pirofosfatni estar tiamina (slika 6.1-35).



Slika 6.1-35. Struktura tiamin-pirofosfata (TPP).

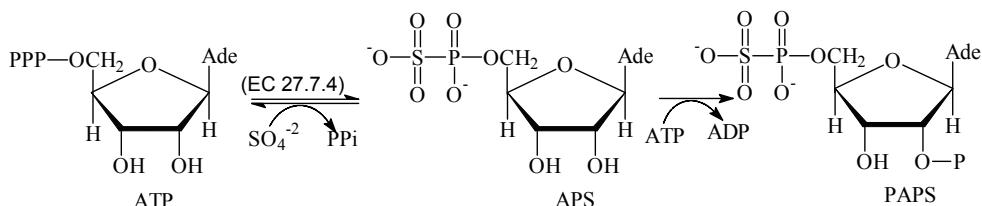
Najvažniji tip reakcije u kojoj tiamin-difosfat učestvuje kao prostetična grupa nekog enzima, jeste *dekarboksilovanje*  $\alpha$ -ketokiselina, piruvata i  $\alpha$ -ketoglutarata. Reaktivni centar TPP-a je C<sub>2</sub>-tiazolskog prstena koji lako otpušta proton i gradi karbanjon. Proizvod dekarboksilacije, koji je u slučaju piruvata "aktivirani" aldehid, može se kao nukleofilna grupa dalje prenositi. Kod oksidativne *dekarboksilacije* akceptor je liponska kiselina. Reakcija dekarboksilacije piruvata prikazana je na slici 6.1-36.



Slika 6.1-36. Dekarboksilovanje pirogrožđane kiseline.

Pored navedenog tiamin-pirofosfat je koenzim mnogih drugih enzima kao npr. transketolaza i fosfoketolaza koji katalizuju i reakcije ciklusa limunske kiseline i pentozofosfatnog ciklusa.

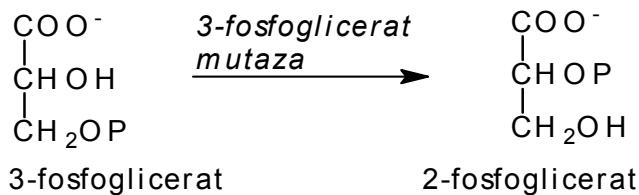
**Fosfoadenozin-fosfatosulfat** (PAPS) - je ključni intermedijer u reakciji sulfata i građenja estara sa sulfokinazama. Njegova sinteza je poznata kao *aktivacija sulfata* (slika 6.1-37). U prvoj fazi terminalni fosfat u ATP se zamenjuje sulfatom i gradi se adenozin-fosfatosulfat (APS) uz katalizu sa *sulfatadenil-transferazom* (EC 2.7.7.4). U drugoj fazi APS se fosforiliše u 2' položaju adenozilnog ostatka sa ATP uz katalizu sa enzimom *adenilsulfat-kinazom* (EC 2.7.1.25). Građenje makroenergetske veze između adenilne kiseline i sulfatnog anjona se obavlja endogenom reakcijom. Smeša APS-a i PAPS-a ima visoki potencijal prenosa grupe.



Slika 6.1-37. Sinteza fosfoadenozin-fosfatosulfata (PAPS).

**IZOMERAZE** - su proteinski enzimi za čiju katalitičku funkciju nije potreban koenzim. Izuzetak je enzim *mutaza* koja u metabolizmu ugljenih hidrata omogućava prebacivanje fosfatne grupe sa jednog C atoma u skeletu na drugi. Tipična reakcija ovog tipa je transformacija 3-fosfoglicerata u 2-fosfoglicerat

delovanjem enzima 3-fosfoglicerat mutaze kao jedna od važnih reakcija u drugoj fazi glikolize.



**LIGAZE** - u reakcijama koje katalizuju koriste nukleozid-fosphate (najčešće ATP, UDP, CTP i GTP) kao koenzime, biotin kod karboksi-lovanja, a u aktiviranju aminokise-lina t-RNA (i ako ovo jedinjenje po definiciji ne pripada koenzimima, jer nije niskomolekularno).

**HIDROLAZE** - su grupa enzima za čiju katalitičku aktivnost nisu potrebni koenzimi.

## 6.2. Vitamini

Vitamini su grupa neproteinskih niskomolekularnih organskih jedinjenja različitog hemijskog sastava i fizičko-hemijskih osobina. Esencijalni su za normalan život svih organizama, ali su zastupljeni u daleko manjim količinama u odnosu na proteine, lipide i ugljene hidrate. Osnovna im je katalitička i regulatorna funkcija u metabolizmu, što realizuju neposredno ili u sastavu sa drugim jedinjenjima (npr. koenzimima). Vitamine najviše sintetizuju biljke i mikroorganizmi. Do nedavno je smatrano da su oni potrebni samo za normalan rast i razvoj heterotrofnih organizama. U novije vreme (studijom ishrane biljaka u kontrolisanim uslovima, kao i kulturom tkiva) dokazano je da isti značaj imaju i za biljne organizme. Biljke se neće pravilno razvijati ako nemaju dovoljno vitamina.

Danas je poznato oko 40 jedinjenja koja imaju vitamsku aktivnost. Oni se proučavaju opširnije u novijoj biohemijskoj disciplini *vitaminologiji*.

Nedostatak vitamina izaziva poremećaje u biohemiskim reakcijama koji se manifestuju određenim fiziološkim simptomima nazvanim *avitaminozama*.

Vitamini se od 1913. godine označavaju velikim slovima abecede iako je prisutna primedba Komisije za čistu i primenjenu hemiju da se nazivi vitamina usklade sa njihovom strukturu. Kako se radi o molekulima veoma različitog hemijskog sastava to ih je teško na osnovu strukture klasifikovati u odgovarajuće hemijske tipove jedinjenja. Zbog toga se radije klasifikuju ili po svojoj rastvorljivosti ili po biohemiskoj funkciji.

Po osnovu rastvorljivosti vitamini su podeljeni u dve grupe od kojih navodimo predstavnike svake grupe:

- ◆ vitamini rastvorljivi u vodi ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_6$ ,  $B_9$ ,  $B_{15}$ , PP, H, C i liponska kiselina) i
- ◆ vitamini rastvorljivi u mastima (A, D, E, i K).

Kako ova podela nema nikakve veze sa njihovom funkcijom to je uvedena i podela prema biohemijskoj funkciji u metabolizmu, po kojoj se vitamini klasificuju u tri grupe i to:

- ◆ vitamini koji imaju funkciju koenzima ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_6$ ,  $B_9$ , C , PP, H i liponska kiselina),
- ◆ vitamini koji nemaju funkciju koenzima (A, D, E, K, U i  $B_{15}$ ) i
- ◆ supstance slične vitaminima (F, P i inozit).

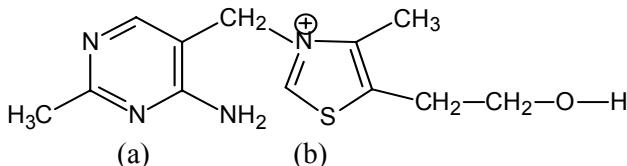
Fiziološko delovanje vitamina se izražava u internacionalnim jedinicama (IU). Količine vitamina koje odgovaraju jednoj internacionalnoj jedinici nisu iste kod svih vitamina (za vitamin A iznosi 0.03 µg, 0.18 µg za biotin, 50 µg za vitamin C itd.)

Pojava da vitaminsku funkciju ima nekoliko strukturno sličnih jedinjenja naziva se *vitamerijom*, a takva jedinjenja *vitamerima*.

### 6.2.1. Vitamini koji imaju funkciju koenzima

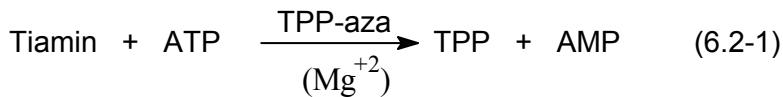
Vitamini sa funkcijom koenzima su pretežno vitamini grupe B koji su rastvorljivi u vodi, te se ne deponuju u organizmu čoveka i životinja, pa se moraju unositi hranom.

**Vitamin B<sub>1</sub>** (tiamin, aneurin) - je jedan od najranije poznatih vitamina rastvorljivih u vodi. Sastoji se iz pirimidinskog i tiazolskog prstena koji su međusobno povezani metilenskim mostom (slika 6.2-1).



Slika 6.2-1. Struktura vitamina B<sub>1</sub> : (a) -pirimidinski prsten; (b) -tiazolski prsten.

Tiamin je sastojak koenzima tiamin-pirofosfata (TPP) koji je značajan u reakcijama oksidativne dekarboksilacije. Lako se fosforiliše sa ATP delovanjem *tiamin-pirofosfataze* (TPP-aza; EC 2.7.6.2) i  $Mg^{2+}$  kao aktivatora enzima (reakcija 6.2-1).



Vitamin B<sub>1</sub> u obliku difosfata učestvuje u reakcijama oksidativne dekarboksilacije α-ketokiselina (pretežno piruvata) kao i α-ketoglutarata.

Sintetizuje se u biljkama i nekim mikroorganizmima. Najviše ga ima u prokljalim zrnima cerealja. U biljkama se sintetizuje na svetlosti, a njegova količina raste tokom vegetacije i dostiže maksimum u toku cvetanja biljaka. Sazrevanjem biljaka tiamin prelazi iz listova u seme. Količina vitamina B<sub>1</sub> zavisi od vrste biljke, ekoloških faktora i dodatka mineralnih djubriva sa N, P, K i S. Nepravilnim djubrenjem količina vitamina u biljkama opada od 1.5 do 2 puta. Vitamin B<sub>1</sub> je različito zastupljen kod različitih biljnih vrsta (tabela 6.2-1).

Najbolji izvor vitamina B<sub>1</sub> je pivski kvasac jer sadrži oko 5 mg% ovog vitamina.

Tabela 6.2-1. Sadržaj vitamina B<sub>1</sub> (mg%).

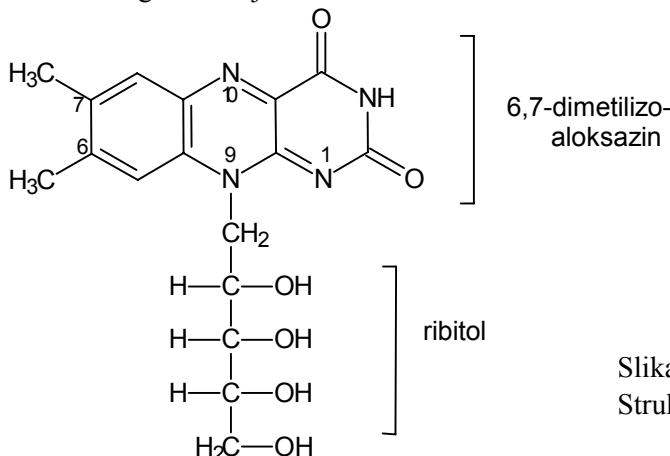
Biljna vrsta	Vitamini B <sub>1</sub>	Biljna vrsta	Vitamin B <sub>1</sub>
Raž ( <i>Secale cereale</i> )	0.2-0.4	Krompir ( <i>S. tuberosum</i> )	0.2
Malina ( <i>Rubus idaeus</i> )	0.3	Kupus ( <i>Brassica oleraceae</i> )	0.16-0.25
Pšenica ( <i>Triticum vulgare</i> )	0.4	Jagode ( <i>Fragaria vesca</i> )	0.05
Paprika ( <i>Capsicum annum</i> )	0.5	Jabuka ( <i>Malus domestica</i> )	0.07
Tikva ( <i>Cucurbita pepo</i> )	0.07-0.14	Kukuruz (zrno) ( <i>Zea mays</i> )	0.15

Kod biljaka nije poznata avitaminoza u vitaminu B<sub>1</sub>. Ona je kod ljudi veoma izražena i dovodi do polineuritisa (bolesti *beri-beri*), neurotskih smetnji i poremećaja funkcije srca. B<sub>1</sub> ulazi u sastav piruvat-dehidrogenaze, piruvat-dekarboksilaze, transketolaze i drugih enzima, te je značajan u metabolizmu ugljenih hidrata. Ako se egzogeno daje biljkama stimuliše rastenje i povećanje prinosa lucerke, graška, rotkve i drugih biljaka.

**Vitamin B<sub>2</sub>** (riboflavin, laktoflavin) - je po hemijskom sastavu 6,7-dimetil-9-ribitol-izoaloksazin (slika 6.2-2).

Vitamin B<sub>2</sub> ima ulogu koenzima u više od 60 enzima, poznatiji pod nazivom *flavoproteini*, koji prenose vodonik i elektrone, jer izoaloksazinska struktura deluje kao reversni redoks sistem.

Prvi put ga je u obliku narandžastih kristala izolovao Szent György sa saradnicima iz surutke 1933.godine. Na svetlosti se raspada u ribitol i 6,7-dimetilizoaloksazin. Lako se oksiduje i redukuje što čini osnovu njegovog vitaminskog delovanja.



Slika 6.2-2.  
Struktura vitamina B<sub>2</sub>.

Vitamin B<sub>2</sub> se u biljkama nalazi u slobodnom obliku. Može se sintetizovati kako na svetlosti tako i u mraku, a njegova količina se znatno smanjuje pri nedostatku azota. Najbogatije biljke u vitaminu B<sub>2</sub> su žitarice i povrće (tabela 6.2-2)

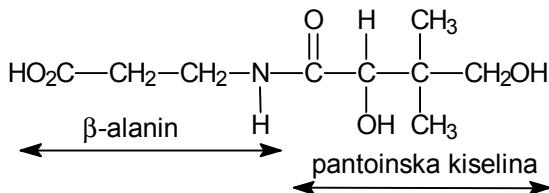
Tabela 6.2-2. Sadržaj vitamina B<sub>2</sub> (mg%).

Izvor vitamina	Vitamin B <sub>2</sub>	Izvor vitamina	Vitamin B <sub>2</sub>
Pšenica	0.09-0.16	Karfiol	0.04-0.08
Ječam	0.007	Kupus	0.05
Kukuruz	0.05-0.12	Mrkva	0.10-0.13
Ovas	0.09-0.10	Raž	1.8
Grašak zeleni	0.15-0.20	Crni luk	0.14-0.20
Grašak suhi	0.16-0.25	Pivski kvasac	6.0

Egzogeno dodan kod biljaka indukuje klijanje i rastenje jer kao sastojak flavinskih enzima učestvuje u oksidaciji aminokiselina, organskih kiselina, prenošenju H<sup>+</sup> i e<sup>-</sup> od NADH i NADPH na citohrome i td.

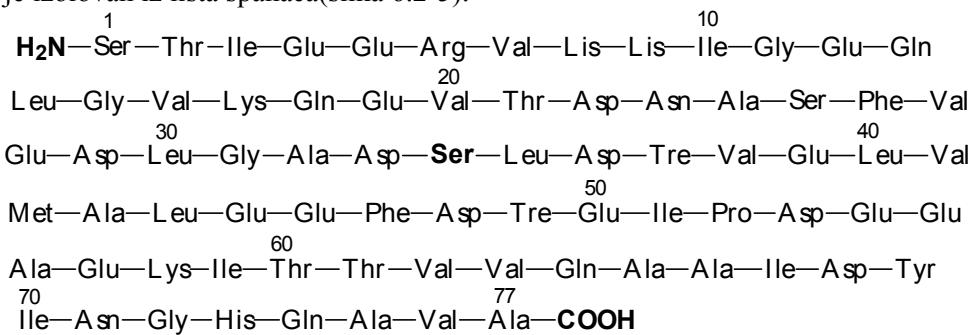
Kod biljaka ne postoje simptomi B<sub>2</sub> avitaminoze kao kod ljudi (kod kojih se javlja dermatitis, upale u usnoj regiji, izmena boje kože, zamor i sl. kao posledica usporavanja oksido-redupcionih procesa).

**Vitamin B<sub>3</sub>** (pantotenska kiselina) - je derivat pantoinske kiseline i β-alanina povezanih medjusobno amidnom vezom. Prvi put je izolovan u kristalnom stanju 1939. godine. Struktura B<sub>3</sub> vitamina je data na slici 6.2-4. Vitamin B<sub>3</sub> je sastojak CoA i kao takav učestvuje u aktiviranju i prenosu sirćetne kiseline (acetil-CoA) i drugih organskih kiselina (acil-CoA), u sintezi limunske kiseline, masnih kiselina, sterola i dr. jedinjenja.



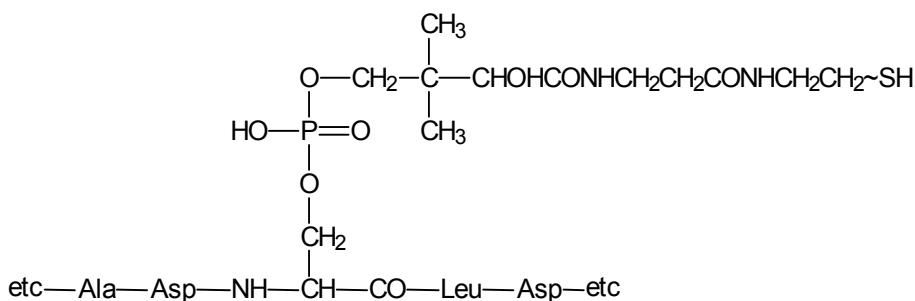
Slika 6.2-4. Struktura vitamina B<sub>3</sub>.

Osim navedenog pantotenska kiselina je sastojak proteinskog nosača acil-grupa tzv.ACP koji učestvuje u biosintezi masnih kiselina i čija je primarna struktura određena i čini je niz od 77 aminokiselina u polipeptidnom lancu . Ovaj polipeptid je izolovan iz lista spanaća(slika 6.2-5).



Slika 6.2-5. Primarna struktura ACP.

ACP biljaka izgradjen je iz oko 70-100 ostataka aminokiselina zavisno od biljne vrste. Mr vrednost ACP je oko 8.000-10.000. On je kovalentno povezan sa 4'-fosfopantoteinom preko aminokiseline Ser u položaju 34. Struktura fosfopantoteina je data na slici 6.2-5.



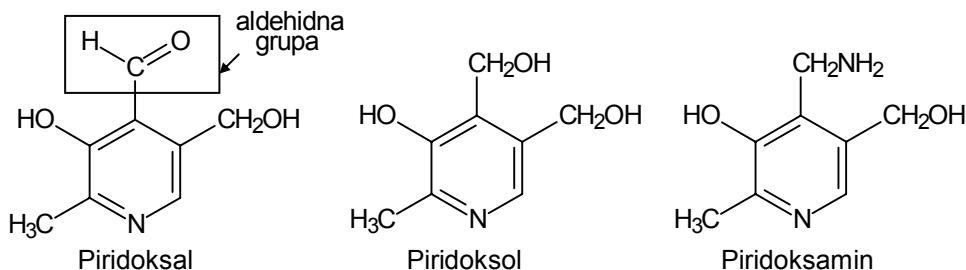
Slika 6.2-5. Struktura 4'-fosfopantoteina.

Pantotenska kiselina se nalazi u svim živim organizmima, a najviše je ima u višim biljkama i mikroorganizmima u kojima se sintetizuje iz aminokiseline triptofana. Biosinteza pantotenske kiseline nije povezana sa fotosintezom i započinje klijanjem biljaka. Najviše je ima u mladim listovima i krajevima korena (2-3 puta više u odnosu na stariji list i stablo). Kod biljaka nije primećena avitaminoza kao posledica nedostatka vitamina B<sub>3</sub>. Količine vitamina B<sub>3</sub> u nekim biljkama su date u tabeli 6.2-3.

Tabela 6.2-3. Sadržaj vitamina B<sub>3</sub> (mg%).

Izvor vitamina	Vitamin B <sub>3</sub>	Izvor vitamina	Vitamin B <sub>3</sub>
Paprika ( <i>Capsicum annum</i> )	0.0025	Pšenica ( <i>Triticum vulgare</i> )	0.15-0.20
Luk ( <i>Allium cepa</i> )	0.01	Raž ( <i>Secale cereale</i> )	0.18-0.25
Sirak ( <i>Sorghum halepense</i> )	0.06	Ječam ( <i>Triticum aestivum</i> )	0.05-0.10
Krompir ( <i>Solanum tuberosum</i> )	0.003	Mrkva ( <i>Daucus carota</i> )	0.05-0.10

**Vitamin B<sub>6</sub>** (piridoksin) - je izgrađen iz tri vitamera i to: *piridoksal*, *piridoksol* i *piridoksamina*. Njihove strukture su date na slici 6.2-6.



Slika 6.2-6. Strukturni vitameri vitamina B<sub>6</sub>.

Svi navedeni vitameri B<sub>6</sub> prelaze u živim organizmima u piridoksal-fosfat-koenzim enzima transaminacije, dekarboksilacije i racemizacije. Aktivator biosinteze B<sub>6</sub> u biljkama je svetlost. Najviše je rasprostranjen u mladim listovima biljaka.

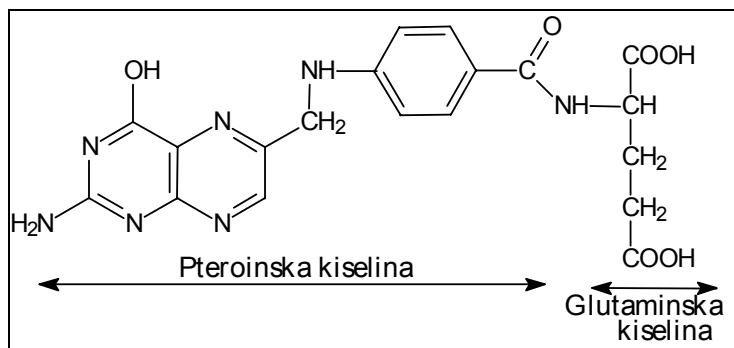
Biohemija funkcija vitamina B<sub>6</sub> je višestruka, jer je koenzim u metabolizmu aminokiselina (transaminacije, dezaminacije i dekarboksilacije). Količine B<sub>6</sub> kreću se u biljkama u sledećim granicama (tabela 6.2-4). (Pivski kvasac sadrži 0.25-0.55 mg% B<sub>2</sub>).

Tabela 6.2-4. Sadržaj vitamina B<sub>6</sub> (mg%).

Izvor vitamina	Vitamin B <sub>6</sub>
Pšenica (zrno)	0.12
Pšenica (klica)	0.20-0.25
Mekinje	0.22-25
Krompir	0.02
Mrkva	0.01
Paprika	0.0019
Grašak	0.025

Kod biljaka za razliku od ljudi nije dokazana avitaminosa u B<sub>6</sub> vitaminu. Egzogeno dodavanje B<sub>6</sub> biljkama ojačava koren paradajza, povećava prinos lucerke i graška, biomasu šećerne repe, ali ne i sadržaj šećera. U kombinaciji sa B<sub>1</sub> deluje kao stimulator rastenja biljaka u ranoj fazi razvoja.

**Folna kiselina** (pteroilglutaminska kiselina, ranije nazivana vitamonom B<sub>9</sub>) - je po hemijskom sastavu derivat pteridin-p-aminobenzoeve i glutaminske kiseline. Redukovan oblik folne kiseline (tetrahidrofolna kiselina, FH<sub>4</sub>) ima ulogu koenzima C<sub>1</sub>-metabolizma. Značajna je u biosintези purina i pirimidina, serina, histidina i metionina. Naziv joj potiče od latinske reči folium = list. Najpre je otkrivena u listu spanaća, a kasnije u mnogim biljnim vrstama. Struktura folne kiseline data je na slici 6.2-7.



Slika 6.2-7.  
Struktura folne  
kiseline.

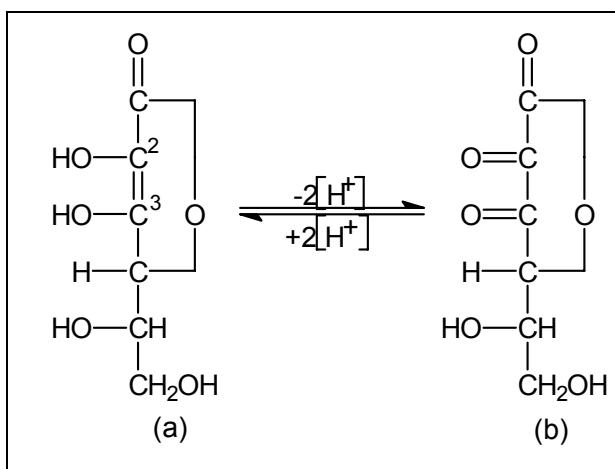
Najviše folne kiseline se nalazi u plodovima borovice, jagoda, malina i šipaka do 160 µmol/kg, jabuci i grožđju

12-25, zrnastim kulturama 1-4, a mladim listovima biljaka 6-20 µmol/kg.

**Vitamin C** (L-askorbinska kiselina) - je vitamin koji je prvo izolovan iz limuna, a zatim i iz paprike. Vitamin C može lako preći u dehidro oblik čime se tumači njegova uloga u oksidoredukcionim procesima. Iako ne sadrži karboksilnu grupu ima kiseo ukus koji potiče od enolnih-OH grupa (na C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub>) koje su sposobne da disocijacijom otpuštaju H<sup>+</sup> jone. Kao en-diol spada u redoks sisteme pri čemu reverzibilno prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu (slika 6.2-8).

Biohemijska funkcija vitamina C se sastoji u obrazovanju redoks sistema sa dehidroaskorbinskom kiselinom koja učestvuje samostalno ili spregnuto sa drugim redoks sistemima u prenošenju vodonika u oksidoredukcionim procesima. U redoks sistemima reaguje sa glutaminskom kiselinom, učestvuje u razgradnji cikličnih aminokiselina, hidroksilovanju steroida, pretvaranju folne kiseline u tetrahidrofolnu i dr. Sastojak je nekih oksidoreduktaza, aktivator arginaza, amilaza, unutar ćelijskih proteaza i dr.

Biljke sintetizuju vitamin C u dovoljnoj količini te kod njih nije dokazana avitaminoza (kod čoveka se avitaminoza manifestuje oštećenjem kapilara, krvavljenjem i upalom desni i dr.). Vitamin C može povećati rast biljaka za 140-170% ako se seme pre setve tretira sa 0.01 mg% rastvorom ovog vitamina.



Slika 6.2-8.  
Struktura vitamina C:  
(a) askorbinska kiselina;  
(b) dehidroaskorbinska  
kiselina.

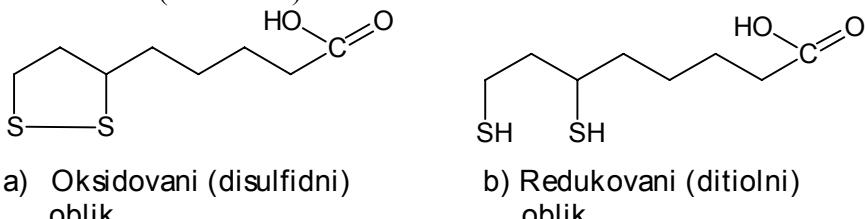
Vitamina C nema u svim biljkama. Tako npr. ne nalazi se u zrnu žitarica. Najviše ga ima u voću i povrću (od kojih plodovi

nekih biljaka su izuzetno bogati ovim vitaminom) (tabela 6.2-5). U biljkama se nalazi u slobodnom i vezanom obliku (obično je vezan za proteine) i naziva se *askorbinogen*. Vitamin C se sintetizuje u ćelijama biljaka iz ugljenih hidrata i to već u semenu koje kljija. Biosinteza ovog vitamina postaje intenzivna u toku vegetacije biljaka naročito u fazi cvetanja, kada se nakuplja u lišću, stabljici, korenju i pupoljcima. Pored niza metaboličkih funkcija vitamin C se ubraja u grupu niskomolekularnih jedinjenja sa izraženim antioksidantnim svojstvima

Tabela 6.2-5. Sadržaj vitamina C (mg%).

Biljna vrsta	Vitamin C	Biljna vrsta	Vitamin C
Šipak	1500	Lucerka	225
Borovnica	100-400	Graorica	200
Paprika	150-200	Detelina	120
Limun	40	Tikva	110
Jabuka	30	Krompir(mladi)	20-40

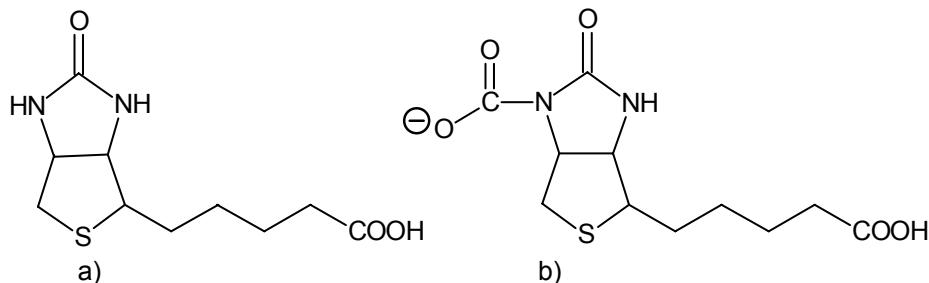
**Liponska kiselina** - je ciklični disulfid koja lako vezuje dva vodonika i prelazi u redukovani oblik *dihidroliponsku* kiselinu. Osnovna funkcija liponske kiseline je kao koenzim oksidoreduktaza jer egzistira u oksidova-nom i redukovanim obliku (slika 6.2-9).



Slika 6.2-9. Struktura liponske kiseline: (a) oksidovan, (b) redukovani oblik.

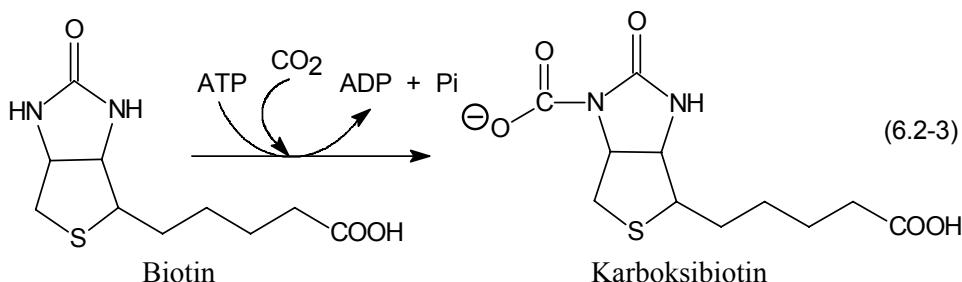
Liponska kiselina je kofaktor multienzimskog kompleksa piruvat-dehidrogenaze i  $\alpha$ -ketoglutarat-dehidrogenaze. Učestvuje u procesu oksidativne dekarboksilacije  $\alpha$ -ketokiselina. Pored navedenog je značajna i za fotosintezu.

**Vitamin H** (biotin) - je kondenzovani proizvod karbamida i tiofenskog prstena. Struktura vitamina H je data na slici 6.2-10.



Slika 6.2-10. Struktura vitamina H: (a) Biotin, (b) Karboksibiotin.

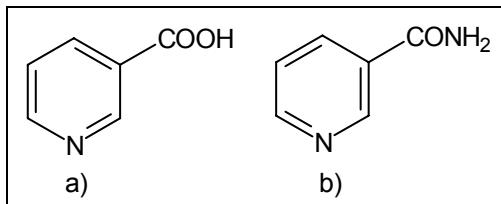
Prevođenje biotina u karboksibiotin je moguće uz utrošak energije u obliku ATP koji je neophodan u prvoj fazi reakcije sinteze karboksibiotina vezivanjem CO<sub>2</sub> za N (reakcija 6.2-3).



Vitamin H je izolovan u kristalnom stanju prvi put 1936. godine. Njegova biohemijska funkcija sastoji se u tome što je koenzim karboksilaza npr. *piruvatkarboksilaze* enzima koji učestvuje u karboksilovanju pirogrožđane kiseline do oksalacetata, zatim karboksilaza koje učestvuju u sintezi masnih kiselina, aminokiselina itd.

Vitamin H se sintetizuje u biljkama i nekim bakterijama iz pimelinske kiseline. Biosinteza vitamina H započinje za vreme klijanja semena i smanjuje se ukoliko zemljište nije snadbeveno N i S. U odrasloj biljci vitamin H se sintetizuje samo u listovima. U slobodnom obliku se nalazi i u polenu. Rasprostranjen je u manjim količinama u odnosu na predhodno navedene vitamine u biljkama. U biljkama se nalazi u količini do 0.01 mg%. Biotin ne izaziva avitaminozu ni kod ljudi ni biljaka. Egzogeno dodat biljkama ubrzava klijanje, povećava dužinu izdanka do 60% kao i količinu biomase.

**Vitamin PP** (niacin, niacinamid) - ili nikotinska kiselina odnosno njen amid nikotinamid su oblici vitamina čija je struktura data na slici 6.2-11.



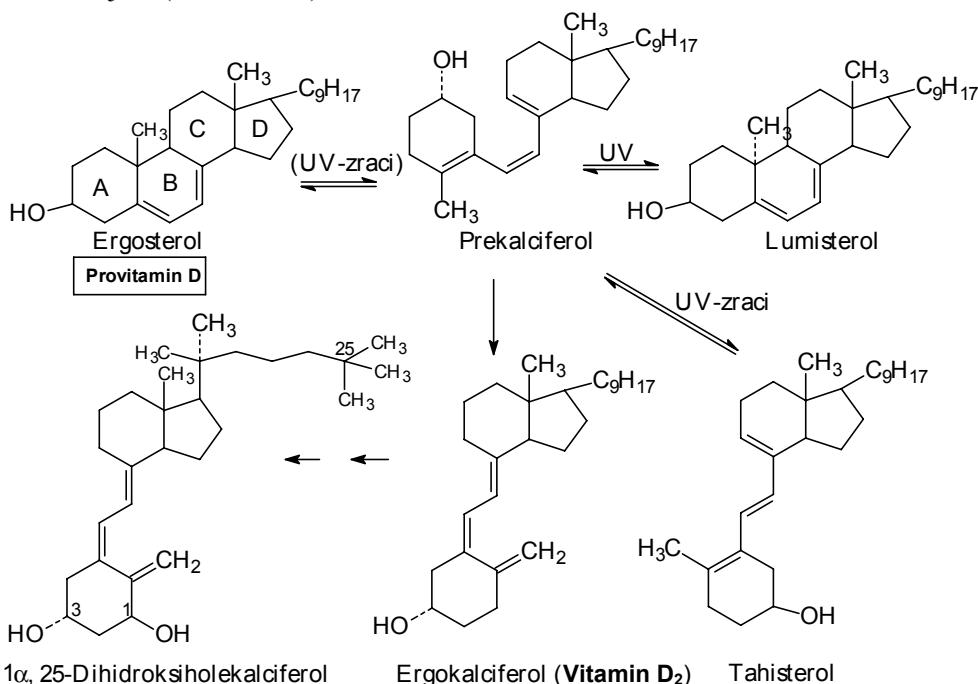
Slika 6.2-11.  
Struktura vitamina PP: (a) Nikotinska kiselina; (b) Amid nikotinske kiseline.

Nikotinska kiselina je sastojak koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ . Sintetizuje se iz triptofana i njena količina se povećava delovanjem svetlosti kod graška 4, a pšenice 5 puta. Vitamin PP se najintenzivnije sintetizuje u toku klijanja semena. Tako npr. seme pšenice sadrži 5-7  $\mu\text{mola/kg}$  nikotinske kiseline, a zavisno od genotipa količina nikotinske kiseline se može povećati i do 300  $\mu\text{mola/kg}$ . Povrće i voće sadrži 2-5, a kvasac od 200-1000  $\mu\text{mola/kg}$  vitamina PP. Ukoliko ljudi ili životinje nemaju dovoljno triptofana u ishrani dolazi do avitaminoze koja se manifestuje poremećajima u oksidoredukcionim procesima. Egzogeno dodat biljkama povećava prinose kao npr. kod suncokreta (*Helianthus annuus*), paradajza (*Solanum lucopersicum*) i maka (*Papaver somniferum*).

## 6.2.2. Vitamini koji nemaju funkciju koenzima

U grupu vitamina hidrofobnog karaktera (nerastvorni u vodi) koji imaju različite funkcije, ali ne i funkciju koenzima spadaju u mastima rastvorni vitamini A, D, E i K. U ovu grupu svrstavaju se i vitamini U i B<sub>15</sub>.

**Vitamin D** (fitosterol) - predstavlja grupu vitamina sastavljenu od vitamera D<sub>1</sub> do D<sub>7</sub> koji imaju svi veoma sličnu steroidnu strukturu zbog koje neki autori ovu grupu vitamina ubrajaju u hormone. Biljke sadrže malo vitamina D grupe. On se u biljkama sintetizuje iz provitamina *ergosterola* (koji se nalazi u listovima i plodovima biljaka). Navedena biosinteza se industrijski "imitira" i biljni ergosterol se UV zračenjem pretvara u *ergokalciferol* (vitamin D<sub>2</sub>), kao i neke druge intermedijere (slika 6.2-12).

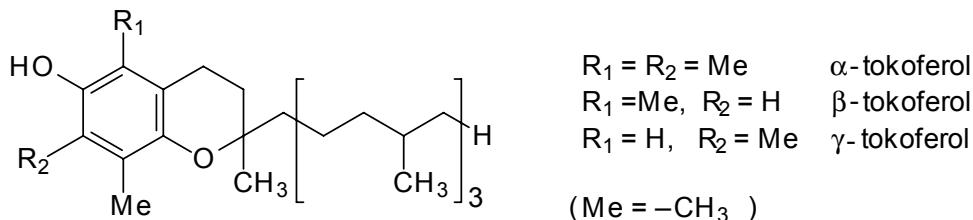


Slika 6.2-12. Putevi nastajanje vitamina D<sub>2</sub>.

I pored toga što avitaminoza vitamina D izaziva brojne poremećaje kod čoveka (rahitis i sl.) i životinja (smanjuje produktivnost ptica i rogate stoke), kod biljaka ne postoji znaci avitaminoze. Najbogatije ratarske kulture u vitaminu D su krmne biljke.

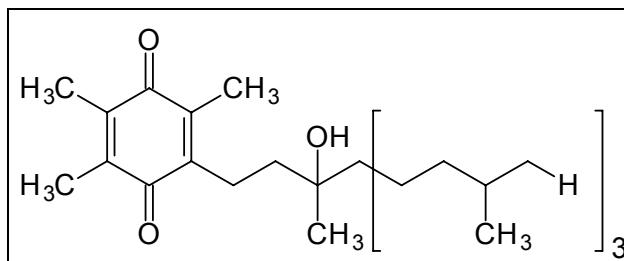
**Vitamin E** (tokoferol) - se sastoji iz 11 vitamera (benzopirana) rastvorljivih u vodi sa zasićenim izoprenskim jedinicama u bočnom lancu. Izomerni oblici se označavaju kao  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i sl., a njihove strukture su date na slici 6.2-13. U biljkama su najviše rasprostranjeni  $\alpha$ -tokoferoli (kao npr. u mrkvi).

Najznačajnije hemijsko svojstvo vitamina E je da je on **antioksidant** i da je veoma dobar redukcioni agens koji reaguje sa oksidujućim agensom pre nego što deluje na druge biomolekule. Osim navedenog vitamin E odstranjuje veoma opasna jedinjenja poznata pod nazivom **slobodni radikali**. Oni imaju najmanje jedan nesparen elektron zbog čega im se pripisuje visok stepen reaktivnosti. Značajni su u razvoju kancera i procesima starenja.



Slika 6.2-13. Struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferola.

Tokoferoli (posebno  $\alpha$ -tokoferol) imaju značajnu funkciju u mitohondrijama, jer ih štite od **lipidne peroksidacije**. Tokoferol se može oksidovati u hinon (*tokohinon*), te deluje kao prirodni antioksidant (sprečava oksidaciju nezasićenih jedinjenja, kao npr. masnih kiselina i sl.) što je od vitalnog značaja za očuvanje strukture ćelijskih membrana. Struktura tokohinona data je na slici 6.2-14.



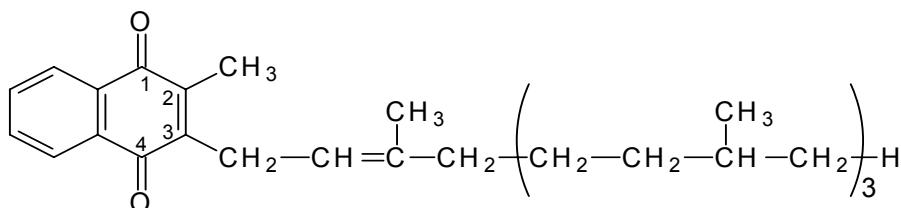
Slika 6.2-14. Struktura tokohinona.

Zbog antioksidantnih svojstava tokoferol i tokohinon su našli primenu u prehrabenoj industriji kao antioksidant. Najviše vitamina E ima u klici pšenice (200-550 mg%), te ona služi kao sirovina za njegovo industrijsko izolovanje.

U znatno manjim količinama vitamin E se nalazi u salati (*Lactuca sativa*), celeru (*Apium graveolens*), kupusu, kukuruzu, soji, ulju od suncokreta, ricinusu i palmi (*Felis dactylofera*). Eggzogeno dodat biljkama smanjuje klijavost i deluje kao inhibitor rastenja.

Pri nedostatku vitamina E poluzasićene masne kiseline se oksiduju delovanjem molekulskog kiseonika pri čemu nastaju peroksiđi masnih kiselina.

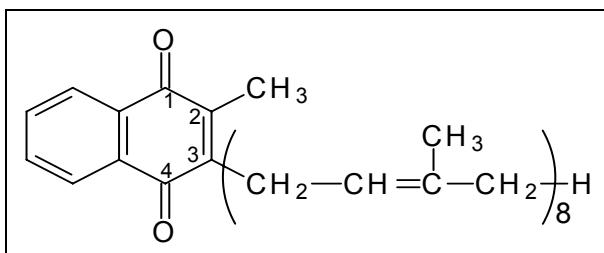
**Vitamini K** (filohinon) - je izgradjen iz nekoliko *vitamera* i to K<sub>1</sub>-K<sub>6</sub>. Medusobno se razlikuju u bočnom lancu. Ne sadrže benzohinonski već naftohinonski prsten. Najveću vitaminsku aktivnost ima *vitamin K<sub>1</sub>* koji je po hemijskom sastavu 2-metil-3-fitil-1,4-naftohinon (filohinon). Prvi put ovaj vitamin je izolovan iz lucerke 1939. godine. Struktura vitamina K<sub>1</sub> je data na slici 6.2-15.



Slika 6.2-15. Struktura vitamina K<sub>1</sub>.

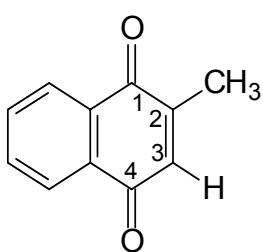
*Vitamin K<sub>1</sub> (filohinon)* - sadrži *fitil* grupu u bočnom nizu. Ime ovog vitamina potiče od nemačkog naziva "koagulatio" jer je K<sub>1</sub> značajan faktor koagulacije. U naftohinonskom prstenu ima dve polarne karbonilne grupe.

*Vitamin K<sub>2</sub> (menahinon)* - u položaju tri naftohinonskog prstena ima umesto fitil-radikala *farnezil*-radikal koji sadrži 8 izoprenskih jedinica u bočnom lancu.(slika 6.2-16).



Slika 6.2-16.  
Struktura vitamina K<sub>2</sub>.

*Vitamin K<sub>3</sub> (menadin)* - za razliku od predhodna dva nema u položaju 3 naftohi-nonskog prstena kondenzovane izoprenske jedinice(slika 6.2-17).



Slika 6.2-17. Struktura vitamina K<sub>3</sub>.

Biohemijska funkcija vitamina K i pored velike rasprostranjenosti (naročito u hloroplastima) nije dovoljno proučena. Vitamini K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> se nalaze u zelenim listovima i plodovima biljaka, posebno je bogata kopriva, kruške i jagoda, a nalazi se i u jabukama, itd. (tabela 6.2-6).

Izvori vitamina	Vitamin K (mg%)
Kopriva	3.0-20.0
Kupus	3.20
Španat	4.40
Lucerka	1.60-3.20
Krompir	0.16
Kruška i jagoda	mnogo
Kesten	6.60

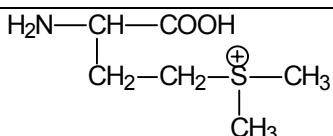
Tabela 6.2-6. Sadržaj vitamina K

**Vitamin U** (antiulkusni princip) - je po hemijskom sastavu S-metil-metionin.

Izolovan je u kristalnom stanju iz lista kupusa. Struktura je data na slici 6-2-18.

Dobar izvor ovog vitamina je list kupusa, nalazi se u količini 1-5 mg%.

Biohemijska funkcija vitamina U nije dovoljno proučena, ali se zna da u metabolizmu služi kao donor metilnih grupa. Avitaminoza vitamina U kod biljaka još nije dokazana, dok nedostatak kod čoveka i životinja izaziva pojavu *ulkusa* na sluzokožama.

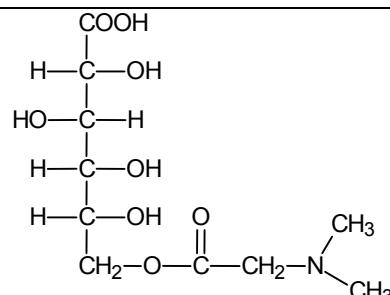


Slika 6.2-18. Struktura vitamina U.

**Vitamin B<sub>15</sub>** (pangamska kiselina) - je po hemijskom sastavu acetilni estar D-gulonske kiseline i dimetilglicina (slika 6.2-19).

Izolovan je u kristalnom stanju prvi put 1950. godine, iz jetre bika, a kasnije i iz semena raznih biljaka, te je zbog toga dobio i naziv (od grčke reči *pan* što znači svuda i *gami* koja znači seme).

Biohemijska funkcija vitamina B<sub>15</sub> nije još dorečena. Smatra se da štiti organizme od nedostatka kiseonika, da učestvuje u metabolizmu lipida, u prenosu metil-grupa i tako obezbeđuje



Slika 6.2-19. Struktura vitamina B<sub>15</sub>

biosintezu metionina i vitamina U.

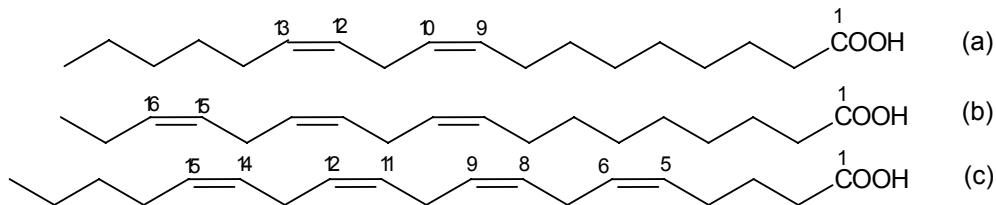
### 6.2.3. Supstance slične vitaminima

U ovu grupu svrstana su jedinjenja koja imaju funkciju sličnu vitaminima kao npr. vitamin F, vitamin P, inozit, orotna kiselina i sl.

**Vitamin F** (kompleks nezasićenih masnih kiselina) - nije jedinstvena supstanca već se sastoji iz tri esencijalne nezasićene masne kiseline i to: *linolne*, *linolenske* i *arahidonske* koje su odgovorne za vitamsku aktivnost. Njihova struktura je data na slici 6.2-20.

Prve dve kiseline su rasprostranjene u biljkama, a treća se u većoj količini može naći u životinjskim organizmima. Najveću biološku aktivnost imaju arahidonska i linolna kiselina, a linolenska ubrzava delovanje linolne kiseline.

Biohemija funkcija vitamina F nije još dovoljno proučena, sem što je poznato da učestvuje u regulaciji metabolizma lipida. U novije vreme je utvrđeno da je arahidonska kiselina prekursor u biosintezi *prostaglandina*. Iz arahidonske i drugih polienskih kiselina mogu se sintetizovati oko 20 različitih prostaglandina koji imaju uticaja na metabolizam i fiziološke funkcije čoveka i životinja, a po novijim istraživanjima i biljaka.



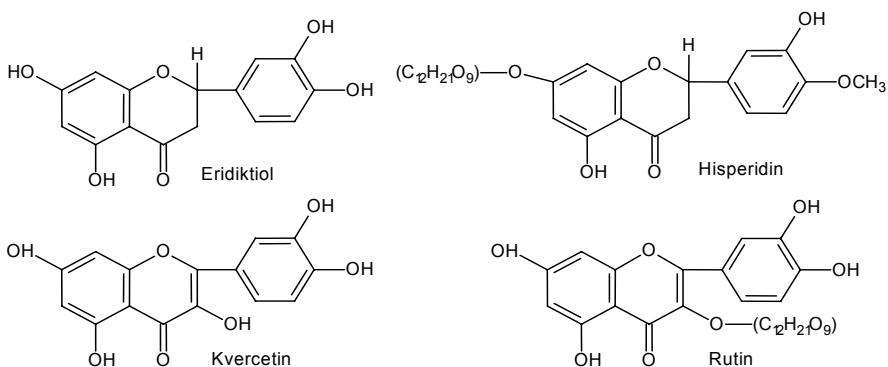
Slika 6.2-20. Struktura vitamina F.

- (a) Linolna kiselina 18:2 (9,12)
- (b) Linolenska kiselina 18:3 (9,12,15)
- (c) Arahidonska kiselina 20:4 (5,8,11,14)

Vitamina F ima najviše u žitaricama. U ostalim biljnim vrstama se nalaze pretežno linolna i linolenska, a redje arahidonska kiselina. Biljna ulja su bogatija u vitaminu F, a pre svih ulje lana i konoplje u odnosu na ulje suncokreta i kukuruza.

Vitamin F je otkriven kada je kod životinja izazvana avitaminoza, na taj način što nisu hranjene uljaricama te se pojava avitaminoze manifestovala suvoćom kože, ekcemom, ispadanjem dlake, raslojavanjem noktiju i sl. Zbog toga su ove masne kiseline nazvane esencijalnima (nezamenljivim).

**Vitamin P** (bioflavonoidi) - nije individualno hemijsko jedinjenje već predstavlja smešu jedinjenja sličnog hemijskog sastava (kao npr. *rutina*, *kvercetina*, *hisperidina*, *eridiktiola* itd) koji u osnovi svoje strukture sadrže flavin. Njihove strukture su date na slici 6.2-21.



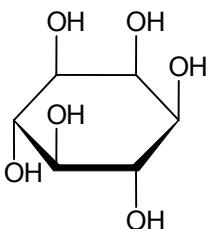
Slika 6.2-21. Strukture nekih biflavonoida.

Danas je poznato više od 10 vitamera P vitamina i svi se oni nazivaju zajedničkim imenom *bioflavonoidima*. Oni se razlikuju u stepenu hidroksilovanja benzenovog prstena koji ulazi u sastav flavinskog prstena, kao i u glikozidnim grupama vezanim u položaj C<sub>3</sub> piranskog prstena.

Biohemijska uloga vitamina P nije dovoljno razjašnjena. Smatra se da učestvuje u regulaciji oksidoreduktionskih procesa u ćelijama, zbog nezasaćenog karaktera flavina i katehina. Postoji sinergizam između vitamina P i C, jer vitamin P oksidiše vitamin C.

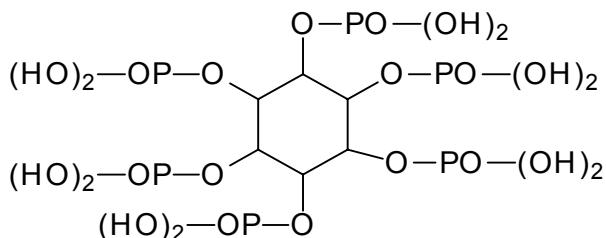
Količine vitamina P u biljkama su različite, a najviše ga ima u voću i povrću kao npr. kupusu 40, cvekli (*Beta vulgaris* var.*cruenta*) 50, mrkvi 70, višnji (*Prunus cerasus*) 280, crnoj ribizli (*Ribes nigrum*) 1.000 µmol/kg itd. Nalazi se u šljivi, grožđu i limunu. Vitamin P utiče na klijanje semena, rastenje, disanje, aktivnost nekih enzima i delovanje fitohormona. Egzogeno dodan biljkama povećava rastenje već pri koncentraciji 10<sup>-5</sup>-10<sup>-6</sup> mol/l.

Bioflavonoidi se primenjuju kao lekovi za oko 50 bolesti izazvanih krhkim kapilarima i njihovom abnormalnom propustljivosti. **Mioinozitol** (mezoinozitol) - je po hemijskom sastavu cikloheksanol i u biljkama je rasprostranjen kao sastojak fosfolipida (slika 6.2-22).



Slika 6.2-22. Struktura mioinozitola.

U biljkama je prekursor za biosintezu uronskih kiselina. Sintetizuje se pretežno u zelenim biljkama i nezrelim zrnima. U toku zrenja biljaka jedini se sa 6 molekula fosfatne kiseline dajući *inozitol-fosfatnu kiselinu* (sl. 6.2-23).

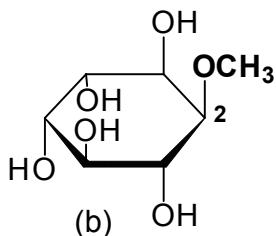
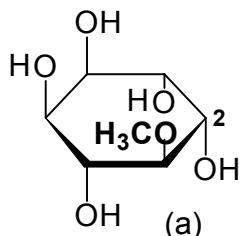


Slika 6.2-23.  
Struktura inozitol-fosfatne kiseline.

Inozitol-fosfatna kiselina ima funkciju rezervoara fosfora u

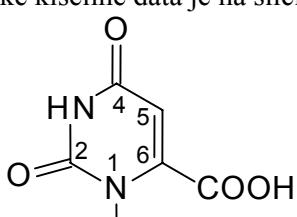
biljkama, a naročito u semenu žitarica. Ona se naziva još i *fitinskom kiselinom*, a njene Ca i Mg soli su poznate pod nazivom *fitin*. Mioinozitol je rasprostranjen u cerealijama, soji, orahu (*Juglans regia*) i raznom voću. Najviše ga ima u uljanim pogačama pamuka. Fitin se nalazi pretežno u semenu uljarica kao npr. konoplji, lanu i suncokretu.

Iz biljaka su još izolovani metilovani derivati inozitola i to *pinitol* i *kvebrahitol* čije su strukture date na slici 6.2-24.



Slika 6.2-24.  
Strukture pinitola (a) i kvebrahitola (b).

**Orotska kiselina** - je derivat uracila. Ona je intermedijer u biosintezi pirimidina, a ubraja se i u grupu jedinjenja sličnih vitaminima. Struktura orotske kiseline data je na slici 6.2-25.



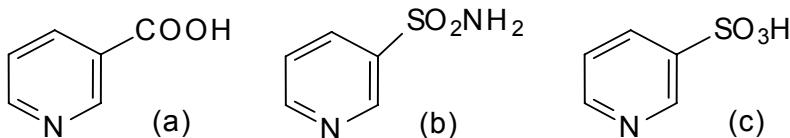
Slika 6.2-25. Struktura orotske kiseline.

Biohemijska funkcija orotske kiseline sastoji se u tome što učestvuje kao intermedijer u biosintezi pirimidina. Tako sa 5-fosforibozil-1-pirofosfatom gradi uridilnu kiselinu koja se potom izomerizuje u citidilnu kiselinu.

## 6.2.4. Antivitamini

U nekim biljkama pronadjen je čitav niz jedinjenja koja inaktivisu vitamine, konkurišu vitaminima u odgovarajućim biohemijskim procesima ili isključuju vitamine iz metabolizma promenom njihove strukture. Takva jedinjenja nazivamo *antivitaminima*. Primer antivitamina PP je *streptocid* - njegov sulfoderivat i *piridin-*

*3-sulfonska kiselina*. Ukoliko se reakcionalnoj smeši dodaju neki od ova dva antivitamina, reagovaće umesto vitamina PP (koji je faktor rastenja bakterija) sa enzimom i na taj način usporavati razvoj bakterija. Strukture vitamina PP i njegovih antivitaminina su date na slici 6.2-26.



Slika 6.2-26. Strukture vitamina PP (a); streptocida (b) i piridin-3-sulfonske kiseline (c).

Piridin-3-sulfonska kiselina se nalazi u semenu kukuruza. Zbog toga u ishrani stoke kukuruzom treba dodavati vitamin PP i triptofan za koji je dokazano da je prekursor u biosintezi vitamina PP. Danas je poznat veći broj antivitaminina. Tako npr. antivitamin koji isključuje vitamin iz katalize promenom njegove strukture je glikoprotein *avidin*. On reaguje sa vitaminom H, gradi nerastvoran biološki neaktivni kompleks koji onemogućava učešće vitamina H u metabolizmu.

Pored navedenih poznati su i mnogi drugi antivitamini kao npr. antivitamini pantotenske kiseline (pantoil-taurin, pantoil-propanolamin i pantoil-etanolamin), piridoksina (deoksi- i metoksi-piridoksin), folne kiseline (metilfolna, 4-aminopteroil-glutaminska kiselina i sl.).

Antivitamini se primenjuju i u terapiji infektivnih bolesti izazvanih bakterijama i virusima.

### 6.3. Fitohormoni

Koordinaciju izmedju ćelija, tkiva i organa u biljkama obezbedjuju hemijski molekuli koji se u provodnom sistemu transportuju od ćelije do ćelije tj. od organa do organa. Dominantnu ulogu pri tome imaju biljni hormoni ili *fitohormoni*. Oni deluju u malim koncentracijama a mesto njihove sinteze i mesto delovanja su im različiti. Oni su međutim, delimično delotvorni i u mestu postanka, zbog čega ih strogo uzeto ne bi trebalo izjednačiti sa životinjskim hormonima. Za razliku od mnogih životinjskih hormona oni su manje specifični za pojedine organe i imaju širok spektar dejstva, tako da jedan te isti fitohormon može da utiče na odvijanje većeg broja različitih procesa. Fitohormoni mogu da se translociraju na više načina: putem ksilema (citokinini), floemom (giberelini), kroz simplast (npr. auksini) i u intercelularnom vazdušnom prostoru (etilen).

Na osnovu dosadašnjih saznanja uloga fitohormona u razviću biljaka zasniva se pre svega na tzv., *permisivnom dejstvu*, tj. na uključivanju gena, zbog

čega u njihovom odsustvu reakcije ne započinju. Brojne pojave u razviću biljkaka se kontrolisu na tom nivou (kljanje semena, cvetanje, formiranje korena i izdanaka i dr.). Fitohormoni imaju i modifikatorsko dejstvo pošto kontrolisu brzinu procesa (izduživanje, starenje i dr.). Pored navedenog, fitohormoni na osnovu svog specifičnog medjusobnog balansa upravljaju i procesima razvića, određujući pravce diferencijacije ćelije ili grupe ćelija. Fitohormoni, (bioregulatori) su biološki aktivna jedinjenja koja regulišu rastenje i razviće, utiču na pravac i intenzitet metaboličkih procesa biljaka itd. Fitohormoni se mogu svrstati u pet osnovnih klasa:

- ◆ *auksine,*
- ◆ *abscisine i*
- ◆ *gibereline,*
- ◆ *etilen.*
- ◆ *citokinine,*

U biljkama postoje i druga jedinjenja koja ispoljavaju regulatornu ulogu, ali se mehanizam njihovog dejstva i neka druga svojstva razlikuju od fitohormona. Na primer medju vitaminima tiamin (vitamin B<sub>1</sub>) ispoljava fitohormonima slično dejstvo. Međutim, dok vitamini svoje dejstvo ispoljavaju kao aktivna grupa enzima, fitohormoni ne ulaze u sastav enzima, njihova regulatorna uloga se zasniva na drugim osnovama.

U delovanju fitohormona važnu ulogu ima i u biljnem svetu široko rasprostranjen *kalmodulin* (Ca-kalmodulin, CaM) protein male molekulske mase koji sa velikim afinitetom i selektivnošću reverzibilno vezuje kalcijum. Kalmodulin učestvuje u posredovanju dejstva fitohormona pri regulaciji procesa rastenja i razvića. Smatra se da kalmodulin ima opštu ulogu posrednika između primarnih nadražaja (nedostatak vode, svetlosti, gravitacije) i odgovora ćelije. Stoga se kalmodulin smatra sekundarnim glasnikom, dok fitohormoni predstavljaju primarne glasnike. Postoje indirektni dokazi da antagonisti kalmodulina inhibiraju od citokinina zavisnu deobu ćelije, auksinom indukovano rastenje ćelije i giberelinom indukovani sintezu amilaze. Kalmodulin ima ulogu i u indukciji zatvaranja stoma delovanjem apscisinske kiseline itd.

**Auksini** - Do sada je iz biljaka izolovan veći broj jedinjenja koja sadrže *indol* i ispoljavaju dejstvo koje se pripisuje auksinima. Ona se nazivaju prirodnim auksinima kao što su: indolsiréetna kiselina, (ISK, IAA) indolpirogroždjana kiselina, indolpropionska kiselina, indolacetonitril i dr. U novije vreme iz viših biljaka izolovana su i jedinjenja koja ne sadrže indol, a pored toga ispoljavaju dejstvo svojstveno auksinima, kao na primer fenilsiréetna kiselina. Pored prirodnih auksina i neka druga jedinjenja mogu da ispoljavaju dejstvo specifično auksinima. Ona se nazivaju sintetičkim auksinima i našla su široku primenu u poljoprivredi. Među njima najpoznatiji su: indol-3-buterna kiselina, naftil-1-siréetna kiselina, fenilbuterna kiselina, 2,4-dihlorfenoksi siréetna kiselina (2,4-D) i dr.

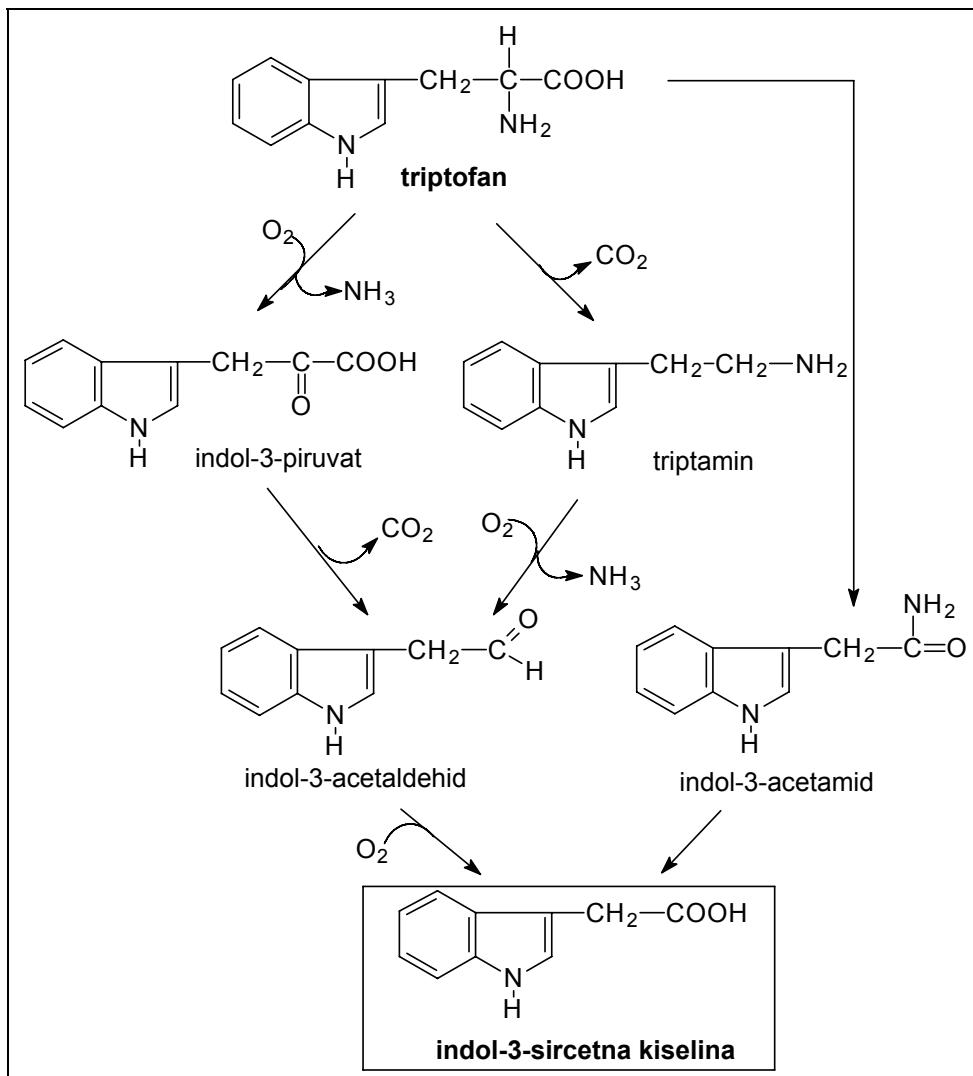
Auksini utiču na brojne životne procese biljaka kao npr:

- ◆ izduživanje,
- ◆ opadanje listova i plodova,
- ◆ deobu ćelije,
- ◆ polarnost organa,
- ◆ aktivnost enzima,
- ◆ sintezu nukleinskih kiselina i proteina itd.

Najpoznatije i najviše proučeno je stimulativno dejstvo auksina na izduživanje biljaka. Koleoptil graška se u prisustvu auksina veoma brzo izdužuje. Povećanje dužine koleoptila zavisi i od koncentracije auksina. Izduživanje ćelije je povezano sa povećanjem njihove razmere. Da bi moglo doći do povećanja ćelije neophodno je da je ćelijski zid plastičan, istegljiv, da se povećava turgorov pritisak i da dolazi do sinteze strukturalnih elemenata ćelijskog zida i citoplazme. Utvrđeno je da indolsirćetna kiselina bez prisustva osmotski aktivnih materija veoma kratko stimuliše povećanje ćelije. Prema tome u indukciji povećanja ćelija auksinima značajnu ulogu ima i osmoregulacija.

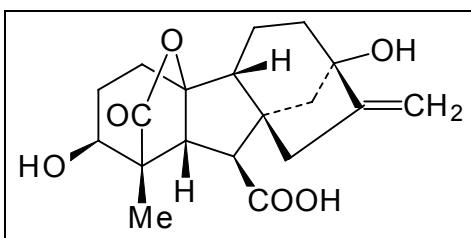
Jedan od najznačajnijih prirodnih auksina je indolsirćetna kiselina (indol-3-sirćetna kiselina,  $\beta$ -indolsirćetna kiselina). Prekursor u biosintezi ovog molekula je aminokiselina triptofan. U toku biosinteze indolsirćetne kiseline, triptofan delovanjem aromatične transaminaze prelazi u indolpirogroždjanu kiselinu. Indolpirogroždjana kiselina enzymskom dekarboksilacijom prelazi u indolacetaldehid, koji se potom oksidiše pri čemu nastaje indolsirćetna kiselina (slika 6.3-1).

Auksini imaju veoma značajnu ulogu u procesima inicijacije i formiranja adventivnih korena, zbog čega se oni veoma često koriste pri vegetativnom razmnožavanju voćaka, vinove loze, ukrasnog šiblja, drveća i cveća, zelenim ili zrelim reznicama itd. Auksini se koriste i za proredjivanje plodova. Prevremeno opadanje nedovoljno zrelih plodova može značajno da utiče na rentabilnost proizvodnje. Ova štetna pojava u značajnoj meri se može ublažiti primenom auksina. Auksini se takođe sa uspehom mogu koristiti i u cilju produžavanja mirovanja vegetativnih organa, posebno krtola krompira.



Slika 6.3-1. Shema biosinteze indol-3-sirćetne kiseline iz triptofana.

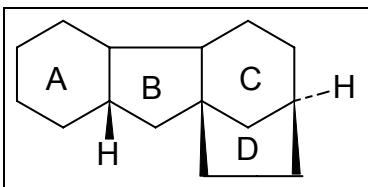
**Giberelini** - su otkriveni 1926. godine od strane japanskog istraživača Kurosave prilikom proučavanja oboljenja pirinča koje se manifestovalo u preteranom izduživanju stabljika i listova. Iz viših biljaka je do danas izolovano i hemijski identifikovano 56 slobodnih i 18 vezanih giberelina. Za očekivati je da će se njihov broj povećati. Giberelini se obeležavaju sa GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> itd. Giberelinska kiselina je prvi identifikovani giberelin koja se označava sa GA<sub>3</sub> i ima sledeću hemijsku formulu (slika 6.3-2).



Slika 6.3-2.  
Giberelinska kiselina ( $GA_3$ ).

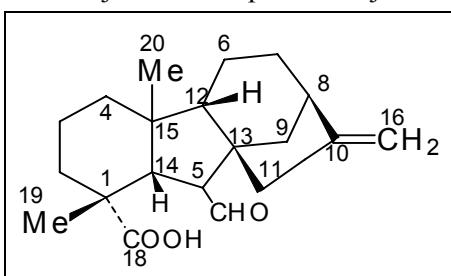
Do danas poznati giberelini mogu se podeliti u dve grupe, na gibereline, koji sadrže 19 i na gibereline koji sadrže 20 C atoma. Za jedne i za druge je karakteristična gibanska struktura koju

čine dva šestočlana i dva petočlana prstena (slika 6.3-3).



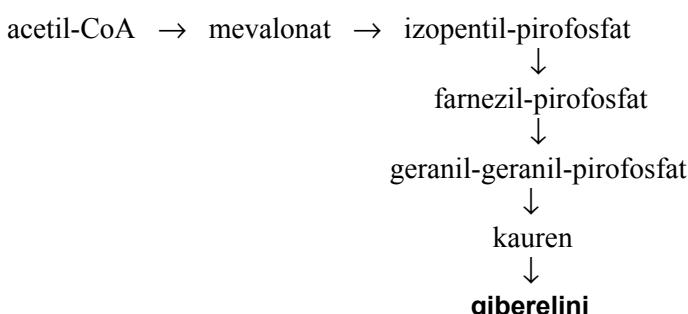
Slika 6.3-3.  
Gibanska struktura

Giberelini koji sadrže 19 ugljenikovih atoma u A-prstenu sadrži jedan laktonski prsten ( $GA_3$ ), a u giberelinima koji sadrže 20 C-atoma u A-prstenu nedostaje laktonski prsten i najčešće na prvom ugljenikovom atomu vezana je jedna karboksilna grupa ( $GA_{12}$ ) (slika 6.3-4).



Slika 6.3-4.  
Struktura  $GA_{12}$ -aldehida.

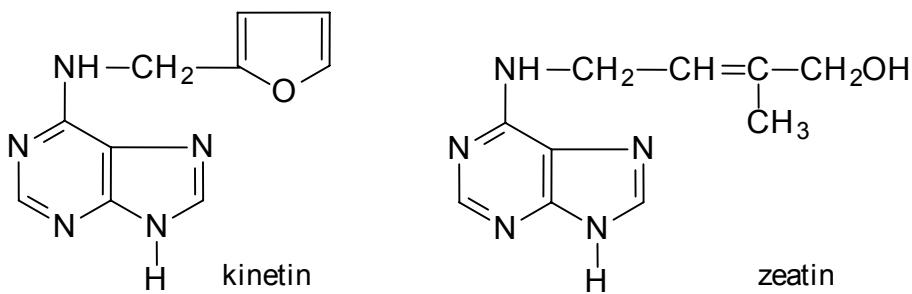
Prepostavlja se da u toku metabolizma giberelini sa 20 C-atoma mogu da prelaze u gibereline sa 19 ugljenikovih atoma i obrnuto. Fiziološki su najaktivniji giberelini koji u A-prstenu imaju laktonski prsten. U metabolizmu biljaka nastaju složenim putem. Oni su ciklični diterpeni čija sinteza počinje sa acetil-CoA od kojeg preko mevalonata zatim izopentil-pirofosfata nastaje farnezil-pirofosfat. Ovaj intermedijer predstavlja polaznu supstancu za sintezu većeg broja jedinjenja, a medju njima i biljni hormoni giberelini i abscisinska kiselina. Giberelini nastaju iz geranil-geranil-pirofosfata preko kaurenata:



Giberelini se najintenzivnije sintetizuju u mladim listovima i u nedozrelim semenima (detaljnije o biosintezi giberelina vidi poglavlje sekundarni biomolekuli).

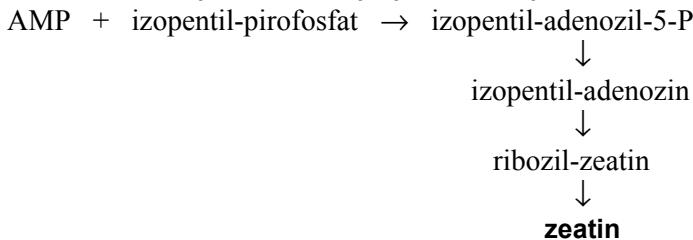
Dejstvo giberelina na životne procese biljaka je kompleksno. Oni utiču pre svega na dužinsko rastenje, a zatim i na obrazovanje cvetova, mirovanje semena i pupoljaka.

**Citokinini** - podstiču deobu ćelije tj. citokinezu zbog čega su nazvani citokininima. Do danas je poznato oko 10 prirodnih citokinina izolovanih iz viših biljaka. Svi su oni N<sup>6</sup>-supstituisani derivati adenina (slika 6.3-5). Prisustvo i biohemijsko-fiziološko delovanje citokinina ne ograničava se samo na više biljke.



Slika 6.3-5. Strukture nekih citokinina izolovanih iz viših biljaka.

Biosinteza citokinina nije sasvim razjašnjenja. Smatra se da su polazne supstance adenozin-monofosfat (AMP) i izopentil-pirofosfat (IPP), čijom kondenzacijom nastaje izopentil-adenozin-monofosfat koji defosforilacijom daje izopentil-adenozin, a ovaj izomerizacijom prelazi u izopentil-adenin odnosno ribozil-zeatin koji nakon odvajanja riboze daje zeatin:



Glavno mesto sinteze citokinina su mladi korenovi. Iz korena se oni pomoću transpiracionog toka prenose u druge organe. Tako npr. 10 ml soka ksilema vinove loze u proseku sadrži 0.5-1.0 µg citokinina. Sadržaj citokinina u biljci u mnogome zavisi od aktivnosti enzima *citokinin-oksidaze*.

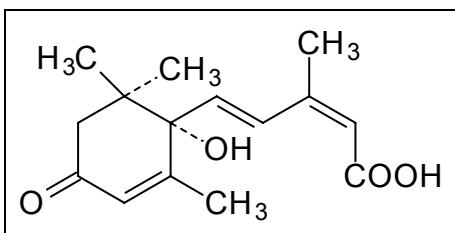
Citokinini se odlikuju veoma raznovrsnom biohemijsko-fiziološkom funkcijom. Oni utiču na:

- ◆ deobu i izduživanje ćelije,
- ◆ sintezu proteina i RNA,
- ◆ proces starenja,
- ◆ transport materija,
- ◆ mirovanje semena itd.

Citokinini utiču na procese starenja na više načina, a pre svih - stupaju u reakciju sa slobodnim radikalima i na taj način onemogućavaju njihovo nakupljanje, inhibiraju aktivnost lipoksigenaze čime usporavaju nastajanje slobodnih radikala, aktiviraju enzime antioksidativne zaštite itd.

Potrebno je na kraju istaći da su citokinini zajedno sa nekim drugim biljnim hormonima redovan sastojak hranljivih podloga koje se koriste u kulturi tkiva i da na taj način imaju danas izvanredan značaj u vegetativnom razmnožavanju brojnih biljaka.

**Abscisinska kiselina (ABA)** - je veoma rasprostranjena u biljnom svetu. Ona je izolovana iz pupoljaka, listova, krtola, korena, semena i plodova. Njeno dejstvo je pretežno inhibitorno. Apscisinska kiselina je antagonist endogenim hormonima. Strukture ABA otkrivena je 1965.godine (slika 6.3-6). Abscisinska kiselina je seskviterpe-noid. Shodno tome njena biosinteza slično drugim terpenoidima polazi od meva-lonske kiseline "aktivnog izoprena", nastavlja se preko farnezil-pirofosfata, a od njega nastaju seskviterpeni. Abscisinska kiselina *in vitro* može da nastane i fotooksidacijom karotenoida, na primer violoksantina ( $C_{40} \rightarrow C_{15}$ ).



Slika 6.3-6.  
Abscisinska kiselina

Iz biljnih tkiva je do sada izolovan veći broj supstanci sa pretežno inhibitornim dejstvom kao što su fenoli, kumarini i dr. Inhibitori imaju veoma važnu ulogu, pošto se regulacija životnih procesa biljaka zasniva na uzajamnom dejstvu stimulatora i inhibitora. Samo njihov harmoničan odnos može da obezbedi normalnu regulaciju životnih procesa. Prema sadašnjim saznanjima najznačajniji prirodnji inhibitor izolovan iz tkiva biljaka je apscisinska kiselina. Ona utiče na brojne biohemijsko-fiziološke procese:

- ◆ otpornost biljaka prema nepovoljnim uslovima sredine,
- ◆ ubrzava opadanje (abscisiju) listova i plodova,
- ◆ inhibira kljanje semena i time produžava njihovo mirovanje,
- ◆ inhibira cvetanje biljaka dugog dana u uslovima kratkog dana.

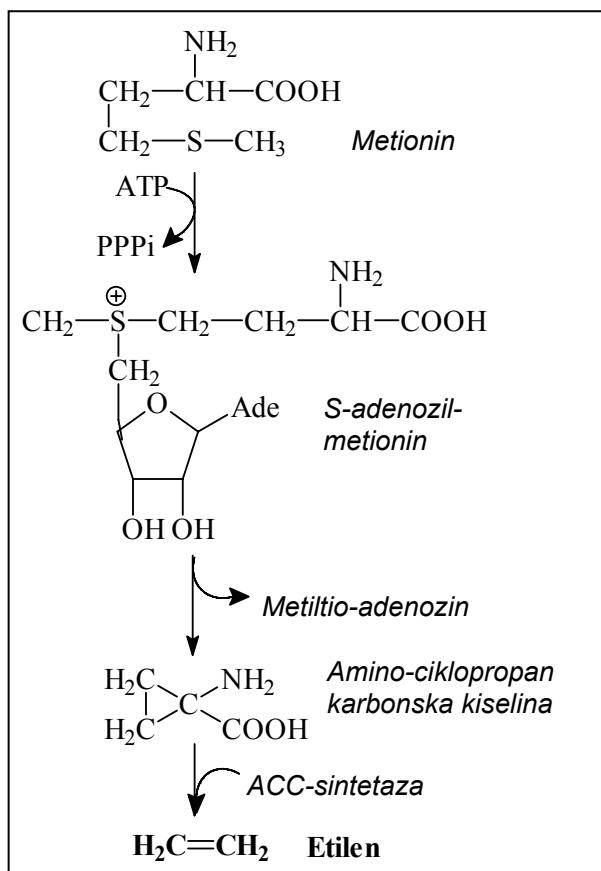
Utvrđeno je da se u uslovima suše u listovima biljaka sinteza abscisinske kiseline povećava, zbog čega se ona naziva hormonom stresa. Uočeno je da se u toku jeseni sa smanjenjem temperature (pojava mrazeva) u ozimoj pšenici nivo abscisinske kiseline, zavisno od genotipa, povećava za dva do tri puta. S tim u vezi pojedini autori navode da postoji pozitivna korelacija izmedju nivoa abscisinske kiseline i otpornosti pojedinih genotipova prema niskim temperaturama.

Starenjem u listovima se smanjuje ideo giberelina i auksina, a povećava nivo abscisinske kiseline. U nekim slučajevima u starim listovima koji su već počeli da žute sadržaj abscisinske kiseline bio je čak za 10-15 puta veći nego u zelenim listovima.

Abscisinska kiselina ima značajnu ulogu i u mirovanju pupoljaka i semena. U toku jeseni, kada dani postaju kraći, pupoljci listopadnog drveća prelaze u stanje mirovanja. Pod uticajem kratkog dana u pupoljcima se nakupljaju inhibitori medju kojima i abscisinska kiselina. Ona prekida aktivnost pupoljaka sve do proleća. U toku zime količina inhibitora se postepeno smanjuje, a nivo supstanci koje aktiviraju životne procese, medju kojima su i giberelini, se povećava. Abscisinska kiselina do sada nije našla šиру primenu u poljoprivrednoj praksi. Postoje pokušaji da se primeni kao antitranspiran.

**Etilen** - Neljubov je još 1901.godine saopštio da etilen izaziva poremećaje u rastenu i razviću etioliranih biljaka. Kasnije je utvrđeno da je etilen prirodni proizvod metabolizma biljaka, kao i da ga biljke odaju u spoljašnju sredinu. Stvaranje etilena u biljnim tkivima otkriveno je zahvaljujući činjenici da u prisustvu zaraženih plodova zdravi plodovi brže sazrevaju. Naime, etilen, koji se stvara u zaraženim plodovima podstiče sazrevanje plodova. Dokazano je da zaraza i hemijske, ili mehaničke ozlede podstiču obrazovanje etilena. Etilen koji se stvara pod uticajem pomenutih činilaca naziva se "stres etilen".

Iako je biohemisko-fiziološko dejstvo etilena odavno otkriveno njegova uloga u brojnim metaboličkim procesima još uvek je ne razjašnjena. Smatra se da etilen u sadejstvu sa drugim biološki aktivnim materijama ima regulatornu ulogu. Egzogeni etilen utiče na rastenje, diferencijaciju, na brojne procese prometa materije, na reakciju biljaka na uslove spoljašnje sredine i dr. tj. ispoljava sve osobine jednog prirodnog bioregulatora. Etilen je gas sa malom molekulskom masom. Njega sintetiše većina biljnih tkiva. Sinteza etilena se odvija u ciklusu metionina. Fosforilovanjem metionin pre-lazi u adenozil-metionin. Posle odvajanja metil-tioadenozina nastaje jedna ciklična amino-kiselina amino-ciklopropan-karbonska kiselina (ACC). Njenom razgradnjom nastaju etilen i mravlja kiselina. Ključnu ulogu u biosintezi etilena tj. njegovog prethodnika l-amino-ciklopropan-l-karbonske kiseline ima enzim ACC-sintetaza (slika 6.3-7).



**Slika 6.3-7.**  
Shema biosinteze etilena u višim biljkama.

Danas se smatra da metionin nije jedini prekursor u biosintezi etilena u biljkama. Sve je više podataka koji ukazuju da u toku sazrevanja plodova paralelno sa oštećenjem ćelijskih mem-brana povećava se peroksi-dativno razlaganje masnih kiselina i da u takvim uslovima etilen ne nastaje iz metionina, već iz nezasićenih masnih kiselina.

Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da etilen utiče na brojne biohemijsko-fiziološke procese u biljkama:

- ◆ inhibira izduživanje izdanaka i korena,
- ◆ podstiče sintezu ABA i time opadanje listova i plodova,

- ◆ ubrzava sazrevanje plodova,
- ◆ indukuje obrazovanje cvetova,
- ◆ utiče na sintezu anticipiana i karotenoida,
- ◆ indukuje klijanje semena nekih biljaka itd.

Na sadržaj etilena u biljkama utiču brojni faktori. U uslovima suše sinteza etilena se mnogostruko povećava. Opadanje listova i plodova pri nedostatku vode objašnjava se povećanjem nivoa etilena. Ova pojava predstavlja odbrambeni mehanizam biljaka čiji je cilj smanjenje transpiracione površine u uslovima nedostatka vode. Nivo etilena se povećava i u zaraženim tkivima biljaka. Pretpostavlja se da etilen u njima podstiče procese starenja, aktivnost peroksidaza i fenol-oksidaza i nakupljanje aromatičnih jedinjenja. Etilen se već odavno koristi u cilju ubrzanja sazrevanja plodova u zatvorenim prostorima, posebno kod citrusa i jabuka. Naprimjer pomorandže se dozrevaju na temperaturi od 25 do 28°C od 50 do 60 sati u atmosferi koja sadrži 50% O<sub>2</sub>, od 0 do 1% CO<sub>2</sub> i do 2 % etilena.

## Izvod

♣ **Koenzimi** - su niskomolekularna organska jedinjenja koja "pomažu" enzimima da obave svoju katalitičku funkciju. Većina koenzima su nukleotidi, izgradjeni od heterociklične baze, šećera i fosforne kiseline, a mogu u svom sastavu imati i vitamine.

♣ Koenzimi se klasifikuju prema enzimima kojima "pomažu" u katalizi u tri grupe i to: koenzime oksidoreduktaza, koenzime transferaza i koenzime liaza, ligaza i izomeraza.

♣ Koenzimi oksidoreduktaza su NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD, ubihinoni i plastohinoni, citohromi i liponska kiselina.

♣ Koenzimi transferaza prenose funkcionalne grupe od donora do akceptora, a to su: nukleobaze (ATP, GTP, UTP i CTP), SAM, H<sub>4</sub>-folat, biotin i CoA.

♣ Hidrolaze su jedina grupa enzima koji svoju funkciju ostvaruju u vodenoj sredini bez koenzima.

♣ Koenzimi liaza, ligaza i izomeraza su pre svih TPP, PALP i PAPS, a često i neke nukleobaze kao npr. ATP, UDP i CDP. Funkcije koenzima ovih enzima često mogu obavljati i neka druga jedinjenja.

♣ **Vitamini** - su niskomolekularna organska jedinjenja različitih struktura i fizičko-hemijskih osobina. Imaju katalitičku i regulatornu funkciju u metabolizmu koju obavljaju neposredno ili u sastavu koenzima.

♣ Po funkciji koju imaju u metabolizmu klasifikuju se u tri grupe i to:

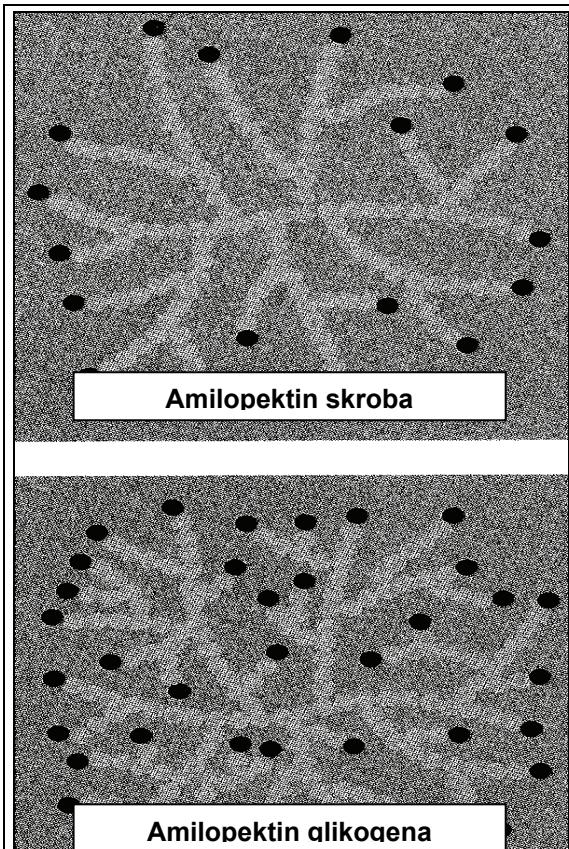
- vitamine koji imaju funkciju koenzima (vitamini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> i B<sub>9</sub>, vitamin C, PP, H i liponska kiselina),
- vitamine koji nemaju funkciju koenzima (A, D, E, K, U, i B<sub>15</sub>) i
- supstance slične vitaminima (F, P i inozit)

♣ Nedostatak vitamina kod heterotrofnih organizama izaziva čitav niz fiziološko-biohemskihs poremećaja poznatih pod nazivom avitaminoza. Kod biljaka nisu primećene avitaminoze, ali je dokazano da egzogeno dodavanje vitamina utiče pozitivno na različite faktore prinosa i kvaliteta.

♣ **Fitohormoni** - su biološki aktivna jedinjenja koja regulišu rastenje i razviće i utiču na pravac i intenzitet metaboličkih procesa biljaka.

♣ Po osnovu svoje hormonske aktivnosti klasifikuju se u pet osnovnih grupa: *auksine, gibereline, citokinine, apscisine i etilen*.

# 7. Ugljeni hidrati



- 7.1. Monosaharidi i njihovi derivati**
- 7.2. Disaharidi i oligosaharidi**
- 7.3. Polisaharidi**
  - 7.3.1. Homopolisaharidi
  - 7.3.2. Heteropolisaharidi
- 7.4. Funkcija ugljenih hidrata u biljkama i primena**

Ugljeni hidrati su polihidroksikarbonilna jedinjenja (aldehidi ili ketoni) ili složenija jedinjenja koja hidrolizom daju polihidrosilna jedinjenja. Izgrađeni su od ugljenika, kiseonika i vodonika (C, O, H) kao osnovnih elemenata, u odnosu izraženom kroz opštu formulu  $C_n(H_2O)_n$ . Kod većine je odnos između vodonika i kiseonika 2:1 (glukoza,  $C_6H_{12}O_6$ ), ali ima i odstupanja (ramnoza,  $C_6H_{12}O_5$ ). Oni su najrasprostranjeniji primarni biomolekuli biljaka, budući da se svake godine *fotosintezom* sintetizuju 100 miliona tona ugljenih hidrata. Nalaze se u svim organima i tkivima u različitim količinama zavisno od biljne vrste. Nakupljaju se u listovima, stabljikama, krtolama, semenu, plodovima i drugim delovima biljaka. Neophodni su za normalan tok metabolizma pre svega kao supstrati u reakcijama u kojima se stvara energija i kao strukturni elementi ćelijske membrane. Imaju raznovrsna i često veoma različita fizičko-hemijska svojstva. Mogu biti kristalni i amorfni, rastvorljivi i nerastvorljivi u vodi, podložni oksidaciji i stabilni, sposobni da hidrolizuju ili ne itd. U zavisnosti od sastava, složenosti strukture i osobina ugljeni hidrati se klasificuju u tri strukturne grupe:

- ◆ **monosaharidi i njihovi derivati** - karbohidratne jedinice koje ne podležu hidrolizi,
- ◆ **disaharidi i oligosaharidi** – hidrolizom daju nekoliko (2-10) monosaharidnih jedinica (*oligo* na Grčkom znači nekoliko) i
- ◆ **polisaharidi** - hidrolizom daju više/mnogo monosaharidnih jedinica: (*poly* na Grčkom znači više/mnogo) **homopolisaharidi** - hidrolizom daju više strukturno identičnih prostih ugljenih hidrata (monosaharida) i **heteropolisaharidi** - koji hidrolizom daju više strukturno različitih monosaharida.

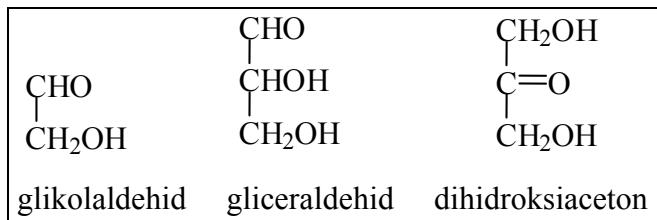
Termin prosti ugljeni hidrati ili prosti šećeri koristi se kao zajednički naziv za mono i disaharide. Termin složeni šećeri odnosi se na na polisaha-ride i glikokonjugate. Često se za sve polimere ugljenih hidrata koristi termin *glikani*.

## 7.1. Monosaharidi i njihovi derivati

**Monosaharidi** (prosti šećeri) - su primarni oksidacioni proizvodi polihidrosilnih alkohola, kojima se jedna hidrosilna grupa (-OH) dehidriraju u **karbonilnu aldo-** (-HC=O) ili **keto-grupu** (> C=O). Prema tome po hemijskom sastavu mogu biti bifunkcionalna jedinjenja: **polihidroksi-aldehidi (aldoze)** i **polihidroksiketoni (ketoze)**. Svi monosaharidi su lako rastvorljivi u vodi, što je uslovljeno prisustvom -OH grupama i imaju sladak ukus. U prirodi se redje nalaze slobodni, a češće su sastojci oligo- i polisaharida. Svi monosaharidi imaju nerazgranat udljovodonikov lanac.

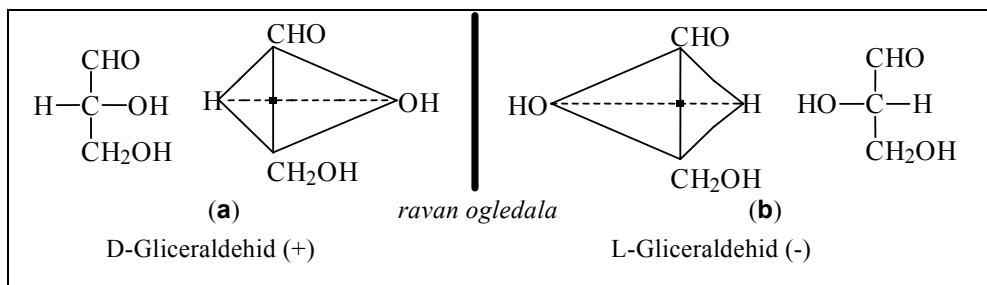
Sa biohemiskog aspekta monosaharidi su značajni kao supstrati za reakcije u metabolizmu koje oslobadjavaju energiju, kao strukturni elementi nukleotida i nukleinskih kiselina i kao jedinjenja vezana za proteine (glikoproteini) i lipide (glikolipidi).

Najprostiju strukturu imaju monosaharidi *glikolaldehid* sa dva ugljenikova atoma (aldobioza), *gliceraldehid* sa tri C-atoma (aldotrioza) i *dihidroksiaceton* takođe sa tri C-atoma (ketotrioza):



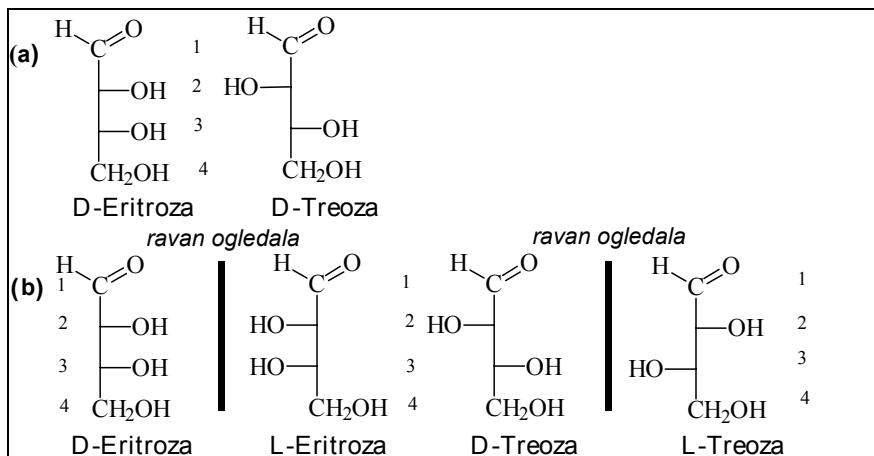
Kao i neki drugi biomolekuli i prosti šećeri sadrže najmanje jedan **asimetričan** (hira-lan) C-atom. Prema prostornom položaju supstituenata vezanih za

asimetričan ugljenikov atom u prirodi su prisutni različiti optički aktivni *stereoizomeri* (*enantiomeri*) pojedinih monosaharidnih jedinica. Enantiomeri gliceraldehida D- i L- predstavljaju osnovni model za stereohemijsko određivanje *optičkih izomera* svih drugih monosaharida (slika 7-1).



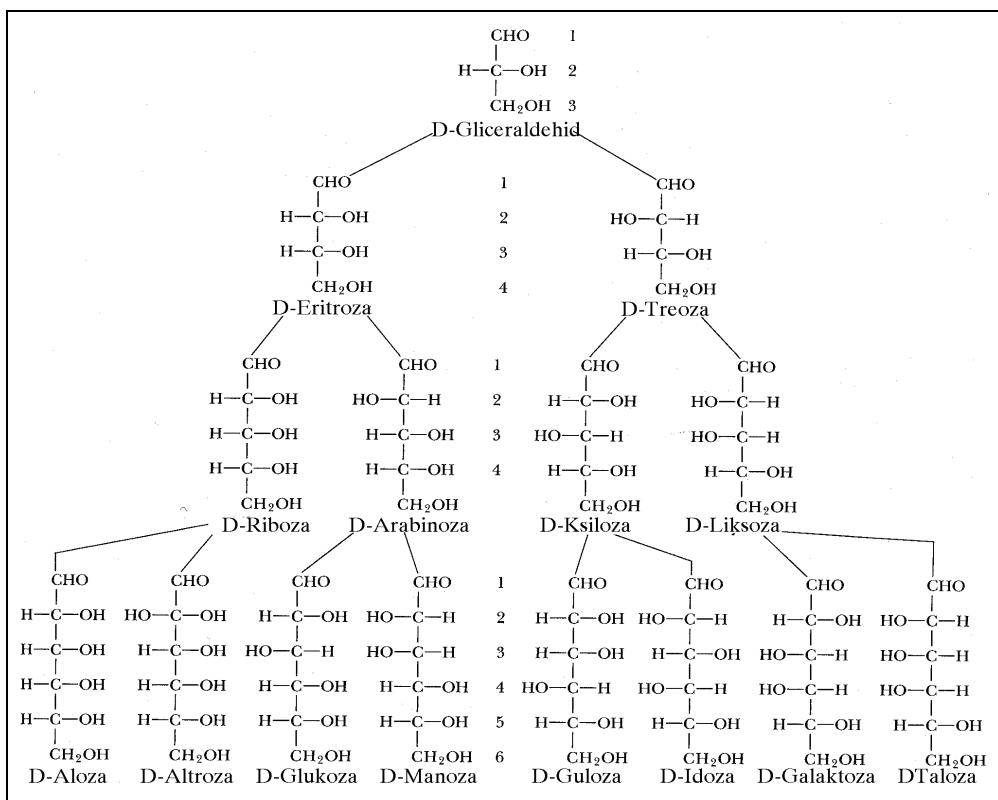
Slika 7-1. Gliceraldehid (desnorotirajući - **a** i levorotirajući - **b**).

Monosaharidi koji imaju jednaku količinu (+) i (-) enantiomera su *optički neaktivni* i nazivaju se **racemska smeša** (racemat), a obeležavaju se sa  $(\pm)$ . Broj mogućih izomernih oblika monosaharida iznosi  $2^n$  (n je broj asimetričnih C-atoma). Jedna polovina molekula ima D-, a druga L-konfiguraciju. Monosaharidi koji se međusobno razlikuju u konfiguraciji na jednom C-atomu nazivaju se *epimeri* (npr. D-glukoza i D-manoza). Biljke sintetizuju i usvajaju samo D-oblike monosaharida, a veoma retko L-oblike. Zbog prisustva asimetričnog ugljenikovog atoma molekuli monosaharida su asimetrični i imaju svojstva da skreću ravan polarizovane svetlosti za neki ugao  $\alpha$  (ugao polarizacije) u levo (-) ili u desno (+). Na ovom svojstvu zasniva se i metoda polarimetrijskog određivanja ugljenih hidrata u biološkom materijalu. Stereoizomeri nekih drugih monosaharida sa C-4 atoma u molekulu (tipične tetroze) dati su na slici 7-2.



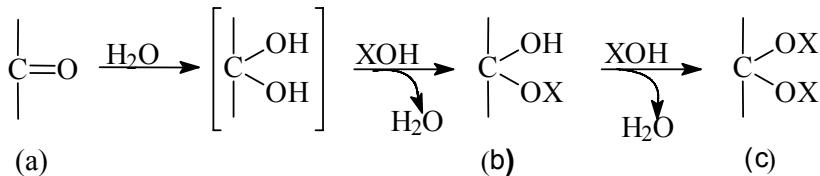
Slika 7-2. Stereoizomeri aldotetroza. (a) Diastereoizomeri: D-Eritroza i D-Trezoza, (b) Enantiomeri: D- i L-Trezoza.

Stereoohemijska povezanost nekih monosaharida otvorenog lanca (slika 7-3).



Slika 7-3. Stereoohemijska povezanost nekih aldoza sa C-3 do C-6 atomima.

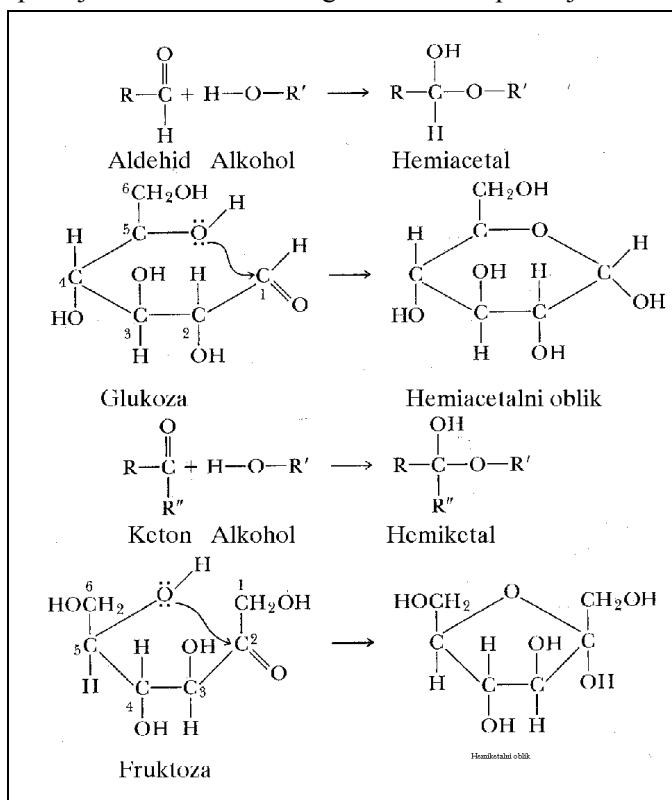
Karbonilna grupa u svim šećerima je veoma reaktivna i može graditi hemiacetale i acetale sa drugim hidroksilnim jedinjenjima ( $XOH$ ) (slika 7-4).



Slika 7-4. Struktura karbonilne grupe (a), hemiacetala (b) i acetala (c).

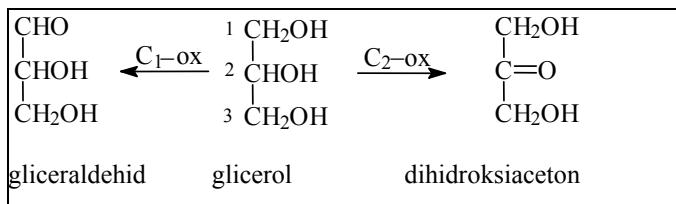
Pored navedenog pojedine funkcionalne grupe istog molekula šećera takođe međusobno reaguju uz izdvajanje molekula  $\text{H}_2\text{O}$  dajući nove strukturne oblike molekulu tipa *hemiacetala* odnosno *hemiketala* (slika 7-5). Hemiacetali nastaju interakcijom funkcionalnih grupa molekula *aldoza* i to poluacetalne na C-1 i OH grupe na C-5, dok hemiketali nastaju interakcijom funkcionalnih grupa molekula *ketoza* i to na C-2 i C-5 atomu. U stvari, glukoza je intramolekulski poluacetal u kome je hidroksilna grupa na C-5 reagovala sa aldehidnom grupom na C-1 koji postaje asimetričan. Zato glukoza može postojati u dva različita stereoizomera ( $\alpha$  i  $\beta$ ).

Kod ketoza OH na C-5 reaguje sa karbonilnom grupom na C-2 dajući hemiketale u obliku petočlanog prstena.



Slika 7-5.  
Formiranje hemiacetala i hemiketala šećera.

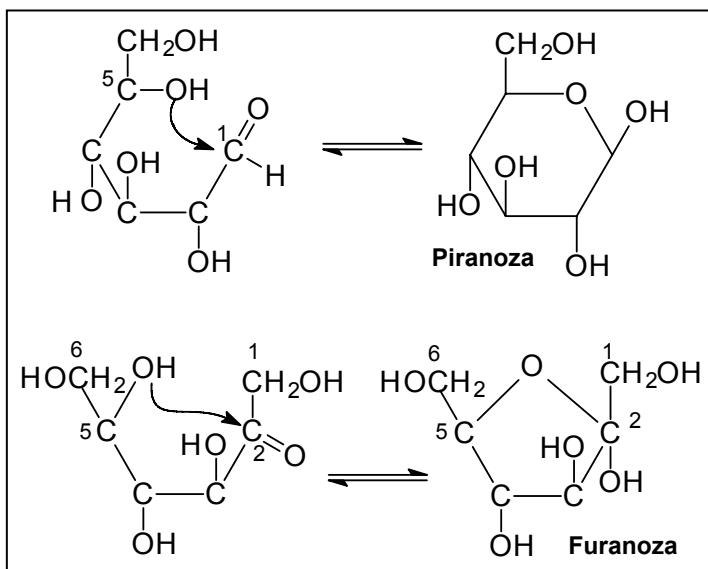
**D-gliceraldehid** (aldotriosa) - kao najprostiji monosaharid sa jednim asimetričnim C-atomom, zajedno sa **D-dihidroksiacetonom** kao ketotriozom, u fosfatnom obliku, pripadaju grupi značajnih intermedijera u biosintezama i glikolizi. Oksidacijom glicerola na C<sub>1</sub> nastaje gliceraldehid, a na C<sub>2</sub> dihidroksiacetton (slika 7-6).



Slika 7-6. Oksidacija glicerola na C-1 i C-2.

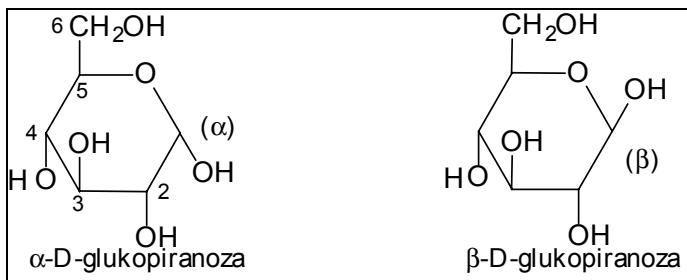
Od ostalih monosaharida biljke sadrže tetroze pentoze i heksoze, a manje heptoze. Navedeni monosaharidi se nalaze u lančastom i cikličnom obliku koji su međusobno dinamički uravnoteženi.

Ciklični oblici se grade reakcijama alkoholne i aldehidne odnosno keto grupe monosaharida (kada se dovoljno približe), a proizvod reakcije se naziva *poluacetal* odn. *poluketal*. U prvom slučaju gradi se šestočlani prsten piran - *piranoza*, a u drugom struktura petočlanog prstena furana - *furanoza* (slika 7-7).



Slika 7-7. Piranozne i furano-zne strukture mon-osaharida.

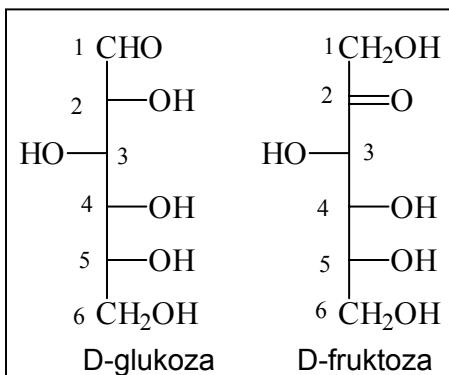
Gradjenjena vedenih prstenastih struktura C-atom u položaju C-1 postaje asimetričan usled čega se javlja nova vrsta izomerije  $\alpha$  i  $\beta$ -anomeri ( $\alpha$  i  $\beta$ -izomeri). Anomeri se medju-sobno razlikuju u konfiguraciji na C-1 atomu. Zaključeno je da  $\alpha$  i  $\beta$ -izomeri D-glukoze nisu strukture otvorenog lanca već šestočlane ciklične strukture koje nastaju reakcijama hidroksilne grupe na C-5 atomu, sa aldehidnom grupom ugljenika na položaju 1. Strukture ovih anomera prikazane su na slici slići 7-8. I ketoze se mogu naći u  $\alpha$  i  $\beta$  izomernom obliku.



Slika 7-8.  
Strukturni anomeri  
D-Glukopiranose.

Obeležavanje C atoma vrši se na taj način što je C-atom aldehidne grupe kod aldoza, kao atom sa najvišim

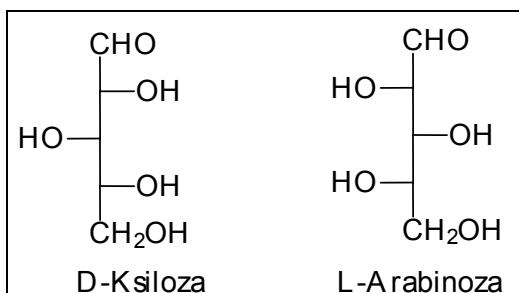
oksidacionim nivoom obeležen sa 1, a kod ketoza C-atom keto grupe obeležen je sa 2. Primer obeležavanja aldoza (D-glukoza) i ketoza (D-fruktoza) dat je u *Fischerovom projekpcionom formulom* na slici 7-9.



Slika 7-9.  
Numerisanje C-skeleta prostih šećera.

U biljkama se od pentoza nalaze mnoge aldopentoze kao npr. *ksiloza*, *arabinoza*, *riboza*, *apioza* i dr. a od ketopentoza od posebnog značaja su *ribuloza* i *ksiluloza*.

**D-Ksiloza** (D-Xyl) - je aldopen-toza, sastojak polisaharida - *ksilana* kojih ima u slami, drveću, semenu i dr. Ona je sastojak nekih glikozida u biljkama, a u maloj količini se nalazi u slobodnom stanju. Dobija se kiselom hidrolizom iz šapurika kukuruza i upotrebljava se u konduktorskoj industriji. Oksidacijom daje polihidroksilni alkohol- *ksilitol*.

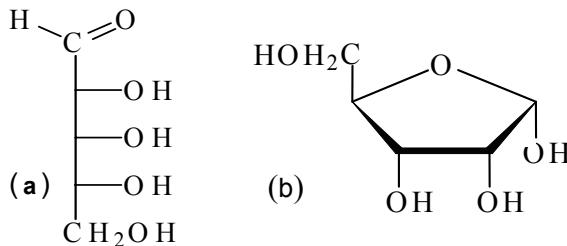


Slika 7-10.  
Strukture aldopentoza (D-Ksiloze i L-Arabinoze).

**L-Arabinoza** (L-Arab) - je aldopentoza koja je u biljkama (za razliku od ostalih monosaharida) nadjena u L-obliku. Retko se nalazi

slobodna već je sastojak glikozida, hemiceluloze, pentozana, biljne gume, pektina, biljnih sluzi, melase, smole trešnjevog drveta, poliglikozida arabana i drugih visokomolekularnih polisaharida *pentozana*. Struktura ovog monosaharida je data na slici 7-10.

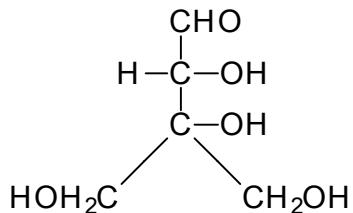
**D-riboza** (D-Rib) - je aldopentoza koja je univerzalni sastojak ćelije, jer ulazi u sastav nukleotida ribonukleinskih kiselina, a u  $\beta$ -D-furanoznom obliku koenzima (ATP, ADP, GTP, NAD, FAD, CoA i dr.) i vitamina B<sub>12</sub>. Sadrži tri asimetrična ugljenika, a stvara se iz D-glukoze kao intermedijer u pentozofosfatnom ciklusu. Struktura D-riboze data je na slici 7-11.



Slika 7-11.  
(a) Lančasta i (b) ciklična-furanozna struktura D-Riboze.

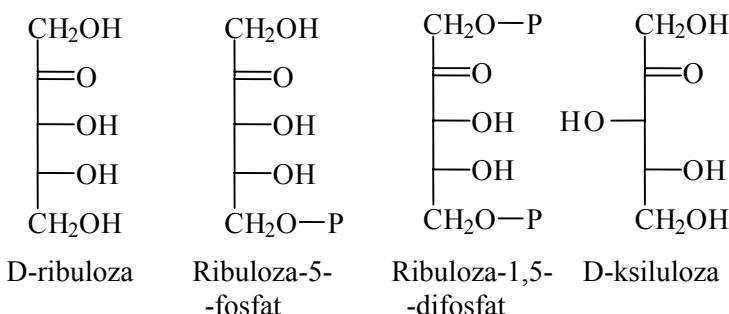
Redukcijom riboze dobija se alkohol *ribitol* koji ulazi u sastav mnogih biološki aktivnih jedinjenja.

**D-apioza** (D-Api) - je aldopentoza sa razgranatim ugljovodoničnim lancem (slika 7-12). Ovaj monosaharid je nadjen u mnogim biljnim vrstama. Ulazi u sastav flavonskog glikozida *apiina* koji je nadjen u peršunu (*Apium petroselinum*).



Slika 7-12. Struktura D-Apioze.

**D-ribuloza** (D-Ribul) i **D-ksiluloza** (D-Ksilul) - su ketopentoze tkiva biljaka čije su strukture prikazane na slici 7-13. Veoma su značajni njihovi fosfatni estri (ribuloza-5-fosfat i ribuloza-1,5-difosfat) kao intermedijeri u fotosintetičkim procesima biljaka.



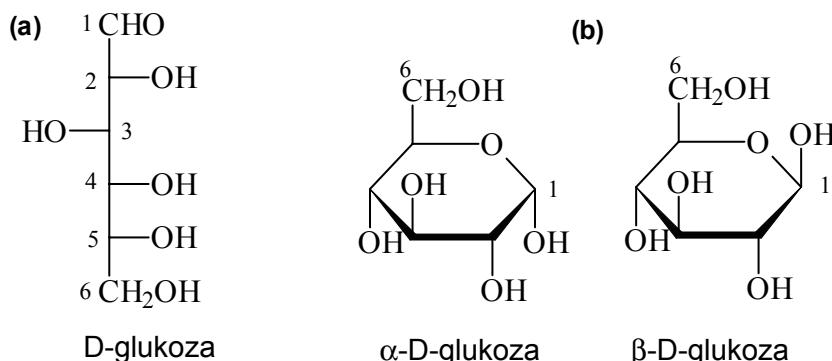
Slika 7-13. Strukture važnih metaboličkih monosaharida.

Od heksosa u biljkama su najrasprostranjениje *glukoza*, *galaktoza*, *manoza* i *fruktoza*.

**D-glukoza** (D-Glc) - ili grožđani šećer odnosno dekstroza je najznačajnija i najrasprostranjenija aldoheksoza. U biljkama se nalazi slobodna u biljnim sokovima ili vezana u saharozi, maltozi, skrobu, hemicelulozi i drugim šećerima. Služi za dobivanje vitamina B<sub>2</sub> i B<sub>15</sub>, riboze i glukonske kiseline. Struktura ovog monosaharida prikazana Fisherovom projekcionom i Haworthovom perspektivnom formulom data je na slici 7-14.

Sa aspekta biohemije od posebnog je značaja fosfatni estar glukoze koji služi kao energetski materijal u ćelijama (glukoza -6-fosfat), i prekursor u biosinteza di-, oligo- i polisaharida. Industrijski se glukoza proizvodi hidrolizom skroba iz krompira i kukuruza, a u novije vreme i pomoću imobilizovanih enzima u biotehnološkim procesima iz celuloze.

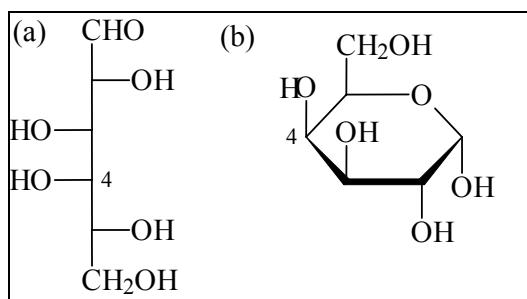
Biohemiska funkcija glukoze sastoji se u tome što je ona kao i većina drugih šećera mataboličko gorivo jer razgradnjom i oksidacijom oslobađa energiju.



Slika 7-14.

Lančasta - Fisherova projekcionalna formula glukoze (a) Ciklična - Haworthova reprezentativna formula (b).

**D-galaktoza** (D-Gal) - se razlikuje od glukoze po konfiguraciji samo na C<sub>4</sub> (slika 7-15).

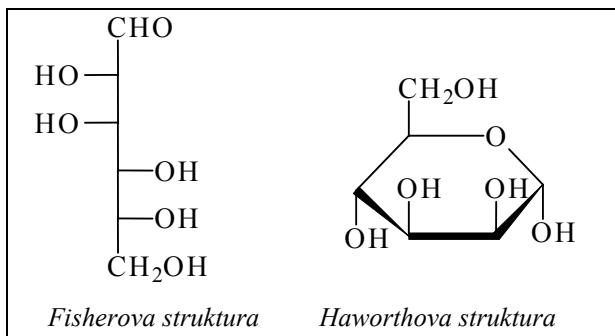


Slika 7-15.

Lančasta (a) i ciklična- piranozna (b) struktura D-Galaktoze.

Galaktoza je značajna kao građevna jedinica oligo- i polisaharida biljaka *galaktana* i *heterogalaktana*, kao rezervnih i strukturnih ugljenih hidrata. Ulazi u sastav trisaharida rafinoze, čitavog niza glikozida i polisaharida semena, nekih biljnih smola i sluzi, kao i glikolipida i glikoproteina. U prirodi se ne nalazi slobodna.

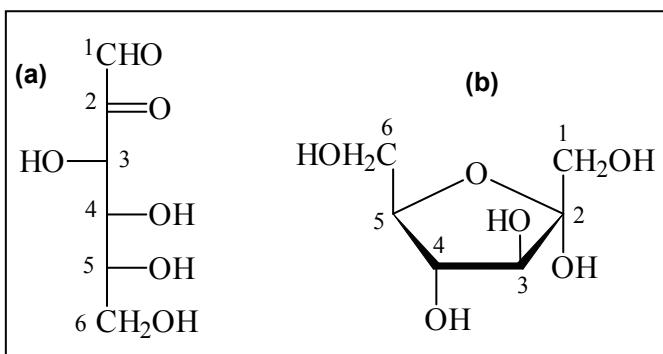
**D-Manoza** (D-Man) - kao aldoheksoza je sastojak visokomolekularnih biljnih polisaharida (hemiceluloze, mono- i heteromanana, i biljnih sluzi). U toku metabolizma može se transformisati u D-glukozu. Retko se nalazi slobodna. Često se sreće u obliku polihidroksilnog alkohola *manitola*. Dobija se hidrolizom hemiceluloze. Struktura D-manoze je data na slici 7-16.



Slika 7-16.  
Strukturalni oblici D-manoze.

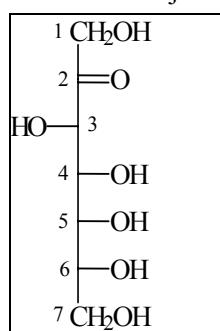
**D-fruktoza** (D-Fru) - je najznačajnija ketoheksoza poznata pod nazivom voćni šećer i može se transformisati u D-glukozu.

Struktura ove ketoheksoze data je na slici 7-17.



Slika 7-17.  
Fisherova projekciona  
(a) i Haworthova reprezentativna furanozna struktura  $\alpha$ -D-fruktoze ( $\alpha$ -D-fruktofuranoza) (b).

Uobičajeni ciklični oblik D-fruktoze je  $\beta$ -D-fruktofuranoza. Fruktoza ulazi u sastav voćnih sokova, disaharida (saharoze), trisaharida (rafinoze i gentianoze) i polisaharida (inulina). U slobodnom obliku fruktoza se najviše nalazi u voću i



povrću. Gradi estre sa fosfornom kiselinom. Najvažniji je estar fruktoza-1,6-difosfat koji učestvuje u sintezi i razgradnji šećera. Fruktoza je najsladi šećer.

**D-sedoheptuloza** (D-Sed) - je ketoheptoza koja se retko sreće u slobodnom obliku u biljkama. Struktura ovog monosaharida data je na slici 7-18.

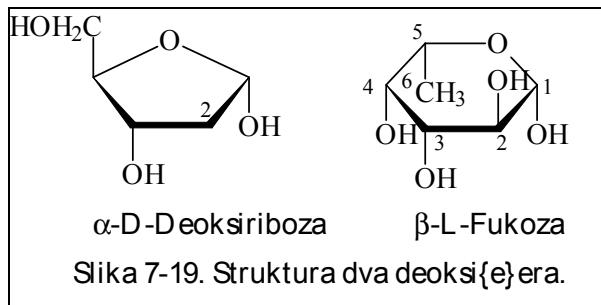
Slika 7-18. Struktura D-sedoheptuloze (D-Sed).

Kao estar, D-sedoheptuloza-7-fosfat je intermedijer u metabolizmu ugljenih hidrata u pentofosfatom ciklusu iz kojeg se dobija eritroza 4-fosfat prekursor u biosintezi aromatičnih jedinjenja.

Pored navedenih monosaharida biljke sadrže i čitav niz **derivata monosaharida** koji nastaju njihovom redukcijom, oksidacijom, esterifikacijom i dr. hemijskim reakcijama. Od derivata posebno su značajni *deoksišećeri*, *šećerni alkoholi*, *šećerne kiseline*, *estri monosaharida*, *aminošećeri* i dr.

Mnoge karakteristične osobine monosaharida (npr. sposobnost redukcije) uslovljene su poluacetalnim hidroksilnim grupama (na C<sub>1</sub> aldoza, odnosno C<sub>2</sub> ketoza).

**Deoksi šećeri** - su redukcioni proizvodi monosaharida. Oni su važan strukturni elemenat deoksiribonukleinskih kiselina zbog čega se 2-deoksi-D-riboza ( $\alpha$ -D-Deoksiriboza) smatra najvažnijim deoksišećerom. Strukture nekih deoksišećera iz grupe C-5 ( $\alpha$ -D-Deoksiriboza) i C-6 ( $\beta$ -L-Fukoza) monosaharida date su na slici 7-19.

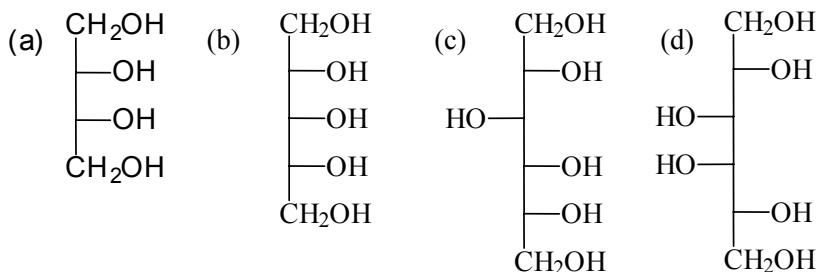


Slika 7-19. Struktura dva deoksi{e}fera.

**Poliooli** - (šećerni alkoholi) su derivati monosaharida D- i L- niza koji nastaju redukcijom karbonilne grupe monosaharida sa NAD<sup>+</sup> odnosno NADP<sup>+</sup> zavisnim reduktazama. Ime-na su izvedena tako što se

monosaharidu odbije sufiks-*oza* i doda sufiks-*itol*.

To su bezbojna, higroskopna jedinjenja koja ne podležu vrenju sa kvascima i imaju sladak ukus. Po rastvorljivosti su slični monosaharidima i imaju slabo laksativno dejstvo. Biljke sadrže više poliola kao npr. *glicerol*, *eritrol*, *ribitol*, *sorbitol*, *manitol*, *dulcititol* i dr. Strukture nekih od njih su date na slici 7-20.



Slika 7-20. Strukture eritrola (a), ribitola (b), sorbitola (c) i dulcitola (d)

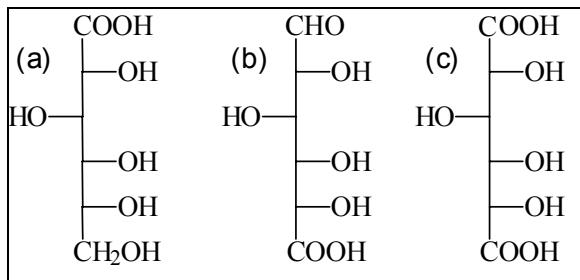
*Eritrol* - je optički neaktivran C<sub>4</sub> - poliol. U višim biljkama je malo rasprostranjen, a u većoj količini se nalazi u nekim travama.

*Ribitol* - je optički neaktivran C<sub>5</sub> - poliol. Sastojak je flavinskih koenzima i gradi se redukcijom riboze.

*Sorbitol* - je C<sub>6</sub> - poliol. Nalazi se u plodovima vića kao npr. jabukama, šljivi, jagodama (*Fragaria vesca*) od 0.5-1.0%, krušci oko 2.5%, glogu 7.6%, a u tropskim biljkama i do 14%. Iz lista šljive izolovan je u količini od 4.5%. Sorbitol je našao veliku primenu u raznim granama industrije. Iz sorbitola se dobija vitamin C, površinski aktivne materije i polimeri, a dodaje se i kao antioksidans mastima. Zbog emulgatorskih osobina našao je primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji služi i kao aditiv (sladoledu da bi se očuvala vlažnost, itd), a primenjuje se i u kožarskoj i duvanskoj industriji. Dobija se iz skroba ili hidrogenovanjem glukoze.

*Dulcitol* - je optički neaktivran C<sub>6</sub> - poliol. Nalazi se u breskvama (*Prunus persica*) i kori drveća. Oksidacijom daje galaktozu i sluznu kiselinu (galakturonsku kiselinu).

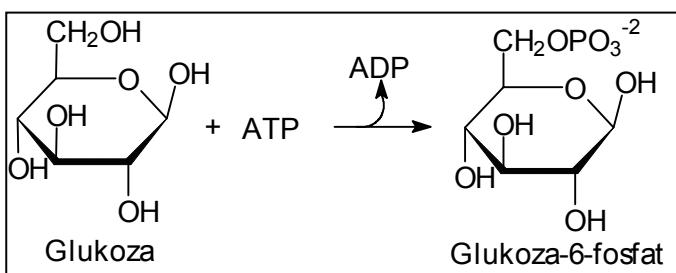
**Šećerne kiseline** - su oksidacioni proizvodi monosaharida. U zavisnosti od mesta oksidacije izvedena je njihova nomenklatura. Tako ako je oksidacija izvedena na hemiacetalnom ili aldehidnom C-atomu onda se umesto nastavka-*oza* dodaje sufiks-*onska*, ako je oksidovana terminalna -CH<sub>2</sub>OH grupa sufiks-*uronska*, a ako oksidacijom nastaje dikarbonska kiselina dodaje se nastavak-*arinska*. Šećerne kiseline su jake kiseline, a njihove soli su rastvorljive u vodi. Strukture nekih šećernih kiselina su prikazane na slici 7-21.



Slika 7-21.  
Strukture D-Glukonske (a), D-Glukuronske (b) i D-Glukarinske kiseline (c).

U biljkama su najviše rasprostranjene *uronske* kiseline koje ulaze u sastav pektina, biljnih sluzi i drugih složenih poliuronida. Nastaju kao meduproizvodi pri obrazovanju pentoza iz heksoza (dekarboksilacijom glukuronske kiseline se dobija ksiloza, a galakturonske arabinoza). Često se u biljkama nalaze u obliku laktona. Značajni su intermedijeri u metabolizmu monosaharida.

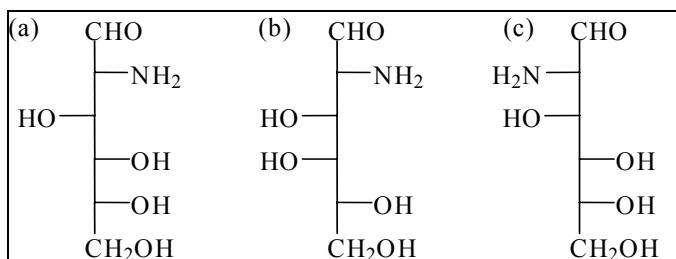
**Estri monosaharida** - Alkoholne i poluacetalne grupe monosaharida grade sa neorganskim i organskim kiselinama estre, kao veoma reaktivna jedinjenja. U metabolizmu najznačajniji su estri sa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kao međuproizvod u metabolizmu ugljenih hidrata posebno su značajni estri monosaharida sa fosfornom kiselinom (slika 7-22).



Slika 7-22.

Formiranje fosfatnog estra (ATP je donor fosfatne grupe).

**Aminošećeri** - su derivati monosaharida koji nastaju supstitucijom -OH grupe (obično u položaju C<sub>2</sub> kod monosaharida) sa -NH<sub>2</sub> grupom. Oni su često acetilovani i kao takvi su sastojci složenih ugljenih hidrata glikolipida, glikoproteina i polisaharida. Najrasprostranjeniji su *glukozamin* (hitozamin - GlcN), *galaktozamin* (hondrozamin - GalN) i *manozamin* (ManN), koji su sastojci strukturnih polisaharida ili glikoproteina, a glukozamin ulazi još i u sastav hitina. Strukture navedenih aminošećera su date na slici 7-23.

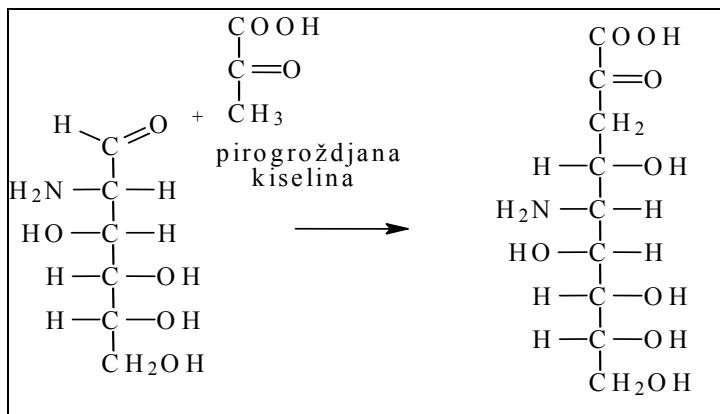


Slika 7-23.  
Strukture D-glukoza-  
mina (a), D-galakto-  
zamina (b) i D-mano-  
zamina (c).

Navedeni aminošećeri nastaju iz glukoze, galaktoze i manoze supstitucijom -OH grupe na C<sub>2</sub>-atomu sa -NH<sub>2</sub> grupom.

Acetilovan oblik **hitozamina** (D-GlcN•Ac) je sastojak hijaluronske kiseline i nekih glikolipida. **Hondrozamin** - se dobija hidrolizom hondroitinsulfata. Sastojak je nekih glikoproteida i glikolipida. Aminošećer **D-manozamin** (D-ManN) i njegov acetil-oblik (D-ManN•Ac) sastojak je acilneuraminske kiseline (sialinske kiseline) u glikoproteinima koji grade membrane i u velikom broju glikolipida.

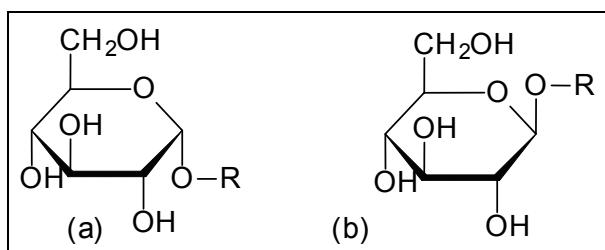
**Neuraminska kiselina** (Neu) - je derivat aminošećera koji ima 9 C-atoma, a nastaje aldolnom kondenzacijom manozamina (epimer glukozamina na C<sub>2</sub>) i pirogroždane kiseline (slika 7-24). Ne nalazi se u slobodnom stanju, a supstituisani oblik N-acilneuraminska kiselina, pod nazivom *sijalinska kiselina*, sastojak je glikolipida koji učestvuju u izgradnji ćelijskih membrana.



Slika 7-24.  
Nastajanje neuraminske kiseline iz D-manozamina.

**Glikozidi** – su acetali šećera i alkohola medju-sobno povezani glikozidnom vezom.

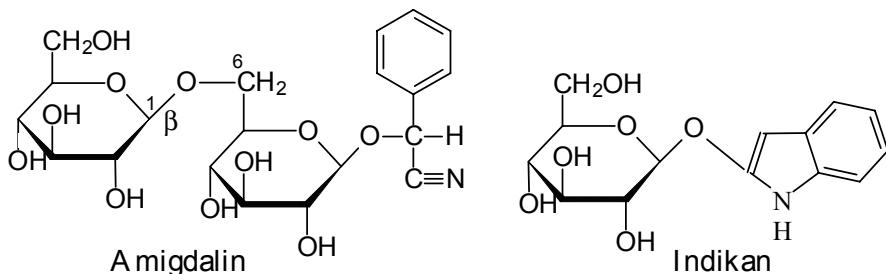
Ako je alkohol povezan za monosaharid "kiseoničnim mostom", onda su to tzv. *O-glikozidi*, ako je povezan direktno na C atom to su *C-glikozidi*, odnosno za atom azota *N-glikozidi* ili pak za atom sumpora *S-glikozidi*. Po analogiji sa izomerizacijom na anomernom C-atomu postoje  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidi (odnosno  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidna veza koja uslovjava njihovu hidrolizu specifičnim enzimima) (slika 7-25).



Slika 7-25.  
Strukture formule  $\alpha$ - (a) i  $\beta$ -glikozida (b).

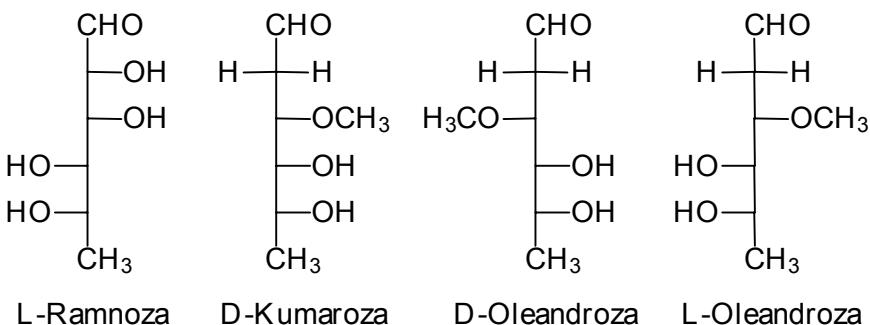
Nešećerna komponenta glikozida se naziva *aglikon* i on može imati različite strukture kao npr. steroidnu.

Glikozidi imaju izvesna fiziološka dejstva na čoveka i životinje te su našli primenu u medicini. Poznati biljni glikozidi su *amigdalin* iz gorkog badema i *indikan* iz indigofere (slika 7-26), zatim *salicin* koji je ustanovljen u kori vrbe i topole u kojem je alkohol hidroksibenzil vezan za D-glukuzu.



Slika 7-26. Strukture nekih biljnih glikozida.

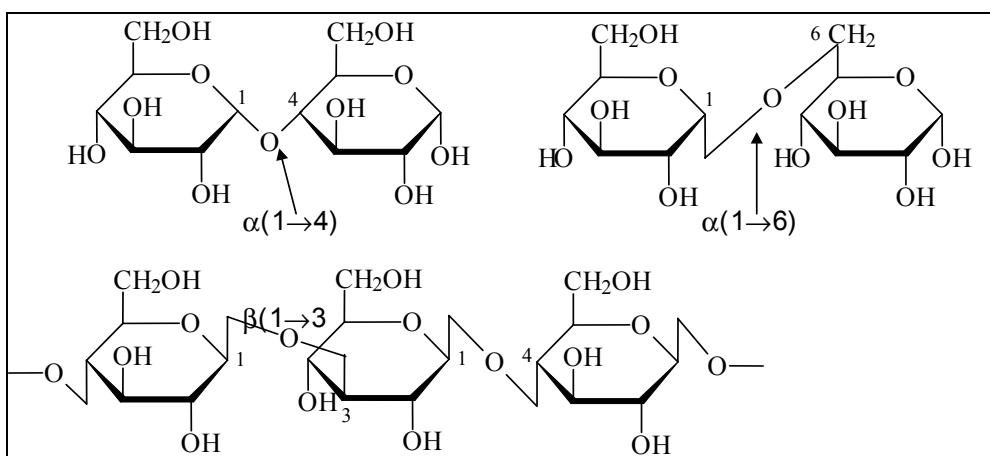
**Neuobičajeni monosaharidi** - nalaze se redje u biljkama i to obično vezani u glikozidima. Najrasprostranjeniji neuobičajeni monosaharidi su D-kumaroza i D- i L-oleandroza. Strukture navedenih neuobičajenih monosaharida date su na slici 7-27.



Slika 7-27. Struktura nekih neuobičajenih monosaharida.

## 7.2. Disaharidi i oligosaharidi

S' obzirom da molekul monosaharida sadrži veći broj OH-grupa, koje su veoma reaktivne u prirodi se javljaju oblici međusobnog povezivanja dve i više jedinica u di-, oligo- i polisaharide. Veza koja se stvara između dve ili više ugljikohidratnih jedinica naziva se **glikozidna veza**. U zavisnosti u kojem se položaju i konfiguraciji nalaze OH-grupe, koje uz izdvajanje H<sub>2</sub>O, stvaraju različite tipove glikozidnih veza kao npr.  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ,  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ ,  $\beta(1 \rightarrow 3)$ ,  $\beta(1 \rightarrow 4)$  i dr. (slika 7-28).

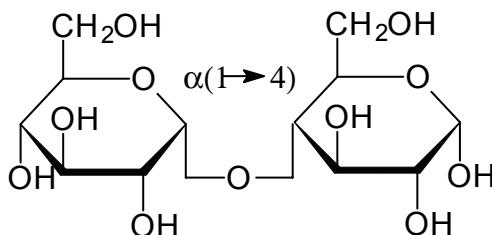


Slika 7-28. Neki oblici glikozidnih veza u molekulima šećera.

**Disaharidi** - su glikozidi izgrađeni iz dve iste ili različite monosaharidne jedinice. Hidrolizom daju monosaharide. Zavisno od načina građenja glikozidne veze razlikujemo *redukujuće i neredukujuće disaharide*.

**Redukujući disaharidi** - nastaju u slučajevima kada u građenju glikozidne veze ne učestvuje poluacetalna grupa osnovnog šećera, odnosno kada se poluacetalna (redukujuća) grupa jednog monosaharida vezuje za bilo koju neredukujuću hidroksilnu grupu drugog monosaharida. Zbog toga oni imaju slobodnu redukujuću grupu i zbog toga pokazuju redukciona i mutarotaciona svojstva. Od redukujućih disaharida u biljkama su najviše zastupljene *maltoza, celobioza i gentiobioza*.

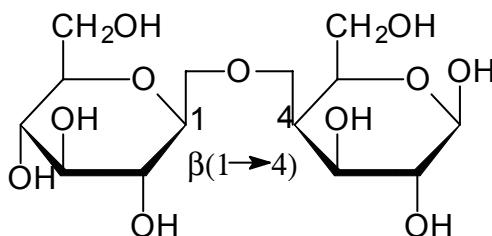
*Maltoza* - je izgrađena iz dva molekula D-glukoze povezanih  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glikozidnom vezom (slika 7-29). Ona je stereoizomer celobioze i jedan je od najrasprostranjenijih disaharida. Nalazi se u listovima, krtolama i semenu biljaka slobodna ili kao gradjevna jedinica skroba.



Slika 7-29.  
Struktura maltoze ( $\alpha$ -oblik)

*Celobioza* - je takođe redukujući disaharid maltoznog tipa u kojem je glukoza povezana  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidnom vezom (slika 7-30). U

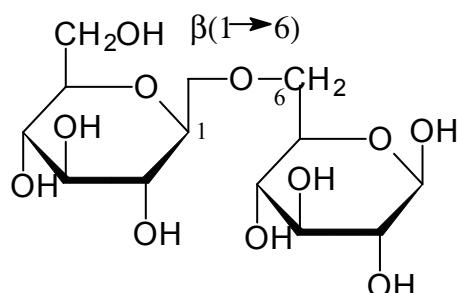
biljkama se ne nalazi slobodna već kao sastojak celuloze i nekih glikozida.



Slika 7-30.  
Struktura celobioze ( $\beta$ -oblik)

*Gentiobioza* - je redukujući disaharid sastojak raznih biljnih glikozida kao npr. amigdalina. Hidrolizom daje dva molekula D-glukoze. Nastaje povezivanjem

glukoze  $\beta(1 \rightarrow 6)$  glikozidnom vezom (slika 7-31).

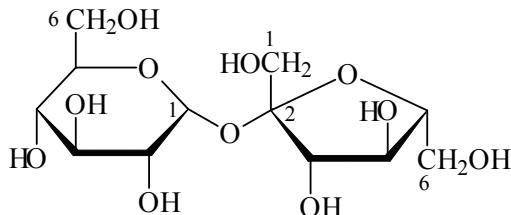


Slika 7-31.  
Struktura gentiobioze ( $\beta$ -oblik)

Napred navedeni redukujući disaharidi prema vrsti glikozidne veze svrstavaju se u *maltozni tip* jer je njihov prototip maltoza.

**Neredukujući disaharidi** - sadrže glikozidnu vezu između dve glikozidne - OH grupe i grade tipične *acetale*. Oni nisu redukciona sredstva i nemaju svojstvo mutarotacije te pripadaju *trehaloznom tipu* disaharida. *Saharoza* je najrasprostranjeniji neredukujući disaharid.

*Saharoza* - je neredukujući disaharid izgrađen od  $\alpha$ -D-glukoze (Glc) i  $\beta$ -D-fruktoze (Fru). Glikozidna veza ova dva monosaharida se uspostavlja između  $\alpha$  C-1 ugljenika glukoze i  $\beta$  C-2 ugljenika fruktoze dajući tako  $\alpha,\beta(1\rightarrow 2)$  odnosno  $\alpha_1\rightarrow\beta_2$  tip glikozidne veze (slika 7-32). Ovakav način povezivanja, gde anomerne grupe oba monosaharida učestvuju u stvaranju glikozidne veze, uslovio je da saharoza pripada neredukujućim disaharidima.



Slika 7-32.  
Struktura saharoze ( $\text{Glc}(\alpha 1\rightarrow\beta 2)\text{-Fru}$ ).

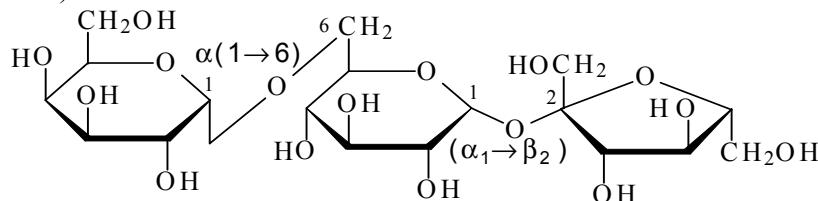
Nalazi se u svim fotosintetičkim delovima biljaka (listu i stabljici) i semenu. Najviše je ima u šećernoj repi (11-15%). Saharoza se koristi u proizvodnji deterdžentata i emulgatora, kao i za industrijsko dobijanje fruktoze.

Enzimskom hidrolizom  $\alpha$ -D-glukozidazom (EC 3.2.1.20) i  $\beta$ -D-fruktozidazom (EC 3.2.1.26) saharoza se prevodi u svoje monomere glukuzu i fruktozu.

Pored disaharida biljke u znatnoj količini sintetizuju i trisaharide od kojih su najviše rasprostranjene *rafinoza* i *gentianoza*.

**Trisaharidi** - su oligosaharidi izgrađeni iz tri iste ili različite monosaharidne jedinice. Rastvorljivi su u vodi kao i disaharidi s tim što se rastvorljivost smanjuje proporcionalno sa povećanjem molske mase. Biljke sintetizuju različite strukturne tipove trisaharida od kojih su najznačajniji *rafinoza* i *gentianoza*.

*Rafinoza* - je neredukujući trisaharid Sastoji se iz galaktoze (Gal), glukoze (Glc) i fruktoze (Fru) međusobno vezane  $\alpha(1\rightarrow 6)$  i  $\alpha,\beta(1\rightarrow 2)$  glikozidnom vezom (slika 7-33).

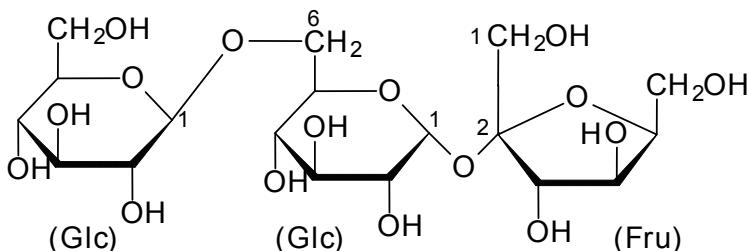


Slika 7-33. Struktura rafinoze ( $\text{Gal}(\alpha 1\rightarrow 6)\text{Glc}(\alpha 1\rightarrow\beta 2)\text{-Fru}$ ).

Rafinoza je bitan proizvod razmene materije, transportni oblik ugljenih hidrata, učesnik u biosintezi UDP-šećera itd. Može se hidrolizovati sirćetnom kiselinom i enzimima. Enzimskom hidrolizom sa dva enzima;  $\alpha$ -D-galaktozidazom (EC 3.2.1.22), hidrolizuje  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glikozidnu vezu, i  $\beta$ -D-fruktozidazom (EC 3.2.1.26), hidrolizuje  $\alpha\beta(1 \rightarrow 2)$  vezu, rafinoza se razlaže na svoje monomere - galaktozu, glukozu i fruktozu.

Rafinoza je posle saharoze najrasprostranjeniji oligosaharid. Nalazi se u znatnim količinama u šećernoj repi (1.5-4%), ječmu i pamuku naročito za vreme cvetanja. Biohemijska funkcija rafinoze se sastoji u tome što je ona transportni trisaharid.

Gentianoza - je rezervni trisaharid rizoma i mnogih *Gentiana* vrsta. Pripada grupi neredukujućih ugljenih hidrata u kojoj su monomeri (dve glukoze i fruktoza) povezani  $\beta(1 \rightarrow 6)$  i  $\alpha\beta(1 \rightarrow 2)$  glikozidnim vezama (sl 7-34).

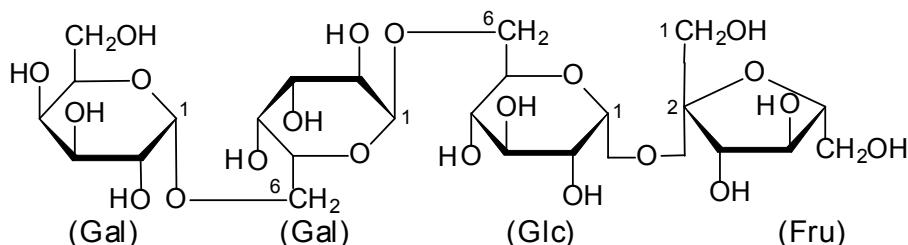


Slika 7-34. Struktura gentianoze (Glc-Glc:  $\beta(1 \rightarrow 6)$ ; Glc-Fru:  $\alpha\beta(1 \rightarrow 2)$ ).

Rasprostranjena je u biljkama kao rezervni oligosaharid, a najviše je ima u lincuri (*Gentiana lutea*).

**Tetrasaharidi** - su ologosaharidi izgradjeni iz četiri monosaharida medjusobno povezani glikozidnim vezama  $\alpha$ - i  $\beta$ -tipa. U biljkama je stahioza najrasprostranjeniji tetrasaharid.

Stahioza - je tetrasaharid izolovana iz biljaka. Nastaje sjedinjavanjem dva ostatka galaktoze i glukoze i jednog ostatka fruktoze (slika 7-35).



Slika 7-35. Struktura stahioze  
(Gal-Gal  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ ; Gal-Glc  $\beta(1 \rightarrow 6)$ ; Glc-Fru  $\alpha\beta(1 \rightarrow 2)$ ).

Saharidi poseduju jednu specifičnu osobinu, a to je slast. Ukoliko se kao stepen slasti saharoze uzme broj 100 onda je stepen slasti ostalih monosaharida i nekih oligosaharida veći ili manji od ovog broja (tabela 7-1).

Tab. 7-1. Stepen slasti mono- i oligosaharida izraženi u odnosu na saharozu.

Naziv šećera	Stepen slasti izražen u odnosu na saharozu
Saharozna	100
Fruktoza	173
Invertni šećer	130
Glukoza	75
Sorbitol i glicerol	48
Ksiloza	40
Maltoza, ramnoza i galaktoza	38
Rafinoza	23

Znatno veću slast ima protein *monelin* iz jagoda i afričke biljke *Dioscoreophyllum cumminis* kao i *taumalin* iz afričke biljke *Thaumatococcus danielli* i to prvi 3.000 puta a drugi 1.000 puta veću u odnosu na saharozu.

### 7.3. Polisaharidi

Polisaharidi (glukani) - su kvantitativno veoma velika grupa ugljenih hidrata-polimera monosaharida ili njihovih derivata povezanih  $\alpha$ - ili  $\beta$ -glikozidnom vezom u razgranate i nerazgranate lanci. Lanci polisaharida mogu biti izgrađeni od 10 pa do 1000 i više istih ili različitih ostataka monosaharida složenih linearno, sforno i spiralno. Oni se razlikuju od monosaharida po mnogim osobinama: nemaju sladak ukus, obično su nerastvorljivi u vodi, a kada se rastvore u vodi uz pomoć hemikalija, grade koloidne rastvore. Prema vrsti monosaharida koje sadrže dele se na **homopolisaharide** i **heteropolisaharide**. Vrsta polisaharida nije uslovljena samo strukturom monomernih jedinica već i njihovim brojem kao i stepenom račvanja. Polisaharidi ne prolaze kroz membrane ćelije. Medjusobno se razlikuju, ne samo po vrsti monomera koji ih izgradjuje, već i stepenu polimerizacije kao i prirodi veze izmedju monomera. Hemijska i fizička svojstva polisaharida uslovljena su monosaharidnim i oligosaharidnim jedinicama. Rastvorljivost polisaharida u vodi i kapacitet redukcije se menja sa povećanjem molekulske mase.

Polisaharidi se razlažu hidrolizom prvo do oligosaharida a potom do monosaharida. Veoma su rasprostranjeni u biljkama a strukture mnogih još nisu odredjene jer se veoma teško izoljuju u čistom stanju. Značajni su u metabolizmu biljaka, ishrani čoveka i životinja kao i sirovine u raznim granama industrije. Prema

funkcijama koje obavljaju u organizmu polisaharidi se takođe dele na *rezervne* i *strukturne* polisaharide.

### 7.3.1. Homopolisaharidi

Polimeri izgrađeni iz samo jednog tipa monosaharida nazivaju se homopolisaharidi. Najvažniji su *skrob* i *celuloza* kod biljaka odnosno *glikogen* i *hitin* kod životinja.

**Skrob** - je osnovni rezervni homopolisaharid biljaka molekulske mase oko 500.000. Obično je deponovan u citoplazmi ćelija u obliku velikih granula. Nastaje u zelenim biljkama asimilacijom  $\text{CO}_2$  u procesu fotosinteze i akumulira se u semenu i krtolama u količini 40-70%, a u drugim delovima 4-25%. Najbogatiji izvori skroba su krtole krompira i seme žitarica. Skrob se koristi u ishrani ljudi i životinja pa je zato najvažniji biljni polisaharid. Kiselim hidrolizom skroba dobija se D-glukoza. Utvrđeno je da se glukoza u skrobu nalazi u obliku  $\alpha$ -D-glukopiranoze. U biljkama se nakuplja u hloroplastima u obliku skrobnih zrnaca koja se razlikuju međusobno u morfološkim osobinama. Utvrđeno je da broj, oblik i svojstva granula skroba zavise od vrste biljaka jer se sintetizuju pod kontrolom gena. Zrno skroba može imati ovalni, sferni ili nepravilni oblik. Dimenzije se kreću 0.002-0.15 nm. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da je svaka granula skroba u populaciji jedinstvena i razlikuje se od susednih po strukturi i svojstvima. Oblici skrobnih zrna se razlikuju pod mikroskopom (slika 7-36).

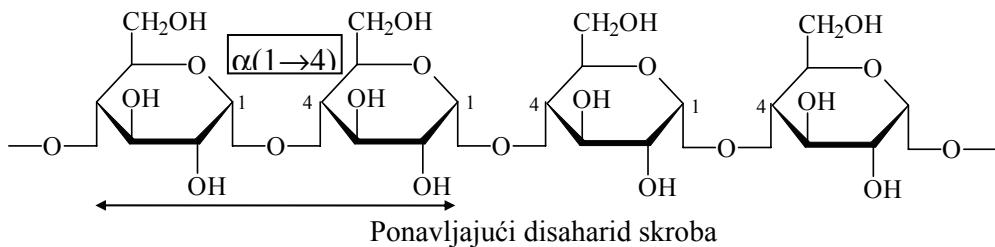


Slika 7-36. Oblik skrobnih zrna iz raznih kultura: pšenice (a), ovasa (b) i krompira (c) (V.Kretović, *Biohemija rastnij*; Visšaja škola, Moskva, 1986).

Na svakoj granuli skroba se razlikuju dva regiona, i to *amorfni* i *kristalni*. Amorfni region je "podobniji" za enzimske i hemijske reakcije od kristalnog regiona čiji lanci su vezani vodoničnim mostovima.

Prirodni skrob je smeša dva polimera (dve subjedinice) koji se mogu razdvojiti jer se razlikuju u strukturnim svojstvima. Prvi polimer se naziva *amiloza* (ulazi u sastav skroba u količini 15-25%), a drugi je *amilopektin* (ulazi u sastav skroba u količini 75-85%). Udeo ovih polimera skroba varira sa biljnom vrstom.

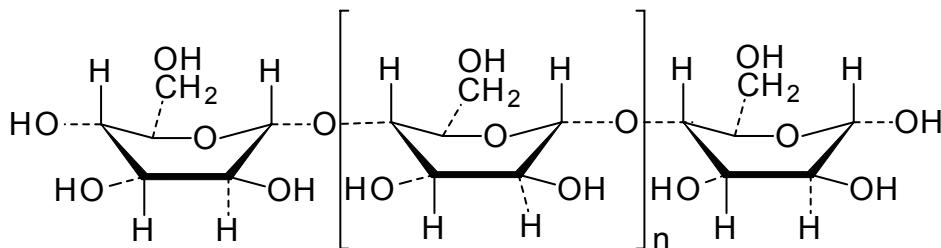
Amiloza - je nerazgranat polisaharid rastvoran u toploj vodi. Izgradjuena je od 200-2.000 osataka glukoze u piranoznom obliku medjusobno povezanih  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glikozidnim vezama te se naziva još i  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  *glukan*. Ako je  $\alpha$ -D-glukoza ponavljamajući monosaharid onda je maltoza ponavljamajući disaharid u molekulu amiloze. Struktura dela molekula amiloze prikazana je na slici 7-37



Slika 7-37.

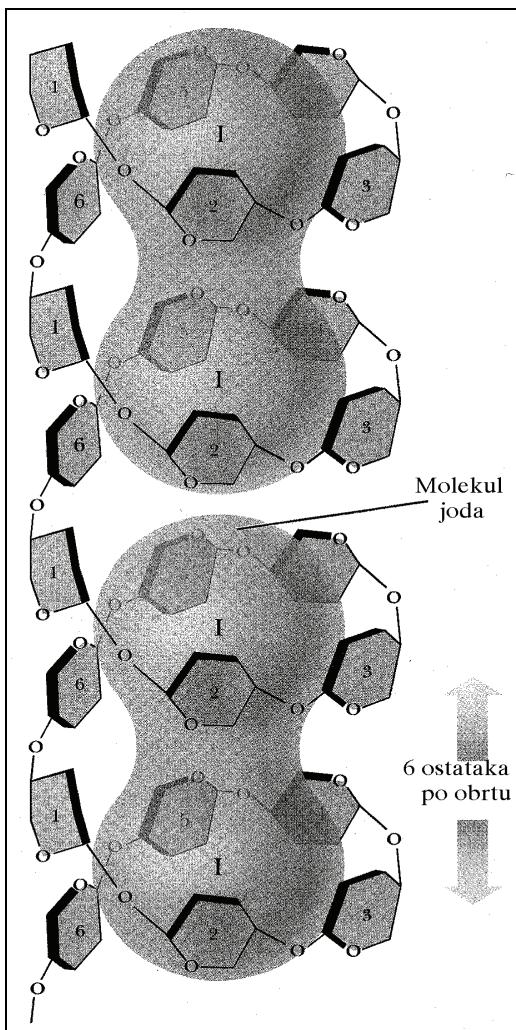
Fragment strukture linearog lanca amiloze.  $\alpha$ -D-glukoza je monomer, a dimer (**Maltoza**) je ponavljamajući disaharid.

Savremeni podaci o gradji amiloze zasnovani su na prepostavci da  $\alpha$ -D-glukopiranozni ostaci imaju konformaciju tipa ladje te se konformaciona formula amiloze može prikazati slikom 7-38.



Slika 7-38. Konformaciona formula molekula amiloze.

Difrakcijom X-zraka utvrđeno je da linearni lanci glukoze mogu zauzimati spiralan oblik sa dijametrom od 3 nm koji je stabilizovan vodoničnim vezama. Svaki obrtaj uvojnica sadrži 6-7 monosaharidnih jedinica. Spiralna konformacija amiloze prikazana je na slici 7-39. Navedena konformacija amiloze omogućava građenje inkluzionog jedinjenja skroba sa jodom. Na slici je amiloza prikazana kao heliks sa šest glukozil-ostataka po obrtu.



podjedinice skroba - amiloze sa nagrađenim skrob-jod kompleksom kao inkluzionim molekulom. (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saunders, College Publish., London, 1995. str.121; sl.6-27).

Amilopektin - je druga podjedinica nativnog skroba, a razlikuje se od amiloze jer ima razgranatu strukturu. Izgrađen je od  $10.000\text{-}20.000$  ostataka  $\alpha$ -D-glukoze sa Mr koja se kreće i do  $4\bullet10^6$ . Na glavnom lancu, glukozil-ostaci su povezani  $\alpha(1\rightarrow4)$  vezama, razmešteni su bočni lanci sa  $\alpha(1\rightarrow6)$  glikozidnim vezama u tačkama granjanja. Lanac se grana u proseku nakon svakih 25 jedinica glukoze. Deo strukture razgranatog lanca amilopektina skroba dat je na slici 7-40.

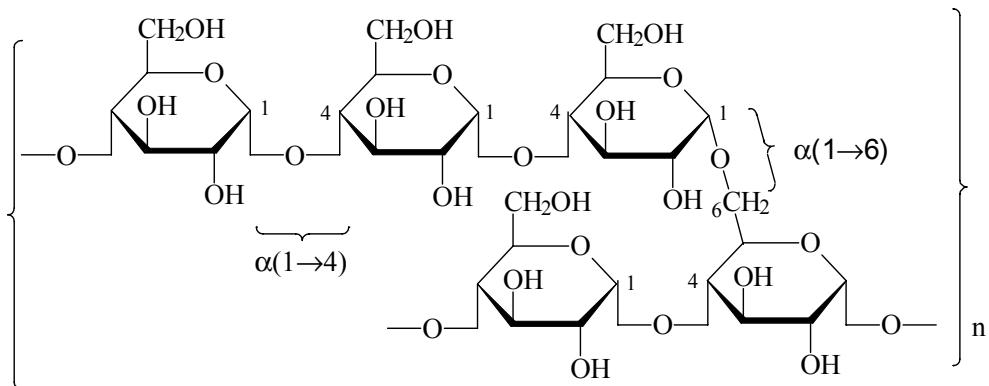
U skrob - jod kompleksu molekuli joda su paralelno poređani duž ose heliksa. Četiri obrta heliksa su prikazana na slici. Šest obrta heliksa sadrži 36 glukozil-ostataka koji su odgovorni za stvaranje karakteristično plavo obojenog kompleksa. Ova reakcija skroba sa jodom nije proizvod hemijskog dejstva već građenja apsorpcionog kompleksa. Jod se ugrađuje u spiralu pri čemu mrko obojenje joda prelazi u plavo obojeno inkluzionalno jedinjenje. Intenzitet boje u srazmeri je sa stepenom umrezenosti molekula skroba.

Struktura amiloze je od značaja za njenu hemijsku odnosno biohemijsku reaktivnost.

Enzimskom hidrolizom uvojnici amiloze sa  $\alpha$ -amilazom (EC 3.2.1.1) dobijaju se manji fragmenati tzv. "deksstrin" (tipa eritrodekstrina, ahrodekstrina itd) a kao krajnji proizvodi najčešće maltoza (90%) i nešto glukoze (10%).

Slika 7-39.

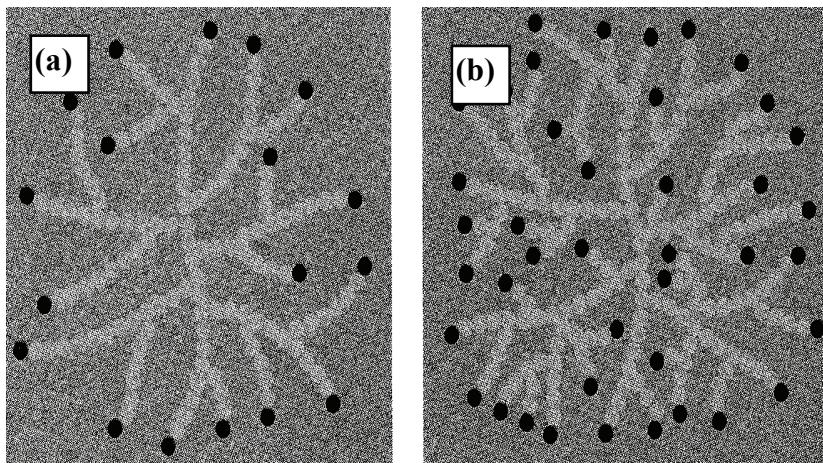
Shematski prikaz spiralne strukture



Slika 7-40.

Fragment strukture razgranatog lanca amilopektina skroba sa naznačenim  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  i  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glikozidnim vezama.

Shematski prikaz strukture amilopektina dat je na slici 7-41, na kojoj svaki kružić označava molekul glukoze. Njegova razgranata struktura ometa stvaranje spirale koja je karakteristična za amilozu.



Slika 7-41. Razgranate strukture amilopektina skroba (a) i glikogena (b).

Amilopektin sa jodom takođe gradi inkluzionalno jedinjenje koje se za razliku od amiloze boji u ljubičasto do crveno-ljubičasto. Ima jedan redukujući i više neredukujućih krajeva.

Većina biljaka sintetizuju skrobna zrna koja se sastoje iz 15% amiloze i 85% amilopektina. Međutim neke vrste kukuruza i pirinča (*Oriza sativa*) poznate kao "voštane" imaju isključivo amilopektin jer sadrže "voštane gene". Postoje i tzv. amilo-kukuruz koji sadrži 50-80% amiloze. Različiti odnosi amiloze i amilopektina

su pod genetičkom kontrolom i utiču na fizičko-hemijske osobine skrobnih zrna. Skrobnia zrna sa manje amiloze imaju amorfnu, a sa više kristalnu strukturu.

U biljkama se skrob nalazi pretežno u obliku skrobnih zrna u kojima je njegova količina uslovljena biljnom vrstom (tabela 7-2).

Tabela 7-2.

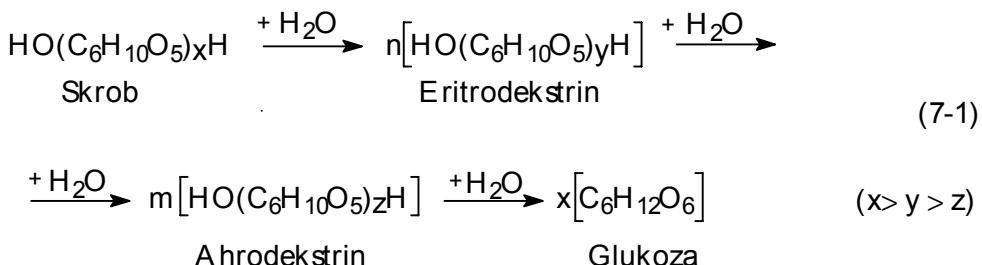
Sadržaj skroba u nekim ratarsko-povrtarskim kulturama.

Biljna vrsta	Sadržaj skroba (%)
Pšenica	75
Raž	60
Ječam	55-72
Kukuruz	70-80
Pirinač	80
Sirak	51-81
Krompir	14-42
Grašak	34-48

U listovima se nalazi samo onda kada su oni izloženi svetlosti jer u mraku biva hidrolizovan enzimima u rastvorne ugljene hidrate. Veće količine skroba se mogu naći u zelenom voću u kojem se u toku sazrevanja pretvara u saharozu.

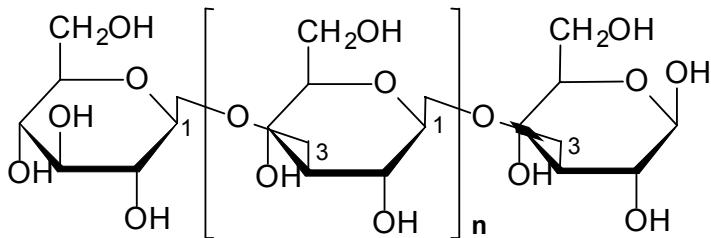
Kratkotrajnim zagrevanjem usitnjenoj skroba raspadaju se njegovi gigantski molekuli i gradi se smeša prostih

polisaharida manje molekulske mase koji se nazivaju *dekstrinima*. Hidroliza skroba u dekstrine i dalje se obavlja po shemi dатој jednačinom 7-1.



Skrob se industrijski proizvodi iz pšenice, kukuruza i raži i našao je višestruku primenu u prehrambenoj industriji. Totalna hidroliza skroba se može izvršiti imobilizacijom tri enzima i to  $\alpha$ -amilaze,  $\beta$ -amilaze i  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glukozidaze.

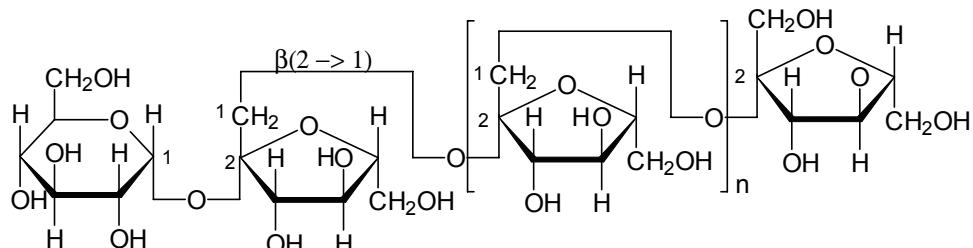
**$\beta$ -1,3-Kaloza** - je homomerni polisaharid sitastih cevčica biljaka. Izgradjena je iz oko 100 ostataka  $\beta$ -D-glukopiranote povezanih  $\beta(1 \rightarrow 3)$  glikozidnim vezama (slika 7-42).



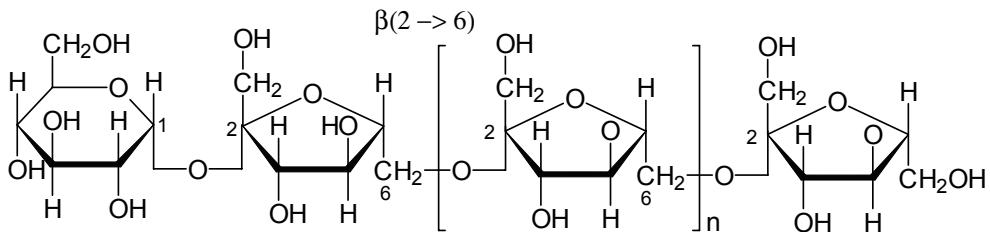
Slika 7-42. Struktura kaloze  $\beta(1 \rightarrow 3)$ .

**Fitoglukani** - su rezervni homopolisaharidi koji imaju veći stepen račvanja od amilopektina jer imaju više  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glikozidnih veza (10%, a amilopektin samo 5%). Nalaze se u kukuruzu i nazivaju se *fitoglukani*. Njegova hidroliza je pored amilazama katalizovana i izoamilazom (fitoglukan-6-glukanohidrolaza; EC 3.2.1.68) koja katalizuje hidrolizu  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glikozidne veze.

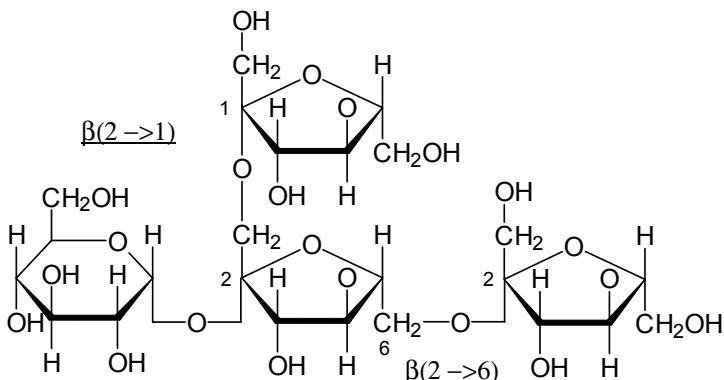
**Fruktani** - su pored skroba i saharoze najzastupljeniji rezervni ugljeni hidrati u biljkama. Polimeri familije fruktana se nakupljaju u korenju, stablu, semenu ili lukovici brojnih biljnih vrsta između ostalog u familijama *Alliaceae*, *Liliaceae*, *Gramineae* i *Compositae*. Fruktani su takođe zastupljeni i u velikom broju gljiva i bakterija. Fruktani su linearni ili razgranati polimeri  $\beta$ -D-fruktofuranosil-furanoze nastali njihovim povezivanjem sa  $\beta(2 \rightarrow 1)$  ili  $\beta(2 \rightarrow 6)$  glikozidnim vezama. U biljkama ova grupa obuhvata oligosaharide i polisaharide sa stepenom polimerizacije 3-6 u *kestonskom*, kao i polisaharide sa dužim lancima i većim stepenom polimerizacije oko 50 u *inulinskom* ili oko 200 u *levanskom* tipu polisaharida. U biljnoj ćeliji fruktani se nakupljaju u vakuolama i obično su nađeni kao smeša lanaca različitih dužina, zavisno od njihove biohemijske funkcije. Strukture navedenih tipova fruktana su date na slici 7-43a; b i c.



(a) Inulinski tip (linearan lanac inulina;  $n=20-30$ )



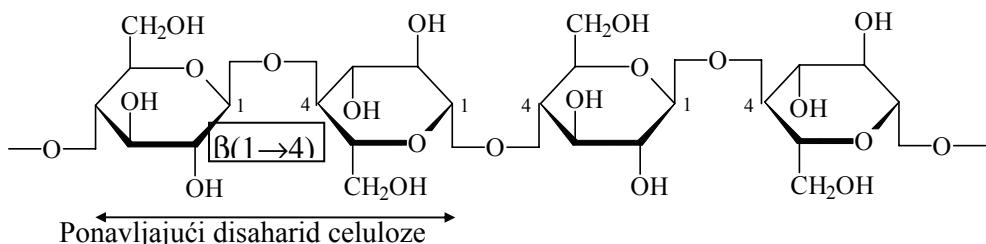
(b) Levanski tip (linearan lanac fleina; n=200)



(c) Kestonski tip (razgranat lanac tetrasaharida - bifukoze)

Slika 7-43. Strukture inulina (a), fleina (b) i bifukoze (c).

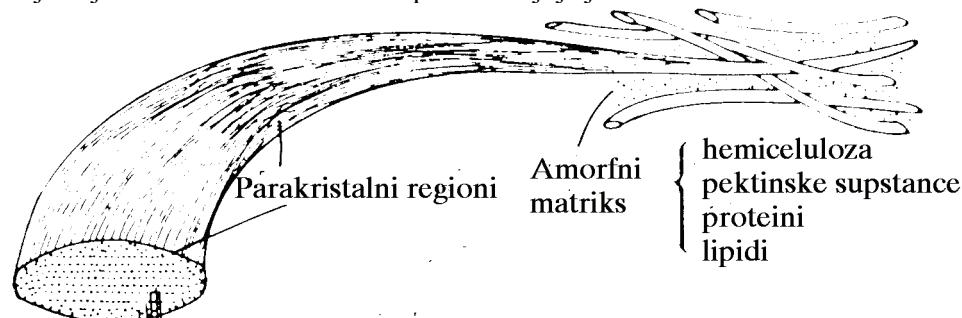
**Celuloza** - je najrasprostranjeniji strukturni polisaharid biljaka jer se godišnje biosintetizuje oko 100 biliona tona ovog jedinjenja. Smatra se da se i do 50% ukupno vezanog CO<sub>2</sub> fotosintezom iz atmosfere ugradjuje u celulozu. Po hemijskom sastavu je linearni polimer β-D-glukopiranoze koji nastaje povezivanjem glukoze β(1→4) glikozidnim vezama. Molekuli celuloze imaju linearni oblik jer su izgradjeni iz glukoznih jedinica povezanih u lance dužine oko 7μ (1μ = 1/100 nm). Slična je skrobu jer je homopolisaharid β-D-glukoze (8.000-72.000 glukozil-ostataka, Mr 1.3-2•10<sup>6</sup>) u kojem su zastupljene β(1→4) glikozidne veze (slika 7-44).



Slika 7-44. Fragment strukture celuloze.

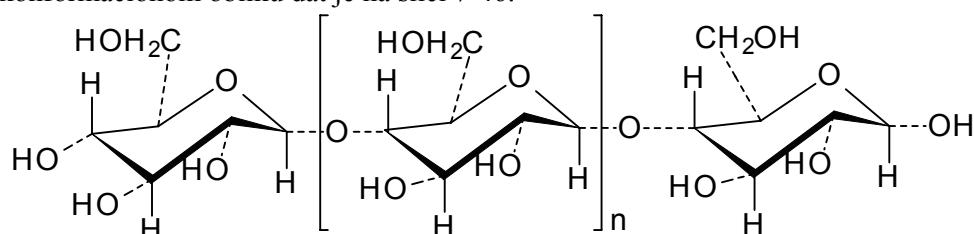
(**Celobioza** je ponavljanjući disaharid).

Male izmene u konfiguraciji glikozidne veze su odgovorne za fizička i hemijska svojstva celuloze. Lanci monomera su nerazgranati, a geometrija  $\beta$ -veza omogućava razvučenu konfiguraciju. Paralelni molekuli se povezuju međusobno H-vezama i grade nerastvorne fibrile. Celuloza je u biljnim tkivima prisutna u obliku *mikrofibrila* koje su izgradjene iz paralelnih lanaca celuloze međusobno povezanih vodoničnim vezama. Najveći deo celuloznog vlakna je izgradjen iz paralelnih lanaca te je nazvan *kristalnim regionom*. On je na određenim mestima ispresecan *amorfnim regionima* u kojima su celulozna vlakna umotana bez reda. Amorfni regioni su značajniji deo u celuloznom vlaknu jer mu daju elastičnost. Celuloza se u najčistijem obliku nalazi u vlaknu pamuka čiji je jedan deo dat na slici 7-45.



Slika 7-45. Kristalni i amorfni regioni celuloze u mikrofibrili.

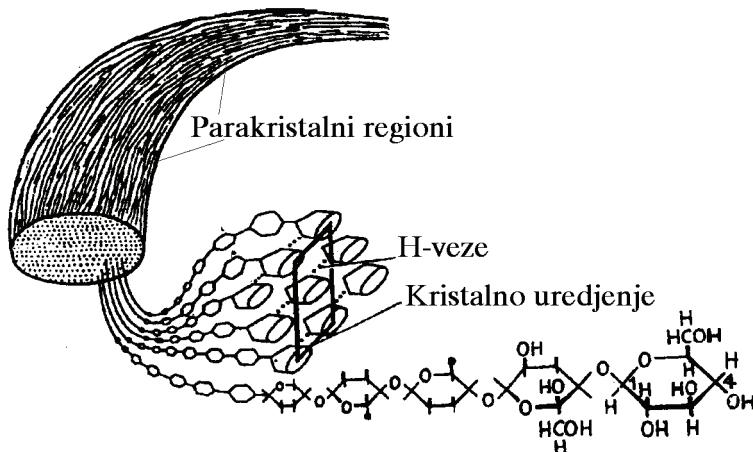
Enzimi **celulaze** (kompleks dva enzima - Endoglukonaza; EC 3.2.1.4 i Egzoglukonaza; EC 3.2.1.74) hidrolizuju celulozu u disaharid *celobiozu*, a koncentrovane mineralne kiseline (kao npr. 40% HCl i 70%  $H_2SO_4$ ) uz zagrevanje do D-glukoze. Celuloza se razlikuje od skroba po tome što se njen monomer D-glukoza nalazi u konformaciji stolice. Deo celuloznog vlakna prikazan u konformacionom obliku dat je na slici 7-46.



Slika 7-46. Molekul celuloze u svom konformacionom obliku.

Celulozna vlakna su u biljkama "uronjena" u ligninski matriks koji služi kao "cement" za slepljivanje fibrila celuloze te im daje određenu čvrstinu (zbog koje stoljetna stabla imaju snagu da drže krošnje drveća). Količina lignina se povećava starenjem biljaka te su njihova stabla, stabljike pa i listovi manje elastični

i krhkiji u odnosu na mladu biljku. Niti celuloze u ligninskom matriksu date su na slici 7-47.



Slika 7-47. Niti celuloze uronjene u ligninski matriks.

Najbogatiji u celulozi su papirus (90%), stabla drveća (50-70%), a zatim slama i kukuruzovina (30-40%) i na kraju listovi biljaka (15-30%). Čista celuloza se nalazi u ćelijskim zidovima pamučnih dlačica (vrste *Gossipium*).

Gusto zbijena vlakna celuloze opkoljavaju ćelije biljaka u pravilnom rasporedu. Šezdeset do 70 molekula celuloze čine micerle koje imaju mrežastu strukturu uronjenu u matriks pektina, proteina i lipida. Kao sastojak ćelijskog zida celuloza ima više funkcija i to:

- ◆ omogućava ćeliji da izdrži ekstremne hipertonične i hipotonične uslove,
- ◆ daje ćeliji čvrstinu i time omogućavada da udružene ćelije u stablima izdrže težine stoljetnih krošnji i
- ◆ igra značajnu ulogu u patogenezi kao fizička barijera patogenima itd.

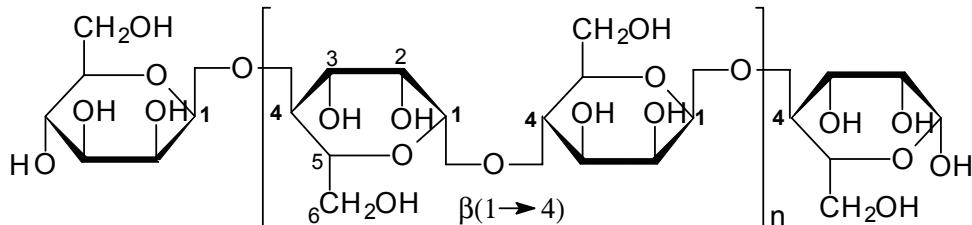
Celuloza je veoma značajno komercijalno jedinjenje jer služi kao sirovina za proizvodnju hartije, veštačkih vlakana, veštačke kože, eksploziva, celofana, alkohola i dr. Veoma značajna je sirovina u biotehnologiji gde se imobiliziranim enzimima pretvara u glukozu.

### 7.3.2. Heteropolisaharidi

Poliosaharidi izgradjeni iz strukturno različitih monosaharidnih jedinica, specifičnih osobina i biohemičkih funkcija nazivaju se polisaharidi. Tipičan predstavnik ove grupe prirodnih polimera kod biljaka je hemiceluloza.

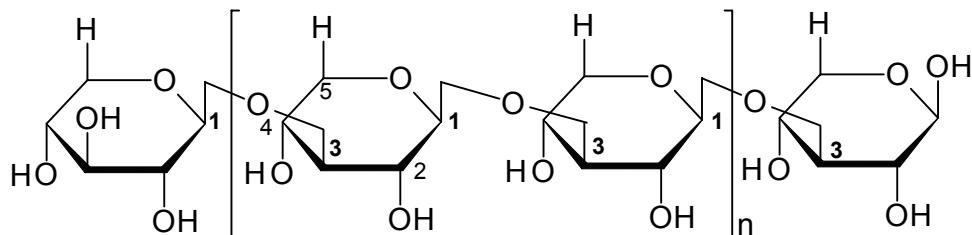
**Hemiceluloza** - je visokomolekulski, obično razgranat, heteropolisa-harid biljaka izgradjen pretežno od D-ksiloze, D-manoze, D-glukoze, D-arabinoze, D-galaktoze i uronskih kiselina. U njemu su heksoze i pentoze medjusobno povezane  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidnim vezama. Ne rastvara se u vodi već samo u razblaženim alklijama. U prostoru može da zauzima oblik uzvojnica. Nalazi se u matriksu ćelijskih zidova semena, slame, kukuruzovine, drveta i može imati funkciju rezervnog polisaharida ili struktornog ukoliko se nalazi u kukuruzovini ili slami. U biljkama se hemiceluloza nalazi u četiri strukturalna oblika i to: - *ksilana, manana, arabana i galaktana*.

**$\beta$ -1,4-Manani** - su glavni necelulozni heksozani biljaka rasprostranjeni u obliku *gluko-* i *galaktomanana*. Izgradjeni su od 200-400 monomernih jedinica manoze medjusobno povezanih  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidnom vezom u obliku linearnih lanaca (slika 7-48). Nalaze se u ćelijskim zidovima cerealja i trava (lišću, semenu, i lignificiranim delovima biljaka). U obliku *gluko-* i *galaktomanana* su rasprostranjeni u gomoljima biljaka i semenu leguminoza.



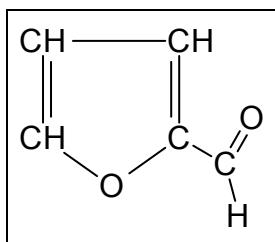
Slika 7-48. Struktura  $\beta$ -1,4-manana.

**$\beta$ -1,3-Ksilani** - su visokomolekularni pentozani čija je monomerna jedinica  $\beta$ -D-ksilopiranza. Njihovi molekuli su linearni i slabo razgranati. Ksiloza u njima je povezana  $\beta(1 \rightarrow 3)$  -glikozidnim vezama. Molekuli ksilana su obično izgradjeni iz 50-200 ostataka ksiloze. Struktura molekula ksilana je data na slici 7-49.



Slika 7-49. Struktura  $\beta$ -1,3-ksilana.

Slama je najbogatija u ksilanima (27%). U nekim biljkama za bočni niz ksilana se mogu vezati i druge pentoze kao npr. u pšenici i raži.

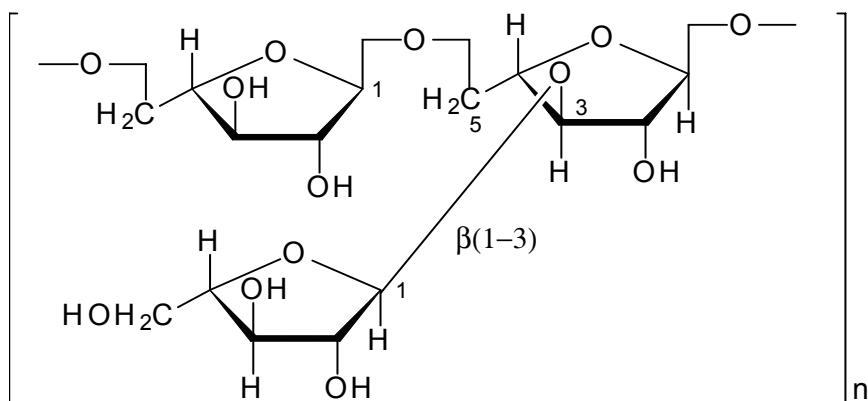


Hidrolizom ksilana pored ksiloze dobija se i arabinosa. Zagrevanjem ksilana do ključanja sa 12-14% HCl gradi se furfrol (slika 7-50).

Slika 7-50. Struktura furfurola.

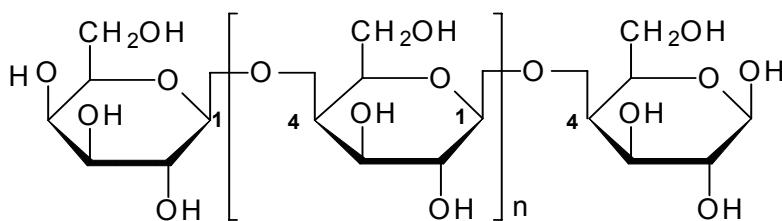
Neki put u sastav hemiceluloze ulaze i uronske kiseline. Tako npr. slama od pšenice sadrži hemicelulozu izgradjenu od uronske kiseline, arabinoze i ksiloze u odnosu 1:1:23. šepurika od kukuruza sadrži 5.1% hemiceluloze koja se sastoji iz 6.2% glukuronske kiseline i 93.8% ksiloze. Ostaci uronske kiseline u hemicelulozi se nalaze obično kao metilesteri.

**$\beta$ -1,5- i  $\beta$ -1,3-Arabani** - su visokomolekularni razgranati polisaharidi izgradjeni od molekula arabinoze medjusobno povezanih  $\beta$ -1,5 i  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama. U biljkama se nalaze kao sastojci hemiceluloze. Deo molekula arabana dat je na slici 7-51).



Slika 7-51. Struktura dela molekula arabana.

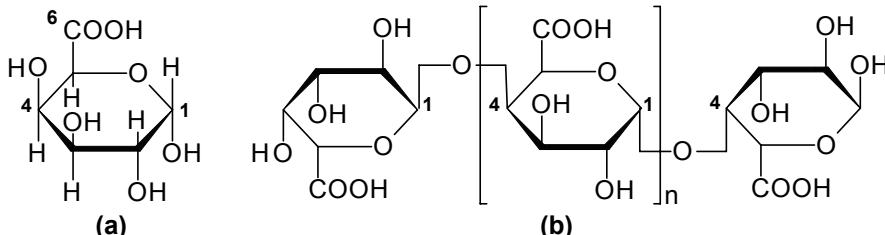
**$\alpha$ -1,4-Galaktani** - su polimeri  $\alpha$ -D-galaktoze. Nalaze se u slami, semenu i drvenastim delovima biljaka. Nastaju povezivanjem galaktoze  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Struktura  $\alpha$ -1,4-galaktana data je na slici 7-52.



Slika 7-52  
 $\alpha$ -1,4-galaktan

**Pektini** - su visokomolekularni poliurinidi koji nastaju povezivanjem molekula D-galakturonske kiseline  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Veći broj

karboksilnih grupa esterifikovan je metil-grupama. Pektini koji imaju niži stepen esterifikacije nazivaju se *pektinskim kiselinama*. Struktura galakturonske i dela pektinske kiseline date su na slici 7-53.



Slika 7-53. Strukture galakturonske kiseline (a) i pektinske kiseline (b).

Biljke sintetizuju pektine koji se medjusobno razlikuju u stepenu polimerizacije i vrsti esterifikacije. Vrlo često su udruženi sa celulozom. Deluju kao cement za celulozu i služe kao potporni materijal u srednjoj lameli i primarnom ćelijskom zidu.

Pektinske kiseline su sastojci ćelijskih zidova mladih biljaka i u većim količinama se nalaze u mladim plodovima u kojima lako vezuju vodu i grade *gele*. Sličnu osobinu imaju i pektini koji su na određenim pH vrednostima jaki želirajući agensi te su našli primenu u prehrambenoj industriji, kozmetici i farmaceutskoj industriji.

Hidroliza pektina se može obaviti razblaženim kiselinama i enzimom *pektinazom*. Proizvod reakcije su slobodne pektinske kiseline i metilalkohol. Pektinska kiselina sa metalima (Ca, Mg, i Fe) gradi soli *pektate* od kojih se kalcijumove soli izdvajaju u obliku taloga. Pektati u biljkama imaju funkciju "cementa" koji povezuju biljne ćelije.

Biljke sadrže i tzv. *pektinske supstance* - polisaharide koji su smeša galaktana, arabana i galakturonske kiseline. Oni su sastojci srednje lamele i ćelijskog zida kao i sokova nekih biljaka.

Pektinske supstance primarnog i sekundarnog ćelijskog zida su protopektini. U njima je karboksilna grupa galakturonske kiseline esterifikovana u većoj količini od pektinskih supstanci srednje lamele.

Pektinske materije imaju značajnu ulogu pri sazrevanju, skladištenju i u industrijskoj preradi plodova i voća. Kada se plod razvija protopektin se skladišti u ćelijskim zidovima i može se sakupljati u značajnim količinama u plodovima jabuka, krušaka, limuna, grožđa, cvekla, mrkve od 0.3-3.0%, zeljastom bilju od 0.1-0.3% i drvenastom bilju oko 0.1%. U biljkama su pektinske materije značajne za transport i izmenu jonova (jer služe kao jonoizmenjivači), vezivanje vode (štite ih od sušenja), a služe i kao lepak za biljne ćelije. U šećernoj repi se nalazi i do 2-5% pektina..

**Biljne gume** - su heteropolisaharidi koje luče drvenasti delovi biljaka posle povrede spoljnog epitela i ljuštenja kore i tako štite biljke od infekcije i dehidratacije. Izgradjene su od monosaharida i njihovih derivata kao npr. nekih

pentoza i metilpentoza, galakturonske kiseline, uronskih kiselina i sl. Tipični predstavnici biljnih guma su gume šljivinog i breskvinog drveta, kao i tropskih i suptropskih biljaka

**Biljne sluzi** - su heteropolisaharidi koji su 90% izgradjeni od monosaharida pentoza, galaktoze i uronske kiseline sa značajnim udelom proteina i celuloze. Najviše biljne sluzi ima u lanenom i raženom zrnu kao i semenu koje klija.

## 7.4. Funkcija ugljenih hidrata u biljkama i primena

Ugljeni hidrati su akumulatori i donatori energije u biljkama i disajni materijal jer se njihovim razlaganjem dobija energija neophodna za održavanje života i biosinteze drugih jedinjenja. Ugljeni hidrati se zato s pravom nazivaju i molekulima života.

Glukoza i fruktoza imaju funkcije monomera u sintezi saharoze u listovima biljaka. Eksperimentalno je dokazano da se u klicama ječma u nedostatku glukoze može sintetizovati saharozu i iz drugih monosaharida kao npr. manoze, galaktoze, maltoze i gliceraldehida, ali ne iz arabinoze i ksiloze. Napred navedeno je moguće jer biljke poseduju odgovarajuće enzimske sisteme koji pretvaraju jedan monosaharid u drugi preko njihovih fosfatnih estara. Iz fosfatnih estara se u reakcijama katalizovanim *supstrat-specifičnim fosfatazama* dobijaju slobodni monosaharidi. Saharozu je pogodan transportni oblik ugljenih hidrata. Ako se skrob nakupi u listovima u toku fotosinteze on se brzo razlaže do glukoze koja se prenosi iz lista u seme, krtole i lukovice gde se ponovo pretvara u skrob ili inulin. Saharozu u meristemskim tkivima služi za sintezu strukturnih polisaharida.

Celuloza ima veliki komercijalni značaj i to posebno u proizvodni tekstila i hartije. Osim toga primenu su našli i razni derivati celuloze kao npr. acetat-celuloza (za proizvodnju filmova, maziva i dr.), trinitrat-celuloza (za proizvodnju baruta), karboksimetil-celuloza (kao sredstvo za pranje koje štiti tkanine). Pamučna poliestarska vlakna se proizvode pomoću rasta sintetičkih polimera na celuloznim lancima pri čemu se grade poprečno-vezani molekuli. Pektini kao visokomolekularni poliuridini su našli primenu kao želirajući agensi u prehrambenoj industriji, u industrijskoj obradi prirodnih vlakana naročito lana i dr.

Biljne gume su od komercijalnog značaja kao emulgatori u prehrambenoj industriji.

## Izvod

♣ Ugljeni hidrati su aldehidni i ketonski derivati polihidroksilnih alkohola ili jedinjenja koja hidrolizom daju ova jedinjenja.

♣ Ugljeni hidrati spadaju u grupu najrasprostranjenijih biomolekula biljaka, a prema složenosti se dele na monosaharide, disaharide i oligosaharide i polisaharide.

♣ Monosaharidi su prosti šećeri. U biljkama su zastupljeni samo D-monosaharidi. Najrasprostranjenije su pentoze (ksiloza, arabinoza, riboza, ribuloza, i apioza) i heksoze (glukoza, ramnoza, fruktoza, manoza, galaktoza, altroza i taloza). Biljke sadrže i čitav niz derivata monosaharida kao npr. deoksišećere, poliole, šećerne kiseline, estre monosaharida, aminošećere itd. Monosaharidi su značajni kao supstrati u reakcijama u kojima se stvara energija, pa se stoga smatraju osnovnim izvorima energije u biljnoj ćeliji. Neki od njih kao riboza i deoksiriboza izgradjuju strukture nukleinskih kiselina (DNA i RNA) često zvanim i programerima života.

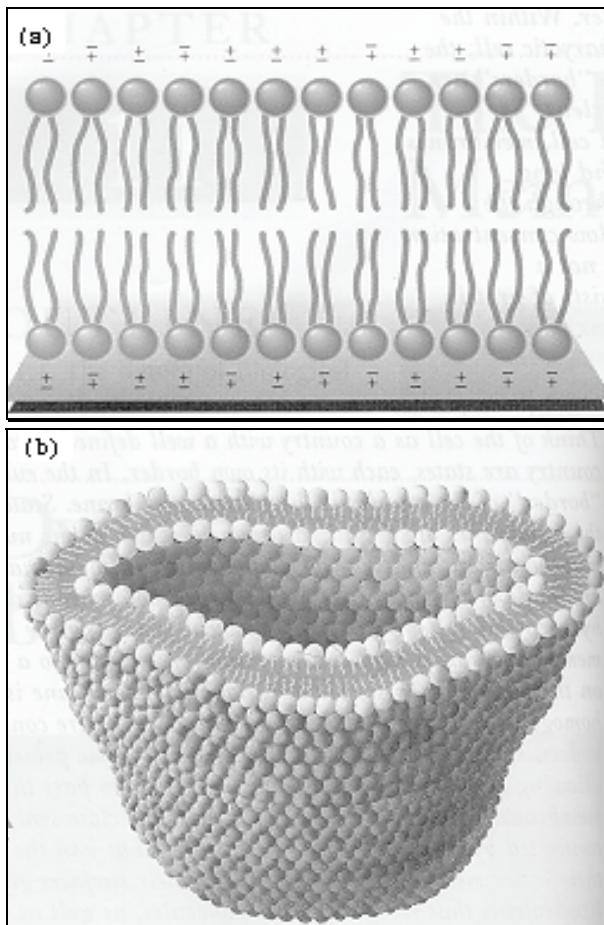
♣ Disaharidi i oligosaharidi su glikozidi izgradjeni iz dva ili više (najviše 10) istih ili različitih monosaharida. U biljkama od disaharida su rasprostranjeni maltoza, celobioza, gentianoza, melibioza i saharoza, od trisaharida rafinoza i gentianoza, a od tetrasaharida stahioza.

♣ Prosti šećeri su rastvorljivi u vodi, a medjusobno se razlikuju u stepenu slasti koji se određuje u odnosu na saharuzu. Oni su važni supstrati i intermedijeri u brojnim reakcijama metabolizma. Estri monosaharida sa fosfornom kiselinom, kao npr. glukoza-6-fosfat, fosfoenol-piruvat i dr. u mnogim reakcijama metabolizma imaju ulogu energetskih jedinjenja, jer hidrolizom makroenergetskih veza (estarska, pirofosfatna i dr.) oslobadaju energiju u obliku sinteze ATP.

♣ Polisaharidi su polimeri monosaharida i njihovih derivata. Od polisaharida biljke sadrže skrob, kalozu, fitoglukane, fruktane (inulin i flein), celulozu, hemicelulozu (ksilane, manane, arabane i galaktane), pektine, biljne gume i sluzi i dr. Dve su najvažnije funkcije ovih polimera u biljci - *prva* je da su to rezervni izvori hrane i energije, a *druga* da su to strukturni elementi ćelijskih membrana.

♣ Svi navedeni šećeri imaju odredjenu funkciju u biljci, a većina je našla i primenu u industriji.

## 8. Lipidi



- 8.1. Biljne masne kiseline**
- 8.2. Membranski lipidii**
- 8.3. Rezervni lipidi**
  - 8.3.1. Neuobičajene masne kiseline u rezervnrvnim lipidima biljaka
- 8.4. Kutini, suberini i voskovi**
  - 8.4.1. Površinski prekrivači
  - 8.4.2. Hemski sastav površinskih prekrivača
- 8.5. Analiza biljnih lipida**
- 8.6. Lipidi kao micle i bislojevi**
- 8.7. Funkcija lipida u biljkama i primena**

*Fosfolipidni dvoslojćelijske membrane (a); poprečni presek (b)*

Interes za biljnim lipidima javlja se u prvoj polovini 20-og veka kada su kod životinja na dijet ishrani biljnim lipidima primećeni simptomi izazvani nedostatkom bitnih (esencijalnih) masnih kiselina. Desilo se kasnije da su "esencijalne" strukture, u ishrani bile obezbeđene biljnim lipidima i karakterisane kao polinezasičene masne kiseline sa duplim vezama na 6 i 9 C-atomu od terminalne metil grupe. Pokazalo se da ove strukture ne mogu sintetizovati životinje i da imaju značajne uloge u zdravlju individua.

Od tog vremena, interes za biljnim lipidima je rastao, naročito danas kada su nezaobilazni u mnogim granama industrije, kao osnova za deterdžente, najlon i kozmetičke preparate, kao visoko stabilna maziva, a od skora i kao obnovljivi izvori energije. Tako danas ima pokušaja da se primenom savremenih metoda molekularne biologije utiče na kvalitet ulja i njegov prinos kod uljnih kultura. Osim toga, lipidi biljnih membrana prema novim saznanjima deluju na različite regulatore rasta i meta su za neke važne klase herbicida.

## 8.1. Biljne masne kiseline

Najzastupljeniji lipidi u biljkama su acil-lipidi. To su lipidi biljnih membrana (fosfogliceridi i glikozilgliceridi) i rezervni (skladišni) lipidi (triacilgliceroli). Svi oni imaju masne kiseline dugog niza estarski vezane za glicerol.

Mada je do danas iz biljaka izolovano oko 300 masnih kiselina, samo manji broj izgrađuje strukture napred pomenutih acil-lipida (tabela 8-1). Zasićene masne kiseline su uvek nepromenjenog parnog broja C-atoma zbog njihovog puta sinteze (sekcija 12). Dakle, zbog prirode sinteze u biljkama su najviše zastupljene one sa C-16 i C-18 u nizu (palmitinska i stearinska). Većina biljaka sadrži signifikantnu, mada neznatnu, količinu miristinske kiseline, a samo neke važne kulture sadrže velike količine masnih kiselina sa ugljovodoničnim nizom srednje dužine kao što su kaprinska (C-10) i laurinska (C-12) (tabela 8-2). Ove poslednje su bitne u proizvodnji deterdženata i kozmetičkoj industriji, a kod pacijenata sa digestitivnim poremećajima obezbeđuju laku apsorpciju lipida. S druge strane, lipidi sa visokim sadržajem stearata kao što je kokosov maslac, čiji je sastav bitno odrediti, doprinose jedinstvenoj osobini u proizvodnji čokolade.

Zbog toga što su biljke poikiloterme (organizmi koji ne regulišu sopstvenu temperaturu) one sadrže membranske lipide sa topljivim osobinama tako da mogu biti fluidni (tečni) zavisno od uslova spoljašnje sredine. U stvari, ovi lipidi sadrže znatan procenat nezasićenih masnih kiselina, koje zbog uvođenja *cis*-duple veze u acil-lanac dramatično utiču na "temperaturni prelaz" (T<sub>t</sub>), što se može ilustrovati primerom (stearinska kiselina ima T<sub>t</sub> = 70°C, a oleinska T<sub>t</sub> = 16°C).

Tabela 8-1. Masne kiseline obično prisutne u biljkama.

Masne kiseline	Uobičajeno ime	Sistematsko ime kiseline	Nalaženje
Z a s i ć e n e	Laurinska (12:0) Miristinska (14:0) Palmitinska (16:0) Stearinska (18:0) Arahidska (20:0)	Dodekanska Tetradekanska Heksadekanska Oktadekanska Dekadekanska	Obično u tragu Obično u tragu Uobičajena Uobičajena U maloj količini
N e z a s i ć e n e	Palmitoleinska (16:1 <sup>Δ9</sup> ) Oleinska (18:1 <sup>Δ9</sup> ) Linolna (18:2 <sup>Δ9,12</sup> ) Linolenska (18:3 <sup>Δ9,12,15</sup> ) Arahidonska (20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup> )	9-heksadekanska 9-oktadekanska 9,12-oktadekadienska 9,12,15-oktadekatrienska 5,8,11,14-dekadekataetraenska	Obično u tragu Uobičajena Uobičajena Najzastupljenija Uobičajena

Oleinska kiselina je uobičajena (u smislu nalaženja) mononezasićena masna kiselina pošto se polinezasićene masne kiseline linolna i -linolenska nalaze široko prisutne naročito u membranskim lipidima. Praktično sve biljne nezasićene masne kiseline imaju duplu vezu *cis*-konfiguracije, a kod polinezasićenih one su razdvojene metilenskom grupom ( $\text{CH}_2$ ).

Tabela 8-2. Sastav masnih kiselina u nekim bitnim uljaricama.

Biljna vrsta	Sastav masnih kiselina (% ukupno)					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Druge
Avokado	20	1	60	18	0	1
Zrno ricinus	1	1	3	4	u tragu	91
Kakao	27	34	35	3	u tragu	1
Kokos	9	2	7	2	0	80
Kukuruz	14	2	30	50	2	2
Laneno ulje	6	3	17	14	60	u tragu
Maslinovo ulje	12	2	72	11	1	2
Repica	4	1	54	23	10	8
Soja	11	4	22	53	8	2
Suncokret	6	5	19	68	u tragu	2
Palmino ulje	9	3	15	2	0	71

U ricinusovom ulju 90%ukupnih masnih kiselina čini ricinoleinska kiselina (12-hidroksioktadekensa), u kokosovom ulju masne kiseline srednje dužine lanca (8-14 C) čine 79%, dok u palminom ulju masne kiseline srednje dužine lanca čine 71% od čega dominantno mesto zauzima laurinska kiselina (12:0) sa 45%.

Nezasićene masne kiseline mogu se podeliti na osnovu lokalizacije zadnje dvogube veze u lancu. Ona se nalazi na 3, 6 ili 9 C-atomu polazeći od kraja lancu. Zbog toga se nazivaju  $\omega$ -3 (tj. 18:3,  $\Delta^{9,12,15}$ ),  $\omega$ -6 (tj. 18:2,  $\Delta^{9,12}$ ) ili  $\omega$ -9 (tj. 18:1,  $\Delta^9$ ). I linolna i arahidonska kiselina pripadaju grupi  $\omega$ -6.

Značajno je napomenuti da je sadržaj masnih kiselina u listu različitih biljnih vrsta konstantan, kao i da su lipidi uglavnom komponente membrana (tabela 8-3). Ovo je očigledno u suprotnosti sa sastavom masnih kiselina u semenu, gde ne samo da su procenti pojedinačnih masnih kiselina varijabilni, već i neobične komponente mogu biti glavni konstituenti (tabela 8-2). Ovo nesumnjivo ima veze sa funkcijom lipida kao membranskih ili rezervnih molekula. U membranama oni su neobično važni za strukturu i osobine membrane, zbog čega je neophodno njihov sastav i sadržaj učiniti stabilnim. Suprotно, kao izvori energije važno je da se mogu lako skladištiti i razlagati po potrebi degradativnim enzimima.

Tabela 8-3. Sastav masnih kiselina u listovima nekih biljaka.

Biljna vrsta	Sastav masnih kiselina (% ukupno)					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Druge <sup>a</sup>
Ječam	13	6	6	64	64	11
Grašak	12	2	25	53	53	8
Repica <sup>a</sup>	13	4	16	50	50	17
Soja	12	7	14	56	56	11
Spanać <sup>a</sup>	13	5	14	54	54	14
Pšenica	18	5	15	55	55	7

<sup>a</sup> Ove vrste su tzv. "16:3 biljke" jer imaju drugačiji put metabolizma lipida u hloroplastima, koji uključuje desaturaciju palmitata u heksadekatrienoat (16:3)

## 8.2. Membranski lipidi

Glavni membranski lipidi biljaka su *glikozilgliceridi* i *fosfoglyceridi*. Svi oni u osnovi imaju trihidroksilni alkohol – *glicerol*. U membranama hloroplasta u fotosintetičkim tkivima (pošto plastidi nisu fotosintetička tkiva) glikozolgliceridi su glavne komponente. Od fosfolipida samo je signifikantan fosfatidilglicerol (tabela 8-4). Prema tome, hloroplasti su lipid-proteinske strukture i značajni su u

markiranju razlika, do praktično svake druge membrane u prirodi. Tri glikozilglicerida su dominantna u molekulskoj strukturi membranskih lipida. Njihove strukture uobičajeno i hemijsko ime su pokazane na slici 8-1.

Tabela 8-4. Sastav lipida u membranama hloroplasta.

Biljni lipidi	Ukupni lipidi(%)	Sastav masnih kiselina (% ukupno)					
		16:0	16:3	18:1	18:2	18:3	Druge <sup>a</sup>
<b>Grašak</b>							
MGDG	42	4	-	1	3	90	2
DGDG	31	9	-	3	7	78	3
SQDG	11	32	-	2	15	58	3
PG	12	18	-	2	11	38	31
<b>Spanać</b>							
MGDG	41	u tragu	25	1	2	72	u tragu
DGDG	29	3	5	2	2	87	1
SQDG	16	39	-	1	7	53	u tragu
PG	12	11	-	2	4	47	36

<sup>a</sup> Uključuje 27% *trans*-heksadekenoata u fosfatidilglicerolu graška i 32% *trans*-heksadekenoata u fosfatidilglicerolu spanaća. Skraćene oznake: MGDG=mono-galaktozil-diacilglicerol; DGDG=digalaktozil-diacilglicerol; SQDG=sulfohinovozil-diacilglicerol; PG=fosfatidilglicerol.

Dva galaktolipida (monogalaktozil-diacilglicerol i digalaktozil-diacilglicerol) ne nose naboј mada su njihove ugljenohidratne grupe (glave) polare. Ovi molekuli obično karakterišu membranske lipide. Kod ovih galaktolipida jedan deo molekula (rep) je nepolaran (hidrofoban) i orijentije se tako da je uronjen u membranu hloroplasta, dok je drugi deo (glava) polaran (hidrofilan) i strši na površini membrane, zbog čega kažemo da su ćelijske membrane trodimenzionalne strukture. Treći glikozilglicerid (biljni sulfolipid) nosi pun negativan naboј na fiziološkom pH. Stoga u hloroplastima se lako povezuje sa pozitivno nabijenim grupama u proteinima i/ili se štite u vodi rastvornim katjonima.

Biljke sadrže i nekoliko tipičnih fosfoglicerida (slika 8-2) kao i životinje, ali u nešto drugačijem odnosu. Fosfatidilglicerol, koji je samo neznatna komponenta u životinjama, glavni je lipid u fotosintetičkim membranama. U ekstrahloroplastnim membranama (membrane mitohondrija, peroksizoma glioksizoma idr.) najzastupljeniji su fosfatidil-holin i fosfatidiletanolamin (tabela 8-5).

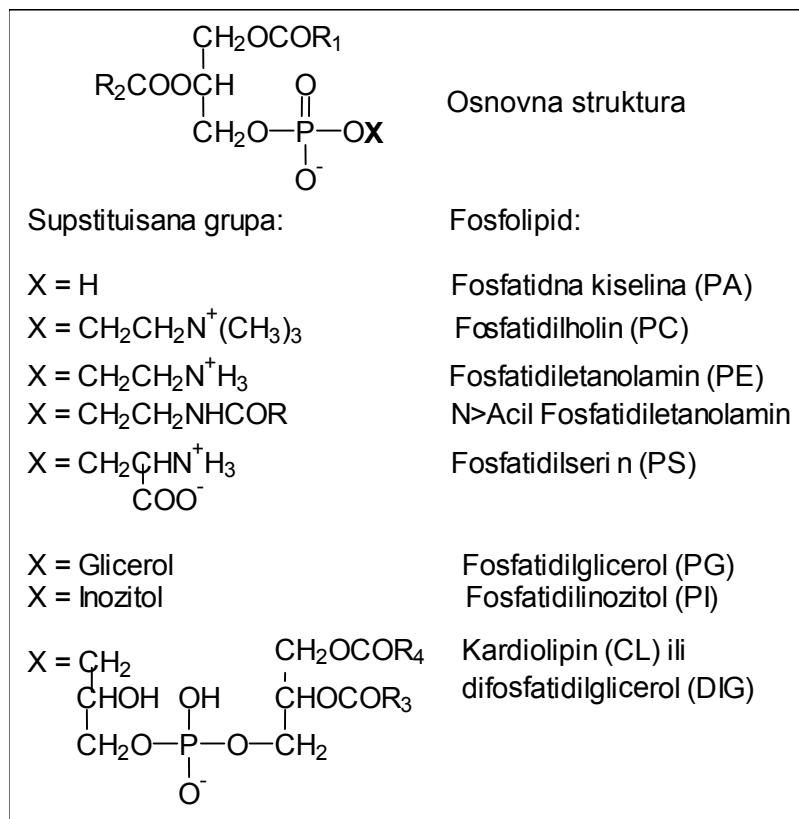
Uobičajeno ime	Struktura i hemijsko ime	
(I) Monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG)	 1,2-diacil-[ $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1'-3)]-sn-glicerol (I)	 1,2-diacil-[6-sulfo- $\alpha$ -D-hinovopiranozil-(1'-3)]-sn-glycerol (III)
(II) Digalaktozil-diacilglicerol (DGDG)		
(III) Biljni sulfolipid (sulfohinovozil-diacilglicerol; SQDG)		 1,2-diacil-[ $\alpha$ -D-galaktopiranozil-(1'-6)- $\beta$ -D-galaktopiranozil (1'-3)-sn-glicerol (II)

Slika 8-1. Strukture važnih membranskih glikozilglicerida.

Tabela 8-5. Sastav fosfoglicerida u nekim mambranama ekstrahloroplasta.

Membrane	Ukupni fosfogliceridi (%)				
	DPG	PC	PE	PG	PI+PS
<b>Endosperm ricinusova zrna</b>					
Spoljašnja mitohondrijalna	0	51	39	u tragu	10
Unutrašnja "	7	34	58	1	2
Peroksizomi	u tragu	49	31	u tragu	6+0
Glioksizomi	u tragu	51	27	3	9+1
<b>Gomolja krompira</b>					
Unutrašnja mitohondrijalna	19	33	33	5	7
Peroksizomi	-	61	20	15	4
Mikrozomi	1	45	33	2	16

DPG = difosfatidilglicerol; PC = fosfatidilholin; PE = fosfatidiletanolamin; PG = fosfatidilglicerol; PI = fosfatidilinozitol; PS = fosfatidilserin.



Slika 8-2. Strukture važnih fosfoglycerida biljaka.

Fosfatidilinozitol je takođe značajan lipid, kao i njegovi fosforilovani derivati (fosfatidilinozitol-4-fosfat i fosfatidilinozitol-4,5-difosfat) u plazma membranama gde učestvuju u transdukciji signala. Fosfatidilserin je minorna komponenta u većini membrana. Difosfatidilglicerol (kardioliipin) je lokalizovan u unutrašnjoj membrani mitohondrija.

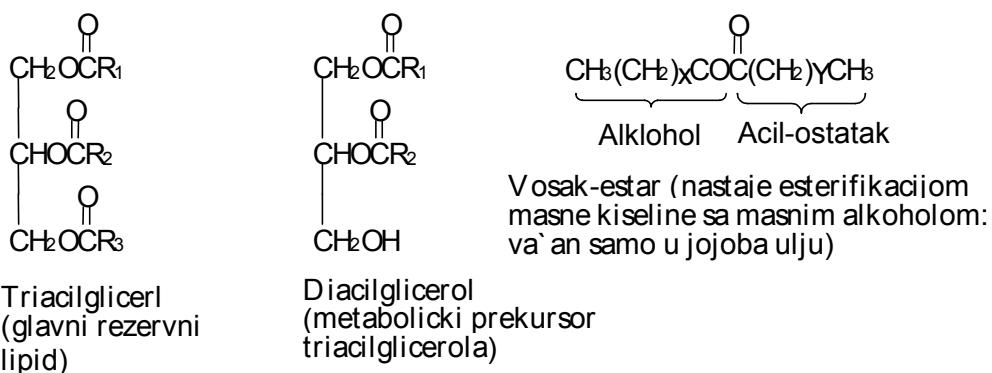
Mada su fosfoglyceridi i glikozilglyceridi daleko najvažniji membranski lipidi, u velikom broju često su prisutni i neki minorni lipidi. Tako npr. steroli i njihovi glikozil ili acil-glikozil derivati i sfingolipidi mogu biti značajni u plazma membrani.

Zato što su *sn*-1 i *sn*-2 pozicije glicerola obično esterifikovane masnim kiselinama, stvarajući tako kompleksne smeše u biljkama, tako da svaka klasa lipida sadrži različitu kombinaciju acil-ostataka masnih kiselina. Ovaj fenomen je poznat kao "molekularna vrsta" kod lipida. Odnos individualnih "molekularnih vrsta" u individualnim membranskim lipidima je pažljivo

regulisan a osim toga, poziciona distribucija naročito masnih kiselina je predmet kontrole za vreme sinteze. Upadljiva ilustracija načina regulacije sastava masnih kiselina kod četiri glavna lipida hloroplasta je pokazana u tabeli 8-4. Vidi se da je monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG) visoko nezasićen, kao i to da spanać kao "16:3 biljka" dominantno sadrži oktadekatrienoat (sve *cis* 9,12,15-18:3). Digalaktozil-diacilglicerol (DGDG) sadrži iste masne kiseline kao i MGDG, ali uvek više zasićenih, dok sulfolipidi sadrže dominantno palmitat i linoleat. Fosfatidilglicerol (PG) hloroplasta obično sadrži *trans*-Δ3-heksadekanoat (vezana isključivo na *sn*-2 poziciju glicerola). Ova masna kiselina nije nikada nađena u drugim membranskim lipidima.

### 8.3. Rezervni lipidi

Kada biljke koriste lipide kao izvore energije one uvek akumuliraju triacilglicerol. Ovaj molekul je prototip rezervnih lipida i lociran je u uljnim telašcima semena ili u obliku heterogene smeše kapljica u delu razorenog tkiva plodova avokada, masline ili palme. Pored triglycerida, u neznatnim količinama su prisutni i diacilgliceroli kao metabolički prekursori triacilglicerola (slika 8-3) zajedno sa minornim degradacionim proizvodima kao što su ne-esterifikovane masne kiseline. Suprotno uobičajenom, estri rezervnih voskova desertne biljke jojoba se koriste kao zamena za ulje tzv. glavatih uljarica u kozmetičkim proizvodima.

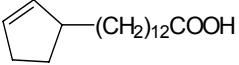


Slika 8-3. Rezervni lipidi biljaka.

### 8.3.1. Neuobičajene masne kiseline u rezervnim lipidima biljaka

Kao što je ranije napomenuto, masne kiseline u biljnog tkiva su ograničene na samo nekoliko tipova tzv. "uobičajene" masne kiseline (tabela 8-1). Ustvari, biljne membrane imaju vrlo pažljivo regulisan balans lipidnih klasa i njihovih acil-konstituenata. Ovo je simbolično pokazano tabelama 8.3 – 8.5. Međutim u nekim slučajevima biljke akumuliraju značajnu količinu "neuobičajenih" masnih kiselina i njihovih rezervnih ulja. Neki primeri za to su dati u tabeli 8-6. Mnoge od ovih neuobičajenih kiselina imaju značajnu primenu u industriji novih materijala.

Tabela 8-6. Neke neuobičajene masne kiseline biljaka.

Strukture masnih kiselina	Ime	Nalačenje
<b>Ciklicne masne kiseline:</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\overset{\text{CH}_2}{\underset{\backslash}{\text{C}}}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 	Sterkuljna Haulmogrīna	U biljkama familije <i>Malvales</i> . U plodovima tropskog drvča.
<b>Epoksi masna kiselina:</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\overset{\text{O}}{\underset{\backslash}{\text{C}}}\text{H}-\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Vernolinska	Dominantna je u ulju <i>Vernonia aethemintica</i> .
<b>Trans-masna kiselina:</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{COOH}$	Trans-heksadekenočna	Karakteristična za fosfatidilglicerol u hloroplastima.
<b>Cis-masna kiselina:</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	Petroselinska Eručna	U ulju ruke i ananasa. U ulju repice. Triterin se koristi kao mazivo.
<b>Hidroksi-masna kiselina:</b> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\overset{\text{OH}}{\underset{\backslash}{\text{CH}}}\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ricinoleinska	U ulju ricinusa.

## 8.4. Kutini, suberini i voskovi

Kutini, suberini i voskovi predstavljaju posebnu grupu lipida specifičnog hemijskog sastava i osobina. Zbog funkcije koju imaju često se jednim imenoma nazivaju površinskim prekrivačima.

### 8.4.1. Površinski prekrivači

Cela površina biljke je prekrivena zaštitnim slojem koji poseduje dvojnu funkciju da štiti od gubitka vode i sprečava prodiranje mikroorganizama u biljna tkiva. Priroda površinskih prekrivača je različita kod različitih delova biljke i dok je lišće prekriveno formiranim kutinom i voskom, koren i povređeni delovi sadrže suberin. U suštini, hemijska struktura i kompozicija voskova, kutina i suberina varira ne samo od biljke do biljke nego se menja i tokom rastenja, razvića i sazrevanja. Ipak, generalizacija može biti napravljena i to će biti razmatrano u ovom poglavlju. I kutin i suberin sadrže ekstenzivne polimerne strukture dok voskovi predstavljaju smešu slobodnih alifatičnih jedinjenja.

### 8.4.2. Hemijski sastav površinskih prekrivača

Kutikularni voskovi mogu biti lako ekstrahovani spiranjem sa neoštećenog tkiva pogodnim organskim rastvaračima poput heksana ili hloroformra. Voskovi se u biljkama takođe mogu pronaći povezani sa suberinom u kori, krtolama, korenju ili ožiljcima kao i u semenima pojedinih biljaka, naročito jojobe. Ugljovodonici (alkani) su uvek prisutni u biljnim voskovima i obično čine visok %. Alkani sa neparnim brojem ugljenikovih atoma su dominantni zbog puta njihove sinteze. Monoestri alkohola dugih lanaca i masne kiseline su pronađeni u svakoj ispitivanoj biljci (slika 12-2). Pored toga, alkoholi veoma dugih lanaca ( $C_{22}$ - $C_{34}$ ) i zasićene masne kiseline isto veoma dugih lanaca su uobičajene komponente. Ipak, udeo ovih jedinjenja može varirati od nekoliko procenata do skoro polovine ukupnog sastava voska. Od drugih jedinjenja u voskovima, ketoni i  $\beta$ -diketoni takođe mogu biti glavni konstituenti nekih voskova.

Kutin je izgrađen uglavnom od  $C_{16}$  i/ili  $C_{18}$  monomera. Hidroksi grupe monomera poput onih iz 16-hidroksipalmitinske kiseline ili iz 10,16-dihidroksipalmitinske kiseline dozvoljavaju formiranje estarskih veza i građenje poliestarske strukture.

Glavna alifatična jedinjenja suberina (u 20-50% od ukupnih uzoraka suberina) su  $\omega$ -hidroksi kiseline, odgovarajuće dikarboksilne kiseline veoma dugih lanaca ( $> C_{18}$ ) i slični dugi alkoholi. Postoji i značajna količina fenolnih jedinjenja od kojih je glavno jedinjenje p-kumarinska kiselina (videti poglavlje 16). Polimerne strukture suberina nisu dovoljno opisane ali se prepostavlja da se baziraju na fenolnom jezgru za koje su zakaćene i povezane estarskim vezama dikarboksilne i neke hidroksi masne kiseline.

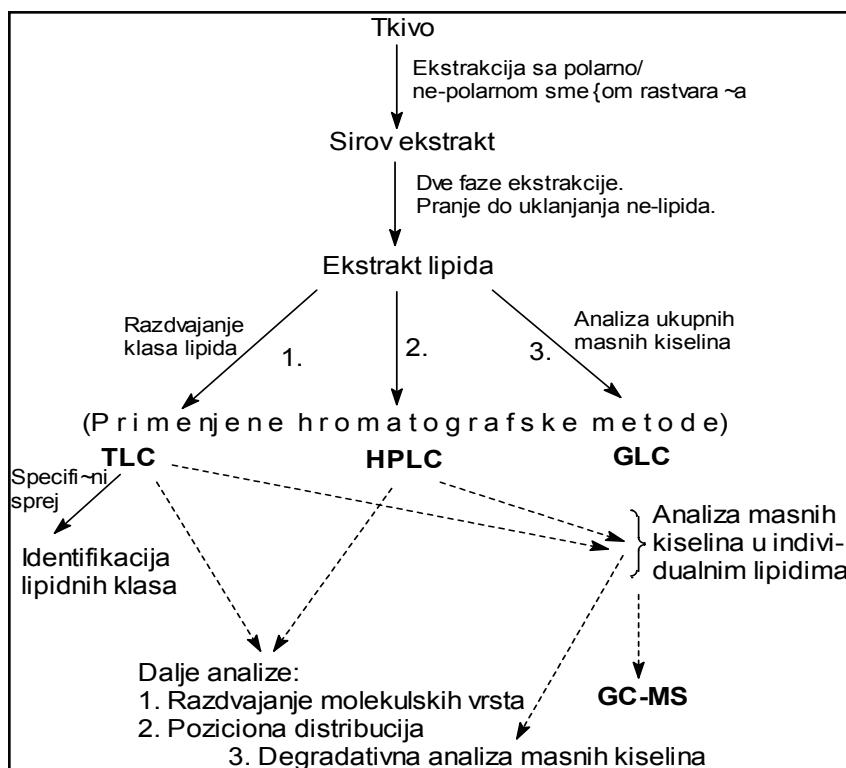
## 8.5. Analiza biljnih lipida

Analiza biljnih lipida nije samo vežba za studente – ona je pre svega bitna za vrednovanje useva u poljoprivredi u ispitivanju njihovih nutritivnih vrednosti i ekološke ispravnosti sa aspekta zdravstveno bezbedne hrane. U prilog tome ide i činjenica vezana za jedan nemio događaj koji se desio 80-tih godina ovoga veka kada je nekoliko nesavesnih pojedinaca kupilo repičino ulje sa sadržajem anilina namenjeno za industrijske svrhe. Nakon pokušaja uklanjanja anilina ulje je dospelo na tržiste. Kao posledica konzumiranja je nekoliko stotina mrtvih i nekoliko hiljada sa teškim simptomima trovanja. Zbog toga analitika lipida mora biti visoko osetljiva i prefinjena. Lipidi se moraju prvo ekstrahovati iz tkiva biljaka suksesivno smešom polarnih i ne-polarnih rastvarača (kao što su metanol i hloroform). Ova smeša dobro penetrira u tkivo pošto dobro rastvara sve glavne klase lipida. Neki enzimi biljaka su aktivni u organskim rastvaračima i stoga moraju biti inaktivirani pre započinjanja analitičke procedure.

Ekstrahovan biljni materijal, obično sadrži i nelipidne kontaminante koji se od lipida odvajaju različitim hromatografskim metodama (slika 8-4). U osnovi, lipidi nemaju hromofore i obično se određuju bojenjem ili derivatizacijom. Najbolji bojeni reagens za tanak sloj u tu svrhu je 1-anilino-4-naftosulfonska kiselina koja otkriva lipide pomoću fluorescencije ispod UV lampe. Veliki napredak u analitici lipida dostignut je primenom HPLC (eng. high performance liquid chromatography) kojom se preko detektora masa konvertuje efluent iz kolone u fini sprej koji rasipa svetlost proporcionalno masi lipida. Ova metoda je relativno osetljiva; 1 $\mu$ g lipida se lako meri i daje nedvosmisleno iste rezultate kao najzastupljeniji tipovi lipida. Za acil-lipide (i neke druge slične tipove kao što su steroli) moguće je pripremiti isparljive derive, tipa metilestara masnih kiselina, a potom ih analizirati veoma osetljivom gasno-tečnom-hromatografijom; GLC (eng. gas-liquid-chromatography). Ova metoda nije samo za kvantifikaciju lipida jer daje informacije i o njihovoj strukturi. Identifikacija je potpuna ako je GLC kombinovana sa masenom-spektrometrijom (MS). Za sofisticirane analize moraju biti sprovedeni i drugi testovi. Tri primera su naznačena na slici 8-4.

Zbog toga što acil-lipidi sadrže smešu masnih kiselina vezanih za glicerol kao kičmu molekula to individualna klasa lipida ne sadrži prostu hemijsku grupu. Različitim kombinacijama masne kiseline (molekulske vrste) mogu biti odvojene

jedna od druge. Primenom hidrofobne hromatografije (kao što je HPLC) kojom se duži lanci čvršće vežu za kolonu jer su hidrofobniji ili pomoću  $\text{AgNO}_3$ -hromatografije kojom se razdvajanje zasniva na broju dvogubih veza u molekulu masnih kiselina. Ova vrsta hromatografije može takođe dati podatke o *cis*- i *trans*-izomerima. Drugi test koristi enzime koji hidrolizuju estarski vezane masne kiseline na različitim pozicijama u glicerolu. Tako npr., fosfolipaza A<sub>2</sub> će hidrolizovati *sn*-2 poziciju fosfolipida, što dozvoljava da u ovom položaju masne kiseline mogu biti analizirane neovisno od masnih kiselina u *sn*-1 poziciji. Treći test se primenjuje pri utvrđivanju redosleda duplih veza. Kao primer navodimo različite redoslede kod C-18 monoenskih masnih kiselina tipa oleinska (*cis*-Δ9-18:1), vakenska (*cis*-Δ11-18:1) ili petroselinska (*cis*-Δ6-18:1). Ovaj test se zasniva na oksidativnoj fragmentaciji ugljovodoničnog lanca na mestu duple veze. Proizvodi su dikarbonske kiseline sa karboksilnog kraja i nova monokarboksilna kiselina sa metil-kraja. Ozon i  $\text{KMnO}_4$  su tipični oksidansi.



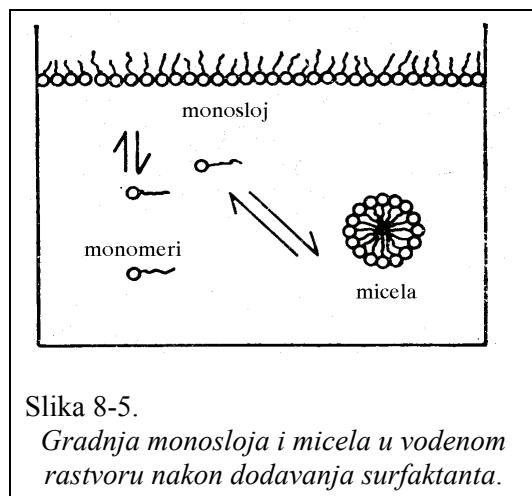
Slika 8-4. Osnovna shema za analizu biljnih lipida.

## 8.6. Lipidi kao miclele i bislojevi

Lipidi ne obrazuju polimerne makromolekule analogno proteinima, već grade visokoorganizovane strukture koje sa proteinima stvaraju pregrade izmedju *ćelija membrane*. Molekuli lipida imaju istegnuti oblik koji je uslovljen vrstom dugih ugljovodoničnih ostataka masnih kiselina. Glava lipida je hidrofilna i kao polarna dobro je rastvorna u vodi, a rep hidrofoban i nerastvoran u vodi, jer se u vodi oko njega ne orjentišu molekuli vode, koji bi građenjem vodoničnih ili jonskih veza, omogućili njegovu rastvorljivost. Rastvorljivost lipida u vodi se određuje sumom medudejstva polarnih glava i nepolarnih repova sa molekulima vode.

Imajući u vidu navedene osobine lipida moguće je objasniti i rastvorljivost  $K^+$  i  $Na^+$  soli masnih kiselina - sapuna i deterdženata u vodi, odnosno smanjenu rastvorljivost drugih soli. ( $Ca^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ -soli su potpuno nerastvorne u vodi). Kalijumove soli su nešto bolje rastvorne od natrijumovih, dok su soli nezasićenih bolje rastvorne od soli zasićenih masnih kiselina.

Između molekula lipida, koji se nalaze u rastvoru i onih koji obrazuju monosloj na granici razdvojne faze uspostavlja se dinamička ravnoteža. Površinski napon vode se na granici podele faza umanjuje ako sile privlačenja među molekulima slabe zbog prisustva ugljovodoničnog lanca. Ako se povećava količina dodatnih surfaktanata u vodi to će koncentracija rastvornih monomera rasti do odredjene granice koja se naziva *kriticnom* koncentracijom posle čega molekuli surfaktanta počinju da asociraju jedan sa drugim i da obrazuju *micle*.

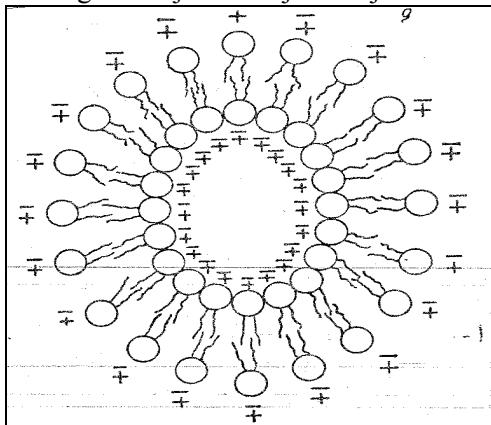


Slika 8-5.  
Gradnja monosloja i miclela u vodenom rastvoru nakon dodavanja surfaktanta.

Miclele su stabilni koloidni agregati koje obrazuju lipidi pri kriticnoj koncentraciji obrazovanja miclela (KKM). Na slici 8-5. je prikazano kako uvodjenjem male količine surfaktanta ili sapuna u vodenu fazu jedan njegov deo prelazi u rastvor u obliku monomera dok drugi deo obrazuje *monosloj* na granici voda-vazduh pri čemu su polarne glave molekula "zagnjurene" u vodu, a ugljovodonični ostaci su istisnuti iz vodene faze.

Biološki lipidi (fosfatidi, glikolipidi i sfingolipidi), koji su glavne lipidne komponente membrana, imaju *amfifilna* svojstva i razlikuju se od surfaktanata, koji obrazuju micele. Oni obrazuju veoma malo micela ( $10^{-10}$  mol/dm<sup>3</sup>), a umesto njih grade *bislojeve* koji se spajaju i grade vezikule. Debljina bisloja je ravna debljini membrane. Na taj način biološki lipidi pri određenim uslovima putem samoorganizacije obrazuju bislojnu matricu bioloških membrana koje ogradjuju sve žive ćelije i ćelijske organele.

Shematski prikaz dvosloja koji obrazuje biološku membranu dat je na slici 8-6.



Slika 8-6.

Shematski prikaz dvosloja lipida koji izgrađuje biološke membrane.

## 8.7. Funkcija lipida u biljkama i primena

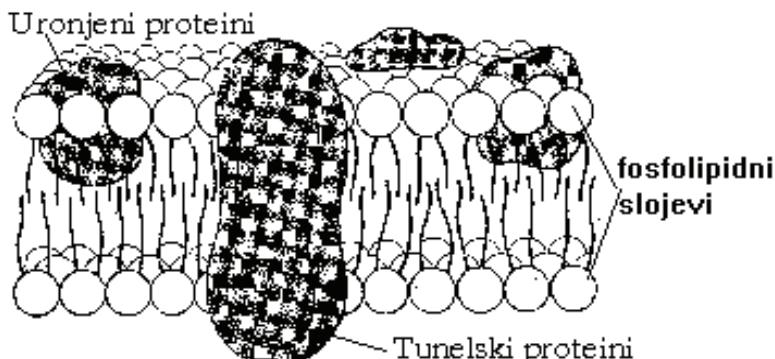
Prema funkciji, lipidi (masti i ulja) u biljkama se mogu podeliti u rezervne i membranske. Rezervni lipidi su skladišteni u različitim organima biljaka i najviše ih ima u semenu gde služe kao rezervoari ugljenika, i energije (ATP) neophodne za klijanje semena. (Njihovom oksidacijom se dobija dva puta više energije u odnosu na oksidaciju ugljenih hidrata).

Uloga masnih kiselina u biljkama do kraja nije dorečena ali je poznato, npr. da linolna i linoleinska kiselina pomažu održavanje oštećenih tkiva, tako što se nagomilavaju u ćelijama koje okružuju povredjena tkiva. Kada se nalaze u kutikuli (zajedno sa voskovima, estrima i drugim jedinjenjima), sprečavaju napad gljiva i bakterija. Seme biljaka sadrži fiksnu kompoziciju masnih kiselina koje su fenotipsko obeležje genotipova. Promene u hemijskom sastavu masti odn. ulja u biljkama služi kao indikator poremećenog metabolizma, te se hemijska istraživanja tih promena mogu koristiti kao biohemski parametri stanja metabolizma biljaka.

Voskovi štite biljne delove od mehaničkih povreda, a isto tako i od delovanja raznih virusa i patogenih agenasa. Oni održavaju ravnotežu vode u biljkama i regulišu razmenu gasova u plodovima. Pored čvrstih voskova biljke

sadrže i tečne voskove koji imaju manje parafina a više masnih kiselina i alkohola koji natapaju kotikule.

Fosfoacilgliceroli su komponente transportnog sistema u unutrašnjoj strani membrana mitohondrija, sastojci fotorespiratornog sistema tilakoidnih membrana hloroplasta itd. Fosfolipidi i glikolipidi su značajne komponente ćelijskih membrana jedra, mitohondrija, plastida, tilakoida, i hloroplasta koje izgradjuju zajedno sa proteinima. One se prikazuju u obliku tekućeg mozaika u kojem su fosfolipidi rasporedjeni u obliku bimolekulskog sloja, a proteini mogu biti *uronjeni*, *integralni* ili *tunelski* (slika 8-7). Proteini koji su uronjeni u fosfolipidni dvosloj imaju ili slobodan hidrofilni kraj ili je on uronjen u fosfolipidni sloj. "Tunelski protein" su značajni transporteri nutrijenata (molekula i jona) kroz biološke membrane. (Detaljnije o membranama pogledaj u poglavlju - Biološke membrane).



Slika 8-7. Fluidno mozaični model biološke membrane sa uronjenim i tunelskim proteinima i fosfolipidnim bimolekulskim slojem.

Navedeni model su 1972. godine postavili Singer i Nikolson. U ovom modelu se vidi da su hidrofobni ostaci aminokiselina u proteinima u čvrstom kontaktu sa hidrofobnim lancem fosfolipida i hidrofilnim lancem aminokiselina na površini u kontaktu sa vodenom okolinom. Ćelijske membrane su fluidne. Fluidnost membrana je sadržana u lipidnom sloju.

Mast i ulja su od velikog ekonomskog značaja jer se koriste kao hrana i sirovina za proizvodnju hrane. U nas se najviše koriste ulja od suncokreta i kukuruza, posebno klice koja sadrži i do 50% ulja, uljane repice i soje. Ulje od kukuruza sadrži i 0.1% vitamina E koji povećava hranljivu vrednost ulja i deluje antioksidantno.

Pored primene u farmaceutskoj industriji i kozmetici ona se u novije vreme koriste i kao goriva za neke motore jer je njihova energija sagorevanja 2.8 puta veća od etanola.

## Izvod

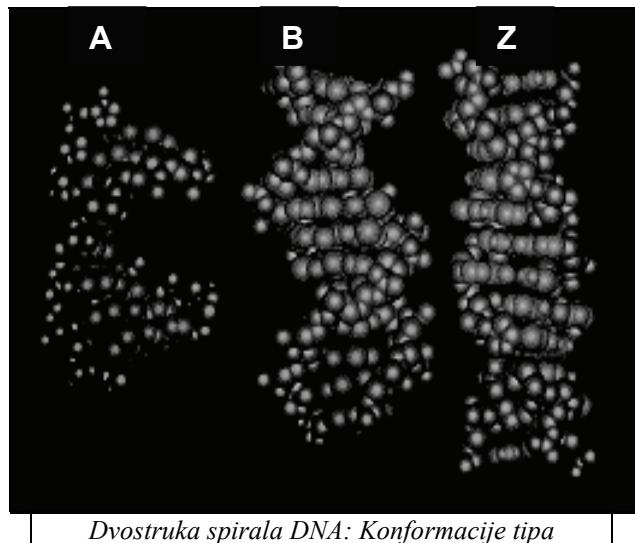
♣ Lipidi su komponente nerastvorljive u vodi, a rastvorljive u nepolarnim organskim rastvaračima. Prema prirodi hemijske strukture to su estri glicerola i viših masnih kiselina. Mogu biti jedinjenja otvorenog lanca sa polarnom glavom i dugim nepolarnim repom (**masne kiseline, triacilgliceroli, fosfoacilgliceroli, glikolipidi, voskovi, kutini, suberini** itd.) i jedinjenja sa fuzionisanim cikličnim strukturama poput **terpenoida** kod biljaka i esencijalno važni **steroidi** kod sisara.

♣ **Masne kiseline**- zasićene ili nezasićene (mono- i poli), odnosno omega masne kiseline imaju karboksilnu grupu kao polarnu glavu i ugljovodonični lanac kao nepolarni rep. Masne kiseline se normalno ne nalaze slobodne u prirodi već su inkorporirane u triacilglicerole i fosfoacilglicerole. **U triacilglicerolima** - tri masne kiseline su esterifikovane sa tri hidroksilne grupe glicerola. **Fosfoacilgliceroli** - se razlikuju od triacilglicerola po tome što je jedna od tri hidroksilne grupe glicerola esterifikovana fosfornom kiselinom, a ova nekim sekundarnim alkoholom. Priroda sekundarnog alkohola određuje identitet fosfoacilglicerola. Triacilgliceroli su rezervni oblici masnih kiselina, a fosfoacilgliceroli su važne komponente bioloških membrana. **Sfingolipidi** - sadrže dugo-lančani amino alkohol sfingozin umesto glicerola, a ostatak strukture je sličan ranije diskutovanim lipidima. **U glikolipidima** - šećerna komponenta (glukoza ili galaktoza) je vezana za alkoholnu grupu glicerola  $\beta$ -glikozidnom vezom.. **Voskovi, kutini i suberini** - su po hemijskom sastavu slični triacilglicerolima jer su estri viših masnih kiselina, sa višim monohidroksilnim alkoholima dugog niza.

♣ Mast i ulja su od velikog ekonomskog značaja jer se koriste kao hrana i sirovina za proizvodnju hrane. U nas se najviše koriste ulja od suncokreta i kukuruza, posebno klice koja sadrži i do 50% ulja, uljane repice i soje. Ulje od kukuruza sadrži i 0.1% vitamina E koji povećava hranljivu vrednost ulja i deluje antioksidantno.

♣ Pored primene u farmaceutskoj industriji i kozmetici ona se u novije vreme koriste i kao goriva za neke motore jer je njihova energija sagorevanja 2.8 puta veća od etanola.

# 9. Nukleinske kiseline



Dvostruka spirala DNA: Konformacije tipa  
A-DNA, B-DNA i Z-DNA

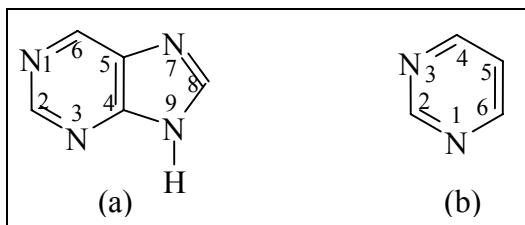
- 9.1. Hemijski sastav nukleinskih kiselina**
- 9.2. Vrste i strukture nukleinskih kiselina**
  - 9.2.1. Strukture DNA
  - 9.2.2. Vrste RNA i njihove strukture
- 9.3. Nukleinske kiseline biljaka**

Nukleinske kiseline su najesencijalnija visokomolekulska azotna jedinjenja polinukleotidnog sastava, jer sadrže sva osnovna svojstva života - razmenu materije, izmenljivost i nasleđe. One čine osnovu života, te se zbog svoje uloge u biosintezi biopolimera nazivaju *programerima života*.

## 9.1. Hemijski sastav nukleinskih kiselina

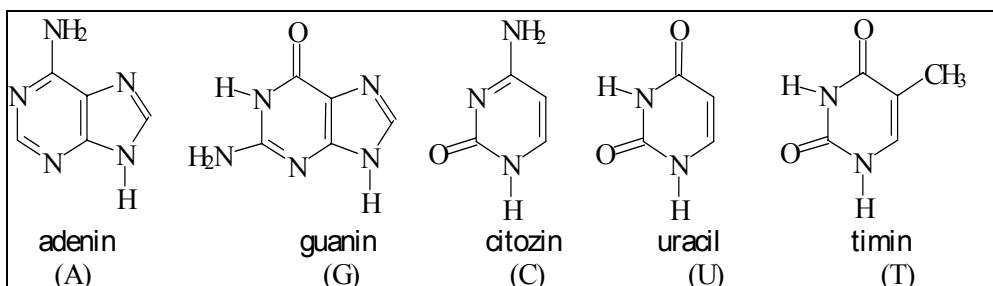
U nukleinskim kiselinama polinukleotidi su povezani fosfodiestarskim vezama koje vezuju šećere iz polinukleotidnog lanca. One se prema svom hemijskom sastavu dele na *deoksiribonukleinske* (DNA) i *ribonukleinske kiseline* (RNA). Obe vrste nukleinskih kiselina su izgrađene iz azotnih baza, šećera i fosforne kiseline.

**Azotne baze** (nukleobaze) - nukleinskih kiselina su purinske i pirimidinske strukture (slika 9-1).



Slika 9-1.  
Strukture purina (a) i  
pirimidina (b).

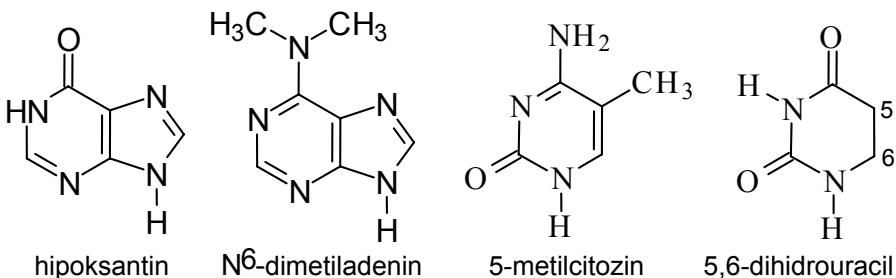
U sastav nukleinskih kiselina od purinskih baza ulaze *adenin* i *guanin*, a od pirimidinskih *citozin*, *uracil* i *timin* (slika 9-2).



Slika 9-2. Strukture uobičajenih purinskih (A i G) i pirimidinskih baza.

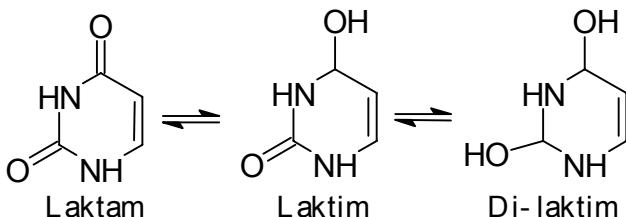
*Uracil* ulazi u sastav samo *ribonukleinskih kiselina*, a *timin* samo u sastav *deoksiribonukleinskih kiselina*.

Pored uobičajenih nukleobaza u strukturama nekih nukleinskih kiselina (kao npr. tRNA) dokazano je prisustvo i manje uobičajenih nukleobaza kao što su *hipoksantin*, *N<sup>6</sup>-dimetiladenin*, *5-metilcitozin*, *5,6-dihidrouracil* itd. (slika 9-3a).



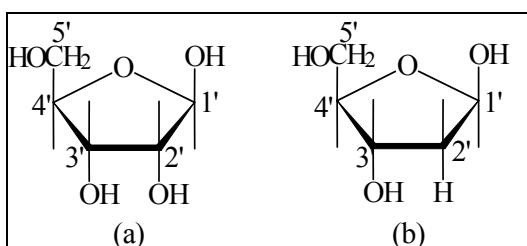
Slika 9-3a. Strukture nekih manje uobičajenih nukleobaza.

Slobodne purinske i pirimidinske baze mogu se naći u ćelijama samo u tragu, kao proizvod enzimske hidrolize nukleinskih kiselina i nukleotida. One su slabo bazna jedinjenja. Zavisno od pH sredine oksipurini i oksipiri-midini mogu se naći u dva tautomerna oblika: laktam (enolni) i laktim (oksi) oblik (slika 9-3b). Pri fiziološkim pH preovlađuje laktam (enolni) oblik. U nukleinskim kiselinama baze se, takođe, nalaze u enolnom obliku (keto) obliku.



Slika 9-3b. Tautomerni oblici uracila

**Šećeri** - koji ulaze u sastav nukleinskih kiselina su dve pentoze, *riboza* i *deoksiriboz* (slika 9-4).

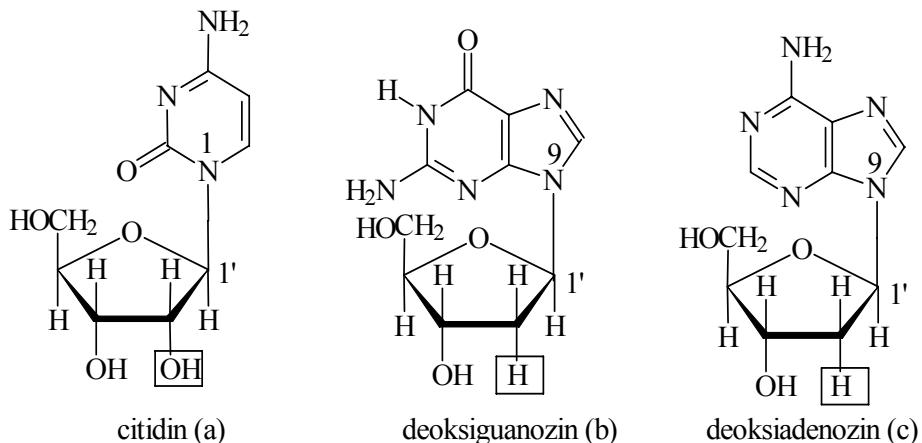


Slika 9-4.  
Strukture  $\beta$ -D-riboze (a) i  
 $\beta$ -D-deoksiribozе (b).

Prema vrsti pentoze nukleinske kiseline mogu biti deoksiribonukleinske i ribonukleinske kiseline.

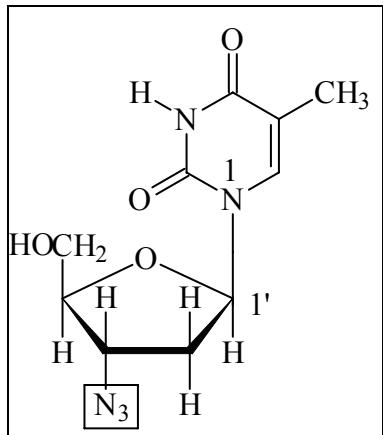
**Nukleozidi** - su N-glikozidi u kojima je azotna baza kovalentno vezana  $\beta$ -glikozidnom vezom za šećernu komponentu. Dobijaju se pažljivom hidrolizom polinukleotidnog lanca. Ako je ostatak šećera riboza nagrađeno jedinjenje je *ribonukleozid*, a ako je deoksiribozna onda je to *deoksiribonukleozid*. Veza koja spaja azotnu bazu sa šećerom je *glikozidna* i uvek se gradi između 1'-ugljenika

šećera i azota u položaju 9 purinskog odnosno u položaju 1 pirimidinskog prstena. Na slici 9-5 su date strukture nekih nukleozida.



Slika 9-5. Struktura ribonukleozida (a) i deoksiribonukleozida(b,c).

U derivate nukleozida u novije vreme ubraja se i sasvim novi 3'-azido-3'-deoksimidin (AZT) (slika 9-6). Ova supstanca pokazuje dobre efekte u lečenju side.



Slika 9-6.  
Struktura 3'-azido-3'-deoksimidina (AZdT).

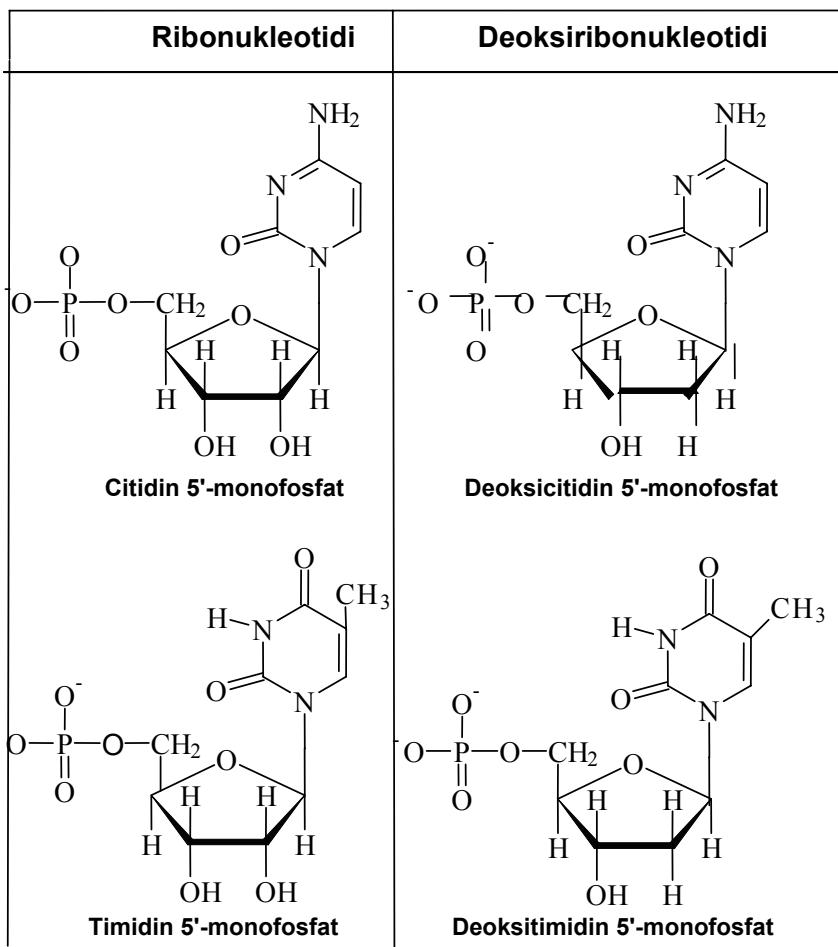
**Nukleotidi** - su nukleozidfosfati u kojima je jedna od hidroksilnih grupa šećera u nukleozidu esterikovana fosfornom kiselinom (slika 9-7). Nazive dobijaju tako što se imenuje nukleozida doda sufiks monofosfat, dok se pozicija fosfoestarske veze određuje brojem C-atoma koji je esterifikovan, npr. adenozin 3'-monofosfat, deoksicitidin 5'-monofosfat itd.

U prirodi su češći 5' nukleotidi. Strukture nukleotida koji izgrađuju lance RNA i DNA su date na slici 9-7a i b.

Polimerizacijom nukleotida nastaju nukleinske kiseline. Veza između monomera u nukleinskim kiselinama omogućena je formiranjem fosfodiestarske veze koja se gradi između 5' C-atoma jednog molekula šećera i 3' C-sledećeg molekula šećera.

Ribonukleotidi	Deoksiribonukleotidi
<p>Adenozin 5'-monofosfat</p>	<p>Deoksiadenozin 5'-monofosfat</p>
<p>Guanozin 5'-monofosfat</p>	<p>Deoksiguanozin 5'-monofosfat</p>
<p>Uridin 5'-monofosfat</p>	<p>Deoksiuridin 5'-monofosfat</p>

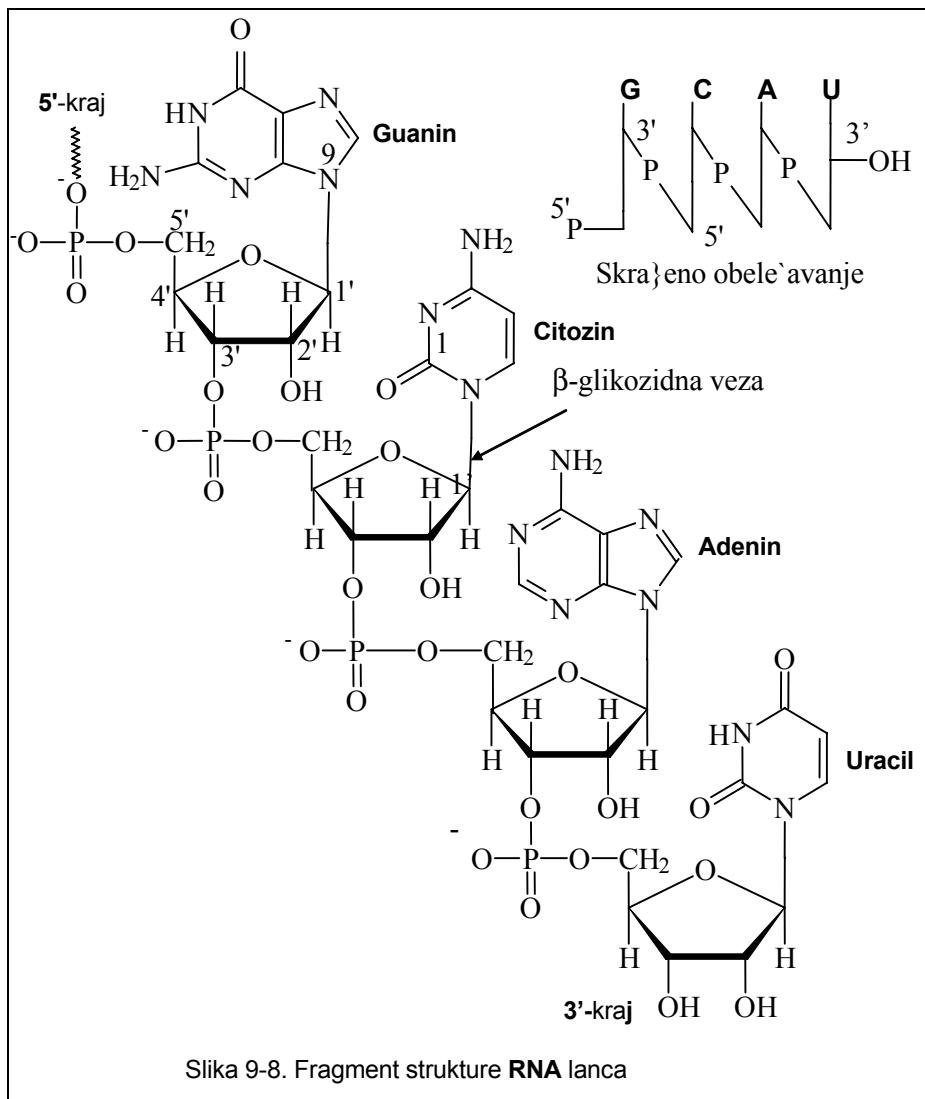
Slika 9-7a. Nukleotidi u strukturama DNA i RNA



Slika 9-7b. Uobičajeni nukleotidi u strukturama nukleinskih kiselina.

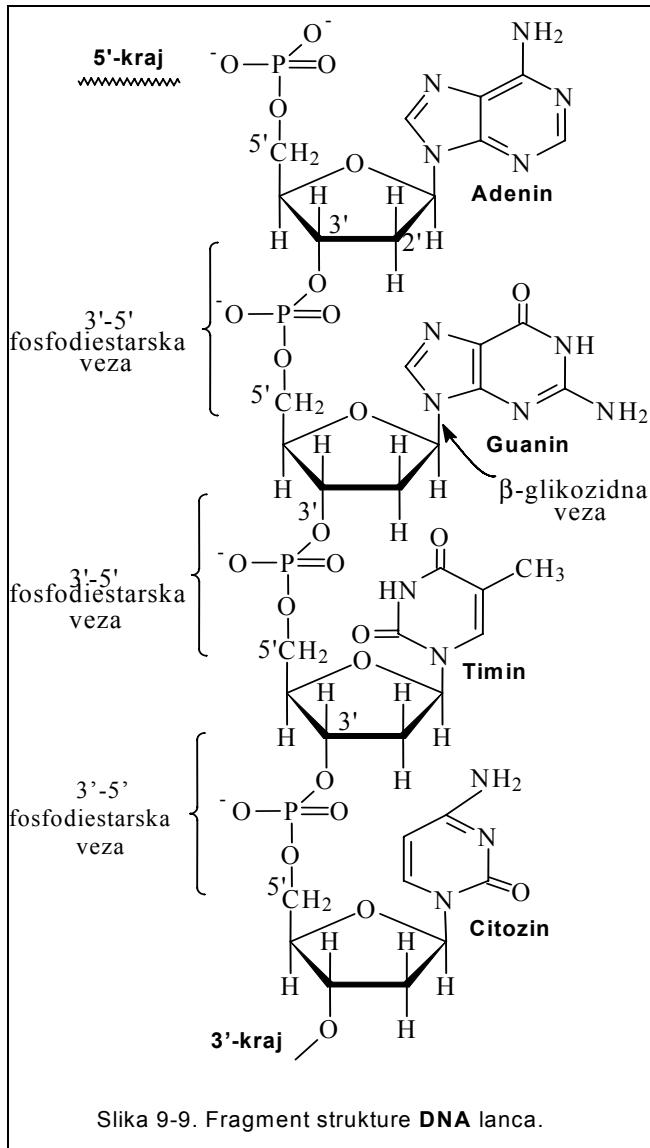
Numeracija ostataka nukleotida u nukleinskim kiselinama se vrši od 5'- kraja, koji nosi fosfatnu grupu ka 3'-kraju koji ima slobodnu OH grupu. Strukture fragmenata RNA i DNA lanca su prikazane na slici 9-8 i 9-9.

“Kičmu” strukture nukleinskih kiselina čine kovalentno vezani ostaci šećer-fosfat koja se proteže čitavom dužinom lanca. Najvažnije u strukturi nukleinskih kiselina je identitet baza, zbog čega se u skraćenom prikazivanju strukture lanca obično navodi samo redosled baza kojom se saopštava esencijalna informacija. Redosled baza u strukturi lanca može biti zapisan pojedinačnim slovima kao npr. A, G, C, U ili T pri čemu svako slovo predstavlja individualnu bazu. Vertikalne linije pokazuju položaj šećera za koji su vezane individualne baze, a dijagonalne koje prolaze preko slova “P” predstavljaju fosfo-diestarske veze (slika 9-8).



Slika 9-8. Fragment strukture RNA lanca

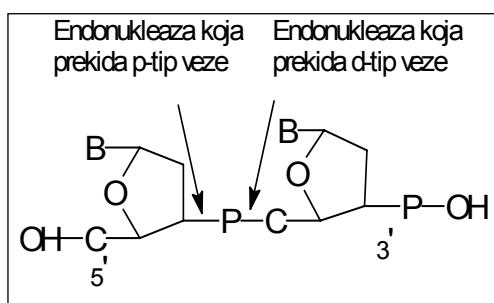
Kada je potrebno naznačiti položaj na šećeru za koji je vezana fosfatna grupa slovo "p" se piše sa leve strane slova baze kada predstavlja 5'-nukleotid odnosno sa desne kada predstavlja 3'-nukleotid. Tako npr. pA označava 5'-AMP, a Ap 3'-AMP nukleotid. Shodno napred navedenom moguće je sekventu baza u nekom oligonukleotidu prikazati i kao pGpCpACpU, ili još jednostavnije kao pGCAU. DNA lanac za razliku od RNA umesto uracila sadrži timin, a umesto riboze deoksiribozu (slika 9-9). Zbog toga se kod skraćenog prikaziva-nja strukture fragme- nta DNA uvodi prefiks "d" što treba da ukaže na deoksiribonukleotidni ostatak, kao npr. dG što je zamena za G kod RNA.



Slika 9-9. Fragment strukture **DNA** lanca.

Shodno tome deoksi analog u prethodno napisanom oligonukleotidu bio bi pdGpdCpdApdU odnosno pd(GCAU).

Polinukleotidi se razlažu delovanjem dva tipa nukleaza: egzonukleaza i endonukleaza. Egzonukleaze postepeno odstranjuju pojedinačne nukleotide ili male oligonukleotide sa 5' ili 3' kraja polinukleotidnog lanca. Pri tome one mogu kidati proksimalnu (p) fosfo-diestarsku vezu oslo-badajući deoksiribonukleozid 5-fosfat ili distalnu (d) vezu oslo-badajući deoksiribonukleozid 3-fosfat. Endonukleaze kidaju fosfodiesterске veze koje se nalaze u unutrašnjosti polinukleotidnog lanca. I one mogu biti p- ili d-tipa (slika 9-9a)



Slika 9-9a.

Mesto delovanja specifičnih nukleaza.

obeležavanje dato je u tabeli 9-1.

. Tabela 9-1. Nukleotidi u nukleinskim kiselinama i skraćene oznake

Baza	Nukleozid	Nukleotid	Oznaka
<b>Adenin</b>	<i>Adenozin (A)</i> Deoksiadenozin (dA)	Adenozin 5'-fosfat Deoksiadenozin 5'-fosfat	AMP dAMP
<b>Gvanin</b>	<i>Gvanozin (G)</i> Deoksigvanozin(dG)	Gvanozin 5'-fosfat Deoksigvanozin 5'-fosfat	GMP dGMP
<b>Citozin</b>	<i>Citidin (C)</i> Deoksicitidin (dC)	Citidin 5'-fosfat Deoksicitidin 5'-fosfat	CMP dCMP
<b>Uracil</b>	<i>Uridin (U)</i> Deoksiuridin (dU)	Uridin 5'-fosfat Deoksiuridin 5'-fosfat	UMP dUMP
<b>Timin</b>	<i>Timidin (T)</i> Deoksitimidin (dT)	Timidin 5'-fosfat Deoksitimidin 5'-fosfat	TMP dTMP

Nukleotidi su jake kiseline, jer je u njima ostatak fosforne kiseline jako disosovan. Značajni su u reakcijama razmene materije i energije, jer se mogu fosforilisati i graditi i trifosfonukleotide kao npr. ADP, ATP, GTP, CDP, UDP, UTP, koji potpomažu akumulaciju energije potrebne za život. Značajni su i kao sastojci niza koenzima kao npr. FAD, koenzima A i dr.

## 9.2. Vrste i strukture nukleinskih kiselina

Prema hemijskom sastavu nukleinske kiselina se dele na dve grupe i to:

- ◆ *deoksiribonukleinske kiseline (DNA)* i
- ◆ *ribonukleinske kiseline (RNA)*.

Navedenoj hemijskoj podeli odgovaraju i njihove različite funkcije u ćeliji.

**Deoksiribonukleinske kiseline (DNA)** - su veliki molekuli "magacini" genetičkih informacija koje određuju svojstva ćelija i puteve njihovog rastenja i razmnožavanja. DNA odražava i prenosi genetičko nasleđe preko kojeg priroda osigurava biološki kontinuitet. U bakterijama se nalazi u obliku jednostavnog lanca dok je u višim organizmima udružena sa baznim proteinima - *histonima*. Neke DNA grade *hromozome*. Broj hromozoma i količine DNA su iste u svim ćelijama određenih vrsta. Sastoje se iz velikog broja nukleozida koji su fosfornom kiselinom međusobno povezani preko 3' i 5'-OH-grupa. Fragment strukture DNA lanca je prikazan na slici 9-9.

**Ribonukleinske kiseline (RNA)** - slično su građene kao i deoksiribonukleinske kiseline (fragment strukture RNA lanca je prikazan na slici 9-8). Prema funkciji u organizmu razlikuju se tri vrste ribonukleinskih kiselina:

- ◆ *transferna RNA (tRNA)*,
- ◆ *ribozomska RNA (rRNA)* i
- ◆ *informaciona (messenger) RNA (iRNA ili mRNA)*.

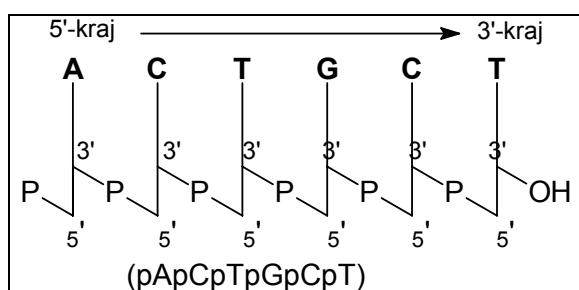
Navedene RNA se razlikuju ne samo po funkciji, već i po veličini molekula. *Transferne ribonukleinske kiseline* su najmanji molekuli izgrađeni od 75 do 85 nukleotida i sadrže relativno mnogo retkih baza. U ribozomima viših organizama nalaze se četiri različite *ribozomske ribonukleinske kiseline* (rRNA) koje prema njihovim konstantama sedimentacije označavamo sa 5 S-RNA, 5.8 S-RNA, 18 S-RNA i 28 S-RNA. *Informacione (messenger) ribonukleinske kiseline* (mRNA) imaju Mr od nekoliko stotina hiljada do nekoliko miliona.

Nukleinske kiseline su makromolekulska jedinjenja kod kojih kao i kod proteina postoje različiti nivoi molekulske strukture i organizacije u prostoru. Primenom najsavremenijih fizičkohemiskih i biohemiskih metoda do danas su odredjeni sledeći oblici struktura nukleinskih kiselina:

- ◆ *primarna struktura*,
- ◆ *sekundarna struktura* i
- ◆ *tercijarna struktura*.

### 9.2.1. Strukture DNA

**Primarna struktura DNA** - označava vrstu i redosled (sekvencu) nukleotida u polinukleotidnom lancu. Segment primarne strukture DNA lanca dat je na slici 9-10. Po modelu Votsona i Krika molekul DNA se sastoji od dva polideoksiribonukleoti-dna lanca, međusobno uvije-na oko zamišljene zajedničke ose da formiraju spiralu.



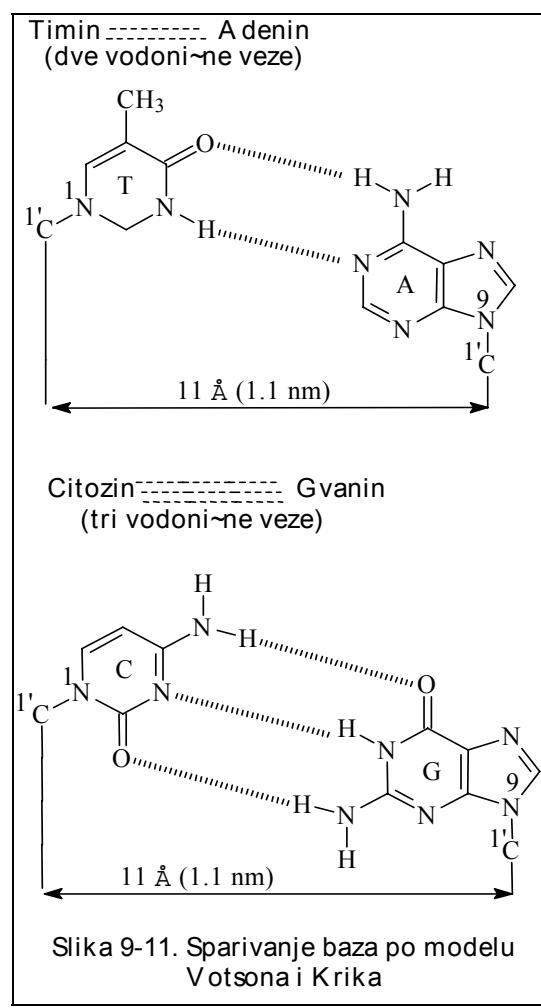
Slika 9-10.

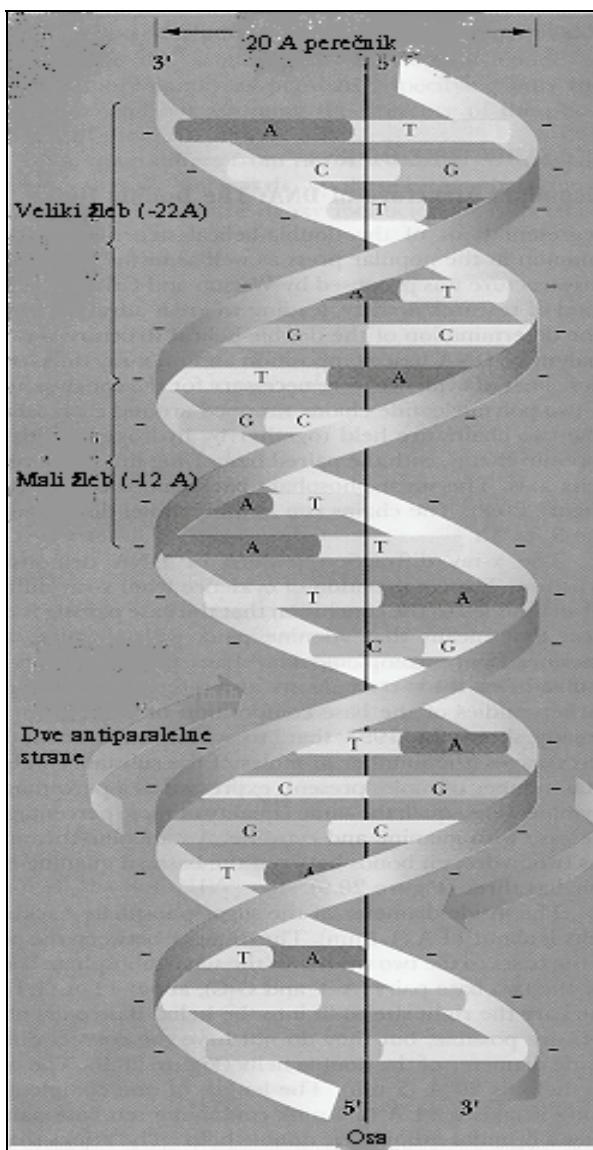
Shematski segment primarne strukture polinukleotidnog lanca DNA.

Na slici 9-10 prikazan je shematski skraćeni način pisanja sekvene u kojem se Fisherova projekcija riboze predstavlja okomitom crtom, a fosforna kiselina velikim slovom P. Такode prikazani su kao baze purinski derivati adenin i guanin te pirimidinski - citozin i timin. Prisustvo timina kao pirimidinske baze tipično je za deoksiribonukleinsku kiselinu.

Kvantitativna analiza (Chargraff-a) pokazala je da su adenin i timin zastupljeni u molarnom odnosu 1:1, kao i guanin i citozin (tako je uvek prisutno jednako mnogo purinskih i pirimidinskih baza). Nasuprot tome, većina ćelija eukariota ima više adenina i timina nego guanina i citozina (molarni odnos baznih parova iznosi 1.3-1.5).

**Sekundarna struktura DNA** - je prostorna struktura DNA koja objašnjava način sparivanja baza. Model sekundarne strukture je načinjen prema pravilu Votsona i Krika, po kojem se dve baze međusobno sparaju (povezuju) vodoničnim vezama (vodoničnim mostovima) koji se grade između parova baza A-T (dve veze) i G-C (tri veze). Na taj način dva lanca su međusobno vezana vodoničnim vezama između parova baza (adenin-timin i guanin-citozin) i međusobno su komplementarni (slika 9-11).





nalazi se 3'-kraj komplementarnog lanca.

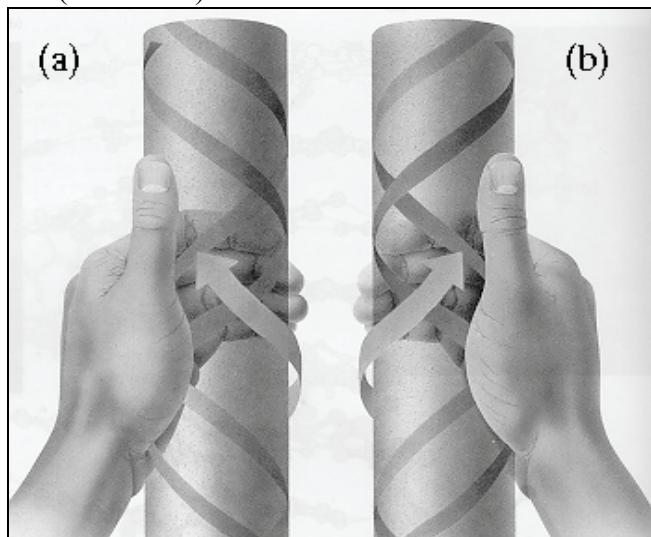
Zbog njihove gradje u prostoru mogu se poređiti sa stepenicama. Spoljni slojevi spirale su izgradjeni iz šećera i fosfodiestarske veze. Prečnik uvojnica iznosi 20 Å (2 nm), a kompletan obrt sa 10 parova baza 34 Å (3.4 nm), u kojem su perpendikularno (normalno, vertikalno) u odnosu na osu ugrađeni parovi baza na rastojanju od 3.4 Å (0.34 nm).

Unutrašnji prečnik "šećer - fosfat kičme" duplog heliksa DNA je oko 11 Å (1.1 nm). Sparivanje baza omogućuje da se dve polinukleotidne niti drže zajedno te jedna nit polinukleotidnog lanca utvrđuje potpuno sekvencu druge niti sa kojom se uvija u prostoru u obliku dvostrukе spirale (uvojnice), po modelu koji su američki biohemičar *J.D.Wotson* i britanski biofizičar *F.H.Krik* postavili 1953. (slika 9-12).

Slika 9-12.  
Dupli heliks DNA lanca.

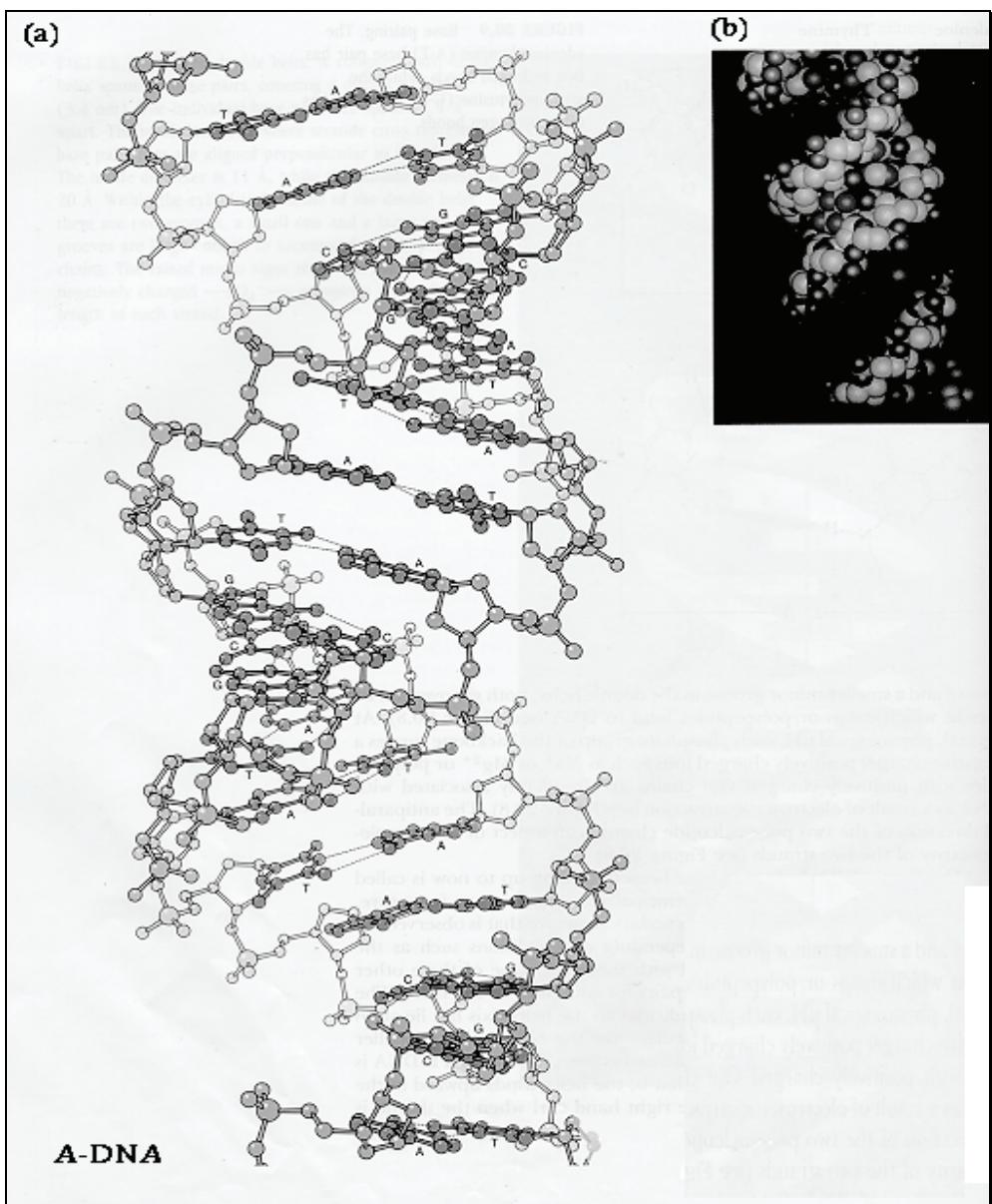
U dvostrukoj spirali niti DNA se čas približavaju, čas udaljavaju jedna od druge, te se na površini molekula pojavljuje jedan veliki i jedan mali otvor. Iz slike 9-12 se vidi da parovi baza leže horizontalno na unutrašnjoj strani spirale. Oni se nalaze dosta blizu pa njihovi  $\pi$ -elektroni mogu graditi vodonične veze. Dva polinukleotidna lanca u molekulu DNA nemaju isti pravac već su antiparalelni tj. naspram 5'-kraja jednog lanca

Oblik DNA koji je diskutovan poznat je kao *B-DNA* tip i prototip je Votson-Krikove uvojnica, za razliku od *A-DNA* koja u kompletном obrtu ima 11 baznih parova koje nisu normalne na osu heliksa već leže pod uglom od  $20^{\circ}$  u odnosu na osu slično krilima propelera. Važna sličnost između *A-DNA* i *B-DNA* je da obe u prostoru zauzimaju položaj desno-ručno namotane dvostrukе spirale, odnosno kod oba tipa heliks se namotava nagore na takav način kao što se savijaju prsti desne ruke kada je palac usmeren nagore u pravcu strelice (slika 9-13).



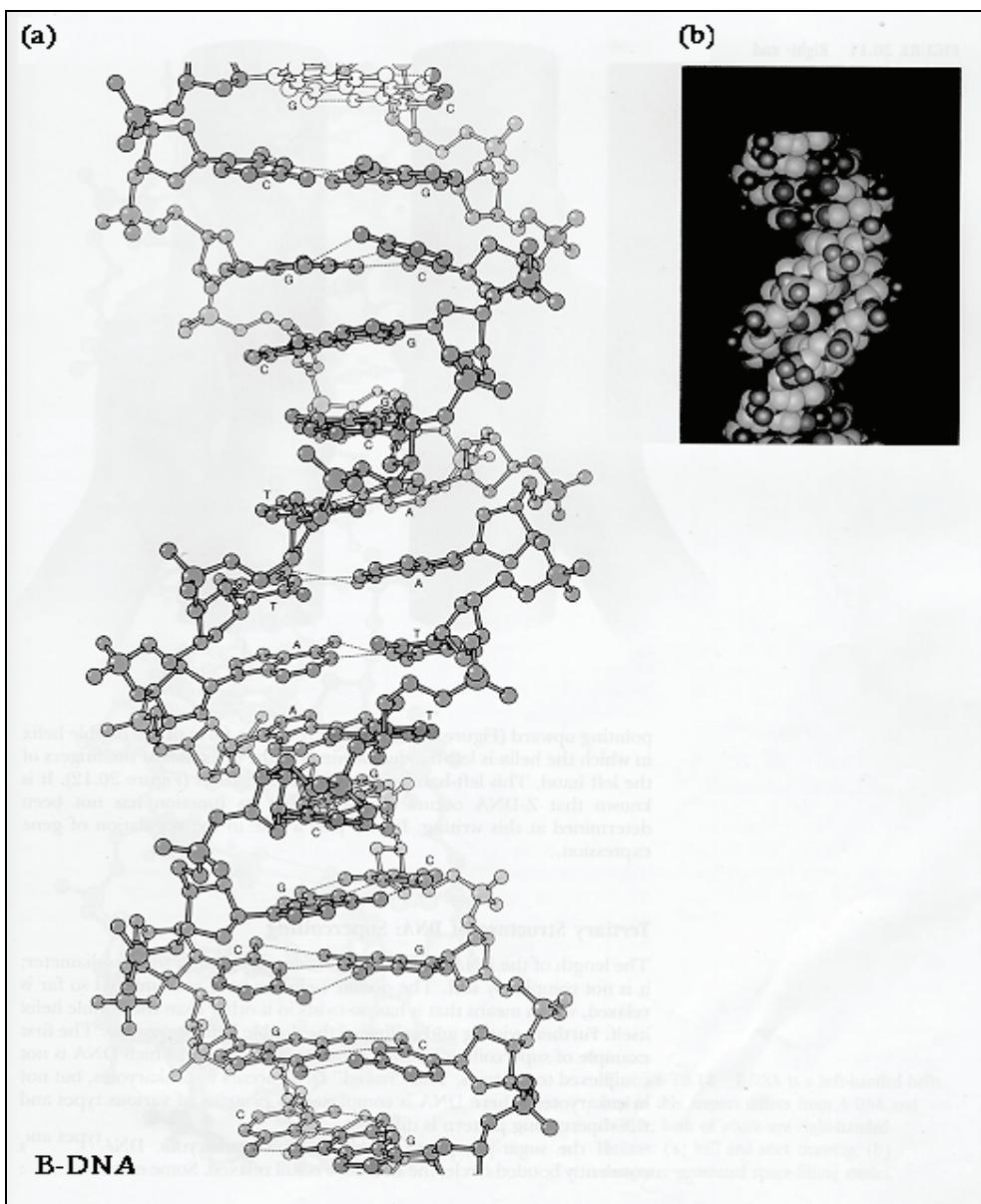
Slika 9-13. Levo i desno-ručno namotana dvostruka spirala DNA:  
(a) Z-DNA tip; (b) A-DNA i B-DNA tip.

Postoji i varijanta oblika dvostrukе spirale u kojem je ona levo-ručna to jest savijena u pravcu prstiju leve ruke. Ovaj oblik nazvan je *Z-DNA* i karakterističan je po tome što sadrži 12 ostataka baza po navoju. Ovaj tip strukture heliksa u prostoru su predložili Aleksander Rich i saradnici na bazi kristalne strukture  $d(CG)_3$ . Poznato je da se *Z-DNA* javlja u prirodi, ali njena funkcija do danas nije sa sigurnošću određena. Pretpostavlja se da ima ulogu u regulaciji ekspresije gena. Sličnost ova dva oblika uvijanja DNA se može porebiti sa sličnosti leve i desne ruke odnosno predmeta i lika u ogledalu. Molekulski modeli dvostrukе spirale kod sva tri tipa DNA sa naglašenim položajem baznih parova u odnosi na osu heliksa dati su na slikama 9-14a-c.



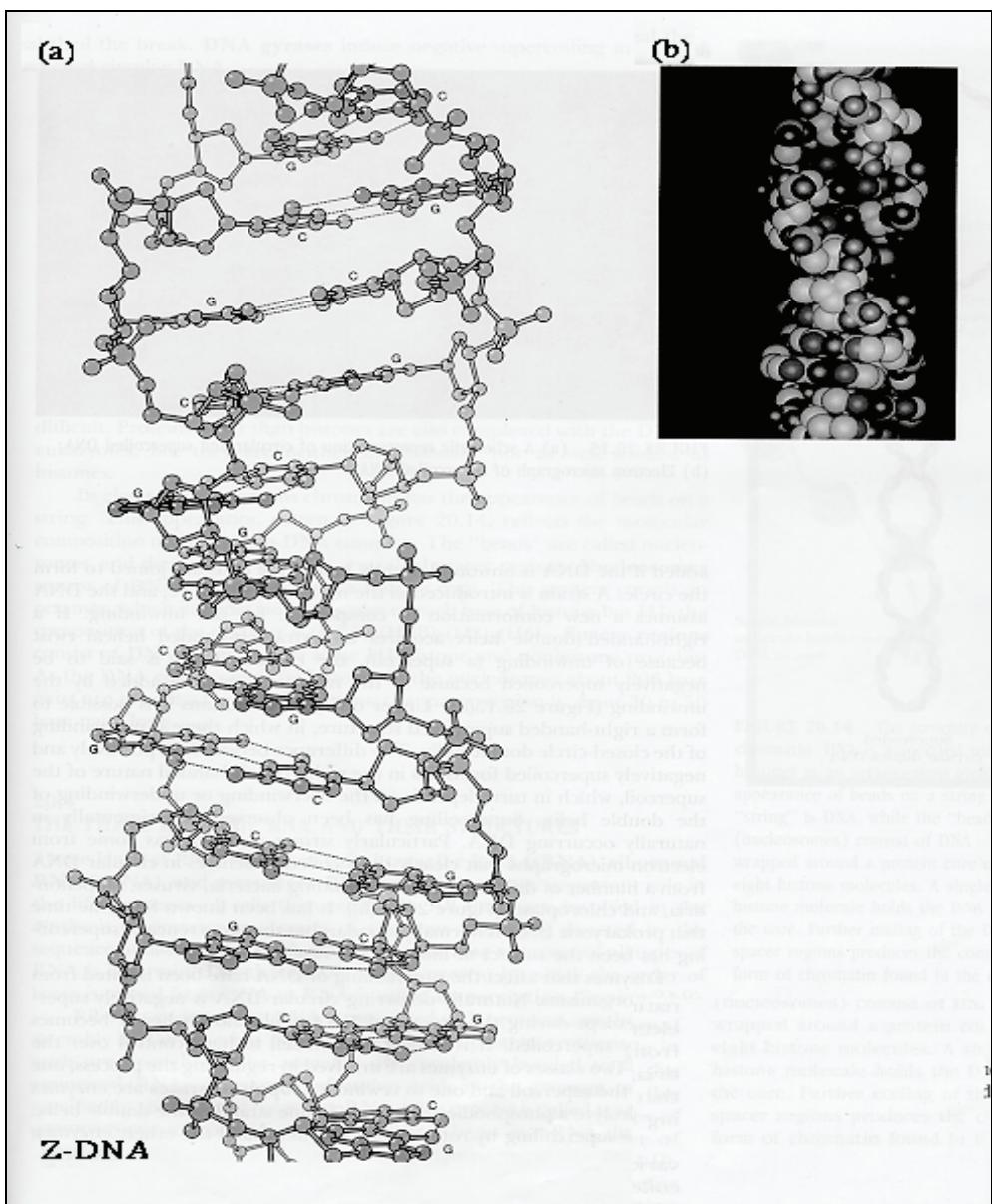
Slika 9-14a.

Molekulski modeli dvostrukih spirala A-DNA. (a) crtež lopte i štapića, (b) kompjuterom generisan prostorno-popunjenoj model (model stereo slike); bazni parovi imaju oznake uvinjene elise sa respektom na osu heliksa (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saunders College Publishing, London, 1991, str.544, sl.20.10 a i b).



Slika 9-14b.

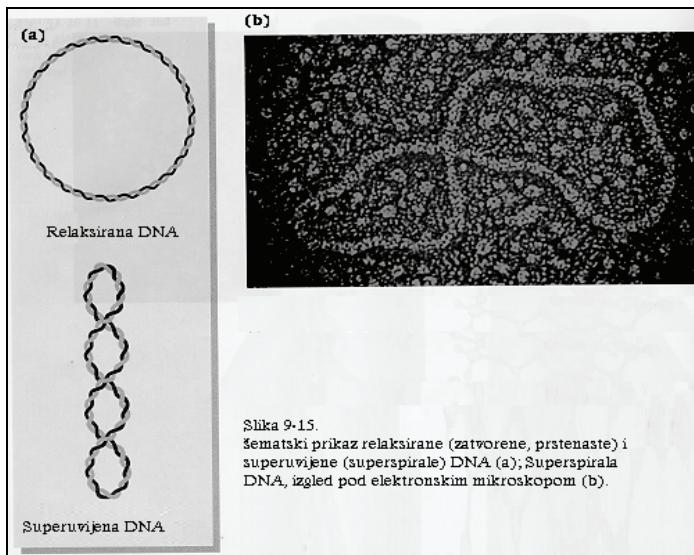
Molekulski model dvostrukne spirale B-DNA. (a) crtež lopte i štapića, (b) kompjuterom generisan prostorno-popunjenoj model (model stereo slike); bazni parovi leže u ravni tako da vertikalno zatvaraju osu heliksa (*M.K.Campbell, Biochemistry, Saunders College Publishing, London, 1991, str.545, sl.20.10 c i d*).



Slika 9-14c.

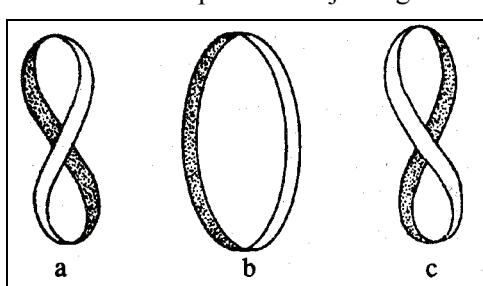
Z-DNA levo-ručni heliks i njegove respektivne razlike u odnosu na heliks A-DNA i B-DNA koji je desno-ručno namotan; (a) crtež lopte i štapića, (b) kompjuterom generisan prostorno-popunjjen model/model stereo slike (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saunders College Publishing, London, 1991, str. 547, sl. 20.12 a i b).

**Tercijarna struktura DNA** - se gradi uvijanjem dvostrukih uvojnica na određenim mestima stvarajući tako *superspiralu* (pozitivno ili negativno uvijenu). Ova lančana reakcija obezbeđena je delovanjem enzima *DNA-giraze*. Za stvaranje superspirale iz relaksirane (cirkularne, prstenaste) DNA moraju se "otvoriti" fosfodiestarske veze i nakon rotacije opet povezati, zašta je potreban ATP (slika 9-15).



Tercijarna struktura DNA nije još dovoljno proučena. Poznato je da ona može biti *relaksirana* u obliku cirkularnog dupleksa ili zauzimati kompaktne oblike i to: *pozitivan superheliks* (u kojem se superheliks uvrće) i *negativan superheliks* (u kojem se on razmotava).

Tercijarne strukture DNA date su na slici 9-16. Ona može prelaziti iz jednog oblika u drugi preko relaksirane strukture.

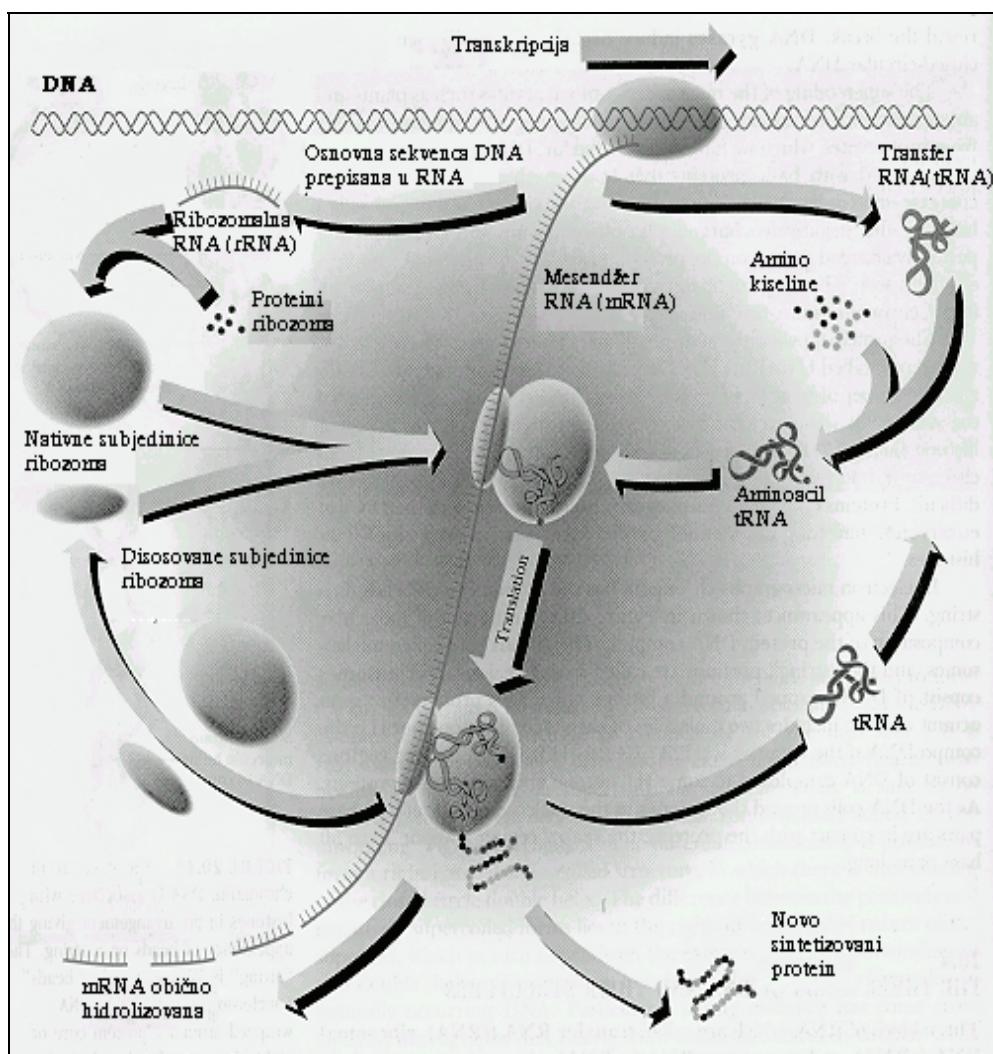


Slika 9-16.

Tercijarne strukture DNA. (a) negativna superuvijena struktura, (b) relaksirana struktura i (c) pozitivna superuvijena struktura.

## 9.2.2. Vrste RNA i njihove strukture

Tri vrste RNA, poznatije kao **transferna RNA (tRNA)**, **ribozomalna RNA (rRNA)** i **mesendžer** ili **informaciona RNA (m/i RNA)**, imaju važnu ulogu u životnim procesima ćelije. Sve tri su uključene u sintezu proteina koja teče u serijama reakcija dirigovanim sekvencom baza u DNA. (slika 9-17).



Slika 9-17.

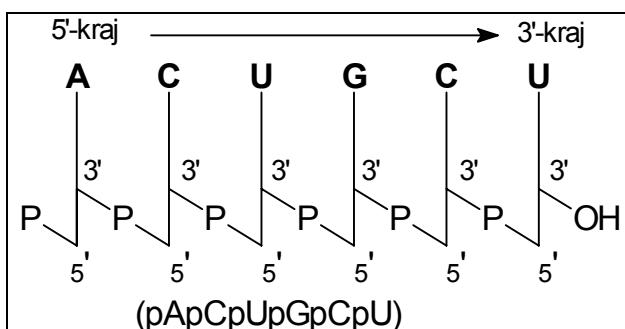
Vrste RNA i neke njihove funkcije. (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Sounders College Publishing, London, 1991, str.550; sl. 20.15).

Bazne sekvene svih tipova RNA su odredene pomoću redosleda baza u DNA. Proces kojim se informacija iz molekula DNA (genoma) "kopira" u komplementarnu sekvencu ribonukleotida RNA naziva se **transkripcija** (detaljnije vidi u poglavljju 10). Nukleotidi se ugrađuju u RNA tokom transkripcije, dok modifikovani nukleotidi nastaju posle transkripcije. Prisustvo modifikovanih nukleotida je karakteristično za stabilne RNA (rRNA i tRNA). Ribozomi, u kojima je rRNA udružena sa proteinima, su građeni tako da obezbeđuju rast polipeptidnom

lancu u proteinskoj sintezi. Aminokiseline dospevaju do ribozoma (mesta sinteze proteina) tako što se kovalentno vezuju za tRNA gradeći aktiviranu aminoaciltRNA. Redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu je određen redosledom baza u mRNA. Ovaj proces je poznat kao **translacija**. Sekvenca tri baze u mRNA direktno je inkorporirana u pojedinačne sekvence aminokiselina u rastućem polipeptidnom lancu (vidi poglavljje 10). Vrste RNA i njihove značajnije funkcije u životnim procesima u ćeliji su prikazane na slici 9-17.

Prisustvo primarne, sekundarne i tercijarne strukture je dokazano i u RNA.

**Primarna struktura RNA** - se razlikuje od primarne strukture DNA po tome što je šećerna jedinica riboza i što se na mestu timina nalazi pirimidinska baza uracil. Segment primarne strukture RNA dat je na slici 9-18.



Slika 9-18.

Skraćeni način prikazivanja sekvence polinukleotidnih lanaca RNA

Na bazi sekvence poli nukleotidnog lanca RNA vidi se velika hemijska sličnost sa

molekulom DNA. Mada RNA spada u stabilnije sastojke ćelije, ona nije stabilna kao DNA. Neke RNK se sintetišu, iskoriste i razgrade vrlo brzo (kao npr tRNA) dok druge imaju sporiji metabolizam (rRNA i tRNA). RNA su linearni polimeri, izgrađeni od ribonukleozid 5-monofosfata povezanih 3',5'-fosfodiestarskim vezama.

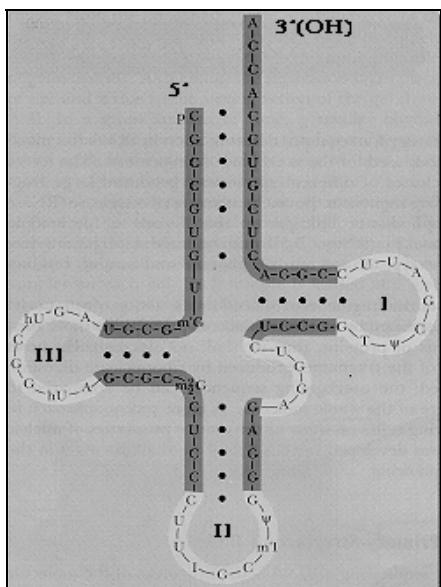
**Sekundarna struktura RNA** – Molekuli RNA su jednolančani. Međutim, RNA često imaju regione dvostrukе zavojnice koje su nastale sparivanjem komplementarnih baza unutar molekula (tzv. intramolekulsко sparivanje baza). Ovakve intramolekulske dvostrukе strukture često se nazivaju "ukosnice". Nespareni regioni formiraju "petlje". Spiralizovani delovi molekula su otporni na dejstvo nukleaza koje pretežno hidrolizuju jednolančane delove. Zato su RNA sa izraženom sekundarnom strukturom termodinamički i metabolički stabilnije od onih koje ne sadrže intramoleku-lske zavojnice. U *in vivo* sistemu molekuli RNA su dinamični: menjaju kon-formaciju za vreme sinteze, obrade i funkcionisanja.

Različiti su nivoi spoznaje o sekundarnim strukturama polinukleo-tidnih lanaca RNA. Prva i najbolje proučena je sekundarna struktura tRNA.

Molekul tRNA predstavlja prost polinukleotidni lanac, obično izgrađen od oko 80 nukleotidnih ostataka sa prosečnom molekulskom masom od oko 25.000 daltona i koja varira sa biljom vrstom.

Vodonične veze se javljaju unutar tRNA izgrađujući A-U i G-C parove baza slično onima koji se javljaju u DNA izuzev što je timin zamjenjen uracilom.

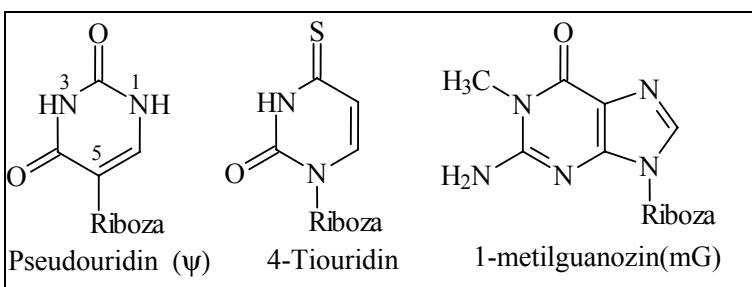
Molekul tRNA je tako organizovan u prostoru da oblikom podseća na list deteline koja se može smatrati **sekundarnom strukturom tRNA** (slika 9-19).



Slika 9-19.

Sekundarna struktura tRNA u obliku lista deteline. Čine je regioni nastali uvijanjem molekula stabilizovanih vodoničnim vezama (stabljika) i regioni bez vodoničnih veza (petlje).

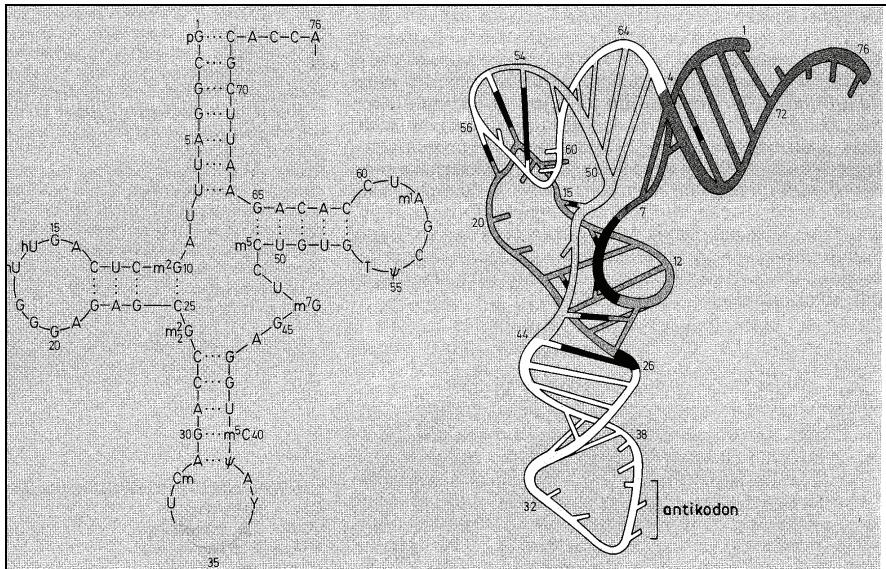
Delovi molekula koji su stabilizovani vodoničnim vezama se nazivaju *stabljkom*, a delovi bez vodoničnih veza se nazivaju *petljama* (I, II i III). Neke od petlji sadrže modifikovane nukleobaze (kao npr. pseudouridin, 4 tiouridin i 1-metil-guanozin čije su strukture date na slici 9-20).



Slika 9-20.  
Strukture nekih  
modifikovanih  
baza u tRNA.

Pored sekundarne strukture (strukture sparenih baza), molekuli RNA često imaju ogroman broj vodoničnih veza koje su značajne za formiranje tercijarne strukture molekula. U tom pogledu primer je struktura molekula tRNA.

**Tercijarna struktura RNA** - tRNA kao i mRNA se vezuju za ribozome tokom sinteze proteina, gradeći kompleks (ribozom-tRNA-mRNA) koji osigurava pravilan redosled aminokiselina u rastućem polipeptidnom lancu. Pravilna tercijarna struktura tRNA je neophodna da bi se enzim mogao vezati kovalentno za aminokiselinu na 3'-kraju tRNA. Da bi nastala tercijarna struktura tRNA list deteline prelazi u konformaciju L-oblika čija je struktura određena difrakcijom x-zraka (9-21).



Slika 9-21.

Trodimenzionalna (tercijarna) struktura tRNA. Na donoj petlji nalazi se antikodon, ugao gore levo u prostornoj strukturi odgovara pseudouridinskoj petlji tj. desnom "listu" deteline. Na otvorenom kraju desno nalazi se krajnja baza koja energijom bogatom vezom povezuje aminokiseline.

Molekul tRNA ima dekle oblik deteline sa tri lista (sl.9-21). Sve tRNA sadrže na svom 3' kraju tri nukleotida sledećeg redosleda: citidil-citidil-adenin (CCA). Za slobodnu 3' OH grupu riboze terminalnog adenilata enzimski se vezuje aminokiselina svojom karboksilnom grupom, gradeći šaržirani oblik tRNA tzv. aminoacil-tRNA koja predstavlja aktivirani oblik aminokiseline u toku biosinteze proteina.

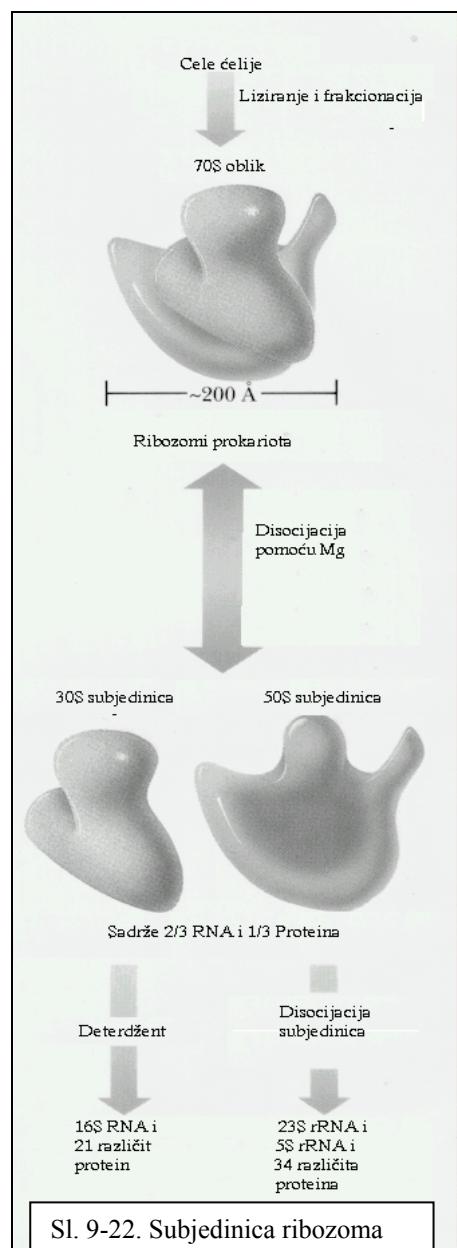
Za razliku od tRNA, molekuli rRNA su obično dosta veći i svega nekoliko tipova rRNA postoje u ćeliji. Da bismo bolje razumeli strukturu rRNA potrebno je sagledati njenu ulogu u samim ribozomima. Udeo rRNA u ribozomima iznosi 60-65% ukupne mase ribozoma, a ostatak 35-40% mase čine proteini. Kako u prokariotima tako i u eukariotima ribozomi se sastoje iz dve subjedinice, jedne veće i jedne manje (slika 9-22).

Manja subjedinica se sastoji od jednog velikog molekula rRNA i oko 20 različitih proteina, a veća od 2 rRNA molekula kod prokariota odnosno 3 rRNA molekula kod eukariota i oko 35 različitih proteina.

Subjedinice ribozoma lako disosuju *in vitro* u uslovima smanjene koncentracije  $Mg^{2+}$ . Povećanje koncentracije  $Mg^{2+}$  na prvočitni nivo obrće proces i aktivnost ribozoma može biti ponovo uspostavljena. Tehnikom *ultracentrifugovanja* moguće je odrediti pokretljivost partikula ribozoma koje karakteriše **sedimentacioni koeficijent** izražen u **Svedbergovim jedinicama** (S) (Svedberg je švedski naučnik koji je otkrio ultracentrifugu). Vrednost S se povećava sa molekulskom masom sedimentacionih partikula, ali nije direktno srazmerna s' obzirom da i oblik partikule utiče na brzinu sedimentacije.

Ribozomi i rRNA su proučavani intenzivno putem određivanja sedimentacionog koeficijenta. Najviše je istraživana prokariotska bakterija *E.coli* čiji ribozom ima tipični sedimentacioni koeficijent od 70S. Prilikom disocijacije intaktnog ribozoma (70S) nastaju lakša (30S) i teža (50S) subjedinica. Vrednosti sedimentacionih koeficijenata subjedinica se razlikuje od intaktnog ribozoma što je posledica zavisnosti S od oblika partikule. 30S subjedinica sadrži 16S rRNA i 21 različiti protein dok 50S sadrži 5S rRNA i 23S rRNA kao i 34 različita proteina (slika 9-22).

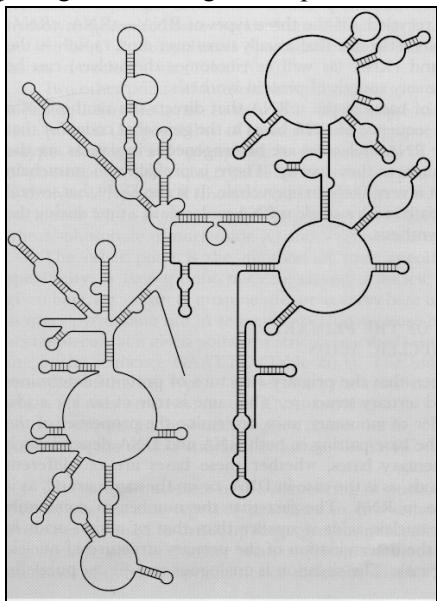
Eukariotski ribozomi u odnosu na prokariotske imaju sedimentacioni koeficijent od 80S gde je mala subjedinica 40S, a velika 60S. Mala subjedinica kod eukariota se sastoji iz 18S rRNA dok velika iz tri tipa rRNA i to: 5S, 5.8S i 28S.



Od navedenih tipova rRNA samo je kod 16S rRNA određena sekundarna struktura (slika 9-23).

Od tri vrste RNA najmanje je zastupljena mRNA. Kod većine ćelija mRNA ne čini više od 5 do 10% ukupne ćelijske RNA, dok tRNA učestvuje sa 10-15%, a različiti tipovi rRNA sa 75-80%. Sekvence baza u mRNA određuju redosled aminokiselina u proteinima. U ćelijama koje brzo rastu, mnogi različiti proteini potrebni su u kratkom vremenskom periodu. Zbog toga je neophodan brzi protok informacija u biosintezi proteina i zato se mRNA formira kada je potrebna. Ona usmerava biosintezu proteina, a nakon toga se degradira tako da nukleotidi iz kojih je izgrađena mogu biti ponovo iskorišćeni. Od tri tipa RNA - tRNA, rRNA i mRNA, ova poslednja se uobičajeno najbrže sintetizuje i razgrađuje u ćeliji. tRNA i rRNA (kao i sami ribozomi) učestvuju intaktni u više ciklusa sinteze proteina.

Sekvence baza u mRNA koje usmeravaju biosintezu određenog proteina, odražavaju sekvencu baza DNA u genu koji sadrži kod za taj protein. Molekuli mRNA su heterogeni po veličini, kao što su to i proteini čije sekvence oni određuju. Veruje se da ne postoji vezivanje lanaca mRNA između sebe već da ona ima oblik otvorenog lanca.



Slika 9-23.  
Sekundarna struktura 16S rRNA.

### 9.3. Nukleinske kiseline biljaka

Nukleinske kiseline biljaka se razlikuju od nukleinskih kiselina drugih organizama jer su raznorodnije (sto je normalno ako se ima u vidu da biljke sintetizuju daleko veći broj jedinjenja u odnosu na ostale organizme). Iz biljaka su prvi put izolovane 1936.g. od strane Belozerskog i saradnika.

**Deoksiribonukleinske kiseline (DNA)** - u biljkama su uglavnom locirane u jedru, mitohondrijama, i hloroplastima. Najveći deo DNA se nalazi u jedru udružen sa baznim proteinima histonima. DNA jedra se naziva i nuklearnom DNA. Ona je udružena sa malom količinom tzv. satelitske DNA koja se odlikuje visokorepetitivnom sekvensijom. U odnosu na DNA jedra zastupljena je sa 1% u biljkama. DNA jedra se medjusobno razlikuju u molarnom odnosu baza (A+T/G+C) zavisno od biljne vrste. Kod pšenice on iznosi 0.94, crnog luka 0.58, pasulja 0.69, mrkve 1.16, deteline 1.41 itd. Za biljke je karakteristično da sadrže

DNA u kojima preovladjuje A+T nad G+C tipom (DNA "AT tipa"). U nekim biljnim DNA (kao npr. iz ponika pšenice) citozin može biti zamenjen 5'-metilcitozinom. Specifičnost biljaka je i u tome što pored nuklearne DNA takođe sadrže *hloroplastnu* i *mitohondrijsku* DNA.

Hloroplastna DNA (htDNA) - se razlikuje od nuklearne DNA. Ima strukturu dvostruko uvijenog cirkularnog molekula dužine 37-55 nm i molekulsku masu 7.000.000 - 16.000.000. htDNA ne sadrži metilovane nukleobaze i može se lako renaturisati.

Mitohondrijska DNA (mtDNA) - je cirkularni dupli heliks sa Mr 22.000.000 - 160.000.000. Čini oko 10% od ukupne DNA celije. Značajna je za mitohondrije kao sastojak "aparature" za sintezu proteina, a istovremeno i za sintezu tRNA i rRNA.

DNA u biljkama ima iste osnovne funkcije kao i u drugim organizmima i to:

- ◆ autokatalitičku (učestvuje u sopstvenoj sintezi) i
- ◆ heterokatalitičku (šablon je za sintezu RNA)

Najviše DNA ima u semenu gde je potrebna za biosintezu proteina u toku klijanja. Medutim, u nekim biljkama količina DNA se može povećati i u drugim fazama ontogeneze kao npr. kod duvana (*Nicotinum tabacum*) gde se može uvećati i do 30 puta u periodu ekspanzije lista.

**Ribonukleinske kiseline (RNA)** - su polimerna jedinjenja i kao DNA izgradjena iz specifičnih azotnih baza, riboze i fosforne kiseline. Njihovi nukleotidi (ribonukleotidi) ne razlikuju se samo u strukturi i veličini molekula već i biohemiskoj i fiziološkoj funkciji, svojstvima i lokalizaciji u celiji. Celije biljaka sadrže tri vrste ribonukleinskih kiselina koje se međusobno razlikuju u strukturi i funkciji i to:

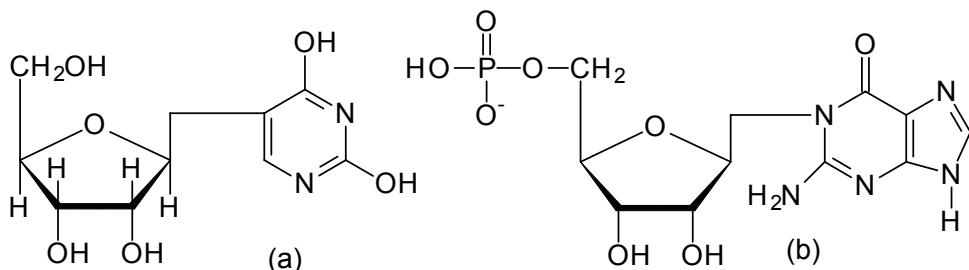
- ◆ *informacionu ili mesendžer ribonukleinsku kiselinu* (iRNA ili mRNA) – koja je posrednik za predaju informacije od DNA "aparaturi" za sintezu proteina,
- ◆ *prenosnu ili transfernu ribonukleinsku kiselinu* (tRNA) - koja prenosi aminokiseline do ribozoma - mesta sinteze proteina i
- ◆ *ribozomalnu ribonukleinsku kiselinu* (rRNA) - koja je glavni sastojak ribozoma.

Navedene vrste RNA u biljkama se nalaze u jedru i citoplazmi kao i citoplazmatičnim organelama, a pre svih ribozomima, mitohondrijama i hloroplastima.

Informaciona (mesendžer) ribonukleinska kiselina (i/mRNA) - je šablon za sintezu proteina. Stvara se u jedru ("kancelariji") i ponaša kao "glasnik" ("mesendžer") koji prenosi informaciju u citoplazmu ("pogon") o vrsti molekula proteina koji treba da se sintetizuje. To je veoma raznovrsna RNA čiji molekuli

mogu odgovarati jednom geni ili grupi gena. Zastupljena je od 3-7% u odnosu na ukupnu RNA u celije. Prosječna i/mRNA biljaka je izgradjena od oko 3.000 nukleotida.

Transferna ribonukleinska kiselina (tRNA) - je "nosač" aktiviranih amino kiselina u ribozome gde se povezuju peptidnom vezom u sekvene odredjene šablonom iRNA. Izgradjena je iz približno 80 nukleotida. Lokalizovana je u hijaloplazmi celija, soku jedra, hloroplastima i mitochondrijama. Hemski sastav tRNA biljaka se razlikuje od ostalih RNA u prisustvu većeg broja minornih nukleotidnih ostataka. Danas je poznato oko 50 minornih ostataka koji ulaze u sastav tRNA, kao npr. pseudouridin, neoguanilna kiselina, 1-metil-adenin i dr. Strukture nekih minornih baza date su na slici 9-24. Pretpostavlja se da minorni nukleotidi štite tRNA od napada ribonukleaza. Smatra se da neke od navedenih baza učestvuju u kodiranju aminokiselina i imaju značajnu ulogu u "upoznavanju" enzima (aminoacil-tRNA-sintetaze) koji učestvuje u aktivaciji aminokiselina. Transfer RNA pripada GC-tipu RNA.



Slika 9-24. Strukture pseudouridina (a) i neoguanilne kiseline (b).

Svaka individualna tRNA je sposobna da prenosi odredjenu aminokselinu u procesu biosinteze proteina. Zbog navedenog nazivi tRNA se dopunjaju prefiksom aminokiselina kao npr. metioninska, alaninska, valinska ili sl. te se skraćeno obeležavaju sa tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>ala</sup>, tRNA<sup>val</sup> itd.

Svi molekuli tRNA imaju na 3'-kraju triplet baza ACC koji služi za vezivanje aminokiselina. Karboksilna grupa aminokiselina se vezuje estarskom vezom za 3'-hidroksilnu grupu adenozilnog ostatka. Petlja koja se nalazi nasuprot mestu vezivanja odredjene aminokiseline naziva se **antikodon** i sadrži specifičan triplet nukleobaza koji je komplementaran odkovarajućem tripletu kodona iRNA. On je sposoban da prepozna odgovarajuće tri baze kodona tRNA, i da sa njima reaguje (tRNA<sup>ala</sup> ima antikodon IGC)(slika 9-19).

Pored antikodonske petlje tRNA sadrži i dve druge petlje koje su prema nukleotidima nazvane pseudouridinskom (I) i dihidrouridinskom petljom (III). U tRNA<sup>ala</sup> na 5'-kraju, koji je fosforilisan nalazi se poliguanin. Od ukupnih nukleotida koji izgradjuju tRNA<sup>ala</sup> 10% su minorne baze od kojih 4-5% je pseudouridinska kiselina. One štite tRNA od delovanja ribonukleaze. Pretpostavlja se da neke od

minornih baza “prepoznaju” enzim aminoacil-tRNA-sintetazu koji reaguje sa odredjenom amino-kiselinom u toku njene aktivacije.

tRNA različitih struktura mogu vezivati istu aminokiselinu ukoliko imaju isti antikodon. Ovakve tRNA se nazivaju *izoakceptorske* tRNA. One se numerišu u indeksu arapskim brojevima kao npr. izoakceptorske tRNA koje vezuju valin obeležavaju se kao tRNA<sub>1</sub><sup>val</sup>, tRNA<sub>2</sub><sup>val</sup> itd. Dokazano je da ima 4 izoakceptorskih tRNA<sup>leu</sup>, 3 izoakceptorske tRNA<sup>pro</sup> i dve izoakceptorske tRNA<sup>ser</sup>.

*Ribozomalna ribonukleinska kiselina (rRNA)* - je najznačajnija komponenta ribozoma – ribonukleoproteinskih čestica koje se nalaze u citoplazmi, mitohondrijama i hloroplastima gde učestvuju u biosintezi proteina. U ćelijama biljaka su zastupljene 70-80% u odnosu na ukupnu RNA i imaju Mr od 600.000 do nekoliko miliona. Ribozomi se zavisno od lokalizacije medjusobno razlikuju u fizičkim i hemijskim svojstvima (veličini, obliku, hemijskom sastavu) kao i funkciji u biosintezi proteina. Izgradjeni su iz dve subjedinice različitih veličina kao što je pokazano slikom 9-22.

Citoplazmatični ribozomi biljaka su izgradjeni iz najmanje 80 različitih proteina i 4 molekula RNA. Veća podjedinica ribozoma ima sedimentacioni koeficijent 60 S i sadrži 3 molekula RNA (26 S, 5.8 S i 5 S), kao i 45 različitih proteina. Mala subjedinica (40 S) sadrži 1 molekul RNA (18 S) i 35-45 molekula različitih proteina.

Hloroplastne rRNA su rasporedjene takodje u dve subjedinice. U podjedinici 50 S ribozoma nalaze se 3 molekula RNA (23 S, 5.3 S i 4.5 S), a u 30 S subjedinici nalazi se 1 RNA koja ima manju Mr od napred navedenih RNA. Visokomolekulske rRNA su strukturne osnove za gradjenje ribunukleoproteina. One mogu reagovati sa iRNA, tRNA i sl. Funkcija niskomolekularnih rRNA još nije dovoljno razjašnjena. Nukleinske kiseline biljaka se veoma intenzivno proučavaju jer su osnova genetičkog inženjerstva. Osim navedenog nukleinske kiseline (*viroidi*) mogu biti izazivači bolesti biljaka (npr. viroid koji napada krompir je RNA sa 359 ostataka nukleotida).

## Izvod

♣ Nukleinske kiseline su najesencijalniji sastojci živih organizama jer su ključna jedinjenja u biosintezi proteina.

♣ One čine osnovu života, te se zbog svoje uloge u biosintezi biopolimera nazivaju *programerima života*.

♣ U sastav nukleinskih kiselina od purinskih baza ulaze *adenin* i *gvanin*, a od pirimidinskih *citozin*, *uracil* i *timin* i dve pentoze – *riboza* i *deoksiribozu*, kao i *fosforna kiselina*

♣ Prema hemijskom sastavu i funkciji nukleinske kiselina se dele u dve grupe i to *deoksiribonukleinske kiseline* (DNA) i *ribonukleinske kiseline* (RNA).

♣ Nukleinske kiseline biljaka imaju dve katalitičke funkcije i to autokatalitičku i heterokatalitičku. Prva podrazumeva svojstvo samoobnavljanja što je specifičnost DNA.

♣ DNA održava i prenosi genetičko nasledje i tako održava biološki kontinuitet, a RNA pomaže realizaciju sinteze proteina, tako da svaka od tri vrste RNA (iRNA, tRNA i rRNA) u ovom metaboličkom putu sinteze proteina ima tačno odredjenu funkciju.

♣ Kod nukleinskih kiselina kao i kod proteina razlikujemo primarnu, sekundarnu i tercijarnu strukturu:

- *primarna struktura* - nukleinskih kiselina određuje sekvencu nukleobaza u polinukleotidnom lancu. Primarna struktura DNA se razlikuje od primarne strukture RNA, po azotnim bazama i šećernoj komponenti,

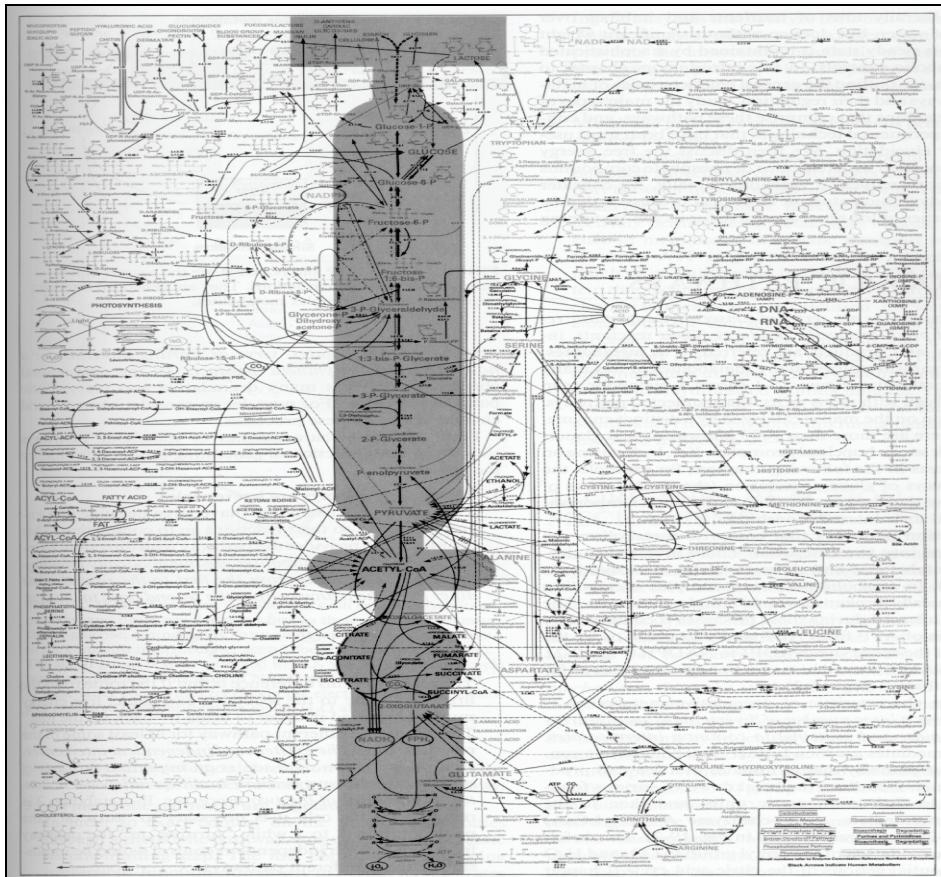
- *sekundarna struktura* - nukleinskih kiselina podrazumeva strukturu u prostoru i ona je stabilizovana vodoničnim vezama,

- *tercijarna struktura* – iako do kraja nije definisana kod svih vrsta nukleinskih kiselina podrazumeva viši oblik organizacije sekundarne strukture.

♣ Nukleinske kiseline biljaka su locirane u ćeliji i to tako da se DNA nalazi u jedru, hloroplastima i mitohondrijama (DNA, htDNA I mtDNA), a RNA u zavisnosti od funkcije u različitim delovima ćelije i to: jedru (iRNA), hijaloplazmi, hloroplastima i mitohondrijama (tRNA) i ribozomima (rRNA).

♣ Nukleinske kiseline biljaka se veoma intenzivno proučavaju jer su osnova genetičkog inženjerstva. Osim navedenog nukleinske kiseline (*viroidi*) mogu biti izazivači bolesti biljaka (npr. viroid koji napada krompir je RNA sa 359 ostataka nukleotida).

# II D E O



## Metabolizam i Bioenergetika

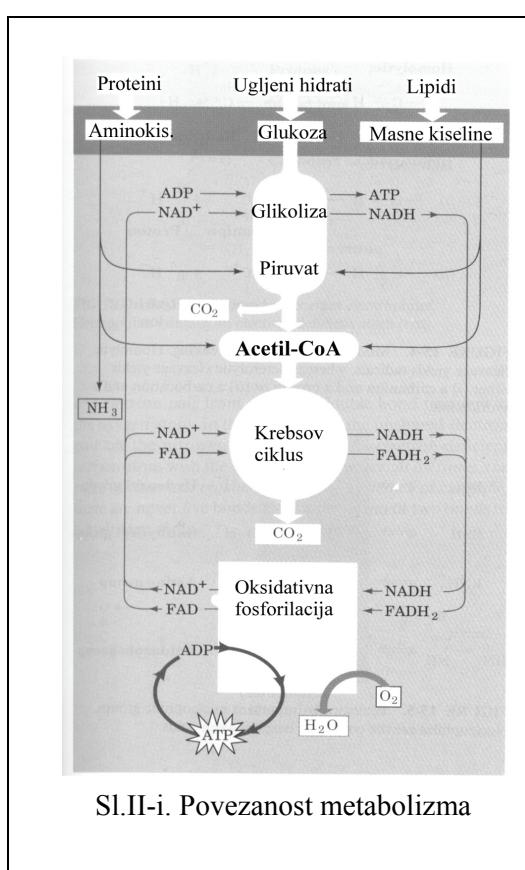
Mapa osnovnih metaboličkih puteva (D.Voet, J.Voet;  
Biochemistry 2<sup>nd</sup> ed, John Wiley and Sons, New York, 1995, str. 413)

Izvor energije za život na zemlji je sunce. U fotosintezi, apsorbovani kvanti sunčeve svetlosti ( $\text{h}\nu$ ) fotolizom molekula vode u zelenim biljkama, oslobađaju kiseonik u atmosferu. Energija sunca se skladišti u granulama skroba u biljnoj ćeliji. Životinje (uključujući i čoveka) koriste energiju nutrienata, tako što skrob razgradjuju do glukoze, a ova oksidacijom do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . U ovim procesima energija za potrebe metabolizma dobija se u serijama reakcija u kojima se elektroni i  $\text{H}^+$  prenose sa *donora na akceptore*. Ovi procesi poznatiji kao *reduks reakcije* su fundamentalni za dobijanje energije iz molekula glukoze. Energija generisana u ovim reakcijama se konzervira prevodjenjem niskoenergetskog ADP u visokoenergetski ATP. Kompleks pomenutih i mnogih drugih reakcija koje teku u serijama u ćeliji, jednom rečju nazivamo **metabolizam i bioenergetika**.

Metabolizam je biohemijska osnova svih životnih procesa. Reakcije biomolekula u ćeliji konstituišu metabolism. Razgradnja velikih molekula (proteina i polisaharida) do malih (aminokiselina i monosaharida) se naziva

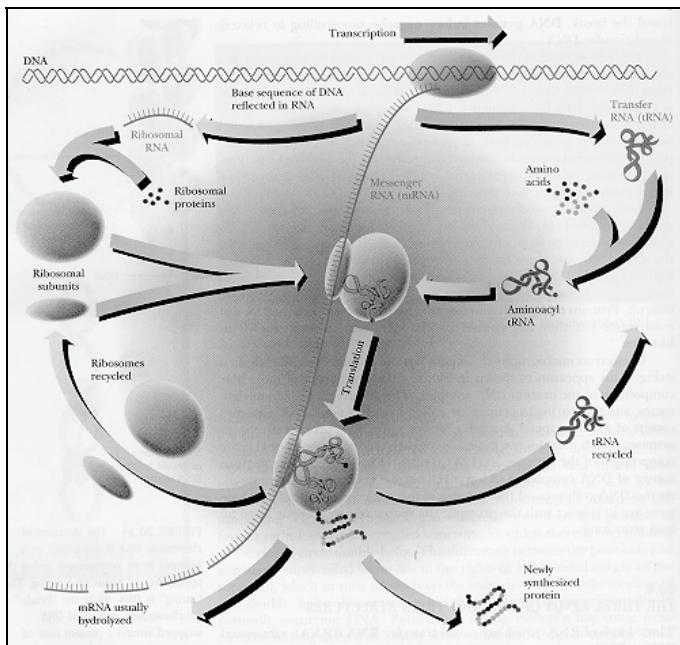
**katabolizmom**, a njihovo nastajanje iz malih molekula **anabolizmom**. Katabolizam i anabolizam su dva odvojena metabolička procesa, sobzirom da reakcije katabolizma nisu proste reversne reakcije ana-bolizma. Katabolizam je oksidativni proces u kojem se stvara energija, dok je anabolizam redukcioni proces u kojem se troši energija.

Mi smo danas u poziciji da proširimo naša ranija saznanja o prirodi anabolizma i katabolizma. Možemo shematski prikazati metaboličke puteve u kojima su eksplicitno naznačene dve najvažnije karakteristike metabolizma: prvo, uloga transfera elektrona, i drugo, uloga ATP u oslobođanju i iskorištavanju energije (slika II-i). Čak i ova proširena shema je vrlo uopštena i dok se najvažniji putevi metabolizma navode u detalje (glikoliza, citratni ciklus, oksidativna fosforilacija itd.) neki su još uvek predmet intenzivnih proučavanja (biosinteza nukleinskih



kiselina i proteina).

# 10. Metabolizam aminokiselina i proteina



Hipotetični model metabolizma aminokiselina i proteina

## 10.1. Biosinteza aminokiselina

## 10.2. Biosinteza proteina

Imajući u vidu napred navedeno lako se uočava da su u biljkama praktično prisutna dva dimanički uravnotežena procesa: **proces katabolizma** i **proces anabolizma**. Vreme za koje se pojedini tkivni proteini razgradjuju i ponovo izgradjuju je veoma različito i kreće se od nekoliko sati do više dana. (tako npr. za albumin biološko vreme polureakcije iznosi 20-25 dana).

Stalno "unošenje" i "iznošenje" proteina neophodno je, jer se na ovaj način vrši potrebna izgradnja novih tkivnih strukturalnih proteina u biljakama, kao i obnova "istrošenih" tkiva. Metabolički put razgradnje proteina praktično počinje delovanjem proteolitičkih enzima, koji složenije proteinske strukture cepaju prvo na duže, a potom i kraće polipeptidne lance, koji se na kraju, kao što je već pomenuto, razgradjuju do aminokiselina. Aminokiseline nastale razgradnjom proteina, polipeptida ili peptida samo jednim delom učestvuju u izgradnji odnosno biosintezi tkivnih proteina biljaka, a drugim delom se dalje razgradjuju. Azot aminogrupe iz aminokiselina se u složenom procesu inkorporira u druga brojna jedinjenja koja sintetizuju biljke, dok se ugljovodonični skelet razgraduje do krajnjih metaboličkih proizvoda  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ .

Razgradnja proteina vrši se uz katalitičko delovanje enzima *proteaza*, koje se, prema mestu nalaženja dele na:

- ◆ *ekstracelularne* i
- ◆ *intracelularne proteaze*.

Prema mestu aktivnog napada u polipeptidnom lancu proteaze se dele na:

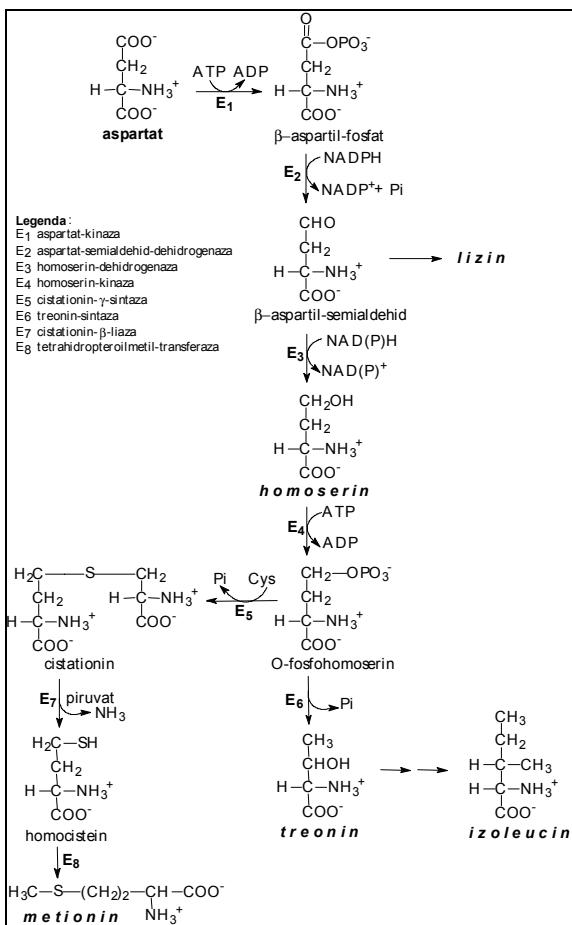
- ◆ *endopeptidaze* ("napadaju" tačno određena mesta u sredini polipeptidnog lanca) i
- ◆ *ezzopeptidaze* ("cepaju" proteinske lance od kraja i to kao *karboksipeptidaze* (deluju na karboksilni kraj) i *aminopeptidaze* (deluje na N –terminalni kraj lanca)).

Za razliku od mnogih drugih enzima, proteaze nisu strogo supstratspecifične i ne deluju specifično na odredjene proteine, već su usmerene na odredjene veze i strukturne karakteristike polipeptidnog lanca.

Aminokiseline nastale proteolitičkom razgradnjom proteinskih i pep-tidnih lanaca imaju različite metaboličke puteve.

# 10.1.

## Biosinteza aminokiselina



### 10.1. Biosinteza aminokiselina

- 10.1.1. Biosinteza aminokiselina iz glutamata
- 10.1.2. Biosinteza aminokiselina iz aspartata
- 10.1.3. Biosinteza aminokiselina iz piruvata
- 10.1.4. Biosinteza aminokiselina iz 3-fosfoglicerata i ribulozo-1,5-difosfata
- 10.1.5. Biosinteza aminokiselina iz fosfoenolpiruvata i D-eritrozo-4-fosfata
- 10.1.6. Biosinteza histidina
- 10.1.7. Putevi pretvaranja aminokiselina u biljkama

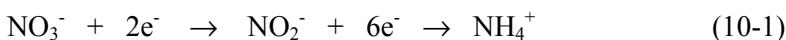
Putevi biosinteze nekih esencijalnih aminokiselina

Aminokiseline u biljkama se uglavnom razgradaju reakcijama *deaminacije* i *dekarboksilacije*, kao i procesima konačne razgradnje tako nastalih medjuproizvoda, do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Treći tip reakcija, koje su prisutne u pojedinim fazama razgradnje aminokiselina, su reakcije *transaminacije*. U toku odvijanja ovih reakcija dolazi do prenošenja aminogrupe sa jedne aminokiseline (npr. alanina) na ketokiselnu (npr.  $\alpha$ -ketoglutarat) pri čemu nastaje druga aminokiselina (glutamat) itd.

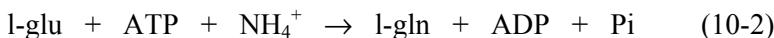
Imajući u vidu centralno mesto *ciklusa trikarbonskih kiselina* (CTK) u metaboličkim procesima neophodno je uspostaviti odgovarajuću vezu izmedju ovog ciklusa i ciklusa koji obuhvata celokupan metabolizam aminokiselina (njihovu razgradnju - katabolizam i njihovu sintezu - anabolizam). Na slici 10-1 prikazana je direktna povezanost ciklusa trikarbonskih kiselina i kataboličko-anaboličkih puteva metabolizma pojedinih aminokiselina.

Živi organizmi se medjusobno razlikuju u sposobnosti da sintetizuju aminokiseline, kao i u oblicima ugljenika i azota koje koriste za njihovu biosintezu. Fotosintetičke biljke kao izvor ugljenika koriste pre svega  $\text{CO}_2$  iz atmosfere, a kao izvor azota neorganska azotna jedinjenja nitrati i amonijak iz zemljišta (a leguminozne biljke i molekulski azot iz atmosfere). Shematski prikaz biosinteze nekih aminokiselina dat je na slici 10-1.

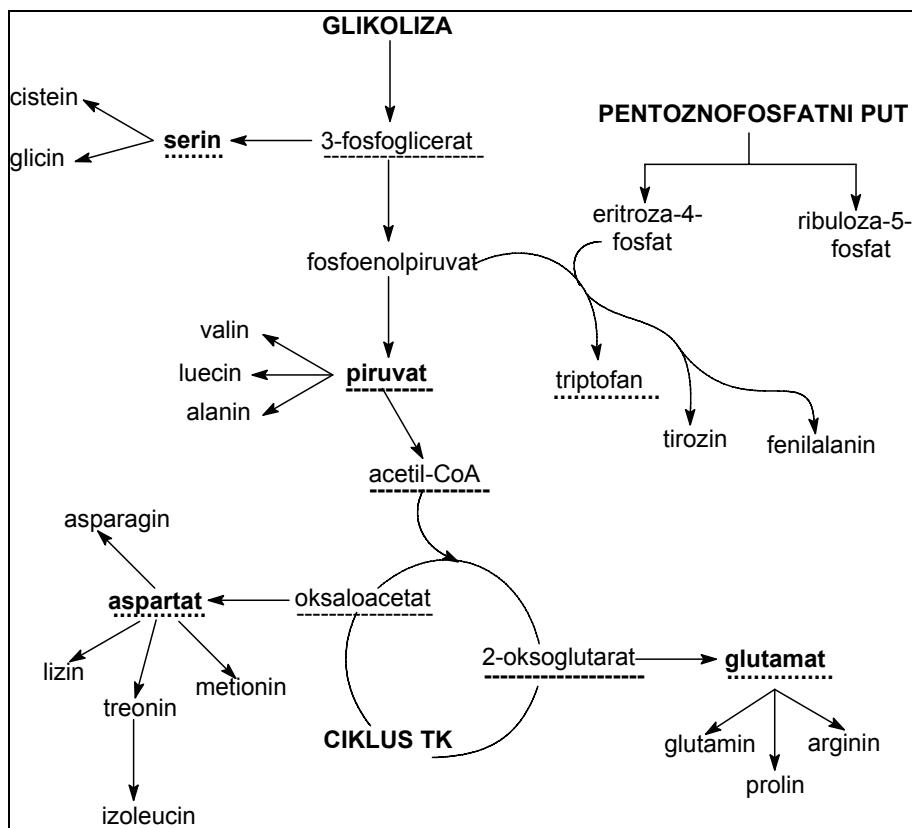
Ugljovodonični skelet za sinteze aminokiselina se dobija od intermedijera *glikolize*, *ciklusa trikarbonskih kiselina* i *pentozofosfatnog puta*. To su 2-oksoglutarat, oksaloacetat, piruvat, 3-fosfoglicerat i eritrozo-4-fosfat. Nitrati biljke uzimaju iz zemljišta u kojem on nastaje raspadom organske materije. Neke biljke kao npr. heljda (*Polygonum fodopyrum*) i duvan (*Nicotiana tabacum*) mogu akumulirati nitrat u većim količinama i uz pomoć enzima asimilacije azota (opširnije u poglavljiju o enzimima) redukovati ga do  $\text{NH}_4^+$  prema jednačini 10-1.



Nagradjeni  $\text{NH}_4^+$  se reduktivnom aminacijom ugradjuje u glutamat prema jednačini 10-2, - ključnoj reakciji u asimilaciji azota. Reakcija je katalizovana enzimom glutamin-sintetazom.



Glutamin u biljkama služi kao multifunkcionalni prekursor kako za razne aminokiseline tako i za purinske i pirimidinske baze. Pored glutamina višak amonijum jona se "skladišti" u biljkama i u obliku asparagina. Koji će se amid nagraditi zavisće od biljne vrste odnosno od aktivnosti enzimskih sistema u njima.



Slika 10-1. Shematski prikaz biosinteze nekih proteinskih aminokiselina:  
 (-----) jedinjenja koja daju skelet aminokiselina i (.....)  
 prekursori za druge aminokiseline.

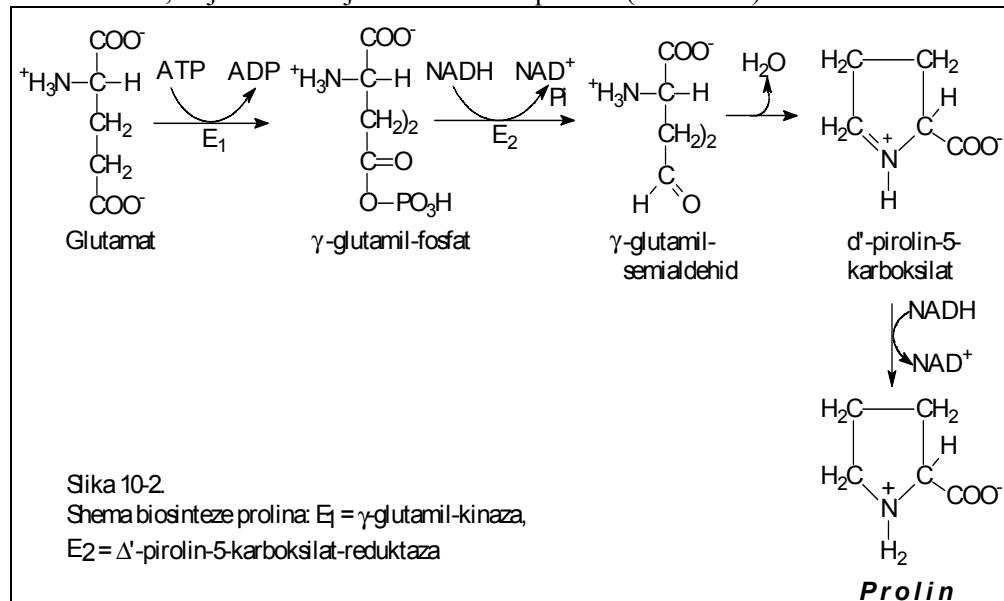
Biosinteza aminokiselina se odvija najvećim delom u hloroplastima, a u manjem intenzitetu i mitochondrijama i citoplazmi. Novija istraživanja su pokazala da se biosinteza aminokiselina može odvijati i u podzemnim delovima biljaka i to pre svega lukovici i krtolama.

Biosinteze proteinskih aminokiselina se mogu prema prekursorima (koji sadrže ugljovodonični deo) podeliti u 6 grupa i to biosinteze čiji su prekursori:

- ◆ glutaminska kiselina,
- ◆ asparaginska kiselina,
- ◆ piruvat,
- ◆ 3-fosfoglicerat i ribulozo-1,5-difosfat,
- ◆ fosfoenolpiruvat i eritrozo-4-fosfat i
- ◆ 1-pirofosforibozil-5-fosfat.

### 10.1.1. Biosinteza aminokiselina iz glutamata

Glutaminska kiselina služi kao bazni skelet za biosintezu proteinskih aminokiselina glutamina, arginina i prolina, kao i neproteinskih aminokiselina ornitina i citrulina (intermedijera za arginin). Istovremeno se sintetizuje i hidroksiprolin (aminokiselina nadjena u proteinima nekih biljaka) hidroksilovanjem prolina. Smatra se da se prolin u biljkama sintetizuje tako što se glutamat prvo fosforiliše sa ATP u acil-fosfat koji se potom redukuje sa NADH u  $\gamma$ -semialdehid-glutaminske kiseline. Gubitkom vode semialdehid se ciklizuje (u neenzimskoj reakciji) u pirolin-5-karboksilat, koji se redukuje sa NADH do prolina (slika 10-2)

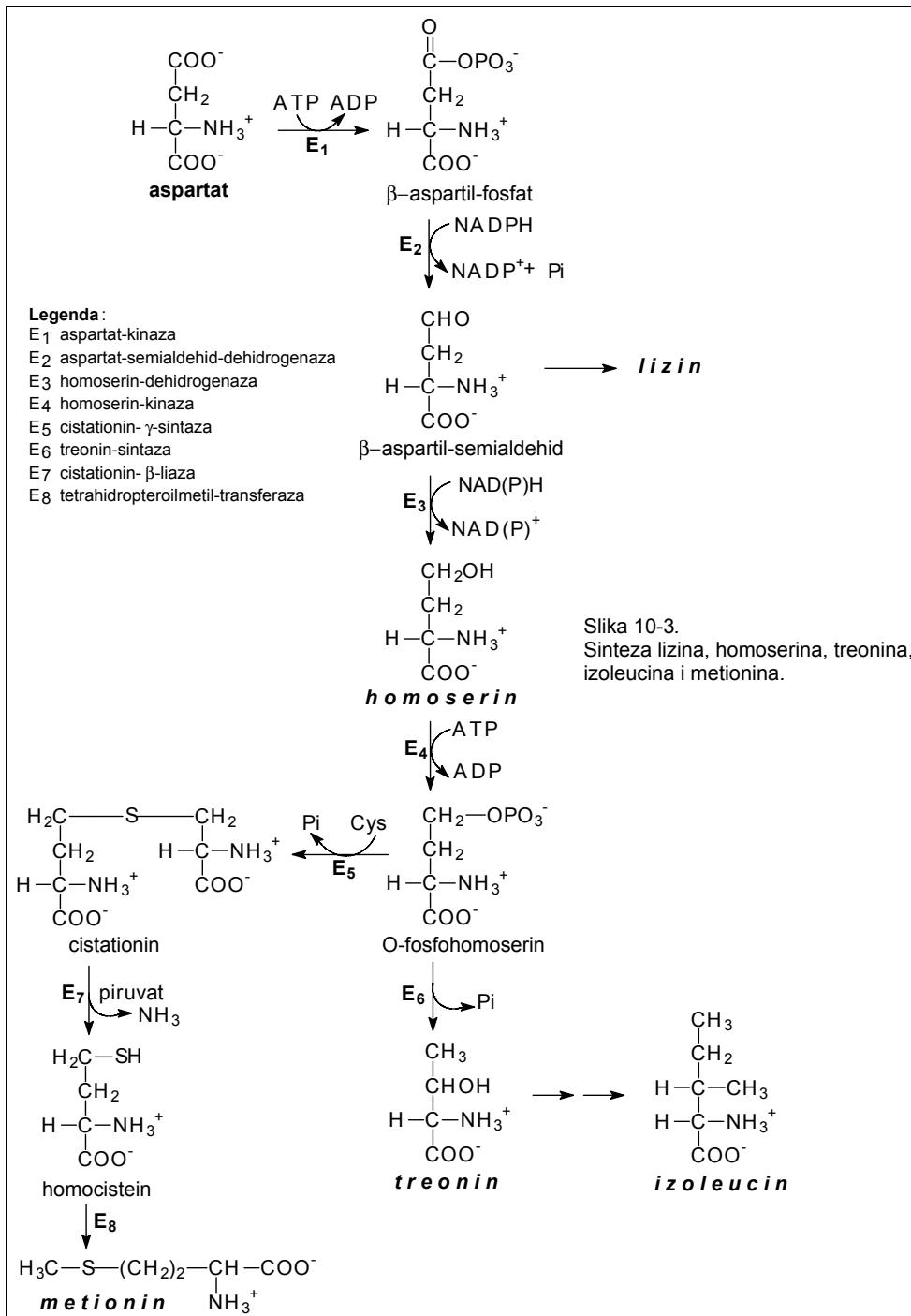


Arginin se sintetizuje drugim biohemijskim putem u kojem se glutamat acetiluje. Postojeći kontrolni mehanizmi usmeravaju azot ka sintezi arginina ili prolina.

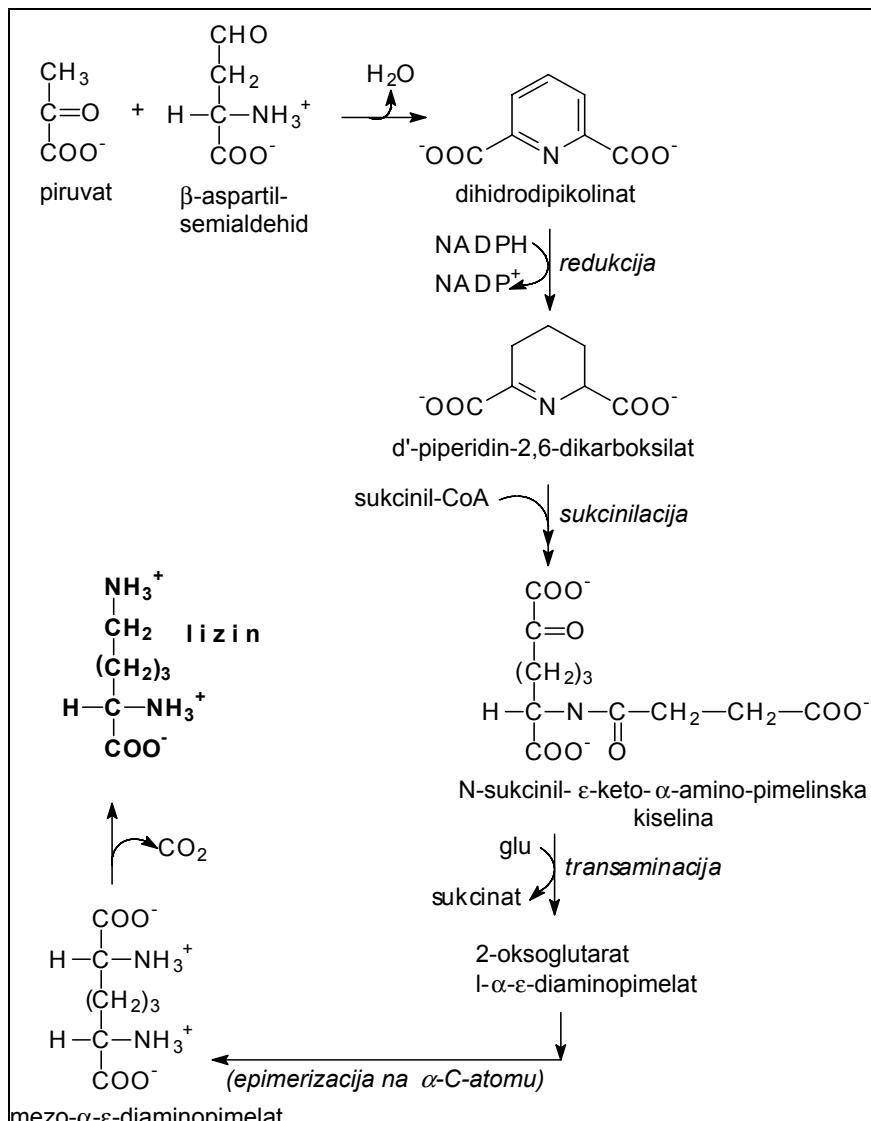
### 10.1.2. Biosinteza aminokiselina iz aspartata

Familija aspartata obuhvata nekoliko aminokiselina i to: lizin, homoserin, treonin, izoleucin, metionin (slika 10-3). Aspartat kao prekursor za ove biosinteze se sintetizuje transaminacijom glutamata (donora amino-grupe) i oksaloacetata (intermedijera ciklusa trikarbonskih kiselina) (jednačina 10-3).





Aminokiselina lizin se sintetizuje i iz  $\beta$ -aspartil-semialdehida (slika 10-4).

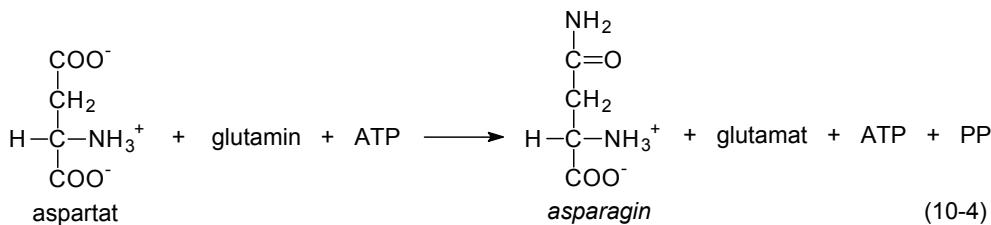


Slika 10-4. Shema biosinteze lizina.

U navedenim biosintezama postoje nekoliko kontrolnih tačaka. Prvi enzim u biosintezi lizina, metionina, treonina i izoleucina, E<sub>1</sub> sadrži izoenzime osetljive na inhibicije lizinom ili treoninom. U toku sinteze lizina, metionina i treonina aspartat se inicijalno pretvara u semialdehid enzimima *aspartat-kinazom* (EC 2.7.2.4) i

*aspartat- $\beta$ -semialdehid-dehidrogenazom* (EC 1.2.1.11) (reakcijom analognom kod pretvaranja glutamatata u semialdehid). Od ove tačke razdvajaju se biosintetički putevi lizina od treonina odnosno metionina. Lizin se sintetizuje iz diaminopimelata, a treonin i metionin u posebnim putevima preko homoserina i O-fosfohomoserina (slike 10-3 i 10-4). Homoserin je dominantna aminokiselina u grašku koji klijira. Treonin se gradi iz O-fosfohomoserina - eliminacijom neorganskog fosfora i migracijom hidroksilne grupe sa  $\gamma$ -na  $\beta$ -ugljenikov atom. On služi kao prekursor za biosintezu izoleucina.

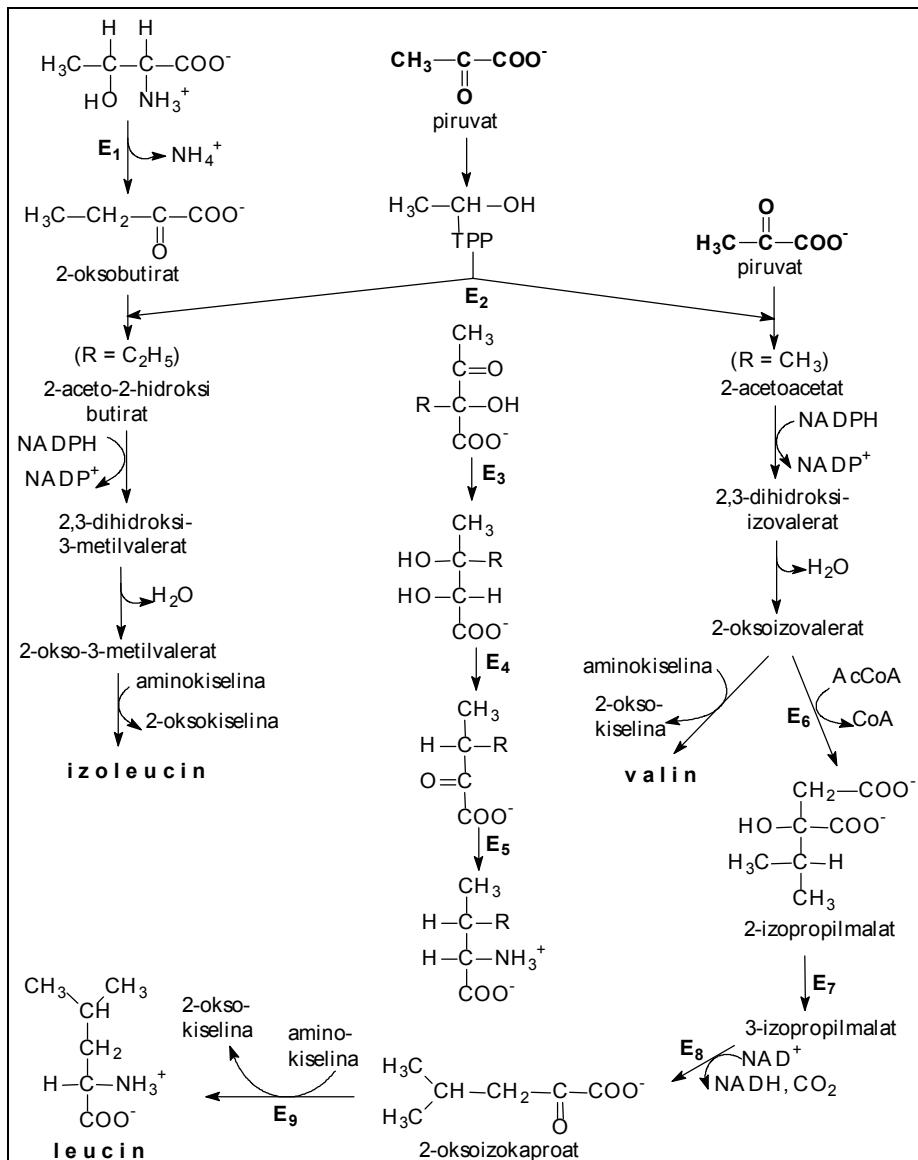
Atom sumpora (za aminokiselinsku metionin) se uvodi preko cisteina, koji u biljnim tkivima reaguje sa O-fosfohomoserinom u prisustvu enzima *cistation- $\gamma$ -sintaze* (EC 4.4.1.1) i gradi tioetar cistationin intermedijer u *trans-sulfuraciji*. Veoma rasprostranjen enzim u biljkama je *cistation- $\beta$ -liaza* (EC 4.2.1.22) koja katalizuje reakciju  $\beta$ -eliminacije i gradi homocistein, piruvat i amonijak iz cistationina. Krajnji stepen u biosintezi metionina je uvodjenje metil-grupe. Donatori su verovatno derivati folne kiseline. Nagradjeni metionin nije značajan samo kao proteinska aminokiselina već i kao donator metil-grupa (u obliku S-adenozil-metionina) u mnogim reakcijama u ćelijama, a isto tako i kao inicijator sinteze proteina. Lizin (slika 10-4) se sintetizuje kondenzacijom  $\beta$ -aspartil-semialdehida i piruvata u dihidropikolinat koji potom podleže sukcesivnoj redukciji (sukcinilacija i deacilacija) i gradi diaminopimelat. Drugi atom azota se uvodi transaminacijom. Prvi enzim specifičan za biosintezu (*dihidropikolinat-sintaza*; EC 4.2.1.52) i poslednji (*diaminopimelat-dekarboksilaza*; EC 4.1.1.20) su lokalizovani u hloroplastima. Iz aspartata se sintetizuje i asparagin u uvođenjem drugog molekula azota prema jednačini 10-4.



### 10.1.3. Biosinteza aminokiseline iz piruvata

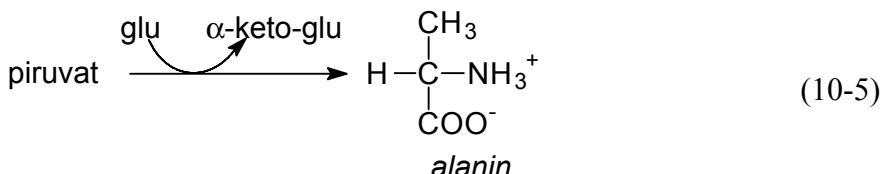
Iz piruvata se sintetizuju tri aminokiseline i to: valin, leucin i izoleucin. Izoleucin može nastati iz dva prekursora i to treonina i piruvata. Biosinteza valina i leucina je katalizovana istim enzimima koji katalizuju inicijalnu reakciju *kondenzacije, redukcije* (u koje je uključena simultana intermolekulска migracija alkila), *dehidratacije* i kao krajnje reakcije *transaminacije*. Leucin i valin imaju isti biosintetički put do 2-oksoizovalerata posle čega se ovaj intermedijer transaminacijom prevodi u valin ili sa acetil-CoA gradi izopropilmalat. Izomerizacijom i oksidativnom dekarboksilacijom prevodi se 2-izopropilmalat u 2-

oksoizokaproat koji učestvuje u reakcijama transaminacije i gradi *leucin*. U svakoj ovoj sintezi 2-oksokiselina ima podesan ugljenikov skelet (koji se sintetizuje pre uvodjenja amino-grupe) za sintezu napred navedenih aminokiselina (slika 10-5).



Slika 10-5. Shema biosinteze valina, leucina i izoleucina; (E<sub>1</sub> treonin-deaminaza, E<sub>2</sub> acetoacetat-sintaza, E<sub>3</sub> acetoacetat-reduktaza, E<sub>4</sub> dihidroksiacil-dehidrataza, E<sub>5</sub> valinamino-transferaza, E<sub>6</sub> izopropilmalat-sintaza, E<sub>7</sub> izopropilmalat-mutaza, E<sub>8</sub> izopropilmalat-dehidrogenaza, E<sub>9</sub> leucinamino-transferaza).

Leucin i valin inhibiraju *acetoacetat-sintazu* (EC 4.1.3.18), a Leu još retroaktivno inhibira *izopropilmalat-sintazu* (EC 4.1.3.12) prvi enzim u granjanju puteva koji vode ka biosintezi leucina. Izoleucin inhibira *treonin-deaminaze* (EC 3.5.4.42), a valin aktivira ovaj enzim. Treonin-deaminaza je izolovana iz spanaća i ima slična svojstva kao enzim izolovan iz mikroorganizama. Iz piruvata se sintetizuje još i alanin prema jednačini 10-5.

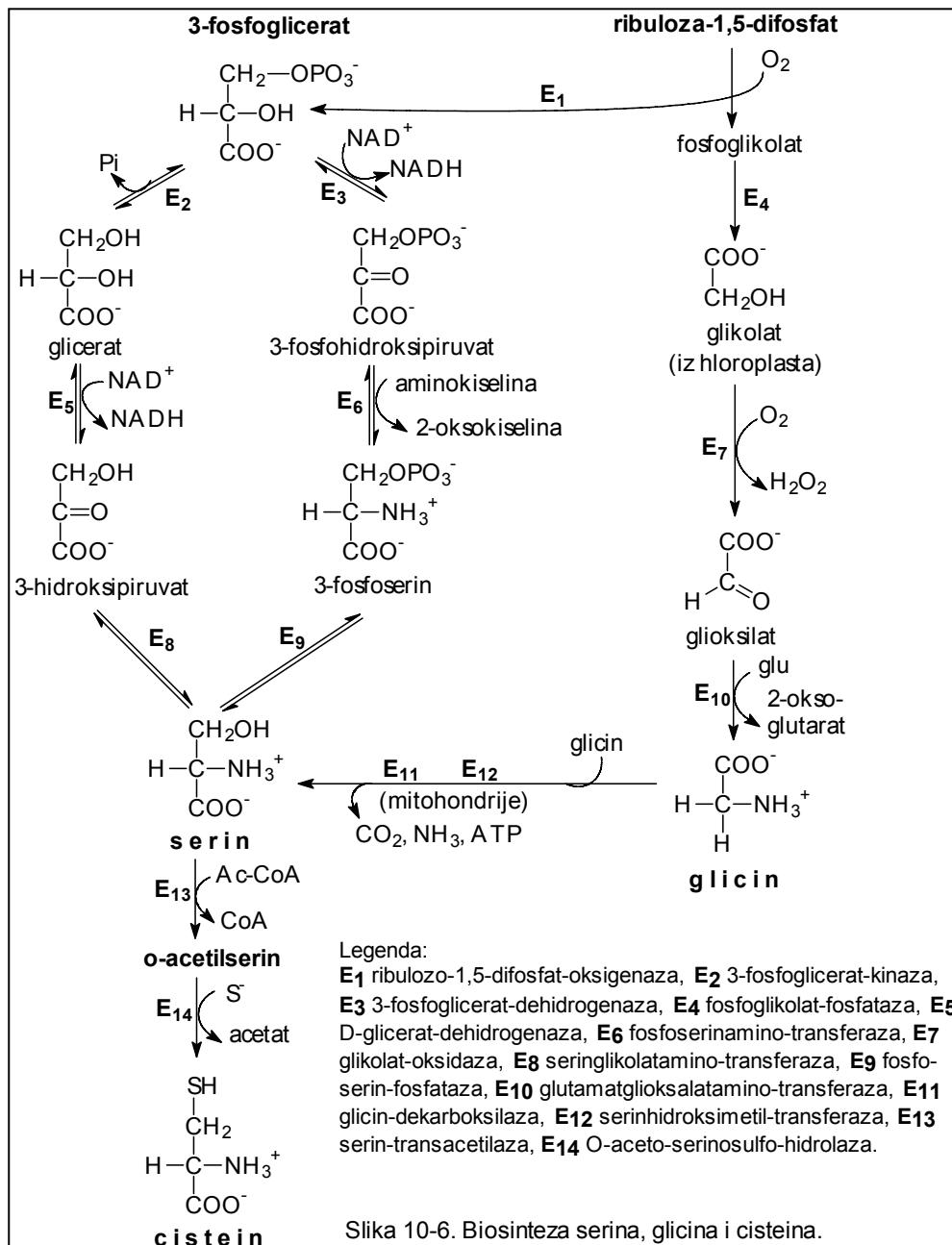


#### 10.1.4. Biosinteza aminokiselina iz 3-fosfoglicerata i ribulozo-1,5-difosfata

Iz 3-fosfoglicerata i ribulozo-1,5-difosfata u biljkama se sintetizuju glicin, serin i cistein pomoću tri različita puta (slika 10-6). Fosforilisan put je dokazan u semenu koje klija, a prvi enzim puta koji nije fosforilisan je dokazan u lišću C<sub>4</sub> biljaka.

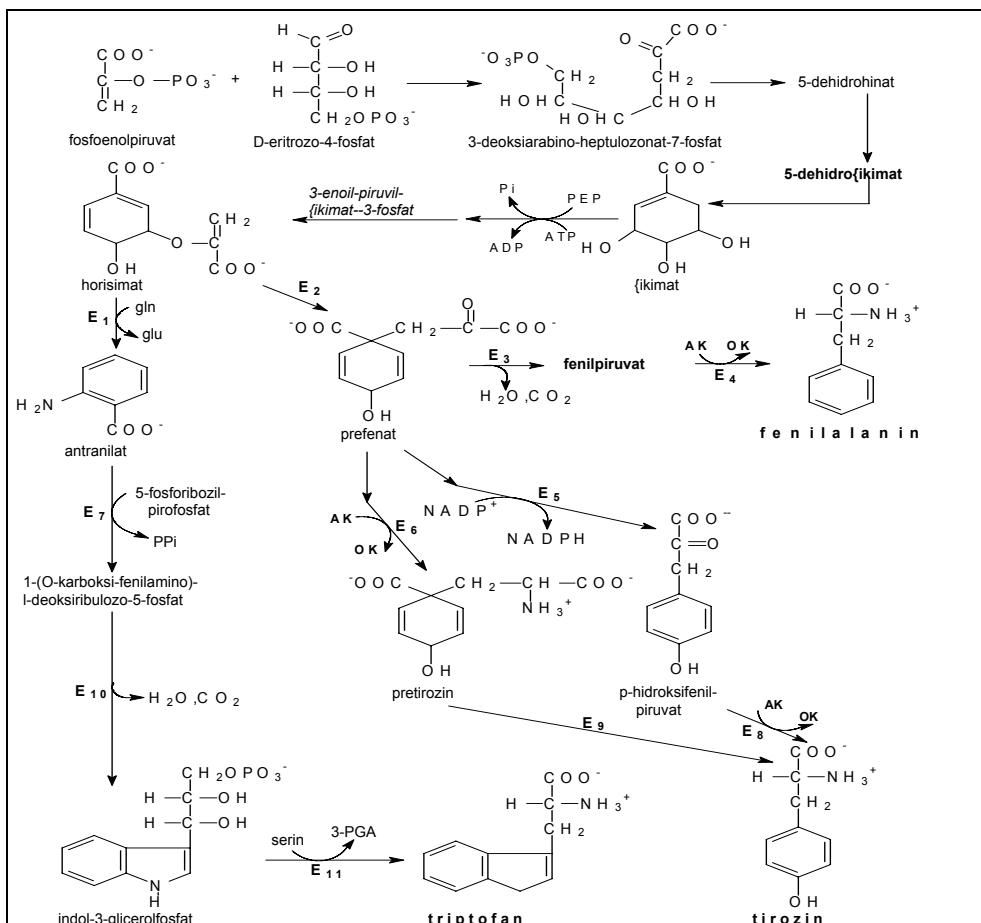
Za biosintezu serina prekursor ugljenikovog skeleta je intermedijer glikolize 3-fosfoglicerat. Iz njega se po nefosforilisanom putu preko inicijalne hidrolize vrši oksidacija kao inicijalna reakcija, a potom transaminacija i na kraju hidroliza. Hloroplasti i peroksizomi su značajni u biosintezi glicina i serina iz fosfoglikolata jer se oni u njima grade u toku fotorespiracije. Glikolat nagradjen u hloroplastima se transportuje u peroksizomima gde se brzo metaboliše u glioksilat u koji se uvodi atom azota iz glicina transaminacijom. Glicin je glavni prekursor serina u mitohondrijama gde 2 molekula glicina daju jedan molekul serina uz eliminaciju CO<sub>2</sub> i amonijaka. Ostatak iz ove reakcije izgradjen iz C<sub>1</sub> jedinice (hidroksiimetil-ostatak) se kao derivat folne kiseline (5,10-metilentetra-hidro-folata) prenosi na drugi molekul glicina. Reakcija je katalizovana *serinhidroksimetil-transferazom* (EC 2.1.2.1). Sinteza serina iz glicina u mitohondrijama se može kuplovati i sa proizvodnjom ATP. Amonijak koji se oslobadja može se reasimilovati mitohondrijskom i citosolnom glutamat-dehidrogenazom ili plastidnom glutamin-sintetazom (slika 10-6). Kontrola mehanizma kod navedenih biosintetičkih puteva je dokazana jedino na prvom enzimu fosforilisanog puta biosinteze serina *3-fosfoglicerat-dehidrogenazi* (EC 1.1.1.95). Ona može biti inhibirana svojim krajnjim proizvodom (serinom). Da bi se nagradio cistein od serina mora se supstituisati atom S u cisteinu sa kiseonikom. Ovo je moguće ostvariti ako se serin aktivira u O-acetil-serin reakcijom u kojoj se sulfid inkorporira uz postepeno oslobadjanje acetata. Nije još poznat donor sumpora u višim biljkama.

Prepostavlja se da je to "vezan" sumpor, jer je slobodan sumpor potencijalan inhibitor za mnoge enzime



## 10.1.5. Biosinteza aminokiselina iz fosfoenolpiruvata i D-eritrozo-4-fosfata

Aromatične aminokiseline tirozin, fenilalanin i triptofan se sintetizuju iz fosfoenolpiruvata i D-eritrozo-4-fosfata po putu šikimske kiseline u bakterijama. Smatra se da se na isti način napred navedene aminokiseline sintetizuju i u biljkama (slika 10-7).



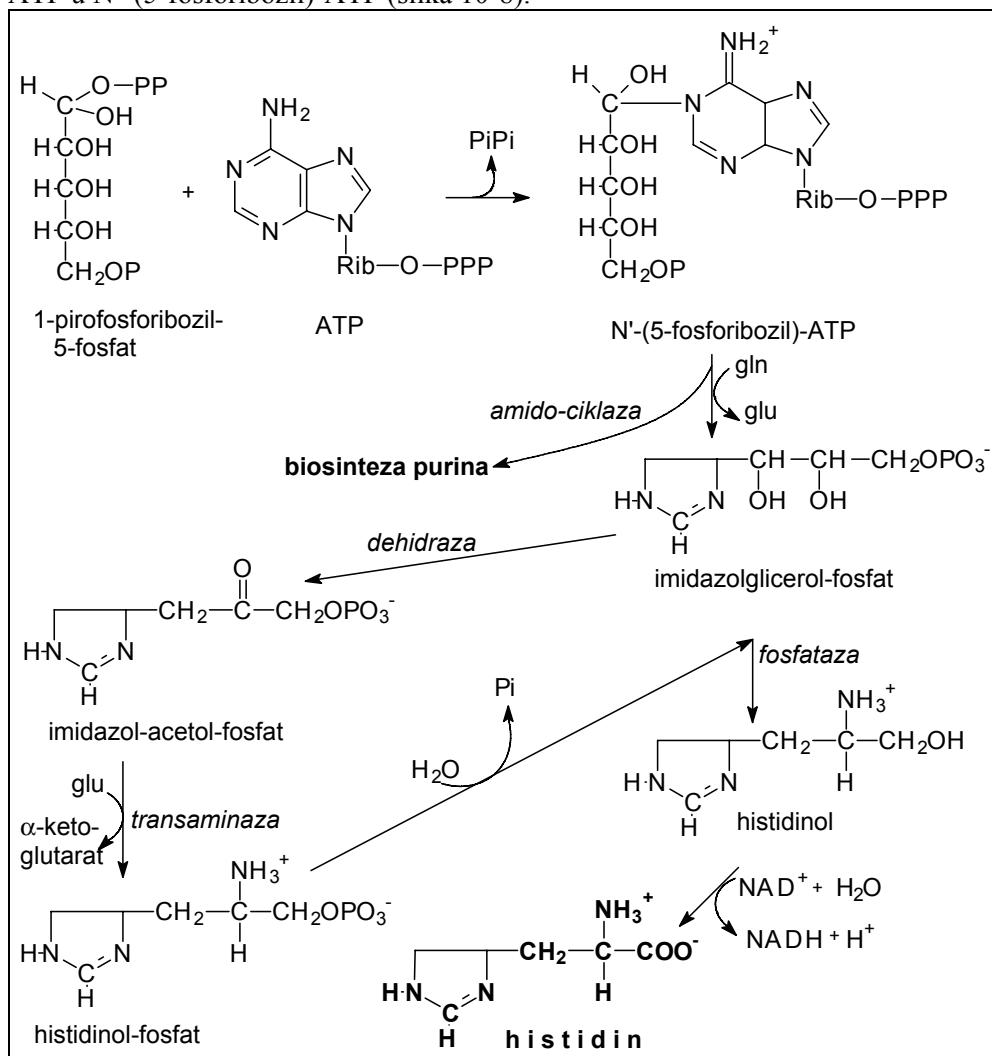
Slika 10-7.

Shema biosinteze fenilalanina, tirozina i triptofana. **Legenda:** E<sub>1</sub> antranilat-sintetaza, E<sub>2</sub> horisimat-mutaza, E<sub>3</sub> prefenat-dehidrataza, E<sub>4</sub> fenilpiruvatamino-transferaza, E<sub>5</sub> antranilat-5-fosforibozil-1-pirofosforibozil-transferaza, E<sub>7</sub> N'-5'-fosforibozilantranilat izomeraza, E<sub>8</sub> p-hidroksifenilpiruvatamino-transferaza, E<sub>9</sub> pretyrosin-dekarboksilaza, E<sub>10</sub> indol-3-glicerolfosfat-sintetaza i E<sub>11</sub> triptofan-sintetaza.

U prvom delu biosintetičkog puta sintetizuje se horismat iz D-eritrozo-4-fosfata i dva molekula fosfoenolpiruvata. Od navedene tačke dolazi do granjanja puteva za biosintezu triptofana i biosintezu fenilalanina i tirozina.

### 10.1.6. Biosinteza histidina

Uslovno esencijalna aminokiselina histidin se sintetizuje po posebnom biosintetičkom putu koji započinje kondenzacijom 1-pirofosforibozil-5-fosfata i ATP u N'-(5-fosforibozil)-ATP (slika 10-8).



Slika 10-8. Osnovni putevi biosinteze histidina.

Prema tome ugljovodonični deo histidina potiče od delova razgradjenog purinskog prstena, a karboksilna grupa od alkoholne grupe riboze (za razliku od ostalih aminokiselina čija je karboksilna grupa dobivena od  $\alpha$ -ketokiselina). Biosinteza histidina se obavlja preko niza medjuproizvoda. Na slici 10-8 data je shema biosinteze histidina u nešto skraćenom obliku.

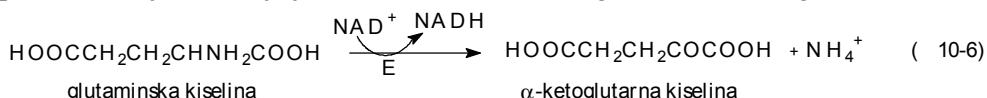
Prva faza biosinteze histidina je katalizovana fosforibozilpirofosfat-ATP-fosforilazom. Istraživanjem aktivnosti ovog enzima u klicama utvrđeno je da je njegova aktivnost alosterično regulisana sa histidinom. Prve faze su iste kao i kod biosinteze purina da bi se kasnije one razdvojile u posebne puteve za biosintezu purina i histidina.

### 10.1.7. Putevi pretvaranja aminokiselina u biljkama

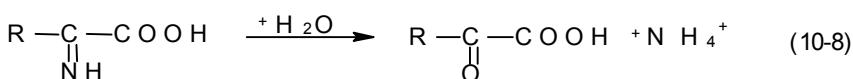
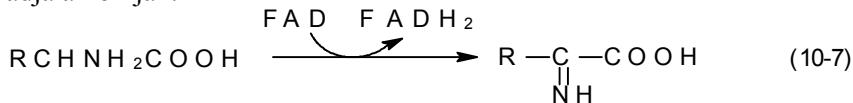
Sve napred navedene aminokiseline koje se sintetizuju u biljkama se koriste najčešćim delom za sintezu proteina. Međutim, navedeno ne isključuje mogućnost i njihove razgradnje do  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . U ovom slučaju biljke pored "rezervoara" azota iz zemljišta grade i u samoj sebi "rezervoar" azota nastao razgradnjom biosintetizovanih aminokiselina ili aminokiselina nastalih hidrolizom proteina.

Zajedničko za biosintetičke procese kao i razgradnju aminokiselina je to što se sve promene aminokiselina odvijaju preko nekoliko tipova biohemijskih reakcija i to : deaminacije, dekarboksilacije, transaminacije i dr.

**Deaminacija** - je razlaganje aminokiselina na amonijak i odgovarajuću organsku kiselinsku. Tako npr. glutaminska kiselina se razlaže do  $\alpha$ -ketoglutarne prema reakciji 10-6 koja je katalizovana enzimom glutamat-dehidrogenazom.



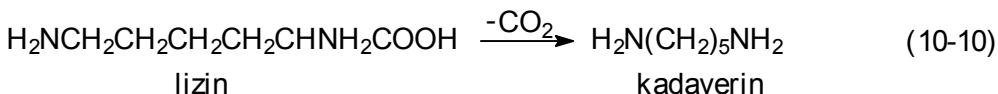
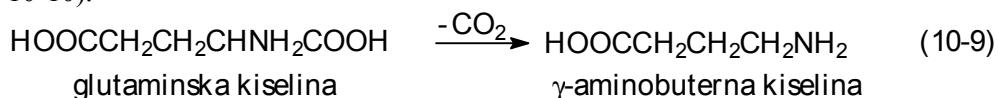
Pored navedenog aminokiseline se mogu razgraditi i oksidativnom deaminacijom. U prvoj fazi reakcije aminokiselina se dehidrogenizuje i pretvara u odgovarajuću imino-kiselinsku (jednačina 10-7), a u drugoj (jednačina 10-8) se jedini sa vodom i oslobadja amonijak.



Oksidativna deaminacija je katalizovana visokospecifičnim oksidazama aminokiselina u čiji sastav ulazi FAD.

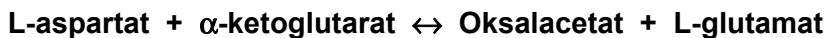
**Dekarboksilacija** - je biohemijska reakcija u kojoj se iz aminokiseline odvaja  $\text{CO}_2$ . U zavisnosti kakav supstrat se dekarboksiluje dobijaju se različiti proizvodi dekarboksilacije i to:

- dekarboksilacijom dikarboksilnih aminokiselina dobija se amino-monokarbonska kiselina (jednačina 10-9), a
- dekarboksilacijom monokarbonskih kiselina dobijaju se amini (jednačina 10-10).

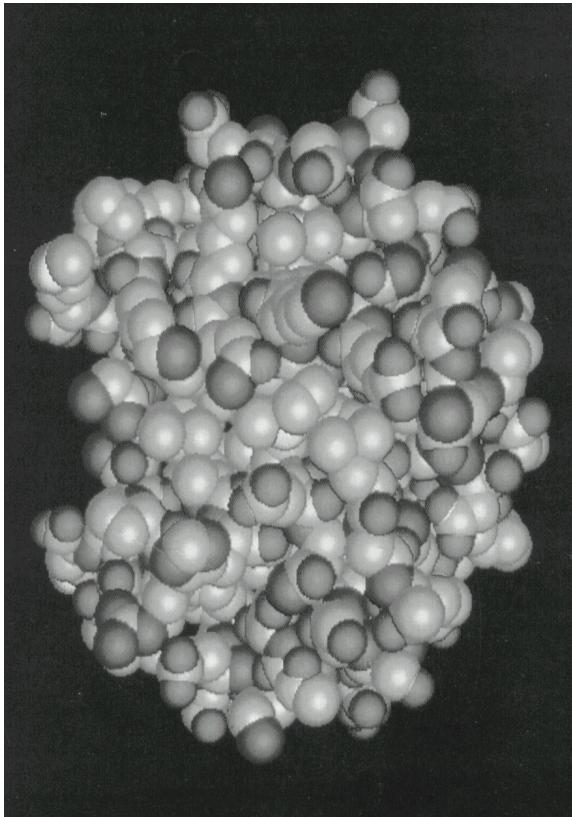


Amini se nalaze u svim biljkama u malim količinama. Neki put biljke mogu imati veću količinu amina i onda je on otrovan za biljna tkiva. Tako npr. nedostatak kalijuma u toku rastenja ječma i lana nakuplja se amin putrescin nastao dekarboksilacijom ornitina ili arginina, koji ima pogubno delovanje na listove. Nagomilani putrescin se može smanjiti unošenjem kalijuma u zemljишte. Amini koji se nakupljaju u biljkama mogu se razgraditi do aldehida i amonijaka ako su prisutne monoamino-oksigenaze. Oslobodjeni amonijak mogu biljke da koriste dok se aldehidi dalje oksidišu u odgovarajuće kiseline.

**Transaminacija** - je biohemski proces u kojem se amino-grupe većine aminokiselina prenose na  $\alpha$ -ketoglutarat ili oksaloacetat. Značajan je za sintezu glutamata. Reakcije transaminacije katalizuju enzimi transaminaze ili aminotransferaze. Poznat je veći broj transaminaza. Većina njih zahteva  $\alpha$ -ketoglutarat kao akceptor amino grupe. Najvažnija transaminaza u ćeliji biljaka je aspartat transaminaza (glutamat-oksaloacetat transaminaza, GOT), koja katalizuje sledeću reverzibilnu reakciju:



## 10.2. Biosinteza proteina



### **10.2. Biosinteza proteina**

- 10.2.1. Ekspresija gena
- 10.2.2. Genetički kod
- 10.2.3. Biosinteza proteina (translacija)
  - 10.2.3.1. Aktivacija aminokiselina
  - 10.2.3.2. Inicijacija
  - 10.2.3.3. Elongacija
  - 10.2.3.4. Terminacija i post-translaciona modifikacija polipeptidnog lanca
- 10.2.3.5. Polizomi i simultana translacija nekoliko kopija istog lanca

*Kompjuterom generisana  
3D struktura proteina*

Eksperimentalnim putem je utvrđeno da se genetička informacija u eukariotima nalazi u jedru u strukturi DNA. Ona je u njemu organizovana u posebnim telašcima nazvanim *hromozomima* čija se tanka struktura proteže kroz jedro. U toku deljenja ćelija hromozomi postaju znatno kraći i mogu se videti pod elektronskim mikroskopom kao gusta obojena struktura u obliku granule.

Svaki hromozom sadrži veliki broj gena - segmenata DNA koji kodiraju proste proteinske lanci ili molekul RNA. Svi geni u ćeliji čine *genom* i on je isti za sve ćelije prisutne u jednom organizmu. Strukturna i funkcionalna razlika u ćelijama uslovljena je različitom ekspresijom (izrazom) zajedničke genetičke informacije.

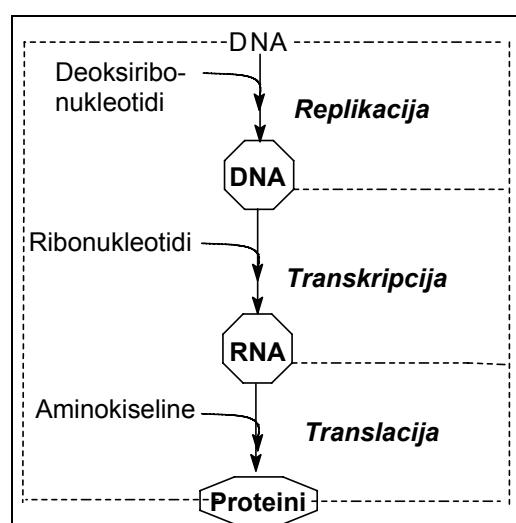
### 10.2.1. Ekspresija gena

Ekspresija gena je deo sinteze proteina u toku koje se genetička informacija prenosi sa DNA na mesto sinteze proteina u citoplazmi. Ona se sastoji iz dva medjusobno povezana procesa i to:

- ◆ **transkripcije** (sekvenca baza DNA se kopira na RNA) i
- ◆ **translacije** (kod RNA napisan sa 4 slova baze se putem tripleta baza, to jest kodona, pretvara u kod napisan sa 20 slova aminokiselina).

**Transkripcija** - je proces u kojem se informacija iz molekula DNA (*genoma*) "kopira" sparivanjem baza u komplementarnu sekvencu ribonukleotida

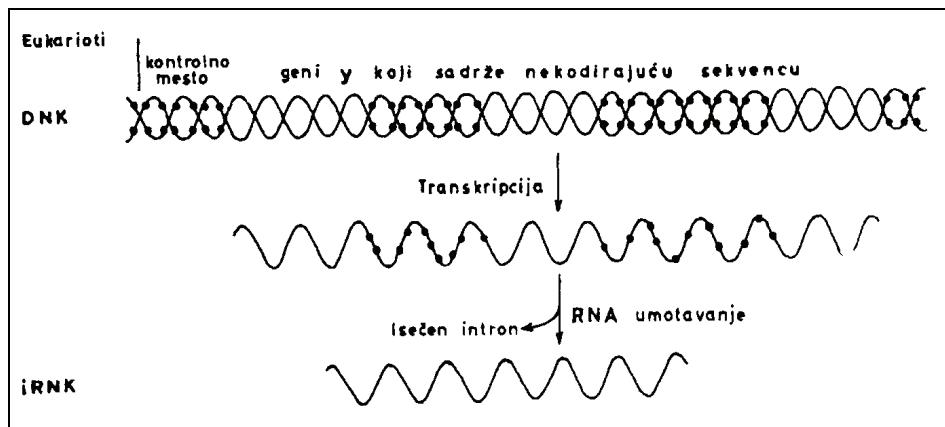
iRNA. Ovaj proces je katalizovan *RNA-polimerazom* koja se vezuje za deo molekula DNA nazvan *promotor*. Tok genetičke informacije od DNA do sinteze proteina je dat na slici 10-9.



Slika 10-9.  
Tok genetičke informacije od DNA.

Sintetizovan lanac iRNA se oslobadja od šabloni i odlazi na ribozome. Transkripcija teče neprekidno ukoliko nisu prisutni inhibitori. Osnovni proces transkripcije je sličan u svim

ćelijama ali u eukariotima ima posebne karakteristike po kojima se strukture njegovih genoma i putevi kopiraju. U njima strukturni geni nisu kontinualni već su prekinuti nekodirajućim regionima DNA (slika 10-10).



Slika 10-10. Transkripcija u eukariotima.

Regioni koji sadrže genetičku informaciju se nazivaju *egzoni*, a nekodirajući segmenti *introni*. Geni u eukariotima se ponavljaju što nije slučaj kod prokariota.

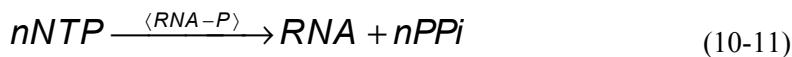
Transkripcija je u biljkama lokalizovana u jedru, mitohondrijama i hloroplastima (gde se nalaze enzimi i geni za sintezu tRNA, rRNA i tRNA) i katalizovana je sa tri DNA zavisne RNA-polimeraze koje se označavaju kao RNA-I, RNA-II i RNA-III.

RNA-polimeraza-I se nalazi u nukleusu gde se transkribuje gen za tRNA. Sastoji se iz 8-14 podjedinica koje imaju Mr 8.000 - 18.000, a proizvodi katalize su 18 S, 5 S, 26 S i 28 S RNA.

RNA-polimeraza-II se nalazi u nukleozomima i izgradjena je od 8-13 subjedinica, ima Mr 14.000 - 220.000. Značajna je za transkripciju specifičnih strukturnih gena koji kodiraju heterogene nuklearne RNA (hnRNA) koje su prekursori za tRNA.

RNA-polimeraza-III se nalazi u nukleusu. Sastoji se iz 8-14 podjedinica i ima Mr 16.000 - 220.000. Odgovorna je za transkripciju gena 5 S RNA i tRNA.

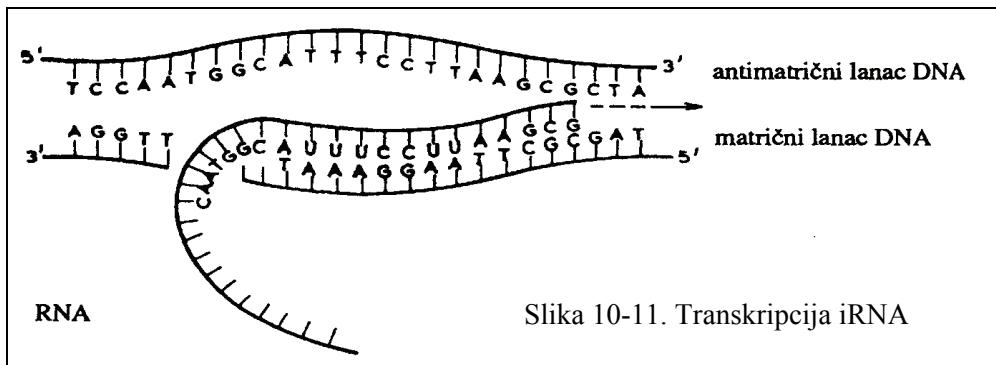
Reaktanti u navedenom procesu su nukleotid trifosfati (ATP, GTP, CTP, UTP), a reakciju katalizuje RNA-polimeraza (RNA-P; EC 2.7.7.6). Navedena reakcija se može prikazati jednačinom 10-11:



Transkripcija se može bolje pratiti ako se podeli u tri faze i to:

- ◆ *faza inicijacije*,
- ◆ *polimerizacije* i
- ◆ *terminacije*.

Inicijacija - je faza u toku koje se zapis sa DNA (transkripcija) prenosi na kratko živuću iRNA. "Poruka" se prenosi samo sa jednog lanca DNA koji se naziva *matrični* (templatni) *lanac*, za razliku od drugog lanca DNA koji se naziva *antimatrični* lanac. Inicijacija započinje na određenom odsečku DNA bogatom AT-parovima, koji se naziva *promotor*, a prepoznaje RNA-polimerazu. Lanac DNA počinje da se razmotava pri čemu na matričnom (kodogenom lancu) uz pomoć sigma faktora započinje "prepisivanje" komplementarnih baza u novosintetizovanu predinformacionu RNA koja se daljim transformacijama pretvara u iRNA. Razmotan fragment DNA i prepisan lanac predinformacione RNA dati su na sl. 10-11.



Polimerizacija - predstavlja fazu u kojoj se transkripcija nastavlja tako što se RNA-polimeraza kreće po DNA molekulu, otvara dupli heliks i vezuje ribonukleozid-monofosfatne jedinice u pravcu  $5' \rightarrow 3'$  zavisno od rasporeda baza u kodogenom lancu DNA. Kada se sintetizovan deo RNA odvoji od DNA njeni lanci se ponovo uvijaju u heliks.

Terminacija - označava kraj sinteze RNA koji određuje terminacioni kodon na DNA koji se prepoznaće sa tzv. terminacionim ili ro-faktorom.

### 10.2.2. Genetički kod

Genetički kod je šifra redosleda nukleotida u iRNA koja se prenosi od DNA u sekvencu aminokiselina u polipeptidnom lancu. DNA može odrediti strukturu novog proteina pomoću svoje 4 baze i to: A, G, C i T. Eksperimentalno je utvrđeno da su tri nukleotida (triplet nukleotida) u molekulu DNA "**kod ili šifra**" za jednu aminokiselinu. Permutovanjem 4 baze dobijaju se 64 mogućnosti za kodiranje aminokiselina. Kako u biljkama postoji samo 20 proteinskih aminokiselina jednu aminokiselinu može kodirati i više tripleta. U tom slučaju se upotrebljava termin *regenerisani kod*. Katalog genetičkih kodona svih živih organizama dat je u tabeli 10-1, u kojoj su posebno istaknuti položaji baza u tripletu tj. da li se baza nalazi na

5' kraju, 3' kraju ili je druga po redosledu. Genetički kod je univerzalan u svim živim organizmima sa malim varijacijama u mitohondrijama i hloroplastima.

U tabeli 10-1. dat je pregled svih 64 kodona od kojih 61 kodiraju aminokiseline, a 3 predstavljaju terminacione signalne kodone. Kodonska šifra je univerzalna i prisutna je u svim organizmima od bakterija do čoveka. Kod se u jedru podvrgava "sazrevanju" u četiri faze koje obuhvataju:

- vezivanje metilovanih guaninskih nukleotida u položaju 5',
- metilovanje nekih nukleotida,
- vezivanje poli-A (30-500 nukleotida) na 3'-kraj,
- izrezivanje fragmenata i sjedinjavanje ostalih fragmenata u lancu.

"Sazrela" iRNA prolazi kroz pore membrane u citoplazmu gde se provlači kroz ribozome i tako orijentise da može vezivati aminokiseline odgovarajućeg startnog kodona. Aktivnost iRNA zavisiće od rastenja i razvića biljaka. Ona u semenu odn. kluci neće biti aktivna jer se jedini sa proteinima u neaktivnojedinjenje- *informozom*.

Tabela 10-1. Kodoni informacione ribonukleinske kiseline.

Srednja baza kodona					
Baza na 5' kraju kodona ↓	U	C	A	G	Baza na 3' kraju kodona ↓
U	Phe*	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	term.	term	A
	Leu	Ser	term.	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (start)	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G
	Val	Ala	Glu	Gly	

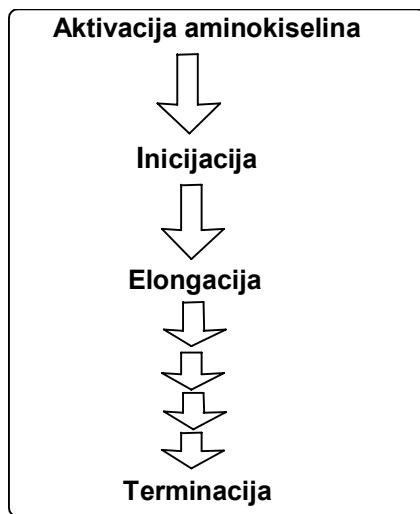
\*Phe /UUU/

### 10.2.3. Biosinteza proteina (translacija)

Biosinteza proteina je ciklični, endogeni, multistepni biohemski proces u kojem se slobodne aminokiseline polimerizuju u genetički determinisane sekvene polipeptida. U ovom biohemskom procesu genetska poruka sa DNA se pomoću iRNA (koja se vezuje sa ribozomima na mestu sinteze proteina) usmerava za povezivanje aminokiselina određenim redosledom zavisnim od redosleda kodona u iRNA.

Utvrđeno je da se iRNA kao nit provlači kroz ribozome odn. njihove agregate koji mogu biti izgradjeni od 4 do 100 ribozoma i nazivaju se *poliribozomi* ili *polizomi*. Oni su izolovani iz biljaka kao i iRNA i koriste se u studijama biosinteze proteina *in vitro* u besćelijskim sistemima. Na napred naveden način su sintetizovani neki proteini koji se nalaze u biljkama kao npr. *hordenin* iz ječma, *globulin* iz ovsa, *legumin* iz graška i *zein* iz kukuruza.

Reaktanti u biosintezi proteina pored iRNA i ribozoma su i tRNA, aminokiseline, proteinski faktori, ATP, GTP, enzimi, i joni Mg kao aktivatora.



Biosinteza proteina se odvija u 4 faze i to:

- ◆ aktivacija aminokiselina,
- ◆ inicijacija,
- ◆ elongacija i
- ◆ terminacija (slika 10-12).

Problem biosinteze proteina u osnovi se svodi na rešavanje dva osnovna pitanja i to:

- energetska mogućnost nastajanja peptidne veze i
- formiranje redosleda aminokiselina u polipeptidnom lancu.

Slika 10-12.Faze biosinteze proteina

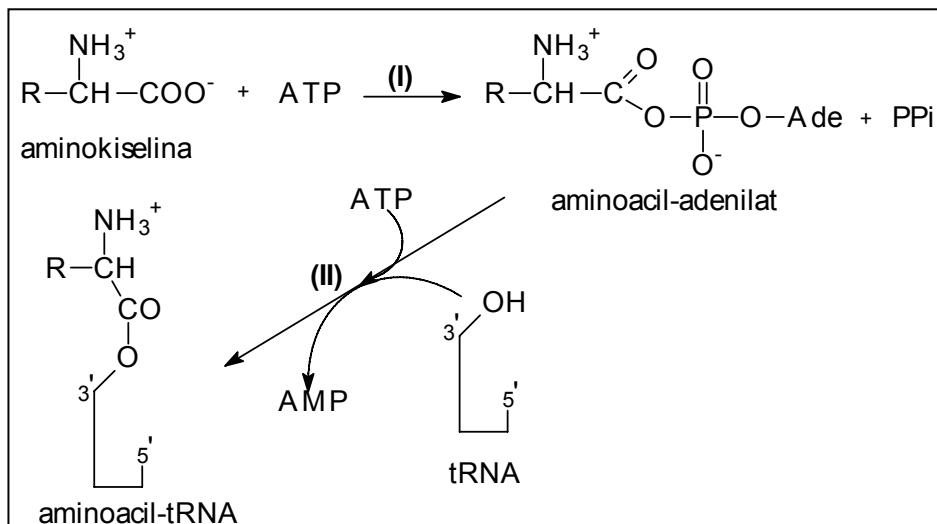
#### 10.2.3.1. Aktivacija aminokiselina

Aktivacija aminokiselina je prva početna reakcija u enzymskoj biosintezi proteina. Proces aktivacije aminokiselina i stvaranje aminoacil-tRNA odvija se u dve reakcione faze (slika 10-13).

U prvoj fazi - slobodna aminokiselina u reakciji sa ATP kovalentno se veže sa adenin-nukleotidom dajući reaktivni anhidrid aminoacil-AMP. Energija

koja je oslobođena hidrolizom ATP praktično je utrošena za stvaranje pomenute kovalentne veze aminoacil-AMP.

U drugoj fazi - nastali aminoacil-AMP se prenosi na tRNA (transfer-RNA) dajući aminoacil-tRNA. Aminoacilna grupa se vezuje estarskom vezom za 3'-hidroksilnu grupu krajnjeg adenozilnog ostatka vezujućeg kodona (CCA). Ovako nastala estarska veza poseduje visok energetski potencijal za prenos grupe što omogućuje nastajanje peptidnih veza.



Slika 10-13. Faze aktivacije aminokiselina: (a) nastajanje aminoacil-AMP intermedijera i (b) nastajanje aminoacil-tRNA.

Uloga tRNA je pre svega u vezivanju aminokiselina energetski bogatom vezom i u aktivnom doprinosu u prevodjenju "jezika baza" u "jezik aminokiselina" što omogućuje antikodon, koji se nalazi u strukturi tRNA.

U obe fazne reakcije katalitički deluje enzim *aminoacil-tRNA-sintetaza* (EC 6.1.1).

S obzirom da je enzim sintetaza veoma specifičan za tRNA, to postoje različite i specifične aminoacil-tRNA sintetaze. Ovako visoka specifičnost enzima izuzetno je značajna, jer se praktično aminoacil-tRNA u fazi *translacije* "prepoznaju" samo pomoću antikodona. Greška u povezivanju aminokiseline i tRNA dovodi do pogrešne sekvene aminokiselina u proteinu. Sekvenca (redosled) aminokiselina zapisana je u genima redosledom baza (adenin-A, gvanin-G, citozin-C, uracil-U). U toku biosinteze proteina neophodno je prethodno nastajanje - *transkripcijom* mRNA (informacijska-RNA, messenger-RNA), koja predstavlja radnu kopiju gena, odnosno sadrži informaciju o redosledu aminokiselina. Ta informacija praktično je sadržana u kodonu koji je sačinjen kombinovanjem tri baze. Baze i njihov raspored u kodonu predstavljaju "jezik baza", koji se nakon

vezivanja mRNA na ribozom prenosi na "jezik aminokiselina". Ovaj proces predstavlja prevodjenje (*translacija*) informacije.

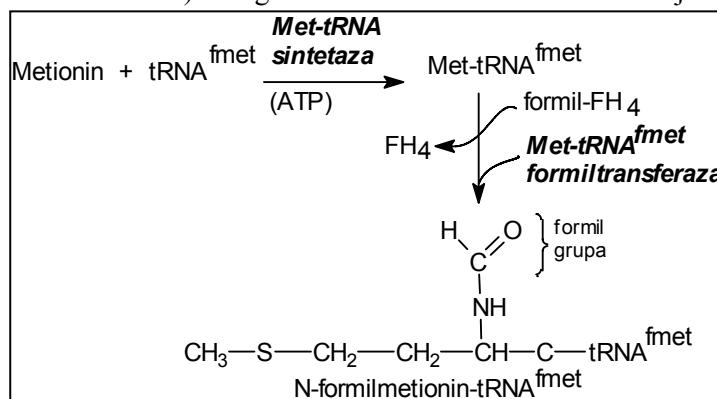
Praktično pri dovođenju i povezivanju aminokiselina na odgovarajuće mesto dolazi do toga da tRNA, koja na sebi nosi aminokiselinu i antiokodonsku tripletnu šifru "prepoznaće" mesto na mRNA preko kodonskog tripleta baza, koje su komplementarne sa antikodonском grupom baza i na taj način aminokiselina dospeva i povezuje se na genetski sekvencom predviđeno mesto.

Povezivanje baza kodona i antikodona ostvaruje se formiranjem vodoničnih veza. Prevodenje "zapisanog" kodeksa baza mRNA u redosled aminokiselina u proteinu odvija se na *ribozomima*, malim subjedinicama (15-20 nm), koje se često vezuju na niti mRNA obrazujući *polizome*.

### 10.2.3.2. Inicijacija

Detalji inicijacije polipeptidnog lanca se nešto razlikuju kod prokariota i eukariota. Sinteza lanca DNA i RNA je temeljno proučena kod prokariota. Svi aspekti sinteze proteinasa najdetaljnije proučeni kod bakterije *E. coli*. U svim studiranim sintezama polipeptidnog lanca sinteza startuje sa N-termina-lnog kraja, a lanac raste ka C-terminalnom kraju. Inicijacijski N-terminalni aminokiselinski ostatak u svim proteinima je N-formilmetyonin (fmet). Međutim, ovaj ostatak u konačnoj strukturi često nedostaje jer se uklanja nakon posttranslacionih modifikacija polipeptidnog lanca. Postoje dve različite tRNA za metionin u *E. coli*, jedna za nemodifikovani metionin i druga za N-formilmetyonin. Ove dve tRNA se označavaju kao tRNA<sup>met</sup> i tRNA<sup>fmet</sup>. Aminoacil-tRNA sa vezanim metioninom/N-formilmetyoninom imaju oznaku met-tRNA<sup>met</sup>, odnosno met-tRNA<sup>fmet</sup> (prefiks identificuje vezanu aminokise-linu) Nagrađena met-tRNA<sup>fmet</sup> for-milacijom sa formil -FH<sub>4</sub> u sekventnim

reakcijama katalizovanim odgovarajućom formiltransferazom stvara N-formilmetyonin-tRNA<sup>fmet</sup> (fmet-tRNA<sup>fmet</sup>) (slika 10-14).

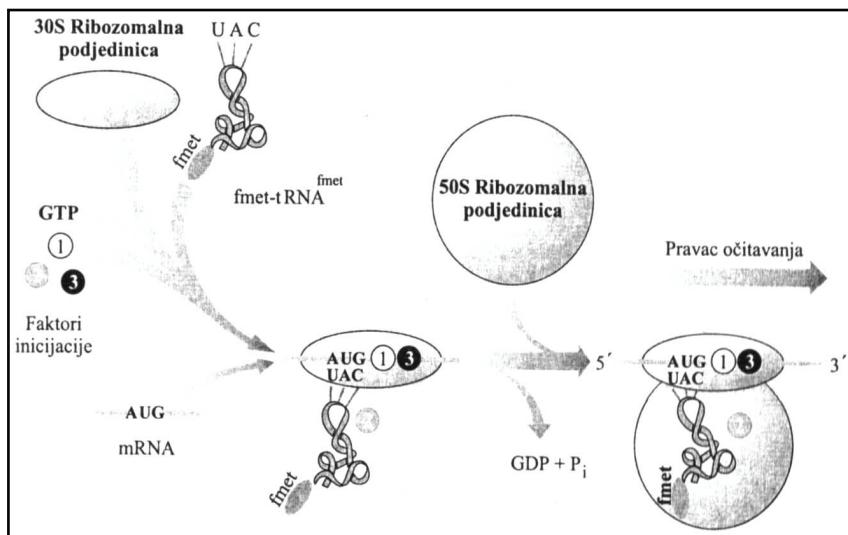


Slika 10-14. Nastajanje N-formilmetyonina-tRNA<sup>fmet</sup> (FH<sub>4</sub> je tetrahidrofolat)

Obe tRNA (tRNA<sup>met</sup> i tRNA<sup>fmet</sup>) sadrže specifičnu sekvencu tri baze (triplet) UAC koji je komplementaran tripletu 5'-AUG-3' u mRNA sekvenci. UAC

triplet na tRNA<sup>fmet</sup> (tzv. antikodon) prepoznaće AUG triplet na mRNA (tzv. kodon), kao inicijalni ili start kodon u sintezi lanca.

Start sinteze polipeptidnog lanca zahteva formiranje inicijacijskog kompleksa u kojem učestvuju mRNA, 30S ribozomalna subjedinica, fmet-tRNA<sup>fmet</sup>, GTP i tri proteinska faktora inicijacije (IF-1, IF-2 i IF-3). IF-3 olakšava vezivanje mRNA za 30S subjedinicu ribozoma. Druga dva faktora, IF-1 i IF-2 se uključuju u vezivanje fmet-tRNA<sup>fmet</sup> za kompleks mRNA-30S ribozom. Rezultat ovih kombinacija je nastajanje 30S inicijacijskog kompleksa. 50S subjedinica ribozoma se tada veže za formirani 30S inicijacijski kompleks stvarajući tako 70S inicijacijski kompleks. Hidrolizom GTP (GDP + Pi) oslobađa se energija potrebna za nastajanje ovog kompleksa, a faktori inicijacije se oslobađaju istovremeno (slika 10-15.)

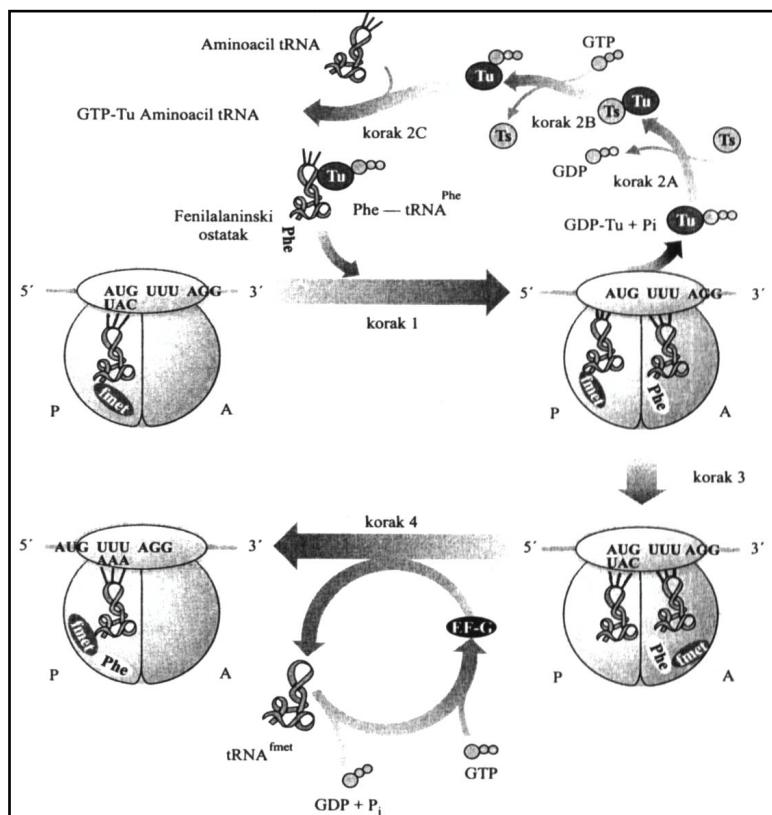


Slika 10-15. Formiranje inicijacijskog kompleksa.

### 10.2.3.3. Elongacija

Faza elongacije u sintezi proteina (slika 10-16) zahteva postojanje dve vezujuće strane na 50S subjedinici 70S ribozoma označene kao P (peptidil) i A (aminoacil) strana. P strana veže tRNA koja nosi peptidni lanac, a A strana veže aminoacil-tRNA. Elongacija lanca počinje sa dovođenjem druge aminkiseline "specificirane" pomoću mRNA na 70S inicijacijski kompleks. P strana na ribozomu je zauzeta sa fmet-tRNA<sup>fmet</sup> na 70S inicijacijskom kompleksu. Druga aminoacil-tRNA se veže na A stranu (*korak-1*). Triplet baza na tRNA (antikodon AAA) formira vodoničnu vezu sa tripletom mRNA baza (UUU, kodon za fenilalanin u ovom slučaju). Ovaj

korak zahteva GTP i dva proteinska faktora elongacije EF-Tu (Tu) i EF-Ts (Ts) za vezivanje aminoacil-tRNA na A strani. GTP se hidrolizuje u ovom koraku (*korak-2*). Peptidna veza nastaje u reakciji katalizovanoj peptidil-transferazom koja je deo 50S subjedinice. Formira se dipeptidil-tRNA na A strani i slobodna tRNA na P strani (*korak-3*). Translokacijom premešta se dipeptidil-tRNA sa A na P, a slobodna t-RNA napušta kompleks. Ovo dovodi do pomeranja kompleksa sa kodona AUG na kodon UUU u pravcu očitavanja  $5' \rightarrow 3'$  sekvence mRNA (*korak-4*). Drugi faktor elongacije EF-G je takođe potreban u ovom koraku kao i GTP.



Slika 10-16. Pregled svih faza u elongaciji lanca. *Korak-1*: Aminoacil-tRNA se veže za A stranu na 50S subjedinici ribozoma. Elongacioni faktor EF-Tu (Tu) je potreban u ovom koraku. P strana na 50S subjedinici je već zauzeta. *Korak-2* : Elongacioni faktor EF-Tu se oslobođa od ribozoma i regeneriše u procesu koji zahteva elongacioni faktor EF-Ts (Ts) i GTP. *Korak-3* : Peptidna veza se formira, a slobodna je tRNA na P strani. *Korak-4* : Ribozom se pomera sa kodona AUG na kodon UUU u pravcu  $5' \rightarrow 3'$  mRNA. Peptidil-tRNA se translocira sa A na P stranu ribozoma. Ovo zahteva faktor elongacije EF-G i GTP. (UUU je kodon za fenilalanin; AAA je antikodon za fenilalanin).

#### 10.2.3.4. Terminacija i posttranslaciona modifikacija polipeptidnog lanca

Terminacija je završna faza u biosintezi proteina. Ona nastaje kada ribozom krećući se “duž” niti mRNA stigne do terminacionog kodona ili tzv “**stop kodona**” koji ne kodira ni jednu aminokiselinu. U tom momentu dolazi do hidrolitičkog kidanja veze aminoacilnog ostatka i tRNA na strani P. Stop signal u procesu biosinteze polipeptidnog lanca imaju kodoni sa baznim tripletima UAA, UAG i UGA. Pored terminacionih kodona biosintezu proteina zaustavljaju i proteinski faktori ili oslobadajući faktori (eng. release factors) RF-1, RF-2 i RF-3. Kod prokariota RF-1 učestvuje u zaustavljanju biosinteze kada najdu kodonski tripleti UAA i UAG, a RF-2 učestvuje u momentu nailaska baznih kodonskih tripleta UAA i UGA. RF-3 praktično nije vezan za bilo koji kodon, ali njegovo prisustvo pospešuje aktivnost druga dva faktora (RF-1 i RF-2). Bitno je da u svakom momentu kada se približava bilo koji stop kodon faktori RF-1 i RF-2, koji su vezani u blizini mesta A na ribozomu, reaguju prekidanjem daljnog produženja polipeptidnog lanca i biosinteze proteina. Terminacija biosinteze proteina obuhvata 2 reakcije i to:

- ◆ vezivanje RF-1 ili RF-2 faktora za terminacioni kodon i
- ◆ hidroliza u kojoj RF-1 ili RF-2 pretvaraju peptidil-transferaznu aktivnost na strani P u hidrolitičku reakciju pri čemu se oslobađa peptidil- tRNA.

Kada se tRNA odstrani, ribozom disosuje od iRNA u subjedinice 30S i 50S i spreman je da ponovi ribozomalni ciklus za drugi molekul proteina. RF-3 se jedini sa 30S subjedinicom i sprečava reasocijaciju 50S i 30S subjedinice, a isto tako priprema 30S subjedinicu za reciklizaciju.

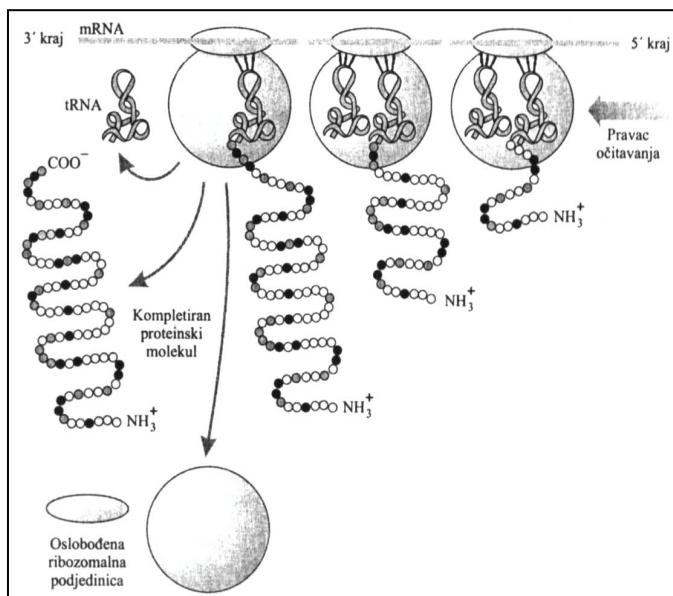
Sintetizovan polipeptid nije definitivne strukture već podleže tzv. *posttranslacionim modifikacijama* (hidrolizi, redukciji, fosforilaciji, i dr. reakcijama). Tako npr. nascentni protein graška ima dve subjedinice. Raskidanjem disulfidnih veza oslobadaju se subjedinice od kojih se veća pretvara u *legumin* (oligomerni rezervni protein semena leguminoza) koji ima Mr 360-400 kD. Na sličan način se sintetizuje *glicinin* iz soje.

Specifičnost biljaka je da se biosinteza proteina može realizovati u hloroplastima, citoplazmi i mitohondrijama, jer svuda postoje potrebni reaktanti i ribozomi. Smatra se da je biosinteza u hloroplastima najznačajnija jer je u njima lokalizovano 30-40% ukupnog sadržaja proteina. Intenzitet biosinteze proteina u biljkama uslovjen je biljnom vrstom. Utvrđeno je da se u toku biosinteze u biljkama u jednoj minuti vezuje 30-40 aminokiselinskih ostataka peptidnom vezom, dok je u bakterijama intenzitet biosinteze i do 10 puta brži. Intenzitet biosinteze proteina se može meriti količinom RNA. Ukoliko se njen sadržaj smanjuje delovanjem ribonukleaza smanjuće se i biosinteza proteina. Sintetizovan protein zauzima određen oblik sekundarne, tercijarne i kvaternarne strukture koji je odgovoran za njegovu funkciju.

Biosinteza proteina može biti kontrolisana u više tačaka. Ova kontrola je najbolje proučena u *E.coli*. Kontrola biosinteze proteina u biljkama je još nedovoljno istražena. Biosinteza proteina može biti izmenjena i raznim ekološkim stresnim faktorima koji izazivaju nagomilavanje štetnih kiseoničnih radikala. Uzročnici stresa mogu biti visoke i niske temperature, teški metali, UV-zračenja, herbicidi, pesticidi i dr.

### 10.2.3.5. Polizomi i simultana translacija nekoliko kopija istog lanca

U prethodnom opisu sinteze proteina, razmatrani su putevi i reakcije koji teku u mestu na jednom ribozomu. Međutim, ista mRNA može biti "provučena" kroz više ribozoma. Svaki od ovih ribozoma će sintetizovati polipeptid sa različitim fazama u njegovom kompletiranju, zavisno od položaja ribozoma koji se kreće duž mRNA (slika 10-17). Ovaj kompleks mRNA sa nekoliko ribozoma naziva se **polizom**; alternativno ime je poliribozom.



Slika 10-17. Simultana sinteza proteina na polizomima. mRNA se provlači kroz nekoliko ribozoma simultano. Svaki ribozom proizvodi jednu kopiju lanca, koji je specifičan sekvencom mRNA. Kada je sinteza lanca završena ribozom disosuje u subjedinice i koristi se u sledećem ciklusu sinteze proteina.

## Izvod

♣ Biljke sintetizuju aminokiseline iz metabolita CO<sub>2</sub> i neorganskih azotnih jedinjenja nitrata i amonijaka.

♣ Prema prekursorima iz kojih se sintetizuju aminokiseline biosin-teze aminokiselina se mogu podeliti u šest odvojenih grupa u kojima je:

\* glutaminska kiselina donator ugljovodoničnog skeleta za sintezu glutamina, arginina i prolina,

\* asparaginska kiselina prekursor u sintezi homoserina, lizina, treonina, izoleucina i metionina,

\* piruvat je donator ugljovodoničnog skeleta za sintezu leucina, izoleucina i valina,

\* 3-fosfoglicerat i ribuloza-1,5-difosfat prekursori u biosintezi serina, glicina i cisteina,

\* fosfoenolpiruvat i D-eritrozo-4-fosfat su donori ugljovodoničnog skeleta u biosintezi aromatičnih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana i

\* 1-pirofosforibozil-5-fosfat je prekursor za histidin.

♣ U biljkama postoje enzimski sistemi koji katalizuju medjusobna pretvaranja aminokiselina raznim biohemijskim reakcijama od kojih su najzastupljenije deaminacije, dekarboksilacije i transaminacije.

♣ Ekspresija gena je sinteza proteina u toku koje se genetička informacija prenosi sa DNA na mesto sinteze proteina.

♣ Transkripcija je proces prenošenja informacije sa genoma (svih gena) na mRNA. Ona se u biljkama obavlja u jedru, mitohondrijama i hloroplastima.

♣ Genetički kod je šifra redosleda nukleotida (sastoji se iz tri nukleobaze) u mRNA koja se prenosi u sekvencu aminokiselina polipeptidnog lanca.

♣ Biosinteza proteina (translacija) je ciklični endogeni multistepeni biohemijski proces u kojem se slobodne aminokiseline polimerizuju u genetički determinisane sekvene polipeptida.

♣ Biosinteza proteina se odvija u 4 faze i to:

\* aktivacija aminokiselina,

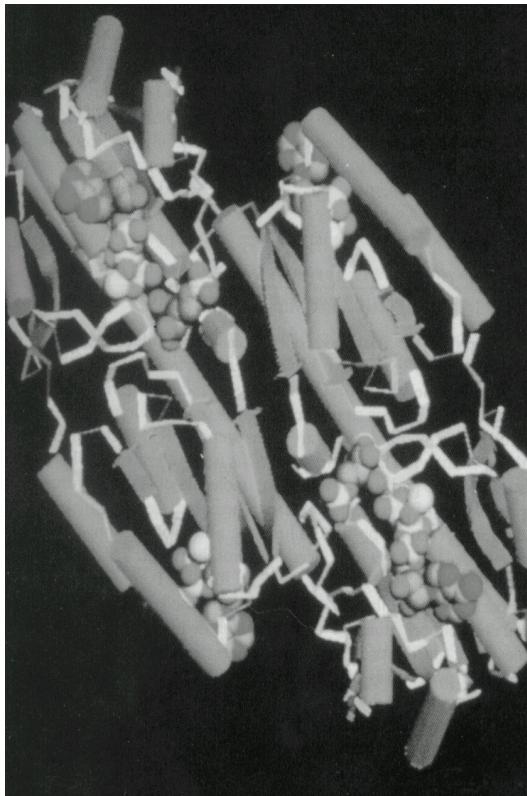
\* inicijacija,

\* elongacija i

\* terminacija.

# 11.

## Metabolizam ugljenih hidrata



*Struktura fosfofruktokinaze,  
regulatornog enzima u glikolizi*

### **11.1. Biohemija fotosinteze**

- 11.1.1. Reakcije fotosistema I i II
- 11.1.2. Proton gradient put stvaranja ATP u fotosintezi
- 11.1.3. Reakcije fotosinteze u mraku - put  $\text{CO}_2$
- 11.1.4. Faktori koji utiču na fotosintezu

### **11.2. Fotorespiracija i produktivnost biljaka**

### **11.3. Biosinteza saharoze, skroba i celuloze**

### **11.4. Medjusobna pretvaranja ugljenih hidrata**

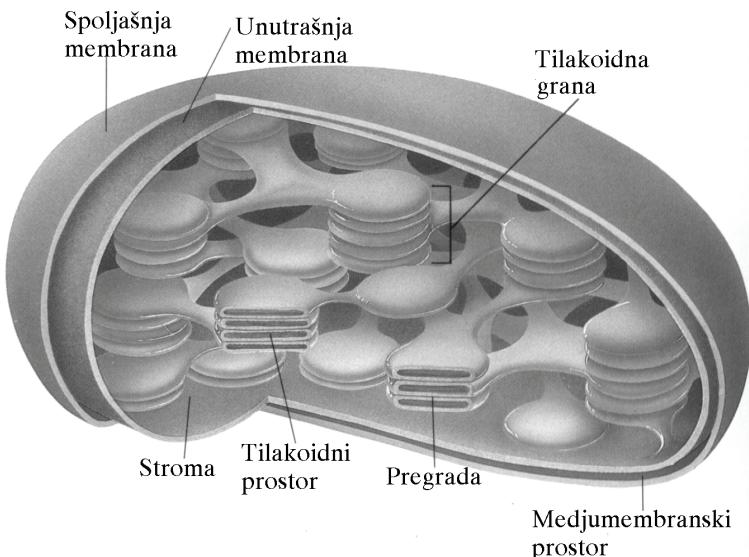
### **11.5. Katabolizam ugljenih hidrata**

- 11.5.1. Glikoliza
- 11.5.2. Ciklus trikarbonskih kiselina (CTK)
  - 11.5.2.1. Reakcije u CTK
  - 11.5.2.2. Energetski bilans CTK
  - 11.5.2.3. Kontrola pojedinih faza u CTK
- 11.5.3. Oksidativni pentozofosfatni put
- 11.5.4. Glioksalatni ciklus

Redukciona faza metabolizam ugljenih hidrata kod biljaka (*anabolizam*) obuhvata najznačajniji i najjeftiniji proces u biosferi - **fotosintezu**. Proizvodi fotosinteze se koriste za biosintezu di- i polisaharida kao i medjusobna pretvaranja ugljenih hidrata. Razgradnja ugljenih hidrata u biljkama (proces *katabolizma*) se obavlja pre svega glikolizom i pentozofosfatnim (glukona-tnim) putem, i ciklusom trikarbonskih kiselina (*Krebsov ciklus*).

## 11.1. Biohemija fotosinteze

Fotosinteza je kompleksan biohemski proces kojim se proizvodi organska materija u biosferi u višim biljkama, plavo-zelenim algama i nekim bakterijama. Ona se odigrava u nizu reakcija u *lipo-proteinskoj membrani tilakoida hloroplasta* (slika 11-1).



Slika 11-1. Membranske strukture hloroplasta.

Po svom značaju fotosinteza je kvalitativno i kvantitativno najznačajniji proces na zemlji, jer pomoću njega biljke vezuju oko  $150 \times 10^{12}$  kg C,  $25 \times 10^{12}$  kg H i oslobadjavaju oko  $400 \times 10^{12}$  kg O<sub>2</sub> za potrebe biosfere. Istovremeno se od ukupne sunčeve energije koja se troši za fotosintezu 40% pretvara u hemijsku energiju odnosno energetski fond ćelija (ATP i NADH). Fotosinteza ima i šire značenje, jer je sa njom usko povezana današnja tehnička civilizacija, koja se razvijala uz pomoć energije uskladištene u velikim zalihama kaloričnog goriva (uglja i nafte) nastalih pre mnogo godina procesom fotosinteze.

Zbog svoje kompleksnosti fotosinteza se danas proučava sa *biohemijskog* i *biofizičkog* aspekta.

Sa ***biohemijskog aspekta*** - fotosinteza je proces u kojem se neorganska jedinjenja  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  pretvaraju u organska jedinjenja (ugljene hidrate kao npr. glukuzu -  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) i molekul  $\text{O}_2$  u fotosintetičkim laboratorijama (hloroplastima)(reakcija 11-1).



Sa ***biofizičkog aspekta*** - to je endogeni proces u kojem se svetlosna energija pretvara u hemijsku.

Fotosinteza je uslovila razvoj svih oblika života na zemlji. Prema K.Timirjazevu fotosinteza podleže osnovnom zakonu fotohemije prema kojem svetlosna energija mora prvo biti absorbovana da bi mogla izvršiti rad. Ugljene hidrate sintetizuju biljke iz  $\text{CO}_2$  jer se on lako redukuje:



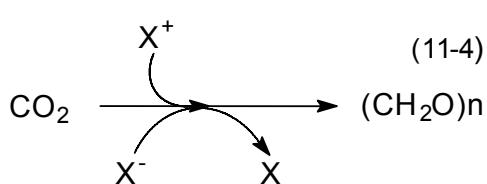
Medutim kako je svaka redukcija uslovljena prelaskom elektrona to je korektnije prethodnu jednačinu napisati u sledećem obliku:



Da bi se napred navedena reakcija odigrala potrebna je energija i biološki oksido-redukcioni sistem koji bi mogao obezbediti elektrone. Ovakav sistem je nazvan *donor elektrona*. Idealni donor morao bi posedovati sledeće karakteristike:

- \* imati  $E_0$  negativnije od redoks-sistema koji se označava  $\text{X}/\text{X}^-$  i
- \* mora se nalaziti svuda u biosferi u izobilju.

Posebno je nepovoljan ovaj drugi zahtev jer u prirodi ne postoji takav redoks-sistem koji bi zadovoljio ova svojstva. Postoji više redoks-sistema koji su lokalno rasporedjeni, ali samo jedan (kiseonik/voda), se nalazi u izobilju svuda ali



ima  $E'_0$  pozitivnije od sistema  $\text{X}/\text{X}^-$  ( $E'_0 = +0.92\text{V}$ ). Takodje postoji nekoliko redoks-sistema koji imaju  $E'_0$  dovoljno negativno, ali nijedan nije prisutan u biosferi u dovoljnoj količini.

Zbog navedenog se mora izabrati

redukcione sredstvo koje ima vrednost  $E'_0$  pozitivnije od sistema  $\text{X}/\text{X}^-$  što znači da će redoks-sistem sa većom elektron-donatorskom snagom dobiti elektron od sistema sa manjom elektron-donatorskom snagom odn. da će elektron biti "iznudjen" elektrohemijskim gradijentom (analogno guranju vode nasuprot vodopadu). Sa biohemijskog aspekta fotosinteza se može definisati kao hemijski lanac oksido-redukcionih reakcija koji se može podeliti u tri faze i to:

- ◆ fotoliza vode uz učešće hlorofila i izdvajanje O (*neciklična fotosforilacija*),
- ◆ sinteza ATP i NADPH uz pomoć svetlosne energije (*ciklična fotosforilacija*) i
- ◆ fotoasimilacija ili fiksacija CO<sub>2</sub> - sinteza ugljenih hidrata redukcijom CO<sub>2</sub> sa NADPH (*tamna faza fotosinteze*).

Termin tamna faza fotosinteze koja se koristi u udžbenicima nije korektan, jer su novija istraživanja pokazala da svetlost aktivira najmanje 5 enzima koji učestvuju u Calvinovom ciklusu, kao npr. RuDP-karboksilazu, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu, fruktozid-fosfatazu, sedoheptulozo-fosfatazu i fosforibulozokinazu, a deluje i na sledeće procese:

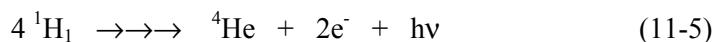
\* pumpanje jona H<sup>+</sup> iz strome hloroplasta u tilakoidni prostor, pri čemu se pH strome povećava sa pH 7 na pH 8 (u odsutnosti svetlosti H<sup>+</sup> joni se vraćaju u stromu i pH opada sa 8 na 7),

\* pumpanje jona Mg<sup>2+</sup> iz tilakoidnog prostora u stromu, pri čemu optimalna koncentracija Mg<sup>2+</sup> i H<sup>+</sup> dovodi do aktivacije nekih enzima (RuDP-karboksilaze, fruktozid-fosfataze, sedoheptulozo-fosfataze itd),

\* sintezu jedinjenja koja su pozitivni alosterični efektori napred navedenih enzima (npr. ATP i NADPH su pozitivni alosterični efektori za RuDP-karboksilazu i gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu) i

\* redukciju "svetlosno efektnih mediatora" (LEM<sub>s</sub>) koji aktiviraju neke enzime. Njihove strukture nisu još poznate, ali se zna da su to proteini, sa cisteinskim ostacima koji se oksidišu u tami, a redukuju na svetlosti.

Svetlost koja se koristi u fotosintezi se može definisati kao elektromagnetno polje koje osciluje sinusoidno u prostoru i vremenu. Ono reaguje sa "materijom" u paketićima ili kvantima - nazvanim fotonima od kojih svaki sadrži definisanu količinu energije. Mol fotona se naziva *einstein* (1 ejnstajn sadrži 6.023 x 10<sup>23</sup> fotona). Energija 6.023 x 10<sup>23</sup> fotona je ekvivalentna 6.23 x 10<sup>23</sup> hc/λ. Oni nastaju na suncu pod uticajem visoke temperature fuzijom vodonika u helijuma (11-5).



Prema *Einstein*-ovom zakonu fotohemijske ekvivalencije - molekuli mogu reagovati u fotohemijskoj reakciji jedino posle apsorpcije jednog fotona. Na taj način oni postaju bogati energijom, u odnosu na osnovno stanje, za količinu energije introdukovani apsorbovanim fotonom. Apsorpcijom fotona jedan elektron iz konjugovane dvogube veze prelazi u viši energetski nivo, a molekul prelazi u pobudjeno stanje:



Otklanjanjem izvora svetlosti, visokoenergetski elektroni se vraćaju u osnovno stanje posle  $10^{-15}$  sekundi uz oslobođanje energije ubaćene fotonom i njenim rasporedjivanjem na okolne molekule i to:

- *fluorescencijom* (elektron iz pobudjenog stanja se posle  $10^{-9} - 10^{-5}$  s vraća u osnovno stanje uz oslobođanje fotonu koji imaju manju energiju) i

- *fosforescencijom* (oslobodjeni foton prolazi kroz kaskade i na kraju emituje energiju manju od fluorescencije).

Energija fotona je obrnuto proporcionalna talasnoj dužini svetlosti (tabela 11-1).

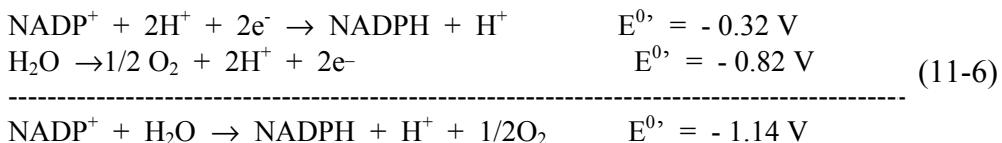
Tabela 11-1.

Energija fotona nekih karakterističnih talasnih dužina svetlosti.

Talasna dužina	Boja svetlosti	kJ/einstein
400	ljubičasta	332.56
500	plava	241.34
600	žuta	190.76
700	crvena	170.92

### 11.1.1. Reakcije fotosistema I i II

**Fotoliza vode** - je fotohemisko razlaganje vode sa ciljem da se dobiju redukujući ekvivalenti i ATP, koji se ne skladište već se koriste u drugim reakcijama. Elektroni dobiveni od vode se *necikličnom fosforilacijom* prenose na NADP<sup>+</sup> (jednačina 11-6).



Negativne vrednosti standardnog redupcionog potencijala ( $E^{0'}$ ), sa odgovarajućom pozitivnom  $\Delta G^{0'} = + 220 \text{ kJ} = + 52.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta G^{0'}$  je standardna slobodna energija) pokazuju da su navedene reakcije endergone i da je za njihovo odvijanje potrebna energija. Apsorbovana energija svetlosti obezbeđuje sve endergone reakcije procesa fotosinteze.

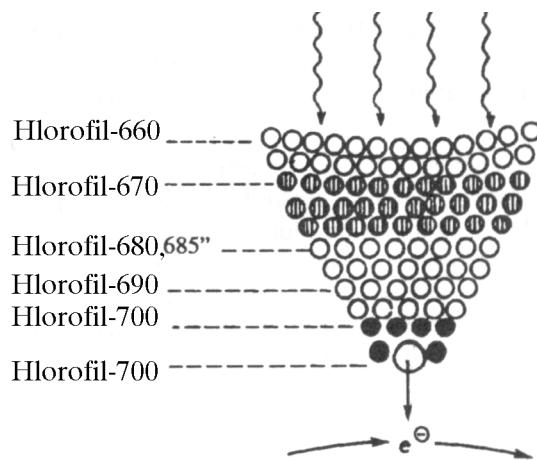
Tok elektrona nije direkstan jer elektroni prolaze kroz više redoks sistema između kojih su na različitim mestima umetnuti u specijalne "mašine" nazvane

“pigmentnim sistemima”. U *nečikličnoj fotofosforilaciji* su kuplovana dva pigmentna sistema:

- \* **pigmentni sistem I (PS I)** i
- \* **pigmentni sistem II (PS II)**.

Pigmentni sistemi se medjusobno razlikuju u apsorpciji svetlosti kao i hemijskom sastavu. Hemijskom analizom utvrđeno je da se pigmentni sistem I sastoji iz:

- \* 250 antenskih hlorofila (200 hlorofila a i 50 hlorofila b),
- \* 50 karotenoida (uglavnom karotena),
- \* 1-og citochroma f,
- \* 1-og plastocianina,
- \* 2 citochroma<sub>563</sub> (citochrom b<sub>6</sub>),
- \* 1-2 feredoksina,
- \* 1-og hlorofila a<sub>700</sub> (P-700),
- \* 13 različitih polipeptida,
- \* 2 pigment-proteinska kompleksa (CK i LHCl), (slika 11-2).



Slika 11-2.  
Kompleks hlorofila  
“fotosistemu I”.

U reakcionom centru PS I se nalazi hlorofil koji ima maksimum apsorpcije na 700 nm te se označava kao hlorofil P-700. On je okružen sa 250 antenskim pigmenata. Analizom frakcija PS I utvrđeno je da se u antenskim pigmentima nalaze

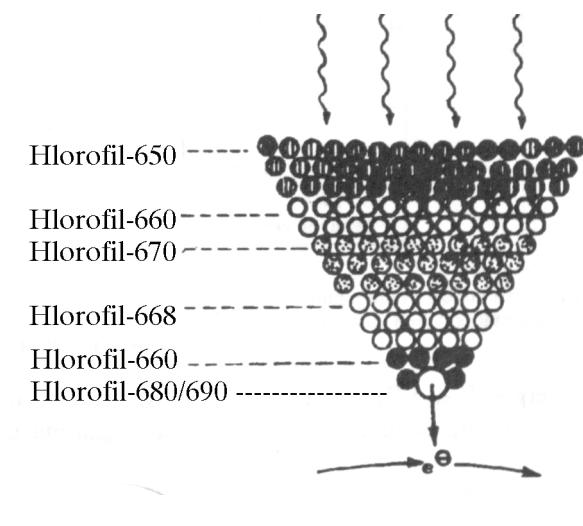
hlorofili a<sub>692</sub>, a<sub>684</sub>, a<sub>677</sub>, a<sub>670</sub>, a<sub>662</sub>, b<sub>650</sub> i b<sub>640</sub>. U fotosistemu I apsorbovana svetlosna energija iz daleke crvene oblasti spektra se usvaja karotenoidima, a zatim se predaje posredstvom hlorofila b, i hlorofila a<sub>600, 678, 685, 690, 705-720</sub> u reaktivni centar koji sadrži molekul hlorofila P-700 (slika 11-2).

Hlorofil P-700 predaje elektrone fotosistemu II koji je organizovan na sličan način kao fotosistem I. On sadrži oko:

- \* 200 antenskih hlorofila,
- \* 50 karotenoida (uglavnom ksantofila koji štite ćeliju od štetnog delovanja kiseoničnih radikala).

- \* 1 nedefinisan primarni donator elektrona Z,
- \* 1 nedefinisan primarni akceptor elektrona Q
- \* 4 plastohinona
- \* 2 citochroma  $b_{559}$
- \* atom Mg po molekulu hlorofila  $a_{680}$  (P-680) ili hlorofil  $a_{690}$  (P-690)
- \* polipeptide D-1 i D-2.

U reaktivnom centru fotosistema II se nalazi hlorofil P-680/690, međutim tačna analiza ostalih sastojaka nije se mogla uraditi jer je PS II onečišćen sa PS I. Kompleks hlorofila "fotosistema II" dat je na slici 11-3.



Slika 11-3.  
Kompleks hlorofila  
"fotosistema II".

U fotosistemu II svetlosna energija koju apsorbuju karoteni (posredstvom hlorofila b,  $a_{660}$ ,  $670$ ,  $678$ , i  $a_{685}$ ) se predaje reaktivnom centru koji sadrži hlorofil P-680. Oba fotosistema se nalaze u tilakoidnoj membrani

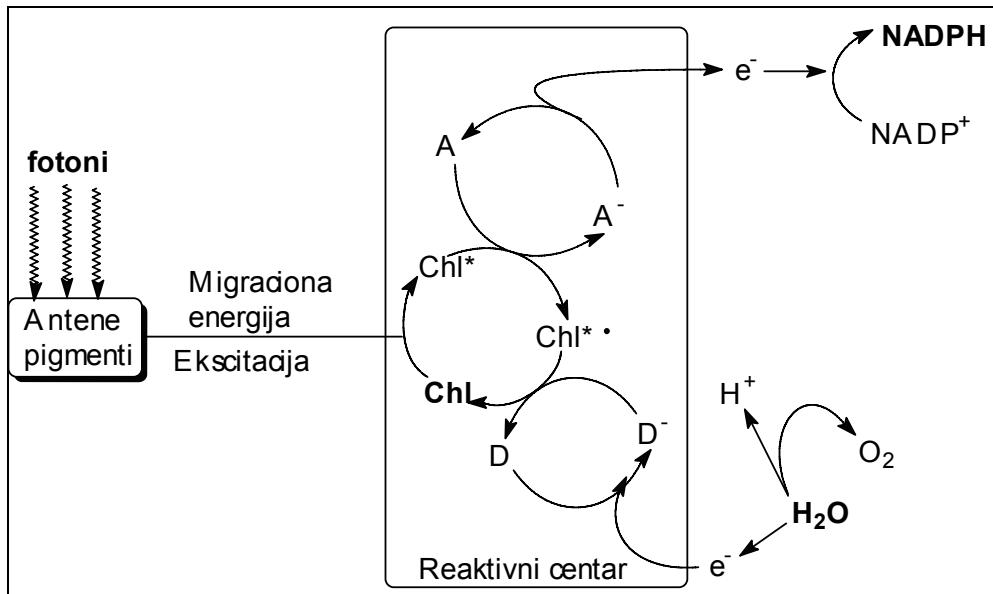
chloroplasta.

Priroda P-700 i P-680 koji se nalaze u centru PS I i PS II odn. njihovog reaktivnog centra se aktivno istražuje. Pretpostavlja se da je svaki reaktivni centar sastavljen pored kompleksa pigmenata i od redoks-sistema koji je neposredan donor elektrona i redoks-sistema koji je neposredan akceptor elektrona.

Nemački naučnici J.Deisenhofer, R.Huber i M.Hertmut odredili su tercijarnu strukturu reaktivnog centra purpurnih bakterija. Utvrđili su da se on sastoji iz tri proteinske podjedinice (H, M i L) i za ovo otkriće su dobili Nobelovu nagradu 1988.g. Očekuje se da će ovo otkriće doprineti i tumačenju funkcionalnosti reaktivnih centara PS I i PS II kod viših biljaka.

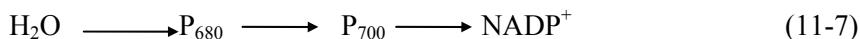
Pigmentni sistemi apsorbuju fotone svetlosti i tako omogućavaju prolaz energije u obliku pobudjenih molekula u reaktivne centre koji specijalne oblike hlorofila (Chl) podižu u pobudjeno stanje ( $\text{Chl}^*$ ). U ovom stanju hlorofil je izrazito reaktivan i jak redukcioni agens, koji odaje jedan elektron iz aromatičnog  $\pi$  elektronskog sistema oksidovanom obliku redoks sistema ( $\text{A}/\text{A}^-$ , obično Fd). On postaje slobodan katjonski radikal ( $\text{Chl}^{+•}$ ) sposoban da se redukuje u osnovno

stanje, primajući elektron od redukovanih oblika drugog redoks sistema ( $D/D^-$ ) koji se redukuje elektronima dobijenim iz vode (slika 11-4).

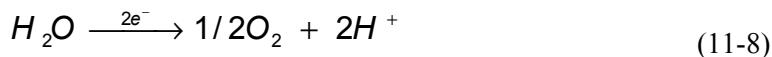


Slika 11-4. Uprošćen koncept rada pigmentnog sistema I i II  
(svaki PS ima različit akceptorski  $A/A^-$  i donatorski  $D/D^-$  redoks sistem).

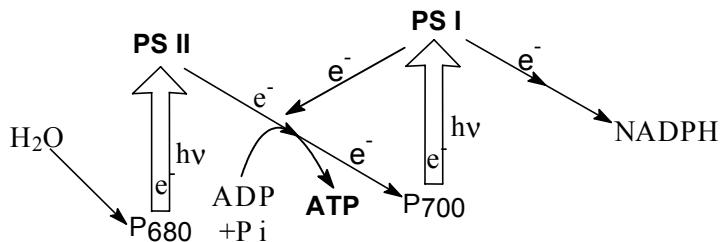
Apsorpcijom energije P-680 i P-700 se podižu na viši energetski nivo pri kojem se redoks potencijal smanjuje drastično i indukuje transport elektrona u smeru datom u jednačini 11-7.



Kada se  $P_{680}$  "pobudi" njegov deficit elektrona se nadoknadjuje oksidacijom vode pri kojoj se oslobadja kiseonik (jednačina 11-8).

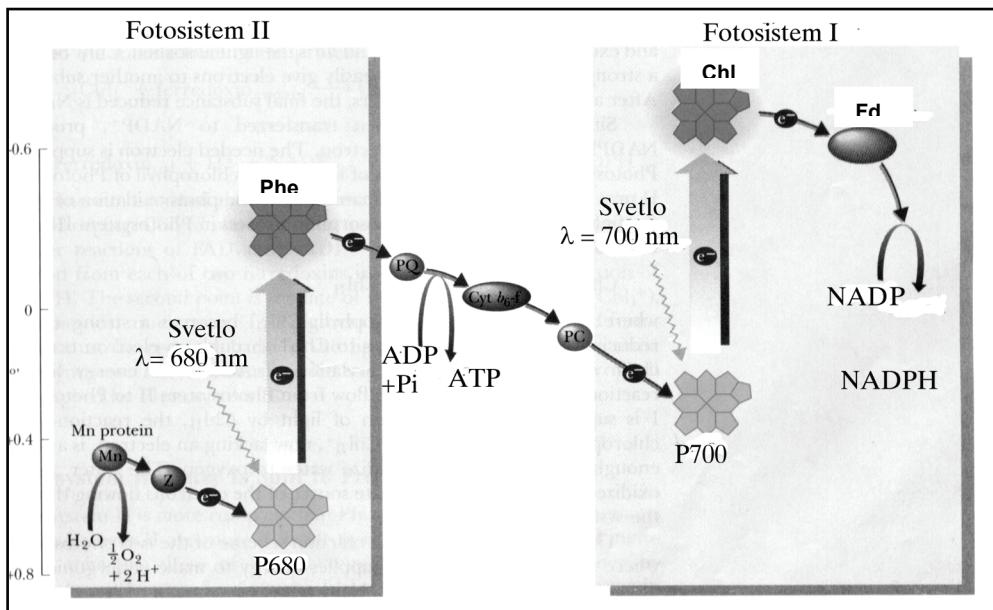


Rezultati istraživanja fotosistema u biljkama su pokazali da su oni vezani u seriji pa se uprošćeno fotosintetička aparatura može prikazati na način dat na slici 11-5.



Slika 11-5. Pojednostavljena shema fotosintetičke aparature biljaka.

Očigledno je da se reakcije fotosinteze na *svetlosti* odvijaju u dva dela, posredstvom dva odvojena ali povezana fotosistema. U prvom delu odvijaju se reakcije redukcije kojima se  $\text{NADP}^+$  redukuje u NADPH (neciklična fotofosforilacija) posredstvom PS I. U drugom delu fotolizom vode izdvaja se  $\text{O}_2$  posredstvom PS II.



Slika 11-6.

Tok elektrona u fotosistemu I i II. Vertikalna osa pokazuje standardan redukcioni potencijal. Energija potrebna za transfer elektrona iz vode do  $\text{NADP}^+$  se obezbeđuje apsorpcijom svetlosti pomoću fotosistema I i II. Fotofosforilacijom se ADP prevodi u ATP i kupluje u elektron-transportni lanac koji povezuje dva fotosistema. (Legenda: Phe = feofitin; Chl = hlorofil; Fd = feredoksin).

Oba fotosistema obavljaju redoks (elektron transfer) reakcije. Fotosistem I generiše blage oksidacione agense, a fotosistem II blage redukcione agense. Oksidacioni i redukcioni agensi medjusobnim interakcijama kroz transfer elektrona povezuju oba fotosistema. Producija ATP je povezana sa transportom elektrona slično njegovom nastajanju u elektron transportnom lancu u mitohondrijama (ciklična fotofosforilacija). Reakcije fotosistema I i II detaljnije su prikazane na slici 11-6.

Proizvodi dobiveni fotolizom vode rasporedjuju se na sledeći način:

- elektroni dolaze u fotosistem II (da bi stigli do  $\text{NADP}^+$ ),
- $\text{H}^+$  odlazi u reaktivni medijum, a
- $\text{O}_2$  se izdvaja u gasnoj fazi.

Elektroni nagradjeni fotolizom vode, preko donatora Z (proteina sa esencijalnim tirozinskim ostacima) i Mn-proteina se predaju feofitinu (Phe) u PS II. On injektuje elektrone u nosač elektrona (u obliku lanca) koji spaja dva fotosistema. To su plastohinon (PQ) sa dva molekula ( $\text{PQ}_A$  i  $\text{PQ}_B$ ) od kojih  $\text{PQ}_B$  prenosi elektrone u veliki rezervoar plastohinonu. Elektroni se od plastohinonskog rezervoara kreću ka kompleksu citohroma  $b_6\text{-f}$  (verovatno preko Fe-S proteina).

Citohrom f se redukuje sa Cu-plastocianinom (PC) koji usmerava elektrone na P-700. Uz pomoć energije koju je apsorbovao PS I i akumulirao pigment P-700 elektroni se predaju akceptoru - rastvorljivom feredoksinu ( $\text{Fd}_s$ ). Izgleda da se  $\text{Fd}_s$  redukuje sa molekulom hlorofila. Od  $\text{Fd}_s$  elektroni se prenose potom na flavoprotein *feredoksin-NADP-oksidoreduktazu* (EC 1.6.1.7) a potom na  $\text{NADP}^+$ .

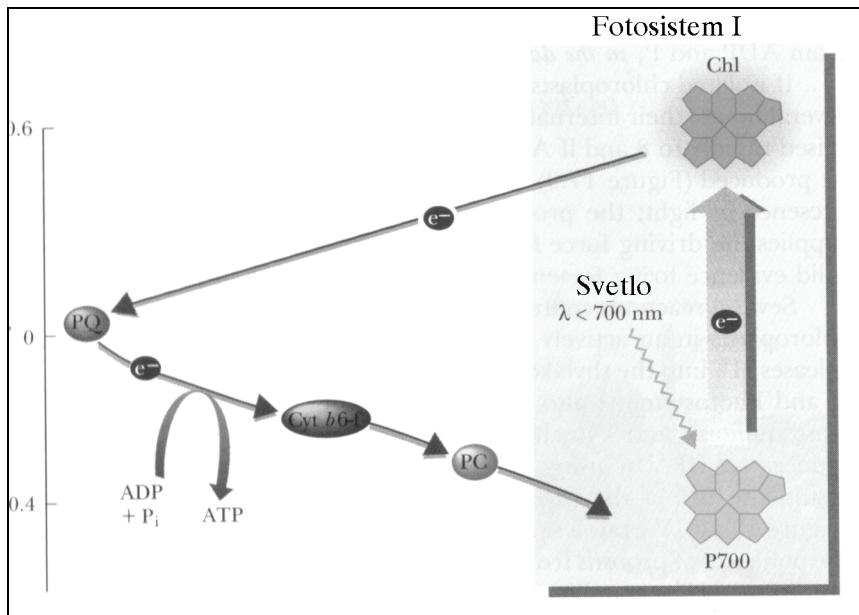
Može se zaključiti da PS I primarno redukuje  $\text{NADP}^+$ , dok PS II "cepa" vodu stvarajući  $\text{O}_2$ .

**Sinteza ATP i ciklična fotofosforilacija u PS I.** Manji deo svetlosne energije se koristi za sintezu ATP. Elektroni bogati energijom migriraju iz PS I i vraćaju se u njega tako da se za svaki par prenetih elektrona gradi jedan molekul ATP iz ADP i neorganskog fosfora (Pi) prema jednačini 11-9.



Kod ciklične fotofosforilacije apsorpcija svetlosti se vrši isključivo za sintezu ATP. Put elektrona u cikličnoj fotofosforilaciji je data na slici 11-7. Smatra se da ciklični tok elektrona i fotofosforilacija započinju kada je ćeliji potpuno obezbedjena potrebna količina NADPH, a ATP se koristi za druge metaboličke potrebe kao npr. za biosintezu lipida, skroba, pigmenata, nukleinskih kiselina i transport metabolita. Kod ciklične fotofosforilacije elektroni koji su izbačeni iz PS I (pri njegovom osvetljavanju) vezuju se za prvi akceptor elektrona P-430 ali ne odlaze na  $\text{NADP}^+$  u PS I. NADPH se ne stvara u ovom procesu. Fotosistem II nije uključen i ne proizvodi se  $\text{O}_2$ . Ciklična fosforilacija započinje u momentu kada se

uspstavi visok odnos NADPH/NADP<sup>+</sup> u ćeliji tj. kada koncentracija NADP<sup>+</sup> u ćeliji nije dovoljna da primi sve elektrone nastale eksitacijom molekula Chl (jednačina 11-10).



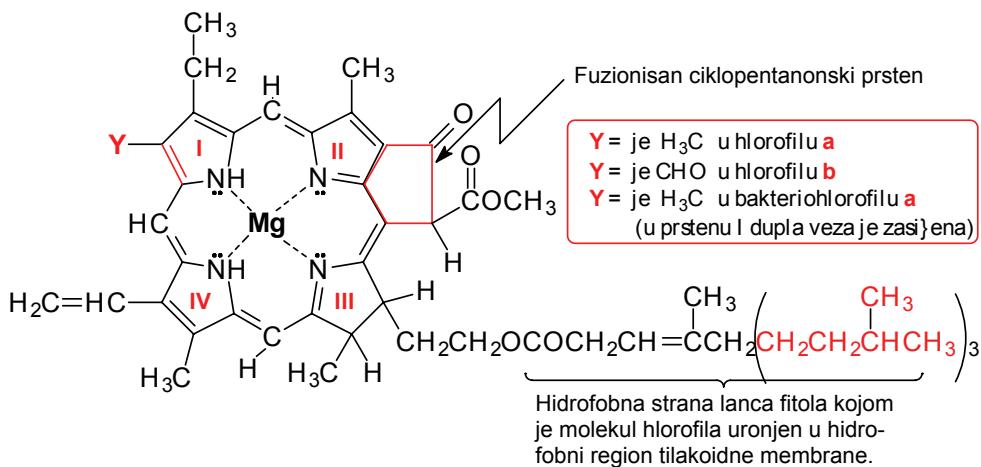
Slika 11-7.

Ciklični tok elektrona kupovan sa fotofosforilacijom u PS I. Pokazano je da se voda ne cepta niti se produkuje NADPH. (Chl je hlorofil, Phe je foefitin, PQ je plastohinon, PC je plastocianin). (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saund.Coll.Publish., London, 1991, str.439, sl.17.8).

Fotosintetička fosforilacija je slična oksidativnoj fosforilaciji u mitohondrijama u nekoliko tačaka i to:

- reaktivni centri, prenosioci elektrona i enzimi koji učestvuju u sintezi ATP se nalaze u lipoproteinskim membranama tilakoida,
- tilakoidna membrana mora biti neoštećena,
- prenos elektrona se može prekinuti pomoću reagenasa koji su sposobni da simuliraju prolaz H<sup>+</sup> kroz tilakoidne membrane,
- prenos elektrona može biti blokirani oligomicinom i drugim reagensima koji sprečavaju sintezu ATP u mitohondrijama,
- sinteza ATP je katalizovana enzimima koji se nalaze na spoljnoj strani tilakoidne membrane.

Očigledno je da hlorofil ima primarnu ulogu u tako značajnom procesu u biosferi kao što je fotosintezi. Visoko energetsko stanje (ekscitovano stanje) hlorofila je potrebno u fotosintezi zato što se apsorbovana energija sunčeve svetlosti može prenosi dalje i potom prevesti u korisnu hemijsku energiju (sinteza ATP) u reakcijama na svetlosti. U principu nalaze se dva tipa hlorofila, **hlorofil a** i **hlorofil b**. Eukariote kao što su zelene biljke i zelene alge sadrže oba hlorofila a i hlorofil b. Prokarioti kao cianobakter (ranije zvan modro-zelena alga) sadrži samo hlorofil a. Druge fotosintetičke bakterije imaju bakteriohlorofile, od kojih je **bakteriohlorofil a** najčešći. Organizmi koji sadrže bakteriohlorofile ne koriste vodu kao konačni izvor elektrona za fotosintetičke redoks reakcije, niti produkuju kiseonik. Umesto toga, oni koriste druge izvore elektrona kao što je  $H_2S$ , koji produkuje sumpor umesti kiseonika. Strukture navedenih tipova hlorofila su date na slici 11-8.



Slika 11-8.

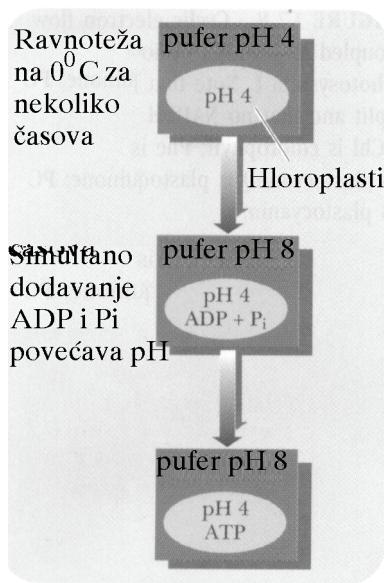
Struktura molekula hlorofila a, hlorofila b i bakteriohlorofila a.

Struktura hlorofila je zasnovana na *tetrapirolovom* prstenu porfirina koja je prisutna i u hem grupi citohroma odnosno hemoglobina i mioglobin kod životinja. Metalni ion vezan za tetrapirolov prsten hlorofila je Mg(II) za razliku od gvožđa koji je prisutan u hemu. Druga razlika u strukturi hlorofila i hema je prisustvo ciklopantanonskog prstena fuzionisanog u tetrapirolov prsten. Takođe u hlorofilu za treći porfirinski prsten u tetrapirolu vezan je dug hidrofobni bočni lanac *fitola* (koji sadrži četiri izoprenske jedinice) koji se veže za tilakoidne membrane hloroplasta pomoću hidrofobnih interakcija. Fitol je vezan za ostatak molekula hlorofila *estarskom vezom* koja se ostvaruje izmedju alkoholne grupe fitola i propionske kiseline bočnog lanca porfirinskog prstena. Razlika u strukturi izmedju hlorofila **a** i hlorofila **b** leži u supstituciju metil-grupe hlorofila a sa aldehidnom-grupom kod hlorofila b u prvom pirolovom prstenu. Razlika izmedju

bakteriochlorofila a i hlorofila a je u duploj vezi na I pirolovom prstenu u tetrapirolu (Chl a ima dve nezasićene veze, a bakterio-Chl samo jednu).

### 11.1.2. Proton gradient-put stvaranja ATP u fotosintezi

Hloroplasti mogu sintetizovati ATP iz ADP i Pi i u mraku ako su obezbedjeni odgovarajućim pH gradientom. Ako se izolovani hloroplasti stave u pufer čija je pH 4, za nekoliko sati će i unutrašnja pH hloroplasta biti jednaka 4. Ako se pH pufera poveća na 8 i ako se ADP i Pi dodaju simultano nastaje ATP (slika 11-9).



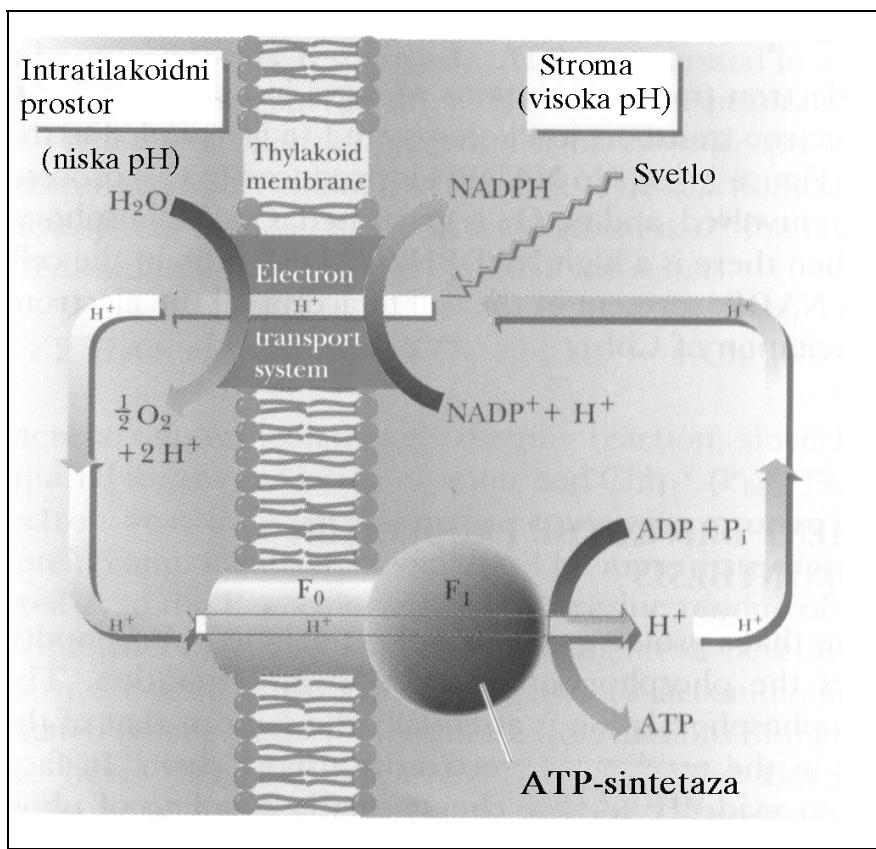
Slika 11-9.

Sinteza ATP u hloroplastima u mraku u prisustvu proton gradijenta, ADP i Pi.

Nastajanje ATP ne zahteva prisustvo svetlosti; proton gradijent nastao na bazi razlike u pH - stvara put za fosforilaciju. Ovaj eksperiment obezbeđuje dovoljno podataka za ustanovljenje teorije o mehanizmu hemiosmotskog vezivnja. U novije vreme, mehanizam sinteze ATP najčešće se tumači hemiosmotskom teorijom P.Mitchella. Prema ovoj teoriji vezu izmedju transporta elektrona i fosforilacije ne čini neko hemijsko jedinjenje, već elektrohemski stanje, tj. razlika u koncentraciji  $H^+$  - jona izmedju dve strane

membrane, odnosno razlika u električnom potencijalu. Drugim rečima energija koja nastaje usled razlike u koncentraciji jona izmedju dve strane membrane koristi se za hemijski rad, sintezu ATP.

Neke reakcije doprinose stvaranju proton gradijenta u hloroplastima. Cepanjem molekula vode (fotoliza) oslobođa se  $H^+$  u tilakoidni prostor. Transport elektrona iz PS II i PS I takođe doprinosi stvaranju proton gradijenta uključivanjem plastohinona i citohroma u proces. Tada PS I redukuje  $NADP^+$  pomoću  $H^+$  u stromama do NADPH. Kao rezultat, pH tilakoidnog prostora je tada niži od pH stroma (slika 11-10).



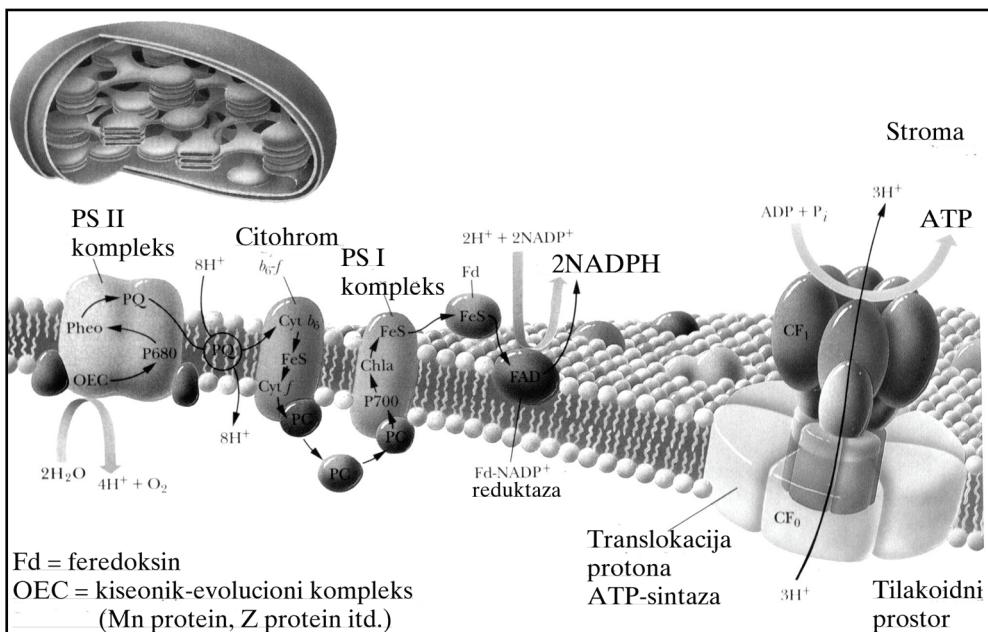
Slika 11-10.

Povezanost izmedju fotofosfo-rilacije i gradijenta protona u hloroplastima. Fotosintetička elektron-transportna pumpa  $H^+$  iz stroma ubacuje u intratila-koidni prostor obrazujući proton gradijent (visoka pH u stromi, niska pH u intratilakoidnom prostoru). Tok  $H^+$  nazad u stromu kroz ATP-sintetazu obezbedjuje energiju za sintezu ATP iz ADP i Pi.

Slična situacija je i kod protonske pumpe matriksa mitohondrija u intermembranskom prostoru. Faktor vezivanja u hloroplastima ( $CF_1$ ) je sličan faktoru vezivanja u mitohondrijama ( $F_1$ ). Komponente lanca elektrona u hloroplstima su uređene asimetrično u tilakoidnoj membrani što je slučaj i u mitohondrijama. Posledica ovog asimetričnog uredjenja komponenata lanca transporta elektrona je sinteza ATP i NADPH pomoću reakcija na svetlosti u stromama, gde oni obezbedjuju energiju i redukujuće ekvivalente za reakcije fotosinteze u mraku.

U mitohondrijama u transportu elektrona učestvuju tri respiratorna kompleksa povezana pomoću rastvorljivih prenosilaca elektrona. Elektronski

transportni aparat u tilakoidnim membranama je sličan i izgradjen je iz nekoliko velikih membran-vezanih kompleksa. To su PS II (fotosistem II kompleks), citohrom b<sub>6</sub>-f kompleks i PS I (fotosistem I kompleks). U tilakoidnoj membrani solubilni prenosioци elektrona su plastohinon i plastocianin, koji imaju ulogu sličnu koenzimu Q i citohromu c u mitohondrijama (slika 11-11). Fosforilacija ATP izazvana proton gradientom u hloroplastima ista je kao i u mitohondrijama.



Slika 11-11.

Komponente elektron transportnog lanca tilakoidne membrane. Ovaj shematski prikaz pokazuje fotosistem II (PSII), citohrome b<sub>6</sub>-f kompleks, i fotosistem I (PSI), zajedno sa prenosiocima elektrona: plastohinon (PQ) i plastocianin (PC). Tok elektrona kroz tilakoidnu membranu povezan je sa sintezom ATP pomoću CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub> ATP-sintetaze. (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saund.Coll.Publish., London, 1991, str.441, sl.17.11).

Sintezu ATP od ADP, Pi i protiona katalizuje ATP-sintetaza (ATPaza), poznata još kao i faktor povezivanja (CF) pošto povezuje tok elektrona (i protiona) u fosforilaciji. U hloroplastima ATPaza se pretežno nalazi u membrani tilakoida strome. Faktor povezivanja ima dinamičnu regulatornu ulogu. Ograničava hidrolizu stromalnog ATP i istovremeno efikasno podstiče sintezu ATP, ukoliko energetski uslovi dozvoljavaju. ATPaza se sastoji iz dve komponente: od faktora CF<sub>1</sub> i CF<sub>0</sub>. Faktor CF<sub>1</sub> je hidrofilni protein koji strši prema stromi, a CF<sub>0</sub> je hidrofobni protein koji se proteže kroz membranu.

Lipidna komponenta membrana tilakoida onemogućava protok protona, zbog čega se oni mogu kretati samo kroz protonске kanale. Proteinske kanale predstavljaju u lipidnom sloju integralni proteinski kompleksi ( $CF_0$ ) koji omogućavaju transport protona iz unutrašnjeg prostora tilakoida na spoljašnju površinu do  $CF_1$ , pri čemu posredstvom faktora povezivanja tj.  $CF_1$  dolazi do sinteze ATP.  $CF_0$  sadrži četiri različita polipeptida.

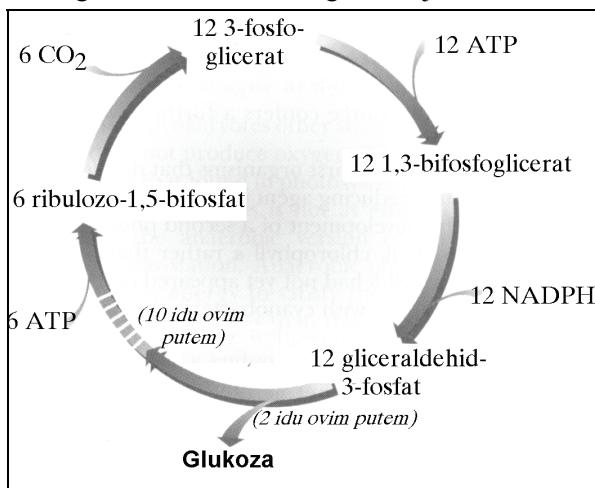
### 11.1.3. Reakcije fotosinteze u mraku: put $\text{CO}_2$

#### Redukcija $\text{CO}_2$ kod $\text{C}_3$ -biljaka

Fotoasimilacija ili fiksacija  $\text{CO}_2$  je treća tamna faza fotosinteze koja se odvija u stromi. Jednačina kojom se obično opisuju serije reakcija fotosinteze u mraku data je neto reakcijom:



Neto reakcija u kojoj iz 6 molekula  $\text{CO}_2$  nastaje 1 molekul glukoze ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) zahteva karboksilaciju 6 molekula 5-C ključnog intermedijera, **ribulozo-1,5-difosfata**, do oblika 6 molekula nestabilnog 6-C intermedijera koji se brzo transformiše dajući 12 molekula **3-fosfoglicerata**. Od ovih, dva molekula 3-fosfoglicerata u cikličnom putu daju jedan molekul glukoze. Ostalih 10 molekula 3-fosfoglicerata služe za regeneraciju 6 molekula ribulolozo-1,5-difosfata. Navedene reakcije se realizuju u kružnom biohemiskom putu poznatom pod nazivom *reduktivni pentozofosfatni put* (RPP) ili **Benson-Kalvinov ciklus** (slika 11-12) po istraživaču Melvinu Kalvinu, koji je za otkriće hemizma ciklusa sa saradnicima dobio Nobelovu nagradu 1961.g. u oblasti hemije.



Slika 11-12.

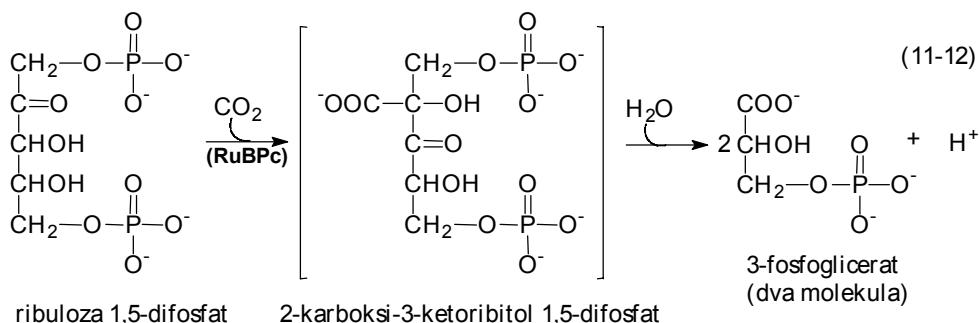
Glavne karakteristike hemizma Benson-Kalvinovog ciklusa.

Glukoza se stvara, a ribulosa-1,5-difosfat se regeneriše.

Biljke u kojima se fotoasimilacija  $\text{CO}_2$  obavlja pomoću Calvinovog ciklusa su prema proizvodu ciklusa (trioze) nazvane  $\text{C}_3$ -biljkama. U njima se fotoasimilacija obavlja na temperaturama  $15\text{-}25^\circ\text{C}$ . Polazni reaktanti u Calvinovom ciklusu su pored  $\text{CO}_2$  još i ATP i NADPH, a proizvodi, triozofosfati iz kojih se sintetizuju prosti i složeni ugljeni hidrati. Prema reakcijama Calvinov ciklus se može podeliti u tri faze i to:

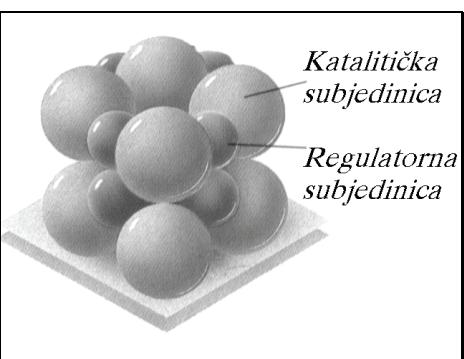
- ◆ karboksilaciju (fiksiranje  $\text{CO}_2$ ),
- ◆ redukciju (sintezu 3-fosfoglicerata) i
- ◆ regeneraciju (regenerišu se akceptori).

**Faza karboksilacije** - je I ključna faza fotoasimilacije u kojoj se neorgansko jedinjenje  $\text{CO}_2$  prevodi u organsko jedinjenje. Ova faza Calvinovog ciklusa podrazumeva karboksilaciju ribuloze-1,5-difosfata (5-C atoma) sa  $\text{CO}_2$  (1-C atom) do oblika 6-C intermedijera, 2-karboksi-3-ketoribitol-1,5-difosfata, koji brzo hidrolizuje dajući dva molekula 3-fosfoglicerata (jednačina 11-12).



Reakcija je katalizovana enzimom **ribuloza-1,5-difosfat karboksi-lazom**, **RuBPc** ili **ribisko** (EC 4.1.1.39). Ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza je jedan od specifičnih enzima fotosintetičkog aparata biljaka. Ovaj enzim je lokalizovan na stromalnoj strani tilakoidne membrane i verovatno je jedan od najrasprostranjenijih proteina u prirodi, on čini oko 15% ukupnih proteina hloroplasta. Mr RuBPc je oko 560 kD, i sadrži osam velikih subjedinica (Mr 55 kD) i osam malih subjedinica (Mr 15 kD) (slika 11-13).

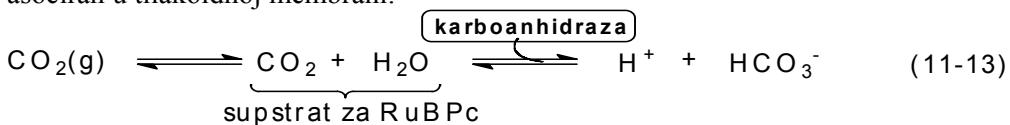
Velika subjedinica ima katalitičku dok mala subjedinica ima regulatornu ulogu. Aktivator ovog enzima je ion  $\text{Mg}^{2+}$ .



Slika 11-13.

Subjedinice strukture enzima ribuloza -1,5-difosfat karboksilaze.

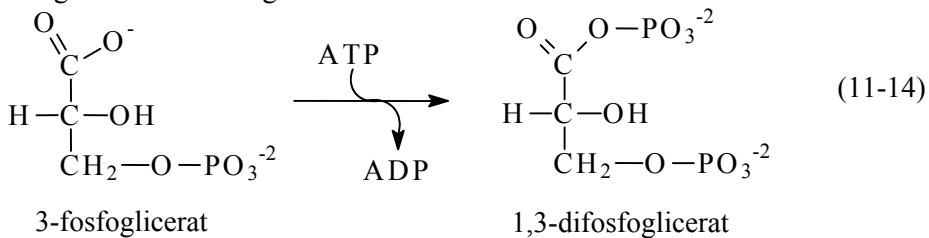
$\text{CO}_2$  u napred navedenoj reakciji ne može proći kroz membranu plazme te se on rastvara u vodi dajući  $\text{HCO}_3^-$  ion koji difuzijom može proći kroz membranu. Iz njega se  $\text{CO}_2$  regeneriše pomoću enzima *karboanhidraze* (EC 4.2.1.1) koji je asociran u tilakoidnoj membrani:



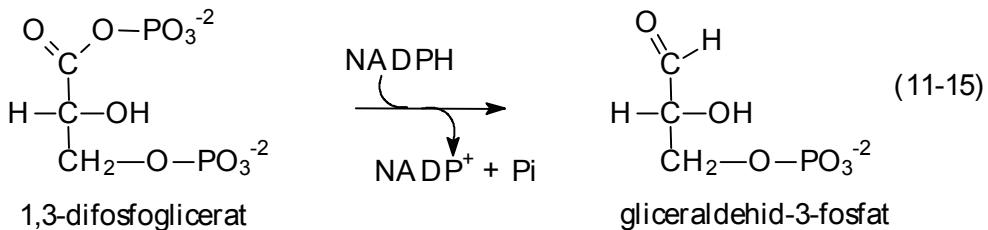
Položaj ravnoteže reakcije zavisi od vrednosti pH. Reakciju katalizuje enzim karboanhidraza (anhidraza karbonatne kiseline). Karboanhidraza dikotiledonih biljaka sastoji se od šest podjedinica, i po molekulu sadrži šest atoma cinka. Karboanhidraza se nalazi u citoplazmi i hloroplastima. Uloga ovog enzima u hloroplastima u foto-sintetičkoj asimilaciji  $\text{CO}_2$  je još nejasna. Smatra se da u hloroplastima prenosi  $\text{CO}_2$ , a ne  $\text{HCO}_3^-$  ion. Supstrat za RuBP-karboksilazu je pre  $\text{CO}_2$  nego  $\text{HCO}_3^-$ .

Izmedju aktivnosti karboanhidraze i intenziteta fotosintetičke asimilacije  $\text{CO}_2$  postoji direktna zavisnost. Aktivnost ovog enzima u velikoj meri zavisi i od nivoa obezbedjenosti biljaka cinkom. U uslovima akutnog nedostatka cinka njena aktivnost prestaje. Aktivnosti oba enzima ribuloze-1,5-difosfat-karboksilaze i karboanhidraze, imaju veliki značaj za intenzitet fotosinteze. Karboanhidraza, verovatno određuje količinu  $\text{CO}_2$  koja se stavlja na raspolažanje enzimu koji karboksilira akceptora  $\text{CO}_2$ , ribulozi-1,5-difosfat-karboksilazi.

**Faza redukcije** - obuhvata dve povezane reakcije u kojima dolazi do redukcije 3-fosfoglicerata u gliceraldehid-3-fosfat pomoću ATP i NADPH koji su nastali u svetloj fazi fotosinteze. U prvoj reakciji (11-14) stvara se 1,3-difosfoglicerat iz 3-fosfoglicerata.



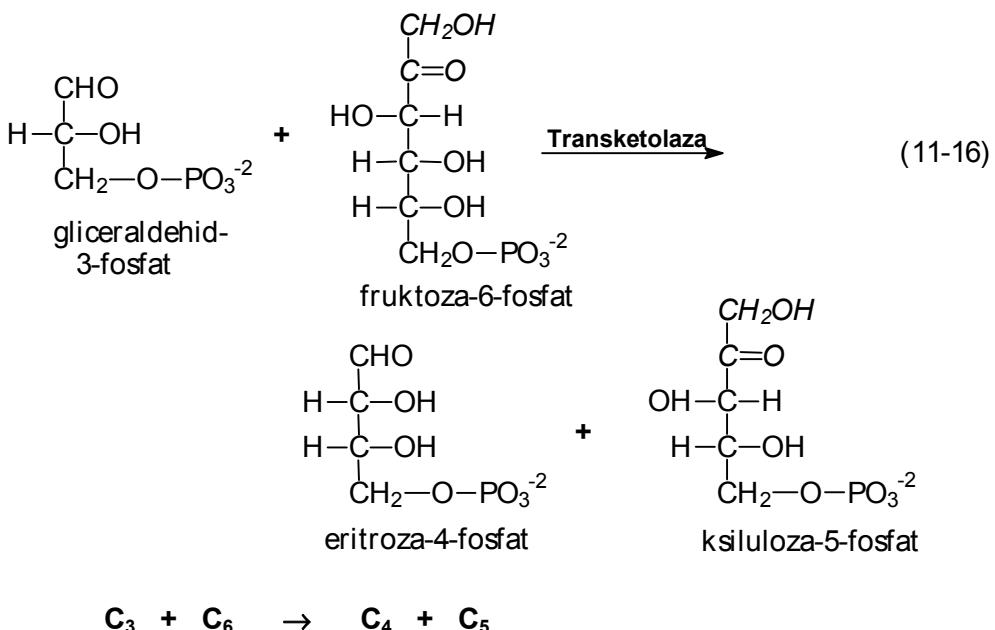
Ovu reakciju katalizuje enzim *fosfoglycerat-kinaza* (EC 2.7.2.3). U drugoj reakciji datoj jednačinom 11-15, vrši se defosforilacija i redukcija 1,3-difosfoglicerata. Reakciju katalizuje enzim *gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza* (EC 1.2.1.12).



**Faza regeneracije** - Da bi se Calvinov ciklus mogao kontinuirano odvijati potrebno je da se polazno jedinjenje, akceptor  $\text{CO}_2$ , ribuloza-1,5-difosfat stalno obnavlja. Reakcije regeneracije ribuloze-1,5-difosfata (RuBP) mogu se podeliti na četiri stepena: priprema, - preraspodela, - izomerizacija i - fosforilacija.

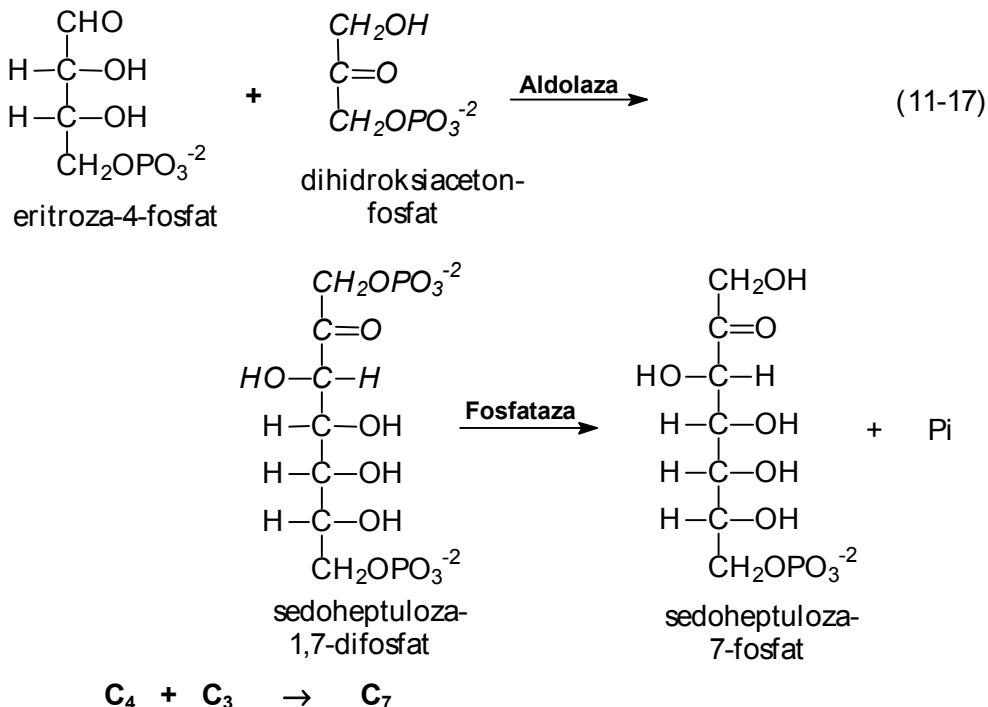
Priprema - regeneracija akceptora počinje sa konverzijom gliceraldehid-3-fosfata u dihidroksiaceton-fosfat posredstvom enzima *triozofosfat-izomeraze* (EC 5.3.1.1). Potom, kondenzacijom ova dva nastaje fruktoza-1,6-difosfat (reakcija je katalizovana aldolazom). Fruktoza-1,6-difosfat se hidrolizuje do fruktoza-6-fosfata (katalizovana difosfatazom). Sa nastanjem gliceraldehid-3-fosfata, dihidroksiaceton-fosfata i fruktozo-6-fosfata može da počne i drugi stepen u regeneraciji ribuloze-1,5-difosfata.

Preraspodela - počinje sa reakcijom gliceraldehid-3-fosfata (tri ugljenika ili  $\text{C}_3$ ) i fruktoze-6-fosfata ( $\text{C}_6$ ). Proizvodi reakcije su eritroza-4-fosfat ( $\text{C}_4$ ) i ksiluloza-5-fosfat ( $\text{C}_5$ ) (jednačina 11-16). Pokazano je da u reakciji učestvuje devet C atoma i daju proizvode takodje sa devet ugljenika, ali su oni različito organizovani.

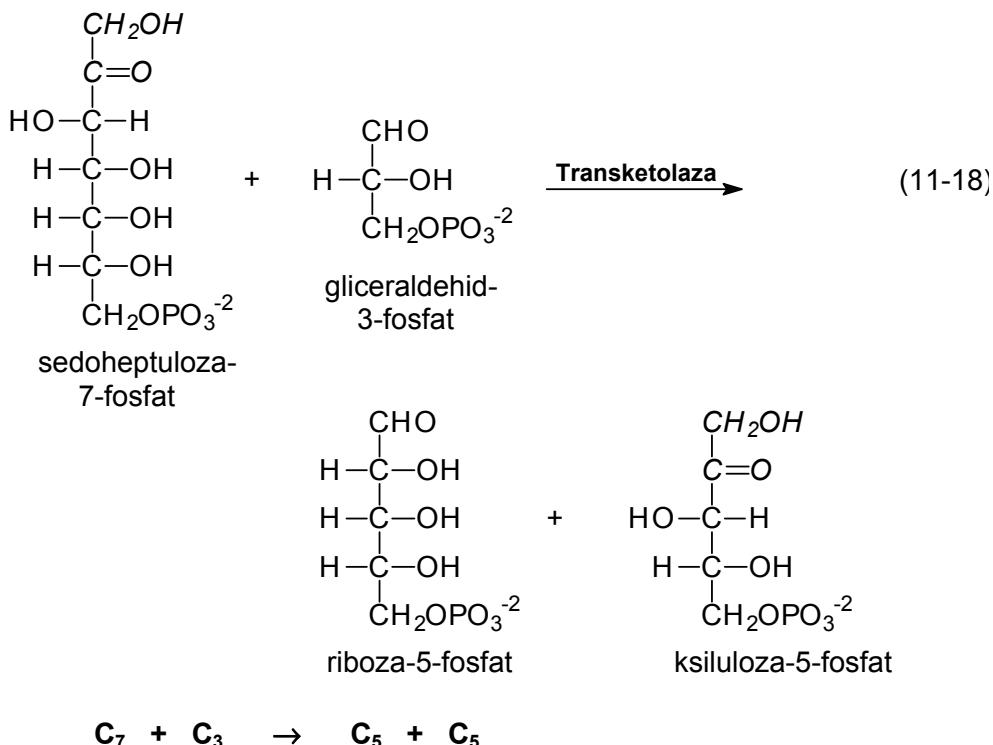


Reakcija je katalizovana *transketolazom* (EC 2.2.1.1) enzimom koji takođe katalizuje neke reakcije u pentozo-fosfatnom putu. U ovoj reakciji se prenose dve C-jedinice (označene kosim slovima) sa C<sub>6</sub> na C<sub>5</sub>.

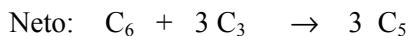
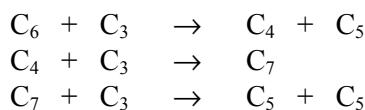
Eritroza-4-fosfat (C<sub>4</sub>) u reakciji sa dihidroksiaceton-fosfatom (C<sub>3</sub>) daje sedoheptulozu-1,7-difosfat (C<sub>7</sub>) (jednačina 11-17).



Krajnji proizvod navedene reakcije je sedoheptuloza-7-fosfat. Tri C atoma se prenose u aldolaznoj reakciji katalizovanoj enzimom *aldolazom* (EC 2.2.1.2). U fosfataznoj reakciji (katalizovana *fosphatazom* EC 3.1.3.37), sedoheptuloza-1,7-difosfat hidrolizuje dajući sedoheptuloza-7-fosfat i fosfatni ion. U poslednjoj reakciji sedoheptuloza-7-fosfat (C<sub>7</sub>) reaguje sa drugim molekulom gliceraldehid-3-fosfata (C<sub>3</sub>) dajući ribuzu-5-fosfat (C<sub>5</sub>) i ksilulozu-5-fosfat (C<sub>5</sub>) (reakcija 11-18). Kao što je naznačeno u ovoj reakciji prenose se dve C jedinice.

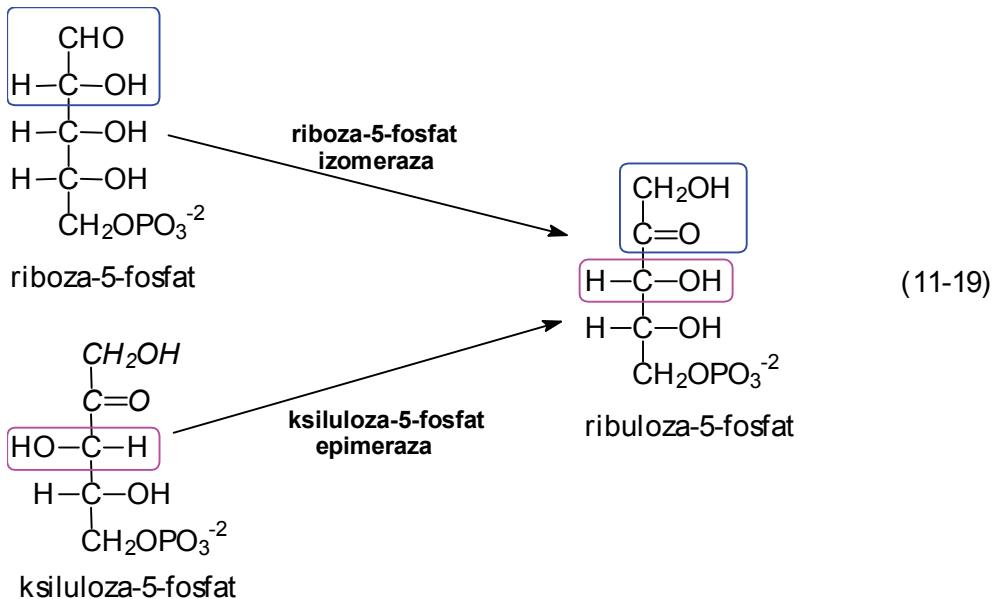


Ova reakcija je takođe katalizovana transketolazom. Reakcije u kojima se formira C-skelet u drugom stepenu preraspodele Calvinovog ciklusa mogu biti sumirane kao:

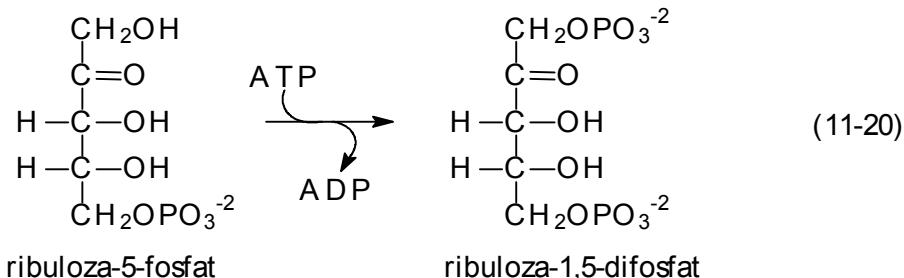


$C_6$  je fruktoza-6-fosfat, a tri  $C_3$  su dva molekula gliceraldehid-3-fosfata i jedan molekul dihidroksiaceton-fosfata. Tri  $C_5$  su dva molekula ksiluloze-5-fosfata i jedan molekul riboze-5-fosfata.

Izomerizacija - kao treći stepen u fazi regeneracije primarnog akceptora uključuje konverziju riboze-5-fosfata i ksiluloze-5-fosfata u ribulozu-5-fosfat. *Riboz-5-fosfat-izomeraza* (EC 5.3.1.6) katalizuje konverziju riboze-5-fosfata, dok *ksiluloza-5-fosfat-epimeraza* (EC 5.1.3.1) katalizuje konverziju ksiluloze-5-fosfata do ribuloze-5-fosfata (reakcija 11-19).



Fosforilacija - je poslednji stepen u kojem se ribuloza-1,5-difosfat regeneriše pomoću fosforilacije ribuloze-5-fosfata (reakcija 11-20). Ova reakcija zahteva ATP i katalizovana je enzimom *fosforibulokinazom* (EC 2.7.1.19).



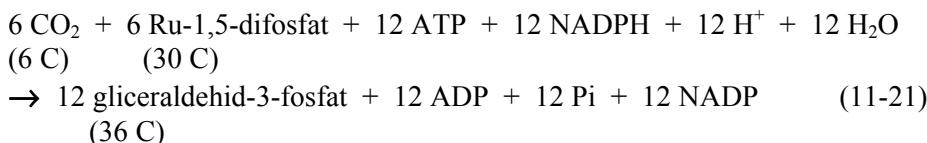
Reakcije regeneracije ribuloze-1,5-difosfata u Calvinovom ciklusu su sumarno date u tabeli 11-2.

Tabela 11-2. Reakcije regeneracije ribuloza-1,5-difosfata.

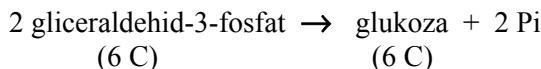
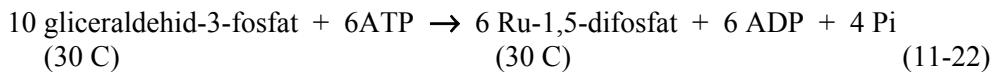
<b>1.</b>	2 gliceraldehid-3-fosfat → 2 dihidroksiaceton-fosfat (2 x 3C)	(2 x 3C)
<b>2.</b>	gliceraldehid-3-fosfat + dihidroksiaceton-fosfat → (3C) (3C)	fruktoza-1,6-difosfat (6C)
<b>3.</b>	fruktoza-1,6-difosfat → fruktoza-6-fosfat + Pi (6C) (6C)	
<b>4.</b>	fruktoza-6-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat → eritroza-4-fosfat (4C) (6C) (3C)	ksiluloza-5-fosfat (5C)
<b>5.</b>	eritroza-4-fosfat + dihidroksiaceton-fosfat → (4C) (3C)	sedoheptuloza-1,7-difosfat (7C)
<b>6.</b>	sedoheptuloza-1,7-difosfat → sedoheptuloza-7-fosfat (7C) (7C)	
<b>7.</b>	sedoheptuloza-7-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat → riboza-5-fosfat + (7C) (3C)	ksiluloza-5-fosfat (5C)
<b>8.</b>	riboza-5-fosfat → ribuloza-5-fosfat (5C) (5C)	
<b>9.</b>	2 ksiluloza-5-fosfat → 2 ribuloza-5-fosfat (2 x 5C) (2 x 5C)	
<b>10.</b>	3 ribuloza-5-fosfat + ATP → 3 ribuloza-1,5-difosfat + ADP (3 x 5C) (3 x 5C)	
<b>NETO:</b> 5 gliceraldehid-3-fosfat + 3 ATP → (5 x 3C) 3 ribuloza-1,5-bifosfat + 3 ADP + 2Pi (3 x 5C)		

### Stehiometrija Benson-Kalvinovog ciklusa:

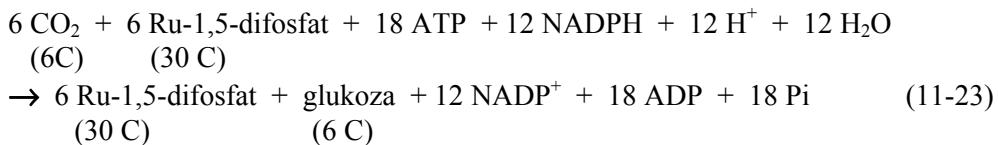
Već je pokazano da se u jednom obrtu Kalvinovog ciklusa veže šest molekula CO<sub>2</sub>. Svaki CO<sub>2</sub> u reakciji sa jednim molekulom ribuloze-1,5-difosfata proizvodi dva molekula 3-fosfoglicerata. Konverzija svakog molekula 3-fosfoglicerata u gliceraldehid-3-fosfat zahteva jedan ATP i jedan NADPH. Za šest molekula CO<sub>2</sub> pišemo jednačinu:



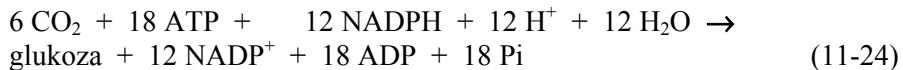
Deset od 12 molekula gliceraldehid-3-fosfata ( $C_3$ ) se prevode u fruktozu-6-fosfat ( $C_6$ ) i dihidroksiaceton-fosfat ( $C_3$ ) u toku regeneracije ribuloze-1,5-difosfata (slika 11-14). Regeneracija šest molekula ribuloze-1,5-difosfata objašnjava 30 od 36 C-atoma koliko ih se nalazi u 12 molekula gliceraldehid-3-fosfata. Ostalih 6 C-atoma (dva gliceraldehid-3-fosfat) se prevode u glukozi:



Sumarna jednačina kojom se izražava stehiometrija u puto  $\text{CO}_2$  u fotosintezi ima sledeći iskaz:



Ako se izostavi primarni akceptor (ribuloza-1,5-difosfat), a glukoza takođe smatra proizvodom fotosinteze sumarna jednačina Calvinovog ciklusa može se izraziti:



Faze regeneracije akceptora (ribuloza-1,5-difosfat),  $\text{CO}_2$  u Calvinovom ciklusu su shematski prikazane na slici 11-14.

### Izvod fotosinteze kod $C_3$ -biljaka:

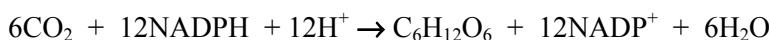
Redukcioni ekvivalenti koji se proizvode u svetloj fazi fotosinteze, kao NADPH koriste se za redukciju  $\text{CO}_2$  i grade ugljene hidrate u tamnoj fazi. ATP se takođe gradi u svetloj fazi i razgradjuje u ADP i Pi oslobadajući energiju za fiksaciju  $\text{CO}_2$ .

#### Svetla faza:



Tamna faza:

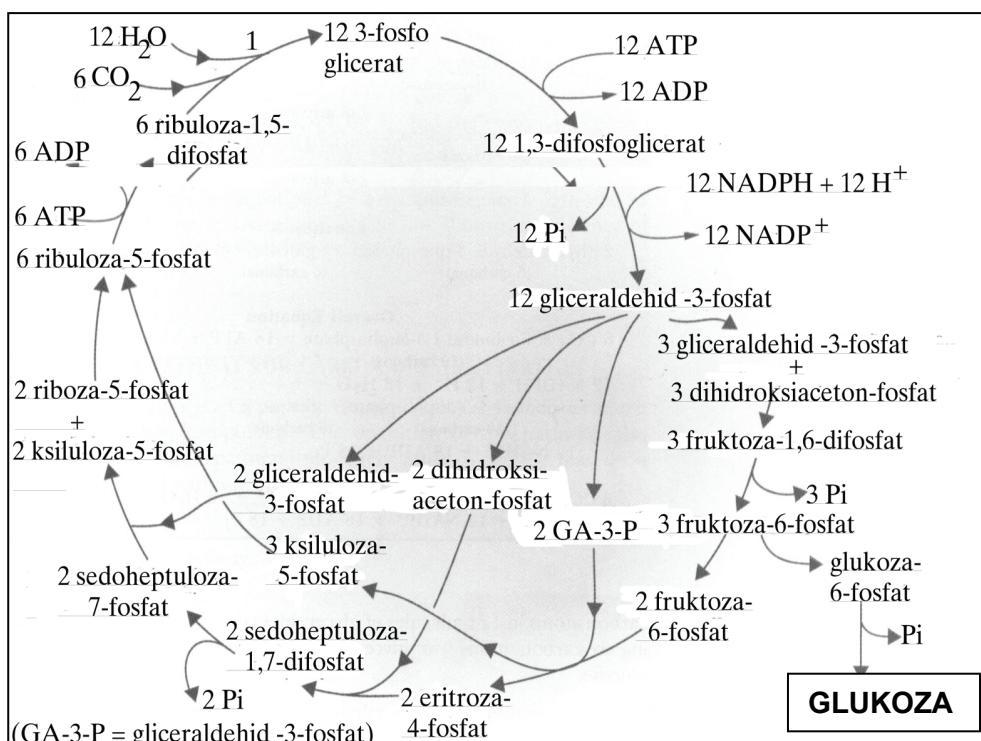
(11-26)



Ukupna reakcija:



Regeneracija akceptora  $\text{CO}_2$  (ribuloza-1,5-difosfata) u Calvinovom ciklusu kod  $\text{C}_3$  tipa biljaka prikazana je na slici 11-14.



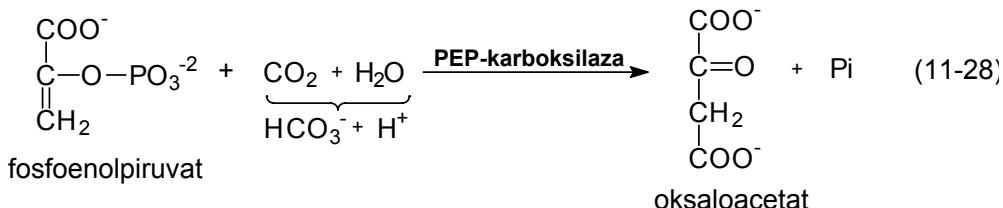
Slika 11-14. Regeneracija ribuloza-1,5-difosfata u Calvinovom ciklusu.

## Redukcija $\text{CO}_2$ u $\text{C}_4$ -biljaka

U brojnim biljkama poreklom iz tropa i subtropa, a najčešće među pripadnicima familija *Poaceae* (šećerna trska, kukuruz), *Chenopodiaceae* i dr.  $\text{CO}_2$  se redukuje pomoću  $\text{C}_4$ -puta, koji se još prema istraživačima koji su razjasnili

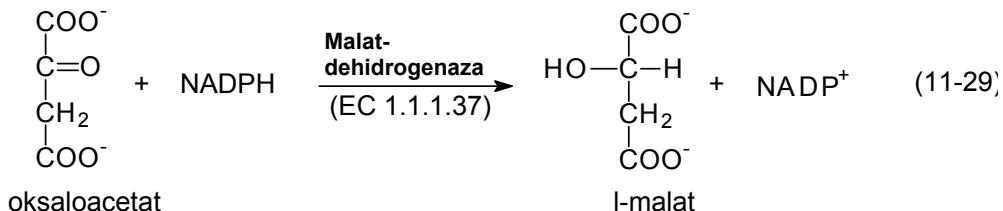
njegov hemizam naziva **Hatch-Slack-put**, ili **Kortschak, Hatch-Slack-put**. C<sub>4</sub>-biljke se razlikuju od C<sub>3</sub>-biljaka ne samo u hemizmu redukcije CO<sub>2</sub> i drugim biohemijskim procesima, već i po karakterističnoj anatomiji lista.

**Hetč-Slajk-Kortčakov ciklus** (Hatch-Slack-Kortschakov ciklus) - je fotoasimilacija odn. fiksacija CO<sub>2</sub> u C<sub>4</sub> biljkama koje imaju karakterističnu anatomiju listova. CO<sub>2</sub> kod ovih biljaka ulazi u listove za vreme otvaranja stroma i difunduje u citoplazmu mezofilnih ćelija gde služi kao supstrat za enzim *fosfoenolpiruvat-karboksilazu* (PEP-karboksilazu) koja karboksiluje fosfoenolpiruvat u oksalacetat.

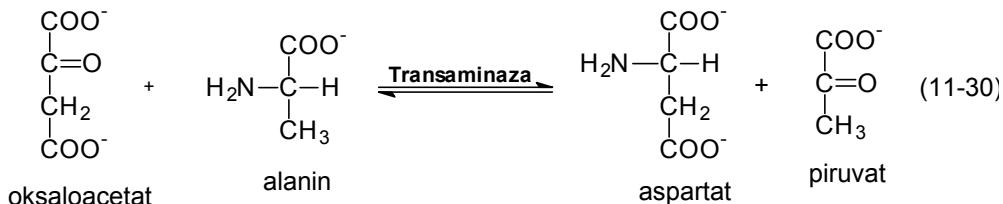


Enzim *fosfoenolpiruvat-karboksilaza* (PEPc; EC 4.1.1.31) ima znatno jači afinitet za CO<sub>2</sub> nego RuBP-karboksilaza/oksigenaza (ribisko) i lokalizovan je u hloroplastima mezofilnih ćelija. U zavisnosti od enzima koje sadrže C<sub>4</sub> biljke, mogu oksalacetat dalje redukovati u dve dikarbonske kiseline po tzv. malatnom i aspartatnom tipu:

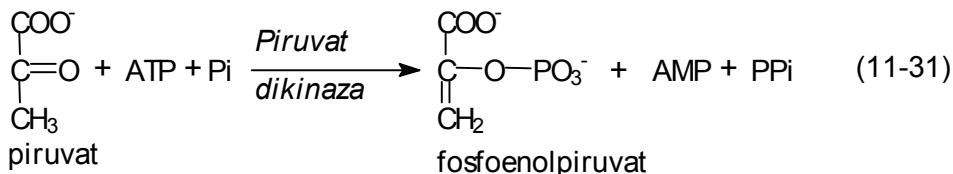
malatni tip:



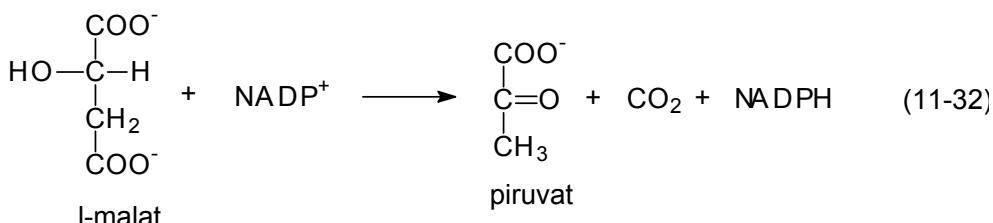
aspartatni tip:



Piruvat se dalje po jedinstvenoj hemijskoj reakciji za mezofilne ćelije pretvara u fosfoenolpiruvat, enzimom *piruvatfosfat-dikinazom* (EC 2.7.1.40) nadjena isključivo u mezofilnim ćelijama (jednačina 11-31):



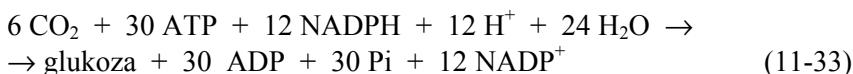
Biljke koje koriste kao nosač  $\text{CO}_2$  - *malat* imaju visoke aktivnosti enzima u ćelijama omotača provodnog snopića ("bandl sweat"). Oni katalizuju oksidativnu dekarboksilaciju malata u piruvat (jednačina 11-32). Oslobođen  $\text{CO}_2$  se koristi za Calvinov ciklus, a nagradjeni piruvat se vraća u mezofil gde se pretvara u PEP u reakciji katalizovanoj *malat-dekarboksilazom* (EC 1.1.1.40).



Biljke koje koriste kao nosač  $\text{CO}_2$ - *asparaginsku* kiselinu sadrže transaminaze u "bundle-sweat" ćelijama koje pretvaraju asparaginsku kiselinu nazad u oksalsirčetu kiselinu. Nagradjena oksalsirčetna kiselina se može prevesti u malat iz kojeg će se oslobođiti  $\text{CO}_2$  u "bundle sweat" ćelijama i služiti kao supstrat za ribisko u Calvinovom ciklusu. Pri transformaciji aspartata, ćelijama omotača provodnog snopića predaje se samo  $\text{CO}_2$  i za razliku od malat-tipa ne predaju se redukcioni ekvivalenti.

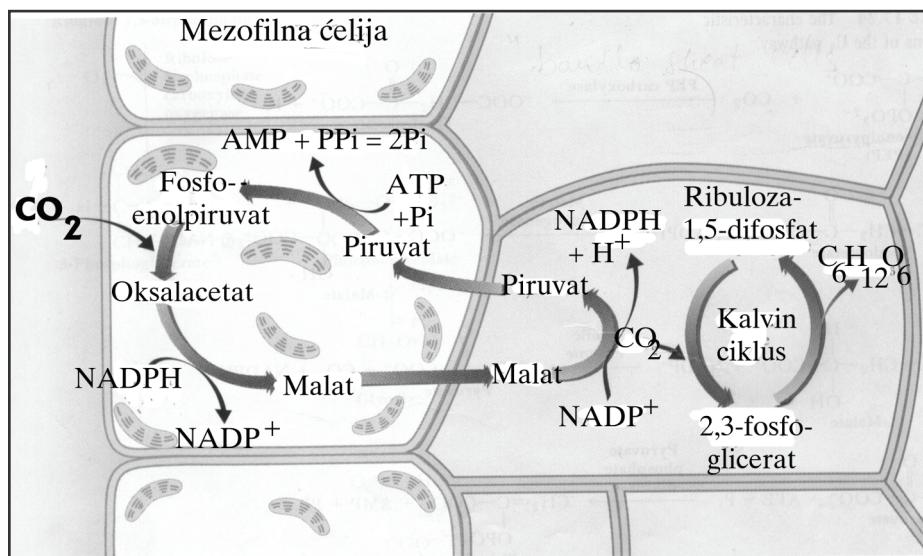
Hatch-Slack-Kortschakov ciklus je dat na slici 11-15 na kojoj se vidi i njegova povezanost sa Calvinovim ciklусом.

U ćelijama omotača provodnog snopića ne asimilira se samo  $\text{CO}_2$  koji u njih dospeva preko  $\text{C}_4$ -puta iz mezofila, već i  $\text{CO}_2$  koji u njih difunduje iz medjućelijskih prostora mezofila. Sumarna jednačina fiksacije  $\text{CO}_2$  kod  $\text{C}_4$ -biljaka je dat jednačinom 11-33.



Neto produkcija organske materije veća je u  $\text{C}_4$  nego u  $\text{C}_3$ -biljaka, i zbog odsustva fotorespiracije u  $\text{C}_4$ -biljaka.  $\text{C}_4$ -biljke troše više energije za fiksaciju  $\text{CO}_2$  od  $\text{C}_3$ -biljaka, što međutim, u uslovima velike osvetljenosti ne ograničava fotosintezu, pošto se sintetizuje dovoljna količina ATP. Tako  $\text{C}_3$  biljke troše 3 ATP

i 2 NADPH po molekulu CO<sub>2</sub>, dok C<sub>4</sub>-biljke troše 5 ATP i 2 NADPH od čega 2 ATP i 1 NADPH u ćelijama mezofila, a 3 ATP i 1 NADPH u hloroplastima omotača provodnog suda. Zbog povećane potrebe za energijom pri redukciji CO<sub>2</sub> efikasnost fotosintetičkog aparata C<sub>4</sub>-biljaka dolazi do punog izražaja samo u određenim klimatskim uslovima koji obiluju svetlošću i odlikuju se visokim temperaturama.



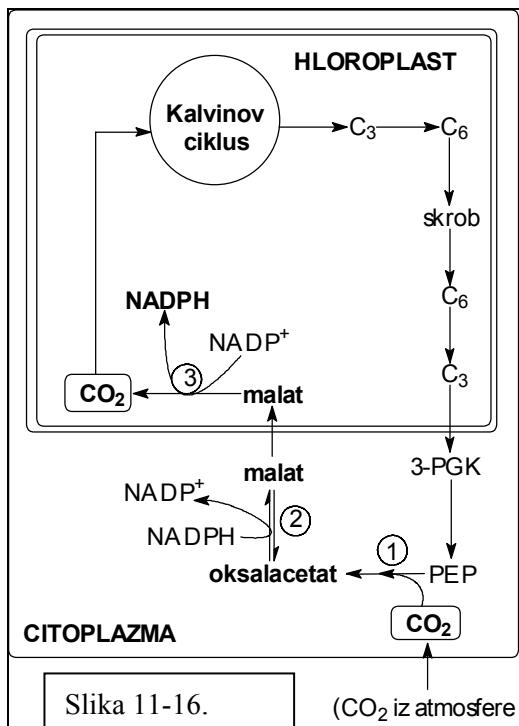
Slika 11-15. Put CO<sub>2</sub> kod C<sub>4</sub>-biljaka (*Hatch-Slack-Kortschakov ciklus*)  
(M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saund.Coll.Publish., London, 1991, str.441, sl.17.11).

C<sub>4</sub> u odnosu na C<sub>3</sub>-biljke bolje iskorišćavaju vodu, imaju niži transpiracioni koeficijent i veću tolerantnost prema solima. C<sub>3</sub>-biljke zbog intenzivnije transpiracije, posebno sredinom dana kada je u letnjim mesecima temperatura visoka zatvaraju strome, čime se pogoršavaju uslovi snabdevanja sa CO<sub>2</sub>. Kod C<sub>3</sub>-biljaka samo je jedan put fiksacije CO<sub>2</sub>, a kod C<sub>4</sub> su dva puta fiksacije CO<sub>2</sub>, razdvojena u prostoru (prostor mezofila i prostor ćelija omotača provodnog snopića). Takodje smatra se da je natrijum za C<sub>4</sub>-biljke neophodan elemenat, dok je za druge biljke samo koristan. Ovo su samo neke od razlika neto fotosinteze izmedju C<sub>4</sub> i C<sub>3</sub>-biljaka. Zajedničko im je da stome otvaraju danju.

## Vezivanje CO<sub>2</sub> u CAM-biljaka

CAM-put asimilacije CO<sub>2</sub> predstavlja prilagodjavanje metabolizma biljaka ekstremno suvim staništima sa visokim dnevnim i niskim noćnim temperaturama. Stome su u tih biljaka danju zatvorene da bi se smanjilo odavanje vode, zbog čega u toku dana ne mogu da usvajaju CO<sub>2</sub>. U toku noću kada je temperatura niža i s tim u

vezi odgovarajuće je viša relativna vlažnost vazduha stome se otvore, usvaja se  $\text{CO}_2$  iz atmosfere i istovremeno koristi i  $\text{CO}_2$  koji se oslobadja u procesu respiracije. Ovaj put usvajanja  $\text{CO}_2$  karakterističan je za sukulente, u prvom redu *Crassulaceae*, mnoge halofite i neke biljke iz porodice *Liliaceae*, *Coctaceae* i dr. Usvojeni  $\text{CO}_2$  pomoću fosfoenol-piruvata-karboksilaze gradi oksalacetat, koji zatim pomoću malat-dehidrogenaze prelazi u malat. U citoplazmi, deo malata se oksidativno dekarboksilira NADP-specifičnim malt-enzimom. Oslobođeni  $\text{CO}_2$  u mraku (u odsustvu redukujućih ekvivalenata, NADPH i ATP fotosinteze) ne može da se uključi u Kalvinov ciklus. Stoga dekarboksilacija malata u mraku veoma brzo prestaje. Malat koji u toku noći nastaje nakuplja se u vakuoli. U toku dana stome su zatvorene i dekarboksilacijom malata nastali  $\text{CO}_2$  uključuje se u Kalvinov ciklus i dalje sve do sinteze skroba. Pošto su stome danju zatvorene ne usvaja se  $\text{CO}_2$ , prestaje sinteza malata usled čega se njegova koncentracija u ćeliji smanjuje.



U toku noći ponovo počinje fiksacija  $\text{CO}_2$  istovremeno se razlaže skrob i putem respiracije dolazi do stvaranja primarnog akceptora  $\text{CO}_2$  fosfoenolpiruvata. Time je sistem zaokružen i stvoreni su uslovi za ponovnu fiksaciju  $\text{CO}_2$  (slika 11-16).

Karboksilacija u toku noći najčešće premašuje dekarboksila-ciju koja se istovremeno odvija u procesu respiracije, tako da u toku noći dolazi do neto potrošnje  $\text{CO}_2$ . Ako su CAM biljke dobro obezbedjene vodom, pošto se iscrpe zalihe malata, otvaraju se stome i u toku dana vezuje atmosferski  $\text{CO}_2$  pomoću RuBP.

Kod većini CAM i  $\text{C}_4$ -biljaka vezivanje  $\text{CO}_2$  je slično s tom razlikom da je u  $\text{C}_4$ -biljaka primarno vezivanje  $\text{CO}_2$  i uključivanje u Kalvinov ciklus prostorno (ćelije mezofila / ćelije omotača provodnih snopića), a u CAM-biljaka vremenski (dan / noć) razdvojeno. Karakteristični enzimi u navedenoj shemi vezivanja  $\text{CO}_2$  kod CAM biljaka su: 1-PEP-karboksilaza; 2-malat-dehidrogenaza; 3-malt-enzim.

Neke sličnosti i razlike u metabolizmu  $\text{CO}_2$  kod  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  i CAM-biljaka date su u tabeli 11-3.

Tabela 11-3. Karakteristike metabolizma CO<sub>2</sub> kod C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> i CAM-biljaka.

C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	CAM
1. Tipične biljke umerno tople zone(duvan, španać, pšenica, soja, krompir, suncokret, eukaliptus).	Tipične tropске ili supertropske biljke prilagođene visokom intenzitetu svetlosti i visokoj temperaturi.	Biljne vrste aridne zone (kaktusi, agave, sukulentne biljke, orhideje).
2. Srednje produktivne. Prinos 30 t/ha suve mase	Visoko produktivne. 120 t/ha sveže mase, npr. šećerna trska.	Obično veoma nisko produktivne (ananas je visoko produktivan).
3. Primarni akceptor CO <sub>2</sub> ribulozo bifosfat (RuBP).	Primarni akceptor CO <sub>2</sub> fosfoenolpiruvat (PEP).	Akceptor CO <sub>2</sub> u mraku PEP na svetlu RuBP.
4. Primarni produkt fiksacije CO <sub>2</sub> je kiselina sa 3 C-atoma, fosfoglicerat.	Primarni produkt fiksacije CO <sub>2</sub> je kiselina sa 4 C-atoma, oksalacetat.	Producat fiksacije CO <sub>2</sub> u mraku je oksalacetat, a na svetlu fosfoglicerat.
5. Samo jedan put fiksacije CO <sub>2</sub> .	Dva puta fiksacije CO <sub>2</sub> , razdvojena u prostoru.	Dva puta fiksacije CO <sub>2</sub> , odvojena u vremenu.
6. Visok intenzitet sinteze glikolata i fotorespiracija.	Nizak intenzitet sinteze glikolata bez fotorespiracija.	Isto kao kod C <sub>4</sub> .
7. Nizak stepen iskorišćavanja vode i mala tolerantnost prema solima.	Visok stepen iskorišćavanja vode i velika tolerantnost prema solima.	Isto kao kod C <sub>4</sub> .
8. Stome se otvaraju danju.	Isto kao kod C <sub>3</sub> .	Stome su otvorene noću

#### 11.1.4. Faktori koji utiču na fotosintezu

Fotosinteza, a samim tim i faktori koji na nju utiču se veoma intenzivno proučavaju u predmetu fiziologija biljaka, te će u ovom poglavlju biti pomenuti samo neki faktori (npr. sadržaj hlorofila, intenzitet svetlosti, stresni uslovi itd.) koji utiču na rastenje i razviće biljaka.

Sadržaj hlorofila u normalnim uslovima rastenja i razvića biljaka nije ograničavajući faktor za intenzitet fotosinteze. Smatra se da listovi biljaka imaju više hlorofila nego što im je potrebno, tako da pri smanjenoj količini hlorofila fotosinteza normalno teče.

Intenzitet svetlosti stimulira fotosintezu ali je uslovлен biljnom vrstom. Danas su veoma aktuelne biljne vrste sa velikom lisnom površinom, koje su krajnji cilj proučavanja u oblasti genetičkog inženjerstva.

Hemijski elementi u zavisnosti od njihove količine u biljci, zemljишtu i okolini mogu delovati kao aktivatori i inhibitori fotosinteze.

Razna hemijska jedinjenja od kojih se mnoga koriste kao herbicidi i pesticidi deluju inhibitorno na fotosintezu i mogu se prema reakciji koju inhibiraju podeliti u 3 grupe i to jedinjenja koja:

- izdvajaju elektrone iz fotosintetičkog elektronskog toka,
- uvode elektrone u fotosintetički elektronski tok i
- prekidaju elektronski tok.

Jedinjenja prve grupe se nazivaju i *akceptorima elektrona*. U ovu grupu ubrajaju se metil-viologen, benzil-viologen, antrahinon-2-sulfonat, diamino-duron i dr. Oni dobijaju elektrone od PS I odnosno  $Fd$  te su verovatno redukovani od  $X^-$ . Gvoždje(III)cijanid i dihlorfenol-indo-fenol primaju elektrone od komponenata intermedijarnog transportnog lanca u oblasti citohroma f i plastocianina.

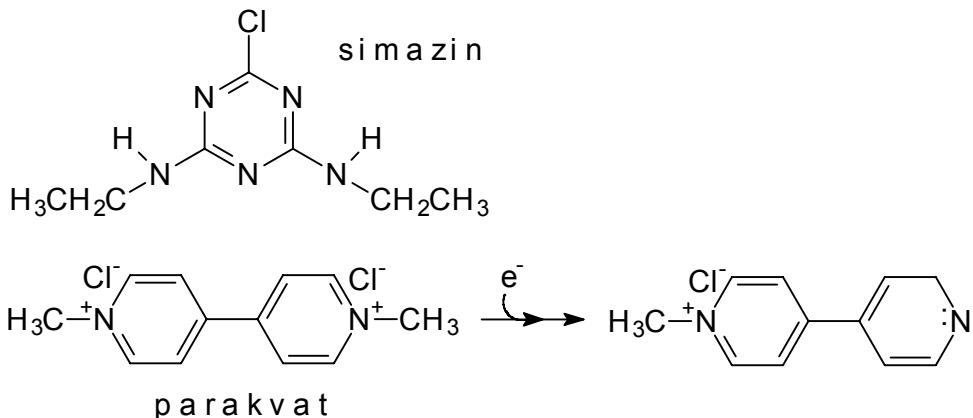
Jedinjenja II grupe su *donori elektrona* kao npr. hidrohinon, hidroksilamin, difenilkarbazid, joni Mn i dr. jer daju elektrone u elektronski tok od vode prema citohromu  $b_{559}$ .

Jedinjenja III grupe su *inhibitori* toka elektrona kao npr. disaliciliden-propandiamid (DSPD) koji inhibira tok elektrona prema  $Fd$ , DBMID prekida tok e<sup>-</sup> između citohroma  $b_{559}$  i citohroma f i simazin čija je struktura data na slici 11-17.

Simazin se od 1952.g. primenjuje kao herbicid (kao i triazin i atrazin). Apsorbovan preko lista i korena inhibira rastenje i razviće biljaka jer blokira necikličnu fotofosforilaciju, zaustavljanjem toka elektrona između koenzima Q i citohroma  $b_{559}$ . Na sličan način deluju i derivati uree koji se apsorbuju korenom i blokiraju necikličnu fotofosforilaciju.

Bipiridinijum herbicidi kao, npr. parakvat (primenjuje se od 1950.g.) oduzimaju elektrone od P-700 te smanjuju nastajanje NADPH. Parakvat može oštetiti i membrane hloroplasta jer oduzima elektron od  $X^-$  i redukuje  $O_2$  u

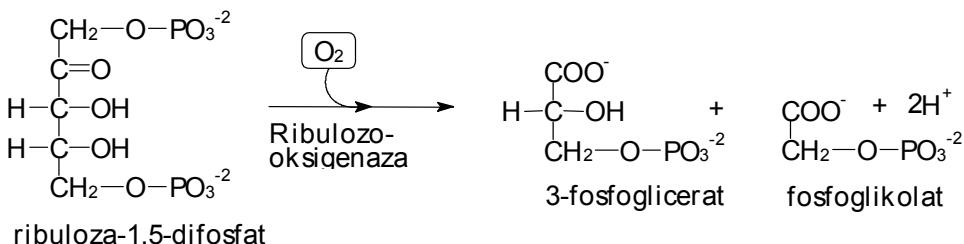
vodonikperoksid (koji reaguje sa masnim kiselinama u membranama prevodeći ih u perokside masnih kiselina).



Slika 11-17. Strukture simazina i parakvata.

## 11.2. Fotorespiracija i produktivnost biljaka

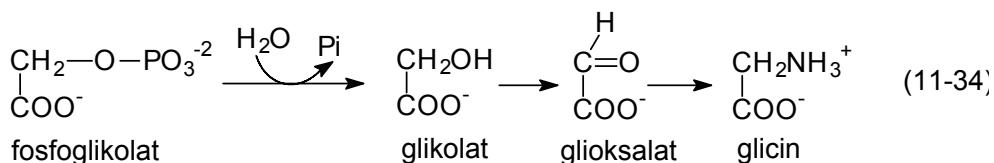
Biljke imaju opšte respiratorne procese slične kao životinje i mikroorganizmi. One razlažu ugljene hidrate pomoću glikolize i Krebsovog ciklusa, a sadrže enzime koji katalizuju reakcije u metabolizmu proteina i aminokiselina. Poseduju i dodatnu metaboličku aktivnost nazvanu *fotorespiracija* koja se realizuje na svetlosti. Slična je respiraciji u tami jer se oslobadja  $\text{CO}_2$  i troši  $\text{O}_2$ , a suprotna je fotosintezi. Njen efekat se ogleda u opadanju rasta biljaka i prinosa. Nastaje zbog sposobnosti **ribiska** da katalizuje i *oksigenaciju* ribulozo-1,5-bifosfata, kada je koncentracija  $\text{O}_2$  u ćeliji visoka (slika 11-18).



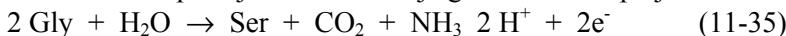
Slika 11-18. Oksigenacija ribulozo-1,5-difosfata.

$O_2$  i  $CO_2$  mogu zauzeti isto katalitičko mesto i reagovati sa fosfatima šećera. Umesto dva molekula gradi se samo jedan molekul fosfoglicerinske kiseline i jedan molekul fosfoglikolne kiseline i tako sprečava funkcionisanje Benson-Calvin-ovog ciklusa.

Gradjenje fosfoglikolata predstavlja gubitak za biljke, jer se on dalje oksiduje oksidazom u glioksilat, a potom transaminacijom daje glicin i druge aminokiseline.



Glicin se transportuje u mitohondrije gde se razlaže po jednačini 11-35.



Nagradjeni  $\text{NH}_3$  se vezuje za glutamat dajući glutamin ( $\text{Glu-NH}_2$ ).

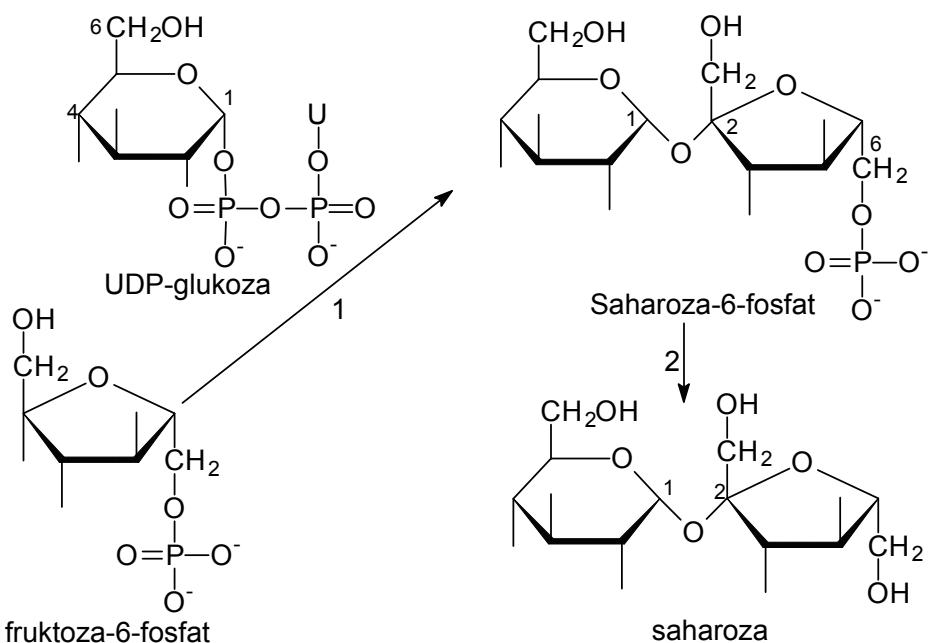
Fotorespiracija je rasipništvo, jer biljke vezuju deo  $O_2$  koji su oslobodili fotosintezom. Zbog navedenog se fotorespiracijom može smanjiti prinos pšenice, šećerne repe i raznih leguminoza i do 50%. C<sub>3</sub>-biljke se odlikuju visokim intenzitetom fotorespiracije, a C<sub>4</sub> niskim.

### 11.3. Biosinteza saharoze, skroba i celuloze

Glukoza-6-fosfat nagradjena fotosintezom iz proizvoda Kalvinovog ciklusa je prekursor za biosintezu saharoze, skroba i celuloze u biljkama. Koji će ugljeni hidrat iz njega nastati zavisiće od enzimskih sistema koji postoje u određenoj biljnoj vrsti i njihovoj aktivnosti. Zajedničko za sve biosinteze ugljenih hidrata je da se glukoza-6-fosfat izomerizuje u glukozu-1-fosfat, koja sa nukleozid-3-fosfatima (NTP) reaguje prema jednačini 11-36.



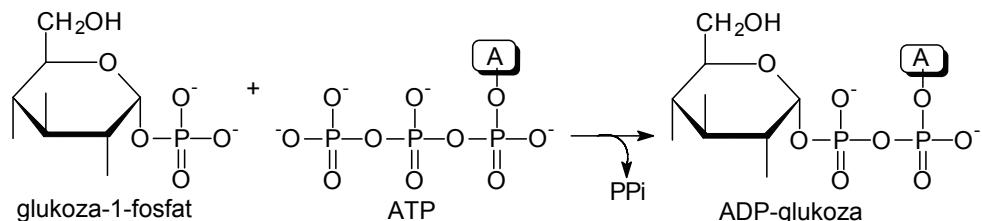
Nagradjena NDP-glukosa (ili bilo koji drugi NDP-monosaharid) može se redukovati raznim enzimima, epimerizovati ili preneti na druge ugljene hidrate ili njihove polimere. Kod biosinteze saharoze umesto ADP se koristi UDP (slika 11-19).



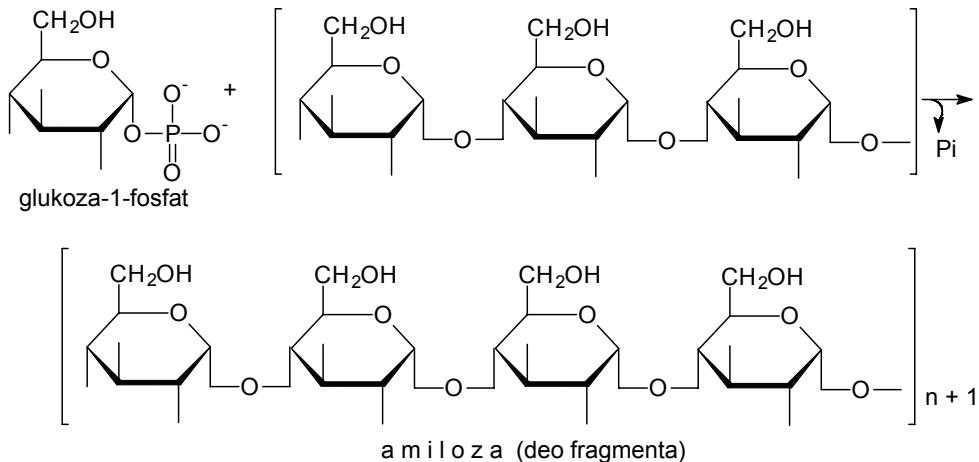
Slika 11-19. Biosinteza saharoze.

**Biosinteza saharoze** - je katalizovana enzimom *saharozo-sintazom* (EC 2.4.1.31) ukoliko se sintetizuje iz ADP- ili GDP-glukoze, ili *saharozofosfat-sintazom* (EC 2.4.1.14) ako se sintetizuje iz UDP-glukoze. Ona se obavlja u citoplazmi fotosintetičkih ćelija. Sintetizovana sahariza se iz lišća pomoću vode i osmotskog pritiska prenosi kroz sitaste cevi u koren gde se u amiloplastima pretvara u skrob. Zbog navedenog sahariza je najznačajniji transportni oblik ugljenih hidrata.

**Skrob** - se sintetizuje u hloroplastima i amiloplastima iz amiloze i amilopektina koji nastaju iz proizvoda fotosinteze. Amiloza se sintetizuje iz glukozofosfata koja se aktivira sa ATP prema reakciji 11-37. katalizovanoj sa ADP-glukozopirofosforilazom (ADPG-Pyr).

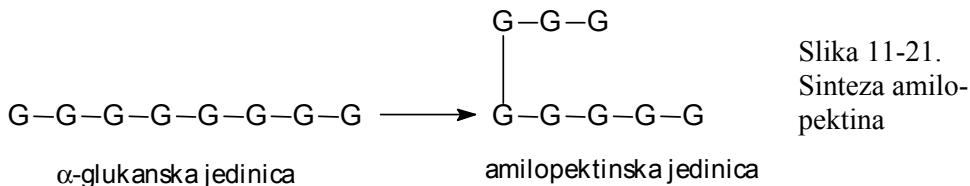


ADP-glukoza kao aktivirani molekul prenosi glukozne jedinice na *primer*-molekul (glukanski polimer)  $\alpha$ -glukana koji sadrži nekoliko  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  povezanih glukoznih jedinica (slika 11-20).



Slika 11-20. Prenošenje glukoznih jedinica na *primer*.

Reakcija je katalizovana  $\alpha$ -glukan-UDPG-glukozil-transferazom (EC 2.4.1.11). Amilopektin se sintetizuje na sličan način s tim što gradjenje  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  glikozidne veze katalizuje  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glukan enzimom granjanja poznat pod nazivom *Q enzim* (EC 2.4.1.18) (slika 11-21).



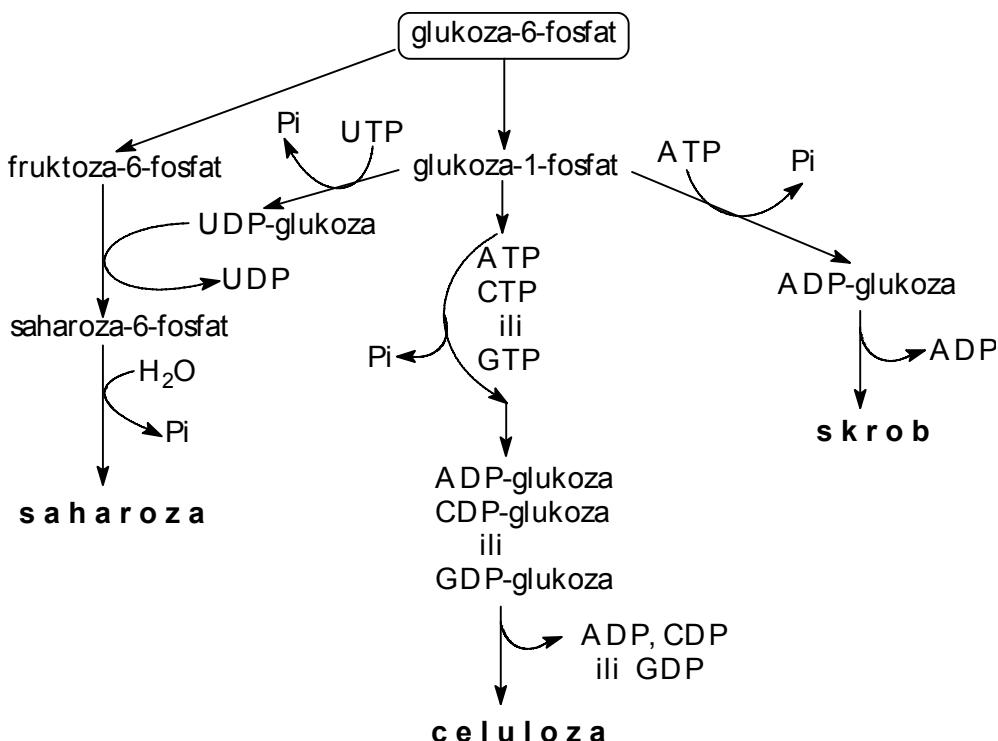
Granjanje se ostvaruje tako što se kratki lanci  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  povezanih glukoznih jedinica iz  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  položaja prenose i vezuju u  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  položaju. Ova reakcija se naziva transglikolizacija i može se definisati kao cepanje  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  veze i formiranje  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  veze.

*Q* enzim je čvrsto vezan za granule skroba i izolovan je iz skroba kukuruza i paradajza. On se aktivira sa 3-fosfoglyceratom (te zbog toga u Calvinovom ciklusu na svetlosti ima dosta ovog jedinjenja), a inhibira se sa neorganskim fosfatom (čija se količina u tami povećava). Zbog navedenog se u zelenim delovima biljaka sintetizuje skrob na svetlosti, a u tami razgradjuje. Skrob se skladišti u ćelijama u obliku granula nerastvornih u vodi. Njihov oblik i veličina je uslovljena biljnom vrstom (vidi slike 7-36 u poglavlju 7).

**Celuloza** - je  $\beta$ -glukan i sintetizuje se iz monomera  $\beta$ -D-glukoze koji se aktivira sa ATP, CTP ili GTP dajući ADP-, CDP- ili GDP-glukozu zavisno od vrste biljaka. Nagradjena "aktivirana glukoza" (nukleozid glukoza) se prenosi na molekul akceptora sukcesivnim adicijama. Akceptor su glukanski polimeri (*primeri*) koji vezuju glukozu na neredukujućem kraju. Biosinteza celuloze katalizovana je enzimom *celulozo-sintetazom* (jednačina 11-37).

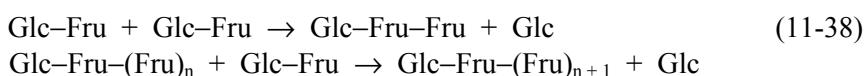


Sumarna shema biosinteze saharoze, skroba i celuloze data je na slici 11-22.



Slika 11-22. Shema biosinteze saharoze, skroba i celuloze.

Fruktani se sintetizuju iz saharoze, tako što jedan molekul saharoze daje fruktu drugom molekulu saharoze i gradi trisaharid koji se dalje produžuje dodavanjem drugih molekula fruktoza od molekula saharoze (jednačina 11-38).



## 11.4. Medjusobna pretvaranja ugljenih hidrata

Prvi proizvod fotosinteze je fosfoglicerinska kiselina čijim se pretvaranjima dobijaju monosaharidi glukoza, fruktoza, manoza i galaktoza. Oni se sintetizuju u tzv. "tamnim" enzimskim reakcijama. Nagradjeni monosaharidi se mogu medjusobno pretvarati jedni u druge na tri načina i to:

- ◆ internim pregrupisavanjem,
- ◆ prenosom C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> jedinica i
- ◆ oksidoredupcionim reakcijama.

**Interno pregrupisavanje** - se može obaviti pomoću tri vrste hemijskih reakcija: fosforilacijom, epimerizacijom i aldozo-ketozo-konverzijom (izomerizacijom). Fosforilacija je prenošenje fosfatnih grupa sa jednog molekula na drugi.. Reakcija je katalizovana fosfoglukomutazama kao npr. reakcija 11-39.



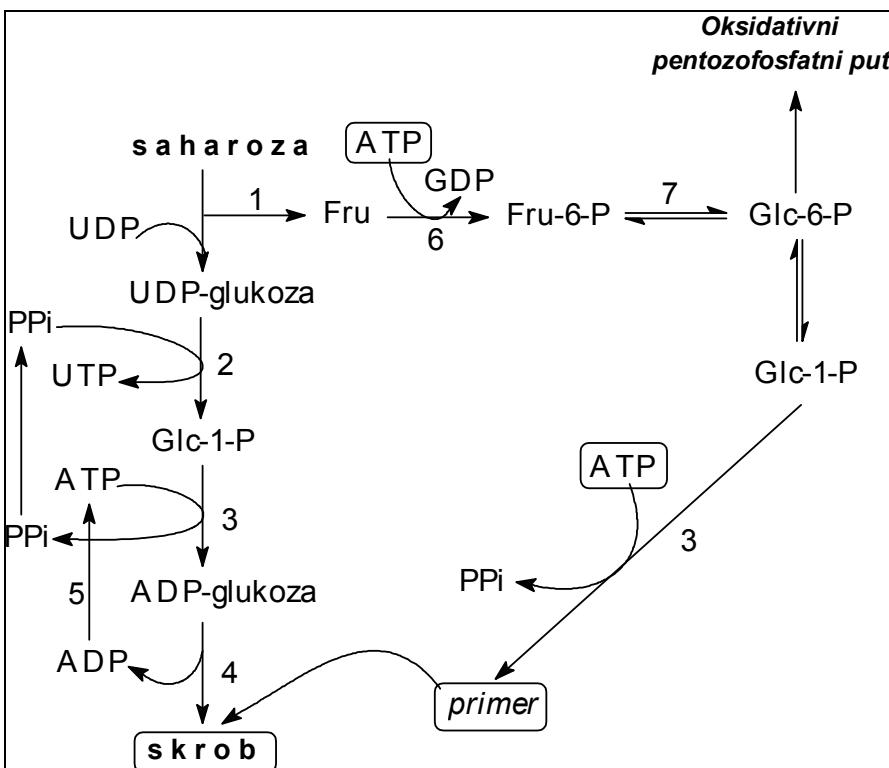
**Epimerizacija** - je druga vrsta internog pregrupisavanja u kojem se vrši interkonverzija konfiguracije na jednom asimetričnom ugljenikovom atomu monosaharida. Ove reakcije su katalizovane epimerazama od koji jedne koriste kao supstrat fosfat-monosaharid (ribulozofosfat-epimeraza), a druge UDP derivate (reakcija 11-40).



**Aldozo-ketozo interkonverzija** - se obavlja odgovarajućim izomera-zama koje kao supstrat koriste monosaharid čija je primarna - OH grupa fosforilisana. U biličkama su zastupljene sledeće tri izomeraze: glukozo-6-fosfat-izomeraza, ribozo-5-fosfat-izomeraza i triozofosfat-izomeraza (reakcije 11-41, 11-42 i 11-43).



Pretvaranje saharoze u skrob je skuplji "proces" od biosinteze skroba iz glukoze, jer je potrebno utrošiti dva molekula ATP po molekulu fruktoze da bi se ona fosforilisala u glukozo-1-fosfat i potom ugradila u skrob (slika 11-23).



Slika 11-23.

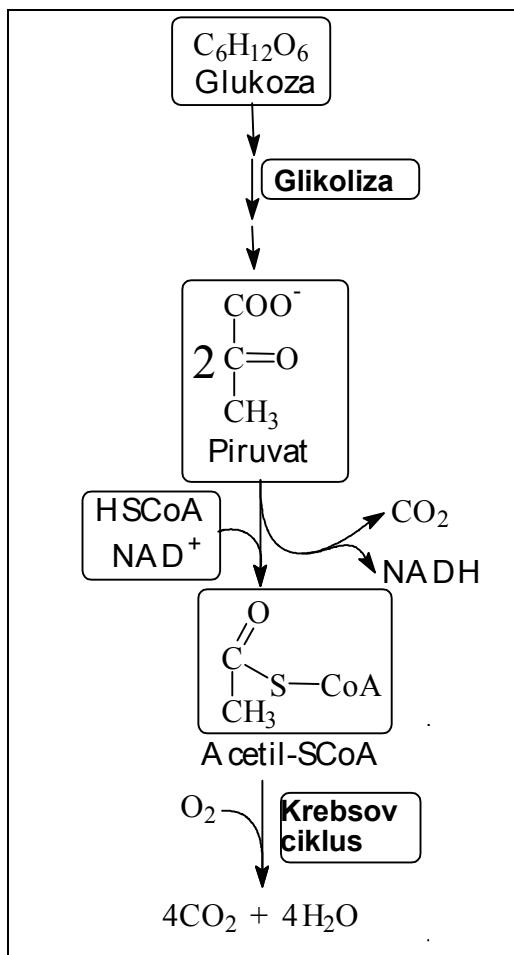
Pretvaranje saharoze u skrob u semenu u toku njegovog sazrevanja. Legende:  
 Enzimi: 1. saharozo-sintaza, 2. UDP-glukozo-pirofosforilaza, 3. ADP-glukozo-pirofosforilaza, 4. skrob-sintaza, 5. nukleozid-difosfat-kinaza, 6. heksokinaza, 7. glukozo-6-fosfat-izomeraza i 8. fosfoglukomutaza.

Na povišenoj temperaturi se vrši obrnut proces pretvaranja ugljenih hidrata. U toku klijanja polisaharidi skrob i inulin se hidrolizuju i to skrob  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilazama (EC 3.2.1.1; EC 3.2.1.2.), a inulin *inulazom* (EC 3.2.1.7). Proizvodi hidrolize su dekstrini, maltoza, rastvorljivi šećeri i sahariza. Tako npr. u toku klijanja u periodu juni/juli količina skroba se smanjuje od 63-15%. Istovremeno se razlaže i hemiceluloza i pretvara se *hemicelulazama* u monosaharide.

## 11.5. Katabolizam ugljenih hidrata

Kada se razmatraju procesi katabolizma (razgradnje) ugljenih hidrata kod biljaka onda se oni mogu podeliti u dva dela i to: razgradnja *polisaharida* i razgradnja *monosaharida*.

Razgradnja polisaharida je najintenzivnija u toku klijanja semena, a proizvodi razgradnje su monosaharidi koji se kao rastvorljivi šećeri prenose u druga tkiva ili se dalje razgradjuju. Glukoza koja se dobija razgradnjom skroba i drugih polisaharida razlaže se u ćeliji sledećim biohemijskim putevima i ciklusima:



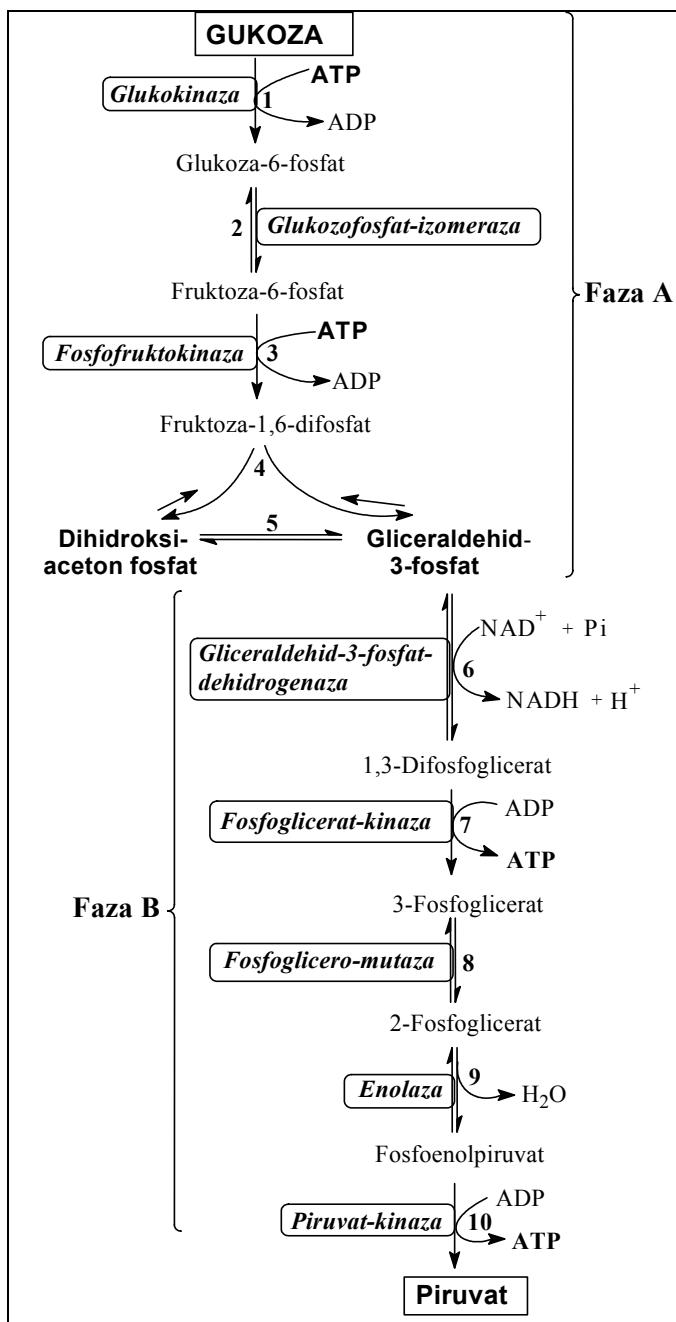
- ◆ *glikolizom,*
- ◆ *ciklusom trikarbonskih kiselina (CTK),*
- ◆ *pentozofosfatnim putem (glukonatnim) i*
- ◆ *glioksalatnim ciklusom.*

Razgradnja glukoze započinje u citoplazmi u uslovima sukcesivnih reakcija katalozova-nim supstrat specifičnim enzimima u biohemijском putu zvanom *glikoliza*, a nastavlja se u mitohondrijama Krebsovim ciklusom (ciklusom trikarbonskih kiselina ili ciklusom limunske kiseline), pri čemu je energetski bilans CTK mnogo povoljniji od energetskog bilansa razgradnje glukoze u uslovima glikolize (slika 11-24).

Slika 11-24.  
Putevi razgradnje glukoze glikolizom i Krebsovim ciklusom.

### 11.5.1. Glikoliza

Proces glikolize, koji se odvija u citosolu, obuhvata enzimsku razgradnju šećera (prostih i složenih) do piruvata ( $C_3$ -jedinjenja) uz oslobađanje ATP i NADH, a realizuje se u više faza (slika 11-25).



Slika.11-25.  
Faze razgradnje glu-  
koze specifičnim enzi-  
mima.

Glikoliza se odvija u 10 uzastop- nih enzimskih reakcija. Većina enzima, koji učestvuju u glikolizi, izolivani su u kristalnom stanju i dobro proučeni. Pošto su izolovani iz citopla zme, razumljivo je da se glikoliza odvija u citosolu. Enzimi glio lize nisu povezani u multienzimski kompleks. Međutim, postoje dokazi da u nekim tipovima ćelija neki enzimi mogu biti vezani slabim vezama za plazma membranu, mitochondrije itd.

U glikolizi se mogu uočiti tri faze. Prva faza je stvaranje glukozo-6-fosfata. On može nastati: (I) razlaganjem skroba (preko glukozo 1-fosfata), (II) izomerizacijom drugih heksokinaza ili (III) fosforilacijom glukoze pri ulasku u ćeliju pomoću heksokineze (glukokinaza) kao što je

prikazano slikom 11-25. Analizirajući sliku 11-25 jasno se uočavaju pojedine reakcije u putu glikolize, koje se mogu grupisati u dve faze:

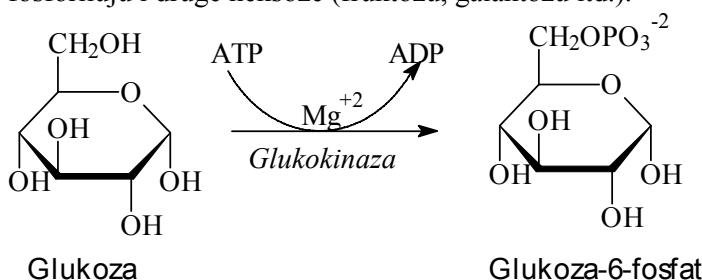
**A - preparativna faza**

(faza glikolize u kojoj se razgradnja glukoze odvija preko niza intermedijera i uz učešće više enzima do gliceraldehid- 3-fosfata) i

**B- faza dobijanja energije**

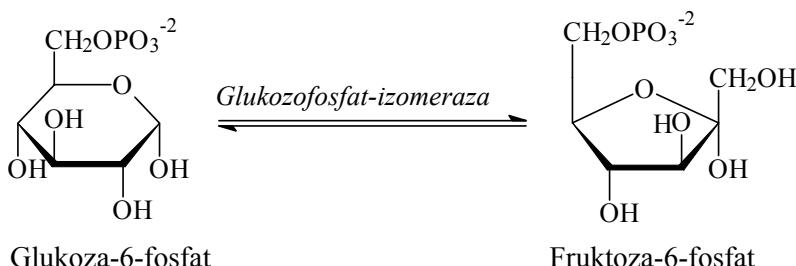
(faza glikolize u kojoj se produžava razgradnja glukoze od gliceraldehid-3-fosfata do piruvata).

**Faza A- fosforilacijom** glukoze (*reakcija 1*) uz katalizu odgovarajuće heksokinaze nastaje glukoza-6-fosfat. Donor fosfata je ATP. Inače enzim *glukokinaza* (EC 2.7.1.2) je specifična za glukozu, dok heksokinaze efikasno fosforiluju i druge heksoze (fruktozu, galaktozu itd.).

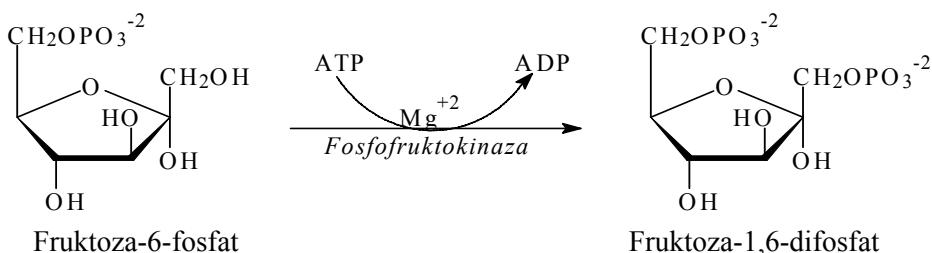


U prethodnoj reakciji nastala glukoza-6-fosfat **izomerizacijom** (*reakcija 2*) prelazi u furanozno ciklizovanu fruktozu-6-fosfat, a reakciju

katalizuje prisutna *glukozofosfat-izomeraza* (EC 5.3.1.9)..



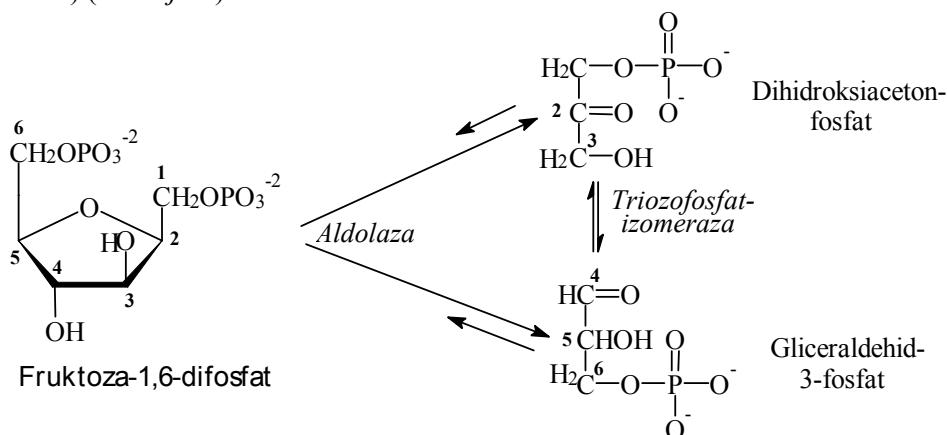
Dalnjom **fosforilacijom** (*reakcija 3*) fruktoza-6-fosfat uz katalitičko delovanje *fosfofruktokinaze* (EC 2.7.1.11) prelazi u fruktozu-1,6-difosfat.



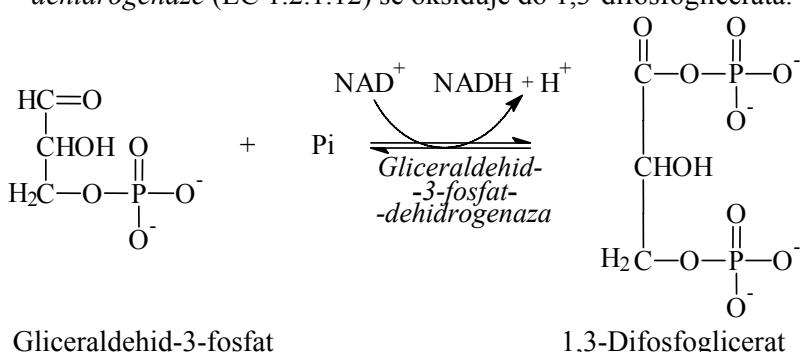
Katalitičko delovanje fosfofruktokinaze dobrim delom se reguliše prisutnim sistemom ATP/ADP. Ukoliko je ATP prisutan u većim koncentracijama on deluje

kao alosterični inhibitor enzima dok ADP i AMP imaju ulogu alosteričnih aktivatora. Na ovaj način potreba ćelije za ATP se veoma efikasno reguliše. Tako na primer ako se pojavi višak ATP u ćeliji u aerobnim uslovima, tada taj višak delujući inhibitorno koči razgradnju glukoze. Prelaskom na anaeroban proces, pri čemu se javlja potreba za većom energijom, troši se prisutni ATP i nastaje ADP, uz istovremenu aktivaciju fosfofruktokinaze i povećanu brzinu glikolize.

Tok glikolize od nastale fruktoza-1,6-difosfata (*reakcija 4*) ide ka stvaranju dva proizvoda - dihidroksiaceton-fosfata i gliceraldehid-3-fosfata koji imaju po 3 C atoma. Reakciju katalizuje prisutna *aldolaza* (EC 4.1.2.13), a transformaciju dihidroksiaceton-fosfata u gliceraldehid-3-fosfat enzim *triozofosfat-izomeraza* (EC 5.3.1.1) (*reakcija 5*).



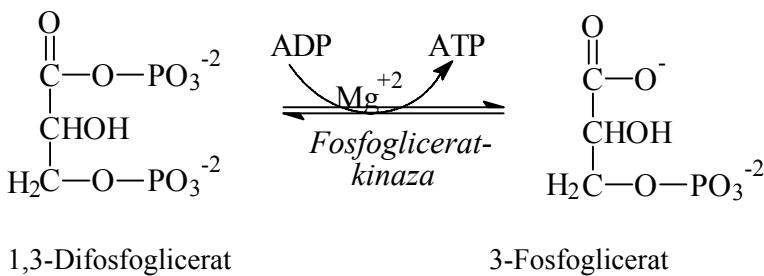
**Faza B** - glikolize u kojoj se produžava razgradnja glukoze od gliceraldehid-3-fosfata do piruvata. Gliceraldehid-3-fosfat (*reakcija 6*) uz prisutne  $\text{NAD}^+$  i Pi i katalitičko delovanje NADH-zavisne *gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze* (EC 1.2.1.12) se oksiduje do 1,3-difosfoglicerata.



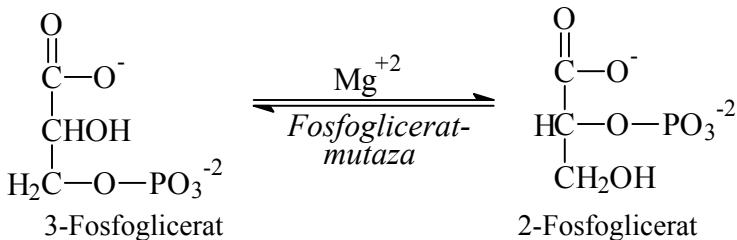
Reakcioni put stvaranja 1,3-difosfoglicerata, kao energetski najvažnija reakcija anaerobne glikolize i aktivno katalitičko učešće gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze uz prisutni  $\text{NAD}^+$  i neorganski fosfat (Pi) odvija se postepeno. Kao

prvo dolazi do stvaranja C-S veze izmedju enzima i aldehidne grupe gliceraldehid-3-fosfata, a potom **transfer hidrid jona** ( $H^-$ ) na  $NAD^+$  pri čemu nastaje  $NADH + H^+$  i tioestar, i na kraju dolazi do napada fosfatnog jona na C atom tioestarskog derivata.

Prenosom fosfatne grupe (*reakcija 7*) sa 1,3-difosfoglicerata na ADP uz *fosfoglycerat-kinazu* (EC 2.7.2.3) nastaje ATP i 3-fosfoglicerat.

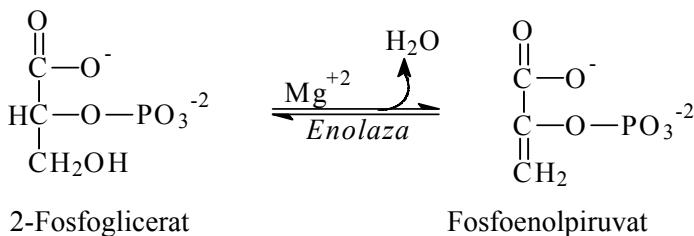


Sledećom reakcijom **izomerizacije** (*reakcija 8*) dolazi do premeštanja fosfatne grupe iz položaja C-3 u položaj C-2 pri čemu iz 3-fosfoglicerata nastaje 2-fosfoglicerat. Ovu reakciju katalizuje *fosfoglycerat-mutaza* (EC 5.4.2.1).



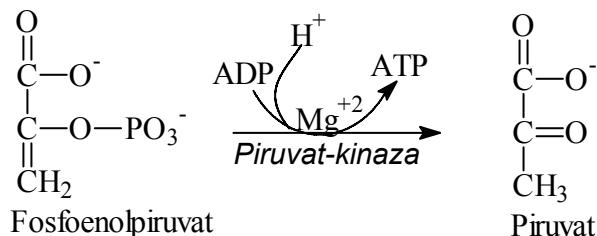
Nastali 2-fosfoglicerat **dehidratacijom** (*reakcija 9*) uz katalitičko delovanje prisutne *enolaze* (EC 4.2.1.11) i jona  $Mg^{2+}$  kao aktivatora enzima prelazi u energetski važan proizvod glikolize - fosfoenolpiruvat.

Fosfoenolpiruvat predstavlja energijom bogato jedinjenje, jer u svom sastavu ima lako prenosivu i energetski bogatu fosfatnu grupu.

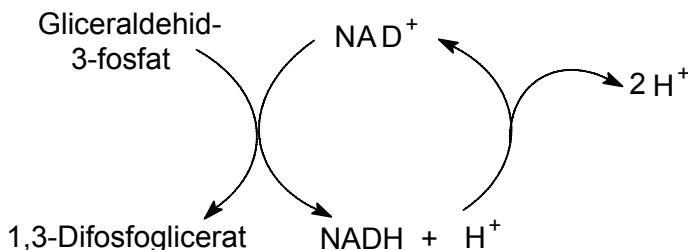


Prenosom fosfatne grupe sa fosfoenolpiruvata na ADP (pri čemu nastaje ATP) uz katalitičko delovanje enzima *piruvat-kinaze* (EC 2.7.1.40) nastaje piruvat

(reakcija 10). Piruvat predstavlja najvažniji metabolit u metabolizmu ugljenih hidrata.



U toku odvijanja ciklusa glikolizne razgradnje glukoze do piruvata u jednoj reakciji učestvuje NADH-zavisni enzim. U prvoj reakciji pri pretvaranju gliceraldehid-3-fosfata u 1,3-difosfoglicerat učestvuje gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza. U citosolu ćelije, gde se odvija anaerobni proces glikolize, oksidoreduktionska uloga NAD<sup>+</sup>/NADH u pomenutoj reakciji može se predstaviti u cikličnom toku na sledeći način:



Daljnjom analizom celog ciklusa glikolizne razgradnje glukoze, takođe se uočavaju dve reakcije u toku kojih dolazi do oslobođanja energije prevedene u fosfoestarske veze ATP, a to su: reakcija dobijanja 3-fosfoglicerata i reakcija nastajanja piruvata.

Nagradjeni piruvat kao krajnji proizvod glikolize se dalje razgradjuje u mitohondrijama u ciklus trikarbonskih kiselina (CTK) do redukujućih ekvivalenta (3NADH i FADH<sub>2</sub>) i CO<sub>2</sub>, a u respiratorni lanac do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O.

## Energetski bilans glikolize

U toku razgradnje glukoze do piruvata dolazi do utroška molekula ATP i to u reakciji nastajanja glukoza-6-fosfata jedan molekul ATP i pri stvaranju fruktoza-1,6-difosfata takođe jedan molekul ATP. Prevodenje oslobođene energije u ciklusu razgradnje glukoze u fosfoestarske energijom bogate veze ATP, odvija se u reakcijama nastajanja 3-fosfoglicerata (2 molekula ATP) i piruvata (2 molekula ATP). Prema tome u reakcijama razgradnje glukoze do C<sub>3</sub>-jedinjenja (piruvat) imamo sledeći utrošak i biosintezu ATP (tabela 11-5).

Tabela 11-5. Energetski bilans razgradnje glukoze u glikoliznom putu.

Reakcije	$\Delta G^0 \text{ mol}^{-1}$	
	kJ	kcal
Glukoza + <b>ATP</b> → glukoza-6-fosfat + ADP	- 16.7	- 4.0
Glukoza-6-fosfat → fruktoza-6-fosfat	+ 1.7	+ 0.4
Fruktoza-6-fosfat + <b>ATP</b> → fruktoza-1,6-difosfat + ADP	- 13.8	- 3.3
Fruktoza-1,6-difosfat → dihidroksiaceton-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat	+ 23.8	+ 5.7
Dihidroksiaceton-fosfat → gliceraldehid-3-fosfat	+ 7.5	+ 1.8
2(Gliceraldehid-3-fosfat) + 2NAD <sup>+</sup> + 2Pi → 2(1,3-difosfoglicerat) + 2NADH + 2H <sup>+</sup>	+ 12.4	+ 3.0
2(1,3-difosfoglicerat) + 2 ADP → 2(3-fosfoglicerat) + <b>2ATP</b>	- 37.6	- 9.0
2(3-Fosfoglicerat) → 2 fosfoglicerat	+ 8.8	+ 2.1
2(2-Fosfoglicerat) → 2 fosfoenolpiruvat + 2H <sub>2</sub> O	+ 3.4	+ 0.8
2Fosfoenolpiruvat + 2ADP → 2 piruvat + <b>2ATP</b>	- 62.8	- 15.0
<b>Glukoza + 2 ADP + 2 Pi → 2 piruvat + 2 ATP</b>	<b>- 73.3</b>	<b>- 17.5</b>

U ukupnom bilansu razgradnje 1 molekula glukoze do piruvata nastaju 4 molekula ATP pri čemu se utroše 2 molekula, u reakcijama nastajanja glukoza-6-fosfata i fruktoza-1,6-difosfata katalizovanim supstrat specifičnim kinazama, tako da je ostatak 2 molekula ATP po svakom razgradjenom molekulu glukoze.

### 11.5.2. Ciklus trikarbonskih kiselina (CTK)

Faza aerobnog metabolizma usmerena je na potpunu oksidaciju piruvata do krajnjih razgradnih jedinica ugljjenioksida i vode uz oslobođanje odgovarajuće količine energije. Ciklus razgradnje piruvata u aerobnim uslovima detaljno je objasnio biohemičar Hans Krebs<sup>1</sup> po kome je ovaj ciklus dobio naziv *Krebsov ciklus*. Ovaj

ciklus naziva se i *ciklus trikarbonskih kiselina*, jer u toku njegovog odvijanja stvaraju se molekuli kiselina sa tri karboksilne grupe, kao i *ciklus limunske kiseline* (citratni ciklus) zbog veoma bitne uloge koju ima citrat u njemu.

Mesta odvijanja glikolize i reakcija ciklusa trikarbonskih kiselina u ćeliji su različita. Dok se glikoliza (kod prokariotskih i eukariotskih ćelija) odvija u citosolu, dotle se ciklus trikarbonskih kiselina odvija u plazmi ćelijske membrane (kod prokariota), odnosno u mitohondrijama (kod eukariota), pa time i biljaka. Većina enzimskih sistema koji učestvuju u ciklusu trikarbonskih kiselina sadržani su u mitohondrijskom matriksu.

Sam ciklus trikarbonskih kiselina ima dvojaku ulogu (amfibolična uloga), jer se u njemu susreću reakcije razgradnje (*katabolizam*) i reakcije biosinteze (*anabolizam*). Aerobna oksidativna razgradnja predstavlja kataboličku fazu, dok se uključenje nekih nastalih organskih metabolita javlja kao anabolička faza.

Oksidativnom dekarboksilacijom piruvata uz učešće multienzimskog kompleksa sastavljenog od tri enzima i prisutnog CoA-SH nastaje acetil-S-CoA. Nastali kompleks acetil-S-CoA posle izdvajanja CO<sub>2</sub> predstavlja “aktivirani acetat”, koji se uključivanjem u ciklus trikarbonskih kiselina (ciklus limunske kiseline ili citratni ciklus) razgraduje do krajnjih proizvoda CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. Ciklus trikarbonskih kiselina praktično predstavlja stecište krajnjeg metabolizma i drugih organskih jedinjenja, a to su pre svih, pored ugljenih hidrata, aminokiseline i masne kiselina kod uljarica pre svega.

U ciklusu trikarbonskih kiselina na svaki uključeni molekul acetil-S-CoA nastaju 2 molekula CO<sub>2</sub> uz oslobadanje elektrona. Intermedijni akceptor elektrona u toku skoro svih reakcionih faza je NAD<sup>+</sup>, koji prelazi u NADH. U jednoj reakciji fazi pri prelasku sukcinata u fumarat intermedijni akceptor elektrona je FAD, koji primanjem vodonika prelazi u redukovani oblik FADH<sub>2</sub>. Nastali redukovani oblici NADH i FADH<sub>2</sub> se reoksiduju pomoću kiseonika koji postaje krajnji akceptor elektrona u elektron-transportnom lancu.

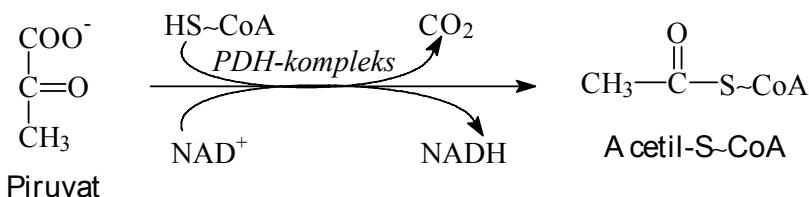
Tokom svakog ciklusa trikarbonskih kiselina nastaju 2 molekula GTP, 6 molekula NADH i 2 molekula FADH<sub>2</sub> sa uključenjem 2 molekula acetil-S-CoA (jedan molekul glukoze daje 2 molekula acetil-S-CoA). Oksidacijom svakog molekula NADH nastaju 3 molekula energijom bogatog ATP, i još dva molekula ATP pri formiranju svakog FADH<sub>2</sub>. Na ovaj način svaki razgradjeni molekul glukoze daje ukupno 36 molekula ATP. (GTP je ekvivalentan ATP).

---

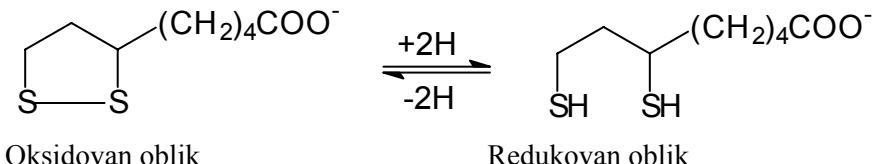
<sup>1</sup>Hans Krebs, rođeni Nemac (1900-1981), 1933. godine emigrirao je u Englesku (Kembrijsku zemlju, Oksford) gde je veoma aktivno radio na rešavanju mnogih problema iz oblasti biohemije i biologije. Hans Krebs, rođeni Nemac (1900-1981), 1933. godine emigrirao je u Englesku (Kembrijsku zemlju, Oksford) gde je veoma aktivno radio na rešavanju mnogih problema iz oblasti dinamike i regulacije metabolizma, 1937. godine definisao je Krebov ciklus, a 1953. godine dobio je Nobelovu nagradu.

### 11.5.2.1. Reakcije u CTK

Pirogrođjana kiselina (odn. piruvat) dobivena glikolizom u citosolu transportuje se u mitohondrije gde se razlaže do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  u ciklusu trikarbonskih kiselina. Piruvat ne ulazi direktno u ciklus već se pre oksidativno-dekarboksiluje uz učešće enzimskog kompleksa *piruvat-dehidrogenaze* (PDH-kompleks) do stvaranja energijom bogatog tioestarskog jedinjenja acetil-S-CoA uz oslobadjanje  $\text{CO}_2$  i redukovanih NADH.



Piruvat-dehidrogenaza kompleks sadrži tri enzima: *piruvat-dehidrogenazu* /E<sub>PDH</sub>/ (EC 1.2.4.1), *dihidrolipoil-transacetilazu* /E<sub>TA</sub>/ (EC 2.3.1.12) i *dihidrolipoil-dehidrogenazu* /E<sub>LDH</sub>/ (EC 1.6.4.3). Važan kofaktor pri katalitičkoj aktivnosti poslednja dva enzima je liponska kiselina, koja sadrži disulfidnu grupu (oksidovani oblik) ili dve sulfhidrilne grupe (redukovani oblik).

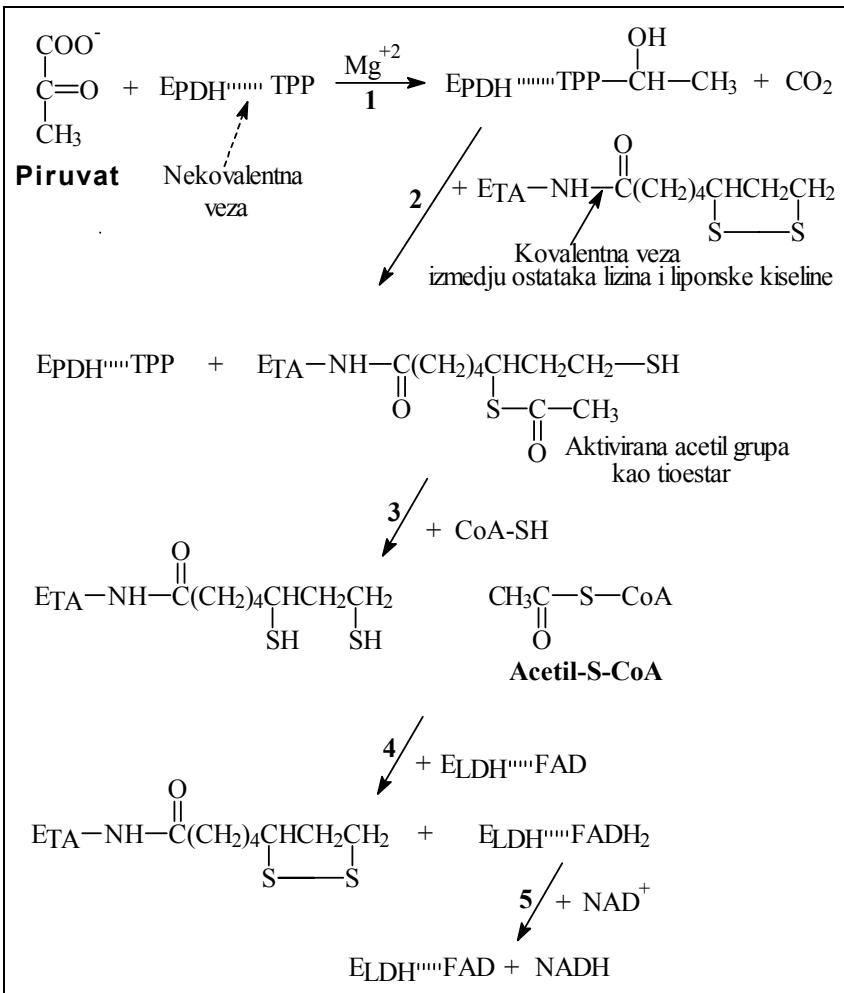


Oksidovani oblik liponske kiseline je akceptor vodonika, a redukovani oblik je donor vodonika.

Oksidativna dekarboksilacija piruvata odvija se kroz nekoliko faznih reakcija uz katalitičko učešće pomenutog enzimskog kompleksa. (slika 11-26).

Iz faznih reakcija prikazanih na slici uočava se da je uloga liponske kiseline, koja sa lizinom enzimskog ostatka dihidrolipoil-transacetilaze /E<sub>TA</sub>-NH-/ stvara kovalentnu vezu, ostvarivanje tioestarske veze preko sulfhidrilne grupe sa acetilnim ostatkom, što praktično predstavlja aktiviranje acil-grupe kao tioestra. U sledećoj reakciji uz prisutni CoA-SH dolazi do odvajanja acetil-S-CoA i dihidrolipoil-transacetilaze.

Dalnjom reakcijom E<sub>LDH</sub>-FAD reoksiduje redukovani liponsku kiselinu (prevodeći pritom sulfhidrilni u disulfidni oblik), koja je u obliku E<sub>TA</sub>-NH-liponska kiselina, a FAD se redukuje do FADH<sub>2</sub> (nastaje E<sub>LDH</sub>-FADH<sub>2</sub>). Na kraju E<sub>LDH</sub>-FADH<sub>2</sub> se reoksiduje do E<sub>LDH</sub>-FAD, a NAD<sup>+</sup> se redukuje do NADH.

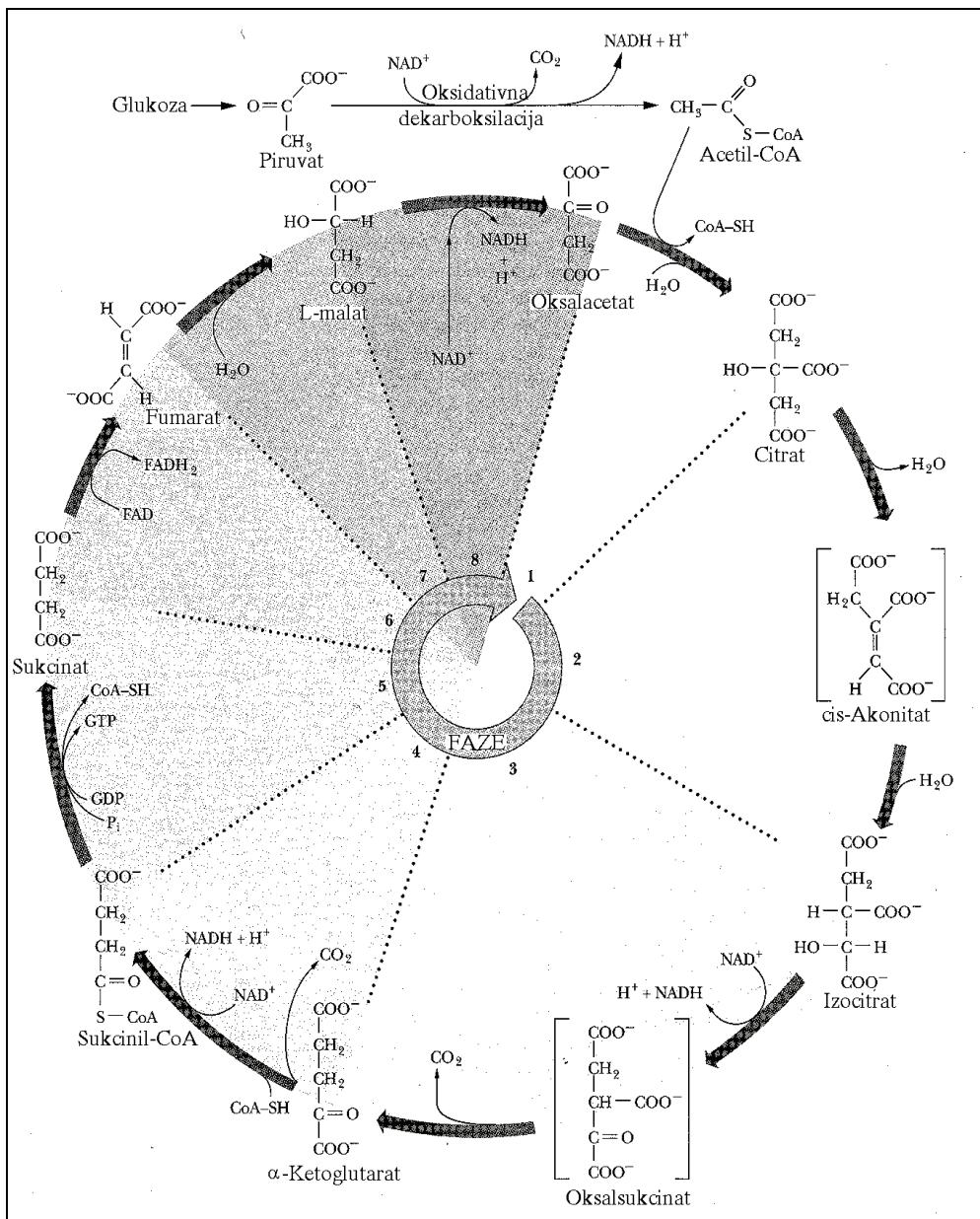


Slika 11-26. Faze oksidativne dekarboksilacije piruvata.

Kondenzacijom acetil-SCoA s jedinicom C<sub>4</sub> nastaje C<sub>6</sub>, citrat, po kome je ciklus i dobio ime, a preko niza intermedijera regeneriše se C<sub>4</sub>. Time se zatvara krug. Tok reakcija ciklusa prikazan je na slici 11-27.

Ciklus trikarbonskih kiselina obuhvata 8 biohemijskih reakcija koje se mogu podeliti u 3 faze i to:

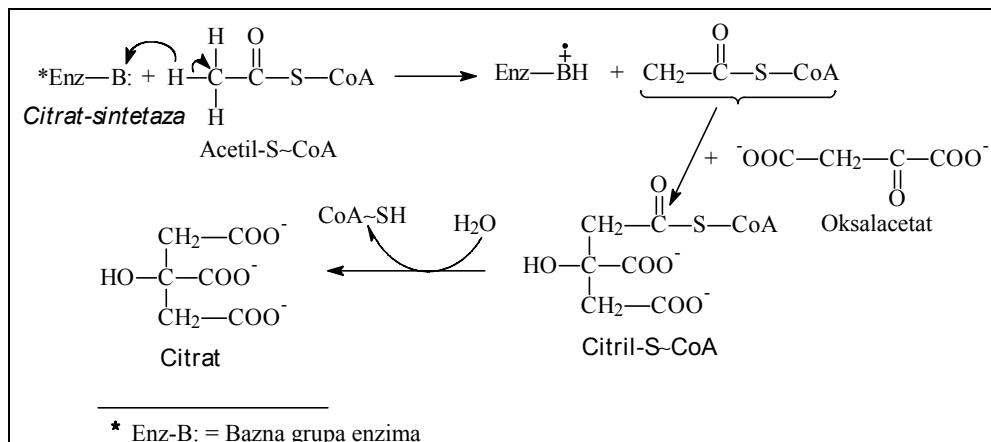
- ◆ I faza (reakcija 1),
- ◆ II faza (reakcije 2-5) i
- ◆ III faza (reakcije 6-8).



Slika 11-27. Tok reakcija u ciklusu trikarbonskih kiselina (CTK).

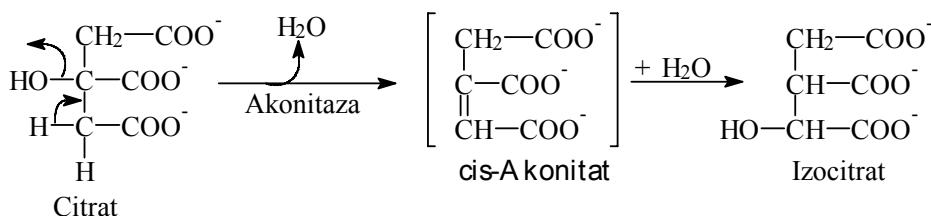
**U 1 fazi (reakcija 1)** - acetil-S~CoA (2 C atoma) ulazi u ciklus i reaguje sa oksalacetatom (4 C atoma) pri čemu nastaje citrat (6 C atoma) i HS~CoA. Ova faza predstavlja kondenzaciju jer dolazi do stvaranja nove C-C veze. Reakcija

kondenzacije ide postepeno uz katalitičko učešće enzima *citrat-sintetaze* (EC 4.3.1.7). Na slici 11-28. prikazana je pomenuta reakcija kondenzacije.



Slika 11.28. Kondenzacija acetil-S-CoA i oksalacetata do citrata.

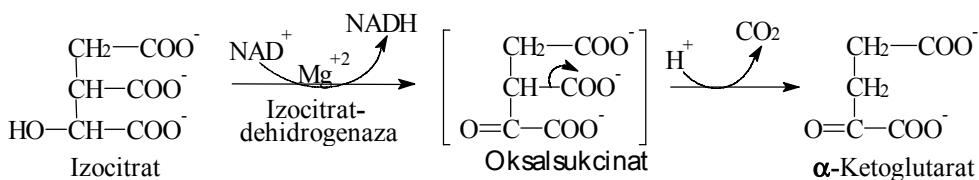
*U drugoj fazi (reakcija 2)* - citrat nastao kondenzacijom acetil-S-CoA i oksalacetata se izomerizuje uz katalitičko delovanje *akonitat-hidrataze* (akonitata) (EC 4.2.1.3) i prelazi, preko nestabilnog intermedijernog cis-akonitata, koji je vezan za enzim akonitazu, u izocitrat. Citrat se ne može oksidovati do ketokiseline jer je OH grupa vezana za tercijarni C atom (slika 11-29).



Slika 11-29. Reakcije nastajanja izocitrata.

Pri procesu izomerizacije OH grupa izocitrata prelazi na sekundarni C atom, te ju je moguće oksidovati do karbonilne grupe u tom položaju.

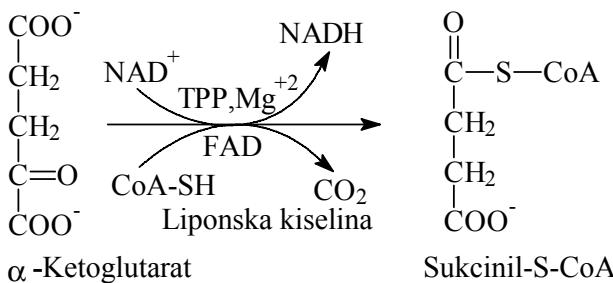
*U reakciji 3* - izomerizacijom nastali izocitrat uz katalitičko delovanje *izocitrat-dehidrogenaze* (EC 1.1.1.42) prelazi u  $\alpha$ -keto-glutarat. Ova faza predstavlja prvu reakciju od dve reakcije oksidativne dekarboksilacije u ciklusu trikarbonskih kiselina. Kao intermedijerni oblik u ovoj reakciji nastaje oksalsukcinat, koji je vezan za enzim izocitrat-dehidrogenazu, a nakon dekarboksilacije daje  $\alpha$ -ketoglutarat. Ceo tok reakcija odvija se uz učešće  $\text{NAD}^+$  koji se redukuje do  $\text{NADH}$  (slika 11-30.).



Slika 11-30. Reakcija oksidativne dekarboksilacije izocitrata.

Enzim izocitrat-dehidrogenazu, koji učestvuje u ovoj, često nazivanoj kontrolnoj reakciji ciklusa trikarbonskih kiselina, inhibiraju ATP i NADH, a aktiviraju ADP i NAD<sup>+</sup> što predstavlja relativno čest slučaj u kataboličkim reakcijama.

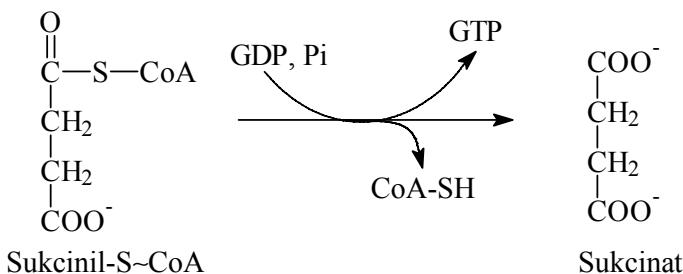
I u sledećoj reakciji ciklusa trikarbonskih kiselina (*reakcija 4*) odvija se oksidativna dekarboksilacija, pri čemu dolazi do izdvajanja CO<sub>2</sub> i kondenzacijom sa prisutnim CoA-SH do nastajanja energijom bogatog jedinjenja sukcinil-S-CoA. Istovremeno dolazi i do redukcije NAD<sup>+</sup> do NADH (slika 11-31.)



Slika 11-31. Reakcija nastajanja sukcinil-S-CoA.

Ovu reakciju katalizuje *α-ketoglutarat-dehidrogenaza* (EC 1.2.4.2) enzimski kompleks, sastavljen od tri enzima po čemu je veoma sličan enzimskom kompleksu koji je učestvovao u dekarboksilaciji piruvata.

*U reakciji 5* - sukcinil-S-CoA kao tioestar se uz katalizu enzimom *sukcinat-tiokinazom* (EC 6.2.1.4) hidrolizuje pri čemu nastaju sukcinat i CoA-SH (slika 11-32).



Slika 11-32. Reakcija nastajanja sukcinata iz sukcinil-S-CoA.

Ova reakcija ne predstavlja jednostavnu hidrolizu upravo zbog toga što istovremeno dolazi do prenosa energije tioestarske veze na GDP, koji sadrži fosfoestarsku vezu veoma bogatu energijom. Suksinati su u ciklusu trikarbonskih kiselina podvrgnuti daljnjoj oksidaciji. Energiju koju sadrži nastali GTP predaje ADP pri čemu se stvara visoko energetsko jedinjenje ATP (reakcija 11-44).



Ovaj prenos fosfatne grupe sa GTP na ATP katalizuje *nukleozid-difosfokinaza* (EC 2.7.4.6), a sama reakcija prenosa fosfatne grupe i energije je jedina u celom ciklusu trikarbonskih kiselina. Ova reakcija je reversna i moguće je uz utrošak energije ATP ili GTP izvršiti prevodjenje sukcinata u odgovarajući tioestar sukcinil-S-CoA.

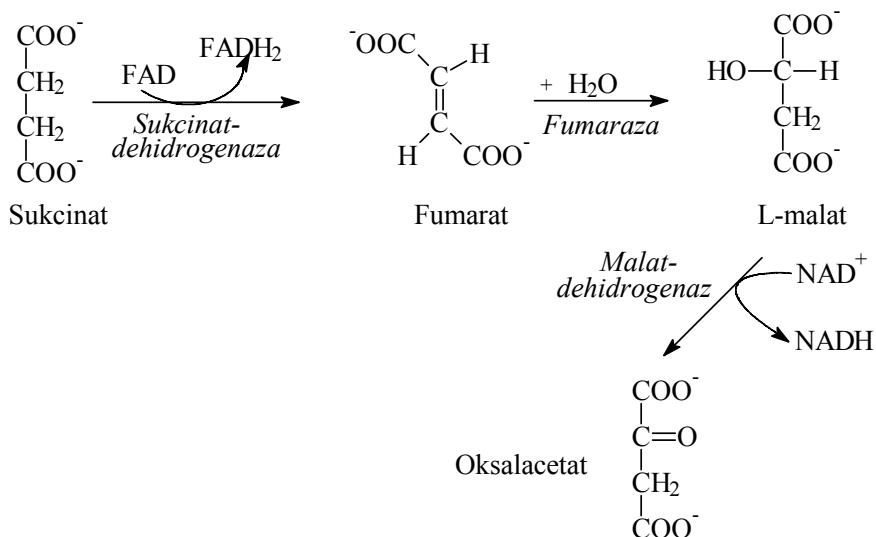
*Smisao II faze CTK* - je oslobođanje  $CO_2$  iz C atoma uvedenih u ciklus u obliku  $Ac-S-CoA$ .

*U reakciji 6* - se oksiduje cílibarna kiselina (suksinat) u fumarnu kiselinsku uz enzimsko delovanje *suksinat-dehidrogenaze* (EC 1.3.99), čiji koenzim FAD se redukuje do  $FADH_2$ .

*U reakciji 7* - nastali fumarat uz katalizu *fumarazom* (EC 4.2.1.2) hidratizuje do malata.

U poslednjoj reakciji (*reakcija 8*) - malat, koji sadrži alkoholnu grupu na sekundarnom C atomu, se oksiduje do oksalacetata. Oksalacetat predstavlja keto-derivat. U ovoj reakciji koja je katalizovana *malat-dehidrogenazom* (EC 1.1.1.37) koenzim  $NAD^+$  se redukuje do  $NADH$  (slika 11-33.).

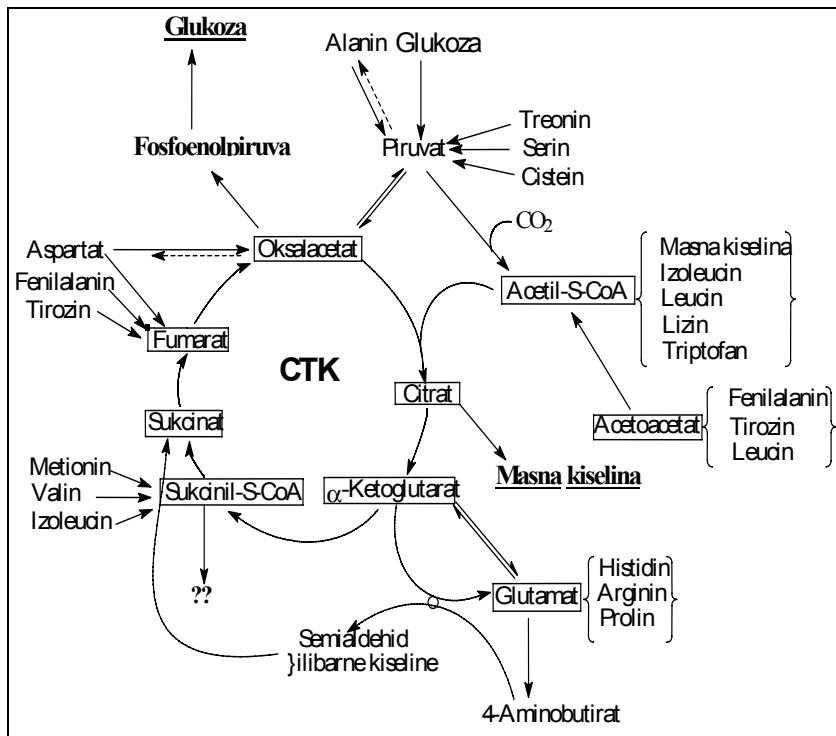
*Smisao III faze CTK* - je regeneracija oksalsirćetne kiseline koja se realizuje u reakcijama 6-8.



Slika 11-33. Reakcije nastajanja oksalacetata iz sukcinata.

U toku odvijanja celog ciklusa trikarbonskih kiselina utrošena su dva molekula vode i to jedan u reakciji pri nastajanju citrata, a drugi u reakciji hidratacije fumarata uz istovremeno stvaranje 5 molekula vode (na bazi izdvojenih H atoma u oksidacionim fazama), što u ukupnom bilansu predstavlja 3 molekula vode. Oksalacetat koji nastaje u poslednjoj reakciji ciklusa, iako ne i sa istim C atomima sa kojima je ušao u ciklus trikarbonskih kiselina, ponovo se uključuje kao reaktant sa novim molekulom acetil-S-CoA, koji može da potiče iz ugljenih hidrata ili iz aminokiselina i masti, startujući na taj način novi ciklus. Ovo je veoma bitan korak u nastavljanju reakcija aerobne razgradnje u *Krebsovom* ciklusu, odnosno ciklusu trikarbonskih kiselina. Vodonikovi atomi izdvojeni u više faznih reakcija ciklusa trikarbonskih kiselina uključuju se u respiratori lanac gde sa kiseonikom daju vodu. Energija koja se dobija u reakcijama ciklusa prevodi se u energijom bogate veze ATP. Ciklus trikarbonskih kiselina ima, osim uloge aerobne razgradnje acetil-S-CoA do konačnih  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  i važnu ulogu u biosintezi i drugih jedinjenja. Tu učestvuju, pre svih, intermedijeri oksalacetat,  $\alpha$ -ketoglutarat, acetat, odnosno acetil-S-CoA, sukcinil-S-CoA, fumarat, malat i drugi koji imaju važnu ulogu u biosintezi važnih organskih molekula. Tako na primer jedan broj aminokiselina nastaje iz ovih medjuproizvoda: transaminacijom iz  $\alpha$ -ketoglutarata nastaje glutaminska kiselina iz koje vodi put do aminobuterne kiseline, iz oksalacetata nastaje asparaginska kiselina, dekarboksilacijom oksalacetata nastaje piruvat, koji transaminacijom prelazi u alanin.

Uloga Krebsovog ciklusa kao centralnog mesta u metabolizmu i njegova povezanost sa drugim reakcijama i metaboličkim putevima prikazana je na slici 11-34.



Slika 11-34. Centralna uloga Krebsovog ciklusa (CTK) u metabolizmu.

*Masne kiseline* se takođe mogu biosintetizovati iz acetil-S~CoA, koji nastaje dekarboksilacijom piruvata.

### 11.5.2.2. Energetski bilans CTK

Pri razgradnji jednog molekula glukoze (šest C atoma) u glikoliznom putu nastaju dva molekula piruvata (sa po tri C atoma) uz oslobadjanje hemijske energije (dva molekula ATP) i NADH. Imajući u vidu sve reakcije koje se odvijaju u ciklusu trikarbonskih kiselina, a koje se praktično svode na konverziju piruvata, odnosno acetil-S~CoA u CO<sub>2</sub>, pri čemu svaki molekul acetil-S~CoA daje dva molekula CO<sub>2</sub>, dobija se sledeći reakcioni put ciklusa sa standardnom slobodnom energijom izmena za pojedinačne reakcije (tabela 11-6).

Tabela 11-6. Slobodna energija reakcija pri konverziji piruvata do CO<sub>2</sub> u ciklusu trikarbonskih kiselina.

Reakcije	$\Delta G^0$	
	kJ	mol <sup>-1</sup> kcal
Piruvat + CoA-SH + NAD <sup>+</sup> → acetil-S-CoA + <b>NADH</b> + H <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub>	-33.4	-8.0
Acetil-S-CoA + oksalacetat + H <sub>2</sub> O → citrat + CoA-SH + H <sup>+</sup>	-32.2 +6.3	-7.7 +1.5
Citrat → izocitrat	-7.1	-1.7
Izocitrat + NAD <sup>+</sup> → $\alpha$ -ketoglutarat + <b>NADH</b> + CO <sub>2</sub>	-33.4	-8.0
$\alpha$ -Ketoglutarat + NAD <sup>+</sup> + CoA-SH → sukcinil-S-CoA + <b>NADH</b> + H <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub>	-3.3	-0.8
Sukcinil-S-CoA + GDP + P <sub>i</sub> → sukcinat + <b>GTP</b> + CoA-SH	$\cong 0$	$\cong 0$
Sukcinat + FAD → fumarat + <b>FADH<sub>2</sub></b>	-3.8	-0.9
Fumarat + H <sub>2</sub> O → L-malat		
L-malat + NAD <sup>+</sup> → oksalacetat + <b>NADH</b> + H <sup>+</sup>		
<b>Sumarna reakcija:</b>		
Piruvat + 4 NAD <sup>+</sup> + FAD + GDP + P <sub>i</sub> + H <sub>2</sub> O → 3 CO <sub>2</sub> + 4 <b>NADH</b> + <b>FADH<sub>2</sub></b> + GTP + 4 H <sup>+</sup>	-77.7	-18.6

Pošto je svaki NADH ekvivalentan 3 ATP, FAD je ekvivalent 2 ATP, a GTP je ekvivalent 1 ATP imamo sledeći ukupan energetski bilans po jednom molekulu glukoze (tabela 11-7):

Tabela 11-7. Oslobodjena energija po molekulu glukoze.

Reakcija	Ukupno ATP
glukoza → 2 piruvata	2 ATP
2 piruvata → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	30 ATP
2 NADH + H <sup>+</sup> → 2 NAD <sup>+</sup>	<u>4 ATP</u> <b>36 ATP</b>

U konačnom bilansu energetskog sadržaja NADH + H<sup>+</sup> daje 2 ATP (gde NADH nastaje u reakciji konverzije 3-fosfogli-ceraldehyda do 1,3-difosfoglicerata, koja se odvija u citosolu). Da bi došlo do reoksidacije

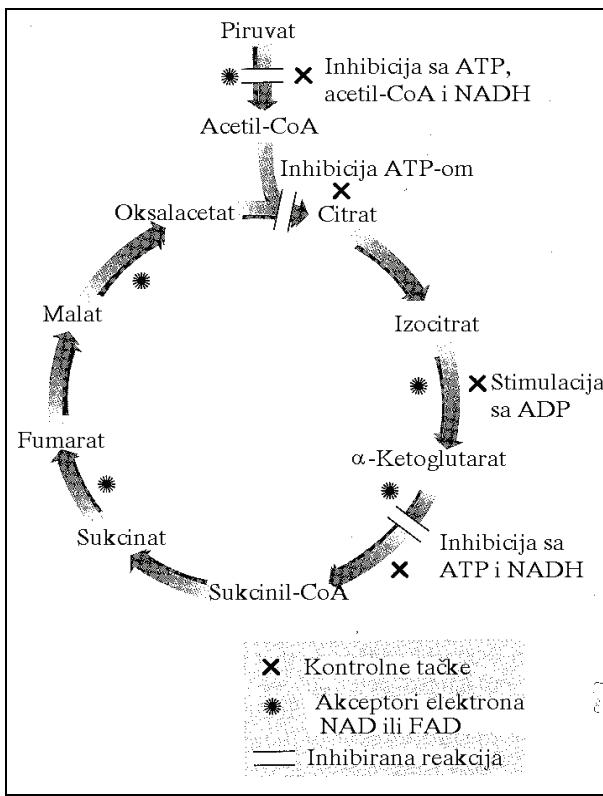
nastalog NADH on se prenosi do mitohondrija gde u sklopu raspiratornog lanca dolazi do redoks procesa u sistemu sa prisutnim FAD prema reakciji 11-45:



Pri odvijanju ovog procesa na račun oslobođjene energije stvaraju se 2 molekula ATP. Oksidovani oblik NAD<sup>+</sup> ponovo se vraća u citosol gde se praktično nastavlja njegova funkcija.

### 11.5.2.3. Kontrola pojedinih faza u CTK

Kontrola pojedinih reakcionalih faza u ciklusu trikarbonskih kiselina odvija se u jednoj tački izvan ciklusa i u tri ključne tačke u samom ciklusu, kao što je prikazana na slici 11-36.



Slika 11-36.  
Kontrolne tačke pri konverziji piruvata u Krebsovom ciklusu.

U ovim tačkama suštinski se utiče i na sam tok lančanih reakcija koje se odvijaju u ovom ciklusu, a time i na celovitost metaboličkih procesa u tipičnoj biljnoj ćeliji.

\* Prva kontrolna tačka nalazi se izvan ciklusa u reakcionaloj fazi oksidativne dekarboksilacije piruvata do acetil-CoA. Inhibicija reakcije vrši se povećanim prisustvom ATP i NADH.

\* U samom ciklusu postoje tri kontrolne tačke katalizovane različitim enzimskim kompleksima i to:

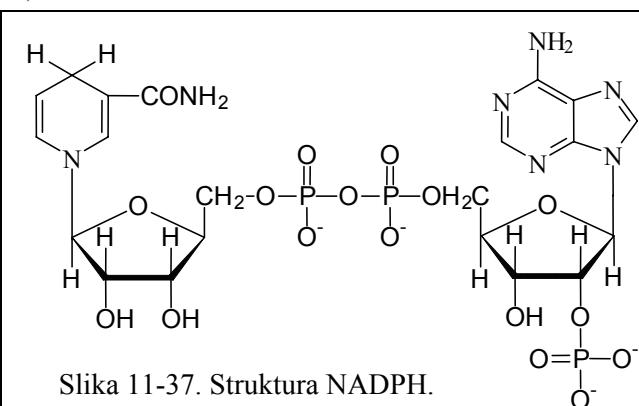
◆ - reakcija katalize citrat-sintetazom pri čemu iz oksalacetata i acetil-CoA nastaje citrat, a kao inhibitor alosteričnog enzima pojavljuju se ATP, NADH i sukcinil-CoA,

◆ - reakcija katalize izocitrat-dehidrogenazom kada nastaje  $\alpha$ -ketoglutarat iz izocitrata, a kao alosterični aktivatori pojavljuju se ADP i NAD<sup>+</sup>, dok inhibirajuće deluju ATP i NADH,

◆ - reakcija katalize kompleksom  $\alpha$ -ketoglutarat-dehidrogenaza pri čemu iz  $\alpha$ -ketoglutarata nastaje sukcinil-S-CoA, a pritom kao inhibitori se takođe pojavljuju ATP i NADH, dok su aktivatori reakcije ADP i NAD<sup>+</sup>.

### 11.5.3. Oksidativni pentozofosfatni put

Ciklus glikoliznih reakcija, koji je već opisan, predstavlja najvažniji anaerobni put razgradnje heksoza do piruvata. Međutim postoji i drugi alternativni put razgradnje glukoze do struktorno prostijih jedinica. Ovim procesom, koji se naziva pentozofosfatni put ili pentozofosfatni ciklus, iz glukoze, pre svega, nastaje 5-C ugljeni hidrat - riboza, koja igra veoma važnu ulogu u strukturi nukleinskih kiselina i nukleotid-koenzima, zatim ksiloza i ribuloza kao i veoma važan nikotinamidski koenzim NADPH, koji za razliku od NADH ima jednu više fosfatnu grupu esterifikovanu u položaju 2' riboze u adenin-nukleotidnom delu molekula (slika 11-37).



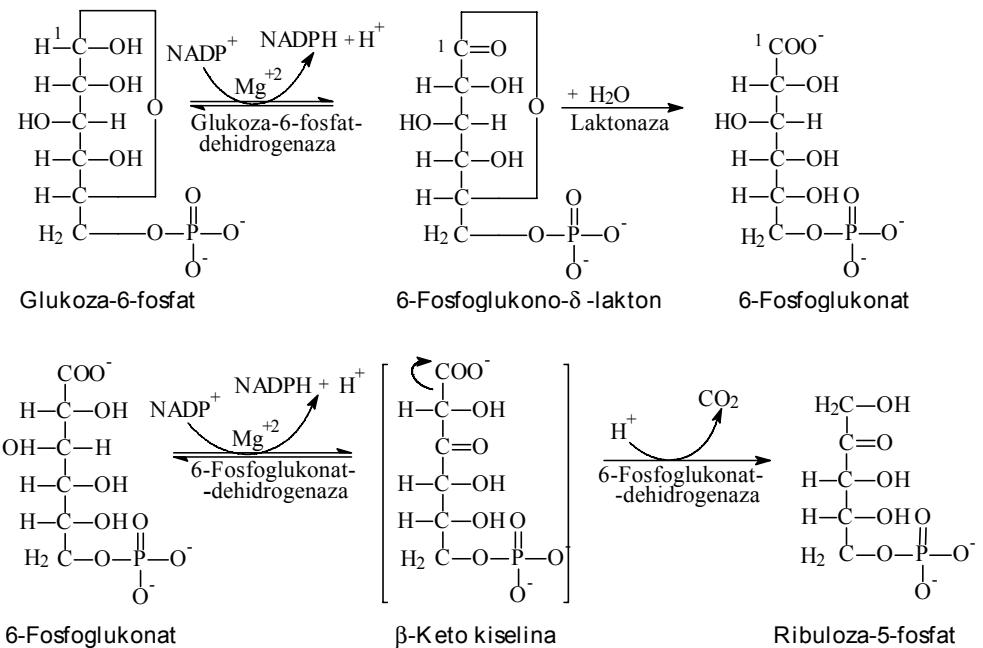
Slika 11-37. Struktura NADPH.

Pentozofosfatni ciklus započinje sa serijom oksidativnih reakcija u kojima se stvaraju pre svih 5-C ugljeni hidrati i NADPH, a završava se sa neoksidativnim reakcijama u kojima nastaju fruktoza-6-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat koji su značajni u glikolizi.

#### Oksidativne reakcije u pentozofosfatnom putu

Ciklus pentozo-fosfata počinje reakcijom u kojoj glukoza-6-fosfat se oksiduje i preko nestabilnog intermedijera 6-fosfoglukono-δ-laktona prelazi u 6-fosfoglukonat. Ovu reakciju katalizuje *glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza* (EC 1.1.1.49) uz prisutne  $Mg^{2+}$  i  $NADP^+$  pri čemu nastaje i redukovani oblik NADPH. Ciklična struktura 6-fosfoglukono-δ-laktona se hidrolizuje u prisustvu *laktonaze* (EC 3.1.1.25) otvaranjem prstena i stvaranjem 6-fosfoglukonata.

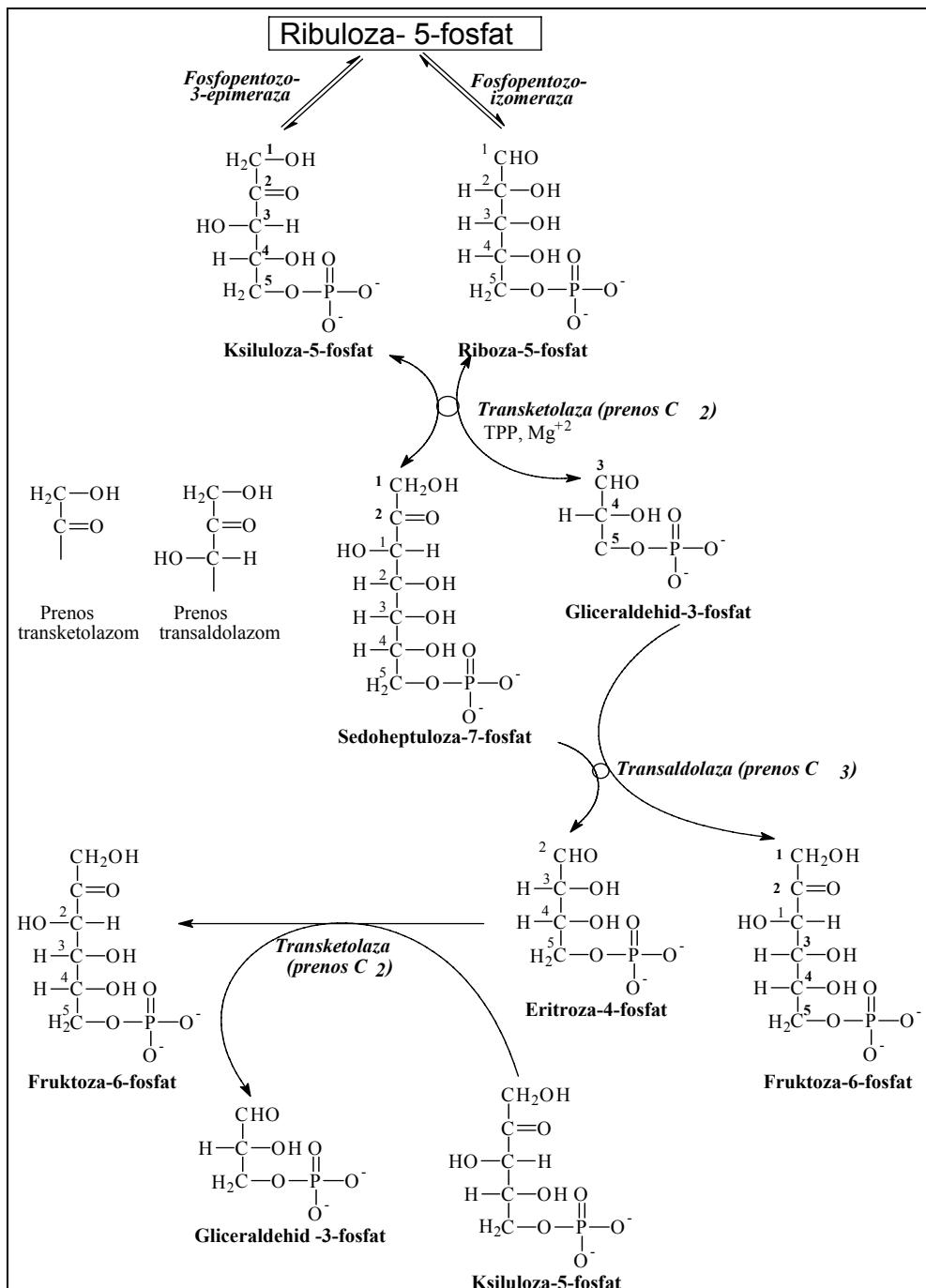
Nastali 6-fosfoglukonat se u narednoj reakciji oksidativno dekarboksiluje uz ponovno nastajanje NADPH. Prvi veoma nestabilni intermedijerni oblik nastaje oksidacijom hidroksilne grupe na C-3 atomu 6-fosfoglukonata pri čemu se, uz katalitičko delovanje *6-fosfoglukonat-dehidrogenaze* (EC 1.1.1.43) dobija u istom položaju keto-grupa. Koenzimska uloga  $NADP^+$  i metalnog jona  $Mg^{2+}$  je veoma bitna u ovoj reakciji. Daljnjom reakcijom, koju takođe katalizuje enzim 6-fosfoglukonat-dehidrogenaza dolazi do dekarboksilacije i nastanka ribuloza-5-fosfata, koji ima 5 C atoma. Na slici 11-38 prikazana je oksidativna faza pentozofosfatnog ciklusa.



Slika 11-38. Oksidativna faza pentozofosfatnog puta.

### Neoksidativne reakcije u pentozofosfatnom putu

Ribuloza-5-fosfat izomerizuje u dva pravca. U prisustvu *fosfopentoza-3-epimeraze* dolazi do inverzije OH grupe u C<sub>5</sub> položaju i nastaje ksiluloza-5-fosfat, dok pri katalitičkom delovanju *fosfopentozo-izomeraze* nastaje aldoza (riboza-5-fosfat). Pritom se stvara aldehidna grupa na C<sub>1</sub> uz istovremenu redukciju keto grupe u položaju C<sub>2</sub>. Upravo nastala riboza-5-fosfat neophodna je pri biosintezi nukleinskih kiselina i koenzimske strukture NADPH. Neoksidativna razgradnja ribulozo-5-fosfata prikazana je na slici 11-39.

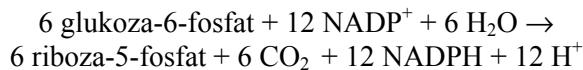


Slika 11-39. Neoksidativne reakcije u pentozofosfatnom ciklusu.

Ksiluloza-5-fosfat i riboza-5-fosfat uz katalitičko delovanje enzima *transketolaze* (EC 2.2.1.1) i koenzimsku ulogu TPP i metalnog jona  $Mg^{2+}$  daju uz prenos 2 C jedinice sa ksiluloza-5-fosfat na ribozu-5-fosfat molekul sedoheptuloza-7-fosfat (sa 7 C atoma) i gliceraldehid-3-fosfat (sa 3 C atoma). Daljnji tok reakcija teče uz prisutnu *transaldolazu* (EC 2.2.1.2), koja katalizuje prenos 3 C jedinica sa sedoheptuloze-7-fosfata na gliceraldehid-3-fosfat dajući dve ugljenohidratne jedinice i to: aldozu (eritroza 4-fosfat, sa 4 C atoma) i ketozu (fruktoza 6-fosfat, sa 6 C atoma).

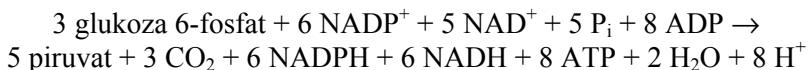
U poslednjoj reakciji ovog ciklusa učestvuju aldoza eritroza-4-fosfat i ketoza ksiluloza-5-fosfat pri čemu, uz katalitičko delovanje transketolaze dolazi do prenosa 2 C jedinice i nastaju fruktoza-6-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Iz navedenog se uočava da se reakcijama pentozo-fosfatnog ciklusa glukoza-6-fosfat prevodi u fruktoza-6-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat, pritom dajući veoma važna jedinjenja riboza-5-fosfat i NADPH.

Ako u ćelijama organizma postoji potreba za više NADPH u odnosu na pentoze, odvijaju se oksidativne reakcije pentozo-fosfatnog ciklusa, koje se mogu predstaviti bruto formulom na sledeći način:



Ukoliko je potrebno više pentoze od NADPH odvijaju se neoksidativne reakcije i iz riboza-5-fosfata nastaju gliceraldehid-3-fosfat i fruktoza-6-fosfat. Fruktoza-6-fosfat se izomerizuje u glukoza-6-fosfat i skupa sa gliceraldehid-3-fosfatom uključuje se u glikolizni ciklus.

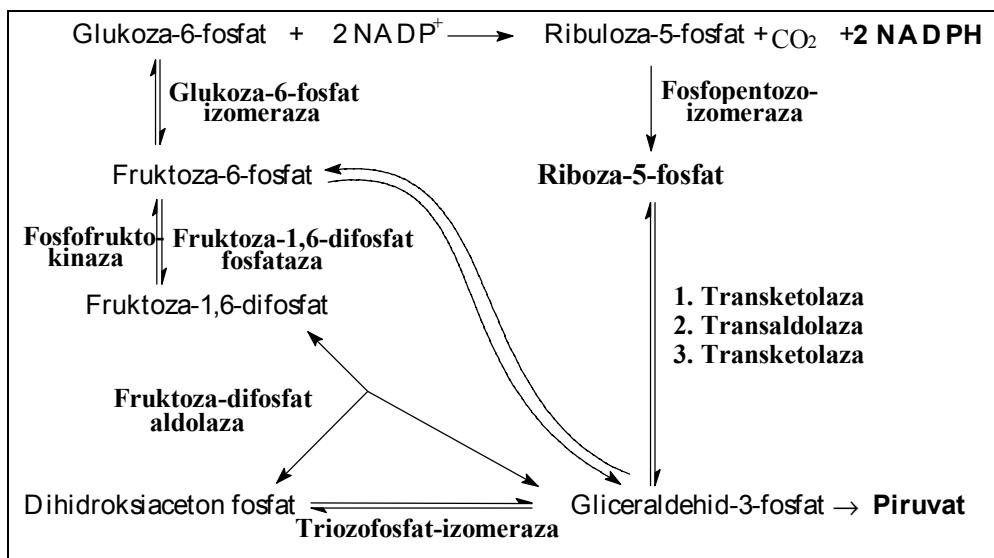
Razgradnju glukoza-6-fosfata do piruvata, uključujući bilanse glikoliznog i pentozo-fosfatnog ciklusa, koji su uporedo prikazani na slici 11-40, možemo zbirno predstaviti sledećom reakcijom u kojoj su naznačeni bilansi redukujućih ekvivalenata (NADPH i NADH) kao i količina energije (ATP):



Uloga pentozo-fosfatnog ciklusa u razgradnji glukozo-6-fosfata veoma je važna iz najmanje dva razloga:

- stvara redukovani oblik dehidrogenaze  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , koji učestvuje u mnogim bitnim procesima biosinteze kao što je biosinteza masnih kiselina dugog niza, redukcija dihidrofolne kiseline do tetrahidrofolne kiseline i piruvata do malata, zatim biosinteze tirozina iz fenilalanina itd. i
- stvara ribozu-5-fosfat koja učestvuje u izgradnji nukleinskih kiselina i nukleotida itd.

Povezanost glikolize i pentozofosfatnog puta moguće je prikazati na više načina, a jedan od njih sa brojnim intermedijerima ova dva puta prikazan je slikom 11-40.



Slika 11-40. Povezanost glikolize i pentozofosfatnog puta.

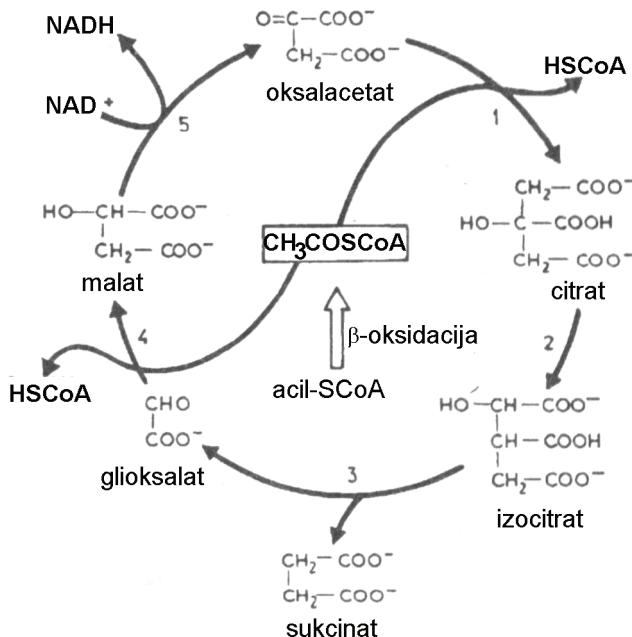
#### 11.5.4. Glioksalatni ciklus

Glioksalatni ciklus je modifikovan ciklus trikarbonskih kiselina. On se odvija u semenu uljarica u toku prvih 5 dana klijanja kada se razgradnjom ulja sintetizuje veća količina acetil-CoA. U subcelularnim strukturama-glioksizomima nastali acetil-CoA može reagovati sa glioksalnom kiselinom koja se gradi iz izolimunske kiseline, pa je i ciklus dobio naziv glioksalatni ciklus. U glioksizomima se nalaze svi potrebni enzimi za odvijanje glioksalatnog ciklusa. Enzimi glioksalnog ciklusa su aktivni u semenu koje klija. Najznačajniji enzimi u ovom ciklusu su *izocitrat-laza* (EC 4.1.3.1), koja katalizuje aldolno cepanje izocitrata u acetil-sukcinat (reakcija 3) i *malat-sintaza* (EC 4.1.3.2) koja katalizuje kondenzaciju CoA i glioksalata (reakcija 4) (slika 11-41).

Glioksalatni ciklus započinje istom reakcijom kao i ciklus trikarbonskih kiselina - kondenzacijom acetil-CoA i oksalosiréctne kiseline i odvija se zajedničkim reakcijama do gradjenja izolimunske kiseline. Izolimunska kiselina se razlaže u glioksalatnu i ćilibarnu kiselinu, a glioksalatna kiselina sa acetil-CoA (dobivenog razlaganjem ulja) daje jabučnu kiselinu (malat), koja se preko

oksalsirćetne kiseline uključuje ponovo u ciklus, ili dekarboksilacijom daje fosfoenolpirogroždjanu kiselinu.

Glioksalatni ciklus se odvija tesnom saradnjom izmedju glioksizoma i mitohondrija. Glioksizomi sadrže kompletan set enzima za  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina koji katalizuju razgradnju masnih kiselina iz rezervnih lipida do acetil-CoA. Glioksizomi nastaju u kotiledonima semena uljarica posle klijanja i kada se lipid koriste kao glavni izvor C (za sintezu ugljenih hidrata) i energije za klijanje semena. Kada klijanci postanu sposobni za fotosintezu, tj. kada C za sintezu organske materije koriste putem fiksacije  $\text{CO}_2$  iz atmosfere, i glioksizomi nestaju. Pošto životinje nemaju izocitrat-liazu i malat-sintazu to ne mogu pretvarati acetil-CoA i ne mogu sintetizovati glukozu iz masnih kiselina.



Slika 11-41. Glioksalatni ciklus.

Biohemski značaj glioksalatnog ciklusa se sastoji u tome što omogućava da se molekuli acetil-CoA nastali razgradnjom ulja u glioksizomima prevedu kroz hemizam ciklusa u organske kiseline (citrat, sukcinat, glioksalat, malat, oksalacetat i dr) iz kojih se mogu sintetizovati ugljeni hidrati.

## Izvod

♣ Fotosinteza je kompleksan biohemski proces pomoću kojeg se proizvodi organska materija u višim biljkama, plavozelenim algama i nekim bakterijama.

♣ Fotosinteza se odvija u hloroplastima uz učešće pigmenata hlorofila i karotenoida objedinjenih u dva fotosistema (fotosistem I i fotosistem II).

♣ Fotosistemi su izgradjeni iz antena (pigmenata koji absorbuju svetlost) i reaktivnog centra (koji pomoću dobivene energije predaju elektrone prenosiocima).

♣ Fotosistem I i II se aktiviraju sunčevom svetlošću i odgovorni su za odvajanje elektrona od vode i izdvajanje nascentnog  $O_2$ .

♣ Protok elektrona od fotosistema II do fotosistema I omogućava fotosintetičku fosforilaciju.

♣ Fiksacija  $CO_2$  može se obaviti bez svetlosti, čiji je primarni akceptor ribulozo-1,5-bifosfat (Kalvinov ciklus) ili fosfoenolpiruvat (Hatch-Slack-Kortscahov ciklus). Prema načinu vezivanja  $CO_2$  biljke su podjeljene na  $C_3$ ,  $C_4$  i CAM-biljke.

♣ Fotorespiracija je oksidacija medjuproizvoda fotosinteze na svetlosti. Ona može i do 50% smanjiti prinos biljaka.

♣ Biosinteza saharoze, skroba i celuloze se obavlja iz glukozo-6-fosfata nagradjenog u Kalvinovom ciklusu. Neophodni reaktanti u biosintezi su nukleozid-trifosfati.

♣ Ugljeni hidrati se mogu pretvarati jedni u druge u biljnim organizmima. Značajna su pretvaranja monosaharida i mogu se realizovati na tri načina.

♣ Razgradnja monosaharida se može obaviti pomoću 4 biohemski puteva i to: glikolize, oksidativnim pentozofosfatnim (glukonatnim) putem, ciklusem trikarbonskih kiselina i glioksalatnim ciklusem.

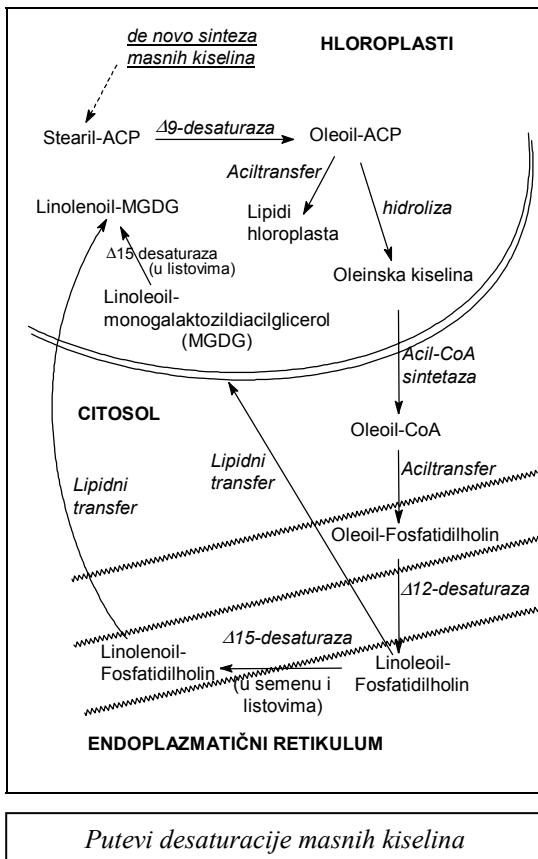
♣ Glikoliza je enzimska razgradnja glukoze do  $C_3$ -jedinica uz oslobadjanje ATP i NADH.

♣ Oksidativni pentozofosfatni (glukonatni) put je put oksidativne razgradnje glukozo-6-fosfata. To je alternativni put glikolize u kojem se stvara NADPH, regeneriše ribuloza-5-fosfat i gradi riboza-5-fosfat.

♣ Ciklus trikarbonskih kiselina (citratni ili Krebsov ciklus) je biohemski put u kojem se piruvat dobiven glikolizom u citoplazmi transportuje u mitohondrije gde se razlaže do  $CO_2$  i  $H_2O$ .

# 12.

## Metabolizam lipida



### 12.1. Biosinteza masnih kiselina

- 12.1.1. *De novo* sinteza
- 12.1.2. Aerobna desaturacija
- 12.1.3. Elongacija masnih kiselina

### 12.2. Biosinteza triacilglicerola

- 12.2.1. Akumulacija skladišnih lipida
- 12.2.2. Kenedijev put sinteze triacilglicerola

### 12.3. Biosinteza membranskih lipida

- 12.3.1. Sinteza glikozilglicerida, glavnih membranskih lipida hloroplasta
- 12.3.2. Sinteza fosfoglycerida
- 12.3.3. Lipid-transportni proteini

### 12.4. Katabolizam lipida

- 12.4.1. Membranski lipidi, promene i analiza
- 12.4.2. Razlaganje rezervnih lipida
- 12.4.3. Lipidi kao sekundarni glasnici
- 12.4.4. Oksidacija masnih kiselina
- 12.4.5. Biljne lipoksiogenaze i njihova funkcija

### 12.5. Biosinteza voskova, kutina i suberina

Lipidi koje sintetizuju biljke najvećim delom su uskladišteni kao neutralni i teško rastvorni triacilgliceroli. Kada je biljkama potrebna energija oni se mogu brzo mobilisati i razgraditi delovanjem specifičnih lipaza. Kako su u lipide svrstana jedinjenja različitog hemijskog sastava i osobina (masti, ulja, voskovi) to se njihova biosinteza i razgradnja (odn. metabolizam) mora pratiti za svaku grupu jedinjenja posebno. Najveći broj biljnih vrsta sintetizuju ulja, a veoma mali broj masti. Ulja biljke sintetizuju (u semenu a ređe u plodovima) iz glukoze, fruktoze i pentoza, nastalih fotosintezom u listovima. Biosinteza ulja je najintenzivnija u toku sazrevanja semena te u njemu ona postaju njegovi glavni sastojci (pored vode, proteina, neproteinskih azotnih materija i rastvornih šećera). Kako su ulja izgrađena iz masnih kiselina i glicerola to će i njihove biosinteze biti i posebno objašnjene.

## 12.1. Biosinteza masnih kiselina

Biosinteza masnih kiselina kod biljaka razlikuje se od biosinteze masnih kiselina kod drugih organizama po organizaciji enzima i mestu biosinteze. Osnovne građevne jedinice u biosintezi masnih kiselina su acetil-CoA, malonil-CoA i NAD(P)H. Biosinteza masnih kiselina teče u tri faze i to:

- *de novo* sinteza,
- desaturacija i
- elongacija

### 12.1.1. *De novo* sinteza

Fotosinteza je glavni izvor ugljenika za potrebe sinteze lipida. Do semena i plodova koje je sposobno da akumulira ulja ti produkti sinteze se od lisnog tkiva moraju transportovati preko saharoze (ili manoze). Završni enzim glikolize piruvat dehidrogenaza/ dekarboksilaza (PDH) dovodi do stvaranja acetil-CoA. PDH je obično prisutan u plastidima koji su mesta *de novo* sinteze masnih kiselina, dok kod nekih biljaka, poput spanaća, mitohondrijala PDH može imati ključnu ulogu u stvaranju acetil-CoA koji je hidrolizovan do acetata. Anjonski acetat (poput srčetne kiseline) poseduje sposobnost lakog prolaska kroz membranu i ulaska u unutrašnjost plastida dge se ponovo aktivira do acetil-CoA.

Prvi od dva enzima uključena u *de novo* sintezu masnih kiselina je acetil-CoA karboksilaza. To je enzim tipa 1 i sadrži biotin. On poseduje dve funkcije i sa biotin karboksil-nosećim proteinom (BCCP) je udružen u jedinstven multifunkcionalni protein visoke molekulske mase (220-240 kDa). Prvi deo reakcije uključuje ATP-aznu karboksilaciju biotinskog dela. Veruje se da reakcija teče preko međuproizvoda carbamil fosfata. Biotin je vezan za BCCP elastičnom vezom koja sadrži prolin, a koja mu omogućava da deluje na aktivno mesto karboksil-

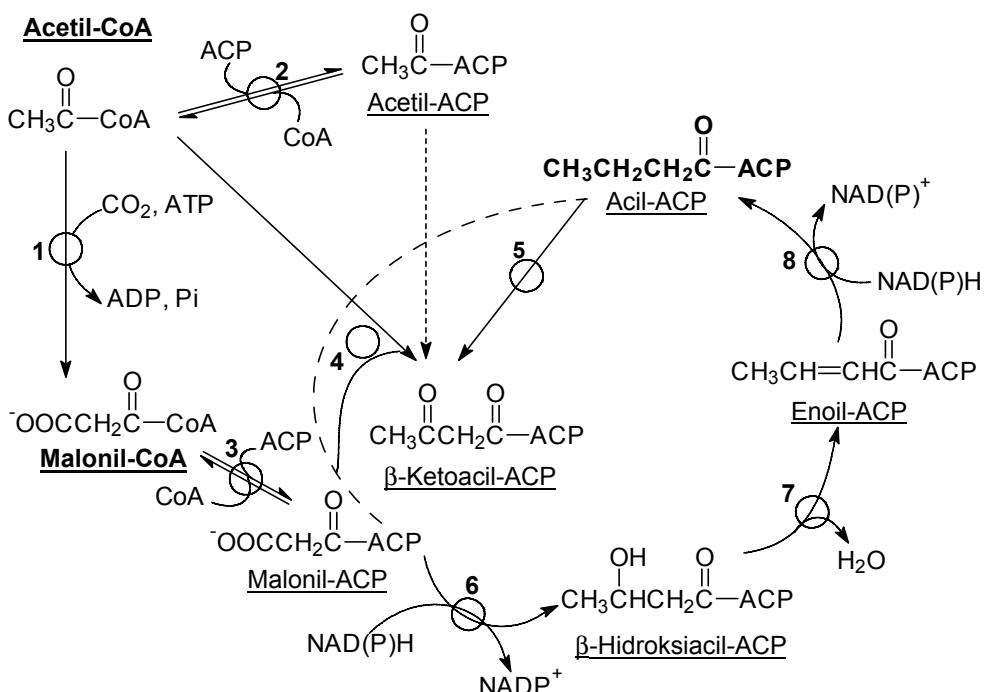
transferaze. *Karboksil-transferaza* katalizuje karboksilaciju acetil-CoA do malonil-CoA (jednačina 12.1). Ovo je drugi deo reakcije u *de novo* sintezi i specifična je po enzimu koji sadrži kao prostetičnu grupu biotin.



Veruje se da u mnogim situacijama acetil-CoA karboksilaza kontroliše ugradivanje ugljenika u lipide. Ipak, mehanizam regulacije još nije poznat. Za razliku od životinja trikarboksilne kiseline (poput citrata) i fosforilacija/defosforilacija nisu uključene u ovu kontrolu. U semenu uljarica koje zri povećava se količina acetil-CoA karboksilaze sa početkom akumulacije ulja (slika 12-1). Vitalna funkcija acetil-CoA karboksilaze je dokazana herbicidnim delovanjem herbicida specifičnim za trave, ariloksifenoksi propionata i cikloheksandiona. Ta jedinjenja uništavaju biljke iz familije trava, poput ječma ili raži, inhibirajući acetil-CoA karboksilazu ali su bez uticaja na enzim u drugim mono- i dikotiledonim biljkama.

Jednom formiran malonil-CoA se može koristiti kao izvor 2C (dvougljenične) jednice za biosintezu masnih kiselina. Biljna sintetaza masnih kiselina je enzim tipa II. To je disociabilan kompleks u kojem proteini koji katalizuju parcijalne reakcije mogu biti izolovani i prečišćeni. Pojedine reakcije uljučene u proces adicije su prikazane na slici 12-1. Prvobitno je smatrano da oba, i acetil-CoA, (prajmer molekul), i malonil CoA podležu acil transferu sa acilnosećim proteinom (ACP) da bi formirali acetil-ACP i malonil-ACP. Ipak, fiziološka aktivnost acetil-ACP-a je sada pod znakom pitanja sobzirom da u biljkama se nalazi enzim koji može direktno kondenzovati malonil-ACP sa acetil-CoA (to je tzv. kratkolančani kondenzujući enzim ili  $\beta$ -ketoacil-ACP sintaza III; KAS III). Kondenzacija prajmer molekula sa malonil-ACP-om daje  $\beta$ -ketoacil-ACP koji se podvrgava redukciji, dehidrataciji pa ponovnoj redukciji da bi dao za dva ugljenikova atoma duži lanac od početnog (butiril-ACP, odnosno C4-ACP). Nastali acil-ACP (butiril-ACP) tada podleže kondenzaciji sa sledećim molekulpm malonil-ACP inicirajući time novi krug (čiji je proizvod acil-ACP jedinica sa C6 atoma u lancu tj. C6-ACP, itd)(slika 12-1).

Prva reduktaza je  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaza koja može biti prisutna u različitim izoformama. U redukciji obično učestvuje NADPH ali su neke od izoformi aktivne i sa NADH. Dehidrataza je specifična za D(-)  $\beta$ -hidroksiacil-ACP i daje *trans*-2-acil-ACP koji se redukuje pomoću druge prisutne reduktaze: enoil-ACP reduktaze. I ovaj enzim takođe postoji u više izoformi i izolovani su i NADH i NADPH oblici.



Slika 12-1.

Reakcije *de novo* sinteze masnih kiselina biljaka. ACP (acil-noseći protein ili kiseli proteinski nosač). Enzimi : 1. acetil-CoA karboksilaza; 2. acetil-CoA:ACP transacilaza (verovatno nije važna za većinu biljaka); 3. Malonil-CoA:ACP transacilaza; 4.  $\beta$ -ketoacil-ACP sintaza (KAS III) važna za početak kondenzacije; 5.  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaza I (važna za elongaciju lanca do C<sub>14</sub>-ACP),  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaza II (katalizuje kondenzaciju palmitoil-ACP sa malonil-ACP); 6.  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaza; 7.  $\beta$ -hidroksiacil-ACP dehidraza; 8. Enoil-ACP reduktaza. Supstrati se reaktiviraju sukcesivno u ciklusu 7 puta do palmitoil-ACP odnosno 8 puta do stearil-ACP.

Pored enzima koji kondenzuje kratke lance, u biljkama su prisutne i druge dve  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaze. U većini biljaka enzim koji kondenzuje kratke lance (KAS III) može kao supstrate koristiti acetil-, a verovatno i butiril-prajmere (eng. *primers* znači početni). Dalja kondenzacija je katalizovana  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetazom I (KAS I) koja koristi prajmere sa do 14 ugljenikovih atoma i verovatno je odgovorna za formiranje palmitoil-ACP.  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaza II (KASII) tada može kondenzovati palmitoil-ACP sa malonil-ACP-om i dati konačni proizvod sinteze masnih kiselina: steroil-ACP. Ova tri enzima kondenzacije su pravobitno bili otkriveni korišćenjem inhibitora i slični su enzimima kondenzacije *Echerichia coli*,

sintetazama masnih kiselina, koje takođe pripadaju rastvorljivim tip II kompleksima.

Svaka pojedinačna komponenta sinteze masnih kiselina je kodirana jedarskom DNK ali je ona aktivna i u stromama hloroplasta (plastidima). One se sintetišu zajedno sa signalnim peptidom koji dozvoljava prolazak kroz spoljnu membranu organele. Proces je nejviše proučavan kod acil-nosećeg proteina koji je, kao i bakterijski ACP, molekul male molske mase. Značajna homologija sekvenci je pronađena između ACP-a različitih biljnih vrsta sa bakterijskim, pa čak i sa odgovarajućim multifunkcionalnim životinjskim sintetazama masnih kiselina.

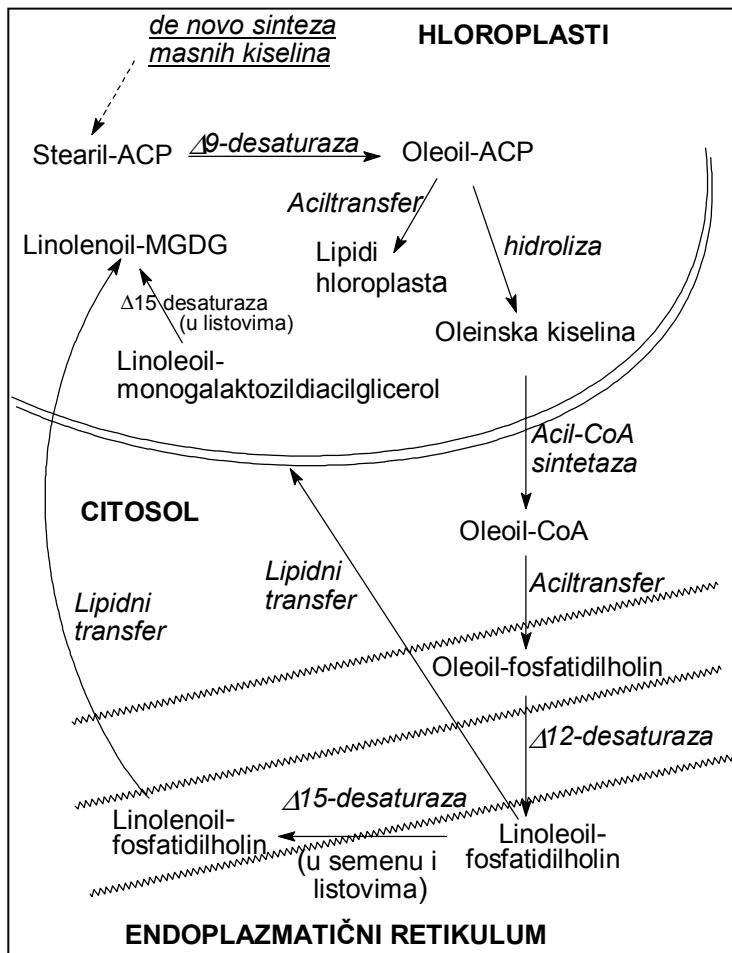
Krajnji proizvod *de novo* sinteze masnih kiselina je skoro uvek mešavina palmitata i stearata. Odnos tih proizvoda zavisi od aktivnosti  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaze II u poređenju sa ostalim konkurentnim reakcijama, poput prelaska palmitata iz palmitoil-ACP-a u kompleksne (složene) lipide ili njihova hidroliza pomoću tioesteraze. Biljke sa relativno visokim sadržajem  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaze II, poput uljane repice daju lipide sa visokim udelom kiselina sa 18 C atoma. Kod nekih biljaka, poput kokosa ili *Cuphea*, akumuliraju se masne kiselina sa lancima srednje dužine ( $C_8-C_{12}$ ). Dugi niz godina nije bio jasan mehanizam terminacije lanca. Ipak, specifična tioesteraza za masne kiseline lanaca srednje dužine je pronađena kod biljaka Kalifornijskog zaliva koje takođe daju kao finalne proizvode masne kiseline lanaca srednje dužine. Slične tioesteraze su pronađene i u nekim poljoprivrednim uljaricama poput *Cuphea* tako da se mehanizam sinteze masnih kiselina sa lancima srednje dužine pokazao sličan onom uključenom u sintezi mlečnih masti u mlečnim žlezdama sisara.

### 12.1.2. Aerobna desaturacija masnih kiselina

Dokazano je da su većina biljnih masnih kiselina nezasićeni molekuli. One se formiraju od zasićenih proizvoda *de novo* sinteze masnih kiselina, poput palmitinske i stearinske kiseline. Celokupan proces je aeroban i uključuje cijanid-osetljive završne desaturacione proteine (eng. *terminal desaturase protein*). Ipak, različite desaturaze se mogu razlikovati u nekim osobinama, poput njihove pozicione specifičnosti prema supstratu koji koriste i detalja vezanih za elektron transportni sistem.

Kao što je već pomenuto u poglavljiju 12.1.1. glavni proizvod *de novo* sinteze masnih kiselina je stearoil-ACP. Ovo jedinjenje je supstrat za prvu značajnu biljnu desaturazu masnih kiselina (stearoil-ACP  $\Delta 9$ -desaturazu) koja kao proizvod daje oleoil-ACP. Ovaj enzim je rastvorljiv i prisutan u stromi plastida. Ona je jako aktivna tako da se stearat retko akumulira u biljkama nego skoro sav biva preveden u oleat. Enzim je izolovan iz nekoliko izvora. Dobijene su aktivne desaturaze i nakon ugrađivanja cDNK Šafranike u *Esherichiju coli* i cDNK ricinus u kvasac. Sve

$\Delta 9$ -desaturaze su pokazale veliku sličnost u polipeptidnoj sekvenci ali malu sličnost sa stearoil-CoA  $\Delta 9$ -desatu-razom izolovanom iz životinja (slika 12-2).



Slika 12-2. Glavni putevi desaturacije masnih kiselina.

Oleoil-ACP je pogodan supstrat i za stromalnu tioesterazu (koja ga hidrolizuje do slobodne oleinske kiseline) i za aciltransferaze koje su odgovorne za acilovanje glicerol-3-fosfata (videti poglavlje 12.2.2.). Dobijena oleinska kiselina može biti ponovo esterifikovana do oleoil-CoA u spoljnoj membranu i to pomoću acil-CoA sintetaze (slika 12-2). Acil-CoA, uključujući i oleoil-CoA, su supstrati aciltransferaza endoplazmatičnog retikuluma i tamo postoji jedan dodatni put u kome oleat može biti ugrađen u glavni lipid endoplazmatičnog retikuluma - fosfatidilholin.

Desaturaze koje prevode oleat u polinezasićenu masnu kiselinu linoleat deluju na  $\Delta$ 12-poziciji i koriste kompleksne lipidne supstrate tako da se desaturacija javlja »in situ« dok je supstrat oleat deo membranskih lipida. Fosfatidilholin je glavni supstrat u biljkama i proces desaturacije dovodi do lokalne promene u fluidnosti membrane pošto linoleat ima nižu tačku mržnjenja od oleata. Napredak u proučavanju  $\Delta$ 12-desaturaze je napravljen nedavno. Izgleda da enzimi endoplazmatičnog retikuluma šafranske koriste elektrone iz NADH koji prelaze na terminalnu desaturazu preko citohroma b<sub>5</sub>.  $\Delta$ 12-desaturaza je prisutna u spoljašnjoj membrani hloroplasta i verovatno koristi različite kompleksne lipidne supstrate. Sigurno je da u cijanobakterijama (modro-zelenim algama) koje ne sadrže fosfatidilholin  $\Delta$ 12-desaturacija se odvija na sva 4 membranska lipida (MGDG, DGDG, SQDG i PG). Genetski kod za  $\Delta$ 12-desaturazu iz dve vrste cijanobakterija je bio prenešen u rod koji ne poseduje sposobnost sinteze linoleata. Pojava  $\Delta$ 12-desaturaze je omogućila tom rodu produkciju linoleata a samim tim ga je i učinila tolerantnim na niske temperature (što je bilo i za očekivanje s obzirom na tačku mržnjenja linoleata u poređenju sa oleatom).

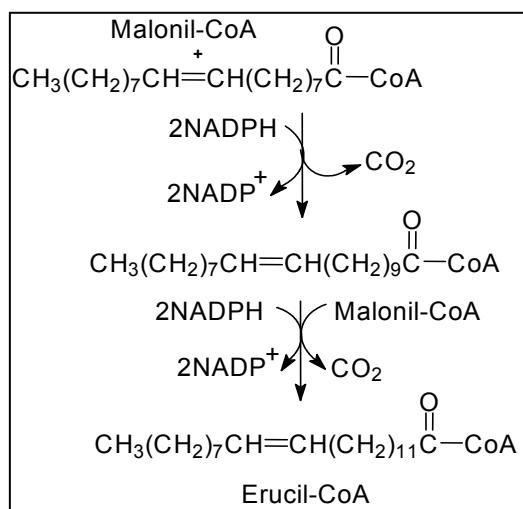
Njazastupljenija biljna masna kiselina je  $\alpha$ -linolenat. Ona se dobija delovanjem  $\Delta$ 15-desaturaze na linoleat. U većini listova glavni supstrati ovih desaturaza je lipid hloroplasta, monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG). Takođe u nekim listovima fosfatidilholin može postati supstrat za neke desaturisane linoleate i u nekim semenima (poput lanenog koje produkuje zanačajne količine linoleata) je ovaj fosfolipid glavni supstrat. Da bi MGDG mogao delovati kao supstrat neophodno je da se prevede iz endoplazmatičnog retikuluma nazad u hloroplaste. To je verovatno katalisano povratnom reakcijom holinfosfotransferaze (slika 12-8, sekcija 12.3.2.). Zbog teškoća u izolovanju  $\Delta$ 15-desaturaze malo se zna o njenim osobinama. Ona se inhibira pojedinim piridazinon herbicidima).

Druga biljna desaturaza masnih kiselina koja koristi kompleksne lipidne supstrate je enzim koji daje neobičnu trans- $\Delta$ -3 heksadekenoičnu kiselinu (videti tabelu 8-6.). Kao što se moglo očekivati za masnu kiselinu koja je jedino prisutna na sn-2 poziciji fosfatidilglicerola, supstrat za enzim je fosfatidilglicerol koji sadrži palmitat na toj poziciji. Postoji i mnogo drugih desaturaza kod različitih biljnih vrsta a neke od njih su prikazane na slici 12-2. Sve one pripadaju tipu aerobnih desaturaza, a anaerobni put otkriven kod Ešerihiye koli se ne pojavljuje u biljkama.

Po nivou desaturacije biljke se razlikuju jedino na nivou hloroplasta. To se dešava zahvaljujući relativnoj aktivnosti fosfatidat fosfohidrolaze hloroplasta koja može diacilglicerol iz plastida učiniti dostupnim (ili u nekim slučajevima ne dostupnim).

### 12.1.3. Elongacija masnih kiselina

Iako su glavni proizvodi sinteze masne kiseline sa 16 i 18 C atima, u izvesnoj količini se sintetišu i masne kiseline sa dužim lancima. Mnoga semena uljarica sadrže masne kiseline sa veoma dugim lancima ( $> C_{18}$ ) i to naročito mononezaisocene oblike. Dobar primer je uljana repica koja sadrži oko 60% eručne kiseline (*cis* Δ13-22:1). Enzimi odgovorni za sintezu eručne kiseline su elongaze koje dodaju dve ugljenične jedinice od malonil-CoA na postojeći prekursor, oleinsku kiselinu. Pošto se novi ugljenikovi atomi dodaju na karboksilni kraj lanca masne kiseline broj dvostrukе veze će se pomeriti u odnosu na karboksilni kraj. Enzimi elongaze koriste acil-CoA i NADPH kao glavni reduktant (slika 12-3).



Slika 12-3. Elongacija oleoil-CoA do eručne kiseline.

Elongacija masnih kiselina se najčešće dešava da bi se obezbedili prekursori za sintezu površinskih lipida (poglavlje 8) poput voskova, kutina i suberina. U sintezi proizvoda dužih lanaca se uključuju zasićene masne kiseline i one se odvijaju u endoplazmatičnom retikulumu ili Goldžijevim membranama. I ovde se NADPH, malonil-CoA i acil-CoA koriste kao supstrati. Izgleda da svaki elongazni kompleks poseduje kondenzacionu aktivnost, dve reduktaze i dehidrazu. Sekvenca reakcija uključenih u dvokarbonsku adiciju je slična sa onima u *de novo* sintezi i neki od proteina koji katalizuju te polureakcije su rastvoreni i delimično izolovani. Neki herbicidi, poput tiokarbamata, koji deluju na sintezu voskova,

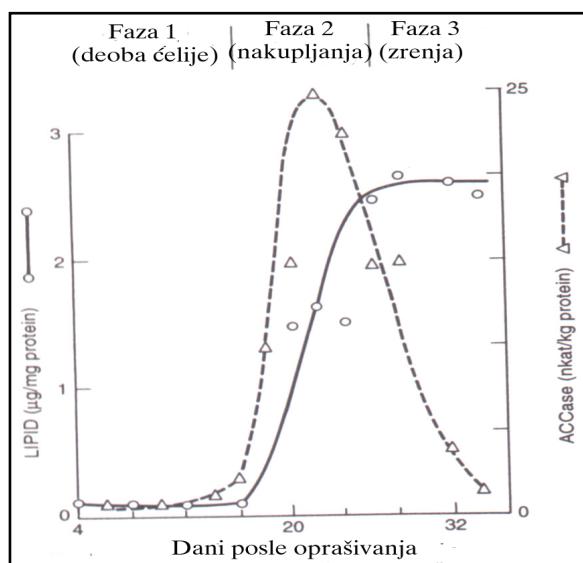
izgleda inhibiraju elongaciju masnih kiselina i tako se može objasniti njihovo delovanje na sintezu površinskih lipida.

## 12.2. Biosinteza triacilglicerola

Sinteza triacilglicerola obuhvata procese akumulacije skladišnih (rezervnih) lipida i Kenedijev put sinteze triacilglicerola. Ovi procesi su obrađeni u sekcijama koje slede.

### 12.2.1. Akumulacija rezervnih lipida

Kada biljke žele da uskladište energiju u obliku lipida one to čine samo u posebnim i pažljivo regulisanim periodima njihovog razvoja. Biljna semena sazrevaju u tri odvojene faze kao što je prikazano na slici 12-4. U prvoj etapi dolazi do deobe ćelija ali se malo rezervnih materija akumulira. U drugoj fazi dolazi do naglog skladištenja rezervnih materija (masti, ugljenih hidrata itd.). Za biljna semena u kojima se pojavljuju »neobičajene« masne kiseline upravo je ta druga faza period kada dolazi do njihove sinteze i to više nego u svim drugim fazama razvića zajedno. U trećoj fazi suša uzima učešće i tada se jako malo rezervnih hranjivih materija sintetiše.



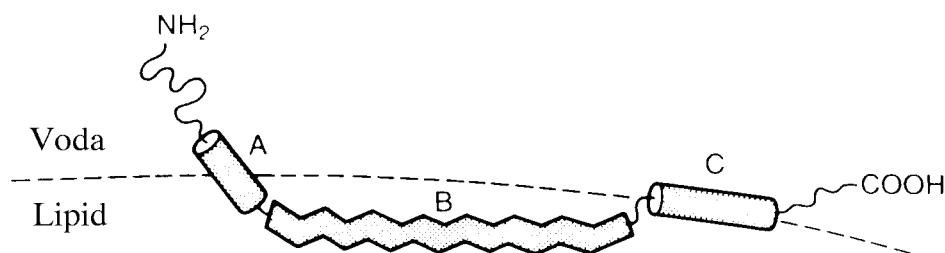
Slika 12-4.  
Nakupljanje triacilglicerola tokom sazrevanja semena uljane repice: korelacija sa aktivnosti acetil-CoA karboksilaze (ACC-aza).

Kao što je već razmatrano u prethodnom poglavlju (poglavlje 12.1.1.) acetil-CoA-karboksilazna aktivnost je često veoma značajna u kontorli celokupnog ugrađivanja ugljenika u lancu masnih kiselina i, stvarno, aktivnost ovog

enzima u toku razvoja semena je povezana sa ovakovom ulogom (slika 12-4).

Mada se u početnoj fazi triacilgliceroli formiraju kao gole kapi, rezervna ulja se obično akumuliraju u uljnim telašcima. Uljna telašca su okružena

fosfolipidnom polumembranom sa specifičnim proteinima-*oleosinima*. Izgleda da oleosini imaju ulogu u sprečavanju spajanja uljnih telašaca, a mogu takođe delovati i kao vezivno mesto za lipaze uključene u razgradnju skladišnih lipida tokom klijanja. Oleosini iz semena različitih biljaka izgleda imaju veoma dobro očuvanu aminokiselinsku sekvencu koja daje tri različita regiona u proteinu (slika 12-5). Ovi regioni veoma podsećaju na apoprotein sisara. N-terminalni kraj ima  $\alpha$ -heliks region (sekcija A) koji penetrira u citosol, dok centralni prolinom bogat hidrofobni domen (sekcija B) verovatno predstavlja ostatak u membrani ili možda čak u jezgru triacilglicerola uljnog telašaca. C-terminalni kraj proteina ima  $\alpha$ -heliksnu grupu sa pozitivno nanelektrisanim amino kiselinama koje se izgleda grupišu oko heliksa tako da mogu jonski reagovati sa negativnim nabojem fosfolipida polumembrane.



Slika 12-5.

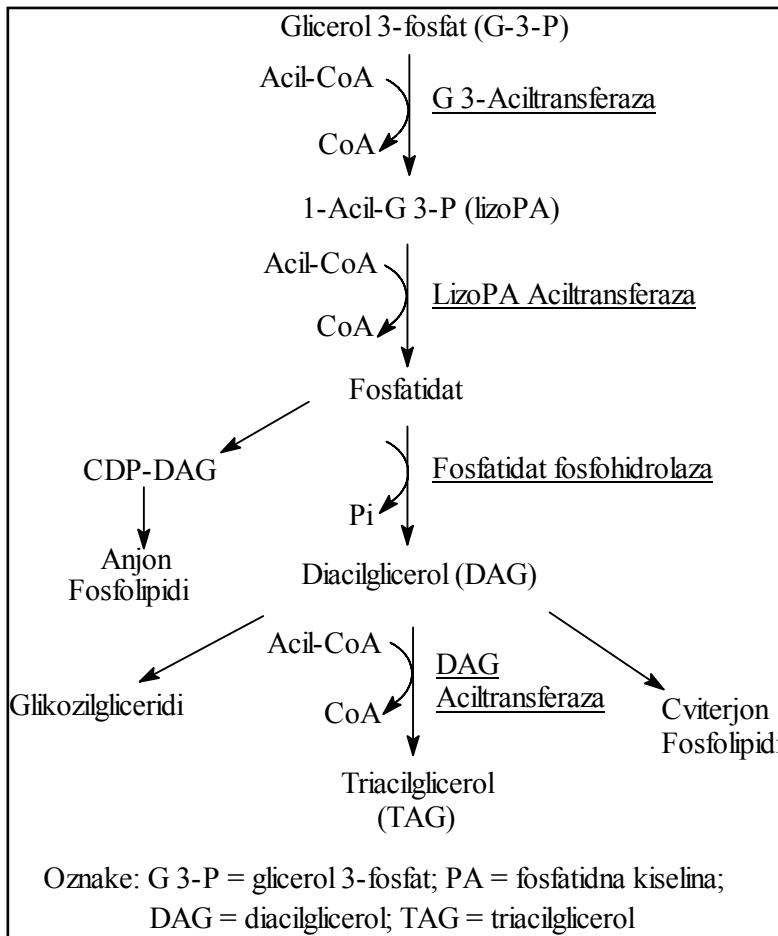
Moguće uređenje tri domena proteina oleosina na površini uljnog telašca. Sekcija A, N-terminalni  $\alpha$ -heliks domen koji može pomoći aktivnosti lipaze za vreme klijanja semena. Sekcija B, centralni hidrofobni domen bogat ostacima prolina. Sekcija C, amfipatični  $\alpha$ -heliks sa nanelektrisanom aminokiselinskom stranom lanca u kontaktu sa vodenom fazom i nenelektrisanom stranom lanca na lipidnoj strani.

### 12.2.2. Kenedijev put sinteze triacilglicerola

Američki biohemičar Kenedi je 1961 godine rasvetlio put sinteze triacilglicerola u životnjama. Isti put sinteze koriste i biljke a on sadrži 4 reakcije (slika 12-6). Glicerol-3-fosfat (nastao redukcijom dihidroksiaceton fosfata intermedijera u glikolizi) je početni akceptor. On se aciluje (prvo na *sn*-1, a posle na *sn*-2 poziciji) pomoću acil-CoA aciltransferaza. Ovi enzimi su locirani u endoplazatičnom retikulumu.

Prvi enzim, glicerol-3-fosfat aciltransferaza, preferira da koristi zasićene kiseline (poput palmitinske) u većini biljaka ali ima znatno širu specifičnost ka supstratu. Kao rezultat te reakcije palmitat postaje mnogo bogatiji u *sn*-1 položaju u odnosu na *sn*-2 položaj. Ipak, u situacijama gde je malo dostupnog palmitoil-CoA koriste se druge masne kiseline tako da u plodovima masline (gde je oleoil-CoA

glavni acil-CoA) oleat je najzastupljenija masna kiselina na *sn*-1 položaju triacilglicerola. Nasuprot tome, drugo acilovanje je visoko specifično za oleol-CoA i zasićene masne kiseline su praktično izostavljene sa *sn*-2 pozicije.



Slika 12-6. Kenedijev put sinteze triacylglycerola (i drugih lipida).

Dva acilovanja glicerol-3-fosfata dovode do stvaranja fosfolipida, fosfatidne kiseline. Ona je u ćelijama prisutna u obliku soli i naziv fosfatidat je mnogo bolji termin. On se hidrolizuje fosfatidat fosfohidrolazom do diacylglycerola koji se koristi u sintezama fosfolipida i glikozilglicerida (sekcija 12.3) da bi dao skladišne lipide. Konačno, u jedinoj reakciji specifičnoj za formiranje triacylglycerola, diacylglycerol se aciluje trećom masnom kiselinom koristeći enzim diacylglycerol acyltransferazu. Ovaj enzim ima široku specifičnost za supstrat u većini biljaka i vezivanje masne kiseline na *sn*-3 poziciji triacylglycerola uglavnom zavisi od toga koje su acil grupe dostupne iz acil-CoA pul-a.

Sinteza triacilglicerola je kod životinja pod veoma striktnom metaboličkom kontrolom i uzima učešća praktično uvek kada postoji dostupan višak kalorija. Kod biljaka, ipak, takva kontrola nije potrebna pošto je sinteza triacilglicerola vođena više privremenim (slika 12-4.) nego metaboličkim faktorima. Nije iznenađujuće da nijedna reakcija u Kenedijevom putu vrši kontrolu toka sinteze pošto diacilglicerol aciltransferaze teško da mogu biti dovoljno aktivne kada je nivo sinteze triacilglicerola visok. Izgleda da ukupna brzina građenja lipida verovatno zavisi od priliva acil-CoA i tako utiče na aktivnost acetil-CoA karboksilaze (slika 12-4.)

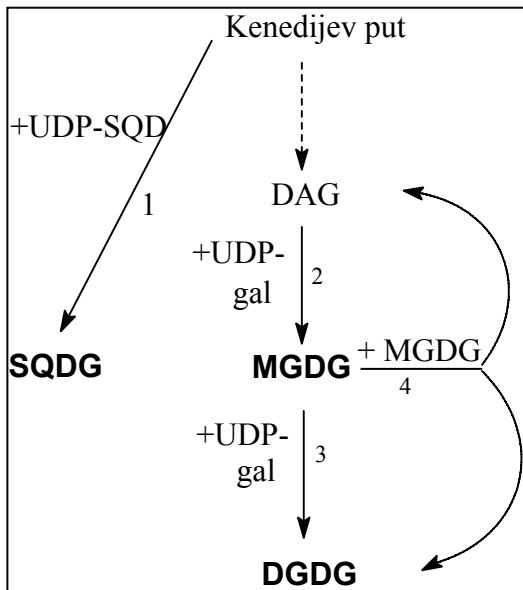
Vredno je pomenuti dve osobine skladišnih ulja. Prvo, kod onih biljaka gde se formiraju visokonezasićena ulja (poput suncokreta, semena lana, tabela 8-2) diacilglicerol iz Kenedijevog puta može biti ugrađen u fosfatidilholin preko povratne reakcije holinfosfotransferaze Oleat sa *sn*-2 pozicije če tada biti supstrat za Δ-12 desaturazu (poglavlje 12.1.3. i slika 12-2.) i diacilglicerol obogaćen linoleatom tada može biti vraćen na Kenedijev put. Za ulja koja su bogata oleatom ali siromašna polinezasićenim masnim kiselinama poput maslinovog ulja (slika 8-2) reakcija holinfosfotransferaze tokom akumulacije je minimalna. Drugi aspekt kvaliteta skladišnih ulja je taj da aciltransferaze svih žitarica imaju posebne strukturne osobine koje im ne dozvoljavaju da reaguju sa »neuobičajenim« masnim kiselinama kada je to potrebno. Tako da, iako su aciltransferaze ricinusa sposobne da iskoriste hidroksimasnu kiselinu, ricinoleinsku kiselinu, taj isti supstrat ne mogu koristiti i aciltransferaze uljane repice. Druga interesantna pojava je da se »neuobičajene« masne kiseline ne pojavljaju u membranskim lipidima (jer im mogu oslabiti funkciju) čak ni preko diacilglicerol međuproizvoda Kenedijevog puta koji se takođe koristi za sintezu membranskih lipida. Nije poznato kako se ovo postiže iako je korišćenje specifičnog pula diacilglicerola za sintezu membrana ili skladišnih lipida jedino moguće objašnjenje. Objašnjenje može biti to da je akumulacija triacilglicerola povezana sa periodom minimalne biogeneze membranskih lipida pa je mogućnost štetne modifikacije u građi membranskih lipida značajno smanjena.

## 12.3. Biosinteza membranskih lipida

Biosinteza membranskih lipida uključuje puteve sinteze glikozilglicerida (glavnih membanskih lipida hloroplasta), fosfoglicerida, kao i lipid transportnih proteina. Svaka od ovih grupa membranskih lipida bice razmatrana u posebnim podpoglavljima na stranicame knjige koje slede.

### 12.3.1. Biosinteza glikozilglicerida, glavnih membranskih lipida hloroplasta

Nije iznenadjuće da se tri glikozilglicerida hloroplasta monogalaktosildiacilglicerol (MGDG), digalaktozildiacilglicerol (DGDG) i sulfophonovozildiacilglicerol (SQDG) stvaraju unutar te organele. Putevi koji su uključeni su prikazani na slici 12-7. Monogalaktozildiacilglicerol se stvara u omotaču hloroplasta koristeći diacilglicerol stvoren pomoću fosfatidil fosfohidraze (svejedno da li iz omotača hloroplasta ili endoplazmatskog retikuluma (videti poglavljje 12.2.2.) i UDP-galaktoze iz citosola. Enzim koji je uključen se naziva galaktoziltransferaza. Za digalaktozildiacilglicerol (DGDG) postoje dva moguća puta, ili je MGDG subjekt druge galaktotransferaze ili, alternativno, dva molekula MGDG podležu interlipidnoj transfernoj reakciji formirajući DGDG i diacilglicerol. Za ovu poslednju rakućiju (katalizovanu pomoću galaktolipida: galaktolipid galaktotransferaze) se veruje da je mnogo zančajnija u onim biljkama koje su bile ispitivane.



Slika 12-7.  
Sinteza glikozilglicerida.  
DAG, diacilglicerol;  
MGDG, monogalaktozildiacilglicerol  
DGDG, digalaktozildiacilglicerol;  
SQDG, sulfophonovozildiacilglicerol.

Reakcije 1 i 2 katalizuju:  
UDP-galaktozo:DAG-galaktozil-transferaza;  
Reakciju 3:  
UDP-galaktozo:MGDG-galaktozil-transferaza;  
Reakciju 4:  
galaktolipid: galaktozil-transferaza.

Biljni sulfolipid (sulfophinovozildiacilglicerol, SQDG) nastaje u reakciji analognoj stvaranju MGDG (slika 12-7) sa tom razlikom da je ovde hidrosolubilni supstrat UDP-sulfohinovoza. Samo poreklo sulfohinovoze nije dovoljno razjašnjeno. Ona može nastati od UDP-galaktoze preko međuproizvoda keto-gluko-5-ena koji vezuje sulfit. Reakcije mogu biti analogne onima koje se odigravaju pri formiranju deoksišećera.

## 12.3.2. Sinteza fosfoglicerida

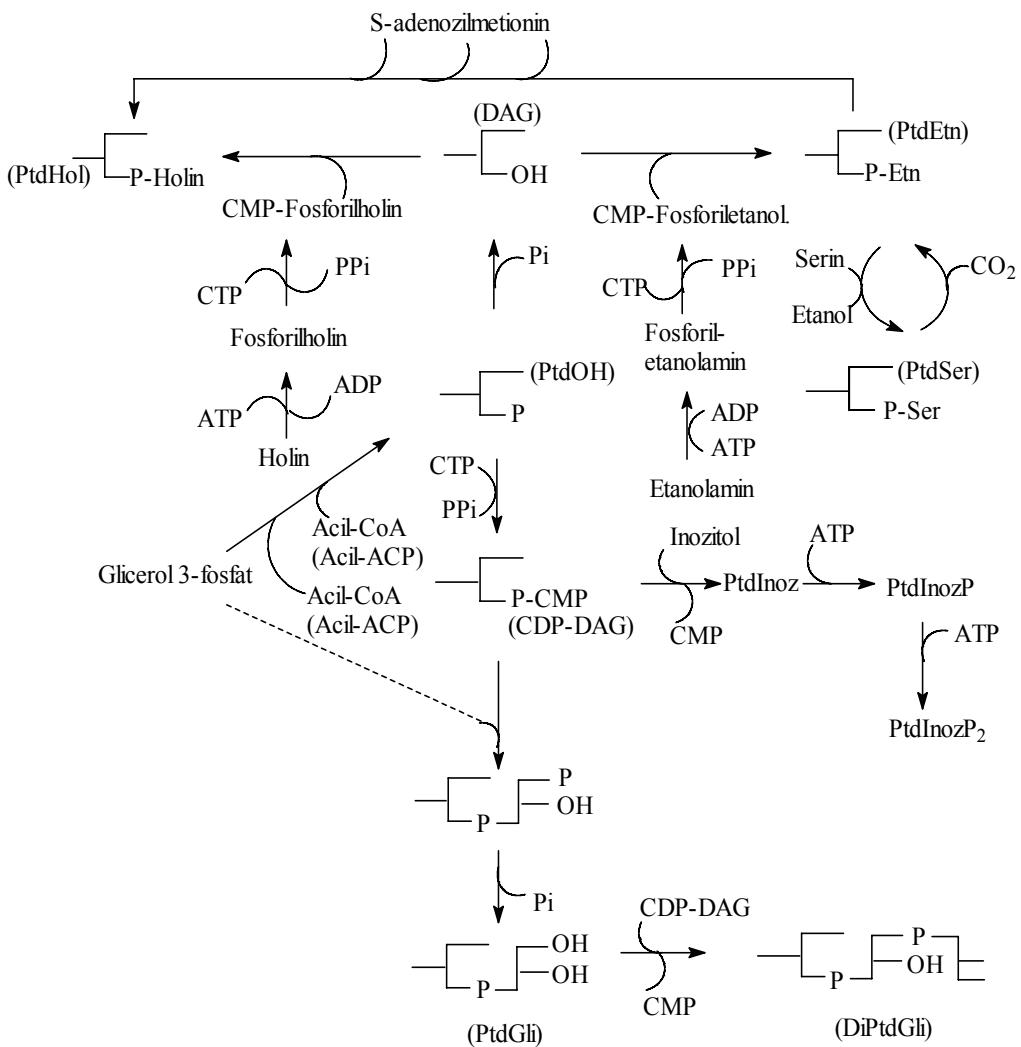
Skoro svi biljni lipidi koji sadrže fosfor su u obliku fosfoglicerida i jedino njihova sinteza će biti razmatrana u ovom poglavlju. Formiranje fosfoglicerida može biti opisano u tri kategorije: formiranje cviterjonskih lipida, formiranje anjonskih lipida i prevođenje jednih fosfolipida u druge.

Cviterjonski lipidi su oni koji sadrže i negativno i pozitivno nanelektrisanje te im je ukupan naboj ravan nuli. Na fiziološkim pH, fosfatidilholin i fosfatidiletanolamin se nalaze u takvom obliku. Oni se sintetišu u sličnom trreakcijskom putu (slika 12-8). Prvo enzim kinaza koristi ATP i fosforiliše bazu (holin ili etanolamin). Različite holin i etanolamin kinaze su izolovane iz semena soje i ta, a i neke druge studije, su definisale neke od njenih karakteristika.

U narednoj fazi se fosforilovane baze prevode do cistidin nukleotida dajući CDP-baze međuproizvode. Uključeni enzimi se nazivaju citidiltransferaze (i one se razlikuju za holinfosfat i etanolaminfosfat). Evidentno je pokazano da je holinfosfat-citidiltransferaza limitirajuća u putu sinteze fosfatidilholina kod graška. Enzimska aktivnost je regulisana alosternom aktivacijom već prisutnih enzima kao i novim sintezama proteina. Završni enzimi sinteze fosfoglicerida prenose fosfatne grupe sa CDP-baza do diacilglicerola. Reakcija je lako povratna i kao što je razmatrano ranije (poglavlje 12.2.), dozvoljava razmenu diacilglicerola iz fosfatidilholinskog pula. Enzimi uključeni u ovaj poslednji transfer su holinfosfotransferaza i etanolaminfosfotransferaza (tim redom).

Umesto da budu stvoreni preko CDP-baza, anjonski (negativno nanelektrisani) fosfoglyceridi se sintetišu korišćenjem CDP-diacilglicerola (slika 12-8). Fosfatidat ponovo igra glavnu ulogu ali umesto nakupljanja diacilglicerola, one je uključen u drugu citidiltransferaznu reakciju sa CTP-om. Nastali proizvod CDP-diacilglicerol tada reaguje diraktno sa inozitolom i daje fosfatidil-inozitol ili sa glicerol 3-fosfatom koji se brzo defosforiliše da bi dao fosfatidilglicerol. Fosfatidilglicerol se takođe koristi za sintezu difosfatidilglicerola (kardiolipina) koji je glavni lipid mitohondrija i smešten je u njihovoj unutrašnjoj membrani.

Reakcije koje dovode do formiranja fosfatidilinozitola se najaktivnije odvijaju u endoplazmatičnom retikulumu. Ipak, dalja fosforilacija ovog fosfoglycerida se odvija u citoplazmatičnoj membrani. Ona je povezana sa funkcijom fosfatidilinozitol 4,5-bis-fosfata u signalnoj transdukciji (sekcija 12.4.3). Nasuprot tome, fosfatidilglicerol se uglavnom stvara u hloroplastima gde je i glavni fosfolipid. Manja količina se sintetiše i u mitohondrijama gde se koristi kao prekursor difosfatidilglicerola.

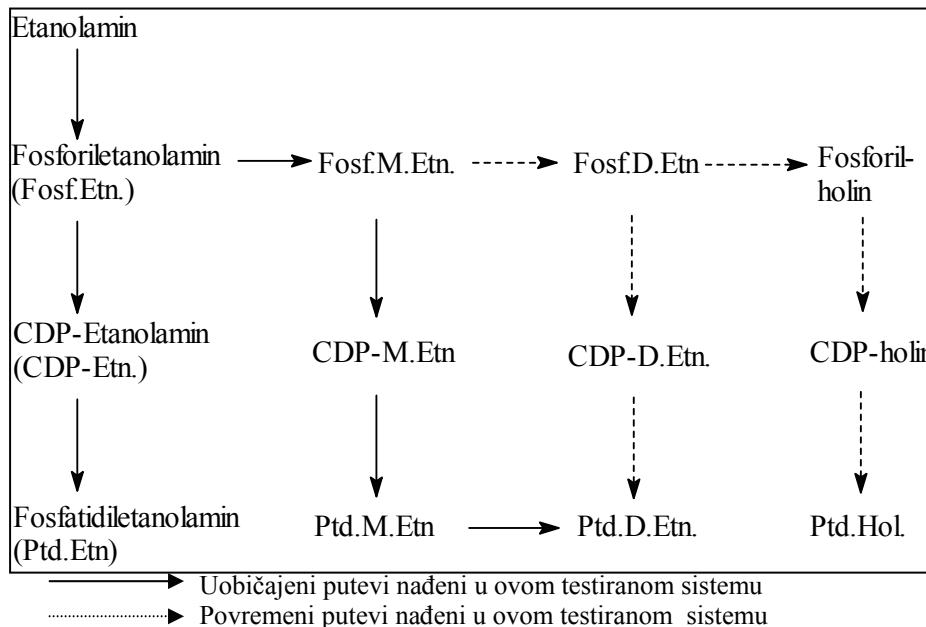


Slika 12-8.

Putevi nastajanja fosfolipida u biljkama.(Direktna metilacija fosfatidiletanolamina u fosfatidilholin ne može se odvijati u biljkama). Skraćenice: PtdHol – fosfatidilholin; DAG – diacilglicerol; PtdEtn - fosfatidiletanolamin; PtdSer – fosfatidilservin; PtdInoz – fosfatidilinozitol; PtdInozP – fosfatidilinozitolfosfat; PtdGli – fosfatidilglicerol; DiPtdGli – difosfatidilglicerol.

Kada se jednom sintetiše neki fosfolipid on ima mogućnost da bude preveden u neki drugi fosfolipid (već je prikazano nastajanje inozitolfosfolipida i kardiolipa iz fosfatidilglicerola). Fosfatidilservin se stvara pomoću  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisne bazne izmene, koristeći u reakciji neki drugi fosfolipid (najčešće

fosfatidiletanolamin) i serin (slika 12-8). Pored toga, postoje neki dokazi da fosfatidiletanolamin može biti uspešno metilovan koristeći S-adenozilmethionin da bi dao fosfatidilholin. Kao alternativa, u nekim biljnim tkivima se etanolamin metiluje do etanolaminfosfata ili CDP-etanolammina i metilovanje fosfatidiletanolamina se ne odvija direktno (slika 12-9). Dodatno, kao što je prikazano na slici 12-8, dekarboksilacija fosfatidilserina može dovesti do stvaranja fosfatidiletanolamina. Ova reakcija je jako dobro proučena kod mikroorganizama a registrovana je i u biljkama iako njen značaj još nije u potpunosti objašnjen.



Slika 12-9.

Alternativni putevi nastajanja fosfatidilholina pomoću reakcija metilovanja u testiranim sistemima. Skraćenice: Fosf.M.Etn. – fosforilmethanolamin; Fosf.D.Etn. – fosforildimethanolamin; Ptd.M.Etn. – fosfatidilmethanolamin; Ptd.D.Etn. – fosfatidildimethanolamin; Ptd.Hol. – fosfatidilholin.

### 12.3.3. Lipid-transportni proteini

Postavlja se pitanje transporta lipida stvorenih u jednom delu ćelije a namenjenih za membrane nekog drugog dela. Trenutno još uvek nije dovoljno poznato kako se to odvija iako se neki lipidi (poput acil-CoA) mogu lako kretati kroz tečne delove, pri čemu slobodna difuzija ne izgleda kao održiva hipoteza. Jedna od pretpostavki je da su sistemi membrana u potpunosti povezani i moguće je da je upravo to jedan od oblika transporta lipida zbog relativno lake pokretljivosti lipida poprečno kroz

membranu (sekcija 14.1.). Veze između endoplazmatičnog retikuluma i drugih organela su potvrđene elektronskom mikroskopijom. Ipak, postoje određena mesta gde takve veze nisu uočene i ostaje da se objasni masovni transport sa takvih mesta poput membrane tilakoida hloroplasta tokom razvoja lista. Mnogo održivija ideja je korišćenje lipid-transportnih proteina. To su molekuli koji deluju poput albumina u transportu masnih kiselina u krvi sisara. Oni poseduju lipid-vezujuće mesto koje može biti veoma specifično za različite klase molekula. Značajan broj takvih lipid-vezujućih proteina je izolovan i opisan. Oni se koriste da bi se omogućilo kretanje fosfolipida ili glikozilglicerida između membranskih sistema *in vitro* i prepostavlja se da takvu ulogu imaju i *in vivo*. Neki od proteina su sekpcionisani i sada se radi na otkrivanju njihove molekularne biologije.

## 12.4. Katabolizam lipida

Katabolizam lipida podrazumeva brzinu kojom se hemijski menjaju membranski lipidi, degradaciju skladišnih lipida kao i lipide biljaka koji imaju funkciju sekundarnih glasnika (mesendžera).

### 12.4.1. Membranski lipidi, promene i analiza

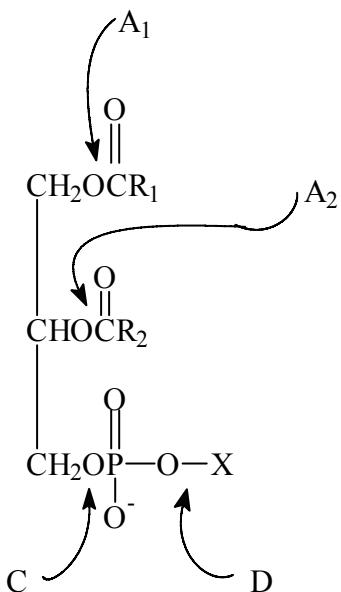
Za lipide se može reći da u prirodi imaju tri uloge. Oni deluju kao skladište energije, kao graditelji membrana a mogu biti uključeni i u kontrolu metabolizma kao sekundarni glasnici ili regulatori rasta.

Fosfolipidi i glikozilgliceridi biljnih membrana nisu statični molekuli već podležu značajnim hemijskim promenama. Ove "promene" (brzina kojom se određeni molekuli sintetišu i kasnije razlažu) (često merena kao  $t_{1/2}$  vrednost kada je 50% od date klase lipida promenjeno) može zahvatiti samo deo molekula ili ceo molekul.

Kod membranskih lipida acil-ostaci masnih kiselina se često uklanaju i zamjenjuju mnogo brže nego ceo molekul. To može biti povezano sa metabolizmom (npr. tokom desaturacije masnih kiselina) ili kao odgovor na određene potrebe. Tokom aklimatizacije na hladne uslove se može javiti potreba za određene molekulske vrsta pojedinih klasa lipida, npr. za promenom kombinacije prisutnih masnih kiselina da bi se snizila tačka mržnjenja lipida i zadržala fluidnost membrane.

Kod fosfolipida se hidroliza može odvijati kao rezultat aktinosti fosfolipaza (slika 12-10) ili acil-hidrolaza. Ove poslednje su prisutne i jako aktivne u mnogim

biljnim tkivima i sposobne su da hidrolizuju svaki acil-lipid. One ipak poseduju specifičnost za supstrat i posebno aktivno deluju na monogalaktozildiacilglicerol. U većini slučajeva je njihova aktivnost pažljivo kontrolisana verovatno pomoću kompermentacije (posebni odeljci) ali, ako se tkivo mehanički ošteti ili smrzne one tada imaju pristup i drugim supstrat-membranskim lipidima. Tako npr. ako se paradajz homogenizuje i želi da se izdvoji membranska frakcija, ona je tad često već razorena (dešava se čak i tokom njene izolacije) usled delovanja acil-hidrolaza. Acil-hidrolaze su veoma otporne na zagrevanje i često deluju i na temperaturama od 60 ili  $70^{\circ}$  C. Zbog toga što deluju na acil-lance koji su fluidni i na niskim temperaturama, one mogu biti aktivne i u zamrznutim tkivima. Aktivne acil-hidrolaze tkiva, poput onih u Briselskim mladicama (*Brussels sprouts*) čine neophodnim da se to povrće prvo skuva pre stavljanja u zamrzivač.



Slika 12-10.

Mesta delovanja različitih fosfolipaza. Ne zna se pouzdano o mestu delovanja *fosfolipaze B* u biljkama.

Fosfolipaza A enzimi uklanjaju masne kiseline iz intaktnog fosfolipidnog molekula. Fosfolipaza A<sub>1</sub> deluje na *sn-1* poziciju dok A<sub>2</sub> deluje na *sn-2* poziciju. Fosfolipaza A<sub>2</sub> ima značajnu ulogu u remodelovanju fosfolipida i specifični enzimi mogu "dozvoliti" novosintetizovanoj masnoj kiselini da napusti maticni fosfolipid nakon formiranja. Npr., »neobičajena« hidroksi masna kiselina, ricinoleinska, se sintetiše na *sn-2* poziciji fosfatidilholina. Odmah nakon sinteze ona se brzo hidrolizuje pomoću specifične fosfolipaze A<sub>2</sub> koja je čini dostupnom za ugrađivanje u triacilglicerol

i u isto vreme je štiti da ne postane deo membranskih lipida.

Fosfolipaze C uklanjaju bazne fosfatne ostatke dajući za proizvod diacilglicerol. Nije poznato koliko su biljci ovi enzimi važni ali je sigurno da takav specifičan enzim učestvuje u promeni inozitol lipida (sekcija 12.4.3.). Sa druge strane, biljke su često veoma dobri izvori fosfolipaze D, enzima koji može ukloniti bazne ostatke. Ta reakcija može biti uključena u opštu produkciju fosfolipida ali postoji malo dokaza za njenu ulogu *in vivo*. Npr. sinteza fosfatidilglicerola katalisana fosfolipazom D daje racemsku smešu koja se pojavljuje u prirodi. Fosfolipaza D je jedan od onih enzima (poput ureaze) kojima još nije u potpunosti razjašnjena biohemijska uloga.

## 12.4.2. Razlaganje rezervnih lipida

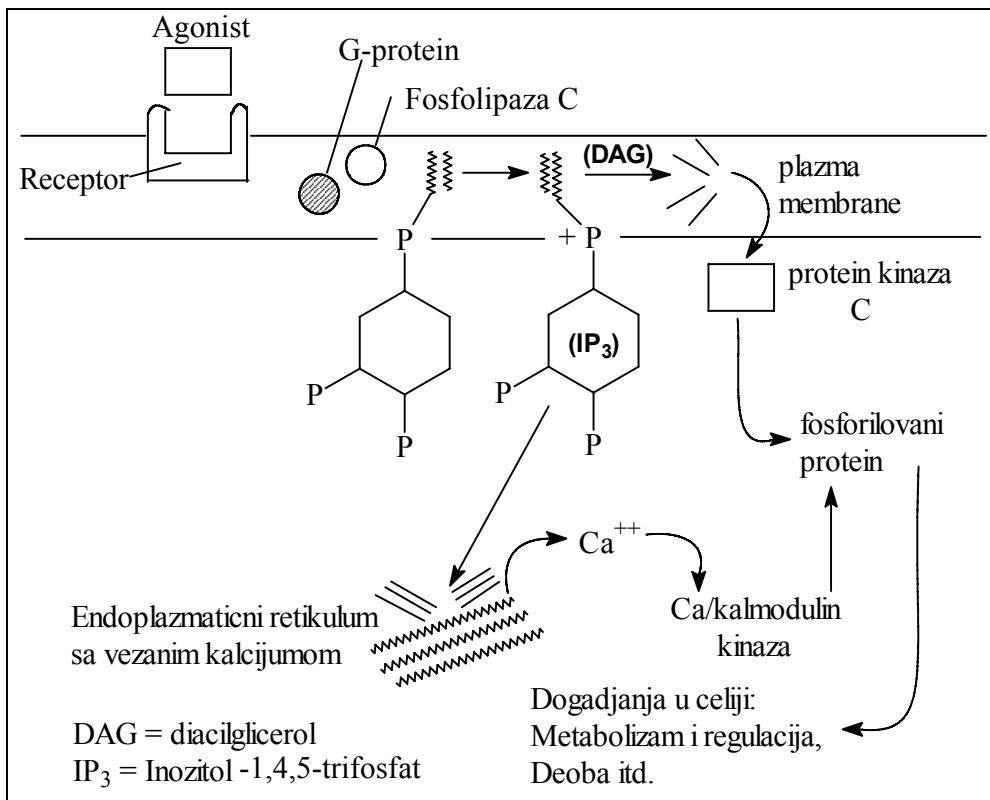
Kao što je istaknuto u poglavljju 8 rezervni lipidi se kod viših biljaka skoro stalno nalaze u obliku triacilglicerola. Takav lipid je uskladišten u posebnim telima (sekcija 12.3.2.) kojim je bogata unutrašnjost semena bogatih uljem. Kada semena, poput ricinusovog, klijaju lipaze se aktiviraju i vezuju za površinu masnih tela verovatno preko specifičnih vezivnih mesta na oleosinima. Hidroliza triacilglicerola započinje na primarnim hidoksilima (*sn*-1 ili *sn*-3 pozicija). 2-monoacilglicerol će u prirodi racemovati do stabilnijeg 1-monoacilglicerola koji će tako postati supstrat za lipaze čak iako enzim ne poseduje sposobnost hidrolize *sn*-2 pozicije. Veliki broj različitih lipaza je izolovan iz biljaka i njihova supstrat-specifična mesta i druge enzimske karakteristike su determinisane. Ovi enzimi su često stabilni na zagrevanje, organske rastvarače i druge ekstremne uslove. Neke od njih imaju veliku industrijsku primenu i koriste se ili u organskim sintezama ili u prehrambenim tehnologijama. Sa druge strane to su enzimi koji dovode do užeglosti maslinovog ulja ili kvarenja svih proizvoda od brašna. Takođe, njihova sposobnost da katališu mnoge esterifikacije i druge sintetske reakcije u nevodenim sredinama čini ih industrijski korisnim za modifikaciju jestivih ulja pa čak i za katalitičko stvaranja peptida od aminokiselina.

Jednom oslobođene masne kiseline iz lipida (ili membrana) mogu postati supstrat oksidativnog napada obično u okviru  $\beta$ -oksidacionog ciklusa. Oksidacija masnih kiselina će biti razmatrana u sekciji 12.4.4.

## 12.4.3. Lipidi kao sekundarni glasnici

U životinjskim organizmima je utvrđeno, i dobro proučeno, da fosfatidilinozitol-4,5-difosfat igra ključnu ulogu u kontroli metabolizma. Izgleda da takva funkcija postoji i kod biljaka i glavni učesnici tog procesa su prikazani na slici 12-11.

Ukratko, *agonist* pristiže na spoljnju stranu gde se vezuje za specifične receptore. To vezivanje dovodi do konformacionih promena na susednom G-proteinu koji zbog toga aktivira specifičnu fosfolipazu C. Ova fosfolipaza jedino deluje na fosfatidilinozitol-4,5-difosfat i hidrolizuje ga da bi se dobio membranski lociran diacilglicerol i hidrosolubilan inozitol-1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ). Oba ova proizvoda deluju kao sekundarni glasnici. Diacilglicerol stimuliše protein kinazu C pošto  $InsP_3$  oslobađa intracelularne kalcijumove depoe da bi se stimulisale  $Ca^{2+}$ /kalmodulin stimulisane protein kinaze. Različiti tipovi protein kinaza fosforilišu različite proteine i na taj način se reguliše metabolizam.



Slika 12-11. Kontrola metabolizma pomoću mehanizma hidrolize fosfatidilinozitol-4,5-difosfata.

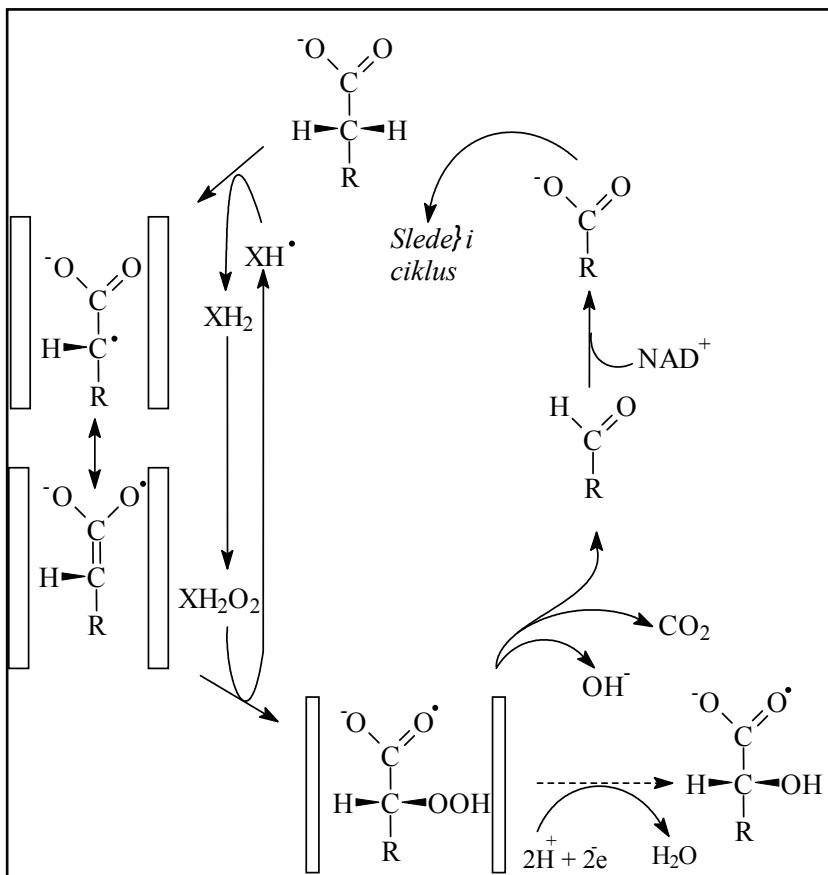
Slabije je proučen metabolizam fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata u biljkama nego u životinjama ali je sa sigurnošću utvrđena uloga lipida u "salt" stresu i cvetanju, pronađeni su svi enzimi koji učestvuju i potvrđen "broj izmena" inozitol lipida u reakciji sa  $\text{Ca}^{2+}$  signaliziranjem.

I drugi fenomeni u kojim učestvuju lipidni su otkriveni u biljkama i jedan od njih uključuje oksidovane (lipooksigenovane) masne kiseline što će biti razmatrano u narednoj sekciji.

## 12.4.4. Oksidacija masnih kiselina

Masne kiseline mogu podleći  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\omega$ -oksidacijama, hidroksilaciji (oksidaciji) u lancu i lipoksgenaznom napadu.

**$\alpha$ -Oksidacija** – je oksidativno razlaganje masnih kiselina na  $\alpha$ -C atomu u toku klijanja semena, peroksidazama masnih kiselina (EC 1.11.1.3) koje katalizuju dekarboksilaciju i građenje aldehida pri čemu  $H_2O$  deluje kao akceptor H. Predloženi put je prikazan na slici 12.12.



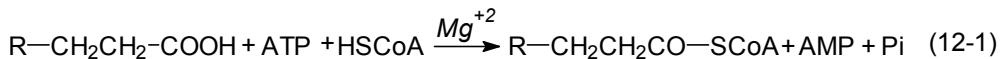
Slika 12-12. Predloženi put  $\alpha$ -oksidacije u biljkama.

Proces je proučavan u lišću graška i u kikirikiju. Molekularni kiseonik je neophodan i u kikirikiju, vodonik peroksid generišući sistem je takođe uključen. Enzimi koji katališu redukciju peroksidova, poput glutation-peroksidaze, redukuju  $\alpha$ -oksidaciju i smanjuju stvaranje D-hidroksipalmitata. To dovodi do nastajanja 2-hidroksipalmitata kao međuproizvoda. U eksperimentima se desila akumulacija

hidroksi masnih kiselina jer su međuproizvodi usmereni na slepi put. Iz hidroperoksi međuproizvoda se izdvaja  $\text{CO}_2$  i nastaje masni aldehid. On se oksiduje pomoću  $\text{NAD}^+$  sistema i dobija se masna kiselina sa jednim C atomom manje od početnog supstrata (palmitat).  $\alpha$ -oksidacija je bitna u biljkama zbog metabolizma jedinjenja kod kojih je strana lanca sa metil-grupom zaštićena od normalne  $\beta$ -oksidacije. Jedan takv primer je fitol iz bočnog lanca hlorofila. Proces oksidacije može se odvijati u citoplazmi ili u endoplazmatskom retikulumu (zavisno od biljnog tkiva).

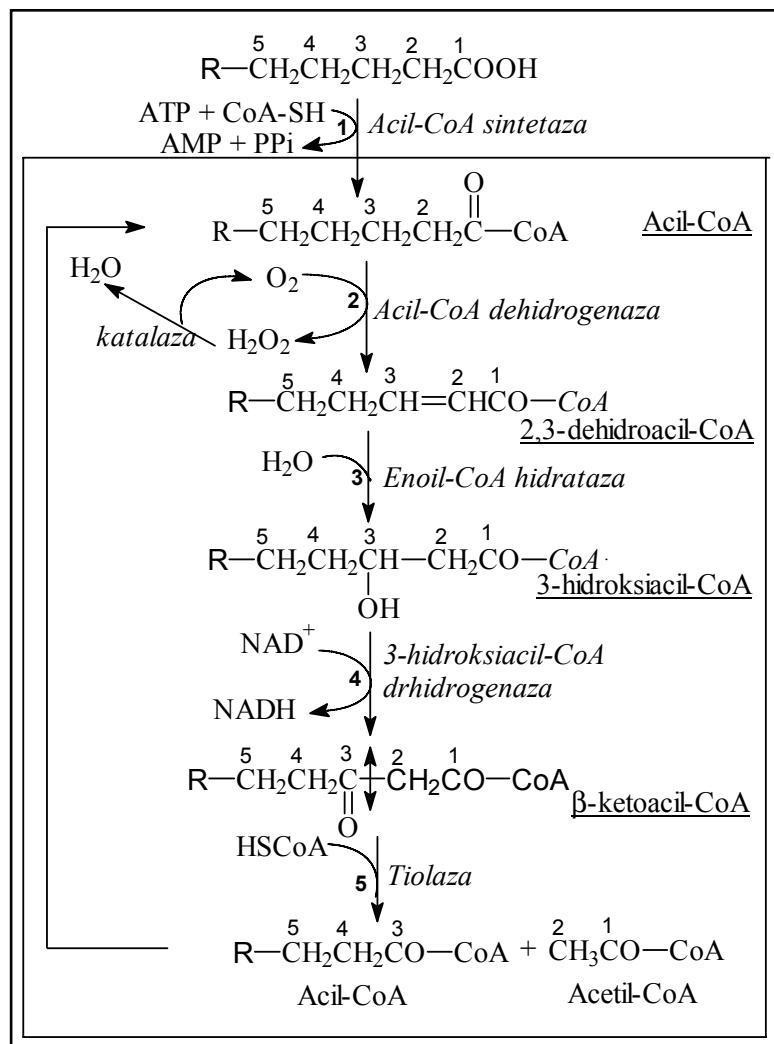
**$\beta$ -Oksidacija** - je glavni put u kom energija lipidnih depoa može biti oslobođena. Pronađeno je da su u biljkama enzimi  $\beta$ -oksidacije locirani u mikrotelašcama i pokazuju neke razlike od onih koji se koriste u životinjskim mitohondrijalnim  $\beta$ -oksidacijama. Masno-kiselinski acil-CoA se koristi kao početni supstrat, ali u katabolizmu koji se odigrava u mikrotelašcama ne dolazi do uključivanja karnitina. Analogno životinjskim sistemima, neesterifikovane masne kiseline se prevode u njihove CoA-tioestre uz pomoć *acil-CoA sintetaze* (EC 6.2.1.3) (reakcija 1) povezane sa membranom mikrotelašcima (slika 12-13). I neesterifikovane masne kiseline i acil-CoA su sposobni da slobodno prolaze kroz membranu mikrotelašaca.

Masne kiseline su hemijski inertne te se one pre razgradnje moraju "aktivirati". Aktivacija masnih kiselina se obavlja sa ATP i CoA u prvoj reakciji  $\beta$ -oksidacije enzimom acil-CoA sintetazom (reakcija 12-1).



Reakcije  $\beta$ -oksidacije su prikazane na slici 12-13. Početna oksidacija acil-CoA (reakcija 2) je katalisana sa acil-CoA dehidrogenazom (EC 1.3.99.3) u reakciji u kojoj se generiše vodonik-peroksid i 2,3-dehidroacil-CoA. Vodonik-peroksid brzo biva razložen pod dejstvom peroksizomalne katalaze. Sledeće dve reakcije katalizuju enzimi enoil-CoA hidrataza (EC 4.2.1.17) i 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenaza (EC 1.1.1.35) pri čemu nastaju 3-hidroksiacyl-CoA (reakcija 3) i  $\beta$ -ketoacyl-CoA (reakcija 4) u kojoj nastaje i NADH. Dobijeni proizvod se tiolitički razgrađuje sa acil-CoA tiolazom u acetil-CoA ( $\text{C}_2$  jedinica) i acil-CoA. Konačno, tiolaza oslobađa acetil-CoA iz acil lanca formirajući drugi acil-CoA koji je za dva ugljenikova atoma kraći od početnog supstrata. Novonastali supstrat se recikluje i celokupan proces može krenuti iz početka.

Acetil-CoA nastao  $\beta$ -oksidacijom može preći u mitohondrije (oksiduje se u  $\text{CO}_2$  pomoću ciklusa trikarbonskih kiselina uz oslobođanje ATP) ili u glioksizome u kojima se pretvara u glukozu pomoću glioksalatnog ciklusa.



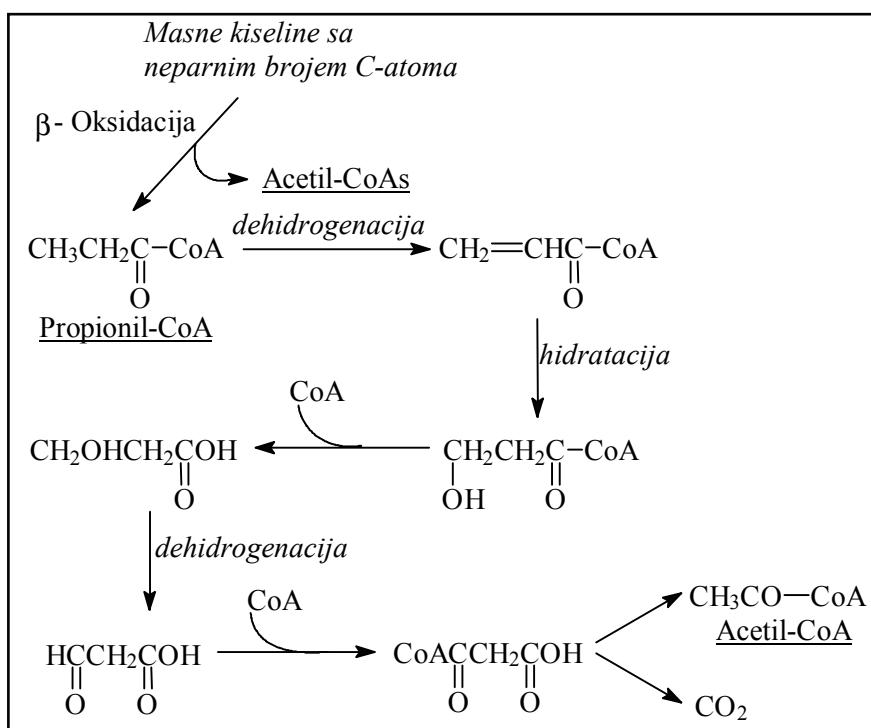
Slika 12-13.  $\beta$ -Oksidacija u mikrotelašcima biljaka.

$\beta$ -oksidacija u semenu koje klija se obavlja u glioksizomima jer ove organele sadrže kompletan set enzima koji katalizuju reakcije  $\beta$ -oksidacije. Glioksizomi se pojavljuju u kotiledonima semena bogatim lipidima odmah kad započne klijanje, te se lipidi koriste kao glavni izvor ugljenika za sintezu ugljenih hidrata. Kada seme postane sposobno da koristi CO<sub>2</sub> fotosintezom, glioksizomi nestaju. Prema tome samo mali broj biljaka (uljarice) ima mogućnost da razgrađuje masne kiseline  $\beta$ -oksidacijom. Ukoliko se u listovima nalazi manje ulja  $\beta$ -oksidacija se odvija u peroksizomima.

Pri svakom obrtu ciklusa u prvoj fazi  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina gradi se 1 mol FADH<sub>2</sub> i NADH koji se reoksidišu u elektrontransportnom lancu (H sa O daje vodu), a potom se ponovo uključuju u  $\beta$ -oksidaciju. Acetil-CoA se u citratnom ciklusu oksiduje do CO<sub>2</sub>.

Kompletom oksidacijom jednog mola stearinske kiseline (18:0) može se dobiti 148 mola ATP (18 C atoma daje 9 molekula acetil-CoA). Svaki acetil-CoA daje 12 molekula ATP (što je ukupno 12 x 9 = 108 ATP) u ciklusu trikarbonskih kiselina, a 5 ATP se gradi u svakom ciklusu  $\beta$ -oksidacije (ukupno 5 x 8 = 40 ATP).

Naravno, nisu sve masne kiseline koje se katališu u mikrotelima zasićene kiseline sa velikim brojem C atoma. Kada se koriste supstrati sa *neparnim brojem C* atoma, propionil-CoA je finalni proizvod. Propioant u biljkama potom ulazi u puteve koji su dosta različiti od onih koji se sreću u životinjama. Uključene su dve dehidrogenacije, zajedno sa hidratacijom. Pored toga, tioestar se pomera sa jednog kraja na drugi da bi se omogućila konačna dekarboksilacija i formiranje molekula acetil-CoA (slika 12-14).

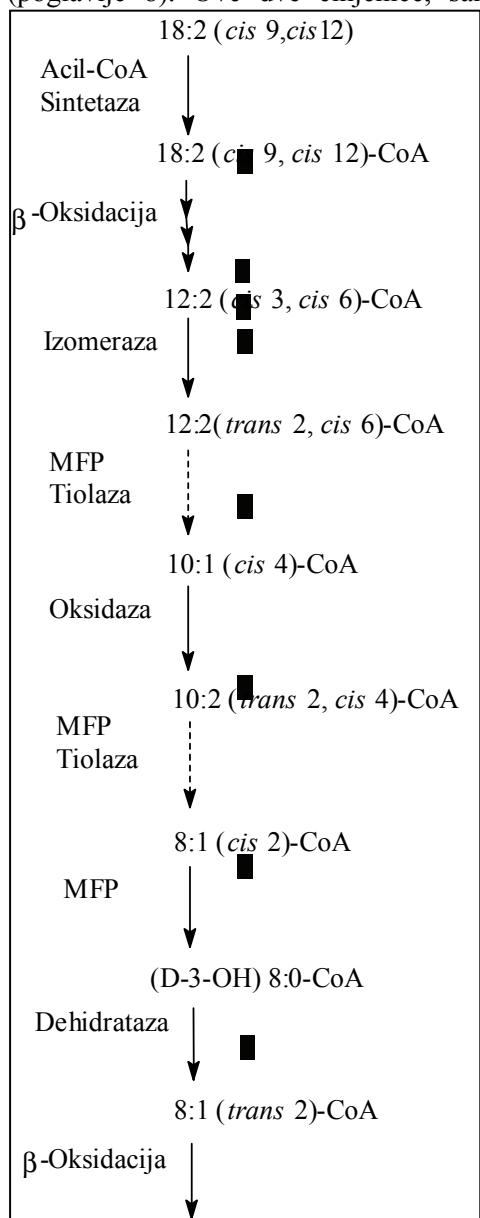


Slika 12-14. Metabolizam propionata u biljkama.

Oksidacija masnih kiselina dugog niza sa neparnim brojem C atoma odvija se po tipu  $\alpha$ -oksidacije.  $\alpha$ -Oksidacija masnih kiselina se razlikuje od  $\beta$ -oksidacije

po tome što se u toku nje ne oslobađa hemijska energija i što na njenom početku nije potrebno aktivirati masne kiseline.

Mnoge biljne masne kiseline su cis-nezasićene i sadrže  $\Delta 9$ -dvostruku vezu (poglavlje 8). Ove dve činjenice, same po sebi, predstavljaju problem za  $\beta$ -oksidaciju zato što su i pozicija i konfiguracija neodgovarajuće za  $trans$ - $\Delta 2$ -međuproizvode  $\beta$ -oksidacije (slika 12-13). Da bi se taj problem prevazišao prisutna je 3  $cis$ -2  $trans$ -enoil-CoA izomeraza kao treća aktivnost tri (bi) funkcionalnog enzima. Za masne kiseline poput linoleata je prisutan enzim 2,4-dienil-CoA reduktaza koja podržava oksidacije ove nezasićene masne kiseline čija sekvenca oksidacije je prikazana na slici 12-15.



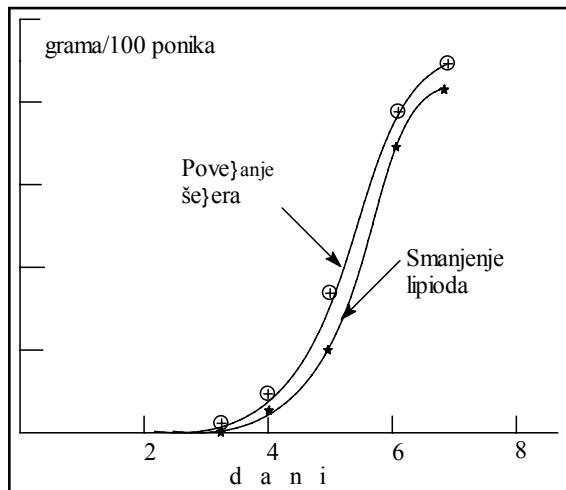
Slika 12-15.

$\beta$ -Oksidacija linoleinske kiseline (18:2) u peroksizomima biljaka: *Skračenica*: MFP – multifunkcionalni protein.

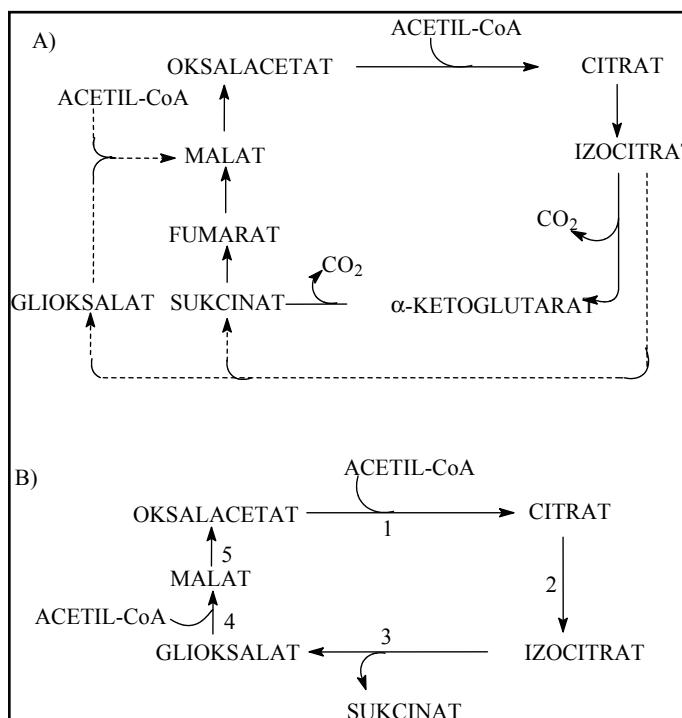
Potreba za  $\beta$ -oksidacijom u klijajućim semenima je kratkotrajna i rad Beeversa i njegovih saradnika je osvetlio detalje tog procesa u ricinusu. Tokom upijanja vode semena stvaraju se posebna mikrotela u kojima su prisutni svi enzimi  $\beta$ -oksidacije i narednog glioksiomalnog ciklusa (u koji odlazi acetil-CoA). Lipaze takođe postaju aktivne i oslobađaju masne kiseline iz triacilglicerola uskladište-nog u masnim telima. Za kratko vreme (5-6 dana) svi depoiti triacilglicerola bivaju hidrolizovani sa gomilom ugljenika koji biva preveden u ugljene hidrate koji se koriste za dalji metabolizam (slika 12-16).

Slika 12-16.

Konverzija ugljenika iz triacilglicerola u ugljene hidrate za vreme klijanja ricinusovog semena.



Kod životinja acetil-CoA oslobođen u  $\beta$ -oksidaciji ulazi u ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus) gde se dva ugljenika oslobađaju u vidu  $\text{CO}_2$ . Životinje ne poseduju sposobnost prevođenja masnih kiselina u glukozu i druge ugljene hidrate. Nasuprot tome, za seme je od životnog značaja sposobnost prevođenja uskladištenih lipida u ugljene hidrate pre nego što započne proces biosinteze u mladim listovima. Tada se koristi glioksalatni ciklus (u kome »nedostaju« dve reakcije dekarboksilacije ciklusa limunske kiseline, slika 12-17).

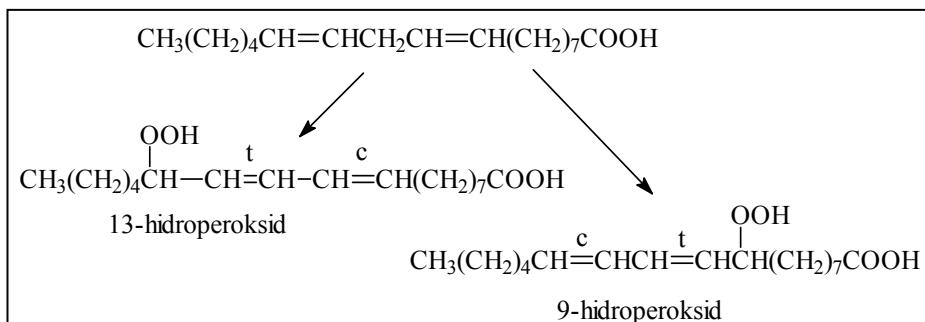


Slika 12-17.  
Glioksalatni ciklus – konverzija C iz acetil-CoA u ugljene hidrate.

- (A) -Glioksalatni ciklus kao modifikacija CTK; (B) - Glioksalatni ciklus se odvija u glioksisomima i pokazuje produkciju sukkinata iz 2 mola acetil-CoA. Pet faza ciklusa su katalizovane sledećim enzimima: 1, citrat-sintetaza; 2, akonitaza; 3, izocitrat-liaz; 4, malat-sintetaza; 5, malat-dehidrogenaza.

## 12.4.5. Biljne lipoksiogenaze i njihova funkcija

Lipoksiogenaza je naziv koji se koristi za grupu enzima koji pomoću molekulskog kiseonika katališu oksidaciju masnih kiselina koje sadrže *cis,cis*-1,4-pentadienski sistem da bi dale konjugovane hidroperoksi-dienske proizvode (slika 12-18). Lipoksiogenaze su široko zastupljene u biljnem svetu i često su jako aktivne. Ovi enzimi su posebno značajni u jestivim biljkama jer katabolišu polinezasičene masne kiseline i daju proizvode karakterističnog ukusa i arome. Često se koriste za izbeljivanje prirodnih pigmenata poput karotenoida pšeničnog brašna ili hlorofila lucerke. Leguminoze, poput soje, su često dobri izvori lipoksiogenaza.



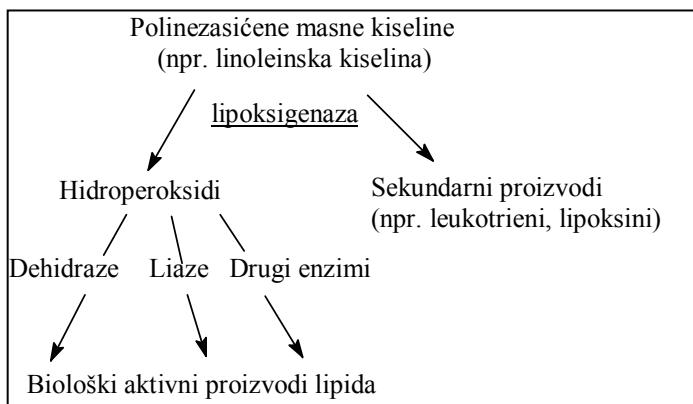
Slika 12-18. Lipoksiogenazni atak na linoleinsku kiselinu.

Brojne lipoksiogenaze su izolovane iz različitih biljaka i pronađeni su enzimi sa pH optimumima i u kiseloj i sa baznoj sredini. Lipoksiogenaze nemaju kofaktore, izuzev nehemskog gvožđa, te je broj njihovih inhibitora mali. Obično su enzimi najaktivniji prema linoleinskoj kiselini mada su aktivni i prema drugim kiselinama sa dvostrukom vezom na C-13 (n-6).

Aerobne lipoksiogenazne reakcije dovode do stavarnja konjugovanih *cis,trans*-pentadienil hidroperoksida koji poseduju *trans*- vezu susednu hidroperoksidu. Ezimi se razlikuju prema položaju hidroperoksidne grupe koji za linoleinsku kiselinu mogu biti na C-9 ili C-13. Pored toga, lipoksiogenaze takođe katališu anareobnu reakciju između nastalih proizvoda aerobne reakcije i linoleinske kiseline. Nastaje kompleksna smeša jedinjenja koja uključuje proizvode razlaganja 13-hidroperoksid-a i dimerne proizvode.

Lipoksiogenaze će takođe katalisati kooksidacione reakcije. One se koriste za ispitivanje enzima i u komercijalne svrhe. Takav primer je i dodavanje brašna soje ili boba (oba poseduju visoku lipoksiogenazu aktivnost) pšeničnom brašnu radi beljenja pigmenata pri proizvodnji belog hleba. Enzimi različitih izvora se razlikuju po svojoj kooksidativnoj sposobnosti koja verovatno zavisi od dužine života slobodnoradikalnih međuproizvoda.

Hidroperoksidni proizvodi lipoksigenaznog delovanja nisu pronađeni u zdravim biljnim ćelijama pošto brzo bivaju uklonjeni enzimskim procesima koji štite membrane i proteine ćelije od oštećenja. Detaljan opis neki proizvodi koji imaju značajnu fiziološku ulogu su prikazani na slici 12-19. Takvi su isparljivi aldehidi koji daju miris nekim plodovima voća i povrća (npr. krastavcu). Proizvod vodonikperoksid-dehidraze, 12-oksofitodienoinska kiselina se metaboliše do biljnog hormona, jasmonske kiselina. Ustanovljeno je da jasmonska kiselina (i/ili njeni metil-estri) uzrokuje inhibiciju rasta, i druge efekte. Pored toga, izgleda da oštećenja aktivisu vodonik-peroksid liazni put da bi se dobila 12-okso-10(E) dodecenska kiselina za koju je otkriveno da poseduje sposobnost oštećivanja. Takođe je dokazano da pojedini proizvodi lipoksigenaznog puta poseduju antifungi-cidno dejstvo.

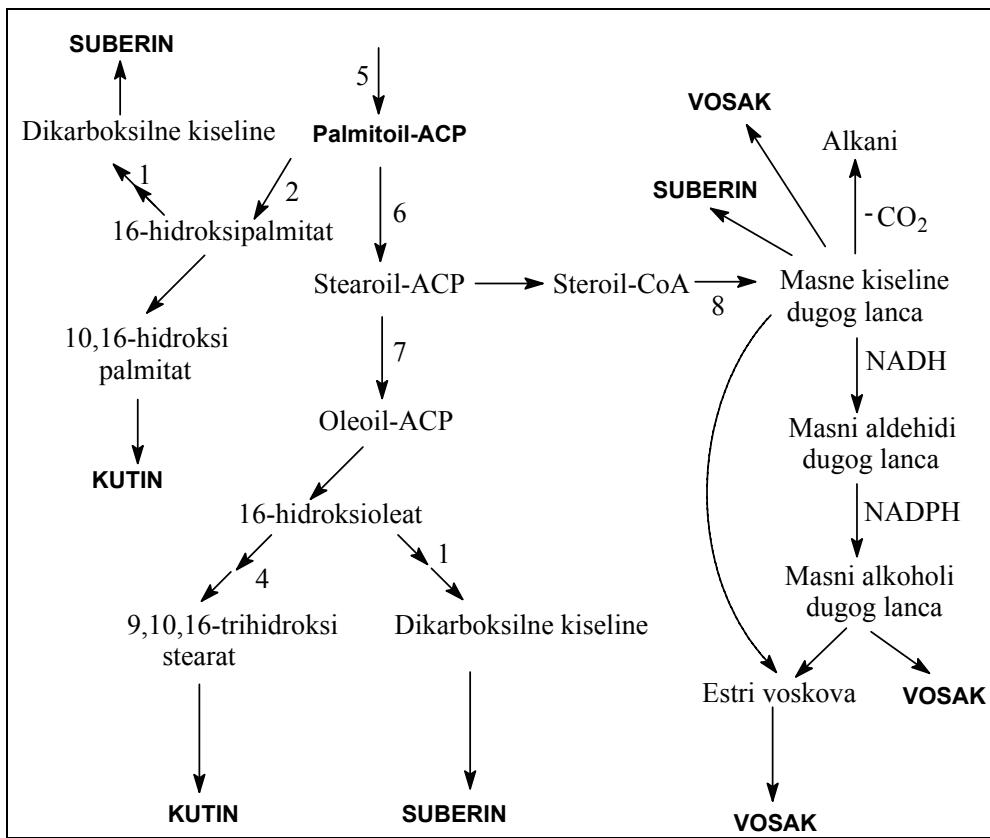


Slika 12-19.

Metabolizam polinezasičenih masnih kiselina daje biološki aktivne proizvode lipida.

## 12.5. Biosinteza voskova, kutina i suberina

Putevi formiranja glavnih monomera voskova, kutina i suberina kao osnovnih površinskih prekrivača tkiva biljaka su prikazani na slici 12-20. Sintezom masnih kiselina (sekcija 12.1.1.) se obezbeđuju palmitat i stearat, koji može biti desaturisan do oleata. Palmitat i oleat tada formiraju glavne prekursore i kutina i suberina. U svim slučajevima je  $\omega$ -hidroksilacija prvi korak sinteze. Nastali  $\omega$ -hidroksipalmitat ili  $\omega$ -hidroksioleat tada mogu biti prevedeni u dikarbonske kiselina potrebne za produkciju suberina ili ulančanih hidroksi kiselina neophodnih za sintezu kutina. Neki detalji sinteze su prikazani na slici 12-20.



Slika 12-20.

Hipotetička shema sinteze kutina, suberina i voskova. 1, dve dehidrogenacije preko intermedijera  $\omega$ -okso kiselina; 2,  $\omega$ -hidroksilacija; 3, hidroksilacija u lancu; 4, epoksidacija duple veze preko hidratacije; 5, sintetaza masnih kiselina; 6,  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaza; 7, stearoil-ACP  $\Delta 9$ -desaturaza; 8, elongacija masne kiseline.

Alifatična jedinjenja voskova se formiraju posle elongacije stearata (sekcija 12.1.3.). Masne kiseline veoma dugih lanaca se mogu redukovati preko aldehidnog međuproizvoda do masnih alkohola ili, alternativno, dekarboksilovati do alkana. Masni alkoholi i masne kiseline se mogu povezati i formirati jednostavne estre voska.

Formiranje polimernih struktura kutina i suberina zahteva transacilaciju između slobodnih hidroksilnih grupa kutina i nastale hidroksi masne kiseline ili između hidroksilnih grupa fenolnog jezgra suberina i nastalih dikarboksilnih kiselina. Malo se ipak zna o enzimima uključenim u ove procese i o njihovim karakteristikama.

## Izvod

♣ Lipidi koje sintetizuju biljke najvećim delom su uskladišteni kao neutralni i teško rastvorni triacilgliceroli. Kada je biljkama potrebna energija oni se mogu brzo mobilisati i razgraditi delovanjem specifičnih lipaza. Kako su u lipide svrstana jedinjenja različitog hemijskog sastava i osobina (masti, ulja, voskovi ...) to se njihova biosinteza i razgradnja (odn.metabolizam) mora pratiti za svaku grupu jedinjenja posebno.

♣ Najveći broj biljnih vrsta sintetizuju ulja, a veoma mali broj masti. Ulja biljke sintetizuju (u semenu a ređe u plodovima) iz glukoze, fruktoze i pentoza, nastalih fotosintezom u listovima. Biosinteza ulja je najintenzivnija u toku sazrevanja semena te u njemu ona postaju njegovi glavni sastojci (pored vode, proteina, neproteinskih azotnih materija i rastvornih šećera).

♣ Biosinteza masnih kiselina kod biljaka razlikuje se od biosinteze masnih kiselina kod drugih organizama po organizaciji enzima i mestu biosinteze. Osnovne građevne jedinice u biosintezi masnih kiselina su acetil-CoA, malonil-CoA i NAD(P)H. Biosinteza masnih kiselina teče u tri faze:

- *de novo* sinteza,
- desaturacija i
- elongacija.

♣ Sinteza triacilglicerola obuhvata procese akumulacije skladišnih (rezervnih) lipida i Kenedijev put sinteze triacilglicerola. Ovi procesi su obrađeni u sekcijama ovog poglavlja.

♣ Biogeneza membranskih lipida uključuje puteve sinteze glikozilglicerida (glavnih membanskih lipida hloroplasta), fosfoglicerida, kao i lipid transportnih proteina.

♣ Katabolizam lipida podrazumeva brzinu kojom se hemijski menjaju membranski lipidi, degradaciju skladišnih lipida kao i lipide biljaka koji imaju funkciju sekundarnih glasnika (mesendžera).

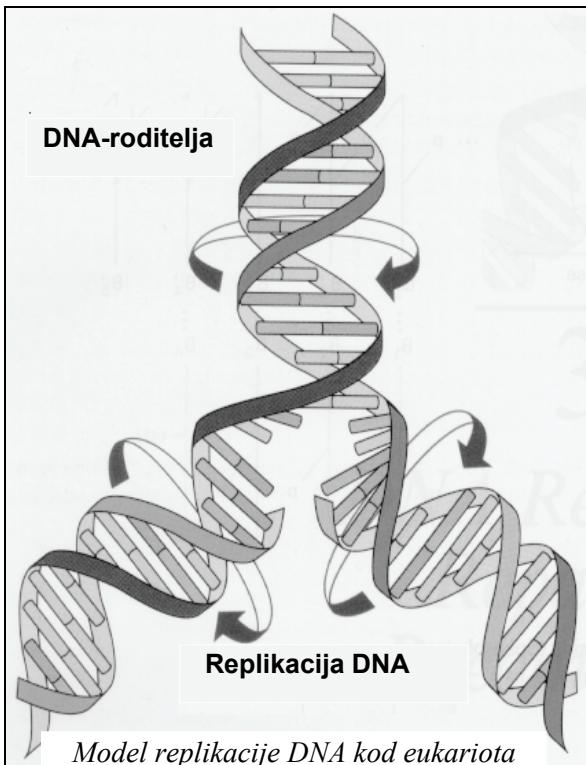
♣ Masne kiseline mogu podleći  $\alpha$ - $\beta$ - $\omega$ -oksidacijama, hidroksilaciji (oksidaciji) u lancu i lipoksigenaznom napadu.

♣ Lipoksigenaze su široko zastupljene u bilnjom svetu i često su jako aktivne. Ovi enzimi su posebno značajni u jestivim biljkama jer katališu polinezasičene masne kiseline i daju proizvode karakterističnog ukusa i aroma.

♣ U svim slučajevima je  $\omega$ -hidroksilacija prvi korak sinteze voskova, kutina i suberina.

# 13.

## Biosinteza nukleinskih kiselina



- 13.1. Tok genetičke informacije**
- 13.2. Replikacija DNA-Neka opšta razmatranja**
  - 13.2.1. Semikonzervativna replikacija
- 13.3. Replikacija DNA-polimeraze**
- 13.4. Replikacija DNA-Kombinovana aktivnost nekoliko enzima**
- 13.5. Replikacija DNA u eukariotima**
- 13.6. Biosinteza RNA: transkripcija genetičke poruke**
- 13.7. Modifikacija RNA posle transkripcije**

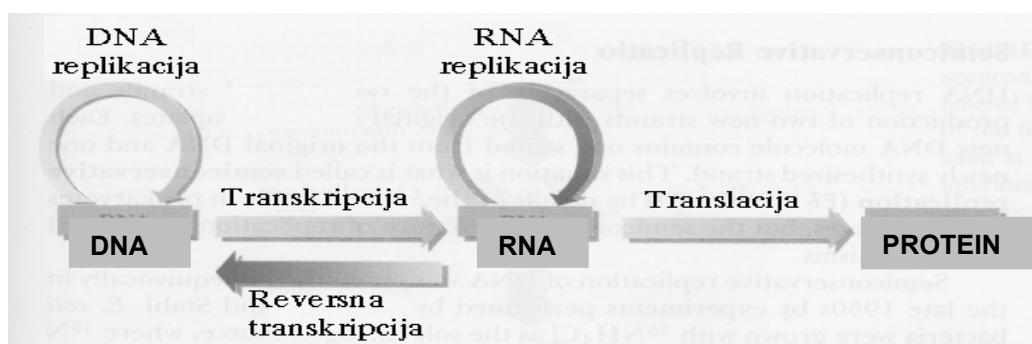
## 13.1. Tok genetičke informacije

Sekvenca baza unutar DNA sadrži **genetički kod**. Uvođenje (duplicacija) DNA, u kojoj nastaje nov molekul DNA sa istim sekvencama baza kao original, je neophodna svaki put kada se ćelija deli i stvara *kćerku-ćeliju*. Ovaj proces uvođenja naziva se **replikacija**. Za stvaranje gena neophodno je prisustvo RNA koja nastaje po šablonu DNA, što se naziva **transkripcija** genetičke poruke. Sekvenca baza DNA se odražava u sekvenci baza RNA.

U proces biosinteze proteina uključene su tri vrste RNA, među kojima je informaciona (eng. messenger) RNA (mRNA) naročito važna. Sekvenca od tri baze unutar mRNA specifično određuje identitet jedne aminokiseline, na način regulisan genetičkim kodom. Proses u kome sekvenca baza usmerava sekvencu aminokiseline naziva se **translacija** genetičke poruke. U gotovo svim organizmima tok genetičke informacije je dobro poznat i teče po modelu:

$$\text{DNA} \rightarrow \text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{Protein}$$

Jedini bitan izuzetak su virusi (nazvani retrovirusi) u kojima je RNA, pre nego DNA, genetički materijal. U ovim virusima RNA može upravljati sopstvenom sintezom kao i sintezom DNA. Slika 13-1. pokazuje puteve kojima se prenose genetičke informacije u ćeliji.



Slika 13-1.

Mehanizmi za prenos informacija u ćeliji. Svetle strelice predstavljaju osnovni tok informacije, dok tamne se odnose na neke specifične slučajeve (npr. RNA virusa)

Nukleinske kiseline su trenutno u fokusu nekih od najinteresantnijih istraživanja u molekularnoj biologiji. Istraživanja na ovom polju napreduju tako brzo da neka otkrića zastarevaju kroz nekoliko meseci od datuma objavljivanja u naučnoj literaturi.

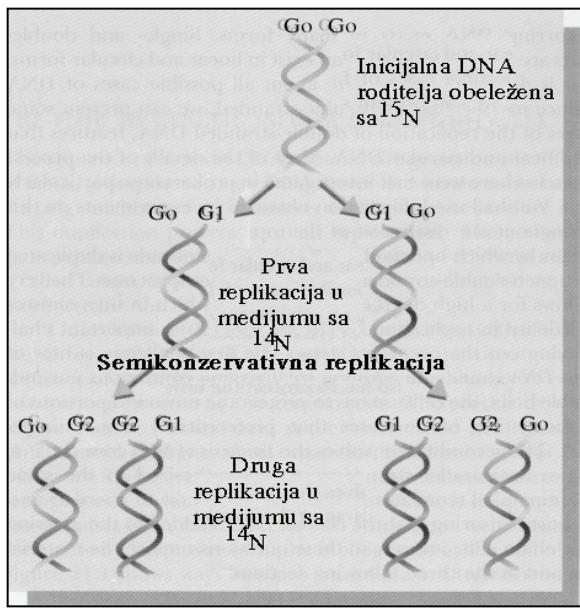
## 13.2. Replikacija DNA - Neka opšta razmatranja

DNA u prirodnom stanju postoji u mnogo oblika (formi). Poznate su jednostruka i dvostruka DNA, i obe mogu egzistirati u linearном i cirkularnom (kružnom) obliku. Zbog navedenog, teško je uopšteno govoriti o svim mogućim slučajevima replikacije DNA. U ovom slučaju, biće opisan proces replikacije dvostrukе DNA iz prokariotskog organizma *Escherichia coli*, kao model sistema, kod koga je ovaj proces prvo istraživan. Opšta svojstva replikacije iz navedenog primera važe i za linearnu i za cirkularnu DNA.

Proces udvostručavanja, tj. nastajanja dva molekula dvostrukе DNA iz jednog molekula duplog heliksa DNA, je veoma kompleksan. Ova kompleksnost omogućuje visok stepen "fine" regulacije (podešavanja), što zauzvrat osigurava značajnu vernost u replikaciji. Pred ćelijom stoje tri važna izazova u sprovođenju neophodnih koraka. *Prvi je*, kako razdvojiti dva lanca DNA. Pored postizanja kontinuiranog odmotavanja dvostrukog heliksa, ćelija takođe mora da zaštitи odmotane delove DNA od dejstva nukleaza koje prioritetno "napadaju" jednostruku DNA. *Drugi zadatak* uključuje sintezu DNA od 5' do 3' kraja. Dva antiparalelna lanca moraju biti sintetizovana u istom smeru na antiparalelnim šablonima. *Treći zadatak* je kako se zaštитiti od grešaka u replikaciji i osigurati dodavanje pravilne (tačne) baze na rastući polinukleotidni lanac. Od više predloženih modela replikacije DNA lanca kod eukariota - (*konzervativni model* - jedna ćelija kćerka je originalna kopija roditelja, a druga dobija novu strukturu; *nekonzervativni model* - DNA se razlaže i grade se novi molekuli kćerke; *model kraj za kraj* - originalni molekul DNA je prisutan kao polovina komplementarnih lanaca oba nascentna molekula; *disperzni model* - originalni molekul DNA se disperguje ili distribuira u sve nascentne lance; i *semikonzervativni model* - originalni molekul DNA se cepe u dva lanca od kojih svaki služi kao šablon za sintezu novih lanaca) najverovatniji je tzv. semikonzervativni model.

### 13.2.1. Semikonzervativna replikacija

Replikacija DNA obuhvata razdvajanje dva originalna lanca i nastajanje dva nova lanca po šablonu originalnih. Svaki novi molekul DNA sadrži jedan lanac originalne DNA i jedan novosintetizovani lanac. Ovaj model je nazvan **semikonzervativna replikacija** (slika 13-2). Detalji ovog procesa se razlikuju u prokariotima i eukariotima, ali semikonzervativna priroda replikacije je uočena u svim organizmima.

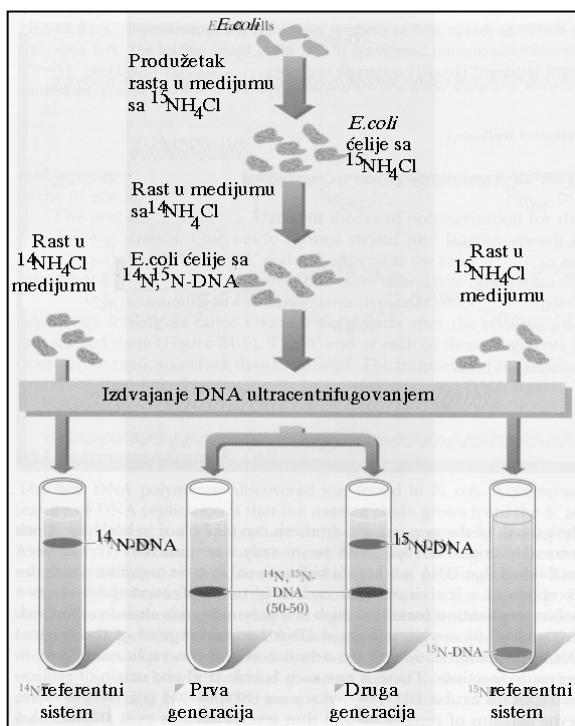


Slika 13-2.

Replikacija DNA po semikonzervativnom modelu. ( $G_0$  je originalni lanac,  $G_1$  je lanac posle prve generacije;  $G_2$  je novi lanac posle druge generacije).

teški izotop azota (uobičajeni oblik azota je  $^{14}\text{N}$ ). U takvom medijumu, sva novonastala azotna jedinjenja, uključujući purinske i pirimidinske nukleobaze, su obeležena sa  $^{15}\text{N}$ .

$^{15}\text{N}$ -obeležena DNA ima veću gustinu nego neobeležena DNA koja sadrži uobičajeni izotop,  $^{14}\text{N}$ . U ovom eksperimentu,  $^{15}\text{N}$ -obeležene ćelije su zatim prenesene u medijum koji je sadržao samo  $^{14}\text{N}$ , gde su nastavile rastenje. Sa svakom novom generacijom porasta, uzorak DNA je bio ekstrahovan i analiziran pomoću tehnike **centrifugovanja** (na osnovu gradijenta gustina) (slika 13-3).



Slika 13-3.

Eksperimentalni dokaz semikonzervativne replikacije na modelu *E.coli*.

Ova tehnika se bazira na činjenici da teška  $^{15}\text{N}$ -DNA (DNA koja sadrži samo  $^{15}\text{N}$ ) formira traku na dnu epruvete, dok se laka,  $^{14}\text{N}$ -DNA pojavljuje na vrhu epruvete. DNA koja sadrži 50-50 smešu  $^{14}\text{N}$  i  $^{15}\text{N}$ -DNA zauzimala je položaj na sredini između dve trake. Ovaj 50-50 DNA hibrid je uočen nakon jedne generacije kao rezultat očekivan pri semikonzervativnoj replikaciji. Nakon dve generacije u lakšem medijumu, pola DNA u ćelijama bi trebalo biti 50-50 hibrid, a pola lakši,  $^{14}\text{N}$ -DNA hibrid. Ova očekivanja u vrsti i količini dobijene DNA su potvrđena eksperimentalno.

### 13.3. Replikacija DNA-polimeraze

#### Jednostruki lanac DNA se sintetizuje diskontinualno

Prilikom DNA replikacije, glavni problem za ćeliju je kako postići  $5' \rightarrow 3'$  polimerizaciju u suprotnom smeru od lanca šablonu (tzv. templatnog lanca), koji je i sam otvoren u smeru  $5' \rightarrow 3'$  (sa drugim lancem ovaj problem ne postoji, jer je on u procesu odmotavanja eksponiran od  $3'$  do  $5'$  kraja).



(Okazaki fragmenti) se sintetizuju diskontinualno takođe u  $5' \rightarrow 3'$  pravcu.

Problem je rešen uz pomoć različitih načina polimerizacije za dva nastajuća lanca. Novoformirani lanac (vodeći lanac) nastaje kontinuirano od svog  $5'$  kraja do svog  $3'$  kraja na replikacionoj viljušci na otkrivenom  $3'$  do  $5'$  lancu šablonu. Drugi lanac (zaostajući lanac) formira se diskontinuirano u malim fragmentima (obično dužine 1000-2000 nukleotida) koji se nazivaju i *Okazaki* fragmenti, po naučniku koji ih je prvi proučavao (slika 13-4).  $5'$  kraj svakog od ovih fragmenata bliži je replikacionoj viljušci nego  $3'$  kraj. Fragmenti zaostajućeg lanca se enzimski povezuju tada uz pomoć enzima DNA-ligaze.

Slika 13-4.

Diskontinualna i kontinualna sinteza DNA lanca u replikacionoj viljušci. Vodeći lanac DNA se sintetizuje kontinualno u  $5' \rightarrow 3'$  pravcu. Zaostajući lanac, kratki fragmenti

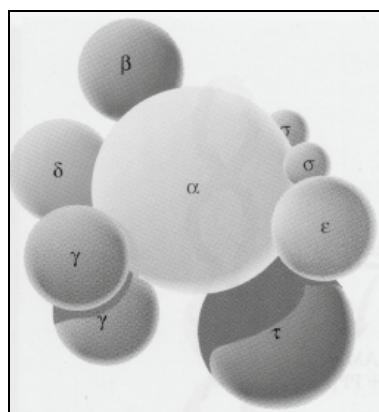
## DNA-polimeraza iz *E.Coli*

Prva otkrivena DNA-polimeraza bila je iz *E. coli*. Univerzalno svojstvo DNA replikacije je to što lanac koji se rađa raste od 5' ka 3' kraju. Na jednom kraju šećerne komponente DNA nalazi se 5'-fosfat dok se na drugom kraju nalazi 3'-hidroksilna grupa. DNA polimeraza katalizuje sukcesivno dodavanje svakog novog nukleotida na narastajući lanac. 3'-hidroksilna grupa na kraju narastajućeg lanca je nukleofilna i vezuje se za fosfor koji je susedan sa šećerom u nukleotidu koji se dodaje na narastajući lanac. Ovo dovodi do eliminacije pirofosfata i nastanka nove fosfodiesterске veze. U *E. coli* postoje tri DNA-polimeraze. Neka od njihovih svojstava data su u tabeli 13-1.

Tabela 13-1. Neke osobine DNA-polimeraza iz *E.Coli*.

	P o l i m e r a z e I	II	III
<b>Funkcije:</b>			
Polimerizacija: 5' → 3'	+	+	+
Egzonukleaza: 3' → 5'	+	+	+
Egzonukleaze: 5' → 3'	+	+	+
Molekulska masa	109.000	120.000	140.000
Molekule/ćelija	400		10-20
Broj nukleotida polimerizovanih/min na 37°	600	30	9.000

DNA-polimeraza I (Pol I) je otkrivena prva, čemu je sledilo otkriće polimeraze II (Pol II) i III (Pol III). Polimeraze I i II se sastoje od prostog polipeptidnog lanca, ali polimeraza III je protein sastavljen iz više subjedinica (slika 13-5).



Slika 13-5.

Subjedinice u strukturi DNA-polimeraze III.  $\alpha$ -subjedinica je sama polimeraza (protein sa Mr 140.000). Ceo kompleks nazvan DNA-polimeraza holoenzim ima molekulsku masu 550.000.  $\beta$ -subjedinica zahteva prepoznavanje matične DNA i ima Mr 400.000.

Svi ovi enzimi vezuju nukleotide za narastajući polinukleotidni lanac, ali imaju različite uloge u sveukupnom procesu replikacije. Sva tri enzima zahtevaju prisustvo "upaljača" "prajmera" (eng. primer), kratkog

lanca RNA za koji se kovalentno vezuje narastajući polinukleotidni lanac u početnim fazama replikacije. Rakcija DNA-polimeraza (DNA-aza) zahteva prisustvo sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dTTP, dATP, dGTP i dCTP) (slika 13-6). Mg<sup>2+</sup> i DNA su takodje neophodni. Četiri ribonukleozid-trifosfata - ATP, UTP, GTP i CTP - su takođe potrebni, i oni se ugrađuju u prajmer. Prajmer (RNA) je vezan vodoničnim vezama za šablon (DNA) i obezbeđuje čvrst kostur na kome počinje da raste lanac u nastajanju. Novosintetizovani lanac DNA počinje da raste formirajući kovalentnu vezu sa slobodnom 3'-hidroksilnom grupom prajmera.



Slika 13-6.

Zahtevi za reakciju DNA-polimeraze (templatna DNA, Mg, RNA prajmer, ribonukleozid-trifosfati za nastajanje RNA-prajmera

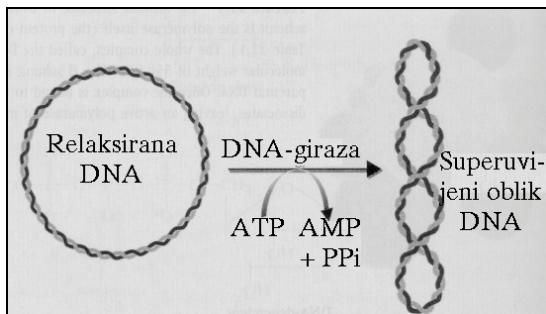
Danas se zna da DNA-polimeraza I ima specijalizovanu funkciju u replikaciji, i to u popravci i "krpljenju" DNA, dok DNA-polimeraza III predstavlja enzim koji je prvenstveno odgovoran za polimerizaciju novoformiranog lanca DNA. Glavna uloga DNA-polimeraze II nije poznata. Egzonukleazna aktivnost navedena u tabeli 13-1 je deo funkcije DNA-polimeraze koja se ogleda u korekciji i popravci, tj. u procesu u kome se neodgovarajući nukleotidi uklanjaju iz polinukleotida tako da ispravni nukleotidi mogu biti ugrađeni. Aktivnost 3' → 5' egzonukleaze, koju poseduju sve tri polimeraze, je deo korektorske funkcije; neodgovarajući nukleotidi se uklanjaju iz procesa replikacije i zamjenjuju odgovarajućim. Korekcija se obavlja za svaki nukleotid pojedinačno. Aktivnost 5' → 3' egzonukleaze se ogleda u uklanjanju kratkih neprekinutih nukleotida tokom popravke i to obično uključuje nekoliko nukleotida istovremeno.

### 13.4. Replikacija DNA-kombinovana aktivnost nekoliko enzima

#### Odmotavanje dvostrukog heliksa DNA - prokariota

Dva su problema prisutna u procesu razdvajanja dva lanca originalne DNA tako da ona može biti replikovana. *Prvi* je, kako postići kontinuirano odmotavanje dvostrukog heliksa, što je veoma značajno ako se zna da DNA prokariota egzistira u jako namotanom i zatvoreno-cirkularnom obliku. *Drugi* problem je, kako zaštititi jednostruke delove DNA nastale u procesu odmotavanja, od unutarćelijskih nukleaza.

Enzim koji se zove *DNA-giraza* katalizuje konverziju opuštene (relaksirane), cirkularne DNA sa urezom na jednom lancu, u jako namotani (super uvjeni) oblik sa zatvorenim (zapečaćenim) urezom (slika 13-7).

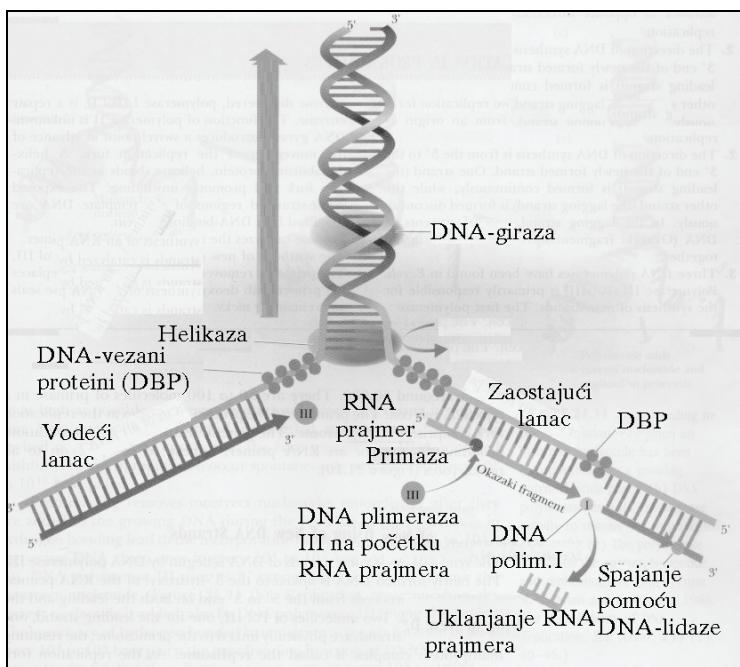


Slika 13-7.

Uloga DNA-giraze u konverziji cirkularne (relaksirane) DNA u superuvjenu strukturu DNA.

Odmotavanje heliksa u maloj meri pre nego što se urez zatvori, dovodi do jakog namotavanja. Energija potrebna za ovaj proces se obezbeđuje iz hidrolize ATP. Postoje dokazi da *DNA-giraza* prouzrokuje prekidanje dvostrukog lanca DNA u procesu konvertovanja opuštene, cirkularne DNA u jako namotani oblik (što je način akcije tipičan za topoizomeraze tipa II, klase enzima u koju DNA-giraza spada). Uloga ovog enzima u procesu replikacije je nešto drugačija.

Nastaje urez u jako namotanoj DNA; u reakciji suprotnoj od one u kojoj dolazi do jakog namotavanja, dolazi do stvaranja tačke obrtanja u DNA, na mestu ureza. *Giraza* otvara i ponovno "pečatira" tačku obrtanja ispred replikacione viljuške (slika 13-8)



Slika 13-8.  
Stepeni DNA

replikacije. Tačan položaj "stožernog" mesta za odmotavanje roditeljske DNA i mesta delovanja DNA-giraze, naravno nije poznat.

Protein koji destabilizuje heliks, nazvan *helikaza*, izaziva odmotavanje prilikom vezivanja za replikacionu viljušku. Ovaj protein je takođe nazvan i *rep-protein* (skladišni protein; eng. rep). Jedan drugi protein nazvan SSB protein stabilizuje jednostruke regije DNA vezujući se čvrsto za ove delove molekula. Prisustvo DNA-vezujućih proteina štiti jednostruke regije od hidrolize.

### **Reakcija primaze**

Jedno od velikih iznenadenja u ranim studijama replikacije DNA bilo je otkriće da RNA služi kao upaljač “*prajmer*” u replikaciji DNA. Gledano unazad, ovo uopšte nije iznenadujuće, s obzirom da se RNA može formirati *de novo* bez prajmera, dok sinteza DNA zahteva prajmer. Ovo otkriće podupire teoriju o poreklu života, po kojoj je RNA, pre nego DNA, bila originalni genetički materijal. Prajmer u replikaciji DNA bi trebao imati slobodni 3'-hidroksil za koji se može vezati narastajući lanac, i RNA i DNA mogu obezbediti ovu grupu. Aktivnost RNA kao prajmera je prvo uočena *in vivo*. U nekim originalnim *in vitro* eksperimentima, DNA je korišćena kao prajmer s obzirom da se očekivao prajmer sačinjen od DNA. Živi organizmi su, svakako, mnogo kompleksniji sistemi nego izolovani molekuli te mogu biti puni iznenadenja za istraživače. Sledeće otkriće je bilo da pojedinačni enzim, nazvan *primaza*, je odgovoran za kopiranje kratkog dela lanca DNA šablona i stvara sekvence RNA prajmera. Prva primaza je otkrivena u *E. coli*; enzim se sastoji od jednostavnog polipeptidnog lanca, molekulske mase oko 60.000. U tipičnoj ćeliji *E. coli* ima 50 do 100 molekula primaze. Prajmer i proteinski molekuli na replikacionoj viljušci sačinjavaju primozu. Opšta svojstva replikacije DNA, uključujući primenu RNA prajmera, su zajednička za sve prokariote (slika 13-8)

### **Sinteza i vezivanje novog DNA lanca**

Sinteza dva nova lanca DNA započinje aktivnošću DNA-polimeraze III. Novoformirana DNA se vezuje za 3'-hidroksil RNA prajmera, i sinteza teče od 5' ka 3' kraju i na vodećem i na zaostajućem lancu. Dva molekula Pol III vezana su fizički sa primazom, jedan za vodeći a jedan za zaostajući lanac. Dobijeni multiproteinski kompleks naziva se *replizom*. Kako se replikaciona viljuška pomera, RNA prajmer se uklanja od strane polimeraze I, na račun egzonukleazne aktivnosti. RNA-prajmer se zamenjuje deoksinukleotidima, zahvaljujući polimeraznoj aktivnosti DNA polimeraze I. Nijedna od DNA polimeraza ne može zatvoriti urez koji ostaje. *DNA-ligaza* je enzim odgovoran za krajnje vezivanje novog lanca.

## 13.5. Replikacija DNA kod eukariota

Tri različite DNA-polimeraze su izolovane iz životinjskih sistema. Upotreboom životinja, umesto biljaka, u proučavanju se izbegavaju komplikacije u sintezi DNA u hloroplastima. Ove polimeraze se nazivaju  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ .  $\alpha$  i  $\beta$  enzimi su locirani u jedru a  $\gamma$  oblik u mitohondrijama. DNA- polimeraza  $\alpha$  igra ulogu sličnu onoj DNA-polimeraze III kod prokariota, u smislu da je  $\alpha$  enzim prvenstveno odgovoran za polimerizaciju DNA. DNA- polimeraza  $\beta$  je najverovatnije enzim za popravku (eng. *repair enzyme*). DNA-polimeraza  $\gamma$  katalizuje replikaciju DNA u mitohondrijama. Nijedna od DNA-polimeraza izolovanih iz životinja, nema egzonukleaznu funkciju i po tome se razlikuju životinjski enzimi od prokariotskih DNA-polimeraza, mada postoje posebni egzonukleolitički enzimi u životinjskim ćelijama.

Opšta svojstva replikacije DNA u eukariotima su slična onim u prokariotima ali nisu tako široko proučavana. Mnogi izvori (porekla), replikacije su otkriveni u eukariotima, umesto jednog kod prokariota, ali su koraci u replikacionom procesu u osnovi isti. Kao i kod prokariota, replikacija DNA kod eukariota je *semikonzervativna*. Prisutan je vodeći lanac sa kontinuiranom sintezom u pravcu  $5' \rightarrow 3'$  i zaostajući lanac sa diskontinuiranom sintezom u  $5' \rightarrow 3'$  pravcu. RNA prajmer se u replikaciji u eukariotima formira uz pomoć specifičnih enzima, kao i u slučaju prokariota. Nastanak Okazaki fragmenata (uobičajeno dugih kod eukariota 150-200 nukleotida) je katalizovan DNA-polimerazom  $\alpha$ . RNA prajmer se hidrolizuje i “rupe” koje ostaju nakon uklanjanja prajmera se popunjavaju u reakciji takodje katalizovanoj DNA-polimerazom  $\alpha$ . Na kraju, DNA ligaza popunjava ureze koji odvajaju fragmente.

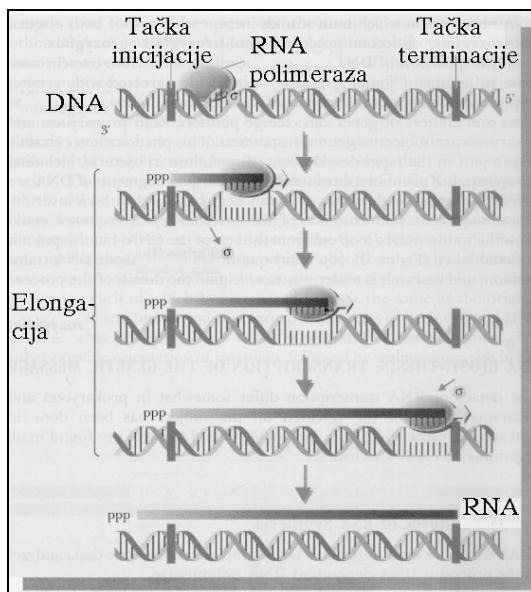
Važna razlika izmedju replikacije DNA u prokariotima i eukariotima je ta što prokariotska DNA egzistira samostalno (nije kompleksirana za proteine) dok eukariotska DNA je kompleksirana proteinima, uglavnom histonima. Do biosinteze histona dolazi istovremeno i u istom obimu kad i DNA biosinteza, i oni se vezuju za DNA čim se stvore.

## 13.6. Biosinteza RNA: Transkripcija genetičke poruke

Transkripcija RNA se razlikuje u detaljima kod prokariota i eukariota. Najviše je istraživana *E. coli* (prokariot), ali neka opšta svojstva važe za sve organizme izuzev za RNA iz virusa.

### Opšta svojstva sinteze RNA:

1. Sve RNA se sintetizuju po šablonu DNA; enzim koji katalizuje proces je DNA-zavisna RNA-polimeraza.
2. Neophodna su sva četiri ribonukleozid-trifosfata (ATP, GTP, CTP i UTP), kao i  $Mg^{2+}$ .
3. U sintezi RNA prajmer nije potreban, ali šablon DNA je neophodan.
4. Kao u slučaju biosinteze DNA, lanac RNA raste od 5' ka 3' kraju (slika 13-9). Nukleotid na 5' kraju lanca zadržava svoju trifosfatnu grupu (skraćeno ppp).
5. Enzim koristi jedan lanac DNA kao šablon za sintezu RNA. Sekvenca baza DNA sadrži signale za započinjanje i okončanje sinteze RNA. Enzim se vezuje za ovaj lanac i kreće se po njemu u pravcu  $3' \rightarrow 5'$ .
6. Šablon ostaje nepromjenjen (slika 13-9).



Slika 13-9.

Transkripcija RNA sa templatne DNA. Transkripcija započinje kada se RNA-polimeraza, holoen-zim ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) veže na DNA.  $\sigma$  subjedinica je odgovorna za vezivanje i disosuje od kompleksa nakon faze inicijacije. Sinteza RNA lanca ide u pravcu  $5' \rightarrow 3'$ .

#### RNA polimeraza iz *E. Coli*

Najviše istraživana RNA-polimeraza je ona izolovana iz *E. coli*. Molekulska masa ovog enzima je oko 500.000, i u strukturi ima više subjedinica.

Identifikovano je četiri različitih subjedinica označenih kao  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  i  $\sigma$ . Stvarni sastav enzima je  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ .  $\sigma$  subjedinica je prilično labavo vezana za ostatak enzima ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) koji se naziva jezgro enzima. Holoenzim se sastoji od svih subjedinica, uključujući i  $\sigma$  subjedinicu. Osnovna uloga ove subjedinice je u prepoznavanju lokusa promotera (sekvence DNA koja signalizira start u RNA transkripciji). Kada transkripcija započne,  $\sigma$  subjedinica se oslobođa.

Promoterski region, za koji se RNA-polimeraza vezuje, je bliži 3' kraju DNA nego što je to dотični gen za biosintezu RNA. (RNA se formira od 5' ka 3' kraju, tako da se polimeraza kreće po DNA od 3' ka 5' kraju). Za mesto vezivanja polimeraze se kaže da leži uzvodno od starta transkripcije. Sekvenca baza promoterskih regiona je određena za veliki broj prokariotskih gena, i glavna karakteristika je da oni sadrže mnoge zajedničke sekvene (konsenzus sekvene). Promoterski regioni su A-T-bogati, sa dve vodonične veze po paru baza, i zbog toga se lakše odmotavaju od G-C-bogatih regiona sa tri vodonične veze po paru baza. Kod prokariota konsenzus regioni često dolaze sa 35 baznih parova (bp) i 10 parova baza uzvodno od starta transkripcije. Ova dva regiona se nazivaju -35 i -10 region (Pribnow region). Konsenzus sekvenca za promoter prokariota je:



U eukariotima, slična sekvenca nazvana "TATA" region nalazi se oko 25 parova baza uzvodno od mesta starta transkripcije. U završetak procesa transkripcije RNA uključene su takođe i specifične sekvene nizvodno od određenog gena na osnovu kojeg se RNA transkribuje. Proces terminacije ovog procesa u prokariotima zavisi od proteina označenog sa  $\rho$ . Ovaj  $\rho$  protein, tetramer molekulske mase od oko 200.000, vezuje se za DNA, RNA i RNA-polimerazu.  $\rho$  faktor izaziva reakciju oslobođanja kompletirane RNA iz DNA-RNA-polimeraza kompleksa (slika 13-9). U eukariotskim sistemima ovaj protein nije otkriven.

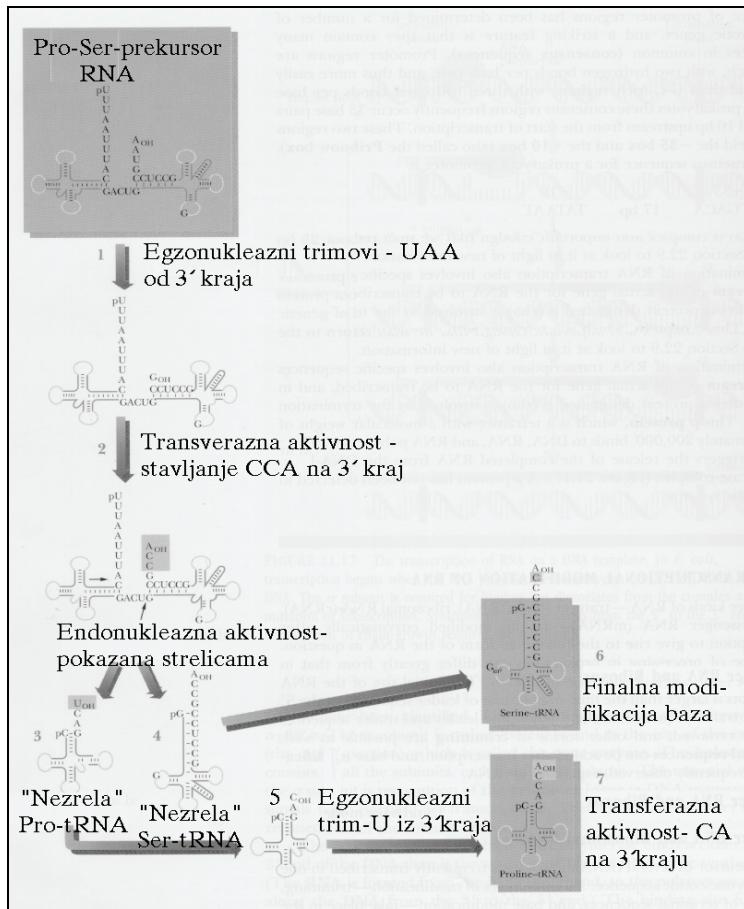
## 13.7. Modifikacija RNA posle transkripcije

Sve tri vrste RNA - *transportna* RNA (tRNA), *ribozomalna* RNA (rRNA) i *informaciona* RNA (mRNA) - se enzimski modifikuju posle transkripcije dajući pri tome odgovarajuć oblik. Tip ovog procesa u eukariotima može biti značajno različit od onog u eukariotima, naročito u slučaju mRNA. Početna veličina prepisa RNA je veća od krajnje zbog vodećih sekvenci na 5' kraju i zaostalih sekvenci na 3' kraju. Vodeće i zaostajuće sekvene se moraju ukloniti, a mogući su i drugi

oblici skrivanja. Terminalne sekvene mogu biti dodate posle transkripcije, a česta je modifikacija baza, posebno kod tRNA.

## Transportna RNA i ribozomalna RNA

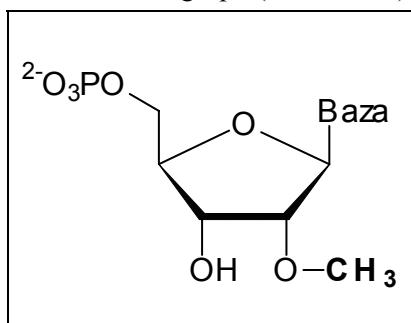
Prekursor za mnoge molekule tRNA je često transkribovan u jednoj polinukleotidnoj sekvenci. Sva tri tipa modifikacije - skraćivanje, dodavanje terminalnih sekveni i modifikacija baza - odvijaju se kroz transformaciju od početnog transkripta do "zrelih" tRNA (slika 13-10).



Slika 13-10.

Posttranslacione modifikacije tRNA prekursora. Vodonične veze između baznih parova se simbolizuju crticama. Oznake  $\text{G}_{\text{OH}}$ ,  $\text{C}_{\text{OH}}$ ,  $\text{A}_{\text{OH}}$  i  $\text{U}_{\text{OH}}$  predstavljaju slobodan 3' kraj bez fosfatne grupe;  $\text{G}_m^2$  je metilovani guanin (iz Campbell; str 592, sl.21.18).

Neke modifikacije baza se odvijaju pre skraćivanja a neke posle toga. Metilacija i supstitucija sumpora kiseonikom su dva uobičajena tipa modifikacija baza. Jedan tip metilovanih nukleotida, nađen samo u eukariotima, sadrži 2'-O-metilribozilnu grupu (slika 13-11).



Slika 13-11.  
Struktura nukleotida koji sadrži 2'-O-metilribozil-grupu.

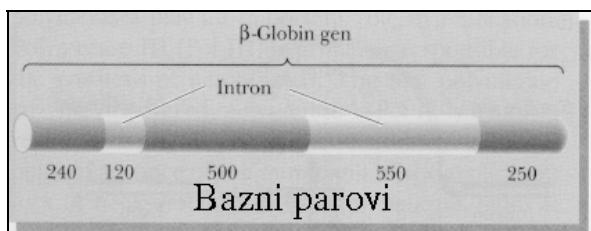
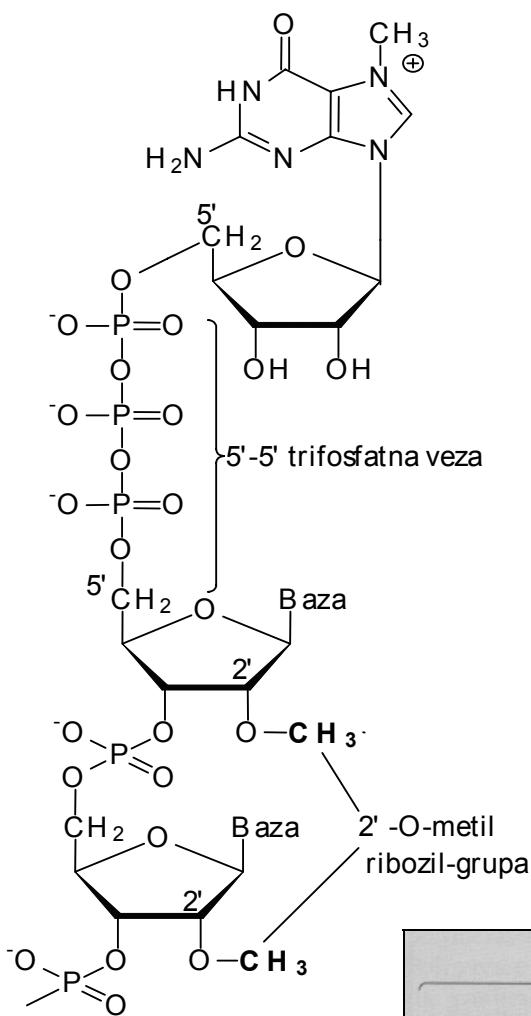
Skraćivanjem i dodavanjem terminalnih nukleotida nastaju tRNA odgovarajuće veličine i sekvene baza. Sve tRNA sadrže CCA sekvensu na 3' kraju.

Prisustvo ovog dela molekula je od velikog značaja u sintezi proteina s obzirom da je 3' kraj akceptor aminokiselina koje se nadovezuju na rastući proteinski lanac. Skraćivanje dugačkih prekursora eukariotskih tRNA odvija se u jedru dok se najveći broj enzima metilacije nalazi u citosolu.

Procesi obrade rRNA su prvenstveno stvar metilacije i skraćivanja na odgovarajuću dužinu. Ribozomi eukariota imaju sedimentacioni koeficijent 80 S, sa subjedinicama 40 S i 60 S. 40 S subjedinica sadrži 18 S RNA, dok 60 S subjedinica sadrži 5 S, 5.8 S i 28 S RNA. Modifikacije baza, kako u prokariotskim tako i u eukariotskim rRNA, uglavnom se ostvaruju putem metilacije.

## Informaciona RNA

U eukariotskim mRNA odvijaju se obimne promene. One obuhvataju "pokrivanje" 5' kraja, poliadenilaciju (dodavanje poli A sekvene) 3' kraja, i upletanje kodirajućih sekvenci. Ovakvi procesi nisu karakteristični za sintezu prokariotske mRNA. "Kapa" na 5' kraju eukariotskih mRNA je ostatak gvanilata (guanilata) koji je metilovan u N-7 položaju. Ovaj modifikovani ostatak gvanilata je vezan za susedne ostatke  $5' \rightarrow 5'$  trifosfatnom vezom (slika 13-12). 2'-hidroksilna grupa ribozilnog dela susednog ostatka je često metilovana, a ponekad i ona kod sledećeg najbližeg suseda. Poliadenilatni "rep" na 3' kraju mesendžera (obično 100-200 nukleotida dug) se dodaje pre nego mRNA napusti nukleus. Smatra se da prisustvo ovog repa služi da zaštitи mRNA od nukleaza i fosfataza koje bi je degradirale. Sa ove tačke gledišta, adenilatni ostatak bi bio otcepljen pre nego deo molekula koji nosi informaciju.



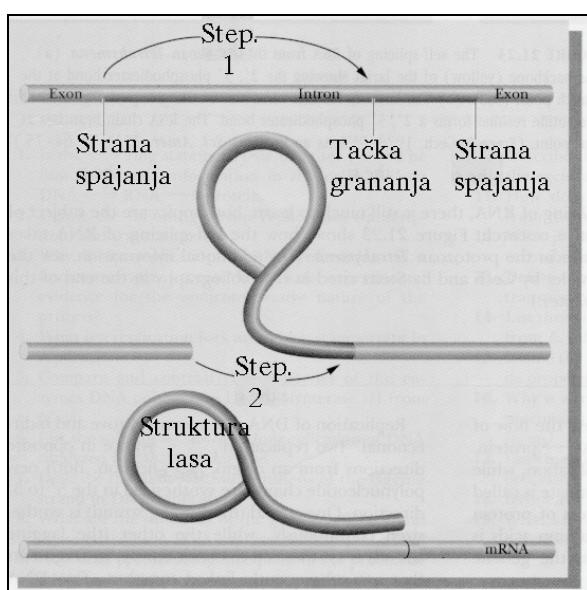
Slika 13.13. Izmešane sekvene (introni) u  $\beta$ -globin-genu.

U eukariotima cela DNA sekvenca, (i introni i egzoni), neophodna je za produkciju prekursora zrele mRNA. U procesu oblikovanja mRNA, nekodirajuće sekvene - *introni*, moraju biti isečeni, a kodirajuće sekvene - *egzoni*, moraju se spojiti. Ovaj proces se odvija narednim akcijama odgovarajućih nukleaza i ligaza. Broj i veličina introna razlikuju se u različitim genima.

Slika 13-12.  
Struktura tipične mRNA "kape".

Geni prokariota su kontinuirani; svaki par baza u kontinuiranom prokariotskom genu se ogleda u sekvenci baza mRNA. Geni eukariota nisu obavezno kontinuirani; oni često sadrže ubaćene sekvene koje se ne pojavljuju u finalnoj sekvenci baza mRNA za taj genski proizvod. Sekvene DNA u ekspresiji (one koje su sadržane u krajnjem proizvodu – polimer RNA) nazivaju se **egzoni**. Ubaćene sekvene, do čije ekspresije nije došlo, nazivaju se **introni**.  $\beta$ -globin-gen iz miša koji kodira  $\beta$ -lanac hemoglobina je poznat primer. Ovaj gen je podeljen u tri dela, sa dve ubaćene nekodirajuće sekvene (slika 13-13).

Uklanjanje ubačenih sekvenci (intraona) odvija se u jedru gde mali ribonukleoproteini jedra (snRNP) upravljaju procesom. Kako samo ime kaže, snRNP sadrže i RNA i proteine, kao što su nukleaze i ligaze. Danas je opšte poznato da neke RNA mogu katalizovati sopstveno spajanje. Proces koji uključuje ribonukleoproteine je možda mogao nastati iz samospajanja RNA. Važna sličnost između ova dva procesa je da se oba odvijaju po mehanizmu "lasa", pomoću kojeg se delovi spajaju (slika 13-14).



Slika 13-14.

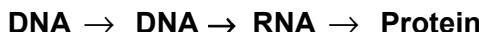
Formiranje strukture "lasa" kao intermedijera u spajanju (uvrta-nju) mRNA lanca.

U prvom stepenu procesa spajanja, jedna od strana spajanja se seče i potom atakuje na drugu najbližu stranu spajanja, formirajući strukturu lasa. U toku spajanja, mRNA je vezana na male nuklearne ribonukleoproteine (snRNPs)(nisu pokazani na slici) koji drže strane mRNA u poziciji za spajanje. U drugom stepenu, intron lasa se eksčituje, i egzoni mRNA se tada spajaju zajedno. Mehanizam lasa slično je involvirani u samo-spajanje RNA. U oba slučaja, kod spajanja mRNA pomoću snRNP i kod samospajanja, ima još mnogo toga da se izučava i obe teme su predmet aktivnog istraživanja.

## Izvod

♣ Sekvenca baza unutar DNA sadrži **genetički kod**. Udvostručavanje DNA, u kojoj nastaje nov molekul DNA sa istim sekvencama baza kao original, je neophodna svaki put kada se ćelija deli i stvara *kćerku-ćeliju*. Ovaj proces udvostručavanja naziva se **replikacija**. Za stvaranje gena neophodno je prisustvo RNA koja nastaje po šablonu DNA, što se naziva **transkripcija** genetičke poruke. Sekvenca baza DNA se odražava u sekvenci baza RNA.

♣ U proces biosinteze proteina uključene su tri vrste RNA, među kojima je informaciona (messenger) RNA (iRNA; mRNA) naročito važna. Sekvenca od tri baze unutar mRNA specifično određuje identitet jedne aminokiseline, na način regulisan genetičkim kodom. Proces u kome sekvenca baza iRNA usmerava sekvencu aminokiselina u molekulu proteina naziva se **translacija** genetičke poruke. U gotovo svim organizmima tok genetičke informacije je dobro poznat i teče po modelu:



♣ Replikacija DNA obuhvata razdvajanje dva originalna lanca i nastajanje dva nova lanca po šablonu originalnih. Svaki novi molekul DNA sadrži jedan lanac originalne DNA i jedan novosintetizovani lanac. Ovaj model je nazvan **semikonzervativna replikacija**.

♣ Diskontinualna i kontinualna sinteza DNA lanca u replikacionoj viljušći. Vodeći lanac DNA se sintetizuje kontinualno u  $5' \rightarrow 3'$  pravcu. Zaostajući lanac, kratki fragmenti (Okazaki fragmenti) se sintetizuju diskontinualno takođe u  $5' \rightarrow 3'$  pravcu.

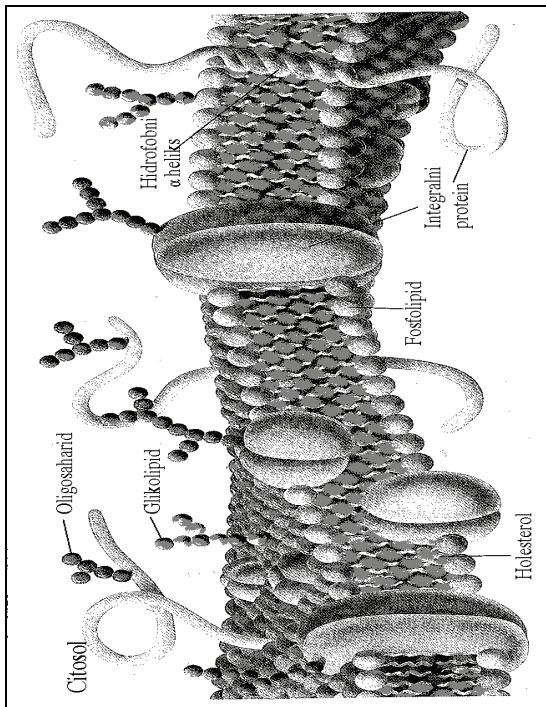
♣ Univerzalno svojstvo DNA replikacije je to što lanac koji se rađa raste od  $5'$  ka  $3'$  kraju. Na jednom kraju šećerne komponente DNA nalazi se  $5'$ -fosfat dok se na drugom kraju nalazi  $3'$ -hidroksilna grupa. DNA polimeraza katalizuje sukcesivno dodavanje svakog novog nukleotida na narastajući lanac. U *E. coli* postoje tri DNA-polimeraze.

DNA-polimeraza I (Pol I) je otkrivena prva, čemu je sledilo otkriće polimeraze II (Pol II) i III (Pol III). Polimeraze I i II se sastoje od prostog polipeptidnog lanca, ali polimeraza III je protein sastavljen iz više subjedinica.

♣ Biosinteza RNA: **Transkripcija** genetičke poruke. Transkripcija RNA se razlikuje u detaljima kod prokariota i eukariota. Najviše je istraživana *E. coli* (prokariot), ali neka opšta svojstva važe za sve organizme izuzev za RNA iz virusa. Sve RNA se sintetizuju po šablonu DNA; enzim koji katalizuje proces je DNA-zavisna RNA-polimeraza.

# 14.

## Biljne membrane

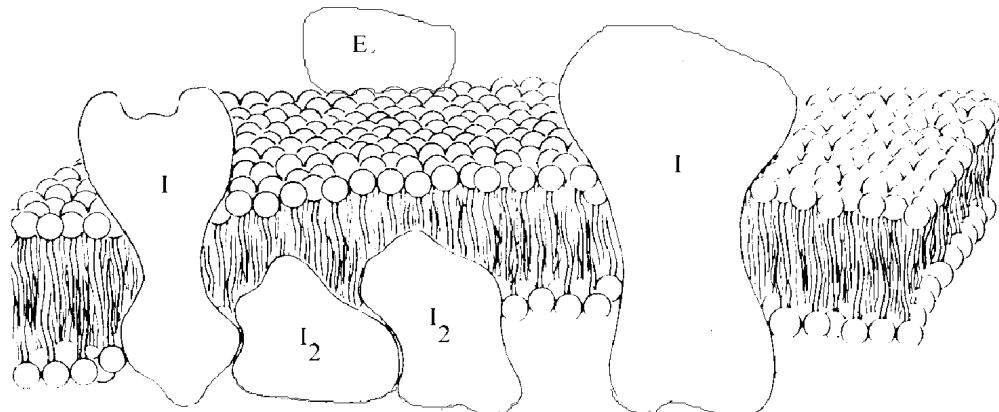


- 14.1. Uvod u strukturu membrana**
- 14.2. Funkcionalni aspekti biljnih membrana**
- 14.3. Aspekti spoljašnje sredine membrana sa posebnim osvrtom na temperaturu**
- 14.4. Izolovanje organela i membrana**
- 14.5. Herbicidi koji utiču na metabolizam membranskih lipida**

*Fluidno-mozaični model strukture membrana*

## 14.1. Uvod u strukturu membrana

Osnovna struktura biljnih membrana koja je i danas opšte priznata je ona koju su predložili Singer i Nicholson, a to je struktura po "fluidno-mozaičnom" modelu (slika 14-1). "Fluidno mozaični" model predočava da osnovnu strukturu membrane čini lipidni dvosloj u kojem proteini mogu biti ugradjeni, uronjeni ili pridodati na spoljašnju površinu membrane. Zbog njihovih amfipatičnih osobina većina membranskih lipida obrazuju dvosloj u vodenom rastvoru tako da su njihovi acil-lanci zaštićeni od vodenog okruženja. Ovo omogućuje polarnim grupama ("glavama" - fosfobazama ili fosfopolihidroksilima u fosfolipidima, ili šećerima u glikozilgliceridima) da stupaju u interakcije sa spoljašnjim proteinima, jonima ili drugim molekulima.



Slika 14-1.

Uprošćen prikaz fluidno mozaične strukture membrane. Lipidni dvosloj (čije su glavne komponente fosfogliceridi ili u hloroplastima glikozilgliceridi) čini kičmu membranske strukture. Acil-lanci su iznad njihove  $T_t$  ("tranziciona temperatura", tj.

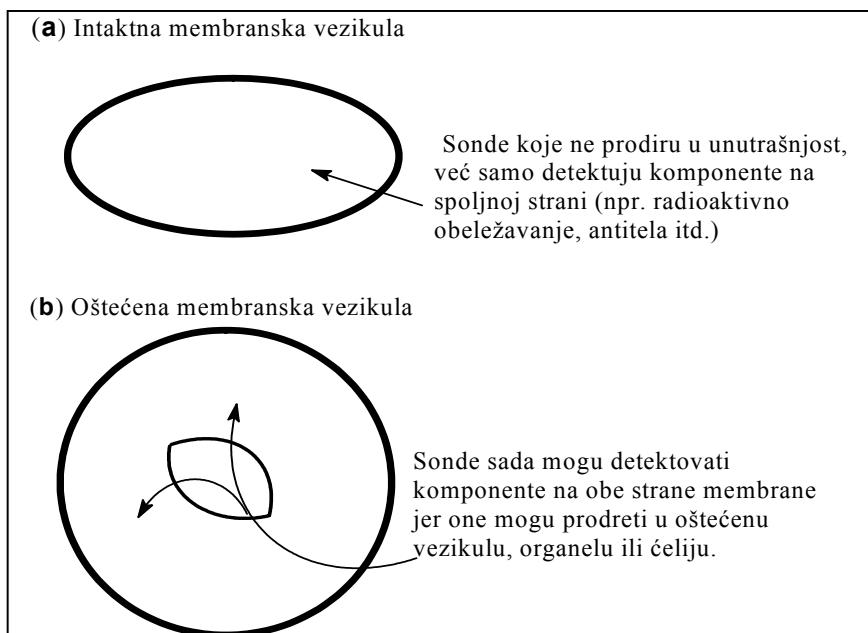
temperatura prelaska iz jednog u drugo agregatno stanje), i stoga su fluidni u normalnoj funkcionalnoj membrani. I, integralni proteini koji premošćuju i povezuju membranu ili, kao  $I_2$ , proteini samo uronjeni u jednu polovinu dvosloja.

Spoljašnji proteini (E) su povezani sa fosfolipidnim dvoslojem jonskim interakcijama.

Da bi membrana efikasno funkcionsala, smatra se da većina acil-lanaca mora preći iz svog gel stanja na "tranzicionej temperaturi" i stoga ona mora biti fluidna. Ovo ima važnu implikaciju na osetljivost i otpornost biljaka prema niskim temperaturama. "Fluidne" membrane su potrebne za efikasnu funkciju membranskih proteina i to ne samo zbog omogućavanja odgovarajuće pokretljivosti supstrata i proizvoda do enzima, već i da bi omogućile bočnu pokretljivost proteina

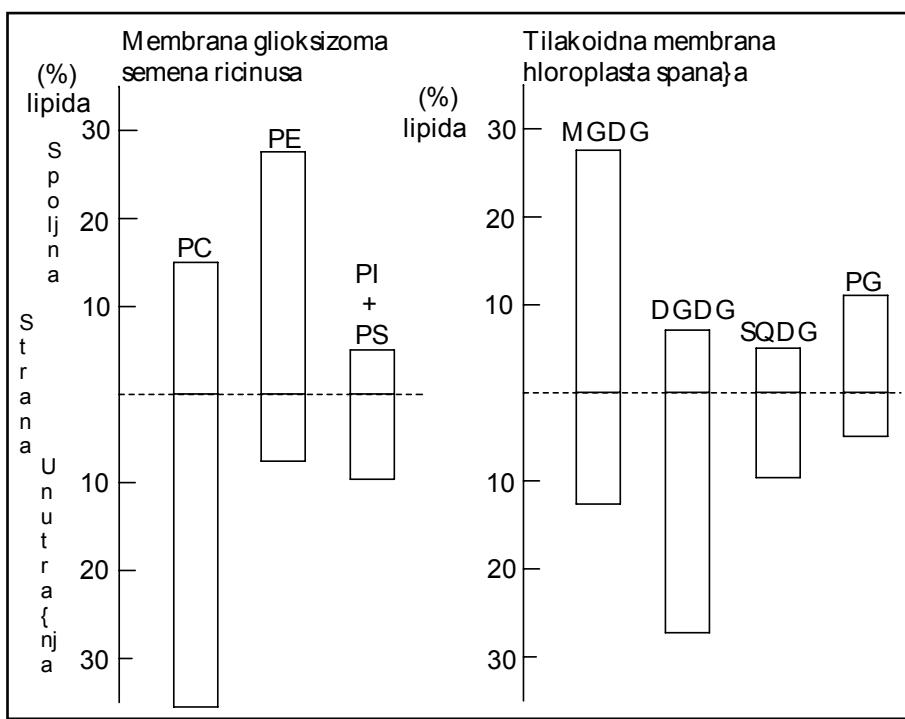
potrebnih u transportu, elektron-transportu i akumulaciji fotona (kvanata sunčeve svetlosti). Zbog toga proteini transportnog sistema koji deluju kroz mehanizam otvaranja pora moraju da se podvrgnu konformacionim promenama, dok oni koji imaju ulogu nosača moraju da prodju kroz hidrofobnu unutrašnjost dvosloja.

Otkriće prisustva unutrašnjih proteina, po modelu Singer – Nicholsona, usmerilo je istraživanje bioloških membrana u dva pravca. Tehnike dubokog zamrzavanja u elektronskoj mikroskopiji, (freeze-fracture i freeze-etching) su otkrile da membrane pokazuju "prostornost" u odnosu na njihove proteine što navodi da se isto pitanje može postaviti i u odnosu na distribuciju lipida u membranama. Da bi se istražila "prostornost" membranskih proteina, neophodno je pripremiti čiste uzorke odredjenih membrana i imati na raspolaganju sonde koje neće oštetiti membranu analiziranih vezikula. Osnovni princip metode je pokazan na slici 14-2.



Slika 14.2. Ispitivanje "prostornosti" membranskih lipida.

Intaktne membranske vezikule se prvo sondiraju kako bi se odredilo koji su lipidi prisutni u spoljašnjoj polovini dvosloja. Nakon toga se vezikule oštećuju kako bi sonde došle u dodir i sa unutrašnjom stranom membrane. Neki lipidi mogu biti nedostupni za sonde (npr. kada su u čvrstom kompleksu sa unutrašnjim proteinima) i oni ostaju neobeleženi i u oštećenim vezikulama. Kada su ove tehnike primenjene i na biljnim membranama, ustanovljen je, kao i kod drugih organizama, bočni raspored lipida (slika 14-3). Pretpostavlja se da ovaj bočni raspored ima značaj u struktURNOM pogledu.



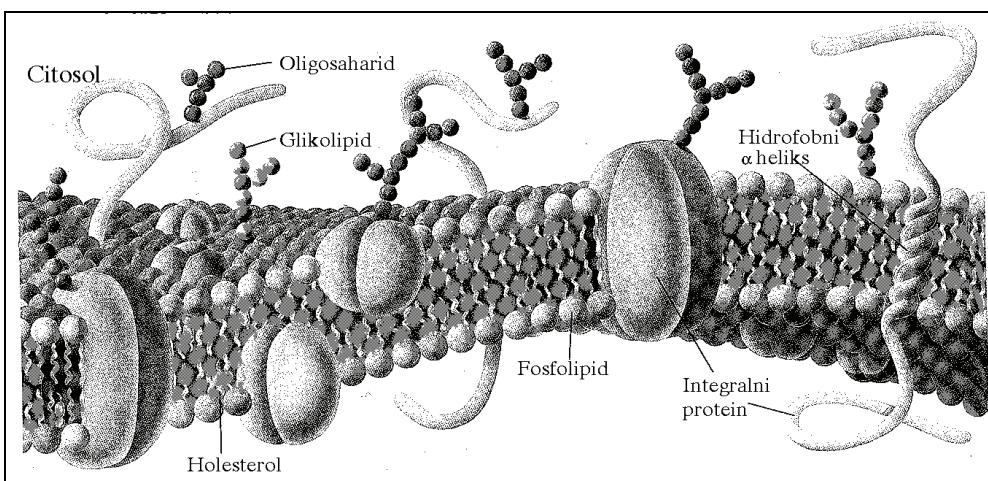
Slika 14-3.

Distribucija lipida na dve strane membrane biljaka. Skraćenice: PC, fosfatidilholin; PE, fosfatidiletanolamin; PI, fosfatidilinozitol; PS, fosfatidilserin; MGDG, monogalaktosyldiacylglycerol; DGDG, digalaktosyldiacylglycerol; SQDG, sulfohiovoozildiacylglycerol; PD, fosfatidilglicerol.

Spin-obeležavanjem (spin-labeling) acil-lanaca membranskih lipida ustanovljeno je značajno pomeranje u ugljovodoničnim lancima, tj. slobodna rotacija oko pojedinačnih atoma ugljenika acil-lanaca (izuzev kod onih vezanih dvostrukom vezom), do koje dolazi na svakih  $10^{-9}$  s. Štaviše, ceo lipid može slobodno da se pokreće transverzalno, tj. u ravni membrane, učestalošću od  $10^{-7}$  s. Ovako brzo pomeranje omogućuje lipidima kao što su plastohinoni da efikasno funkcionišu kao pokretni nosači elektrona u fotosintezi. Nasuprot tome, lipidima je praktično onemogućen prelazak iz jedne strane dvosloja u drugi (proces poznat pod nazivom flip-flop), zahvaljujući hidrofilnoj prirodi njihovih polarnih "glava" i nemogućnosti prolaska tih grupa kroz hidrofobnu unutrašnjost membrane. Procenjuje se da u model-membranama do pojave flip-flopa dolazi tek na svakih  $10^5$  s, odnosno više milijardi puta sporije u odnosu na bočno pomeranje. Na taj način je očuvan bočni raspored membranskih lipida.

**Membrana kao fluidno-mozaični model** - Prema današnjim saznanjima, membrana je izgrađena kao mozaik od proteina raspoređenih u viskoznom lipidnom dvostrukom sloju kao što je to prikazano na slici 14-4.

**Membranski proteini** - najčešće su nerastvorljivi u vodi i skloni su agregaciji. Mogu se rastvoriti samo dodatkom deterđženata. Kao sekundarnu strukturu membranski proteini pretežno imaju  $\alpha$ -uvojnicu. Proteini membrana sadrže najčešće mnoge hidrofobne ostatke, raspoređene na površini proteina, tako da mogu stvarati hidrofobne veze s' lipidnim sastojcima membrana. Membranski proteini nisu važni samo kao strukturni elementi. Mnogi od njih imaju različite biohemski funkcije kao enzimi, transportni proteini ili receptori. U membrani su asimetrično raspoređeni.



Slika 14-4.

Fluidno-mozaični model membranske strukture-organizacija na nivou molekula.

Komponente lipidnog dvosloja se pre svih fosfogliceridi ili u hloroplastima glikozilgliceridi koji čine kičmu membranske strukture.

Proteinski molekuli, čija visina može doseći 10 nm, razdeljeni su u bimolekulskom fosfolipidnom tankom sloju. Lipidni tanki sloj nije čvrst, već je pre viskozna tečnost. Unutar tog sloja proteini mogu menjati mesto. Neki od proteina pružaju se kroz membranu (tzv. "tunelski proteini" ili "integralni proteini") pa su na obema stranama membrane izloženi vodenom medijumu. Ovi proteini stoga imaju značajnu ulogu u transportu supstrata kroz membranu. Drugi su proteini verovatno samo uronjeni u membranu pa im je hidrofilna strana okrenuta prema spolja (ili prema unutra). Preduslov za to je da se na površini tercijarne strukture proteina nalaze hidrofilna i hidrofobna područja. Preko hidrofilnih područja proteini mogu stupiti u međusobne interakcije sa lipidima membrana.

Proteini su u membranama strogo vektorski orjentisani. Postoje proteini koji su užljebljeni u membranu, a svojim slobodnim krajem strše prema napolju. Oni često na svojim krajevima sadrže ugljenohidratne grupe. Drugi su pak čvrsto smešteni na unutrašnjoj strani membrane (tzv. "periferni proteini") a to su najčešće enzimi. Već spomenuti "tunelski proteini" takođe su raspoređeni strogo vektorski.

## 14.2. Funkcionalni aspekti biljnih membrana

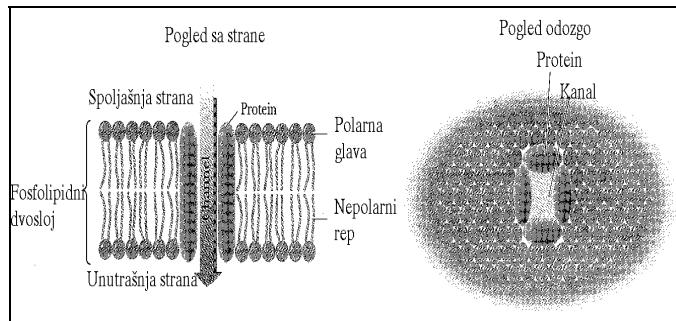
Mnoga svojstva membrana u svim eukariotskim organizmima su zajednička. *Prvo*, one predstavljaju propustljive barijere za mnoge molekule čime omogućuju da se u ćelijama i njihovim organelama kao jedinstvenom okruženju odvijaju metabolički i drugi procesi. S obzirom da su membrane nepropustljive za velike i/ili molekule rastvorljive u vodi, neophodno je prisustvo specifičnih transportnih procesa koji omogućavaju transport ovakvih molekula ukoliko je to potrebno.

Najvažnije pitanje u vezi transporta supstanci kroz biološke membrane je da li ovaj proces zahteva trošenje energije od strane ćelije. U *pasivnom transportu*, supstance se pokreću iz regiona gde je koncentracija veća, u region gde je ona manja, tj. prenos supstanci je u istom smeru kao i gradijent koncentracije. U ovom slučaju ćelija ne troši energiju za transport. Prilikom *aktivnog transporta*, supstance se prenose iz regiona manje koncentracije prema mestu gde je koncentracija veća, tj. suprotno gradijentu koncentracije i tada ovaj proces zahteva utrošak energije od strane ćelije.

**Pasivni transport** - se može podeliti u dve kategorije: *prosta difuzija* i *olakšana difuzija*. Kod *proste difuzije* molekul se kreće direktno kroz otvor ili poru na membrani bez interakcije sa drugim molekulom. Molekul koji se transportuje prolazi direktno kroz lipidni dvosloj ili kroz otvor u *proteinskom kanalu* membrane (slika 14-5).

Mali molekuli kao npr. molekuli vode, kiseonika ili ugljen-dioksida prolaze direktno kroz lipidni dvosloj, a veći, naročito polarni molekuli, zahtevaju proteinski kanal. Joni ne mogu da prolaze kroz lipidni dvosloj usled svog nanelektrisanja i njihov transport takođe podrazumeva proteinske kanale. Veličina i oblik otvora u proteinskom kanalu je specifična za određene jone ili molekule.

**Olakšana difuzija** - uključuje prisustvo *proteina nosača*. Molekul koji se transportuje kroz membranu vezuje se za protein nosač pre nego što samostalno prođe kroz nju, kao što je slučaj sa proteinskim kanalima kod proste difuzije. Kako kod proteinskih kanala tako i kod proteina nosača, pora se stvara heliksnim sklapanjem osnovnog lanca i bočnih nizova. Spoljašnji deo heliksa, koji je u kontaktu sa lipidnim dvoslojem, je hidrofoban, dok je unutrašnjost heliksa kroz koji joni prolaze, hidrofilan.



Slika 14-5.

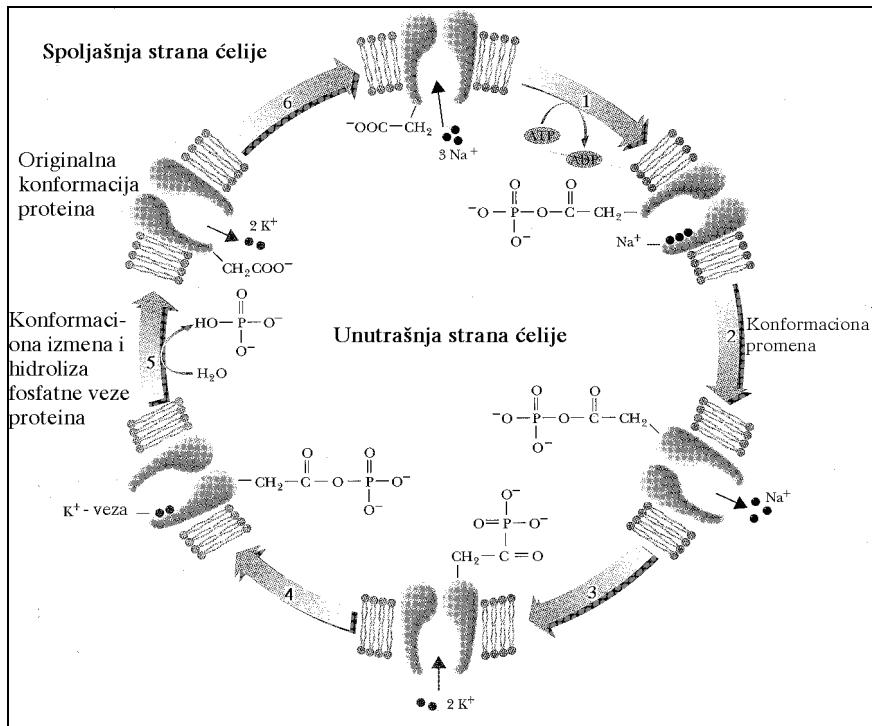
Shematski prikaz prote-inskog kanala. Na ovom primeru (desno), prote-inski kanal se sastoji iz četiri subjedinice. Kako proteinski kanali, koji imaju ulogu u prostoj difuziji, tako i protein-nosači koji omogućavaju olakšanu difuziju, imaju pore kroz koje supstance mogu prolaziti. Razlika izmedju njih ogleda se u tome što se pri olakšanoj difuziji supstanca koja ulazi u ćeliju vezuje za protein nosač, dok pri prostoj difuziji joni i mali molekuli jednostavno prolaze kroz poru u proteinskom kanalu. (*M.K.Campbell, Saunders College Publishing, London, 199, str. 263, sl. 11.10.*)..

**Aktivni transport** - podrazumeva kretanje supstance suprotno gradijentu koncentracije, slično pumpanju vode naviše. Sličnost sa pumpom je tako velika, da je jedan od najčešće istraživanih primera aktivnog transporta - kretanje jona kalijuma u ćeliju uz simultani izlazak jona natrijuma iz ćelije, nazvan *natrijum-kalijumova jonska pumpa*. Rad  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$  pumpe je organizovan na način prikazan na slici 14-6.

Pri normalnim okolnostima, koncentracija  $\text{K}^+$  je veća unutar ćelije nego u ekstracelularnoj tečnosti, dok je koncentracija  $\text{Na}^+$  niža unutar ćelije nego spolja. Energija neophodna da se ovi joni pokrenu suprotno njihovom gradijentu obezbedjuje se egzogenom reakcijom (oslobadjanjem energije) kroz hidrolizu ATP na ADP i Pi (fosfatni ion). Bez hidrolize ATP nema ni transporta jona. Jedan isti protein je istovremeno i enzim, koji hidrolizuje ATP (ATP-aza) i transportni protein. Sastoje se iz nekoliko subjedinica. Reaktanti i proizvodi ove hidrolitičke reakcije - ATP, ADP i Pi - ostaju u ćeliji i fosfatni ion se kovalentno veže za transportni protein tokom jednog dela procesa.

Jedna subjedinica proteina hidrolizuje ATP i prenosi fosfatnu grupu na bočni lanac aspartata druge subjedinice. Istovremeno dolazi do vezivanja tri jona  $\text{Na}^+$  iz unutrašnjosti ćelije. Fosforilacija jedne subjedinice izaziva konformacionu promenu u proteinu što ima za posledicu otvaranje kanala ili pore kroz koje se tri  $\text{Na}^+$  oslobadaju u ekstracelularnu tečnost. Sa spolašnje strane ćelije, dva jona  $\text{K}^+$  vezuju se za enzim pumpe koji je još uvek fosforilovan. Do nove konformacione promene dolazi pri hidrolizi veze izmedju enzima i fosfatne grupe. Ova druga

konformaciona promena regeneriše originalni oblik enzima i omogućuje ulazak dva  $K^+$  u ćeliju. Navedeni proces omogućuje da se na svaka tri jona  $Na^+$  koji se izlaze iz ćelije, istovremeno usvoje po dva jona  $K^+$  u ćeliju.



Slika 14-6. Rad  $Na^+ - K^+$  pumpe.

Proces rada pumpe je reversan u slučaju kada nema  $K^+$ , a koncentracija  $Na^+$  u ekstracelularnoj tečnosti je visoka. U ovom slučaju dolazi do sinteze ATP kroz fosforilaciju ADP. Rad  $Na^+-K^+$  pumpe je verovatno složeniji i on do danas nije u potpunosti objašnjen.

*Drugo*, membrane su mesto za enzime i druge aktivne unutrašnje proteine. Za enzime metabolizma hidrofobnih molekula, kao što su oni koji katalizuju reakcije lipida, unutrašnjost membrane predstavlja odgovarajuću sredinu za njihovu aktivnost. Kod reakcija koje se odvijaju na određenoj strani membrane, ona omogućuje proteinima da se postave u specifičan položaj u odnosu na jednu ili drugu stranu membrane. Zbog ovoga, fotosintetički kompleksi (fotosistem I, fotosistem II, citohrom  $b_6/f$  kompleks) su u stanju da funkcionišu kroz simultano stvaranje protonskog gradijenta u membrani što je od primarnog značaja za fotofosforilaciju.

Treće, membrane učestvuju u procesu skladištenja molekula kao i u sekreciji. Membrane uljnih tela (half-unit membrane), su primer za to. Drugi primer kod biljaka su žlezde za izlučivanje soli u lišću *Tamarix*-a koje omogućuju biljci tolerantnost prema salinitetu. Takođe, mnoge ćelije biljaka poseduju dobro razvijen endoplazmatični retikulum i Golđzi aparat koji imaju funkciju u sintezi supstanci koje se izlučuju. Primeri tih supstanci su i neki molekuli lipida kao i produkcija veoma dugih lanaca masnih kiselina za izgradnju površinskog sloja. I konično, membrane mogu posedovati receptore koji služe u prenosu spoljašnjih signala. Receptori za auksine i fitohormone su dobro proučeni i oni omogućavaju ovim regulatorima rasta biljaka da vrše svoju funkciju. Kao drugi primer bi se mogla navesti uloga membrane u produkciji sekundarnih mesendžera putem hidrolize fosfatidilinozitol-4,5-difosfata.

### 14.3. Aspekti spoljašnje sredine membrane sa posebnim osvrtom na temperaturu

Mnogobrojni uticaji spoljašne sredine menjaju sastav i/ili metabolizam lipida u biljkama. Tu se ubrajaju svetlost, temperatura, polutanti iz atmosfere, soli iz zemljišta i ksenobiotici, kao npr. pesticidi. Najočigledniji uticaj svetlosti ogleda se u stimulaciji fotosintetske funkcije membrane. Svetlost je neophodna za razvoj hloroplasta, i iz tog razloga dolazi do značajnih promena u sastavu lipida u lišću. Najvažniju promenu čini produkcija hlorofila tj. ozelenjavanje lišća, ali se pri tome i sastav acil-lipida menja (tabela 14-1). Najistaknutiji primeri za ovo su povećanje sadržaja  $\alpha$ -linolenata i pojava *trans*- $\Delta$ 3-heksadekenoata.

Tabela 14-1. Promena u sastavu masnih kiselina u tkivu pasulja u uslivima rasta na svetlu i mraku.

	Masne kiseline (%)						
	16:0	16:1 <sup>a</sup>	18:0	18:1	18:2	18:3	Druge
Svetlo	12	7	3	3	14	56	5
Mrak	17	1	5	2	34	39	2

<sup>a</sup> 4% kao *trans*- $\Delta$ 3-heksadekenoat koji nije prisutan u mraku

Svetlost stimuliše kako proces fotosinteze, a kroz to i produkciju ATP i NADPH, tako i sintezu masnih kiselina i lipida. Acetyl-CoA-karboksilaza se aktivira, najverovatnije zbog promena u stromama (tabela 14-2). Merenje sinteze

masnih kiselina uz pomoć radioaktivnih prekursora je pokazalo da je nastajanje lipida u lišću oko 20 puta brže na svetlosti nego u mraku.

Tabela 14-2. Mogući putevi stimulacije hloroplastne acetil-CoA-karboksilaze pomoću svetlosti.

Parametri	<i>In vivo</i> izmene za vreme fotosinteze		Izmena aktivnosti in vitro <sup>a</sup>		Povećanje aktivnosti
	Od	Do	Od	Do	
PH	7.1	8.0	50	155	3.1x
Mg <sup>2+</sup>	2 mM	5 mM	70	165	7.3x
ATP	0.5-0.8 mM	0.8-1.4 mM	80	135	12.3x
ADP	0.6-1.0 mM	0.3-0.6 mM	65	125	23.6x

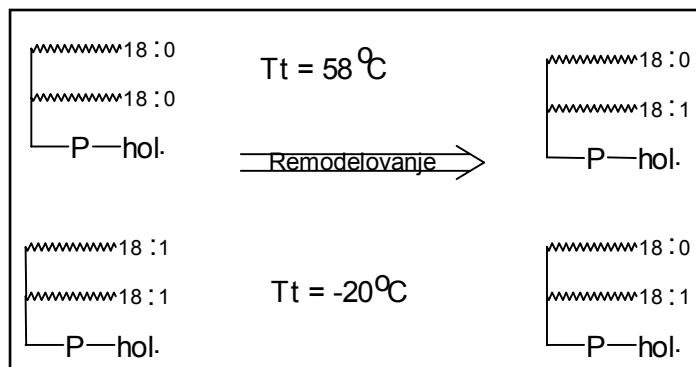
<sup>a</sup>Aativnost je izražena kao nmol/min/mg proteina.

Sa poljoprivrednog stanovišta, postoji veliko interesovanje za sposobnost određenih biljnih vrsta da pokazuju otpornost na niske temperature. Ako bi se neki usev, koji je osjetljiv na hladnoću, mogao učiniti otpornim onda bi se postigla i njegova rasprostranjenost na veći broj zemalja uzgoja. Zbog toga biohemičari istražuju mehanizme koji biljkama mogu pomoći u prilagodjavanju niskim temperaturama (0 – 10°C). Postoji veliki broj načina kod kojih promene u sastavu membranskih lipida mogu doprineti nastajanju "tečnije" ugljovodonične srži, ili alternativno, nastajanju dvosloja koji je fluidniji pri nižim spoljašnjim temperaturama. Uočene promene kod biljaka date su u tabeli 14-3.

Tabela 14-3. Načini kojima se promenom u sastavu lipida izazivaju promena u fluidnosti membrana kod biljaka.

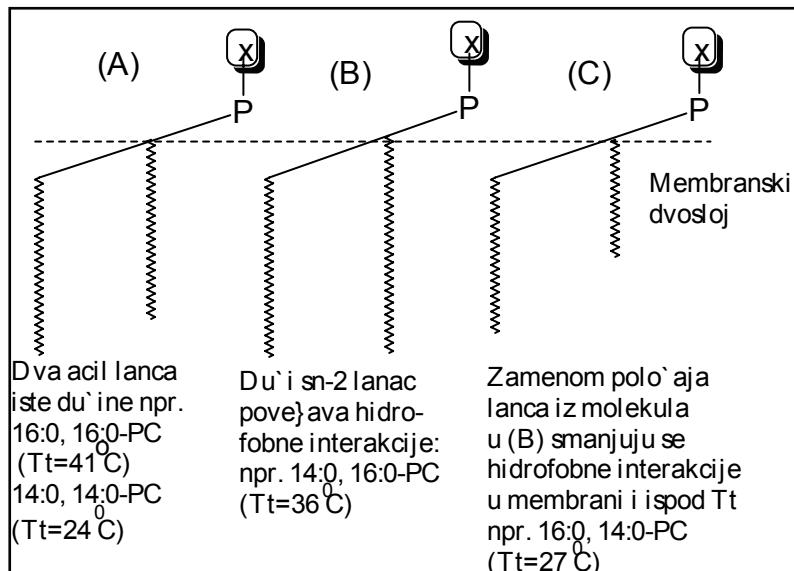
- 
1. Remodelovanj molekulskih vrsta,
  2. Izmena u nezasićenosti,
  3. Promene u odnosima klase lipida,
  4. Smanjenje odnosa lipida i proteina pri niskim temperaturama itd.
- 

Remodelovanje molekulskih vrsta može obuhvatati ili sveukupno stvaranje novih kombinacija masnih kiselina (slika 14-7), ili zamenu mesta dve postojeće kiseline u molekulu glicerola (slika 14-8). Kako u ovom slučaju nove masne kiseline ne moraju da se sintetizuju, ova promena se često smatra hitnim odgovorom u nuždi izazvanim iznenadnim sniženjem spoljne temperature.



Slika 14-7.

Kako kreiranje novih molekulskih vrsta membranskih lipida može sprečiti fazu razdvajanja koja dospeva u prelazu nekih molekula u gel fazu.



Slika 14-8.

Zato što glicerol čini kičmu to membranski lipidi nisu paralelni sa površinom membrane, a izmena položaja acil-lanaca može uticati na fluidnost iste.

Značaj sastava molekulskih vrsta u određivanju osetljivosti prema temperaturama dodatno je istaknut kroz studije koje su pokazale da do umanjenja u fotosintezi u nekim, ali ne i svim biljkama, dolazi usled različite zastupljenosti fosfatidilglicerola. Kada biljka sadrži više od 20% ukupnih tilakoidnih fosfatidilglicerola u obliku dipalmitoil-(Tt=42°C) ili 1-palmitoil, 2-trans-Δ3-

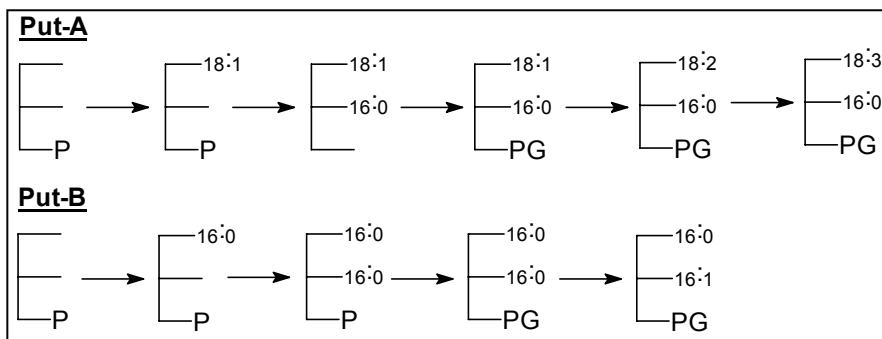
heksadekenoil kombinaciji ( $T_t=32^{\circ}\text{C}$ ) onda se smatra da je ona podložna oštećenju izazvanim mržnjenjem (tabela 14-4). Smatra se da je ovo posledica činjenice da bi se značajna količina ukupnih lipida tilakoida pod ovim uslovima razdvojila što bi izazvalo gubitak funkcije membrane. Pretpostavlja se da nijedan drugi lipid tilakoida nije uključen u mehanizam otpornosti i osetljivosti na mržnjenje.

Tabela 14-4. Korelacija različitih biljaka osetljivih na hladnoću sa sadržajem 16:0/16:0 – i 16:0/*trans* 16:1 – molekulske vrste fosfatidilglicerola.

Biljke osetljive na hladnoću	% <sup>a</sup>	Biljke otporne na hladnoću	%
Indijski krompir	65	Salata	17
Bundeva	64	Spanać	6
Pirinač	44	Maslačak	4
Duvan	39	Kupus	4
Kukuruz	37	Pšenica	3

%<sup>a</sup> (a= vrednosti kao mol; % = ukupni fosfatidilgliceroli).

Biljke, kao npr. bundeva, koje proizvode velike količine navedenih ("zasićenih") molekulske vrste fosfatidilglicerola po svoj prilici sadrže enzime glicerol-3-fosfat aciltransferaze koji pokazuju supstratnu specifičnost prema palmitatu, kao i oleatu (slika 14-9).



Slika 14-9.

Stvaranje nezasićenih vrsta fosfatidilglicerola u biljkama osetljivim na temperaturu zavisno od specifičnosti njihovih glicerol-3-fosfat-aciltransferaza. Put A je dominantan kod biljaka otpornih na hladnoću i proizvodi visoko fluidne molekule fosfatidil-glicerola. Putevi A i B su uporedno aktivni kod biljnih vrsta osetljivih na hladnoću što ima za posledicu povećani udeo fosfatidilglicerola koji ima  $T_t$  iznad  $32^{\circ}\text{C}$ .

Kada se geni za ove enzime prenesu u srednje osetljive biljke, npr. duvan, oni ih čine osetljivijim prema mržnjenju, a kada se geni za aciltransferaze slično prenesu iz otpornih biljaka kao npr. iz *Arabidopsis*, tada duvan postaje više otporan (tabela 14-5).

Tabela 14-5. Genetskom manipulacijom na biljkama duvana izmenjen je sastav fosfatidilglicerola i povećana tolerantnost na hladnoću.

	PG Sastav masnih kiselina (%)			Fotosinteza <sup>a</sup>	
	16:0	16:1	C <sub>18</sub> nezasić.	Pre hlađenja	Posle hlađenja
Bundeva	54	22	18	-	-
<i>Arabidopsis</i> (ARA)	29	29	40	-	-
Duvan	20	46	32	-	-
<i>Transgeni duvan</i>					
sa plazmidom	23	44	32	0.016	0.010
pSQ <sup>b</sup>	52	29	12	0.024	0.004
pARA	24	38	36	0.017	0.017

<sup>a</sup>Fotosinteza je merena kao O<sub>2</sub> evolucija u ml min<sup>-1</sup> 10 cm<sup>-2</sup> površine lista. Biljke su gajene na 27°C, potom hlađene 4 časa na +1°C i ponovo vraćene na 27°C.

<sup>b</sup>pSQ = odgovarajući plazmid sadrži gen za glicerol-3-fosfat aciltransferazu iz bundeve i pARA = sadrži gen za enzim iz *Arabidopsis*.

Više detalja o navedenom u časopisu: Murata et al. (1992) Nature 356, 710-713.

Veoma česta promena koja se dešava kod membranskih lipida u uslovima sniženja spoljne temperature ogleda se u povećanju nezasićenosti istih. Uvodjenje *cis* dvostrukе veze u zasićeni lanac dovodi do ogromne razlike u njegovoj tački topljenja. Tako stearinska kiselina ima Tc na 58°C dok oleinska ima Tc na 14°C. Uvodjenje druge nezasićene veze snižava dalje tačku topljenja (linoleinska kiselina, Tc= -5°C) mada ne toliko kao prva dvostruka veza. Zbog toga, povećanje nezasićenosti membranskih lipida pokazuje značaj u smislu adaptivnog odgovora biljaka.

Ovaj mehanizam u kome dolazi do povećanja nezasićenosti masnih kiselina u uslovima sniženja spoljne temperature je proučavan u mnogim organizmima. Predložene su tri osnovne teorije (tabela 14-6). Dostupni rezultati favorizuju dvojak uticaj na fluidnost membrana - kroz aktiviranje postojećih kompleksa desaturaza, kao i putem sinteze nove protein-desaturaze kroz proces transkripcije gena.

Tabela 14-6. Kako sadržaj nezasićenih masnih kiselina može biti povećan na niskim temperaturama?

1. Povaćanim snabdevanje supstratom (zahtev za kiseonikom kao supstratom za aerobnu desaturaciju i rastvorljivost u vodi se povećava na niskim temperaturama).
2. Aktiviranjem desaturaza (desaturaze su obično enzimi vezani za membranu, a niske temperature mogu prouzrokovati izmenu u fluidnosti membrane i tako aktivirati enzimske komplekse).
3. Sintezom nove protein-desaturaze (kao što je poznato niske temperature povećavaju sintezu proteina u mnogim slučajevima – verovatno povećanom transkripcijom gena).

Značaj desaturacije masnih kiselina u poboljšanju otpornosti na niske temperature jasno je demonstriran u eksperimentima transfera gena kod cijanobakterija. Gen koji kodira  $\Delta$ -12 desaturazu (koja prevodi, npr. oleat u linoleat) prenesen je u mutante vrste *Synechocystis* koji ne poseduju aktivnost, kao i u organizam koji ne stvara polinezasićene masne kiseline. U oba slučaja, povećanje u membranskim polinezasićenim masnim kiselinama dovelo je do povećanja fluidnosti membrane i otpornosti organizma prema oštećenju izazvanom niskim temperaturama (tabela 14-6).

Druge promene kod lipida uočavaju se pri promeni spoljašnje temperature. Povećanje u relativnom sadržaju fosfatidilholina se često sreće. Ako se njegov sadržaj, u odnosu na fosfatidiletanolamin poveća u dатој membrani, može se očekivati pozitivan efekat u odnosu na fluidnost membrane. Ovo je zbog toga što je  $T_c$  za fosfatidilholin oko  $13^{\circ}\text{C}$  niža nego za fosfatidiletanolamin. Naravno, prevodjenje fosfatidiletanolamina u fosfatidilholin je lako izvodljivo putem metilacije i ovo može predstavljati adaptivni mehanizam. Slično ovome, i konverzija monogalaktozil-diacilglicerola u digalaktozildiacilglicerol takodje povećava fluidnost membrane zbog niže  $T_c$  kod digalaktozil lipida. Promene u odnosu ova dva galaktolipida se često sreću u uslovima promenljivih spoljnih temperatura.

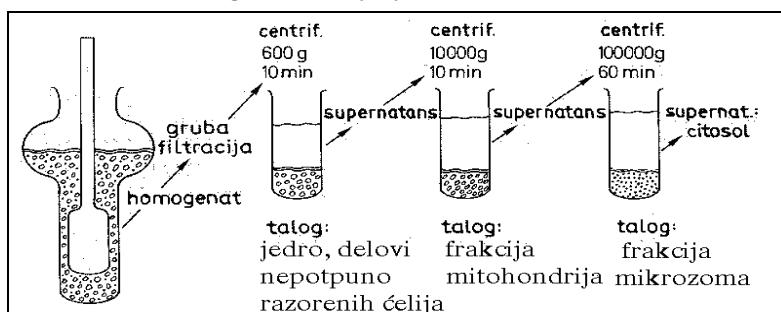
Konačno, relativni udeli lipida i proteina mogu uticati na fluidnost membrane. U uslovima sniženja spoljnih temperatura dolazi uobičajeno do povećanja sadržaja lipida i smatra se da to potpomaže fluidnost membrane.

## 14.4. Izolovanje organela i membrane

Za istraživanje izgradnje i biohemijskih funkcija pojedinih ćelijskih organeli, vrlo je važan postupak diferencijalnog centrifugovanja. Ovim se postupkom membranama obavijene čestice mogu međusobno odvojiti i pojedinačno ispitati.

Danas uobičajeni postupak prikazan je na slici 14-10. Tako dobivene frakcije, koje se moraju "prečistiti" ponovnim centrifugovanjem, mogu se odvojeno ispitati s' obzirom na njihov hemijski sastav, sadržaj enzima i njihovo učešće u metabolizmu.

Kao merilo čistoće frakcija obično se uzimaju karakteristični enzimi (enzimi markeri). Npr. *sukcinat-dehidrogenaza* i *citohrom-oksidaza* nalaze se samo u mitohondrijama. Stoga se u frakciji koja sadrži célijska jedra može odrediti jedan od ovih enzima čime se dobija mera onečišćenja te frakcije mitohondrijama. Dok se jedra i mitohondrije ovom metodom mogu izolovati neoštećeni, membrane endoplazmatičnog retikuluma se homogenizovanjem kidaju. Pokidani delovi se povezuju opet u male vezikule pa se mogu izolovati kao "mikrozomalna frakcija". Mikrozomalna frakcija nije jedinstvena. Ona sadrži *ribozome*, *lizozome* i delice membrane, koji čine stvarne mikrozome (u biohemiskom značenju). U tim se mikrozomima nalaze enzimi hidroksilacije koji se sastoje iz *citohroma P-450* i flavoproteina NADPH-citohrom P-450-reduktaze. Ostali enzimi mar-keri mikrozoma su *citohrom b<sub>5</sub>* i *glu-koza-6-fosfataza*.



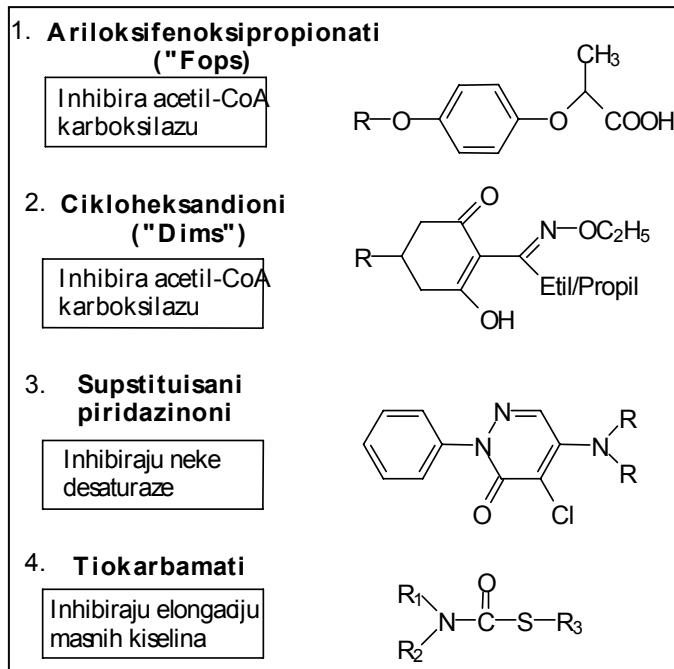
Slika 14-10. Odvajanje célijskih organela diferencijalnim centrifugovanjem.

## 14.5. Herbicidi koji utiču na metabolizam membranskih lipida

Postoje tri osnovne klase herbicida koji imaju primarnu ulogu u izazivanju promena tokom biosinteze membranskih lipida (slika 14-11).

**Prvu klasu** - čine supstituisani piridazinoni koji deluju u tri osnovna pravca: oni mogu (1) inhibirati stvaranje karotenoidea, (2) vršiti promene u procesu desaturacije masnih kiselina i (3) ometati proces transporta elektrona. Iz grupe desaturaza masnih kiselina posebno skloni dejstvu herbicida je  $\Delta$ -15 desaturaza koja prevodi linoleat u  $\alpha$ -linolenat. Ipak, najveća herbicidna aktivnost mnogih piridazinona ogleda se u inhibiciji sinteze karotena, obično na nivou fitoendesaturaze. Manjak karotenoidea omogućuje obimnu fotodestrukciju hlorofila tokom fotosinteze, a zbog ovog efekta, jedinjenja koja ih izazivaju nazvana su "herbicidi za beljenje".

**Drugu klasu** - herbicida čine tiokarbamatni (slika 14-11). Za mnoga od ovih jedinjenja se zna da remete stvaranje voskova. Tačan mehanizam ovog dejstva se još proučava ali se veruje da se tiokarbamatni prevode u svoje sulfoksidne derivate koji u stvari predstavljaju herbicidna jedinjenja. Sulfoksidni derivati tiokarbamatnih herbicida inhibiraju elongaciju masnih kiselina i time sprečavaju nastanak veoma dugačkih lanaca masnih kiselina koje su prekursori mnogih voskova.



Slika 14-11.

Osnovne strukture nekih klasa herbicida koji utiču na biosintezu masnih kiselina. Za arilosifenoksipropionate R-grupa je obično benzen- ili piridinski prsten sa halogen supstituentima. Za piridazone R-grupe su obično vodonici ili metil-grupe. U tiokarbamatima R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> su obično alkil grupe (etil, propil, izopropil), a R<sub>3</sub> može biti etil, propil ili hlorid.

**Treću klasu** - jedinjenja predstavljaju nedavno otkriveni "trava-specifični" herbicidi. Mogu se predstaviti pomoću dve osnovne hemijske strukture – arilosifenoksipropionatna i cikloheksandionska. Ova jedinjenja deluju inhibitorno na acetil-CoA karboksilazu u osetljivim travama (*Poaceae*) ali ne i u ostalim monokotiledonim ili dikotiledonim vrstama. Ono što je interesantno je da se mehanizam selektivnosti bazira na razlici u strukturi ciljanog enzima, acetil-CoA karboksilaze, a ne na različitom usvajanju, transportu ili metabolizmu herbicida. Ovo je veoma neobična osnova za selektivnost određenog herbicida. Arilosifenoksipropionati i cikloheksandioni inhibiraju reakciju karboksiltransferaza i pokazuju zajedničke karakteristike vezivanja.

## Izvod

♣ Osnovna struktura biljnih membrana koja je i danas opšte priznata je ona koju su predložili Singer i Nicholson, a to je struktura po “*fluidno-mozaičnom*” modelu

♣ “Fluidno mozaični” model predočava da osnovnu strukturu membrane čini lipidni dvosloj u kojem proteini mogu biti ugradjeni, uronjeni ili pridodati na spoljašnju površinu membrane

♣ Tehnike dubokog zamrzavanja u elektronskoj mikroskopiji, (freeze-fracture i freeze-etching) su otkrile da membrane pokazuju “prostornost” u odnosu na njihove proteine što navodi da se isto pitanje može postaviti i u odnosu na distribuciju lipida u membranama.

♣ Kada su ove tehnike primenjene i na biljnim membranama, ustanovljen je, kao i kod drugih organizama, bočni raspored lipida (slika 14-3). Prepostavlja se da ovaj bočni raspored ima značaj u strukturnom pogledu.

♣ Membranski proteini nisu važni samo kao strukturni elementi. Mnogi od njih imaju različite biohemijske funkcije kao enzimi, transportni proteini ili receptori. U membrani su asimetrično raspoređeni.

♣ Mnoga svojstva membrana u svim eukariotskim organizmima su zajednička. *Prvo*, one predstavljaju propustljive barijere za mnoge molekule čime omogućuju da se u ćelijama i njihovim organelama kao jedinstvenom okruženju odvijaju metabolički i drugi procesi. *Drugo*, membrane su mesto za enzime i druge aktivne unutrašnje proteine. *Treće*, membrane učestvuju u procesu skladištenja molekula kao i u sekreciji

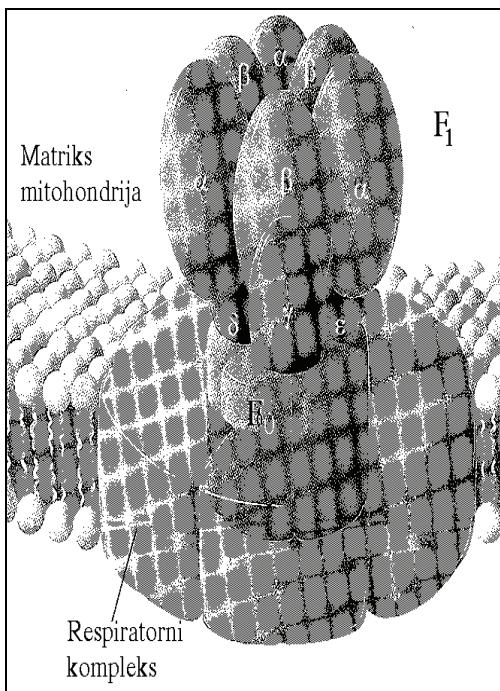
♣ Mnogobrojni uticaji spoljašne sredine menjaju sastav i/ili metabolizam lipida u biljkama. Tu se ubrajaju svetlost, temperatura, polutanti iz atmosfere, soli iz zemljišta i ksenobiotici, kao npr. pesticidi.

♣ Svetlost stimuliše kako proces fotosinteze, a kroz to i produkciju ATP i NADH, tako i sintezu masnih kiselina i lipida. *Acetyl-CoA-karboksilaza* se aktivira, najverovatnije zbog promena u stromama (tabela 14-2). Merenje sinteze masnih kiselina uz pomoć radioaktivnih prekursora je pokazalo da je nastajanje lipida u lišću oko 20 puta brže na svetlosti nego u mraku.

♣ Biljake otporne na hladnoću proizvode visoko fluidne molekule fosfatidilglicerola.

# 15.

## Transport elektrona i oksidativna fosforilacija



### **15.1. Transport elektrona**

15.1.1. Redukcioni potencijali bioloških redoks sistemi

### **15.2. Fosforilacija u respiratornom lancu - oksidativna fosforilacija**

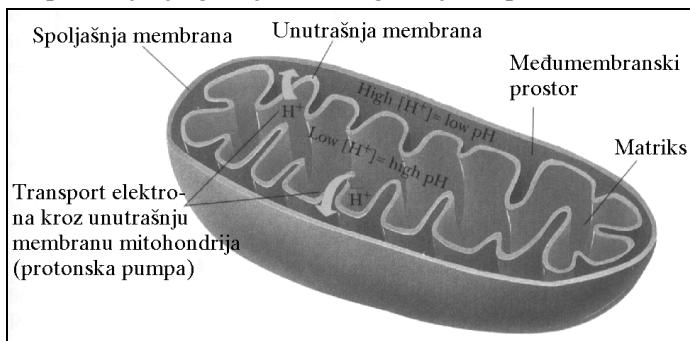
15.2.1. Inhibitori procesa oksidativne fosforilacije i transporta elektrona

### **15.3. Proizvodnja ATP pri potpunoj oksidaciji glukoze**

*Kompleks mitohondrijalne ATP-aze*

Kao što je opisano u poglavlju 11.5 redukujući ekvivalenti NADH i FADH<sub>2</sub> nastaju u glikolizi i CTK ciklusu. Svaka od ovih potencijalno “energijom bogatih molekula” ima par elektrona sa visokim potencijalom prenosa, a slobodna energija nastala za vreme prenosa elektrona može biti iskorištena za sintezu ATP. Energija “upregnuta” u anhidridne veze molekula ATP se koristi za pokretanje brojnih biohemijских procesa u ćeliji. Transport elektrona je omogućen posredovanjem prenosioca elektrona prisutnih u unutrašnjoj membrani mitohondrija. **Lanac prenosa elektrona**, drugačije nazvan **respiratorni lanac**, ima seriju od četiri velika proteinska kompleksa kroz koje elektroni prolaze od nižeg ka višem redoks potencijalu. Samo dva kompleksa, međutim, obično oksiduju oba NADH i FADH<sub>2</sub>. Tok elektrona izaziva protonska pumpa iz matriksa do među-membranskog prostora. Ovaj tok elektrona snažno izaziva nastajanje protonskog gradijenta (pH-gradijent) i membranskog potencijala. Proton teče nazad u matriks različitim putevima ali naročito kroz ATP-sintetazni kompleks ugrađen u membranu za vreme sinteze ATP. Glavna karakteristika ovog procesa je **oksidativna fosforilacija** generisana protonskim gradijentom praćenim membranskim potencijalom.

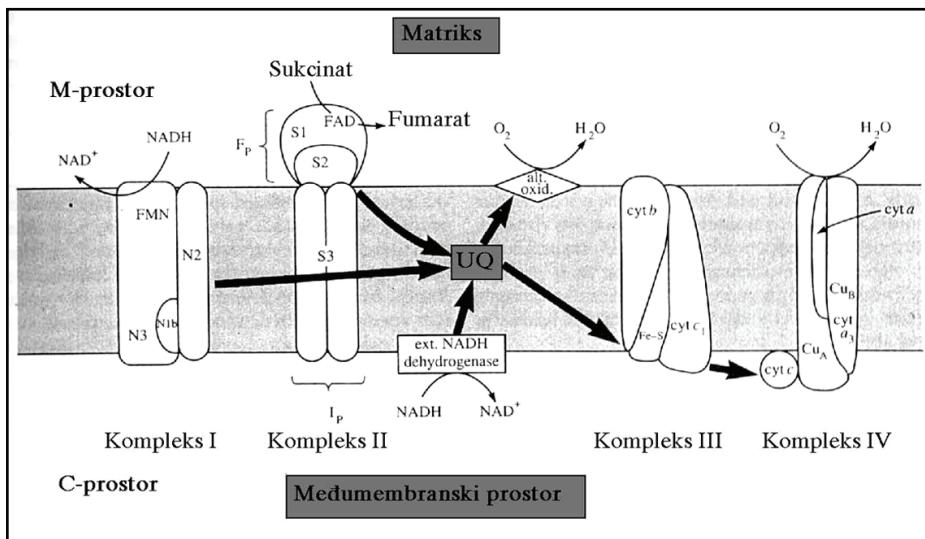
S obzirom da se procesi transporta elektrona i oksidativna fosforilacija odvijaju u mitohondrijama, na slici 15-1 dat je prikaz ove ćelijske organele kao i način formiranja pH-gradijenta. Evidentno je da razlika u koncentraciji H<sup>+</sup> jona dovodi do uspostavljanja gradijenta tzv. gradijenta protona.



Slika 15-1. Gradijent protona- (pH-gradijent) kao rezultat transporta elektrona kroz unutrašnju membranu mitohondrija.

## 15.1. Transport elektrona

Transport elektrona od NADH ili FADH<sub>2</sub> do O<sub>2</sub> kao krajnjeg akceptora preko citohrom oksidaze veoma je sličan kod biljaka i životinja. Glavne komponente respiratornog lanca su organizovane kao četiri multi-proteinske jedinice (kompleksa) koje su inkorporirane u strukturu unutrašnje membrane mitohondrija i prikazane su na slici 15-2.



Slika 15-2.

Rasporeda redoks komponenata unutar unutrašnje membrane mitohondrija. Boldovane strelice pokazuju osnovni put toka elektrona od kompleksa I ili II preko mobilnog pula ubihinona do kompleksa III i IV. Oznake: alt.oxid. = "alternativne oksidaze"; ext.NADH dehidrogenaze = spoljašnja NADH-dehidrogenaza locirana na C-strani (strana međumembranskog prostora) unutrašnje membrane mitohondrija; int.NADH dehidrogenaza = unutrašnja NADH-dehidrogenaza locirana na M-strani (strana matriksa); N1, N2, N3 i S1, S2, S3 = Fe-S-protein centri kompleksa I i II; Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub> = atomi bakra udruženi sa citohromom oksidazom; cyt = citohrom; Fe-S = gvožđe-sumpor protein u kompleksu III.

**Kompleks I** - drugačije nazvan kao NADH-dehidrogenazni kompleks ili NADH-ubihinon (UQ) oksidoreduktaza;

**Kompleks II** - poznatiji kao sukcinat-dehidrogenazni kompleks ili sukcinat-UQ reduktaza;

**Kompleks III** - referisan kao citohrom b/c<sub>1</sub> kompleks ili UQH<sub>2</sub>-citohrom c reduktaza;

**Kompleks IV** - u literaturi poznatiji kao citohrom c oksidaza kompleks.

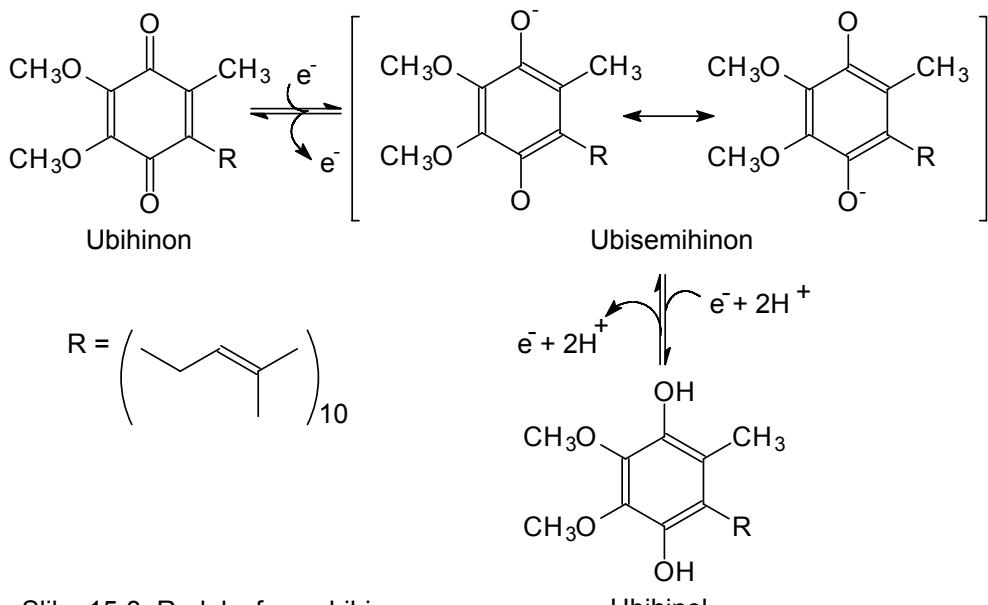
### (a) **Kompleks I**

Prvi kompleks u respiratornom lancu (slika 15-2) je unutrašnja NADH-dehidrogenaza ili NADH-ubihinon (UQ) oksidoreduktaza; koja je odgovorna za oksidaciju NADH i redukciju ubihinona (takođe zvan kao koenzim Q, CoQ, ili UQ). NADH može nastati iz različitih izvora kao što su ciklus limunske kiseline,

oksidacijom piruvata pomoću piruvat-dehidrogenaze ili oksidacijom glicina u zelenim listovima pomoću glicin-dekarboksilaze.

Kompleks I kao najveći, smešten je poprečno kroz celu unutrašnju membranu mitohondrija. Njegov aktivni centar smešten je u prostoru M (prostor matriksa), gde se kao prva odvija reakcija oksidacije NADH u NAD<sup>+</sup>. Posebnom tunelskom jedinicom, koja se proteže od prostora M do prostora C (prostor između krista, međumembranski prostor) u isto vreme dolazi do prelaska H<sup>+</sup> iz prostora M u prostor C. Prenos elektrona odvija se preko kompleksa gvožđe-sumpor proteina (Fe-S protein) na ubihinon (UQ). Ubihinon prihvaćene elektrone prenosi sa enzimskih kompleksa I i II na kompleks III.

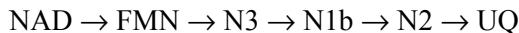
Ubihinon (UQ) je supstituisani 1,4-benzohinon koji sadrži 9 ili 10 izoprenskih (C<sub>5</sub>) jedinica i označavaju se kao Q-9 ili Q-10, mada ubihinoni iz različitih izvora sadrže različit broj izoprenskih jedinica (slika 15-3).



Slika 15-3. Redoks faze ubihinona.

Oksidovani UQ može primiti elektrone i protone do oblika redukovaniog UQ zvan ubihinol ili hidrohinon. Kao intermedijeri ove redukcije javljaju se stabilni ubisemihinoni. Ubihinon je rastvorljiv u lipidima (lipid-solubilan) zbog čega ima ulogu mobilnog redoks prenosioca između kompleksa i unutrašnje membrane mitohondrija.

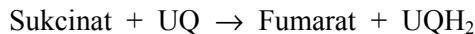
NADH dehidrogenaza-UQ kompleks je izgrađen iz fosfolipida i polipeptida. Kompleks I sadrži nekovalentno vezan flavinmononukleotid (FMN) i tri Fe-S-centra označeni kao N1b, N2 i N3. Predskazani put transporta elektrona u kompleksu I je sledeći:



Prenos elektrona može biti inhibiran rotenonom. Fe-S-centri su sposobni za prenos elektrona samo kroz oksido/redukpcioni  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  centar. Prolaskom elektrona kroz kompleks I, protoni se premeštaju iz matriksa u međumembranski prostor. Odnos  $\text{H}^+/\text{e}^-$  je verovatno 2:1.

### **(b) Kompleks II**

Predstavlja sukcinat-dehidrogenazu (sukcinat-UQ reduktaza; EC 1.6.2.4) koja ima ulogu prenosioca vodonika sa sukcinata na ubihinon. Imajući u vidu da je redoks potencijal isuviše mali nije moguć prenos  $\text{H}^+$  iz prostora M u prostor C kao što je to slučaj sa enzimskim kompleksom I. Kompleks II sadrži dva glavna subkompleksa. Prvi veliki i u vodi rastvorljivi subkompleks sadrži dve subjedinice označene kao Fp i Ip sa Mr 65-67 kDa i 26-30 kDa. Fp subjedinica (flavo-Fe-S-protein) sadrži FAD (kovalentno vezan) i dva gvožđe-sumpor proteina 2Fe-2S konfiguracije, zvani centri S1 i S2. Ip subjedinica sadrži gvožđe-sumpor protein 4Fe-4S kompozicije zvani S3 centar. Drugi subkompleks je hidrofoban i sadrži dva mala polipeptida (7 kDa i 13 kDa). Citohrom b je udružen sa jednim polipeptidom čija funkcija nije poznata ali je ekvimolaran sa FAD. Subjedinice obezbeđuju vezivanje sukcinat-dehidrogenaze za membranu i redukciju ubihinona. One nisu, međutim, učesnici u oksidaciji sukcinata u prisustvu odgovarajućeg akceptora elektroba. Elektroni se prenose od  $\text{FADH}_2$  kroz S1, S2 i S3 do ubihinona.



Kompleks II egzistira kao neaktivni oblik stabilizovan oksalacetatom u ekvimolarnom odnosu 1:1. Inkubacijom sa ATP *in situ* ili ubihinolom enzim se aktivira.

### **(c) Kompleks III**

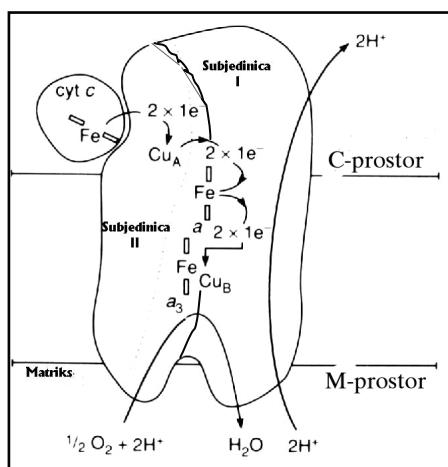
Transfer elektrona od ubihinona do citohroma c odvija se kroz kompleks III označen kao cyt bc<sub>1</sub> kompleks ili UQH<sub>2</sub>-citohrom c reduktaza (EC 1.6.2.4). Ovaj kompleks može se porediti sa plastohinol-plastocianin oksidoreduktazom ili cyt b<sub>6</sub>f kompleksom tilakoida hloroplasta. Kompleks III sadrži tri polipeptida sa redoks grupama: cyt c<sub>1</sub>, cyt b i Fe-S protein poznatiji kao Rajske protein. Ovaj protein ima 2Fe-2S klaster (grupa, grozd) vezan za polipeptid preko kompleksa Fe-2Cys i Fe-2His ostatka. Globularna struktura sa 2Fe-2S centrom se pruža u vodenim slojem (C-prostor) unutrašnje membrane mitohondrija, ali je pričvršćena za membranu pomoću hidrofobnog N-terminalusa. Citohrom c<sub>1</sub> je takođe globularan ali hidrofobni C-terminus je vezujuća strana. Citohrom b subjedinica veže dva hema. Jedan hem,

poznat kao  $b_1$  (takođe zvan  $b_{565}$  jer je to njegov  $\alpha$ -absorpcioni pik) je lociran na unutrašnjoj strani (tzv. P-faza ili P-strana) membrane i drugi hem,  $b_H$  (takođe zvan  $b_{560}$ ) je na matriks strani membrane (tzv. N-faza).

Enzimski kompleks III omogućuje prenos elektrona sa ubihinona na citohrom b, a potom posredstvom Fe-S proteina, koji je povezan sa citohromom b, na citohrom  $c_1$  koji je smešten uz sam obod prostora C. Prisutna razlika u elektropotencijalima i komponentama gde deluje enzimski kompleks III omogućuje prenos  $H^+$  kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu od prostora M ka prostoru C. Prenos elektrona se verovatno dešava kroz tzv. *Q-ciklus*. Prenosioci elektrona su aranžirani kroz unutrašnju membranu mitohondrija tako da se elektroni prenose u jednom pravcu a vodonik u drugom što rezultira stvaranje pH-gradijenta ili protonske pumpe. Verovatni odnos  $H^+/e^-$  je 2. Iz slike 15-2 se vidi da citohrom  $c_1$  nije u sastavu unutrašnje membrane mitohondrija, već je sa strane porostora C povezan sa ovom membranom.

#### (d) Kompleks IV

Citohrom oksidaza (EC 1.9.3.1), kompleks IV, obuhvata unutrašnju membranu mitohondrija. To je terminalna oksidaza respiratornog lanca u prenosu elektrona od cyt c do  $O_2$  (slika 15-4). Citohrom c nije integralni deo kompleksa IV, ali je stehiometrijski udružen s' njim i verovatno prostorno udružen sa subjedinicom II citohrom-oksidaze. Citohrom c je u vodi rastvorljiv prenosilac elektrona i egzistira u međumembranskom prostoru između unutrašnje i spoljašnje membrane mitohondrija. On može difundovati slobodno u ovaj prostor prenoseći elektrone između citohroma  $c_1$  iz kompleksa III i citohroma a iz kompleksa IV. Struktura ovog kompleksa je dobro proučena iz različitih izvora; hem je definitivno smešten u hidrofobnom delu ovog kompleksa.



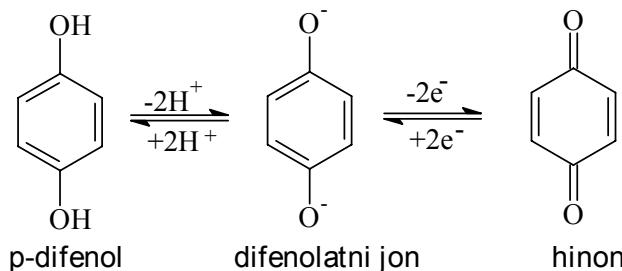
Slika 15-4. Hipotetična struktura citohrom oksidaze (kompleks IV).

Kompleks IV može biti inhibiran različitim agensima; azidom, cijanidom ili CO. Kompleks IV iz mitohondrija slatkog krompira sadrži dva citohroma a i  $a_3$  i dva atoma bakra (označeni kao Cu<sub>A</sub> i Cu<sub>B</sub>). Gvožđe-(III)-citohrom i Cu<sub>A</sub> su paramagnetični i vidljivi su pomoću elektroparamagnete rezonantne spektroskopije (EPR). Cu<sub>B</sub> je antiferimagnetičan kuplovan sa cyt  $a_3$  na aktivnoj

strani enzima i stoga je nevidljiv pomoću EPR spektroskopije. Citoхrom c oksidaza je kompleks sa više od deset subjedinica, ali samo dve od tri velike subjedinice sadrže redoks centre koji su važni za prenos elektrona. Obe njih i Cu<sub>B</sub> su u velikoj subjedinici (subjedinica I), a Cu<sub>A</sub> je u maloj subjedinici (subjedinica II). Kao što pokazuje slika 15-4 cyt c koji egzistira u međumembranskom prostoru je izvor elektrona koji se prenose do Cu<sub>A</sub>. Cu<sub>B</sub> i hem a<sub>3</sub> su dvostruki centri u subjedinici I locirani na matriksnoj strani membrane koji primaju jedan elektron od Cu<sub>A</sub>. Drugi elektron predaju kiseoniku koji sa H<sup>+</sup> iz matriksa daju vodu.

### 15.1.1. Redukcioni potencijali bioloških redoks sistema

Redoks reakcije prikazane slikom 15-3 pokazuju tok elektrona saglasno redukcionim potencijalima komponenata u reakciji. Treba naglasiti da se uz prenos elektrona vrši i prenos H<sup>+</sup> što pokazuje i sledeća reakcija:



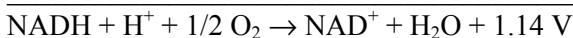
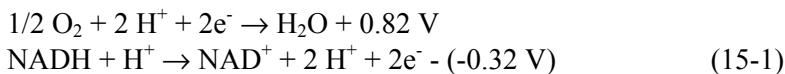
Odvijanje redoks procesa omogućeno je postojanjem određenih redukcionih potencijala pojedinih komponenti koje učestvuju u ovim reakcijama. S' obzirom da u većini biohemijskih redoks procesa učestvuju H<sup>+</sup> joni, njihova koncentracija bi morala biti  $c(H^+) = 1 \text{ mol/dm}^3$ , odnosno da bi se mogli odrediti tzv. standardni potencijali pH bi trebalo da bude 0. Međutim, u živim ćelijama enzimski sistemi pri ovako niskoj pH vrednosti su inaktivni, te se sva merenja moraju odvijati u "fiziološkim uslovima". Zbog toga se u biohemijskim procesima računa sa potencijalom reakcione sredine na neutralnoj pH vrednosti (pH=7), što se označava kao E<sup>o</sup>. Neki standardni redukcioni potencijali E<sup>o</sup> na pH 7 u poznatim biološkim redoks sistemima dati su u tabeli 15-1.

Tabela 15-1. Neki standardni redukcionи potencijali bioloških sistema.

R e a k c i j a	$E^{\circ}$ (volt)
$\alpha$ -ketoglutarat + 2e <sup>-</sup> → sukcinat + CO <sub>2</sub>	- 0.67
2 H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → H <sub>2</sub>	- 0.42
NAD <sup>+</sup> + 2 H <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> → NADH + H <sup>+</sup>	- 0.32
fumarat + 2 H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → sukcinat	0.03
2 citohrom b <sub>ox</sub> (Fe(III)) + 2e <sup>-</sup> → 2 citohrom b <sub>red</sub> (Fe(II))	0.07
2 citohrom c <sub>ox</sub> (Fe(III)) + 2e <sup>-</sup> → 2 citohrom c <sub>red</sub> (Fe(II))	0.22
2 citohrom a/a <sub>3</sub> ox(Fe(III)) + 2e <sup>-</sup> → 2 citohrom a/a <sub>3</sub> red(Fe(II))	0.38
1/2 O <sub>2</sub> + 2 H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → H <sub>2</sub> O	0.82

Iz navedene tabele se uočava da je najnegativniji redukcionи potencijal E<sup>°</sup> u reakciji nastajanja sukcinata iz  $\alpha$ -ketoglutarata (-0.67 V), a najpozitivniji redukcionи potencijal E<sup>°</sup> pri nastajanju vode iz vodonika i kiseonika (+0.82 V).

Imajući u vidu redukcionе potencijale, u reakcijama prenosa elektrona i nastajanja oksidovanog oblika NAD<sup>+</sup> i molekula vode dolazi do sledećih redoks procesa (reakcija 15-1):



S' obzirom da konačan redukcionи potencijal E<sup>°</sup> u reakciji 15-1 iznosi +1.14 V, ovaj transport elektrona predstavlja egzogenу reakciju. Kako između redukcionog potencijala i promene slobodne energije postoji korelacija:

$$\Delta G^{\circ} = - nFE^{\circ}$$

pri čemu  $n$  predstavlja broj elektrona transportovanih u toku reakcije, a  $F$  je Faradejeva konstanta ( $F = 96\ 400 \text{ J/V}$ , džul/volt po molu oksidovane supstance) moguće je izračunati promenu slobodne energije u jednačini 15-1. U ovoј reakciji transportovana su po dva elektrona na svaki molekul NADH:

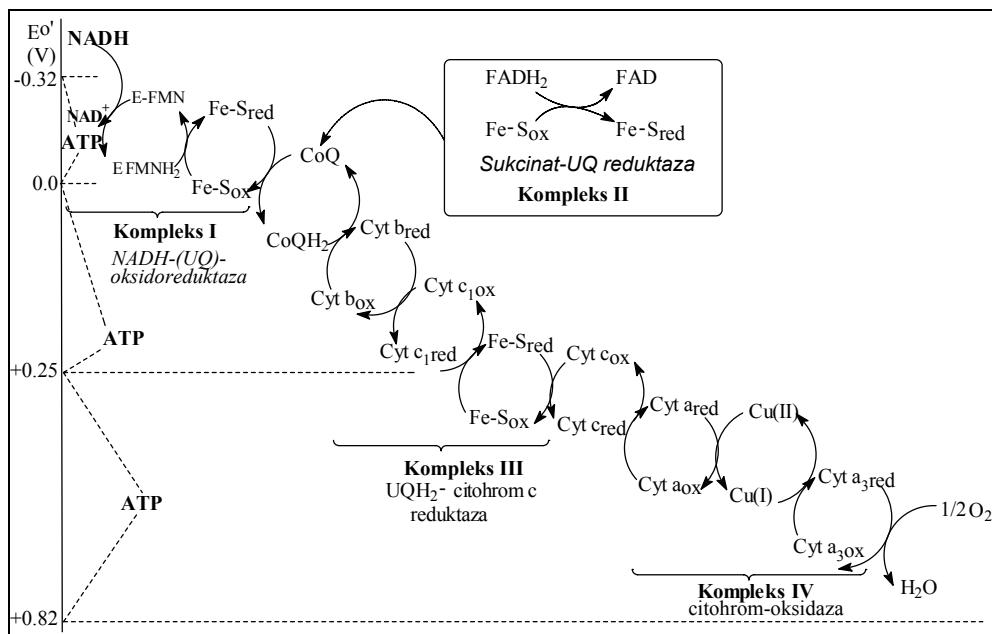
$$\Delta G^{\circ} = - 2 \times 96\ 400 \text{ J/V} \text{ na mol NADH} \times 1.14 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ} = - 220 \text{ kJ/mol NADH} = - 52.6 \text{ kcal/mol}$$

Dobijena promena slobodne energije u ovoj reakciji pokazuje da je transport elektrona u respiratornom lancu egzogeni proces.

Prenos elektrona, počev od NADH, kao početnog intermedijera u respiratornom lancu, do O<sub>2</sub> kao elektron-akceptora, odvija se kaskadno kao što je napred navedeno uz učešće 4 enzimska kompleksa koji su povezani sa unutrašnjom membranom mitohondrija.

Na slici 15-5 prikazan je tok transporta elektrona u respiratornom lancu prema redoks potencijalu učesnika u prenosu elektrona.

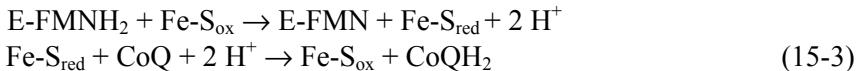


Slika 15-5. Shematski prikaz lanca transporta elektrona i redukcionih potencijala bioloških redoks sistema - prenosioca elektrona.

**Prvi kompleks** - (*NADH-CoQ oksidoreduktazu*) katalizuje prvi stepen prenosa elektrona od NADH do koenzima Q. Ovaj kompleks sadrži gvožđe-sumpor (Fe-S) i flavoprotein (FMN) kompleks koji oksiduje NADH do NAD<sup>+</sup>. Njihova uloga je u prenosu elektrona i protiona. Pritom se FMN kovalentno veže za enzim. Tok reakcije je postepen. Prvo se vrši prenos elektrona sa NADH na flavinski deo flavoproteina pri čemu se NADH oksiduje do NAD<sup>+</sup>, a flavoprotein redukuje do E-FMNH<sub>2</sub> (reakcija 15-2).



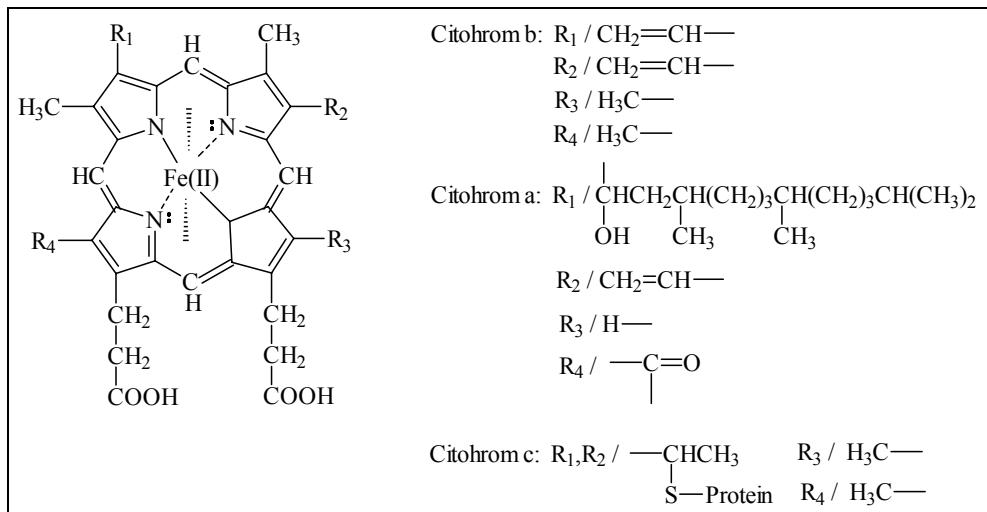
**Drugi kompleks** - (*sukcinat-UQ reduktaza*) katalizuje reakcije u kojima se redukuje CoQ (UQ). Nastali E-FMNH<sub>2</sub> se reoksiduje preko prisutnog CoQ, a elektroni se prenose na Fe-S protein prema reakciji 15-3.



Gvožđe u Fe-S proteinu je nosilac redoks procesa pri čemu menja oksidaciono stanje Fe<sup>2+</sup> u Fe<sup>3+</sup>.

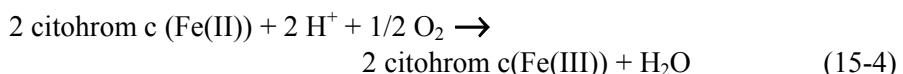
**Treći kompleks** - (*UQH<sub>2</sub>-citohrom c reduktaza*) katalizuje oksidaciju koenzima Q. Komponente ovog kompleksa su citohrom b, citohrom c<sub>1</sub> i gvožđe-sumpor protein (tzv. Fe-S-protein). I ovaj multienzimski kompleks, kao i NADH-CoQ oksidoreduktaza, je integralni deo unutrašnje membrane mitohondrija. Na slici 15-6 prikazane su strukture citohroma a, b i c.

Prenos elektrona praktično se u ovom delu respiracije odvija počev od CoQ, preko citohroma b, citohroma c<sub>1</sub> i Fe-S proteina do citohroma c. Pritom redukovani oblici CoQ, citohroma b, citohroma c<sub>1</sub> i citohroma c, predajom elektrona sa jedne na drugu komponentu multienzimskog kompleksa II, prelaze u oksidovane oblike CoQ<sub>ox</sub>, citohrom b<sub>ox</sub>, citohrom c<sub>1 ox</sub> i citohrom c<sub>ox</sub>.



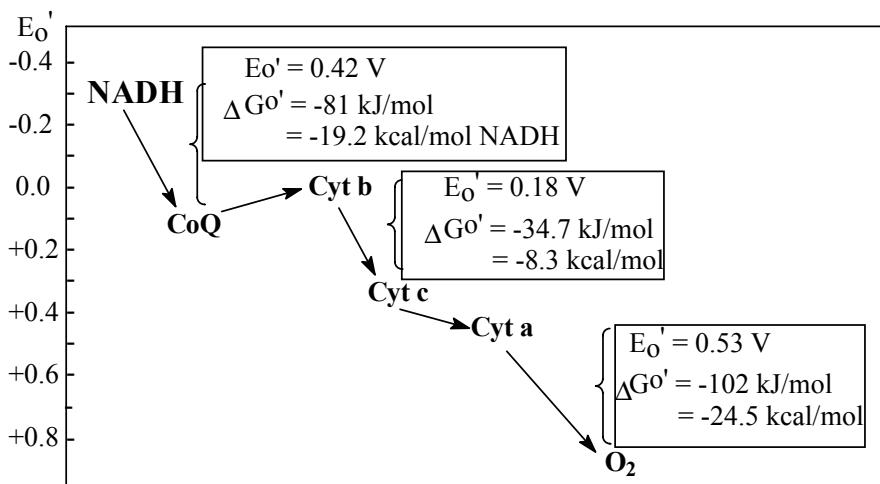
Slika 15-6. Strukture citohroma a, b i c.

**Četvrti kompleks** - (*citohrom-oksidaza* EC 1.9.3.1), koji oksiduje poslednji stepen prenosa elektrona sa citohroma c na kiseonik pri čemu nastaje molekul H<sub>2</sub>O kao krajnji proizvod respiratornog lanca (reakcija 15-4).



Kao intermedijерне komponente ovog kompleksa pojavljuju se citohromi a i a<sub>3</sub>, kao i dva bakarna jona koji takodje učestvuju u transportu elektrona.

Imajući u vidu napred navedene reakcione faze transporta elektrona i učešća četiri respiratorna multienzimska kompleksa, moguće je odrediti i ukupan energetski bilans transporta elektrona od NADH do akceptorskog molekula O<sub>2</sub>. Na slici 15-7 prikazana je promena redoks potencijala, a s tim u vezi i promena slobodne energije ( $\Delta G^\circ$ ) kao posledica transporta elektrona u respiratornom lancu.



Slika 15-7. Energija prenosa elektrona od NADH do O<sub>2</sub>.

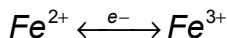
S obzirom da respiratori lanac omogućuje oksidaciju redukovanih koenzimskih struktura, pre svih NADH sa molekulskim kiseonikom prisutnim u ćelijama (koji je akceptor elektrona) može se odrediti i razlika elektropotencijala od 1.13 V, odnosno ekvivalentna oslobođena energija  $\Delta G^\circ$  od -218 kJ/mol. Ova energija je veoma velika za jednu biohemijsku reakciju, te zbog toga proces prenosa elektrona teče kaskadno, uključujući sve poznate intermedijere pojedinih multienzimskih respiratornih kompleksa. Na ovaj način ukupna energija oslobođena u toku odvijanja svih pomenutih reakcija respiratornog lanca ugradjuje se postepeno u tri energijom bogata molekula ATP.

Elektrohemijska energija nastala u toku odvijanja respiratornih redoks reakcija, uz prisutnu mitohondrijalnu *ATP-sintetazu* (ATPaza; EC 3.6.1.3), akumulira se u obliku ATP. Ovaj proces se naziva "oksidativna fosforilacija", odnosno fosforilacija u respiratornom lancu.

Na slici 15-7 se uočava da prvi molekul ATP nastaje pri prelazu elektrona, odnosno vodonika sa NADH na ubihinon (CoQ), drugi prelazom elektrona sa ubihinona na citohrom c, a treći molekul nakon prelaza elektrona sa citohroma c na molekulski kiseonik.

Razna merenja energetskog bilansa respiratornog lanca pokazala su da uvek na 1/2 O<sub>2</sub> (1 H<sub>2</sub>O) nastaju 3 molekula ATP. Ovaj odnos se označava kao P/O koeficijent. Tri mola ATP nastaju ukoliko učestvuje NADH. Međutim, ako je prisutan flavoprotein, koji oksiduje sukcinat, nastaju samo dva mola ATP na molekul H<sub>2</sub>O, mada u novijoj literaturi se navodi da i pri oksidaciji FMNH<sub>2</sub> takođe nastaju tri mola ATP po molu oksidovanog FMNH<sub>2</sub>.

Radi boljeg razumevanja uloge citohroma neophodno je napomenuti da ova jedinjenja predstavljaju elektron-transportne proteine u kojima centralno mesto zauzima Fe koje je vezano za porfirinski prsten. Prenos elektrona izaziva promenu valence gvožđa



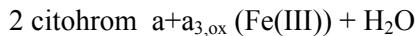
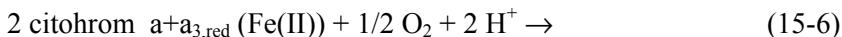
*Citohrom c* - je dobro proučen i strukturno određen hemoproteid, koji ne reaguje sa kiseonikom niti sa CO, jer je prostetična grupa duboko uronjena u unutrašnjost proteinskog skeleta.

*Citohrom b* - ima niži redoks potencijal od ostalih citohroma i strukturno je povezan sa citohromom c<sub>1</sub>. Ispitivanja su pokazala da postoje dva funkcionalno različita tipa citohroma b.

*Citohromski sistem a+a<sub>3</sub>* (citohrom oksidaza) - ima veoma značajnu ulogu u respiratornom lancu jer elektrone koje prima od citohroma c direktno predaje prisutnom molekulskom kiseoniku. U ovom procesu prenosa elektrona sa citohroma c na kiseonik prvo se uključuje citohrom a, a potom i citohrom a<sub>3</sub>. Redukovani kompleks citohroma a+a<sub>3</sub> se oksiduje pomoću kiseonika, koji sa vodonikom daje vodu prema reakciji:



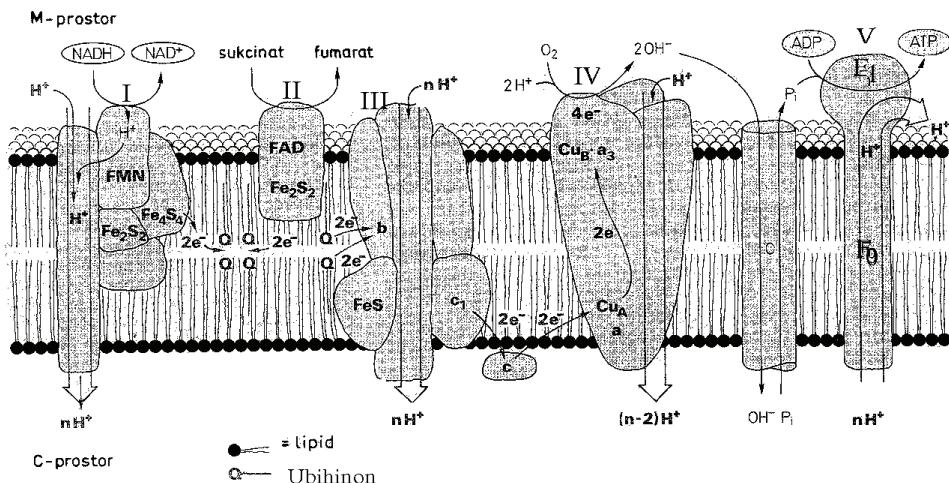
U ukupnom prikazu reakcija poslednje faze respiratornog lanca dobijamo sledeću reakciju:



Bitno je napomenuti da citohromi ispoljavaju svoju funkcionalnost samo u medjusobnom sadejstvu (cit b i cit c<sub>1</sub>, zatim citohrom c i citohrom oksidaza), te je njihovo pojedinačno dejstvo na metabolite isključeno.

## 15.2. Fosforilacija u respiratornom lancu-oksidativna fosforilacija

Zahvaljujući rezultatima dobijenim na elektronskom mikroskopu i mnogim primjenjenim efektima elektronske mikrografije određen je tačan raspored enzimskih kompleksa respiratornog lanca u unutrašnjoj membrani miotohondrija. Na slici 15-8 shematski je prikazan presek unutrašnje membrane sa rasporedom enzimskih kompleksa.



Slika 15-8.

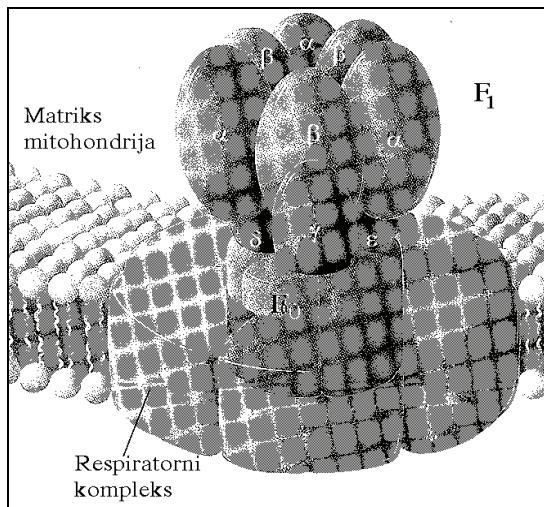
Shematski prikaz unutrašnje membrane mitohondrija sa enzimskim kompleksima prenosa elektrona (kompleksi I - IV) i sinteze ATP (kompleks V).

Enzimski kompleksi respiratornog lanca, koji su obeleženi I, II, III, IV i V imaju veoma odredjene katalitičke uloge u pojedinim faznim reakcijama respiracije odnosno prenosa elektrona i sinteze ATP. Kompleksi I - IV su komentarisani ranije dok će o kompleksu V biti reči u ovom odeljku.

**Kompleks V** - obuhvata ATP-sintetazu (EC 3.6.1.3) koja katalizuje oksidativnu fosforilaciju, odnosno fosforilaciju ADP sa P<sub>i</sub> do ATP. U sastavu ovog kompleksa pojavljuju se i faktori kopulacije označeni kao F<sub>o</sub> i F<sub>1</sub>.

Znatan deo oslobođene energije u oksidacionim reakcijama, pri prenosu elektrona tokom procesa respiracije, koristi se za fosforilaciju molekula ADP. Ova funkcija mitohondrija jedna je od najvažnijih jer predstavlja osnovni bioenergetski sistem koji se odvija na nivou ovih ćelijskih organela.

Dokazano je da postoje tri mesta u respiratornom lancu gde se, u toku transporta elektrona, vrši fosforilacija ADP ( $ADP + P_i$ ) do ATP. Na ovaj način se energija oslobođena procesom oksidacije NADH do  $NAD^+$  deli u tri "paketa", koji omogućuju stvaranje po jednog molekula ATP po svakom "energetskom paketu". Slično složenom multienzimskom sistemu, koji katalitički deluje pri transportu elektrona u respiro-tornom lancu, u mitohondrijskoj postoji i složena, a uz to i veoma efikasna enzimska struktura koja katalizuje sintezu ATP. Ovu ulogu vrši enzim *ATP-sintetaza* (slika 15-9).



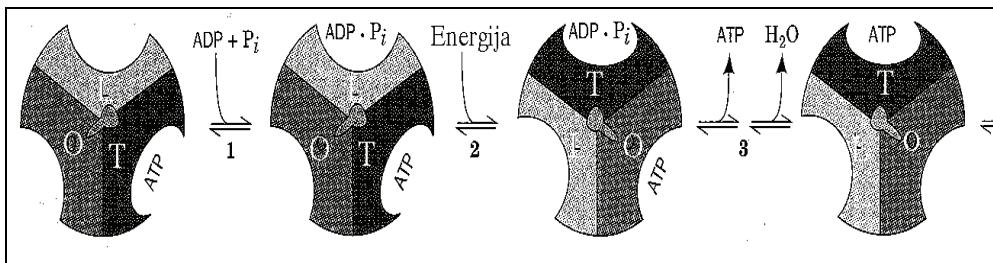
Slika 15-9.

Kompleks V sa faktorima kopula-cije (kopulacioni faktori)  $F_o$  i  $F_1$  ugrađeni u unutrašnju membranu mitohondrija.

Fosforilacija ADP, odnosno biosinteza ATP, vrši se na tzv. ATP-sintetaznom kompleksu (kompleks V), koji je smešten delimično u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani, a jednim delom nalazi se i u matriksu. Ovaj kompleks se sastoji iz proteina koji imaju različite funkcije, a nazivaju se faktori kopulacije i označavaju se sa  $F_o$  i  $F_1$ .  $F_o$  kopulacioni faktor, koji se sastoji od 4 različite polipeptidne podjedinice, omogućuje protok elektrona, a energija koja se pritom oslobadja prenosi se na kopulacioni faktor  $F_1$ .  $F_1$  deluje kao ATP-sintetaza, ali se naziva i ATP-sintaza ( $F_1$ -ATP-aza), jer reversno vrši hidrolitičko cevanje ATP na ADP i  $P_i$ . Ovaj faktor sastoji se iz pet različitih i međusobno povezanih podjedinica polipeptidnog lanca označenih sa  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  (slika 15-9).

**Mehanizam sinteze ATP** - Iako mehanizam stvaranja ATP još uvek nije u potpunosti razjašnjen, verovatno je hipoteza o konformacionoj promeni proteinske strukture faktora kopulacije  $F_1$  pri sintezi ATP najpričinjija.

Konformaciona promena vezana je sa postupnim utroškom energije. Na slici 15-10 prikazan je hipotetički put sinteze ATP.



Slika 15-10.

Energetsko-zavisni mehanizam promjenjenog vezivanja pri sintezi ATP. Mehanizam se odvija prenosom protona, regulisanom aktivnošću enzima ATP-sintaze.

Kopulacioni faktor  $F_1$  ima tri hemijski identična, ali konformaciono različita  $\alpha\beta$  protomera: **O** - otvorene konformacije, sa malim afinitetom za ligande (katalitički neaktivran); **L** - sa labavim vezivanjem liganda (katalitički neaktivran) i **T** - sa čvrstim vezivanjem liganda (katalitički aktivran) (*D.Voet, J.Voet, Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1995. str.590; sl.20.31*).

Analizom slike uočava se da, pri sintezi ATP, postoje tri konformaciona oblika (L, O i T), koji trpe odredjene konformacione promene u zavisnosti od trenutne uloge.

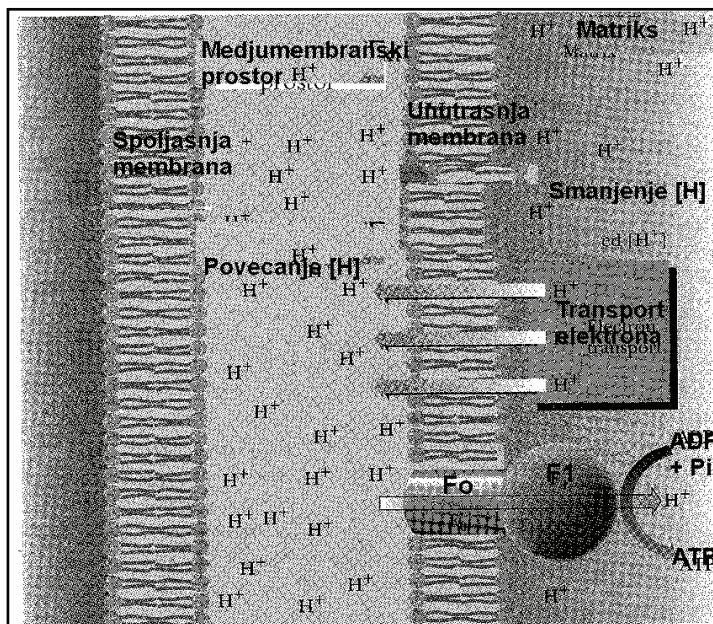
Sinteza ATP odvija se u tri faze: (1) Vezivanje ADP i Pi za mesto L. (2) Konformaciona promena pretvaranja vezujućeg mesta L u T, T u O i O u L uz utrošak energije. (3) Sinteza ATP na mjestu T i oslobadjanje ATP sa mesta O. Enzim se vraća u osnovno stanje posle još dva ponavljanja ove reakcione sekvence. Energija koja pokreće konformacione promene se prenosi na katalitičko mesto  $\alpha_3\beta_3$  putem rotacije  $\gamma\beta\epsilon$  mesta koje je na slici predstavljeno centralno lociranim asimetričnim objektom.

S' obzirom da su kopulacioni faktori  $F_o$  i  $F_1$  smešteni u poprečnoj strukturi unutrašnje membrane mitohondrija, odnosno na strani matriksa, to se i biosinteza ATP odvija u prostoru matriksa (slika 15-11).

Ova biosinteza ATP uslovljena je vraćanjem protona ( $H^+$ ) u prostor matriksa. Neka merenja su pokazala da je za sintezu svakog molekula ATP neophodan povratak 3  $H^+$ , a s' obzirom da je za transport fosfata potreban još jedan energetski ekvivalent protona, to je ukupan utrošak 4  $H^+/1$  ATP. Kako je već ranije pomenuto ATP-sintetaza može katalitički delovati i kao ATP-sintaza pri čemu se ATP hidrolitički cepa na ADP i  $P_i$  uz istovremeni transport protona ka medjumembranskom prostoru, što predstavlja aktivni transport  $H^+$ .

Ova pojava praktično predstavlja stvaranje tzv. protonskog gradijenta. Na slici prikazano je stvaranje povećane koncentracije  $H^+$  jona u medjumembranskom

prostoru i njihov povratan tok u matriks mitohondrija što, uz učešće i drugih faktora, dovodi do sinteze ATP.



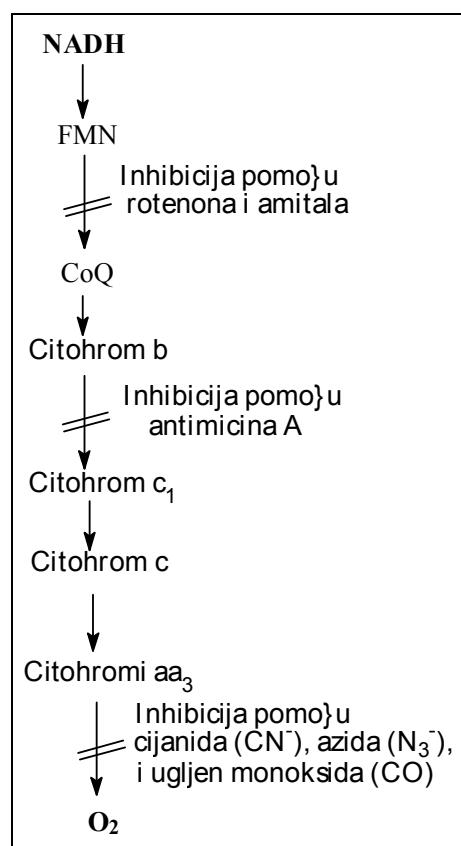
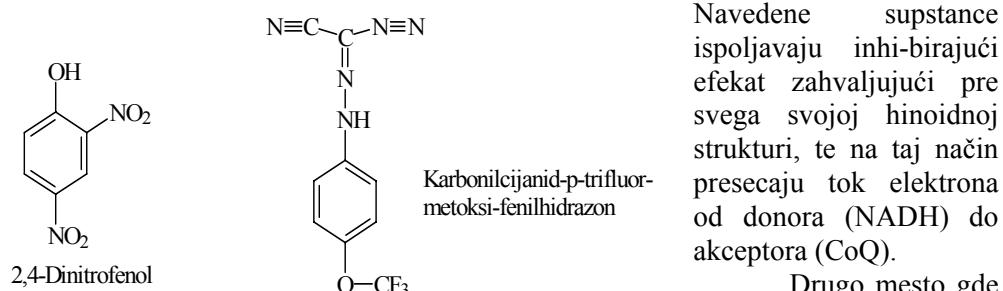
Slika 15-11. Uloga unutrašnje membrane pri stvaranju protonskog gradijenta i sintez ATP. (M.K.Campbell, *Biochemistry*, Saunders College Publishing,London, 1991. str.378; sl.15.12).

### 15.2.1. Inhibitori procesa oksidativne fosforilacije i transporta elektrona

U idealnim uslovima tok reakcija respiratornog lanca, uz aktivno katalitičko delovanje enzimskih kompleksa, odvija se prema već pomenutim reakcionim putevima. Oksidativna fosforilacija, kao proces stvaranja hemijskih veza bogatih energijom u vidu ATP, takođe se u ovim uslovima odvija prema prikazanim reakcijama, dok se prenos elektrona u elektron-transportnom lancu odvija bez zastoja. Međutim, ukoliko su u sredini u kojoj se odvijaju ovi procesi prisutna sredstva koja imaju inhibirajuće dejstvo na pojedine faze reakcije, doći će do blokade i prekida ovih procesa. U ulozi inhibitora fosforilacije ADP sa  $P_i$  do ATP javljaju se dinitrofenol, supstituisani fenilhidrazoni (karbonilcijanid - p-trifluormetoksi-fenilhidazon), karbonilcijanid-m-hlorfenilhidazon (CCCP) i dr. Ova sredstva ne blokiraju disanje (respiraciju) mitohondrija, dok npr. oligomicin ima inhibirajuće dejstvo i na respiraciju, posebno ukoliko je respiratori lanac

čvrsto povezan sa procesom fosforilacije. Ako sistemi fosforilacije i respiracije nisu blisko povezani ne dolazi do blokade oba procesa, odnosno najčešće ne dolazi do blokade procesa disanja.

U respiratornom lancu prenosa elektrona u mitohondrijama, postoje tri mesta u kojima neke supstance ispoljavaju izrazito inhibirajuće delovanje. (slika 15-12). Ove supstance mogu biti kako organskog tako i neorganskog porekla. Prva tačka inhibicije, koju izazivaju barbiturati (npr. amital), predstavlja prenos elektrona sa NADH i flavoproteina na koenzim Q. U ovoj tački i rotenon deluje inhibirajuće.

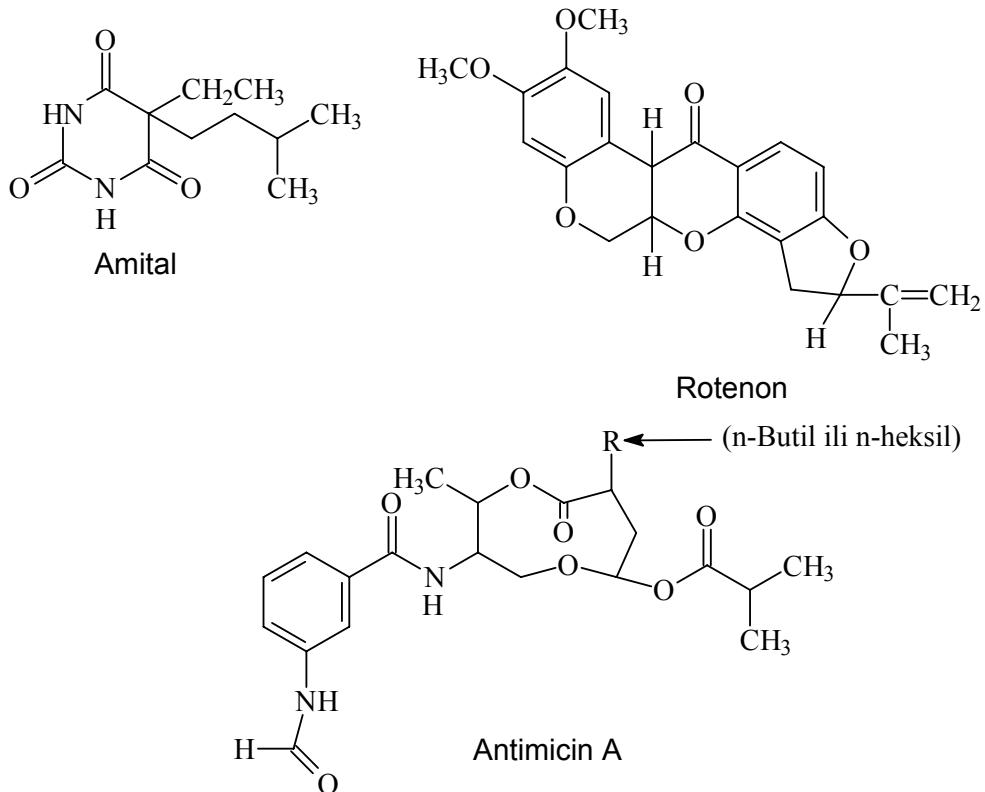


Drugo mesto gde se vrši blokada je u toku prenosa elektrona sa citohroma b na citohrom  $c_1$ . Ovu inhibiciju izaziva antimicin A.

Treća tačka u lancu prenosa elektrona gde može doći do blokade nalazi se pri prenosu elektrona sa kompleksa citohroma a/a<sub>3</sub> na molekulski kiseonik. Ovu inhibiciju izazivaju izmedju ostalih i supstance neorganskog porekla kao npr. cijanidni joni ( $CN^-$ ), azidi ( $N_3^-$ ) i ugljen monoksid (CO).

Slika 15-12.  
Moguća mesta inhibicije u respiratornom lancu prenosa lektrona.

Strukture nekih respiratornih inhibitora koji mogu biti uključeni u transport elektrona u respiratornom lancu date su na slici 15-13.



Slika 15-13. Strukture nekih respiratornih inhibitora.

### 15.3. Proizvodnja ATP pri potpunoj oksidaciji glukoze

Kao što je u prethodno obrađenim poglavljima (poglavlje 11) objašnjeno potpuna razgradnja, odnosno oksidacija glukoze vodi do nastanka krajnjih proizvoda vode i ugljjenioksida. U toku ovog relativno dugog i veoma složenog procesa dolazi do stvaranja energijom bogatih hemijskih veza ATP, što je zbirno prikazano i u tabeli 15-2. Pritom dolazi i do značajnog obnavljanja NADH i  $\text{FADH}_2$ , koji se ponovo uključuju u metaboličke redoks reakcije.

Tabela 15-2.

Prikaz ukupnih promena ATP, NADH i FADH<sub>2</sub> pri potpunoj oksidaciji molekula glukoze.

Reakcije	NADH	FADH <sub>2</sub>	ATP
<b><u>Reakcije u citoplazmi:</u></b>			
<b>Glikoliza:</b>			
1. glukoza → glukoza-6-fosfat			-1
2. fruktoza-6-fosfat → fruktoza-1,6-P			-1
3. 1,3-difosfoglicerat → 2(3-fosfoglicerat)			+2
4. fosfoenolpiruvat → 2 piruvata - Oksidacijom gliceraldehid-3-fosfata (2 molekula)	+2		+2
<b><u>Reakcije u mitohondrijama:</u></b>			
1. piruvat → acetil-CoA (2 molekula)	+2		
<b>Ciklus trikarbonskih kiselina (CTK)</b>			
1. sukcinil-CoA; formiranje GDP → GTP			
2. oksidacija sukcinata (2 molekula) oksidacija po 2 molekula izocitrata, ketoglutarata i malata	+6	+2	+2
<b>Oksidativna fosforilacija i transport elektrona</b>	—		
1. Reoksidacija NADH nastalog glikolizom	-2		+6
2. Reoksidacija NADH iz reakcije (piruvat → acetil-CoA)	-2		+6
3. Reoksidacija FADH <sub>2</sub> nastalog u CTK	-6	-2	+4
4. Reoksidacija NADH u CTK			+18
	0	0	38

## Izvod

♣ Mitohondrije su ćeljske organele u kojima se odvijaju procesi respiracije i oksidativne fosforilacije.

♣ **Lanac prenosa elektron**, poznatiji kao **respiratorni lanac** ima seriju od četiri velika proteinska kompleksa kroz koje elektroni prolaze shodno redupcionim potencijalima ekvivalentima u prenosu.

♣ *Kompleks I*, drugačije nazvan kao NADH-dehidrogenazni kompleks ili NADH-ubihinon (UQ) oksidoreduktaza; *Kompleks II*, poznatiji kao sukcinat-dehidrogenazni kompleks ili sukcinat-UQ reduktaza; *Kompleks III*, referisan kao citohrom b/c<sub>1</sub> kompleks ili UQH<sub>2</sub>-citohrom c reduktaza; *Kompleks IV*, u literaturi poznatiji kao citohrom c oksidaza.

♣ Tok elektrona izaziva protonska pumpa iz matriksa do međumembranskog prostora. Ovaj tok elektrona snažno izaziva nastajanje proton-gradijenta (pH-gradijent) i membranskog potencijala. Proton teče nazad u matriks različitim putevima ali naročito kroz ATP-sintezni kompleks ugrađen u membranu za vreme sinteze ATP. Glavna karakteristika ovog procesa je **oksidativna fosforilacija** generisana proton-gradijentom praćen membranskim potencijalom.

♣ *Kompleks V* - obuhvata ATP-sintetazu (EC 3.6.1.3) koja katalizuje oksidativnu fosforilaciju, odnosno fosforilaciju ADP sa P<sub>i</sub> do ATP. U sastavu ovog kompleksa pojavljuju se i faktori kopulacije označeni kao F<sub>o</sub> i F<sub>1</sub>.

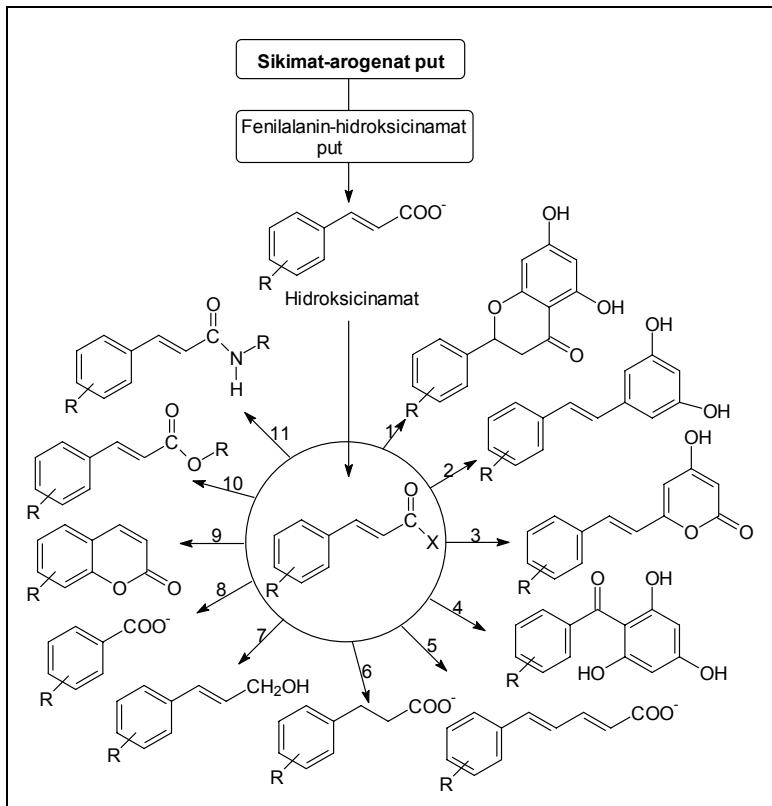
♣ **Mehanizam sinteze ATP** - Iako mehanizam stvaranja ATP još uvek nije u potpunosti razjašnjen, verovatno je hipoteza o konformacijskoj promeni proteinske strukture faktora kopulacije F<sub>1</sub> pri sintezi ATP najpribližnija.

♣ S' obzirom da su kopulacioni faktori F<sub>o</sub> i F<sub>1</sub> smešteni u poprečnoj strukturi unutrašnje membrane mitohondrija, odnosno na strani matriksa, to se i biosinteza ATP odvija u prostoru matriksa

♣ Oksidativnu fosforilaciju i transport elektrona inhibiraju različite supstance kako organskog ( dinitrofenol, fenilhidrazin, aurovertin, rotenon, amital i dr.) tako i neorganskog porekla ( CN, N<sub>3</sub>, CO itd.).

♣ Potpunom oksidacijom jednog molekula glukoza izdvaja se 38 molekula ATP.

### III D E O



## Sekundarni Biomolekuli

(Shema centralne uloge hidroksicinamata u formiranju različitih fenilpropanoida. Dey, P.M., and J.B.Harborne. Plant Biochemistry (P.M.Dey, J.B.Harborne, ads.), Academic Press, London, 1997.)

Po tradiciji se sva hemijska jedinjenja koja sintetizuju biljke dele na *primarne* i *sekundarne* biomolekule. Sekundarni biomolekuli su takva jedinjenja koja se najviše nalaze u biljkama, ali direktno ne učestvuju u primarnim biohemijskim aktivnostima. I pored toga oni mogu biti veoma značajni za biljke jer ih štite od napada bakterija, virusa i gljiva (analogno imunom sistemu životinja) i kao sirovine za razne industrijske grane. Oni su uzrok osnovne razlike između biljaka i životinja. Biljke sintetizuju i akumuliraju sekundarne biomolekule zavisno od svojih nutricionih resursa, genetičkog potencijala i ekoloških svojstava. Primenom novih analitičkih metoda u biohemijskim istraživanjima biljaka omogućeno je izolovanje i određivanje strukture velikog broja sekundarnih biomolekula. Smatra se da su danas poznate strukture desetine hiljada sekundarnih biomolekula što predstavlja samo 2% od ukupnog njihovog potencijala u biljkama. Zbog činjenice da većina sekundarnih biomolekula ima izraženu fiziološko-biohemiju aktivnost to su danas u eri raka i side i dr. teških bolesti, kao i veoma otrovnih sintetičkih pesticida, herbicida i insekticida sve oči uperene u biljke. One se sakupljaju, bilo da su samonikle ili gajene, potom se aktivne supstance (sekundarni biomolekuli) iz njih ekstrahuju, frakcionisu, izoluju i identifikuju, a potom dalje proučavaju radi utvrđivanja njihovih fiziološko-biohemijskih aktivnosti.

Izolovani sekundarni biomolekuli mogu se klasifikovati po biohemijskoj i fiziološkoj osnovi. Po biohemijskoj osnovi oni se dele na dva načina i to:

- ◆ hemijskoj strukturi i
- ◆ biosintetičkim putevima.

Klasifikacijom po hemijskoj strukturi sekundarni biomolekuli se mogu podeliti na više grupa i to:

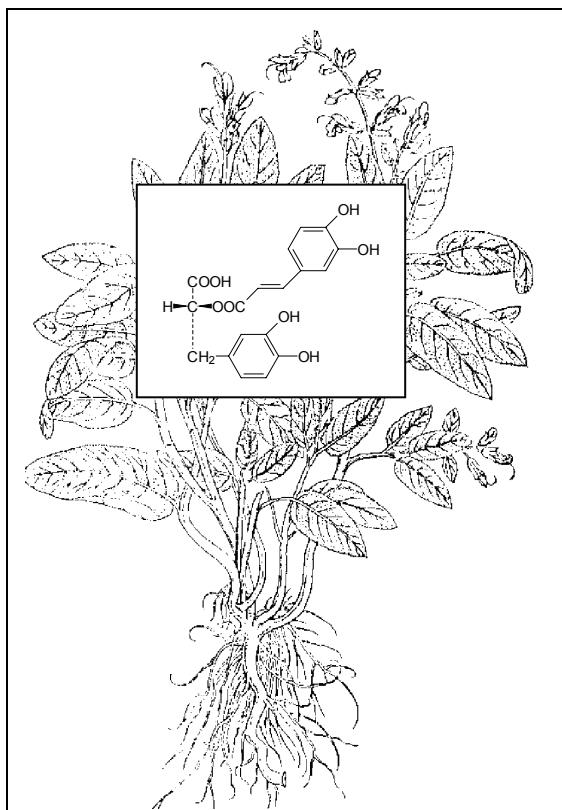
- ◆ biljne fenole,
- ◆ izoprenoide,
- ◆ alkalioide,
- ◆ steroide,
- ◆ biljne hormone,
- ◆ organske kiseline i druge biomolekule.

Na osnovu prekursora i biohemiskog puta nastajanja sekundarni biomolekuli se mogu podeliti u tri grupe i to biomolekuli koji se sintetizuju po:

- ◆ putu šikimske kiseline,
- ◆ acetat-malonatnom (poliketidnom) putu i
- ◆ acetat-mevalonatnom putu.

# 16.

## Metabolizam fenola



*Salvia officinalis L.*

### **16.1. Strukturne klase biljnih fenola**

### **16.2. Funkcija fenola u bilj.**

### **16.3. Šikimat-rogenat put**

### **16.4. Fenilalanin-hidroksicinamat put**

- 6.4.1. Fenilalanin amonijum-liaza
- 6.4.2. Biosinteza hidroksicinamata
- 6.4.3. Aktivacija hidroksicinamata

### **16.5. Fenilpropanoidni putevi**

### **16.6. Konjugovani hidroksicinamati**

- 16.6.1. Reakcije konjugacije
- 16.6.2. Konjugacija sa glukozom

### **16.7. Hidroksikumarini**

### **16.8. Hidroksibenzoati**

### **16.9. Flavonoidi**

- 16.9.1. Sintesa halkona i izomera
- 16.9.2. Biosinteza klase flavonoida
- 16.9.3. Supstituisani flavonoidi
- 16.9.4. Konjugovani flavonoidi
- 16.9.5. Konjugovani antocijanidini
- 16.9.6. Degradirani flavonoidi

### **16.10. Lignini**

### **16.11. Lignani i neolignani**

### **16.12. Tanini**

- 16.12.1. Hidrolizujući tanini
- 16.12.2. Kondenzujući tanini

### **16.13. Hinoni**

- 16.13.1. Poliketidni put
- 16.13.2. Sukcinilbenzoat put

## 16.1. Strukturne klase biljnih fenola

Fenole kao hemijska jedinjenja karakteriše najmanje jedan aromatični prsten ( $C_6$ ) za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. Mnogi fenoli nastaju kao derivati u reakcijama kondenzacije ili adicije. Rastvorljivi su u vodi i veoma su reaktivna jedinjenja. Sa šećerima grade glikozide. Veoma su rasprostranjeni i u biljkama je do danas identifikovano više hiljada fenolnih jedinjenja. Nalaze se u vakuolama. Lako se oksiduju (enzimima ili bez njih) u hinone ili jedinjenja hinoidne strukture.

Poznata su tri različita biogenetska puta nastajanja biljnih fenola.

1. **Šikimat-rogenat put** - vodi od fenilalanina do glavnih biljnih fenola, derivata fenilpropana ( $C_6-C_3$ ), fenilpropanoïda. Neki fenoli su nastali iz intermedijera šikimat/rogenat puta kao npr. hidroksibenzoat-galat iz dehidrošikimata ili neki hinoni iz horismata preko sukcinilbenzoata (u **sukcinilbenzoatnom putu**).
2. **Acetat-malonat put (poliketidni put)** - vodi do nekih biljnih hinona ali takođe i do bočno-produženog lanca fenilpropanoïda, kao npr. velike grupe flavonoida ( $C_6-C_3-C_6$ ).
3. **Acetat-mevalonat put** - u reakcijama dehidrogenacije vodi do nastajanja nekih aromatičnih terpenoida, prevashodno monoterpena.

Šikimat-rogenat i poliketidni put su najvažniji u biosintezi biljnih fenola. Do danas poznati biljni fenoli se mogu klasifikovati po dva osnova:

- *po složenosti hemijske strukture i*
- *po fiziološkom delovanju.*

Prema složenosti biljni fenoli se dele u nekoliko klasa. U tabeli 16-1 dat je pregled strukturalnih klasa fenola od vrlo prostih do najkompleksnijih.

U ovom odeljku su pored uvoda opisane i najprostije klase biljnih fenola. Dominantne strukture u listovima viših biljaka su flavonol glikozidi, konjugati hidroksicinamata i kondenzovani tanini i antocijanini u cvetnim laticama i voću.

Tabela 16-1. Glavne strukturne klase fenola u biljkama.

No. C atoma	C Skelet	Klase biljnih fenola	Komponente
6	C <sub>6</sub>	Prosti fenoli	Hidrohinon, Katehol
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Hidroksibenzoati	4-Hidroksibenzoat
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenoni Fenilacetati	4-Hidroksiacetofenon 4-Hidroksifenilacetat
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroksicinamati Fenilpropeni Kumarini Hromoni	Kafeat Eugenol Eskuletin 2-Metil-5-hidroksi-7-metoksihromon
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftohinoni	Juglon
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni	1,3,6,7-Hidroksikanton
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni	Rezveratrol
		Antrahinoni	Emodin
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi	Kvercetin
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignani	Pinorezinol
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi	Amentoflavon
n	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Katehol melanini	Naftalen polimer
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignini	Guaiacil lignini
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Kondenzovani tanini	Polimeri katehina

## 16.2. Funkcija fenola u biljkama

Sve je evidentnije da se fenoli, s obzirom na svoju funkciju u biljkama, moraju uzimati u obzir prilikom pravljenja razlike izmedju primarnih i sekundarnih jedinjenja. Tako npr., poznato je da mnogi fenolni sekundarni biomolekuli predstavljaju dragocena sredstva za skladištenje i neophodne elemente anatomske i morfološke strukture. Ali sve je evidentnije da su fenoli i od primarnog značaja, pre svega u poboljšanju opstanka biljaka. Bez sekundarnih jedinjenja, biljke nikada ne bi evoluirale do tako širokog opsega različitih vrsta i ne bi nikada bile u stanju da koegzistiraju u svojim staništima.

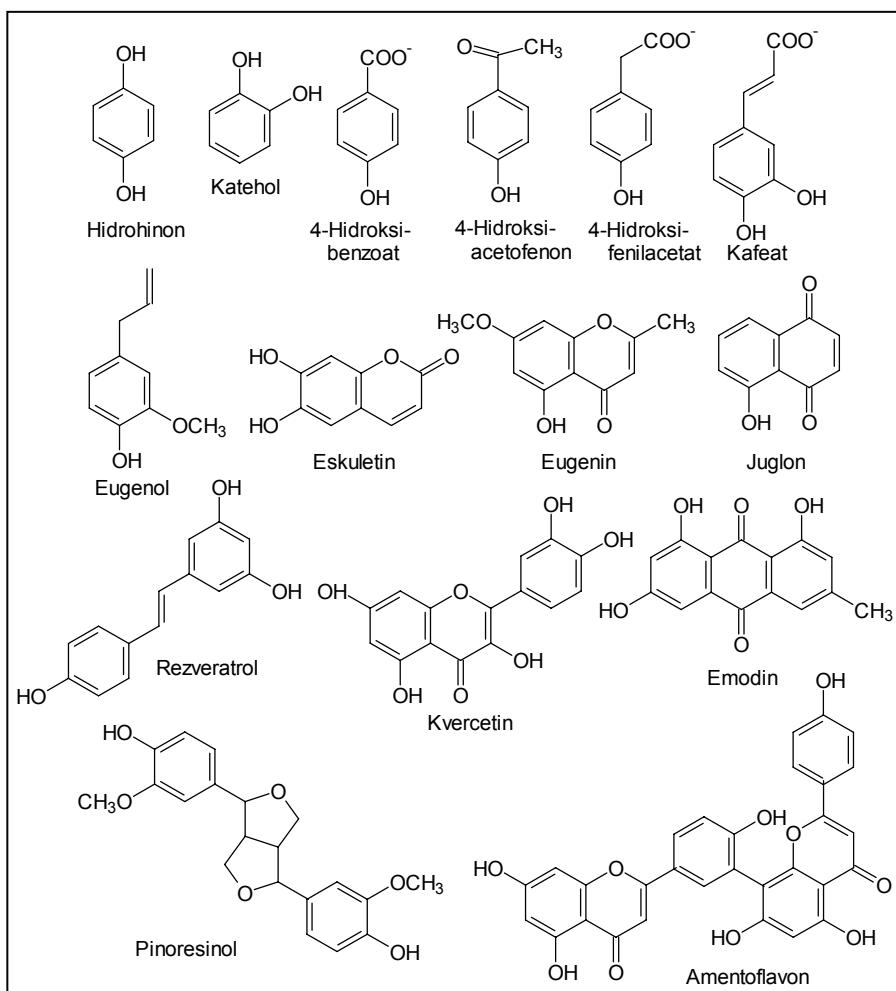
Fenoli su od velikog značaja kao čelijski potporni materijal. Predstavljaju integralni deo strukture čelijskog zida, najviše polimerne

materijale poput lignina i suberina, koji čine mehaničku potporu i barijeru invaziji mikroba. Nakon celuloze, lignini su druga po zastupljenosti organska struktura na zemlji. Njihovim nastankom bilje su se adaptirale životu na kopnu izgradjujući čvrste organe poput drvenastih stabala i ćelijske elemente za sprovodjenje vode.

Fenoli su od velike ekološke važnosti, slično raznim toksičnim azotnim jedinjenjima i terpenoidima atraktantima i repellentima. Najvažnija funkcija fenolnih flavonoida, naročito antocijanina, zajedno sa flavonima i flavonolima kao ko-pigmentima, je u formiranju boje cvetova i voća biljaka. Ovo je važno za privlačenje insekata i životinja od strane biljaka zbog oprašivanja i raznošenja semena. Fenoli se mogu akumulirati kao posledica stresa. Postoje jasni dokazi da ultraljubičasta (UV) svetlost, koja oštećuje DNA, indukuje nakupljanje UV-apsorbujućih flavonoida i ostalih fenolnih jedinjenja, prvenstveno u epidermisu biljnog organizma. Flavonoidi, naročito antocijani, mogu se prolazno pojaviti u toku biljne ontogeneze. Ovo se uočava u klijancima i mladim listovima, što, iako spekulativno, sugerira fiziološku ulogu u percepciji svetlosti.

Fenoli učestvuju u odbrani biljaka od predavara. Herbivori reaguju osjetljivo na sadržaj fenolnih jedinjenja u biljkama. Jednostavne fenolne kiseline, kao i kompleksi tanina i fenolnih smola na površini biljke, uspešno odbijaju npr. ptice. Fenoli se akumuliraju kao inducibilni nisko-molekularni proizvodi nazvani fitoaleksini, kao posledica napada mikroba. Biljka prepoznaće ove napade detekcijom molekula nastalih od parazita – elicitora. Zbog ovoga su fitoaleksini postinfektivni, tj. iako mogu već biti prisutni u niskoj koncentraciji u biljci, oni se rapidno akumuliraju tek nakon napada kao indukovana jedinjenja. Suprotno tome, preinfektivni toksini su konstitutivna jedinjenja. Oni su prisutni u zdravim tkivima u koncentracijama dovoljnim da odbiju napad, bilo kao slobodni toksini ili kao konjugovani oblici iz kojih se oslobadaju nakon napada. Od fenolnih fitoaleksina i toksina, hidroksikumarini i konjugati hidroksicinamata su od najveće važnosti. Oni doprinose mehanizmu otpornosti prema bolestima u biljkama.

Fenoli mogu uticati na kompeticiju između biljaka, fenomen nazvan alelopatija. Pored dobro poznatih efekata isparljivih terpenoida koji deluju kao alelopatska jedinjenja, postoje toksični fenoli rastvorljivi u vodi, kao što su prosti fenoli (npr. hidrohinon), hidroksibenzoati i hidroksicinamati. Poznati toksin iz *Juglans* vrsta (*Juglandaceae*) je juglon (5-hidroksinaftohinon), koji je veoma toksičan za mnoge biljke. U biljci je prisutan u obliku netoksičnog glukozida a postaje aktivan deglukozilacijom i oksidacijom nakon dospevanja iz lišća u zemljište. Postoje takođe fenolna jedinjenja u korenskim izlučevinama koja mogu delovati kao toksini. Poznato je da biljka gvajula (*Parthenium argentatum*; *Asteraceae*) izlučuje cinamate koji su toksični za samu biljku (autotoksičnost). Cinamati mogu redukovati kompeticiju između članica iste ili različitih vrsta.



Slika 16-1. Predstavnici strukturno različitih klasa fenola

Najnovija otkrića vezana za funkcije fenola, posebno flavonoida, odnose se na njihovu ulogu signal-molekula (supstanci za prepoznavanje domaćina) u interakciji između bakterija azotofiksatora i određenih pripadnika familije *Fabaceae* (leguminoze). Ove biljke izlučuju flavonoide koji deluju selektivno u *Rhizobium*-u kao izazivači transkripcije gena za nodulaciju (*nod*), tako što aktiviraju regulatorne proteine. Proizvodi *nod* gena, za uzvrat, utiču na domaćina da formira krvžice na korenju, što omogućuje biljci da koristi atmosferski azot zahvaljujući aktivnosti bakterijskog azot-aktivirajućeg enzima nitrogenaze.

Zajedno sa drugim sekundarnim jedinjenjima biljnog porekla, fenoli su od velikog značaja i za čoveka. Biološke aktivnosti sekundarnih

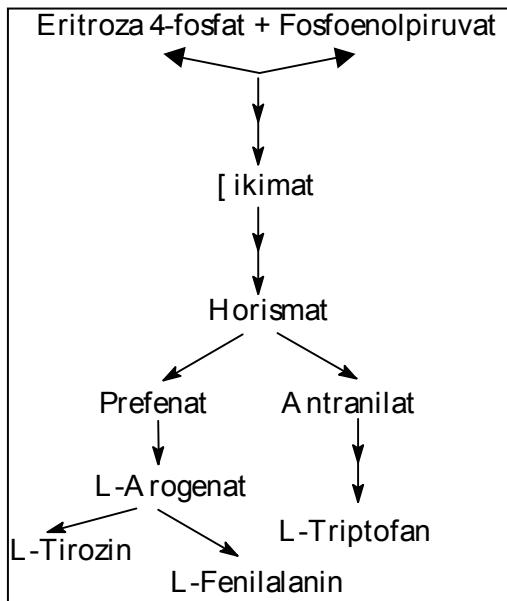
jedinjenja otkrivane su empirijskim putem od strane naših predaka. Tako je ustanovljeno da ona nisu samo bezukusna, otrovna ili halucinogena jedinjenja, već i da pokazuju moguću farmakološku vrednost. Ljudi su naučili da koriste biljke u narodnoj medicini, i danas mi imamo bogat izvor lekovitih biljaka koje sadrže fenole, i koriste se kao lekovi u medicini. Polifenoli su značajni u namirnicama i ishrani, u vinima i biljnim čajevima zbog svog astringenthog ukusa. Biljke bogate polifenolima su vekovima korišćene u proizvodnji kože zbog sposobnosti da sa proteinima grade komplekse. Fenolni pigmenti cvetova i plodova su takodje i od estetskog značaja. Zbog toga su uzgajivači (oplemenjivači) biljaka veoma zainteresovani za uzgoj širokog spektra različito obojenih ukrasnih biljaka. Ovi pigmenti su verovatno najrasprostranjenije boje namirnica zastupljene na bazi antocijanina kao crvene boje u raznom jestivom biljnom materijalu i voćnim sokovima, vinima i džemovima. Antocijanini imaju značajan potencijal u prehrambenoj industriji kao sigurni i efektni aditivi hrane. Strukture nekih tipičnih fenola karakteristične za mnoge biljne vrste su prikazane na slici 16-1.

### 16.3. Šikimat-rogenat put

Šikimat-rogenat put (japanski to je *shikimino-ki*; biljka *Illicium anisatum*, *Illiciaceae*, se pominje kao prva u kojoj je opisan šikimat od strane Eijkmann, 1885.) vodi do nastajanja tri aromatične aminokiseline L-fenilalanina, L-tirozina i L-triptofana. One su važni prekursori za biljne hormone tipa auksina i različite sekundarne komponente uključujući i fenilpropanoide. Slika 16-2 daje osnovne pravce šikimat-rogenat puta koji se završava sa tri aromatične aminokiseline. Sekvence reakcija vode do fenilalanina i tirozina katalizovanih sa 11 enzima označeni kao E<sub>1-1</sub>-E<sub>1-11</sub>(pogledaj enzimski boks 1).

Put počinje sa dve reakcije kondenzacije koje vode do formiranja osnovnog cikloheksanskog skeleta. Prva reakcija (inter molekulska aldolna kondenzacija) je katalizovana enzimom E<sub>1-1</sub> u kojoj se eritroza 4-fosfat (intermedijer u pentozofosfatnom putu) kondenzuje sa fosfoenolpiruvatom (PEP, intermedijer u glikolizi). Proizvod je C<sub>7</sub> šećer otvorenog niza 2-dehidro-3-deoksiarabinohoptulozonat-7-fosfat (DAHP). Drugi stepen u šikimat-rogenatnom putu je konverzija DAHP u 3-dehidrohinat, a katalizovan je enzimom E<sub>1-2</sub>. On obuhvata kompleks sekventnih reakcija uključujući oksidaciju, β-eliminaciju, redukciju i intramolekulsku aldolnu kondenzaciju koje vode do formiranja ciklične strukture 3-dehidrohinata. Nastali 3-dehidrohinat *cis*-dehidratacijim enzimom E<sub>1-3</sub> vodi do 3-dehidrošikimata. 3-Dehidrošikimat se redukuje pomoću NADPH-zavisne

dehidrogenaze ( $E_{1-4}$ ) do šikimata. Posle C-3 fosforilacije ( $E_{1-5}$ ) šikimat-3-fosfat reaguje sa PEP posredstvom EPSP-sintaze ( $E_{1-6}$ ) produkujući 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP).

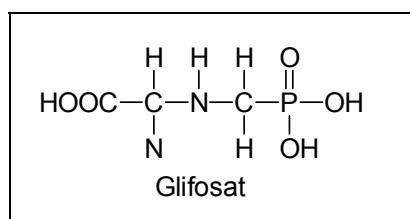


Slika 16-2.

Shema šikimat-rogenat puta. Sekvenca reakcija vode do aroma-tičnih aminokiselina u višim biljka-ma sa dve tačke račvanja od horis-mata i arogenata

EPSP-sintaza može biti inhibirana herbicidom glifosatom [ $N$ -(fosfonometil)glicin]. Ovo je analog PEP-a koji se koristi ekstenzivno u mnogim zemljama u svetu, nije selektivan i širokog je spektra.

Primena glifosata izaziva trošenje pula aromatičnih aminokiselina što rezultira supresiju sinteze proteina, prestanak rasta, a na kraju vodi do uginuća. Glifosat se uspešno primjenjuje u nekim biohemijskim i fiziološkim eksperimentima zbog dobijanja značajnih informacija o regulaciji procesa formiranja fenola. Poznato je da su neke biljke otporne na ovaj herbicid.

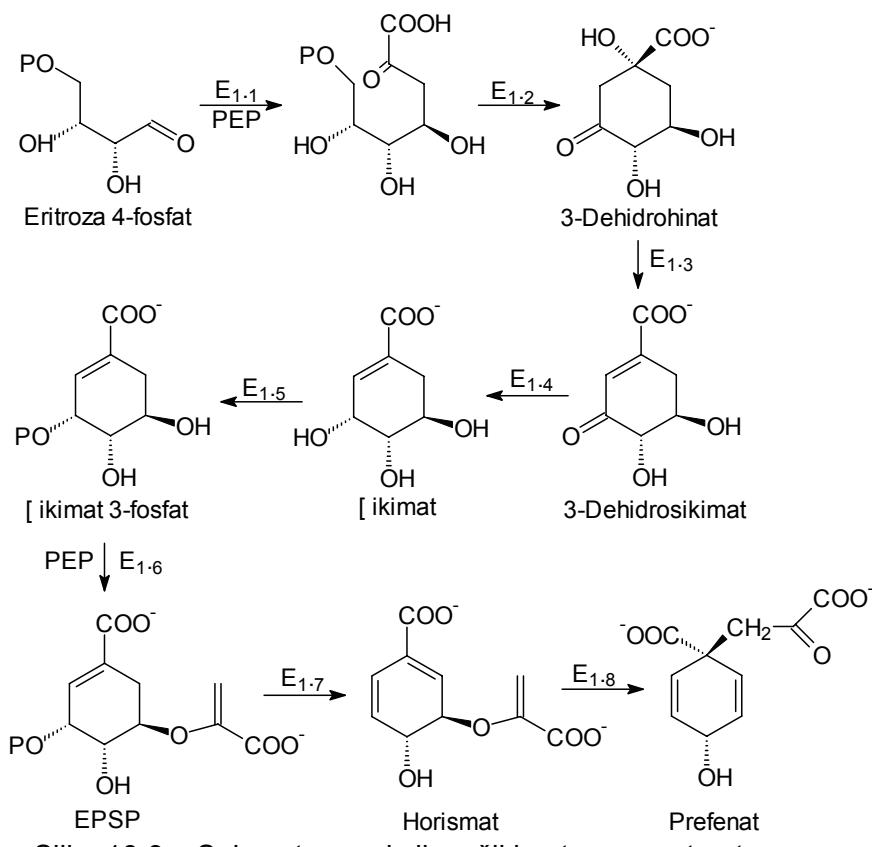


#### Enzimski boks 1: Enzimi Šikimat-rogenat puta:

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| $E_{1-1}$ : 2-dehidro-3-deoksifosfoheptonat aldolaza  | $E_{1-7}$ : horismat-sintaza       |
| $E_{1-2}$ : 3-dehidroshikimat-sintaza                 | $E_{1-8}$ : horismat-mutaza        |
| $E_{1-3}$ : 3-dehidroshikimat-dehidrataza             | $E_{1-9}$ : prefenat-              |
| aminotransferaza                                      |                                    |
| $E_{1-4}$ : Šikimat-3-dehidrogenaza                   | $E_{1-10}$ : Rogenat-dehidrogenaza |
| $E_{1-5}$ : Šikimat-kinaza                            | $E_{1-11}$ : Rogenat-dehidrataza   |
| $E_{1-6}$ : 3-fosfоšikimat 1-karboksiviniltransferaza |                                    |

Ovo se može objasniti hiperprodukcijom EPSP-sintaze koja omogućava normalno funkcionisanje šikimat-rogenat puta.

Sledeći stepen u šikimat-rogenat putu je eliminacija fosfata iz EPSP, katalizovan horismat-sintazom ( $E_{1-7}$ ) što daje horismat. Subsekventnom aktivnošću enzima putu se grana u dva pravca: pravac sinteze antranilata koji vodi do L-triptofana i drugi pravac katalizovan horismat-mutazom ( $E_{1-8}$ ) preko prefenata i L-rogenata vodi do L-tirozina i L-fenilalanina (slika 16-3a).



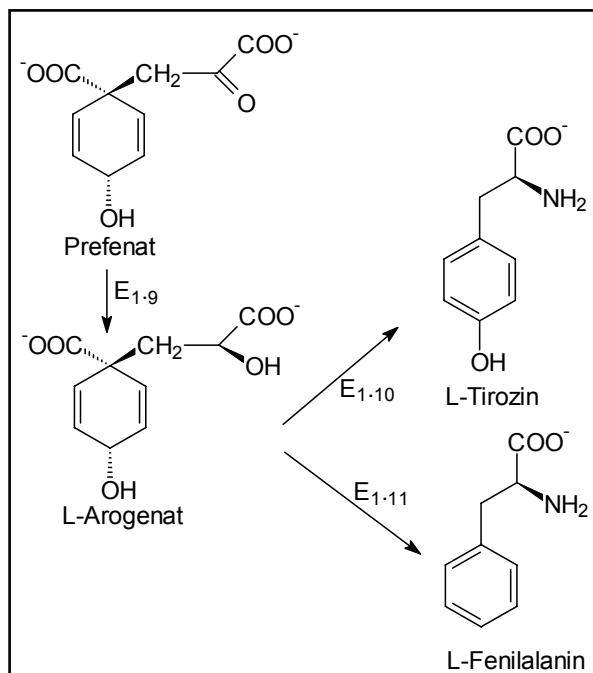
Slika 16-3a. Sekventne reakcije u šikimat-rogenat putu.

Horismat-mutaza katalizuje periciklično Klajzenovo-premeštanje do hinona prefenata. U ovoj reakciji se bočni lanac piruvata kroz biciklično prelazno stanje premešta sa  $C_5$  na  $C_1$ , stvarajući tako tipičan fenilpropanoidni skelet. (Klajzenovo premeštanje je nazvano po Nemačkom hemičaru L.Klajzenu (L.Claisen, 1851-1930)).

Dalji putevi iz prefenata do fenilalanina i tirozina mogu biti različiti zavisno od organizma. U *Escherichia coli* i naravno drugim bakterijama,

dve aminokiseline se formiraju direktno iz fenilpiruvata i hidroksifenilpiruvata. Fenilpiruvat se formira iz prefenata pomoću dekarboksilat-hidroliazе (prefenat-dehidrataze) i dalje reakcijama aminotransferaza vodi do fenilalanina, dok hidroksifenilpiruvat se stvara pomoću dekarboksilat-NAD<sup>+</sup>-zavisne oksidoreduktaze i dalje u reakcijama aminotransferaza vodi do tirozina. Međutim, kod eukariota i mnogih prokariota arogenat se stvara kao neposredni prekursor za ove aminokiseline. Arogenatni put je karakterističan za sintezu fenilalanina i tirozina u višim biljkama.

Konverziju prefenata u arogenat, u prisustvu glutamata, katalizuje prefenat-aminotransferaza (E<sub>1.9</sub>). Dalje put sinteze ide u dva pravca katalizovanim arogenat-dehidrogenazom (E<sub>1.10</sub>) i arogenat-dehidratazom (E<sub>1.11</sub>) do nastajanja tirozina i fenilalanina (slika 16-3b).



Slika 16-3b.  
Konverzija prefenata.

Granjanje je važna tačka u regulaciji sinteze ovih aminokiselina (fidbek inhibicija). Ovo zbog toga što je tok ugljenika između dve aminokiseline kontrolisan. Dehidrataza je inhibirana fenilalaninom, a dehidrogenaza tirozinom. Obe aminokiseline takođe inhibiraju horismat-mutazu. Šikimat-arenogenat put je lokalizovan primarno u hloroplastima u kojima se aromatične aminokiseline sintetizuju za potrebe biosinteze proteina i sekundarno u citoplazmi gde se stvara fenilalanin kao prekursor fenilpropanoida.

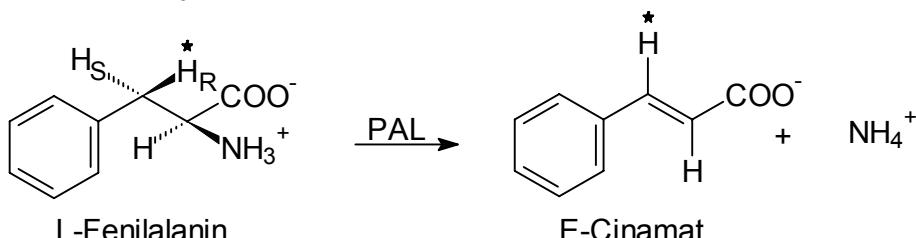
## 16.4. Fenilalanin-hidroksicinamat put

Fenilalanin-hidroksicinamat put je definisan kao "osnovni metabolizam fenilpropanoida". Ovaj put uključuje sve reakcije od L-fenilalanina do hidroksicinamata i njihove aktivne oblike kao što su, tioestri CoA i 1-O-

acilglikozidi. Krajnji proizvodi ovoga puta u biljkama su tipični hidroksicinamat-konjugati. U enzimskom boksu 2 dati su enzimi ( $E_{2-1}$  do  $E_{2-7}$ ) koji katalizuju najvažnije reakcije fenilalanin-hidroksicinamatnog puta.

### 16.4.1. Fenilalanin amonijum-liaza

Faza između fenilalanina i metabolizma fenilpropanoida je kontrolisana enzimom fenilalanin amonijum-liazom (PAL;  $E_{2-1}$ ). Ovaj enzim katalizuje neoksidativnu deaminaciju fenilalanina do oblika prve strukture fenilpropana. U ovoj reakciji eliminiše se amonijak, uključujući i *pro*-3S H atom na C<sub>3</sub> što daje E-cinamat.



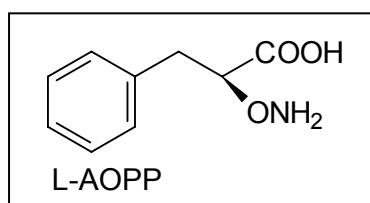
PAL pripada grupi C-N-liaza (cepa C-N vezu) koje daju duplu vezu što je suprotno dehidrogenaciji i hidrolizi. Aktivna strana enzima sadrži dehidroalanin ostatak koji svojom metilenskom grupom veže amino grupu fenilalanina ( $\beta$ -adicija). E-cinamat i "amino enzym" kao proizvodi procesa eliminacije generišu aktivnost PAL, nakon prototropnog premeštanja. Enzim se na kraju regeneriše oslobođenim amonijakom. Ovaj amonijak kao i onaj proizveden u velikim količinama npr. lignifikacijom tkiva, može biti reasimilovan pomoću aktivnosti glutamin-sintetaze. PAL egzistira kao strukturni tetramer.

#### Enzimski boks 2: Enzimi fenilalanin-hidroksicinamat puta:

- $E_{2-1}$  Fenilalanin-amonijum liaza (PAL)
- $E_{2-2}$  Cinamat 4-hidroksilaza
- $E_{2-3}$  4-Kumarat 3-hidroksilaza (monofenol monooksigenaza; fenolaza)
- $E_{2-4}$  Ferulat 5-hidroksilaza
- $E_{2-5}$  Kafeat 5-hidroksiferulat metiltransferaza
- $E_{2-6}$  Hidroksicinamoil-CoA ligaza (HCA-CoA ligaza)
- $E_{2-7}$  Hidroksicinamat O-glukoziltransferaza

Tipične karakteristike ovog enzima su (i) Mr od 270.000 do 330.000 sa 4 verovatno identične subjedinice, (ii) negativna kooperativnost u odnosu na fenilalanin sa dve  $K_m$  vrednosti, jedna za niže a druga za više koncentracije fenilalanina i (iii) pH optimum u rangu 8-9. Poznati su prirodni inhibitori koji utiču na katalitičku aktivnost PAL, uključujući i hidrofobni protein sa Mr 19.000.

U *in vivo* eksperimentima dokazano je da sintetički PAL-specifični inhibitori, kao analozi fenilalanina, kao što je L-2-amino-oksi-3-fenilpropionska kiselina (L-AOPP), blokiraju aktivnost PAL. Ovi efekti su postignuti i pri nanomolarnim koncentracijama. Ovakva ispitivanja su korisna za proučavanje metabolizma fenilpropanoida. Iz perspektive biohemijskih proučavanja PAL-aktivnosti, primenom AOPP proniklo se je u prelazno stanje kada je vezan fenilalanin. Može se prepostaviti da konformacione izmene na enzimu mogu doprineti stvaranju slobodne energije potrebne za procese eliminacije.



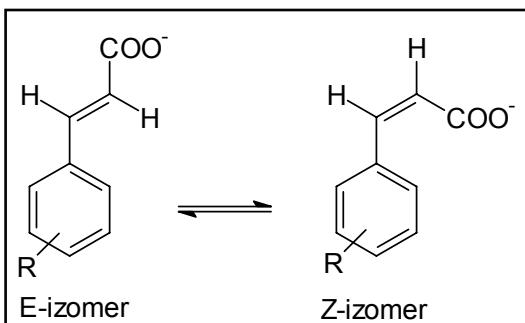
Izvesno je da u travama i gljivama, PAL takođe može delovati na tirozin, što vodi direktno do 4-kumarata. Ranije mišljenje da ova reakcija može teći samo uz katalitičku aktivnost tirozin ammonium-liaze (TAL) i danas ima svoju važnost. Nije izvesno da u biljkama egzistira visoka aktivnost ammonium liaze sa tirozinom.

U nekim biljkama PAL egzistira kao pojedinačan enzim. U drugim, međutim, nađene su multiple forme. Tako npr. u *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), PAL izoenzimi se sintetizuju *de novo* kao odgovor na UV zračenje, atak mikroorganizama i oštećenja. Međutim moguće specifične metaboličke uloge individualnih izoenzima definitivno nisu potvrđene. U *Medicago sativa* (alfaalfa; Fabaceae) alelne varijacije PAL-a su dokazane.

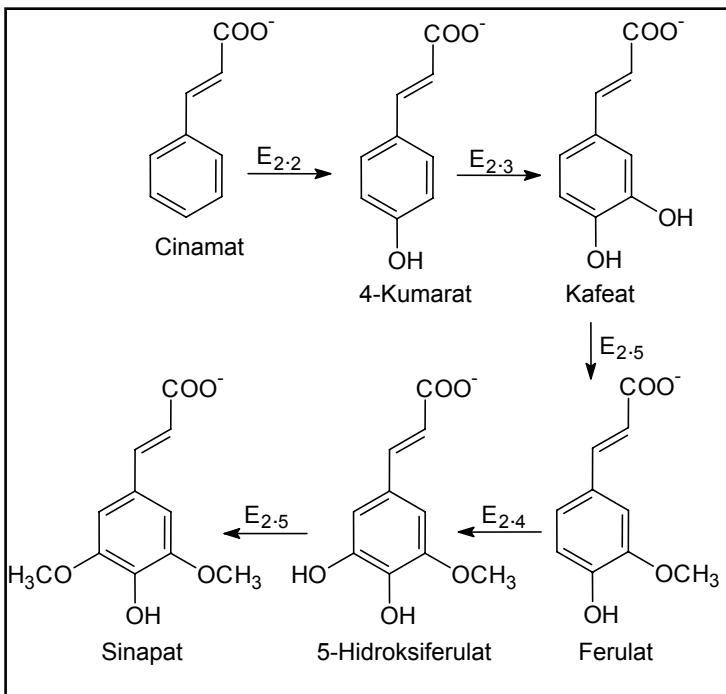
## 16.4.2. Biosinteza hidroksicinamata

Serijske reakcije hidroksilovanja i metilovanja katalizovane enzimima E<sub>2-2</sub>-E<sub>2-5</sub> vode do nastajanja uobičajenih hidroksicinamata: 4-kumarat, kafeat, ferulat i sinapat, dok je 5-hidroksiferulat substrat za formiranje sinapata (slika 16-4).

Hidroksicinamati obično nastaju kao *trans* (E)-izomeri, izvedeni iz E-cinamata. Međutim, *cis* (Z)-izomeri mogu nastati fotohemijskom ili enzimskom izomerizacijom. Ovo može biti primenjeno na nekim od fenola kao što su monolignoli:

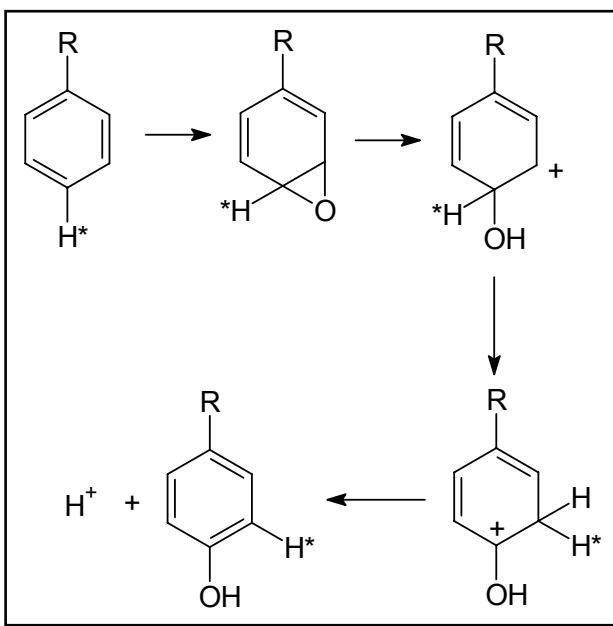


Hidroksilaze  $E_{2\cdot2}$ ,  $E_{2\cdot3}$  i  $E_{2\cdot5}$  pripadaju monooksigenazama, što upućuje na oksidaze mešovite funkcije, pošto uvode singlatom molekula kiseonika u supstrat. Kiseonik se cepa za vreme ove reakcije, a drugi atom kiseonika se redukuje do  $\text{H}_2\text{O}$ . NADPH je drugi supstrat koji se oksiduje.



Slika 16-4.  
Biosinteza hidroksicinamata u reakcijama hidroksilovanja i metilovanja.

Poznata su dva tipa hidroksilaza; (i) membran-vezana (mikrozomalna) citohrom P-450-zavisna oksigenaza ( $E_{2\cdot2}$  i  $E_{2\cdot4}$ ) i (ii) solubilna fenolaza ( $E_{2\cdot3}$ ) koja katalizuje uvođenje druge hidroksilne grupe u monofenol tipa kafeata. Cinamat 4-hidroksilaza ( $E_{2\cdot2}$ ) uvodi hidroksilnu grupu specifično u poziciju 4 E-cinamata. Enzim se inaktivira sa Z-izomerom. Hidroksilovanje u poziciji 4 pripada tzv "NIH premeštanju" (NIH je naziv za National Institute of Health, Bethesda, USA, u kojem se naročito ispituju enzimi-hidroksilaze). Ovo je intramolekulsko migriranje protona ka susednoj *ortho* poziciji na aromatičnom prstenu. Evidentno je da reakcija teče preko oksida (epoksida) kao intermedijera (slika 16-5).



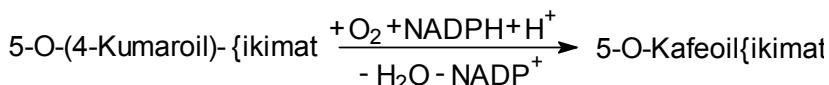
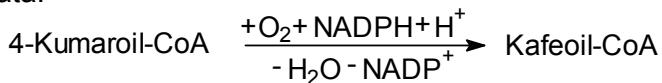
Slika 16-5.  
"NIH-premeštanje".

Fenolaza, 4-kumarat hidroksilaza ( $E_{2-3}$ ) uvodi drugu hidroksilnu grupu, *ortho* hidroksilna grupa (položaj 3), u aromatični prsten 4-kumarata. Ovo vodi do gubitka *ortho* protona. Treća hidroksilaza je ferulat hidroksilaza ( $E_{2-4}$ ), koja je ponovo membran-vezana citohrom P-450-zavisna oksigenaza.

Više puta je saopštavano o niskoj

supstratnoj specifičnosti u drugoj reakciji koja vodi nastajanju hinonoidnih struktura. Ovo je osporeno, zato što su mnoge od opisanih fenolaza uključene u put formiranja slobodnih hidroksicinamata. Budući istraživači će morati da pokažu postojanje različite i visoko-specifične hidroksilazne aktivnosti na putu nastajanja hidroksicinamata.

Diskutujući problem u tom svetlu, saopštavaju se interesantni rezultati koji pokazuju da hidroksilaze egzistiraju sa visokom specifičnosti kada grade hidroksicinamat-konjugate. Ovo se realizuje pri formiranju kafeata iz kumarata (aktivirani 4-kumaroil-CoA) ili 5-O-(4-kumaroil)-šikimata:



O-metilacijom kafeata i hidroksiferulata nastaju ferulat i sinapat. Enzim ( $E_{2-5}$ ) koristi S-adenozil-L-metionin (SAM) kao metil-donor. Za vreme transfera metil grupe SAM se prevodi u SAH (S-adenozil-L-homocistein). Zanimljivo je da SAH može biti supstrat za specifične hidroksilaze koje katalizuju nastajanje adenozina i L-homocisteina. Ovo favorizuje nastajanje metoksilovanih produkata.

### 16.4.3. Aktivacija hidroksicinamata

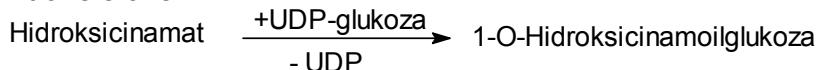
Krajnji stepen "osnovnog metabolizma fenilpropanoida" je aktivacija karboksil-hidroksicinamata katalizovana hidroksicinamat:CoA ligazama ( $E_{2-6}$ ) ili pomoću aktivnosti hidroksicinamat O-glukozil-transferaza ( $E_{2-7}$ ). CoA-hidroksicinamati nastaju u različitim i specifičnim fenilpropanoidnim reakcijama, kao što su kondenzacije sa malonil-CoA kada nastaju flavonoidi, NADPH-zavisne redukcije kada nastaju lignini, ili reakcijama konjugacije što vodi do estara ili amida. Hidroksicinamat 1-O-acilglukozid služi kao acil-donor u različitim transferaznim reakcijama kojima nastaju O-estri. Ovo su alternativne reakcije u kojima katalitičku funkciju ima CoA tioestar-zavisna transferaza.

Formiranje hidroksicinamil-CoA je analogno aktivaciji masnih kiselina sa ATP i CoA:



Verovatno da su ovo specifične ligaze (izoforme) za specifične puteve kao npr. one u kojima nastaju flavonoidi, lignini ili estri, ali ovo nije još nedvosmisleno dokazano. Od svih ligaza najviše ispitivana je 4-kumarat: CoA ligaza ( $E_{2-6}$ ) koja je uključena u biosintezu flavonoida. Često pominjana neslaganja između supstratne specifičnosti nekih ligaza i supstituisanih fenolnih struktura mogu biti proizvod delimično izvedenih činjenica iz sporednih reakcija sa hidroksicinamoil-CoA, kao što su hidroksilacije ili O-metilacija u kojima nastaju finalne strukture supstituisanih fenola.

Formiranje 1-O-hidroksicinamoilglukoze (hidroksicinamat 1-O-acilglukozid) je katalizovano pomoću uridin 5'-difosfata (UDP)-Glu-zavisne glukoziltransferaze:

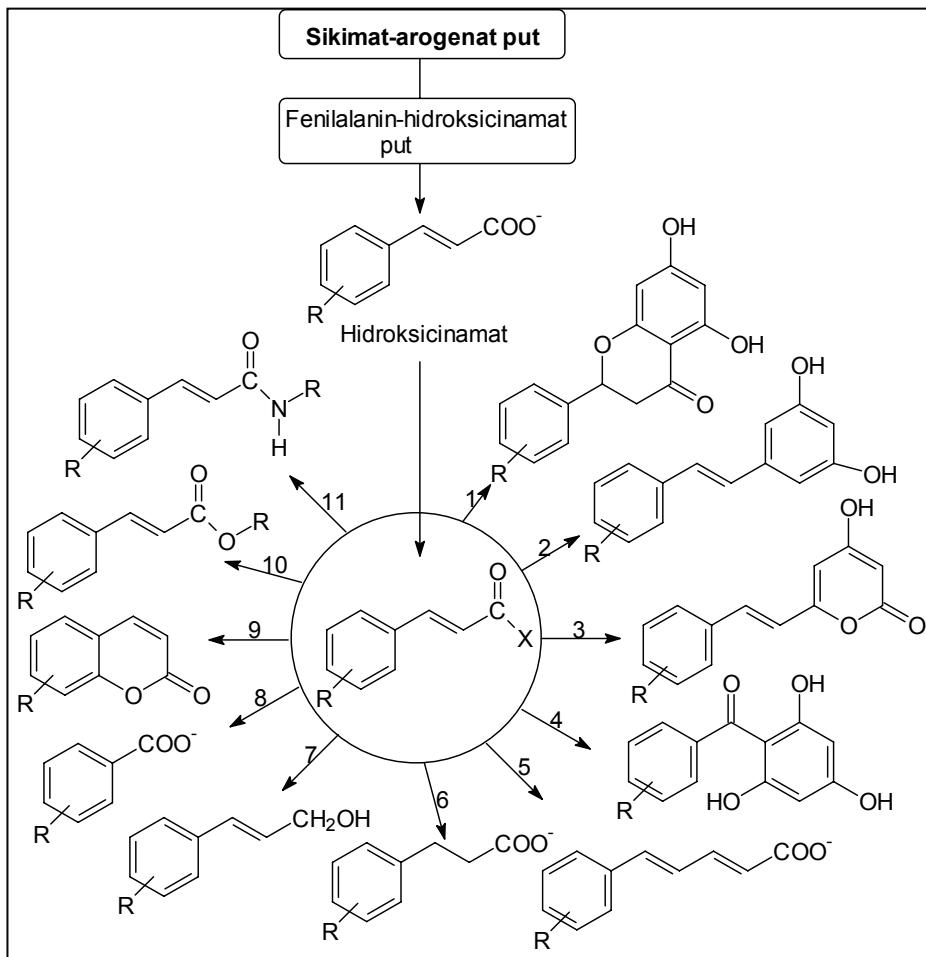


## 16.5. Fenilpropanoidni putevi

Hidroksicinamati se koriste u različitim putevima od kojih su četiri dominantna tipa reakcija na bočnom lancu (slika 16-6).

1. **Kondenzacija** (*produženje bočnog lanca*) sa malonil-CoA (dodavanjem acetata uz oslobođanje  $\text{CO}_2$ ), kao npr. u reakciji sa tri malonil-CoA što vodi do flavonoidi.
2. **Degradacija** (*skraćivanje bočnog niza*) uklanjanjem acetatne jedinice vodi do hidroksibenzoata.

3. **Redukcija** (*NADPH-zavisna*) vodi do prekursora lignina, hidroksicinamil alkohola.
4. **Konjugacija** posredstvom vezivanja hidroksil- ili amino-vezanog molekula uz oslobođanje H<sub>2</sub>O vodi do estara ili amida



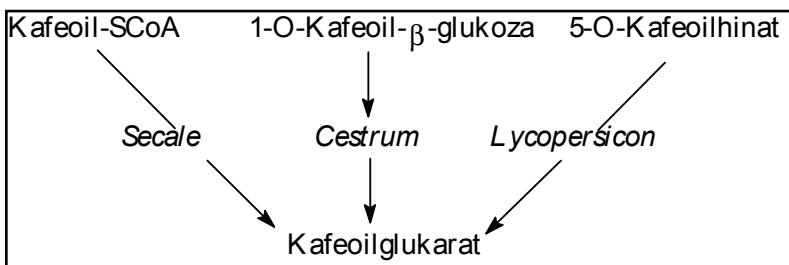
Slika 16-6. Shema centralne uloge hidroksicinamata u formiraju različitim fenilpropanoida: **roduženje** bočnog niza (reakcije 1-5; 1 vodi do flavonoida, 2 do stilbena, 3 do stirilpirona, 4 do benzofenona koji ciklizacijom daju ksantone, 5 do produženja bočnog niza hidroksicinamata); **redukcijom** bočnog niza (reakcija 6 vodi do dihidrohydroxycinnamata, 7 do hidroksicinamoil alkohola); **degradacija** bočnog niza (reakcija 8 vodi do hidroksibenzoata); 2-hidroksilacija i laktonizacija (reakcija 9 vodi do hidroksikumarina); **konjugacijom** bočnog niza (reakcija 10 nastaju hidroksicinamat estri, a 11 hidroksicinamat amidi). X=OH, ScoA (tioestari) ili glukozo-(1-O-acilglukozid).

## 16.6. Konjugovani hidroksicinamati

U biljkama su obično prisutni konjugovani hidroksamati osnovne C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> strukture. Estri i amidi su najčešći tipovi konjugovanih hidroksicinamata, pošto glikozidi retko nastaju. Izraz "konjugacija" prvo bitno se koristio u metabolizmu biljnih hormona, i označavao je "pričvršćenje" ili kondenzaciju, različitih monomernih ili oligomernih komponenata, što dovodi do promena hemijskih osobina fenolnih komponenata. Konjugaciji podležu kako ugljenihidrati i lipidi tako i proteini, aminokiseline, amini, terpenoidi, alkaloidi ili fenoli i dr. U dodatku, nerastvorljivi oblici hidroksicinamata vezani u polimere kao kutini, suberini, lignini ili polisaharidi su frakcije ćelijskog zida. Sistematičnom podelom konjugovanih hidroksicinamata može se ukazati na korelaciju sa sistematično uređenim biljnim familijama. Tako npr. familije *Scrophulariaceae* i *Oleaceae* karakterišu estri kafeata (kafeoil-disaharidi), *Asteraceae* *Solanaceae* i *Rubiaceae* sadrže domuinantan 5-O-kafeoilhinat (hlorogenat), kafeoldihidroksi-fenillaktat (rozmarinat) je fitohemijski marker za familije *Lamiaceae* i *Boraginaceae*, a sinapat estar – sinapoilholin (sinapin) za familiju *Brassicaceae*. I drugi primeri ukazuju da se konjugovani hidroksamati mogu koristiti kao hemmarkeri u hemotaksonomiji biljaka

### 16.6.1. Reakcije konjugacije

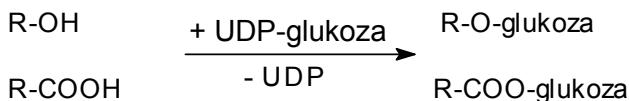
Reakcije konjugacije mogu odrediti da li će komponenta u reakciji biti prevorena u krajnji metabolički inaktivni proizvod (stalna rezerva) ili u prolazano (privremeno) akumulirani intermedijer koji može biti supstrat za neke buduće metaboličke puteve tipa daljih konjugacija, interkonverzija ili degradacija. Pored toga, UDP-glukozo-zavisne transferaze su uključene u formiranje hidroksicinamatglukozo estara (1-O-acilglukozidi) ili glukozida. Tri su tipa ovih enzima koji katalizuju formiranje konjugovanih hidroksicinamata: (i) hidroksicinamoil-CoA-tioester-, (ii) hidroksicinamat 1-O-acilglukozid- i (iii) hidroksicinamat-O-ester-zavisne transferaze. Danas je poznato da put iskoštavanja nije zavisan samo od prirode konjugacije, već pre od izvora upotrebljenog enzima, kao i ispitivane biljne vrste. Dobar primer za to je konvergiranje pravaca za nastajanje hidroksicinamat-O-estara (O-kafeoilglukarata) koji se akumulira u listovima različitih biljaka (slika 16-7). U *Secale cereale* (Poaceae) biosintetički procesi vode od kafeoil-CoA tioestra, u *Cestrum elegans* (Solanaceae) od 1-O-kafeoilglukoze, i u *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) put vodi od 5-O-kafeoilhinata (hlorogenata).



Slika 16-7. Alternativni putevi biosin-teze kafeoil-glukarata.

### 16.6.2. Konjugacija sa glukozom

Konjugacija fenola sa šećerima je katalizovana transferazama koje koriste aktivirane nukleotid-šećere kao što je npr. UDP-glukozo-zavisna glukoziltransferaza. Uopštena shema reakcije glukozil-transfera (prenosa glukoze), može se prikazati na sledeći način:



Za očekivati je da energija oslobođena hidrolizom nukleotid-šećera prevazilazi energiju nastanka fenol-glukozida. Utvrđeno je međutim, da reakcije stvaranja fenolnih glukozida kao i 1-O-acilglukozida (estara) fenolnih kiselina, mogu biti slobodno reverzibilne. Ovo ukazuje da glikozidna veza glukoze (C-1) sadrži veliki potencijal za prenos grupe. *In vitro* studijom je dokazano da UDP-glukoza može nastati u uvećanoj količini iz fenolnih glukozida i slobodnog UDP (slika 16-8).

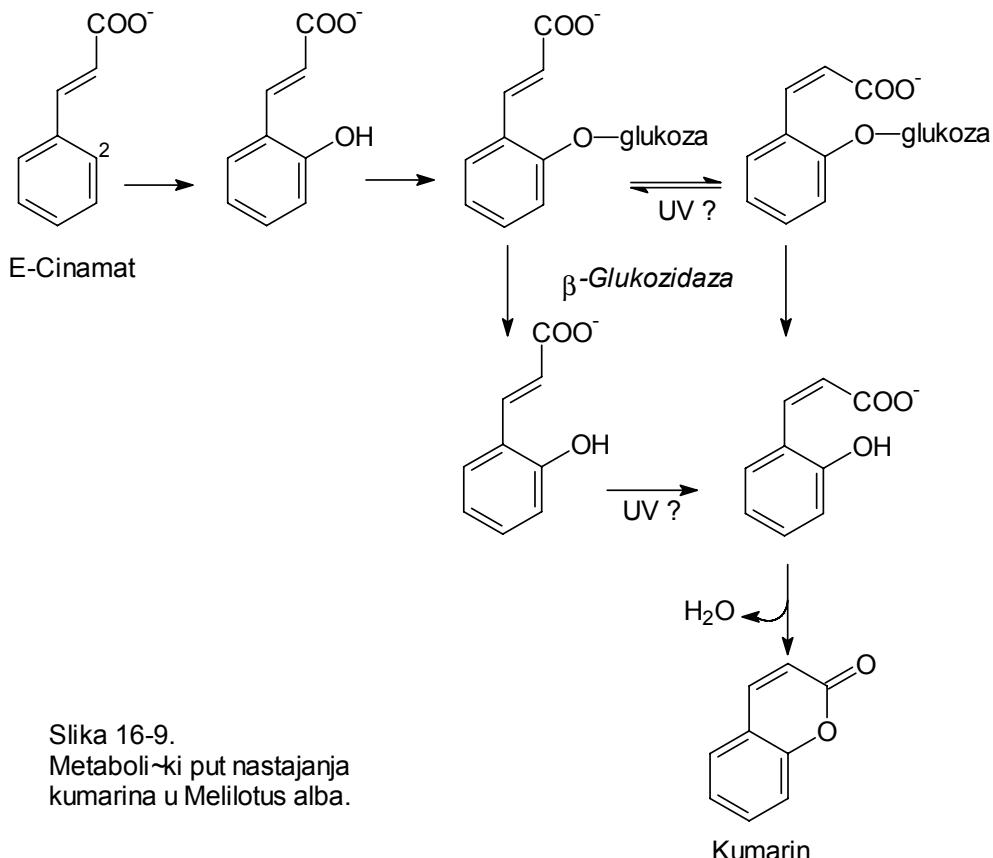
<i>Raphanus</i> :	
1-O-Sinapil- $\beta$ -glukoza	$\xrightarrow[-\text{Sinapat}]{+\text{UDP}}$ UDP-glukoza
<i>Picea</i> :	
4-O- $\beta$ -Glukozilkoniferilalkohol	$\xrightarrow[-\text{Koniferil alkohol}]{+\text{UDP}}$ UDP-glukoza
<i>Petroselinum</i> :	
Kvercetin 3-O- $\beta$ -glukozid	$\xrightarrow[-\text{Kvercetin}]{+\text{UDP}}$ UDP-glukoza

Slika 16-8. *In vitro* nastajanje UDP-glukoze iz acilglukozida (estar) sa zaštitnim proteinima iz *Raphanus sativus* (Brassicaceae), kao i fenolnih glukozida sa zaštitnim proteinima iz *Picea abies* (Pinaceae) i *Petroselinum crispum* (Apiaceae).

## 16.7. Hidroksikumarini

Neke vrste biljnih familija *Rutaceae*, *Solanaceae* i *Apiaceae* akumuliraju velike količine hidroksikumarina. To su laktoni formalno izvedeni iz 2-hidroksicinamata što vodi do kumarina (nesupstituisan aromatični prsten) ili iz 2-hidroksilovana hidroksicinamata što vodi do hidroksikumarina. Formiranje laktona teče u mestu između 2-hidroksil grupe i karboksilne grupe na C<sub>3</sub> bočnog lanca. Preduslov za ovu reakciju je izomerizacija E-hidroksicinamata u Z-hidroksicinamat.

Tačka granjanja u fenilalanin/hidroksicinamat putu do kumarina i hidroksicinamata je 2-hidroksilacija. Prisustvo specifične 2-hidroksilaze nije još uvek nedvosmisleno dokazano, mada neki radovi ukazuju da postoji aktivnost koja pokazuje slična svojstva onima koja pokazuje enzim E<sub>2</sub>, što verovatno uključuje NIH premeštanje. Sam put do kumarina (slika 16-9), dobro poznatog konstituenta nekih zeljastih vrsta odvija se iz oba izomera cinamične kiseline (E- i Z-cinamata) preko 2-O-glukozida.

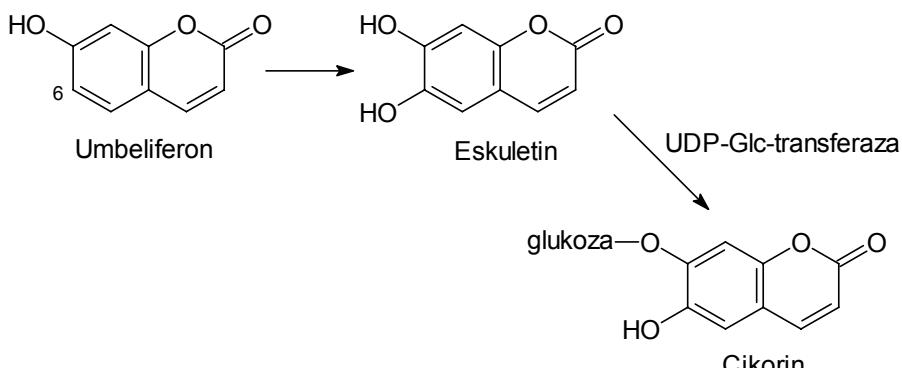


Slika 16-9.  
Metabolički put nastajanja  
kumarina u *Melilotus alba*.

Prepostavlja se da se E-izomer transportuje u vakuole gde se transformiše u velikom stepenu u Z-izomer. Ova izomerizacija može biti indukovana UV zracima, što se lako može demonstrirati u *in vitro* eksperimentima. Međutim, ima dokaza o izomerizaciji u vakuolama i u odsustvu svetlosti.

Finalna faza u formiranju kumarina je laktonizacija koja se dešava spontano nakon deglukozilacije (između hidroksila na C-2 u prstenu i karboksila na C-3 u bočnom nizu), što je katalizovano  $\beta$ -glukozidazom kada je tkivo oštećeno, npr. pri mehaničkim povredama. Ovo je uzrok karakterističnom mirisu sveže pokošenog sena. U neoštećenom tkivu,  $\beta$ -glukozidaza i 2-O-glukozid su odvojeni jedan od drugoga na ćelijskom nivou. Glukozid je lociran u vakuolama, a  $\beta$ -glukozidaza je udružena sa ćelijskim zidom ili je locirana unutar intercelularnog prostora.

Smatra se da se hidroksikumarini, čije se supstituisane strukturne formule izvode najverovatnije iz odgovarajućih hidroksicinamata, slično nesupstituisanim kumarinima takođe nalaze u živim ćelijama. Najpoznatiji hidroksikumarini, međutim, egzistiraju kao aglikoni ili kao konjugati kao što je cikorin (eskuletin-7-O-glukozid) u *Cichorium intybus* (Asteraceae). Kumarat vodi do umbeliferona, kafeat do eskuletina, a ferulat do skopoletina. Međutim, takođe je evidentno da supstituisane strukture hidroksikumarina mogu biti određene na nivou strukture kumarina, analogno sekvenčijalnim reakcijama supstitucije u fenilalanin-hidroksicinamat putu. Jedan od primera je i biosinteza cikorina iz umbeliferona izvedenog iz Z-4-kumarata (slika 16-10). Hidroksilovanje umbeliferona na C-6 vodi do eskuletina. Finalni stepen u biosintezi je glukolizacija na C-7 sa UDP-glukozo-zavisnom glukoziltransferazom

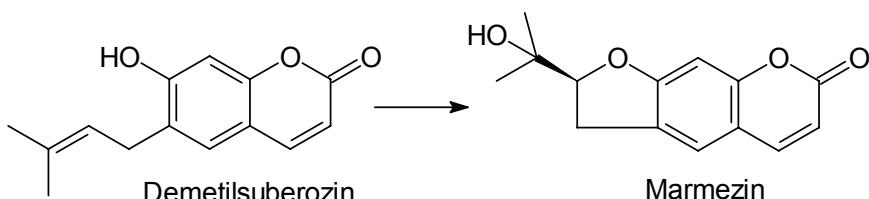


Slika 16-10. Nastajanje cikorina iz umbeliferona.

Biljke sintetizuju više kompleksnih hidroksikumarina od kojih su glavni izvedeni iz umbeliferona. Ovo su različiti fenilovani hidroksikumarini od kojih vodi sinteza nekoliko stotina lipofilnih furanokumarina i

dihidropiranokumarina. Oni se učestalo izlučuju u posebne kanale ili na površine slične vosku. Mnogi furanokumarini su toksični i neki od njih su istinski fitoaleksini koji inhibiraju rast spora patogenih gljiva. Ćelijske kulture nekih vrsta Apiaceae (kao npr. *Petroselinum crispum* ili *Ammi majus*) tretirane sa elicitorom gljiva iz *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* ili *Alternaria carthami*, može biti dobar model sistem za ispitivanje enzimologije i regulacije biosinteze derivata hidroksikumarina.

Dva ključna enzima dimetilaliltransferaza i ciklaza (citohrom P-450-monooksigenaza) su uključena u biosintezu flavonoidnih-pterokarpa. Mada krucijalni stepeni u ovim putevima nisu još uvek nedvosmisleno objašnjeni, verovatno je da oksidativne ciklizacije preko epoksida vode do različitih hidroksikumarina. Ključni enzim u ovoj biosintezi je marmezin sintaza (citohrom P-450-monooksigenaza) koja katalizuje konverziju demetilsuberozina u marmezin koji se smatra centralnim prekursorom za oba furano- i dihidropiranokumarina (slika 16-11).



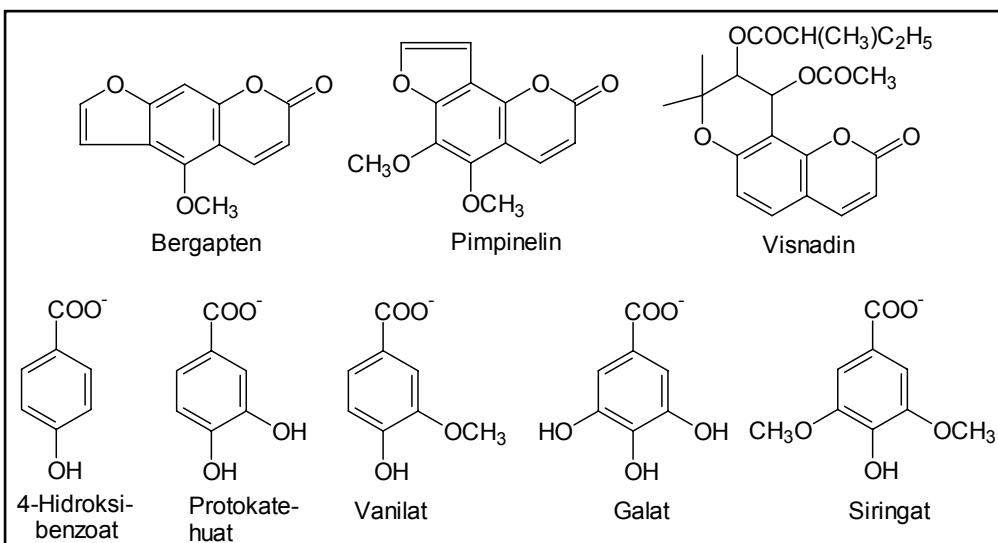
Slika 16-11. Biosinteza marmezina katalizovana NADPH-i O<sub>2</sub>-zavisnom marmezin sintazom.

Primeri različitih klasa stvorenih komponenata su bergapten, linearni furanokumarin, iz bergamot ulja (esencijalno ulje iz *Citrus aurantium bergamia*; Rutaceae), pimpinelin iz *Pimpinella* vrsta (Apiaceae) i visnadin biološko aktivni kompleks dihidropiranokumarin derivat iz *Ammi visnaga* (Apiaceae).

## 16.8. Hidroksibenzoati

Kao i hidroksicinamati, čini se da su i hidroksibenzoati (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) univerzalno distribuirani u biljkama. Od hidroksibenzoata obično su prisutni 4-hidroksibenzoat, protokatehuat, vanilat, galat, salicat i siringat. Oni mogu biti prisutni u obliku rastvornih konjugata pošto se vezuju za frakcije ćelijskog zida kao što je vezivanje za lignin. Trihidrosilni derivat galata je učestalo prisutan u visokim molekularnim strukturama kao što su galotanini. Drugi uobičajeni hidroksibenzoat je salicilat (2-hidroksibenzoat).

On je značajno prisutan u familiji Ericaceae najčešće kao metil-estar u esencijalnim uljima.

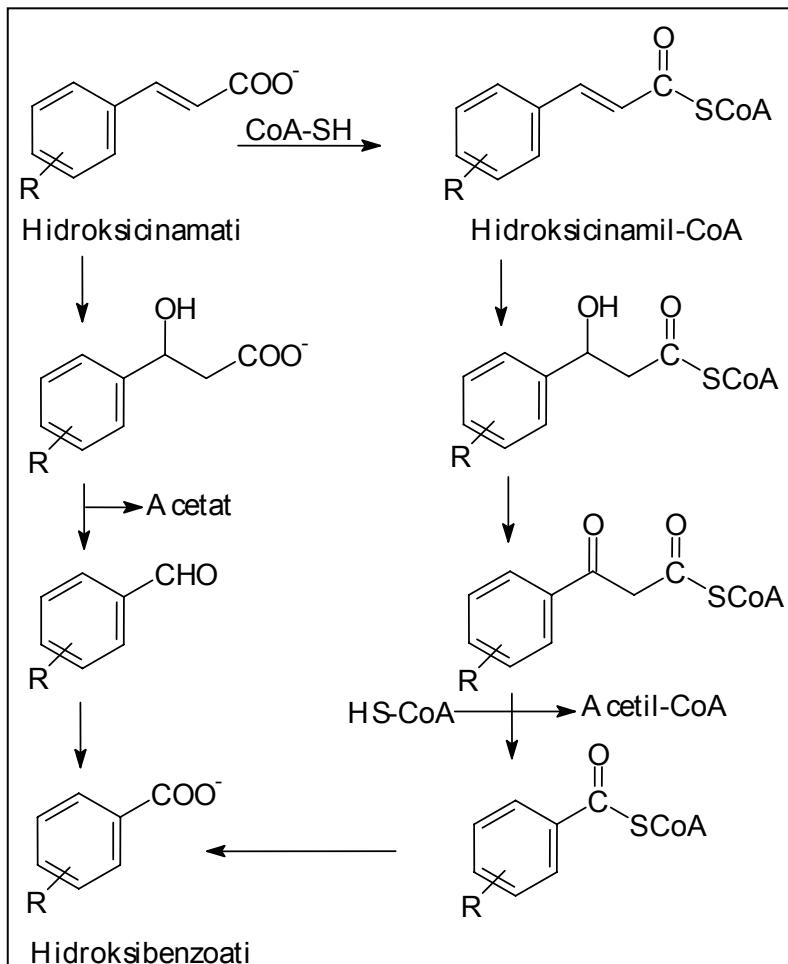


Ima više suprostavljenih mišljenja koji se tiču biosinteze hidroksibenzoata. Verovatno je da putevi biosinteze koji vode do individualnih hidroksibenzoata zavise od biljke. U jednom od glavnih puteva dolazi do degradacije u bočnom lancu hidroksicinamata uklanjanjem acetata. U drugom reakcionom nizu predložen je postupak koji teče preko CoA-estra, analogno  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina (slika 16-12).

Supstituisane strukture hidroksibenzoata mogu biti određene pomoću prekursora hidroksicinamata, polazeći od toga da hidroksibenzoati podležu reakcijama hidroksilovanja i metilovanja analogno reakcijama u fenilalanin-hidroksicinamat putu.

Hidroksibenzoat sa tri supstituisane OH grupe (galat) može takođe nastati u putu koji vodi od šikimat-rogenat puta do 3-dehidrošikimata. Direktna aromatizacija enolnog oblika 3-dehidrošikimata je verovatno preovlađujući put koji vodi do galata u biljkama. Ovo je potvrđeno i eksperimentima u kojima je korišćen <sup>14</sup>C-šikimat.

Hidroksibenzoati mogu biti korišteni kao prekursori za druge proizvode metabolizma. Tako npr. neki od njih se preko CoA estara, mogu redukovati do benzaldehida i benzilalkohola ili konjugovati tako što formiraju estar u biosintezi kokaina (nesupstituisanog benzoata). Hidroksibenzoati su takođe nađeni i kao acil derivati u acilovanim flavonoidima.



Slika 16-12. Postulirani putevi biosinteze hidroksibenzoata.

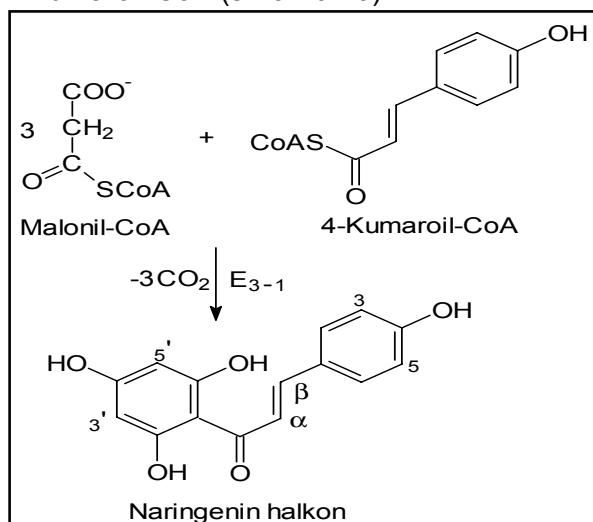
## 16.9. Flavonoidi

Poznato je više od 5000 različitih flavonoida koje sintetizuju biljke. Aglikonski skelet  $C_{15}$  pojavljuje se u različitim strukturnim klasama zavisno od oksidacionog stanja centralnog piranovog prstena. Strukture unutar ovih klasa se modifikuju pomoću hidrosilikacije i metoksilikacije. Flavonoidi se obično glukoziluju, a osim toga mnogi od njih se aciluju sa alifatičnim i aromatičnim kiselinama. Enzimi koji su neophodni za biosinteze flavonoid-aglikon strukture (flavonoid-aglikon put) su ispisani u enzymskom boksu 3.

## 16.9.1. Sinteza halkona i izomera halkona

Halkon-sintaza ( $E_{3-1}$ ) se smatra limitirajućim enzimom u sintezi flavonoida, jer katalizuje formiranje osnovnog  $C_{15}$  skeleta i tako kanališe osnovni put hidroksicinamata u biosintezi flavonoida. Ovaj enzim katalizuje reakciju kondenzacije 4-kumaroil-CoA sa tri molekula malonil-CoA do forme "naringenin halkona" (2',4,4',6'-tetrahidroksihalkon). Halkon-sintaza je dimerni protein sa Mr 78.000 – 88.000 i verovatno dve identične subjedinice. Optimum pH za navedenu reakciju je u rangu 7.5 – 8.5 i visoko je specifičan za 4-kumaroil-CoA kao i za neke druge hidroksicinamate.

Naringenin halkon je prvi u lancu biosinteze koji poseduje monohidrosilni B-prsten, a što je tipično za sve flavonoide. Predviđeni mehanizam podrazumeva transfer "aktiviranog acetata" iz malonil-CoA do 4-kumaroil-CoA (slika 16-13).



Slika 16-13.  
Hemizam sinteze naringenin halkona.

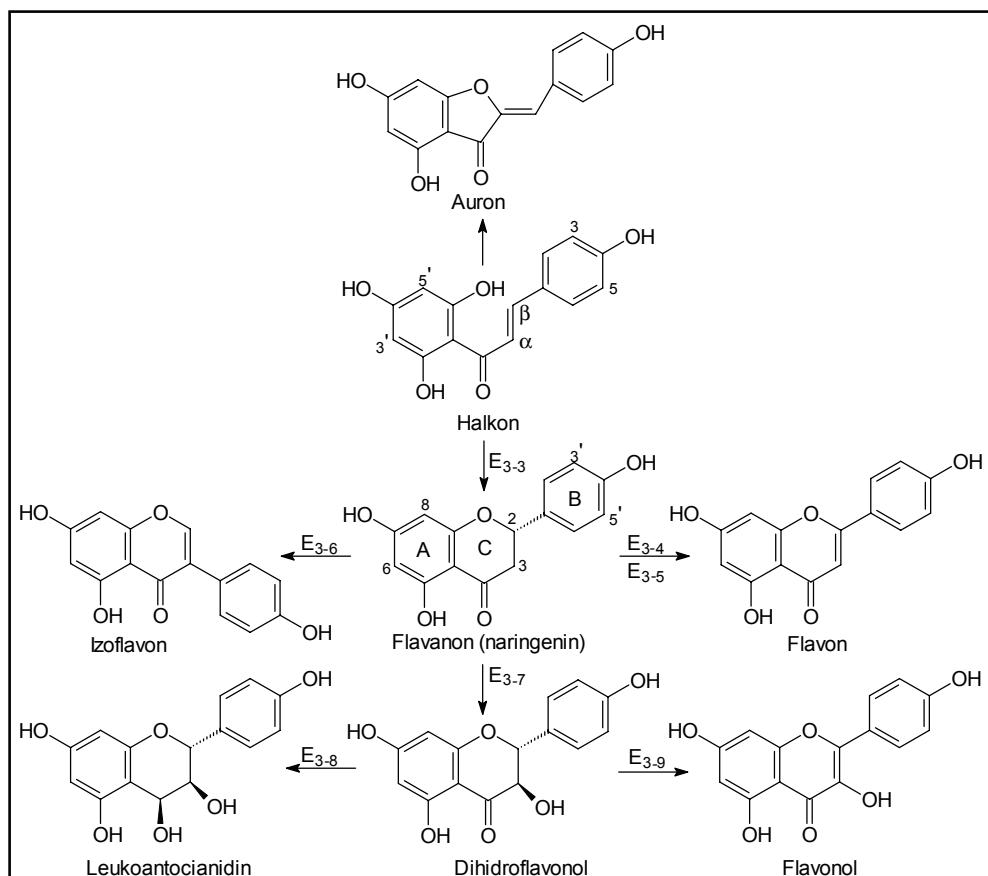
"Slučajnom" orientacijom (eng. random) acetatne jedinice obrazuju A-prsten flavonoida. Ovo vodi do 5-hidroksiflavonoid puta obrazovanja tipične 5,7-hidroksilovane strukture floroglucinol tipa (struktura poliketidnog hidroksilovanja prstena) A-prstena flavonoida. Halkon-sintaza

koristi estre CoA kao neposredne supstrate, suprotно od enzim-vezanih estara u kompleksu sa ACP (acyl carrier protein) kod sinteze masnih kiselina.

### Enzimski boks 3. Flavonoid-aglikon put:

$E_{3-1}$ – Halkon-sintaza	$E_{3-2}$ – Acetil-CoA karboksilaza
$E_{3-3}$ – Halkon izomeraza	$E_{3-4}$ – Flavon-sintaza I
$E_{3-5}$ – Flavon-sintaza II	$E_{3-6}$ – Izoflavon-sintaza
$E_{3-7}$ – Flavanon 3-hidrosilaza	$E_{3-8}$ – Dihidroflavonol/dihidroflavon 4-reduktaza(dioksi genaza)
$E_{3-9}$ – Flavonol-sintaza	$E_{3-10}$ – Flavan-3,4-diol 4-reduktaza

Delovanjem enzima ATP-zavisne acetil-CoA karboksilaze ( $E_{3-2}$ ) obezbeđuje se malonil-CoA kao supstrat za halkon-sintazu. Ovo je tipična enzimska reakcija u sintezi masnih kiselina. To je takođe, kao što se vidi i ovde, kao i u narednoj sekciji (sekcija 16.9.4 konjugacija flavonoida) integralni deo sinteze flavonoida. Snabdevanje malonil-CoA je važno za izgradnju bloka flavonoid-aglikona i kao acil-donor za malonilaciju glikozida. Sledeći enzim u sintezi halkona i izomera halkona ima veoma sličnu aktivnost kao i halkon-sintaza. On takođe koristi 4-kumaroil-CoA i tri molekula malonil-CoA kada gradi C<sub>15</sub> fenole. Ova sintaza, čija kataliza teče preko različitih mehanizama, vodi do nastajanja stilbena (stilben-sintaza), a po sličnom hemizmu i do rezveratrola ili pinosilvina. Osnova za poređenje ova dva enzima, utvrđena na bazi klonirane sekvene gena i analiziranog mehanizma reakcije, je pokazala da su halkon- i stilben-sintaza dva veoma srodnih enzima.



Slika 16-14. Putevi sinteze glavnih klasa flavonoid-aglikona.

Ima flavonoida koji nemaju 5-OH grupu, kao što je flavanon lihiritigenin ili izoflavanoid gliceolin. Ove strukture nastaju aktivnošću NADPH-zavisne reduktaze pre zatvaranja prstena A, iz intermedijera vezanih za halkon-sintazu, u 5-deoksiflavonoidnom putu. Smatra se da prsten A obavezno nastaje iz 2'-deoksi proizvoda trihidroksihalkona pravilnom orientacijom acetatnih jedinica.

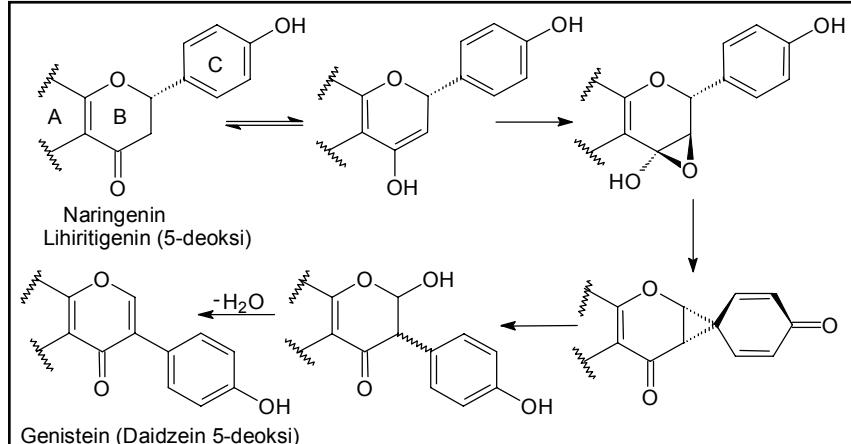
Ciklizacijom halkona enzimom halkon-izomerazom ( $E_{3-3}$ ) u 5-hidroksiflavonoidnom putu nastaje flavanon naringenin (slika 16-14). Halkon-izomeraza je čvrsto vezana u kompleks sa halkon-sintazom za vreme sinteze flavanona. Takav kompleks sprečava moguću neenzimsku ciklizaciju halkona do R-konformacije na C-2.

## 16.9.2. Biosinteza klase flavonoida

Flavonoid-aglikoni se klasifikuju prema stepenu oksidacije heterocikličnog prstena C (piranski prsten) koji sadrže dva benzenska prstena A i B. Slika 16-14 zbirno prikazuje sve enzime koji su uključeni u sintezu različitih klasa flavonoida (enzimski boks 3). Auroni direktno nastaju iz halkona. Enzimologija ove reakcije, verovatno sadrži i posredno stepen peroksidacije, još uvek je nepoznata. Flavanon naringenin je prekursor za tri različite klase flavonoida; flavone, izoflavone i dihidroflavonole.

### (a) Izoflavoni

Oksidativnim "uređenjem" naringenina sa 2;3-aryl-premeštanjem nastaje izoflavon genistein. Predviđeni mehanizam ove reakcije dat je na slici 16-15.



Slika 16-15. Predloženi mehanizam aktivnosti izoflavon-sintaze ( $E_{3-6}$ ) u formiranju genisteina (5-hidroksiflavonoid put) i diadzeina (5-deoksiflavonoid put).

Inicijalni stepen u formiranju izoflavona može biti epoksidacija katalizovana izoflavon-sintazom ( $E_{3-6}$ ). Nakon strukturne izmene, (aril-premeštanjem, dodatkom hidroksil-jona na C-2 i eliminacijom vode pomoću dehidrataze) dobija se struktura izoflavona. Dehidratacija je verovatno katalizovana posebnim rastvorljivim enzimom. Analogne reakcije teku i pri sintezi flavona i flavonola.

### (b) Pterokarpani

Važna podgrupa izoflavona su pterokarpani. Oni su, zajedno sa izoflavonima, karakteristični konstituenti u membranama biljaka familije *Fabaceae* koje poseduju fungicidnu i baktericidnu aktivnost. Među brojnim ispitivanim biljkama sa znatnom produkcijom pterokarpana su leguminoze *Cicer arietinum* (leblebjija), *Glycine max* (soja), *Medicago sativa* (lucerka) i *Pisum sativum* (grašak). Kao primer biosinteze pterokarpana na slici 16-16 dat je put u biosintezi gliceolina u *Glycine max*. Najvažniji enzimi su prikazani u enzimskom boksu 4.

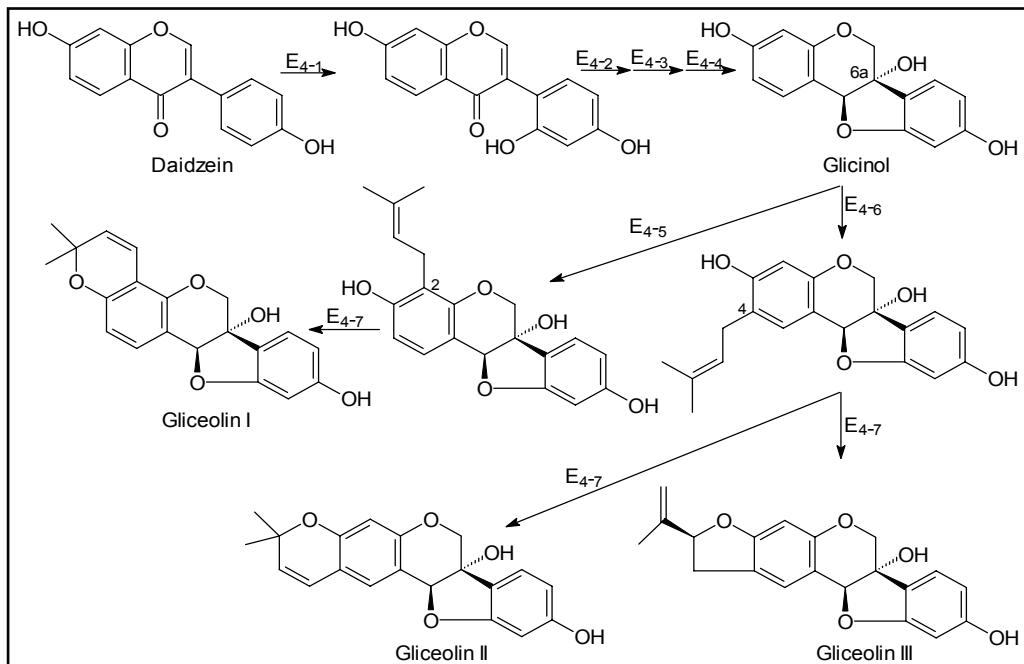
U 5-deoksiflavonoid putu polazna supstanca je daidzein. Oksigenaze uključene u ovaj put su membran-vezane citohrom P-450-monooksigenaze. Krajnji stepeni su prenilacije sa ili bez ciklizacije. Dve zasebne  $Mn^{2+}$ -zavisne preniltransferaze ( $E_{4-5}$  i  $E_{4-6}$ ) su opisane. One katalizuju transfer dimetilalil grupe iz dimetilalilpirofosfata (DMAAPP) do C-2 ili C-4 u pterokarpanskom jezgru. Dimetilalil-transferaze takođe katalizuju formiranje prenilovanih kumarina i prenilovanih dihidroksinaftoata u biosintezi antrahinona. One su takođe dobro poznate u putu biosinteze izoprenoida. Ciklizacija pterokarpan-izoprenil-strane lanca je katalizovana pterokarpan-ciklazom ( $E_{4-7}$ ) koja takođe istupa kao citohrom P-450-monooksigenaza.

Ona katalizuje ciklizaciju oba 2- i 4-dimetilalilglicinola. Primećeno je da elicitor preparati indukuju većinu enzima u pterokarpan-gliceolin putu, uključujući i one koji katalizuju reakcije metabolizma fenilpropanoida. Obično preparati su micelie ili zoospore iz patogena *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*.

#### Enzimski boks 4. Pterokarpan-gliceolin put

$E_{4-1}$  Izoflavon-2'-hidroksilaza  
 $E_{4-3}$  Pterokarpan-sintaza  
 $E_{4-5}$  Preniltransferaza I  
 $E_{4-7}$  Pterokarpan-ciklaza

$E_{4-2}$  2'-Hidroksiizoflavon-reduktaza  
 $E_{4-4}$  Pterokarpan 6a-hidroksilaza  
 $E_{4-6}$  Preniltransferaza II

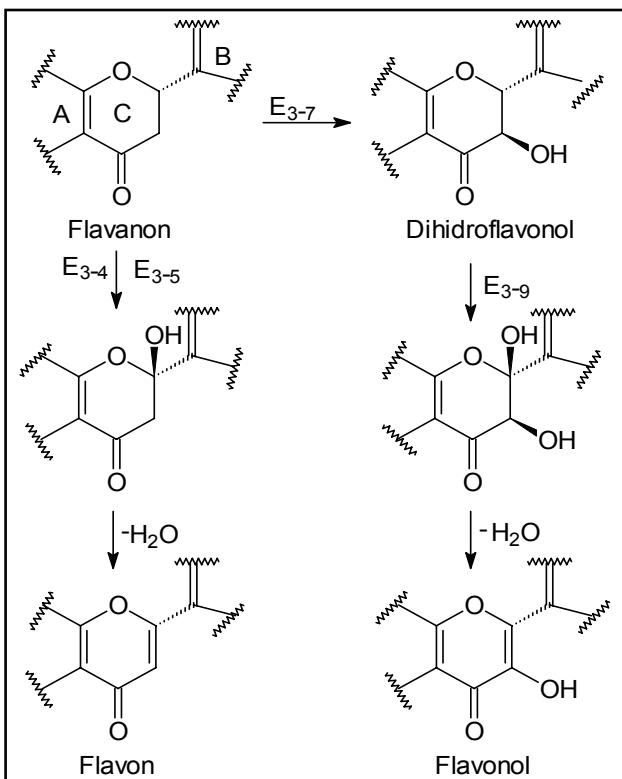


Slika 16-16. Biosinteza glicelolina (I, II i III) u *Glicine max*.

### (c) Flavoni i flavonoli

U glavnom putu sinteze uobičajenih klasa flavonoida (slika 16-14), iz flavanona naringenina nastaju flavoni uvođenjem duple veze između C-2 i C-3. Potrebna su dva stepena reakcije za ovu konverziju. Mada ovo nije još definitivno dokazano, predpostavlja se da u prvom stepenu nastaje 2-hidroksiflavanon ( $E_{3-4}$ ,  $E_{3-5}$ ). U drugom stepenu, voda se eliminiše, pomoću dehidrataze. Dve različite flavon-sintaze katalizuju ove reakcije: flavon-sintaza I (npr. kod *Petroselinum crispum*; Apiaceae) je tipična dioksigenaza i flavon-sintaza II (npr. kod *Antirrhinum majus*; Scrophulariaceae) je monooksigenaza.

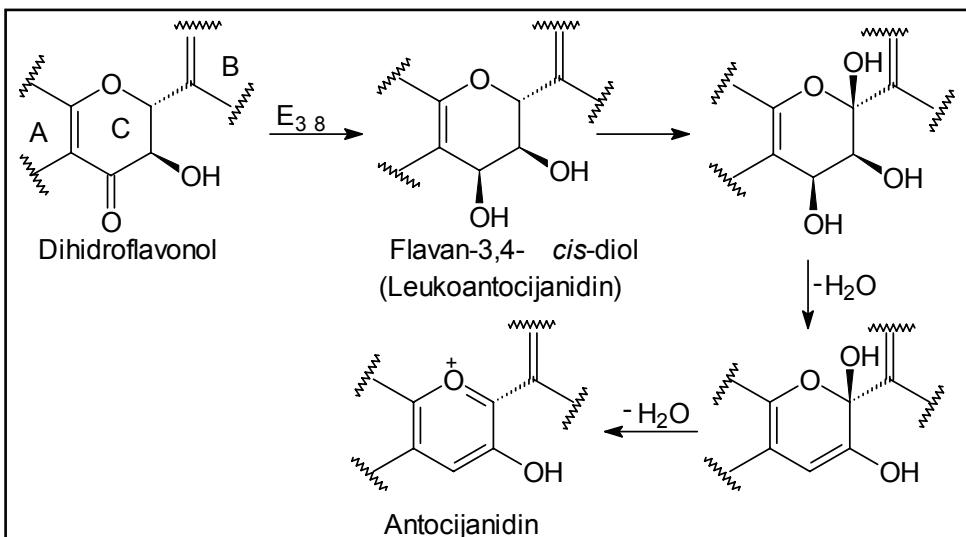
U analognom nizu reakcija nastaju najzastupljeniji flavonoli. Enzim flavanon-3-hidroksilaza ( $E_{3-7}$ , rastvorljiva dioksigenaza) katalizuje formiranje 3-hidroksiflavanona (dihidroflavanol). Kao što je već opisano kod formiranja flavona; aktivnošću flavonol 2-hidroksilaze ( $E_{3-9}$ , flavonol-sintaza) hidroksiluje se supstrat (3-hidroksiflavanon) i na kraju se eliminiše voda pomoću dehidrataze. Dva proizvoda ovih reakcija su flavon apigenin i flavonol kampferol (slika 16-17).



Slika 16-17.  
Dva stepena reakcija, katalizovana flavon-sintazama ( $E_{3-4}$ , i  $E_{3-5}$ ) i flavonol-sintazom ( $E_{3-9}$ ), vode iz flavanona do flavona i iz dihidroflavonola do flavonola.

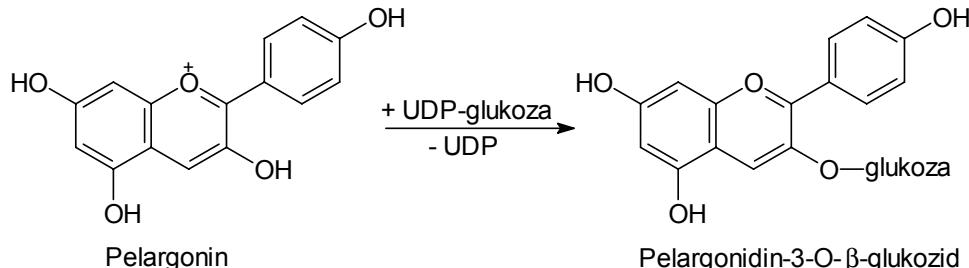
#### (d) Antocijanini i flavonoli

Dihidroflavonol može unutar drugog puta (slika 16-17) voditi do antocijanina. NADPH-zavisna dihidroflavonol-4-reduktaza ( $E_{3-8}$ ) katalizuje sintezu flavan-3,4-cis-diola, leukoantocijanidinske strukture. Sekvence reakcija u kojima nastaju antocijanidini nisu još uvek izvedene u *in vitro* eksperimentu. Hipotetična tri stepena puta uključuju hidroksilaciju i dve dehidratacije (slika 16-18).



Slika 16-18. Postulirane sekvene reakcija u sintezi jezgra antocijanidina.

Labilna flavilium struktura se stabilizuje glukozilacijom 3-OH grupe dajući pelargonidin-3-O- $\beta$ -glukozid. Ovaj stepen je katalizovan enzimom 3-O-glukoziltransferazom (slika 16-19).



Slika 16-19. Glukozilacija antocijanidina do prvog stabilnog antocijanina pelargonidin –3-O- $\beta$ -glukozida.

Dihidroflavanol-4-reduktaza ( $E_{3-8}$ ) takođe katalizuje redukciju flavanona (dihidroflavona) do flavan-4-ola. Potom, analognim nizom reakcija formira se struktura antocijanidina. Proizvodi su retko žuto obojeni 3-deoksiantocijanidini koji se nalaze u mahovini, papratima i nekim travama, kao i u nekim vrstama *Gesneriaceae* i *Bignoniaceae*.

Flavan-3,4-cis-diol je supstrat za drugi stepen biosinteze koji vodi do flavan-3-ola. On je katalizovan sa NADPH-zavisnom flavan-3,4-diol 4-reduktazom ( $E_{3-10}$ ), koja je uključena u biosinteze katehina kao i važnih elemenata strukture kondenzovanih tanina.

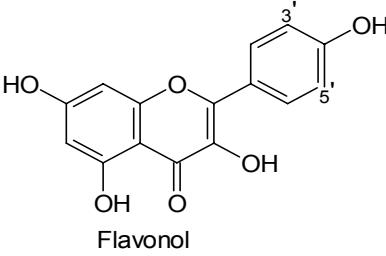
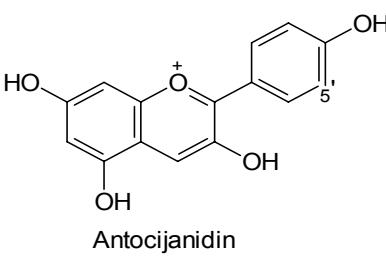
Dehidroflavanol-4-reduktaza ( $E_{3-8}$ ) uključena u biosintezu antocijana, bila je predmet genetskih transformacija za boju cvetova. Gen iz kukuruza (*Zea mays*; Poaceae) koji kodira dihidrokvercetin-4-reduktazu, enzim koji takođe akceptira dihidrokamferol kao supstrat, bio je unešen u beli mutant petunije (*Petunia hybrida*; Solanaceae). To je rezultiralo u sintezi derivata pelargonidina koji daju cvetovima ciglaružičasto obojenje nijansu koja ranije nije primećena kod petunija. Ovo je izvanredan primer za uvođenje novih enzimskih reakcija u biljke pomoći interspecifičnog transfera gena. Međutim, brojna su ograničenja, kao šarolika i nestabilna ekspresija, novo uvođenje gena, a znatan napor je još uvek potreban za efikasne modulacije heterologne ekspresije gena u biljkama.

### 16.9.3. Supstituisani flavonoidi

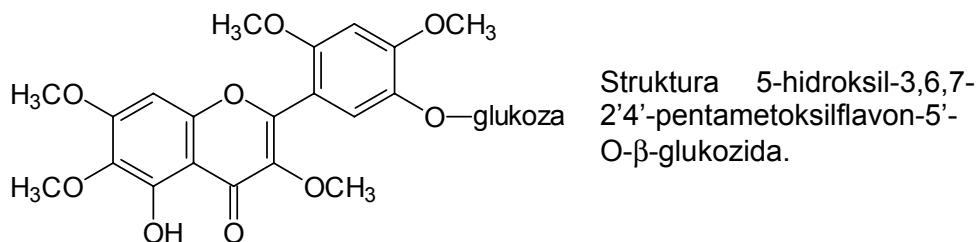
Osnovne supstituisane strukture flavonoida su delom određene načinom aktivnosti i supstratnom specifičnošću halkon-sintaze ( $E_{3-1}$ ) (5,7-hidroksil grupe na prstenu A i 4'-hidroksil grupe na prstenu B) i enzimima iz

flavonoid-aglikon puta (hidroksil grupa na prstenu C). Hidrosilacije, kao i metilacije hidrosilnih grupa, naročito na prstenu B, su katalizovane flavonoid-specifičnim hidrosilazama i O-metil-transferazama. 3'- i 5'-hidrosilacije su katalizovane sa citohrom P-450-enzimima. Posebno specifične SAM-zavisne O-metiltransferaze vode do nekih uobičajenih metoksilovanih flavonoida na prstenu B. Uobičajene supstituisane strukture flavonola i antocijanidina su prikazane u tabeli 16-1.

Tabela 16-1. Supstituisane strukture flavonola i antocijanidina.

 Flavonol	 Antocyanidin
<u>SUPSTITUCIJA</u>	
	3'
Kampferol	H
Kvercetin	OH
Miricetin	OH
Izoramnetin	OCH <sub>3</sub>
Laricitrin	OCH <sub>3</sub>
Siringetin	OCH <sub>3</sub>
	5'
Pelargonidin	H
Cijanidin Delfnidin	H
Peonidin	OH
Petunidin	H
Malvidin	OH
	OCH <sub>3</sub>

Katalitičkom aktivnošću metiltransferaza nastaju neki retki polimetoksilovani flavonoidi kao što su flavonol glukozidi tipa 5-hidrosil-3,6,7,2',4'-pentametoksiflavon-5'-O-β-glukozid. Ovim je pokazano da se nalazi pet flavonol-poziciono-specifičnih-O-metiltransferaza koje katalizuju sekvenčijalne metilacije koje vode do formiranja ovog pentametil etra.



### 16.9.4. Konjugovani flavonoidi

Izuvez nekih polimetoksilovanih derivata, koji se mogu naći u lipofilnim sekretima kao što je eksudat pupoljka, flavonoidi su obično u vodi rastvorljivi glikozidi koji se izlučuju u vakuolama. Oni su evidentno glikozidi, koji se sintetizuju u endoplazmatičnom retikulumu, a potom transportuju do vakuola.

Konjugovani flavonoidi nastali iz uobičajenih prostih 3-O-glikozida (monozida ili monoglikozida) preko rasprostranjenih 3-O-diglikozida (biozida) do glikozida, vezuju šećere za C-3 u prstenu C, kao i za C-5 i C-7 u prstenu A. Flavonoidi sa vezanim šećerima za prsten B su takođe poznati, ali su veoma retki. Poznato je nekoliko stotina različitih glikozida konjugovanih sa glukozom, galaktozom, ramnozom, ksilozom i arabinozom kao najčešćem šećerima. Dva glavna tipa vezivanja aglikona i šećera u konjugovanim glikozidima opisani su kao O- i C-glikozidi. Kao primer za to su rutin (kvercetin 3-O-rutinozid) i viteksin (apigenin 8-C-glukozid). Sva dosadašnja saznanja ukazuju da glikoziltransferaze koriste UDP-šećere kao glikozil-donore.

Konjugovani flavonoid nije ograničenje za glikozilaciju. Mnogi flavonoidi vežu acilovane šećere. Acil grupe su hidroksicinamatni ili alifatične kiseline kao malonat. Odgovarajuće transferaze koriste CoA-aktivirane kiseline kao acil-donore. Smatra se da hidroksicinamat-acilovani flavonoidi kao i hidroksicinamat-1-O-acilglikozidi mogu takođe služiti kao donori.

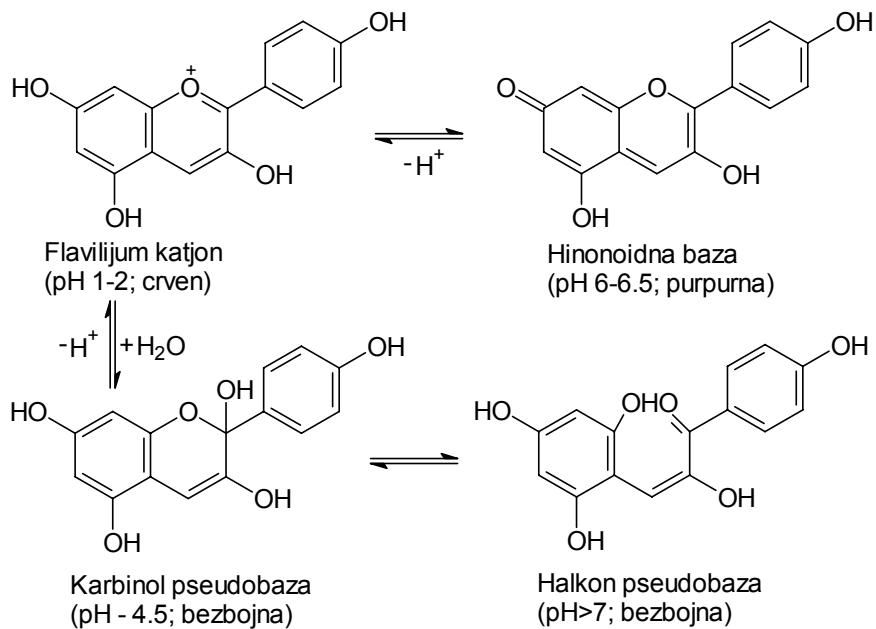
Aromatična acilacija antocijanina je doprinela stabilizaciji strukture antocijanidina u vakuolama. Acilacija flavonoida sa malonatom, kao najčešćom alifatičnom kiselom, može biti odgovorna za vakuolarnu "klopku" flavonoida kada dolazi do izmene u simetriji molekula izazvanoj kiselom sredinom u vakuolama.

Svakodnevno se povećava broj publikovanih radova o sulfatnim estrima flavonoida. Do danas je poznato više od 100 struktura flavon- i flavonol-sulfata. Enzimi uključeni u sinteze ovih estara su supstrat-specifične sulfotransferaze koje katalizuju transfer sulfatne grupe iz 3'-fosfoadenozin-5-fosfatosulfata (PAPS) kao sulfat donora do različitih hidroksilnih grupa flavonoida.

### 16.9.5. Konjugovani antocijanidini

Strukture antocijanina zahtevaju posebnu pažnju od saznanja da su to najkompleksnije konjugovane strukture među flavonoidima. Osnovu strukture čini *flavilinum* katjon (oksonium jon), ali zavisno od pH

antocijanini mogu egzistirati u različitim strukturnim oblicima (slika 16-20). Pri pH 4-6, što je pH interval najvećeg broja biljnih vakuola, hidratacijom jezgra antocijanidina dolazi do stvaranja bezbojne karbinol pseudobaze. Ovo može biti mehanizam za zaštitu anticijanina protiv hidratacije *in vivo*. Najefikasniji mehanizam zaštite je kopigmentacija: (i) intermolekulska kopigmentacija sa drugim ne-kovalentno vezanim bezbojnim supstancama (flavonol ili flavon glikozidi); (ii) intermolekulska kopigmentacija sa aromatičnim acil-grupama (npr. hidroksicinamatima) koji su deo strukture antocijana (sendvič tip slaganja) (slika 16-21)

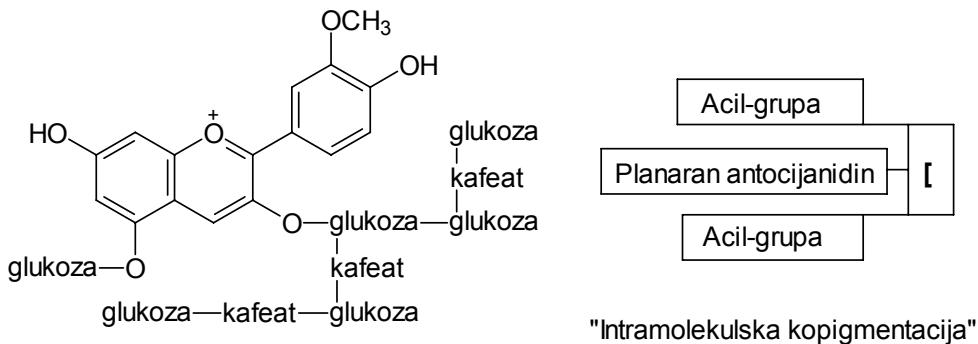


Slika 16-20.

Transformacija strukture antocijanina u vodenom rastvoru pri različitim pH vrednostima (pokazano za antocijanidin pelargonidin).

Intramolekulska kopigmentacija, u kompleksnoj acilovanoj strukturi anticijanina pokazana u *in vivo* konformaciji sa acil-grupama na jednoj ili drugoj strani jezgra antocijanidina, prema tome štiti flavilijum katjon od nukleofilne adicije vodom. Strukturni primeri potencijalno složenih konjugacija u anticijaninima su poliglikozilacija i poliacilacija. "Nebo-plavi anticijanin" iz plavih latica *Ipomoea tricolor* je izgrađen iz peonidina sa šest molekula glukoze i tri molekula kafene kiseline (slika 16-21). Kafeati se esterifikuju sa jednim molekulom glukoze i glikoziluju na jednoj od njениh aromatičnih hidroksilnih grupa sa drugim molekulom glukoze. Osim uobičajenih acilacija sa hidroksicinamatima alifatični dikarboksilati su

takođe nađeni kao acil-grupe, kao što su malonat, sukcinat, malat, ili oksalacetat u tzv. "cviterjonskim antocijaninima".



"Nebo-plavi antocijanin"  
Slika 16-21.

Struktura "nebo-plavog antocijanina" iz plavih latica *Ipomoea tricolor*. Shema intramolekulske kopigmentacije uopštava takvu konformaciju strukture; Š = šećer

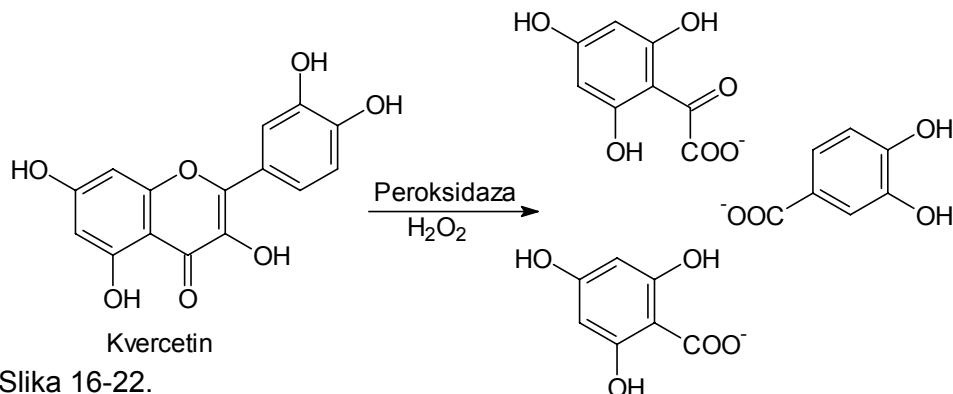
## 16.9.6. Degradirani flavonoidi

Najvažniji flavonoidi su istinski krajnji proizvodi i mogu ostati nepromenjeni do kraja života biljaka. Međutim, evidentno je da se promenjeni i degradirani flavonoidi takođe mogu nalaziti u biljkama. Među reakcijama degradacije su obično: hidroliza glikozida izazvana  $\beta$ -glukozidazama, demetilacija, hidratacija i oksidacija. Reakcije oksidacije mogu takođe dovesti do polimerizacije katalizovane peroksidazama. Jedna manifestacija ovih procesa je pojava polimera "zapečena supstanca" u povređenom tkivu kao odgovor na atak patogena ili na starost.

Peroksidaze su prisutne u velikom broju izoformi u različitim tkivima i ćelijskim kompartmentima. Supstratna specifičnost peroksidaza je relativno niska, suprotno njihovoј visokoj specifičnosti za  $H_2O_2$ . Destrukcija flavonoida izazvana aktivnošću peroksidaze, je proces što vodi do formiranja hidroksibenzoata, nastalih iz prstena A i B molekula flavonoida (slika 16-22). Međutim, globalna važnost degradacije flavonoida kao i način kojim se reguliše nisu poznate.

Očiglejan primer za iščezavanje flavonoida su antocijanini. Antocijanini se mogu akumulirati privremeno tokom ontogeneze biljke, na primer u mladim listovima gde mogu imati različite funkcije u procesima usvajanja svetlosti ili filtracije svetlosti. Osim toga, istinskom degradacijom antocijanini nestaju i zato što se mogu prevesti u bezbojne strukture. U

osnovi oni mogu nestati i zbog toga što se iz rastvornih mogu prevesti u nerastvorne oblike. Takođe je poznato da u vodi rastvorljivi flavonol-glikozidi mogu biti vezani za komponente čelijskog zida. Transportni mehanizam i mesto vezivanja nisu poznati.



Slika 16-22.

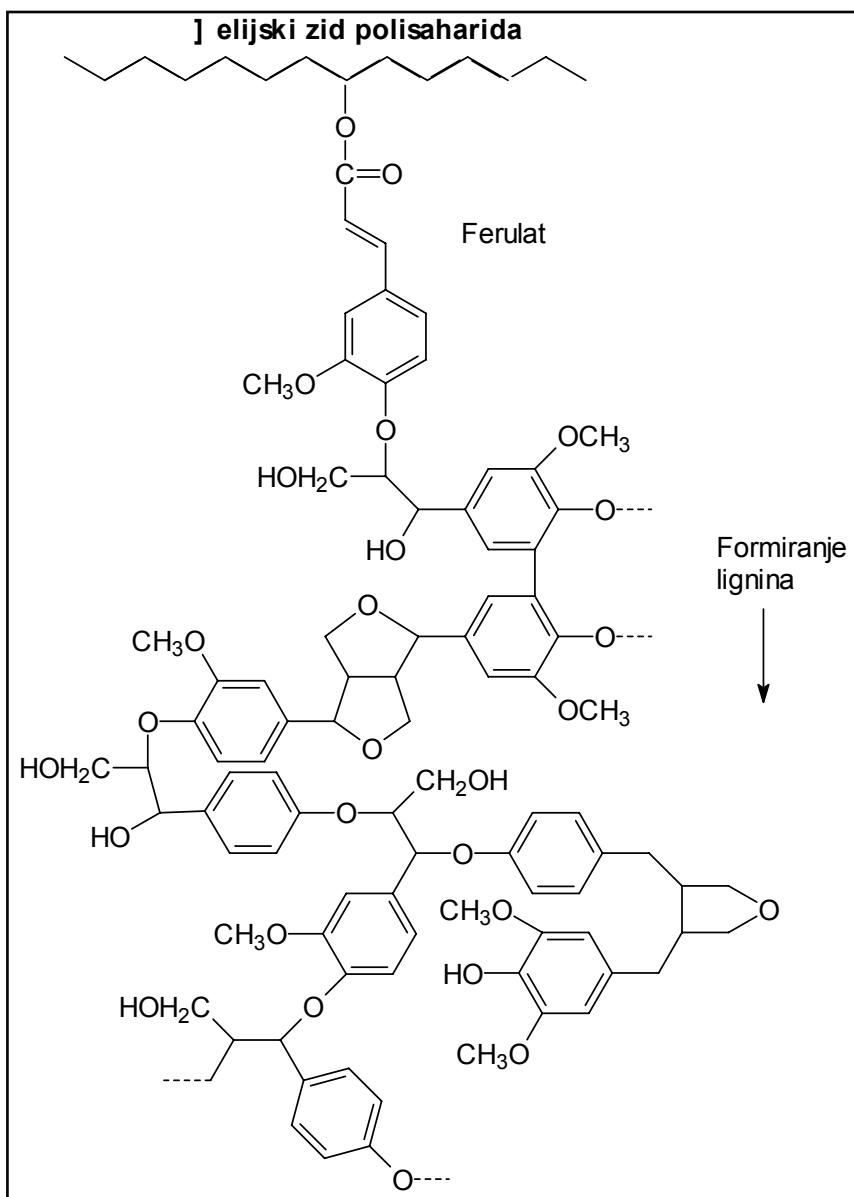
Peroksidazna aktivnost vodi do nastajanja hidroksicinamata iz degradiranog molekula flavonola (kvercetina).

## 16.10. Lignini

Lignini su heterogena grupa biljnih fenola. Po hemijskom sastavu su polimeri fenilpropana i značajni su konstituenti čelijskog zida. Oni daju zajedno sa drugim strukturama unutrašnju potporu tkivima. Ova tkiva omogućavaju vaskularnim biljkama da se razviju u veliko uspravno stablo. Lignini su uvek udruženi sa polisaharidima (celulozom i hemicelulozom). Čelijski zidovi kako vaskularnih tako i nevaskularnih biljaka imaju sličan odnos glavnih komponenata (celuloza : hemiceluloza : lignin : pektin – 4:3:1:0.1).

Lignini su amorfna jedinjenja koja se samo delimično rastvaraju u organskim rastvaračima (5 – 10 %). Oni su metaboliti biljnih ćelija i nalaze se izmeđe celuloznih mikrofibrila u čelijskom zidu. Na shemi je prikazan hipotetički deo strukture polimera lignina kao i njegovo moguće vezivanje za čelijski zid polisaharida (slika 16-23).

Monomerni konstituenti lignina su tri hidroksicinamil alkohola (monolignola). To su 4-kumaril, koniferil i sinapil alkohol. Kafeil alkohol nije nađen kao konstituent lignina. Lignin je karakteristična komponenta sekundarnih zidova ćelije. Od početka do kraja primarnog rasta lignini se uklanjanju prema "uglovima ćelije i srednje lamele. Prepostavlja se da inicijalni stepen može biti vezivanje (estarskom vezom) hidroksicinamata za specifičnu stranu u zidu polisaharida



Slika 16-23. Shema hipotetičkog dela strukture polimera lignina kao i njegovo moguće vezivanje za čelijski zid polisaharida.

Tada posredstvom peroksidaze vezuju se monolignoli, a hidroksicinamatni mogu formirati vezu između narastajućih polimera lignina i polisaharida. Zna se da ove reakcije u biljkama katalizuju 5 enzima

stvarajući monolignol radikale koji tada polimerizuju u ligninsku strukturu (Enzimski boks 5).

Na slici 16-24 je pokazano nastajanje koniferil alkohola i njegovog damera lignan pinorezinola uključujući i inicijaciju u nastajanju lignina. Ključne reakcije polaze od monomera lignina-monolignola koji se redukuje uz katalizu enzimima NADPH-zavisnom oksidoreduktazom; hidroksicinamat-CoA reduktaza ( $E_{5-1}$ ) i monolignol-dehidrogenaza ( $E_{5-2}$ ). Proizvodi monolignola se potom glukoziluju 4-O- $\beta$ -glukozidazom ( $E_{5-3}$ ) i tako prevode u strukture koje se lako transportuju u ligninske matrikse ćelijskog zida. Ova glukoza se potom uklanja pomoću  $\beta$ -glukozidaze ( $E_{5-4}$ ) i oslobađa monolignol unutar ligninskog puta. Nastajanje ligninske strukture iz monolignola je inicirano aktivnošću peroksidaze ( $E_{5-5}$ ) čime je otvoren put dehidrogenativne polimerizacije.

Interkonverzijom iz mezomernih slobodnih radikala preko "random" kuplovanja sledeći intramolekulske reakcije nastaje hinon-metid dimer. Daljim intermolekulskim reakcijama sa drugim fenolima i polisaharidima u ćelijskom zidu nastaju stabilne poprečne veze.

Interesantan fenomen je u činjenici da su u nekim lignificirajućim tkivima, kao što je monolignolom bogato tkivo kore drveta iz familije Fabaceae, samo Z-izomeri monolignola bili detektovani (vidi E/Z-izomere hidroksicinamata) kao npr. Z-koniferil i Z-sinapil alkoholi u *Fagus grandifolia* (Fabaceae). Njihova uloga u lignifikaciji i moguće uključivanje E/Z-monolignol-izomera već je dokazana.

#### **Enzimski boks 5**

##### **Formiranje monolignol radikala:**

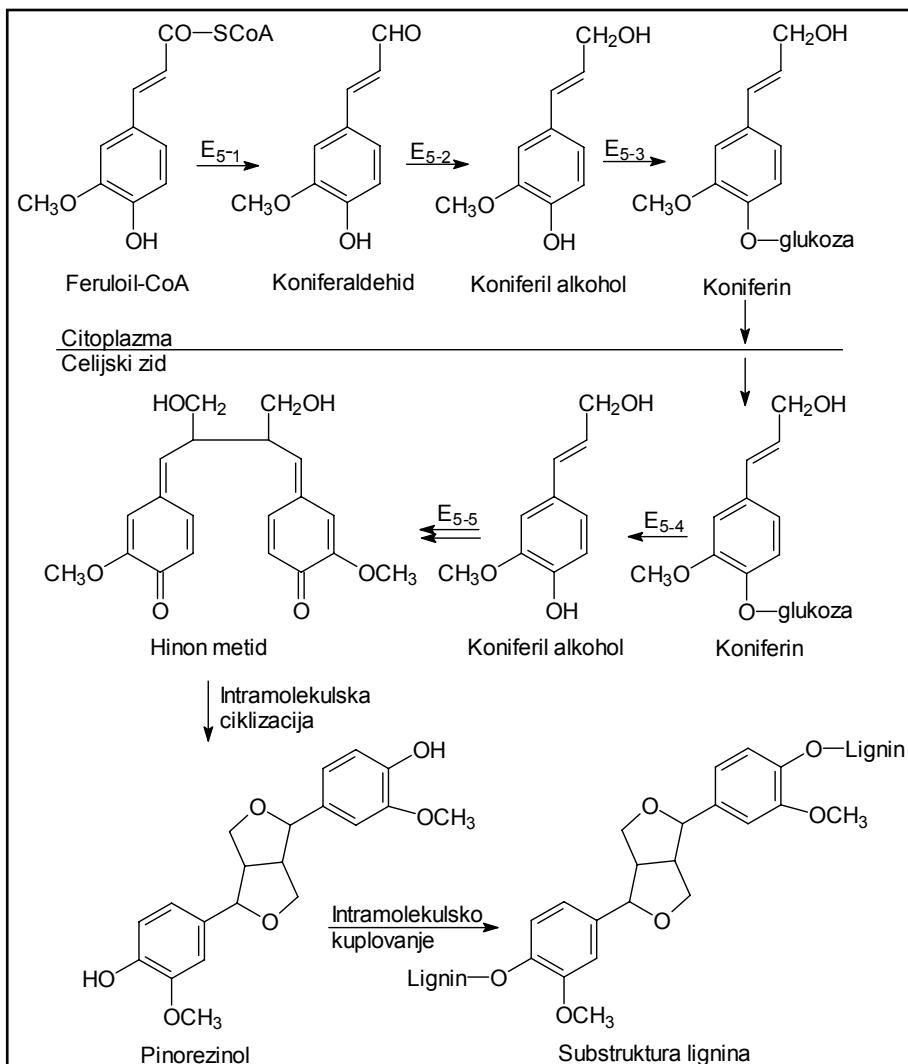
$E_{5-1}$  HCA-CoA reduktaza

$E_{5-2}$  Monolignol-dehidrogenaza

$E_{5-3}$  Monolignol-glukoziltransferaza

$E_{5-4}$  Monolignol-glukozid-  $\beta$ -glukozidaza

$E_{5-5}$  Peroksidaza; (monolignol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoreduktaza)



Slika 16-24. Rana faza nastajanja lignina uključuju biosintezu koniferil alkohola u citoplazmi, transport koniferina kroz ćelijski zid i inicijaciju biosinteze lignina.

## 16.11. Lignani i neolignani

Lignani se u osnovi definišu kao dimeri fenilpropana. Fenilpropanske jedinice su C-C vezom vezane uglavnom preko C<sub>3</sub>-strane lanca po sistemu *rep-rep* kao kod pinorezinola. Neolignani, kao što je futohinol, su takođe dimeri fenilpropana kod kojih su monomeri međusobno vezani po sistemu *glava-rep*.

Mada se lignani i neolignani izvode iz substruktura lignina, nema evidentnih dokaza da oni služe kao direktni prekursori ligninima. Umesto toga oni predstavljaju posebnu klasu fenola, pre nego što su samo prekursori lignina. Oni su široko distribuirani, u biljkama se akumuliraju kao rastvorljive komponente, neke od njih kao glikozidi, sa naglašenim interesom o njihovoj biološkoj aktivnosti. Ima primera o njihovom antimikrobnom, antifungalnom i antifidnom delovanju. Zna se da neolignal futohinol iz *Piper chamaejasme* (Piperaceae) služi kao insekt-antifidan. Osim toga, dobro je poznato da su lignani optičkiaktivni, njihova biosinteza je stereoselektivna i ne može biti proizvod tipične peroksidazne aktivnosti. Ovo poslednje bi vodilo stvaranju racemskih proizvoda što može biti put za dalja istraživanja. Takođe nema dovoljno podataka o katalitičkim mehanizmima biosinteze lignana i neolignana, kao i o specifičnim enzimima i njihovoj lokaciji.

## 16.12. Tanini

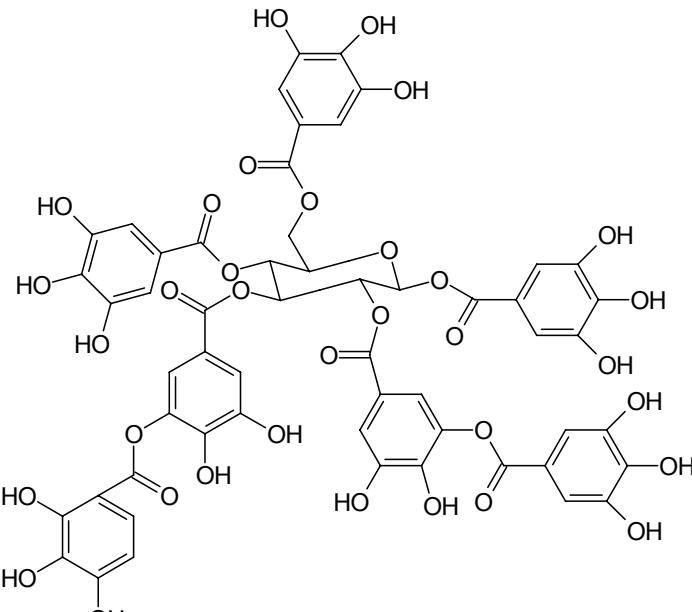
U vodi rastvorljivi biljni polifenoli koji izazivaju taliženje proteina iz vodenih rastvora nazivaju se taninima. Oni su oligo- i polimerni fenoli i podeljeni su u dve grupe:

- hidrolizujući i
- kondenzujući tanini.

Ovi poslednji su takođe poznati pod imenom *proantocijanidini* koji u kiseloj sredini mogu dati antocijanidine. Za razliku od fenolnih polimera lignina obe grupe tanina se nalaze u vakuolama.

### 16.12.1. Hidrolizujući tanini

Tipičnu strukturu hidrolizujućih tanina, galotanina i elagitanina karakteriše centralni polihidroksilni deo molekula što je obično  $\beta$ -D-glukopiranosa. Osim glukoze nađene su i hamamelosa, šikimat, hinat i ciklitol. Hidroksilne grupe su esterifikovane najčešće sa galatom, ali i hidroksicinamatima su takođe primećeni. Galotanini su poliestri galata. Važna galotanin komponenta je pentagaloioglukoza koja reaguje sa molekulima galata obrazujući *meta*-depsidnu vezu. Galoitanin koji je heptagaloiutanin sa *meta*-depsidnom vezom je izolovan, između drugih galat-estara, iz tanina *Rhus semialata* (Anacardiaceae) i zaista u ovoj biljci se može dobiti 10-12 galoi ostataka po molekulu glukoze. Ove strukture su takođe karakteristične za biljke *Quercus infectoria* (Fagaceae) ili za *Paeonia albiflora* (Paeoniaceae).



Hepatogaloilglukoza (2,3-di-O-digaloil-1,4,6-tri-O-galoilglukoza)



Biosinteza poligaloilglukoza uključuje nastajanje intergaloil-depsidnih veza ili oksidaciju (dehidrogenaciju) elagitanin-strukture što je prikazano na slici 16-25.

Slika 16-25.

Galotanin-put vodi do nastajanja strukturnih subklasa galotanina i elagitanina. Galotanini nastaju prenosom galoil-ostataka iz 1-O-galoilglukoze do centralne glukoze stvarajući *meta*-depsidnu vezu. Elagitanini nastaju oksidacijom C-C veze susednog galoil ostatka.

Ovaj put biosinteze startuje sa formiranjem 1-O-galoil- $\beta$ -D-glukoze iz galata i UDP-glukoze, katalizovan sa UDP-glukozo:galat-O-glukoziltransferazom (Glc-T). Sledеća četiri stepena reakcije što vode do 1,2,3,4,6-pentagaloilglukoze, su katalizovana sa četiri galoiltransferaze (enzimi Gal-T1 do Gal-T4) kojima je

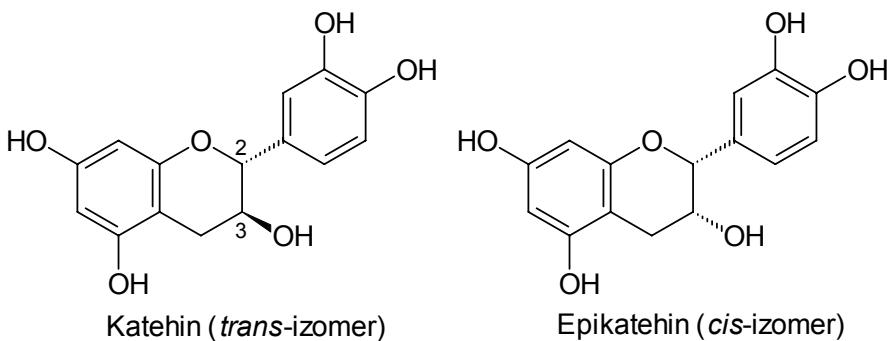
deca četiri stepena reakcije što vode do 1,2,3,4,6-pentagaloilglukoze, su katalizovana sa četiri galoiltransferaze (enzimi Gal-T1 do Gal-T4) kojima je

1-O-galoil-glukoza acil donor. Daljom galoilacijom (formiranje depsida) nastaju galotanini. Ovaj stepen je katalizovan enzimom 1-galoilglukozavisnom acil-transferazom. Elagitanini nastaju iz sekundarne C-C veze između susednih galoil grupa. Na ovaj način oni mogu "narasti" do oligomernih derivata kuplovanjem preko C-O-C veze.

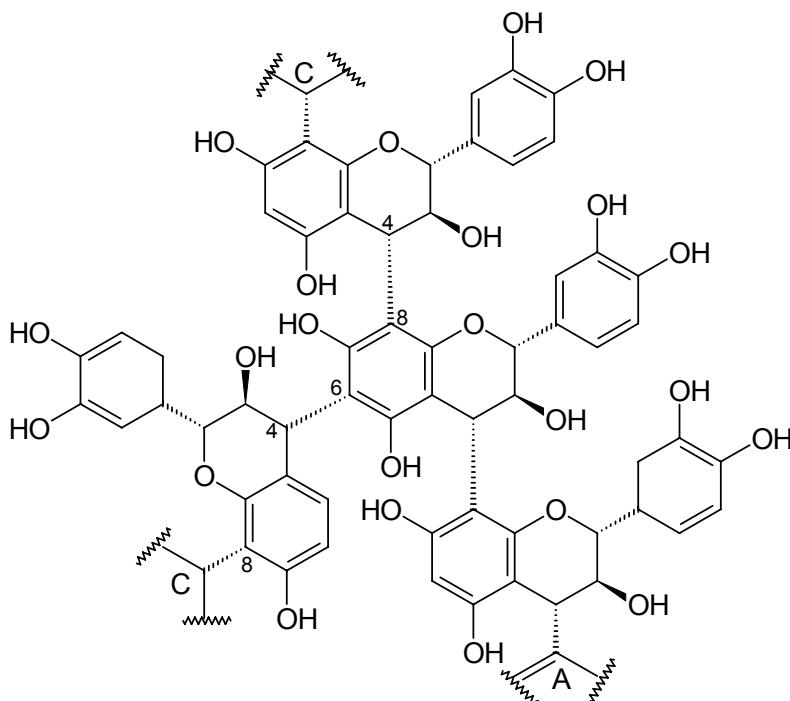
## 16.12.2. Kondenzujući tanini

Flavonoidi mogu biti vezani u jedan drugi oblik dimera (biflavonoidi) kao što je amentoflavin koji se nalazi u mnogim gimnospermama. Veza između monomera se obično ostvaruje između C-5' u prstenu B i C-8 u prstenu A. Karbonilna grupa na C-4 piranovog prstena je uvek stabilna. Biflavonoidi su prilično lipofilni i lokalizovani izvan žive ćelije (na površini ćelijskog zida).

Interflavonoidna veza kod oligo- i polimernih flavonoida kao što su kondenzovani tanini (*proantocijanidini*), s druge strane uvek uključuje vezu na C-4. Ovi proizvodi se akumuliraju u vakuolama i imaju mnogo veću molekulsku masu od galotanina (mr između 2000 i 7000). Monomerni flavonoidi kao prekursori u biosintezi proantocijanidina su obično 3,4-dioli, mada se i 4-oli učestalo pojavljaju. Oni polimerizuju do oblika flavan-3-ola i flavana. Flavan-3-ol monomer može postojati u četiri izomerna oblika, mada se samo dva od njih 2,3-*trans* (2R, 3S)- i 2,3-*cis* (2R, 3S)-izomera javljaju u prirodi. Strukture ova dva izomera su data na primeru katehina (*trans*) i epikatehina (*cis*)-izomer.



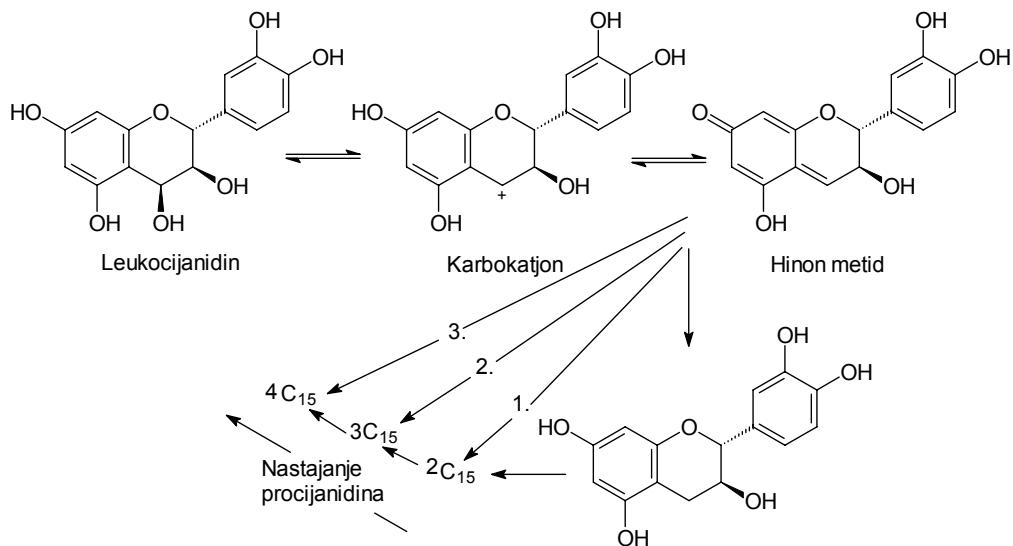
Obično C-C veza u dimernim proantocijanidinima je između C-4 i C-8 što daje molekulu linearnu strukturu. Veze između C-4 i C-6 su takođe moguće i one su rezultat razgranate strukture. Slika 16-26 pokazuje substrukturu tipičnog proantocijanidina sa C-4 : C-6 i C-4 : C-8 interflavan vezama. Takva komponenta se naziva procijanidin.



Slika 16-26. Substruktura procijanidina sa flavan-3-ol 2,3-trans jedinicom i pokazanom tipičnom inter-flavan C-4 : C-8 linearnom i C-4 : C-6 razgranatom vezom.

Ključni enzimi u biosintezi procijanidina nisu poznati. Samo reakcija koja vodi iz flavan-3,4-*cis*-diola (leukoantocijanidina) do flavan-3-ola, koja je katalizovana stereospecifičnom reduktazom je ranije opisana. Prema tome, katehin se formira preko 2,3-*trans* puta. Analogan enzim koji koristi 2,3-*cis* put do epikatehina još uvek nije poznat.

Proantocijanidini mogu nastati i kao sporedni proizvodi u reakcijama koje vode do flavan-3-ola. Smatra se da je ovo stereospecifično premeštanje od intermedijera karbokatjona ili njegovog hinon-metida do krajnjih proizvoda flavan-3-ola. (sl. 16-27). Oligomerne strukture nastaju kao posledica daljeg dodavanja ovih intermedijera. Ovo je najverovatnije visoko ko-ordiniran proces, ali praktično ništa se nezna o enzimima koji katalizuju ove reakcije.



Slika 16-27.

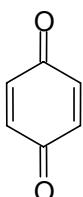
Postulirani put nastajanja proantocijanidina (primer sa procijanidinom).

## 16.13. Hinoni

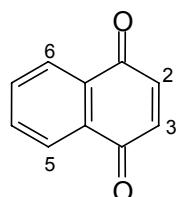
Hinoni su u prirodnim obično prisutni kao benzo-, nafto- i antrahinoni. Iako su nastali u različitim biosintetičkim putevima, njihove strukture sadrže fenolno jezgro i oni će stoga biti razmatrani zajedno. Mada su najvažnije biosintetske sekvence kod viših biljaka utvrđene primenom izotopa, još uvek se čeka na jasno navođenje svih enzima koji regulišu ove puteve. Nešto više se zna o ključnim enzimima koji vode do nastajanja nafto-intermedijera kod bakterija. Tehnike kulture ćelije kod biljaka su značajno doprinele sadašnjem nivou znanja o biosintezi hinona.

Benzohinoni derivati izoprena kao što su plastohinon i ubihinon (lipohinoni) imaju ključnu ulogu u primarnom metabolizmu. Sekundarni benzohinoni su tipični konstituenti gljiva, dominantno kod *Hyphomycetes* i *Basidiomycetes*, dok su retki kod viših biljaka. Međutim u nekim familijama biljaka kao npr. *Rosaceae* i *Ericaceae* gotovo redovno se nalaze redukovani benzohinon-konjugati i hidrohinon-glukozidi. Supstituisani hidrohinoni, kao što su metoksilovane strukture (2,6-dimetoksihinon) se učestalo nalaze u zrnu pšenice.

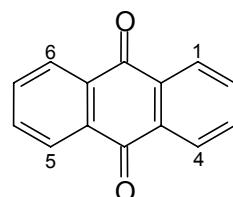
Hidrohinoni nastaju oksidativnom dekarboksilacijom derivata 4-hidroksibenzoata koji su najverovatnije izvedeni iz hidroksicinamata.



Benzohinon



Naftohinon



Antrahinon

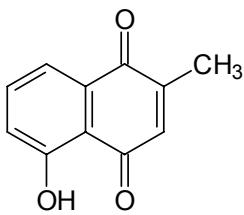
Mnogi nafto- i antrahinoni se nalaze u višim biljkama. Naftohinoni su često odgovorni za boju jezgra (srca) drveta i kore, kao što je šikonin odgovoran za boju kore korena

biljke *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae). Isto tako juglon-glukozid je alelopatski agens kod nekih vrsta Juglandaceae. Spopradično naftohinoni su prisutni u oko 20 familija viših biljaka, pored već pomenutih to su još Ebanaceae, Droseraceae, Balsaminaceae, Plumbaginaceae, Bignoniaceae i dr.

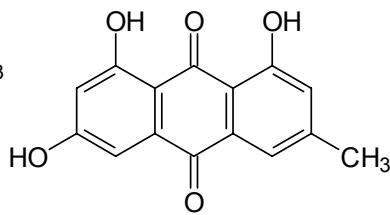
Antrahinoni, od kojih je više od 200 poznato, se obično nalaze u bakterijama, gljivama i lišajevima kao i u nekim familijama viših biljaka. Važne antrahinonske familije su Caesalpiniaceae, Polygonaceae, Rahmanaceae i Rubiaceae. Postoje najmenje dva strukturalna tipa antrahinona, jedan sa hidroksilnim grupama na prstenu C i drugi sa hidroksilovanim aromatičnim jezgrima A i C. Predhodne strukture normalno odražavaju biosintezu po sukcinilbenzoat putu, dok kasnije teku po acetat-malonat putu (poliketidni put). Međutim, ima i izuzetaka, tako npr. antrahinon morindon (1,5,6-trihidroksi-2-metilantrahinon) nastaje isključivo u sukcinilbenzoat putu.

Različiti putevi vode do hinonskih struktura pri čemu je poliketidni put dominantan kod mikroorganizama, ali takođe egzistira i u nekim višim biljkama (fam. Rahmanaceae i Polygonaceae). Drugi, sukcinilbenzoat put je dominantan kod viših biljaka. Naftahinon plumbagin iz *Plumbago europaea* (Plumbaginaceae) i antrahinon emodin iz *Rhamnus frangula* (Rhamnaceae) nastaju poliketidnim putem, dok haftahinon lavzon iz *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) i antrahinon alizarin iz *Rubia tinctoria* (Rubiaceae) se izvode iz sukcinilbenzoat puta.

Derivati hinona u poliketidnom putu:

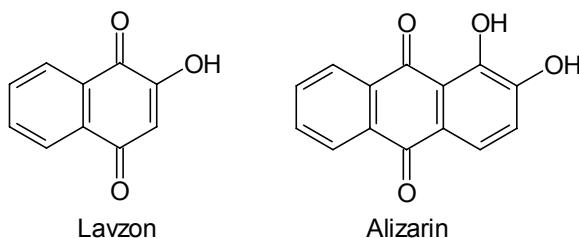


Plumbagin



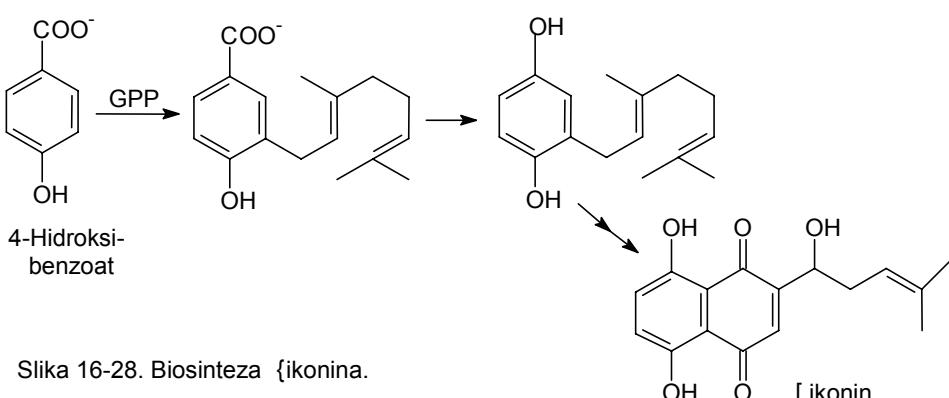
Emodin

Derivati hinona u sukcinilbenzoat putu:



(slika 16-28).

Slično benzohinonima i neki naftohinoni mogu takođe nastati iz 4-hidroksibenzoata. Ovo je pokazano na primeru biosinteze šikonina, čiji se drugi prsten izvodi iz metabolizma izoprenoida



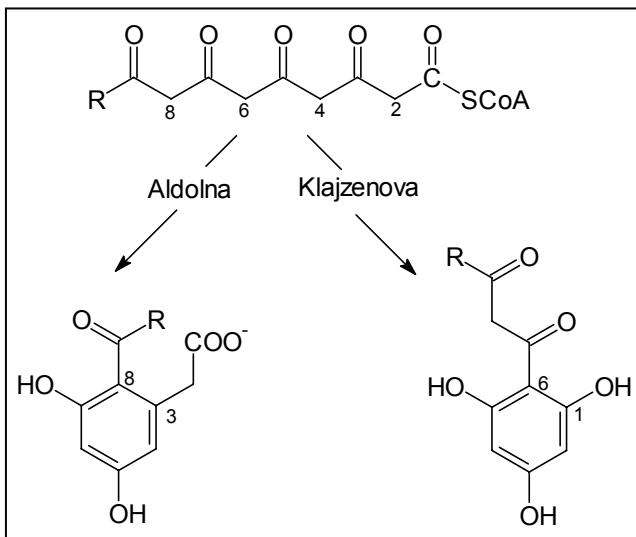
Slika 16-28. Biosinteza {ikonina.

Ključni enzim je specifična geranilpirofosfat (GPP)-zavisna geranil-transferaza koja katalizuje nastajanje geranilhidrohinona. Reakcije koje preko ciklizacije vode do formiranja naftahinonskog skeleta još uvek se ispituju. Šikonin se intenzivno primenjuje u zemljama Istočne Azije za isceljivanje rana. Zbog intenzivne crvene boje takođe se koristi kao važan pigment u industriji boja i u kozmetici.

### 16.13.1. Poliketidni put

Acetyl-CoA je startni molekul za većinu poliketida. Klajzenovom kondenzacijom (po *Liner Claisen-u*) nekoliko acetil-ostataka, izvedeni iz malonil-CoA, uz prateći gubitak  $\text{CO}_2$ , nastaje poliketid (acetogenin) strukture  $\text{S}-(\text{CH}_2-\text{CO})_n-\text{C}$ . Direktnom kondenzacijom i ciklizacijom nastaju različite aromatične strukture. Biosinteza aromatičnih poliketida se razlikuje od puta biosinteze masnih kiselina, pošto se poliketidi podvrgavaju redukciji i dehydrataciji do oblika alifatičnih ugljovodonika. Enzim-vezane poliketidne strukture su vrlo reaktivne i moraju biti privremeno stabilizovane vodoničnim vezama ili kompleksirane na površini enzima. Različiti

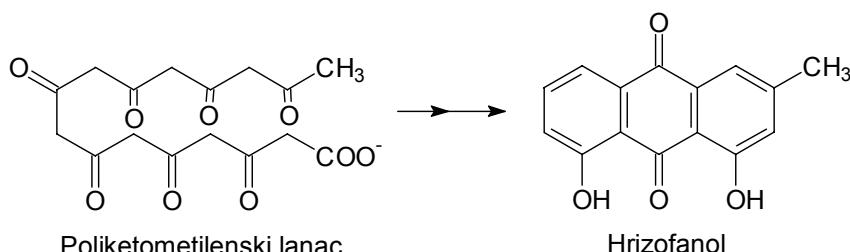
mehanizmi ciklizacije koji se verovatno diriguju topologijom raričitih enzima vode nastajanju različitih fenola (slika 16-29).



Slika 16-29.  
Dva primera ciklizacije poliketida: aldolnom ( $C_3$  do  $C_8$ ) ili Klajzenovom kondenzacijom ( $C_1$  do  $C_6$ ).

Aromatični sistemi nastaju ili aldolnom kondenzacijom u reakciji karbonilne sa  $\text{CH}_2$ -grupom ili Klajzenovom kondenzacijom u reakciji tioestarske sa  $\text{CH}_2$ -grupom.

Tipični mehanizam sklapanja obuhvata aldolnu kondenzaciju hipotetične poliketometilenske komponente što vodi do antrahinona hrizofanola u *Rhamnus frangula* (Rhamnaceae).

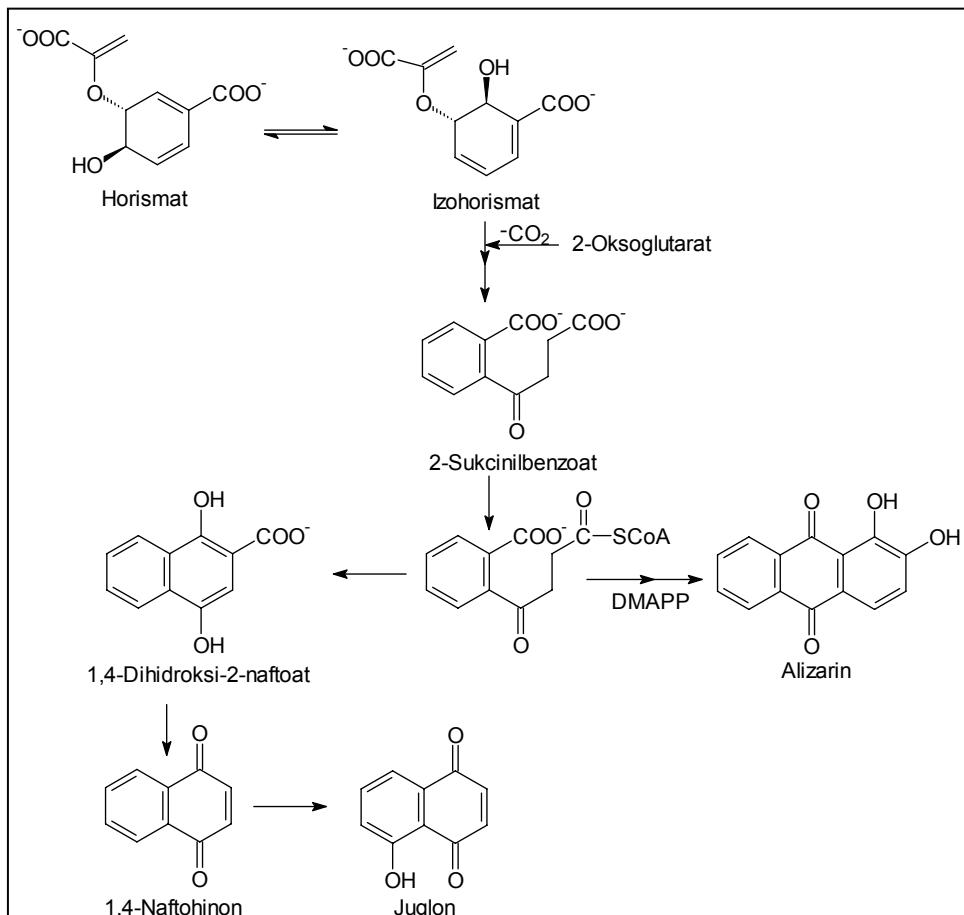


Poliketidi izvedeni iz jediničnih lanaca tipa propionil-CoA, butiril-CoA, malonil-CoA ili hidroksicinamil-CoA umesto acetil-CoA zahtevaju dalje modifikacije strukture oksidacijom, redukcijom ili konjugacijom nastalih intermedijera.

### 16.13.2. Sukcinilbenzoat put

Ovo je drugi značajan put u biosintezi hinona. U ovom putu ključni prekursor je 2-sukcinilbenzoat koji vodi ka nastajanju nekoliko naftohinona (kao što je juglon) i antrahinona (kao što je alizarin) (slika 16-30). Biosintetski putevi vode od proizvoda koji se stvaraju u šikimat/areogenat

putu polazeći od horismata koji je prekursor izohorismatu. Nastajanje ovih izomera je katalizovano enzimom izohorismat hidroksimutazom. Izohorismat se menja sukcesivno u 2-sukcinilbenzoat u prisustvu 2-oksoglutarata i tiamin-pirofosfata po Michaelisovom tipu reakcije. Ova reakcionala sekvenca konstituiše do sada nepoznat proces aromatizacije prstena. Sukcinilbenzoat se subsekventno aktivira do sukcinil-ostatka koji daje mono-CoA estar. Ova aktivacija zahteva ATP koji se hidrolizuje do AMP kod bakterija odnosno ADP kod biljaka. Zatvaranje prstena mono-CoA estra do 1,4-dihidroksi-2-naftoata je inicialni stepen u bakterijama koji u biljkama nije operativan. Većina metaboličkih stepeni dalje od CoA-estra ostaje nepoznat u višim biljkama, izuzev u biosintezi juglona gde se zna de je 1,4-naftohinon intermedijarni metabolit. Takođe je verovatno da treći prsten u alizarinu nastaje iz dimetilalilpirofosfata (DMAPP) u sukcesivnim reakcijama.



Slika 16-30. Postulirana biosinteza juglona i alizarina.

## Izvod

♣ Fenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni biomolekuli koji u svojoj strukturi sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više -OH grupe. Specifični su najvećim delom za biljnu ćeliju i prema složenosti strukture dele se u nekoliko strukturnih klasa i to: prosti fenoli ( $C_6$ ), hidroksibenzoati ( $C_6-C_1$ ), acetofenoni ( $C_6-C_2$ ), kumarini ( $C_6-C_3$ ), naftohinoni ( $C_6-C_4$ ), ksantoni ( $C_6-C_1-C_6$ ), stilbeni/antrahinoni ( $C_6-C_2-C_6$ ), flavonoidi ( $C_6-C_3-C_6$ ), lignani ( $C_6-C_3$ )<sub>2</sub>, biflavonoidi ( $C_6-C_3-C_6$ )<sub>2</sub>, katehol melanini ( $C_6$ )<sub>n</sub> itd.

♣ Flavonoidi su najrasprostranjeniji biljni fenoli (oko 5000 je poznato) koji se dalje klasificuju u više grupa kao npr. katechine, leukoantocijane, halkone, aurone, flavone, flavonole, flavonone i dr.

♣ Antocijanidini su fenolni pigmenti odgovorni za boju cvetova.

♣ Od složenih fenola u biljkama su rasprostranjeni tanini, lignini i melanini.

♣ Tanini su heterogena polioksifenolna jedinjenja koja se klasificuju u hidrolizirajuće i kondenzovane tanine. Prema strukturi mogu biti galo- i elegatanini.

♣ Lignini su posle celuloze najrasprostranjenija jedinjenja u biljkama. Oni nemaju određen hemijski sastav i ako su u osnovi polimeri fenilpropansa. Značajni su kao mikrobiološka barijera i kao jedinjenje koje "cementira" celulozna vlakna.

♣ Melanini su polimeri fenola čija struktura još nije dorečena. Alkalnom hidrolizom se razlažu u pirokatehin i salicilnu kiselinu.

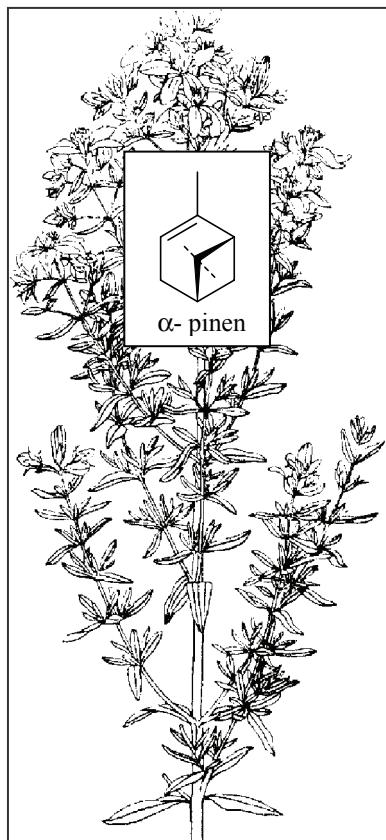
♣ Biosinteza fenolnih jedinjenja u zavisnosti od prekursora može teći različitim biosintetičkim putevima. Veći broj fenolnih jedinjenja u biljkama se sintetizuje iz šikimske kiseline u tzv šikimat-rogenat putu.

♣ Fenolna jedinjenja u biljkama imaju više značajnih funkcija kao npr. stimuliraju rastenje i razviće biljaka, štite biljke od patogena, daju boju cvetovima i time stimulišu oprašivanje biljaka, daju ukus zelenim plodovima itd.

♣ Fenolna jedinjenja su našla primenu i u farmaceutskoj industriji zbog određenih fizioloških efekata na ljude i životinje, a od interesa su i za prehrambenu industriju kao antioksidansi i pigmenti.

# 17.

## Metabolizam izoprenoida



*Hypericum perforatum L.*

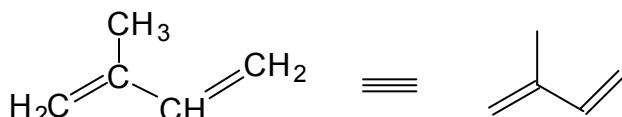
- 17.1. Nomenklatura i klasifikacija**
- 17.2. Osnovni putevi u biosintezi terpenoida**
- 17.3. Monoterpenoidi**
  - 17.3.1. Biosinteza
  - 17.3.2. Biološka aktivnost
  - 17.3.3. Iridoidi
- 17.4. Seskviterpenoidi**
  - 17.4.1. Biosinteza i funkcija
  - 17.4.2. Abscisinska kiselina
- 17.5. Diterpenoidi**
  - 17.5.1. Giberelini
- 17.6. Triterpenoidi**
  - 17.6.1. Čisti triterpenoidi
  - 17.6.2. Fitosteroli
  - 17.6.3. Saponini
  - 17.6.4. Kardenolidi
- 17.7. Karotenoidi**
  - 17.7.1. Distribucija
  - 17.7.2. Biosinteza i enzimologija
  - 17.7.3. Regulacija biosinteze
  - 17.7.4. Funkcija karotenoida
- 17.8. Politerpenoidi**
- 17.9. Ređe zastupljeni terpenoidi**
  - 17.9.1. Degradirani terpenoidi
  - 17.9.2. Sesterterpenoidi

Biljke sadrže značajnu količinu izoprenoidnih komponenata veoma različitih struktura i funkcija. Neki od njih su primarni metaboliti, kao steroidi, ali većina se sintetizuju u biljkama kao sekundarni metaboliti. U literaturi se ova grupa metabolita može naći pod različitim nazivima kao terpentinska ulja odnosno terpenoidi da bi se u novijoj odomaćio naziv izoprenoidi. Izoprenoidi su poznati još iz doba antičke, kao sastojci parfema, sapuna, začina i sl. Zbog toga, oni se proučavaju od početka moderne hemije (tj. sa početka 18. veka). Međutim sve do 1945.g. nije bila poznata biogeneza različitih klasa izoprenoidea, kada je konstatovano da oni nastaju iz istog prekursora. Razvojem hromatografskih i spektrografskih tehnika došlo se do razumevanja strukture, biosinteze i izolovanja terpenoida. Novi terpenoidi se izoluju i identifikuju u kontinuitetu, a o tome se naučna javnost obaveštava u periodici, kao što su *Phytochemistry*, *Reports on Terpenoids and Sterols* itd.

Hrabar pokušaj učinili su Connolly i Hill, 1991.g. publikujući tri volumena "Dictionary of Terpenoids" u kojima se nalaze opisane strukture i osobine za oko 22000 terpenoida. To prelazi okvire ovog poglavlja bez ambicije da se pokriju svi aspekti hemije i biohemije biljnih terpenoida koji su široko distribuirani u svih 94 reda biljaka cvetnica. Zbog toga će biti opisane samo pojedinačne strukture i njihove biosinteze koje pripadaju različitim klasama izoprenoidea.

## 17.1. Nomenklatura i klasifikacija

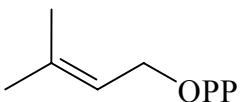
Izoprenoidi su izgrađeni iz C<sub>5</sub> jedinica izoprena, a nomenklatura glavnih klasa odražava broj prisutnih jedinica izoprena (tabela 17-1). Izopren je izgrađen iz 5 ugljenikovih atoma (slika 17-1).



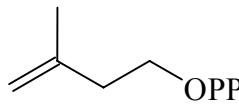
Slika 17-1. Struktura izoprena.

Wallach je prvi predložio "izoprensko pravilo" kojeg je kasnije Ružička proširio u "biogenetsko pravilo", a što sugerira da sve klase izoprenoidea se

sintetizuju iz biohemski "aktivnog izoprena". Biohemski aktivne izoprenske jedinice se identifikuju kao piro-fosfatni (difosfatni) estri i to kao *dimetilalil pirofosfat* (DMAPP) i *izopentil pirofosfat* (IPP). Njihove strukture su date na slici 17-2.



Dimetilalil pirofosfat  
(DMAAPP)



Izopentil pirofosfat  
(IPP)

Ovo pravilo je bilo osnova za sva pojedinačna znanja o putevima njihove biosinteze. Njime je pokazano da se sve klase izoprenoida izvode iz

proste matične komponente (što je pokazano u tabeli 17-1). Različite klase izoprenoida, iz iste C<sub>5</sub> jedinice, nastaju pomoću različitih kondenzacija, ciklizacija, intramolekulske premeštanja ili adicija. Ponekad u literaturi ima i konfuzije u nomenklaturi terpenoida pošto se za isti C skelet koriste različiti nazivi. U ovom odeljku mi ćemo koristiti jedinstvenu i uobičajenu terminologiju.

Tabela 17-1. Glavne klase izoprenoida nađene u biljkama.

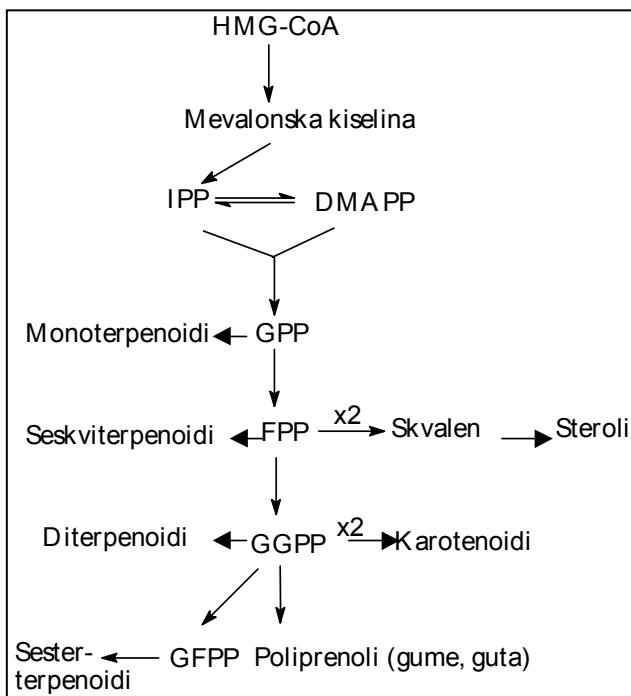
Broj C-atoma	Naziv klase	Prekursor izoprenoida	Naziv subklase
10	Monoterpenoidi	GPP	Iridoidi
15	Seskriterpenoidi	FPP	ABA, Seskviterpenoidni laktoni
20	Diterpenoidi	GGPP	Giberelini
25	Sesterterpenoidi	GFPP	-
30	Triterpenoidi	Skvalen	Fitosteroli, Saponini, Kardenolidi
40	Tetraterpenoidi	Fitoen	-
>40	Poliprenoli, (guma, guta)	GGPP + (C <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	-

Kada grade izoprenoide dva ili više molekula izoprena se kondenzuju jedan sa drugim po sistemu "glava-rep"( razgranat lanac izoprenske jedinice se naziva "glava", a nerazgranati "rep"). Oni se prema broju izoprenskih jedinica mogu klasifikovati u nekoliko grupa (tabela 17-1) i mogu imati ciklične strukture sa jednom ili više funkcionalnih grupa ( hidroksilna, karbonilna, aldehidna, itd). Dobro se rastvaraju u lipidima i lokalizovani su najčešće u citoplazmi biljnih ćelija i u specijalnim žlezdanim ćelijama na površini listova.

Terpenoidi imaju najčešće trivijalne nazive jer su hemijski nazivi veoma kompleksni. Većina trivijalnih naziva je vezana za vrstu biljke iz koje je određeni terpenoid izolovan. U biljkama se nalaze u smeši sa neterpenoidnim jedinjenjima u obliku tzv. *mešovitih terpenoida*.

## 17.2. Osnovni putevi u biosintezi terpenoida

Put biosinteze terpenoida (slika 17-3) je originalno proučen na sterolima kod životinja i kvascima. Praktično samo u *Biljnom Carstvu* se dešava da specifične vrste stvaraju strukturno karakteristične izoprenoide.

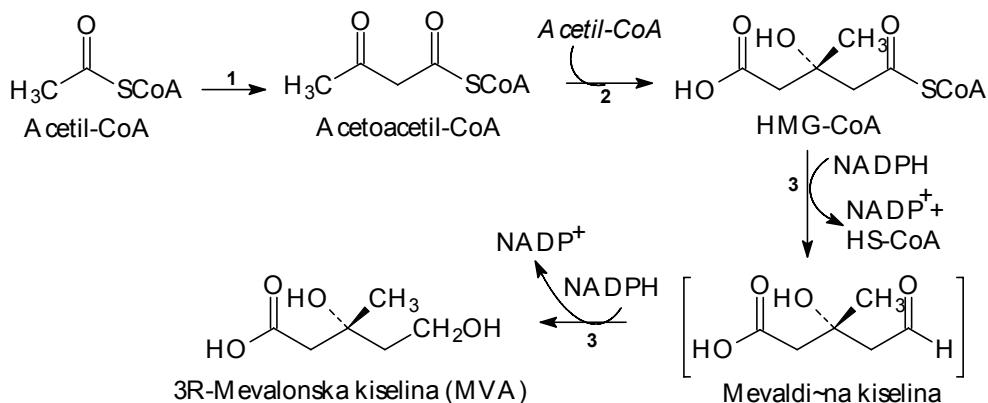


Slika 17-3. Osnovni putevi u biosintezi terpenoida.

Ključ na putu biogeneze izoprenoida pripada acetil-CoA koji konverzijom preko mevalonske kiseline vodi do nastajanja biološki »aktivnog izoprena«, izopentenil pirofosfata (IPP), (slika 17-4), potom izomerizuje do dimetilil pirofosfata (DMAPP, slika 17-5).

Nastajanje mevalonske kiseline (MVA) je katalizovano hidroksimetil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reduktazom (HMGR; EC 1.1.1.34). *In vitro* konverzija HMG-CoA u mevalonsku kiselinu može se postići različitim membranskim funkcijama iz viših i nižih biljaka. Raspoloživi podaci o HMGR biljaka sugeriraju da je prisutna u plastidima i u mitohondrijama ali ovo je još stvar za diskusiju.

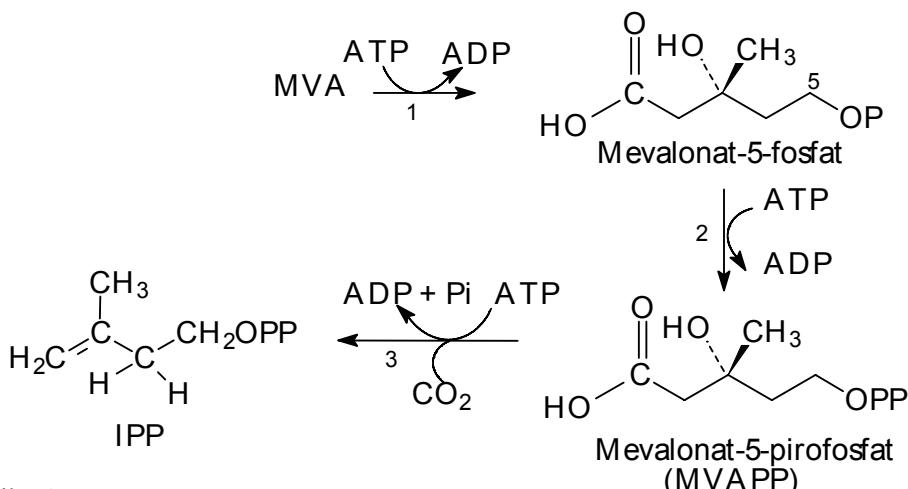
Reakcija uključuje dva molekula NADPH po molekulu MVA, preko mevaldične kiseline ( slika 17-4).



Slika 17-4.

Konverzija acetil-CoA u mevalonsku kiselinu. *Enzimi:* 1. acetoacetil-CoA tiolaza; 2. HMG-CoA sintaza; 3. HMG-CoA reduktaza

Konverzija MVA u IPP odvija se u tri stepena i svaki zahteva po jedan molekul ATP po molekulu supstrata ( slika 17-5).

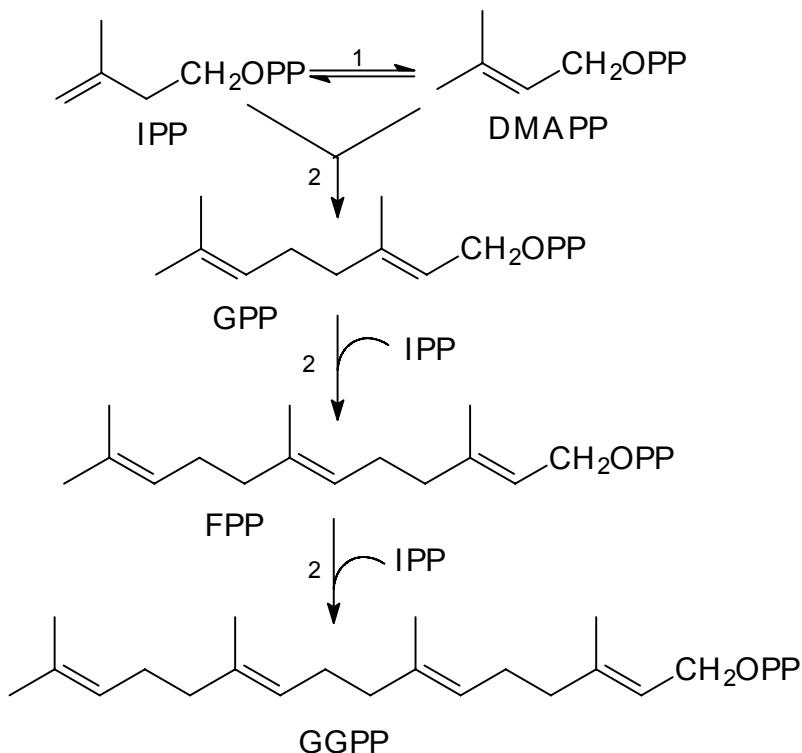


Slika 17-5.

Metabolizam mevalonske kiseline do IPP. Enzimi: 1, MVA-kinaza; 2, mevalonat-5-fosfat kinaza; 3, mevalonat-5-difosfat dekarboksilaza.

DMAPP se ponaša kao prenil-donor za IPP, stvarajući geranil pirofosfat (GPP) pomoću kondenzacione reakcije "glava-rep". GPP dalje služi kao prenil-donor za drugi IPP molekul formirajući fernezil pirofosfat (FPP). Ovom kondenzacijom alil-pirofosfati sa IPP stvaraju više prenil pirofosfate ( slika 17-6).

Prenil-transferaza (EC 2.5.1.1) katalizuje ove reakcije u kojima nastaju *trans*-prenil pirofosfati. Unutar centralnog puta, lanac se produžava kondenzacijom "glava-rep", ali u slučaju obrazovanja tri- i tetraterpenoida dolazi do tzv. "glava-glava" kondenzacije gde iz FPP i geranilgeranil pirofosfata (GGPP) nastaju skvalen i fitoen, prvi tri- i tetraterpenoidi (slika 17-3).



Slika 17-6.

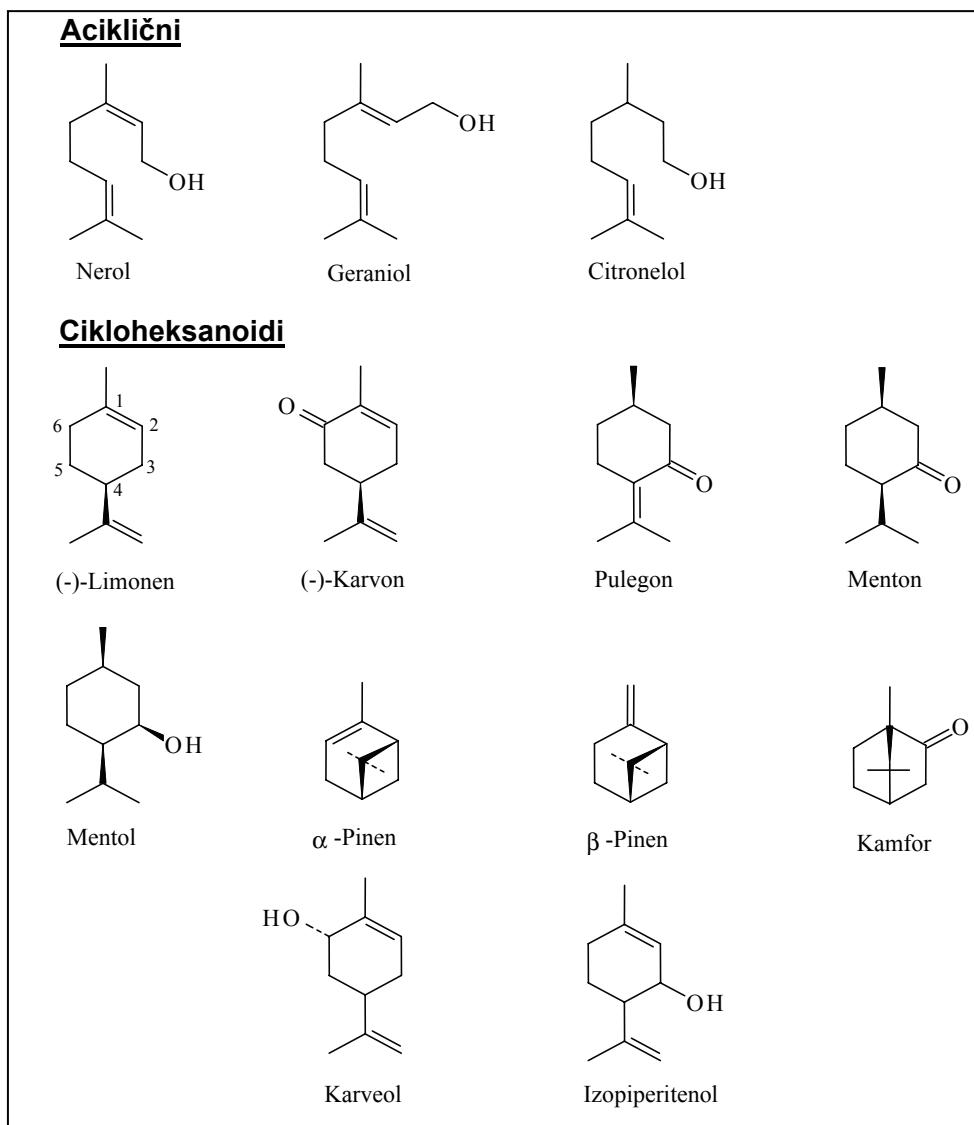
Izomerizacija izopentil-pirofosfata i reakcije prenil transferaze. Enzimi: 1, IPP-izomeraza; 2, prenil-transferaza.

### 17.3. Monoterpenoidi

Monoterpenoidi su prosta klasa izoterpenoida sa  $C_{10}$  strukturnom konstrukcijom koju čine kondenzovane 2 izoprenske jedinice opšte formule  $(C_5H_8)_2$ . Oni su komponente etarskih ulja i naročito se akumuliraju u nekim *Umbelliferae* i *Pinaceae*, ali su sve prisutniji u višim biljkama i algama. Interes za njima je nastao zbog njihove upotrebe u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, a od skora i zbog izraženih farmakoloških osobina. Do danas je iz biljaka izolovano više od 1000 monoterpenoida koji su podeljeni u 4 strukturne grupe :

- ◆ aciklični monoterpenoidi,
- ◆ ciklopentanoidi,
- ◆ cikloheksanoidi i
- ◆ ostali monoterpenoidi.

Prve tri grupe nastaju vezivanjem dve C<sub>5</sub> jedinice po ključu "glava-rep", dok četvrta po ključu "glava-sredina" (slika 17-7).



Slika 17-7. Strukture nekih monoterpenoida

Monoterpenoidi mogu biti nezasićeni ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni i dr., jedinjenja u zavisnosti od vrste prisutnih funkcionalnih grupa. To su bezbojna jedinjenja, nerastvorna u vodi, najčešće prijatnog mirisa.

### 17.3.1. Biosinteza

Uloga GPP kao prekursora monoterpenoidea je dokazana još 60-tih godina 20 veka, gde ključnu ulogu u višim biljkama ima enzim GPP-sintaza. Znatan napor je učinjen kako bi se pokazalo da se i u *in vitro* uslovima GPP efikasno može prevesti u ciklične monoterpenoide. GPP-sintaza je nedavno (1993. godine od strane Clanter et al.,) prečišćena i karakterisana iz žlezdanih dlačica žalfije.

Monoterpen-ciklaze (sintaze) imaju sličan reakcioni mehanizam kao i prenil-transferaze, u kojem one katalizuju inicijalnu ionizaciju alil-pirofosfata što rezultira stvaranju duple veze na alil-karbkatjonu.

Ciklaze (sintaze) su obično solubilni proteini, Mr 50-100 KDa a mogu biti udružene sa endoplazmatičnim retikulumom ili plastidima *in situ*. Više od 20 monoterpen-ciklaza je identifikovano u višim biljkama. Većina ih katalizuje nastajanja alkena (nezasićenih monoterpenoida) kao i nekih oksidovanih proizvoda. Ciklični oksidovani monoterpenoidi nastaju ciklizacijom proizvoda oksidacije pomoću citohrom P-450-zavisne oksidaze. Navedene reakcije su tipične za monoterpenoide nane (*Mentha piperita*). Genetske i biohemijske osnove u sastavu monoterpena Mente su danas poznate. Poređenja između monoterpena *M. spicata* (spermint) i *M. piperita* (pepermint) pokazuju da se oni razlikuju po mestu oksidacije na p-mentan prstenu. *M.piperita* proizvodi uvek isključivo monoterpenoide sa kiseonikom na C<sub>3</sub>, kao što su pulegon, menton ili mentol (slika 17-7), dok *M. spicata* sintetizuje isključivo proizvode sa kiseonikom na C<sub>6</sub> kao što je karvon (slika 17-7). Takođe se zna da hidroksilacijom (-)-limonena na C<sub>3</sub> se stvara (-) *trans*-izopiperitenol u *M. piperita*, odnosno na C<sub>6</sub> (-) *trans*-karveol u *M. spicata*.

Enzimski sistem kod ova dva tipa Mente su veoma slični. Enzim citohrom P-450- zavisna hidroksilaza određuje tip monoterpenoida nađenih u većini vrsta Mente. Limonen-sintaza (GPP: limonen-ciklaza) solubilni protein prečišćen do homogenata iz obe vrste mente. U osnovi je dokazano da je mehanizam delovanja ovog enzima sličan mehanizmima drugih terpenoid-ciklaza kod viših biljaka koje imaju ostatke histidina i cisteina na aktivnoj strani.

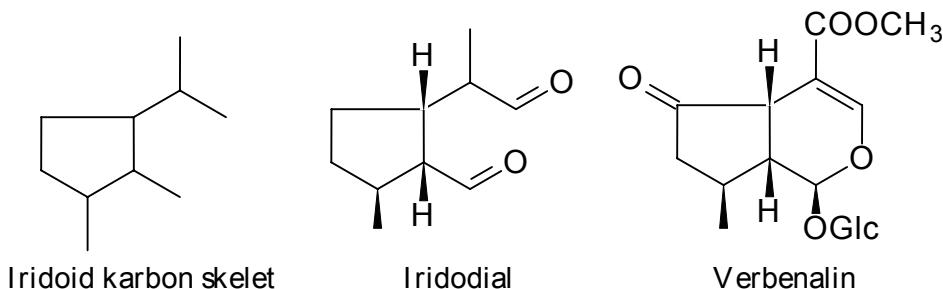
Biosinteza pinena je intenzivno proučavana u solubilnim frakcijama žalfije (*Salvia officinalis*). Tri monoterpen-sintaze (ciklaze) katalizuju konverziju GPP u monoretpen olefine. Pinen ciklaza I prevodi GPP do bicikličnih (+)- $\alpha$ -pinena i (+) kamfena; ciklaza II do (-)- $\alpha$ -pinena i (-)- $\beta$ -kamfena; dok ciklaza III transformiše GPP do (+)- $\alpha$ -pinena, (+)- $\beta$ -pinena i do monocikličnih i acikličnih olefina. Poznata je i stereohemija ove konverzije (Pynnetal.,1994).

## 17.3.2. Biološka aktivnost

Monoterpеноиди су цитотоксиčни за биљке и имају важну улогу у интеракцијама биљка-биљка. На primer  $\alpha$ - и  $\beta$ - pinен, лимонен и цитронелол (слика 17-7) из *Amaranthus retroflexus* инхибишују раст стабла поморандže (*Citrus aurantium*) ако су у близини. Бројни monoterpеноиди posedују antimикробијалну активност. Такође је саопштавано о терапеутским испитивањима есенцијалних уља и њиховим individualним компонентама.

## 17.3.3. Iridoidi

Iridiodи су monoterpеноид-лактони са метил-цикlopентанским скелетом, који се може превести у секоиридоиде чејанjem цикlopентанског прстена (слика 17-8). Искључиво се налазе у дикотиледоним биљкама, а многи од њих и као гликозиди. Детаљи њиховог nastajanja iz geraniola su opisani u literaturi (Inonye, H.: *In Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 1991.).



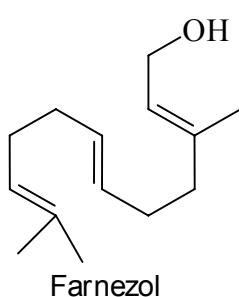
Slika 17-8. Strukture nekih iridoida.

## 17.4. Seskviterpenoidi

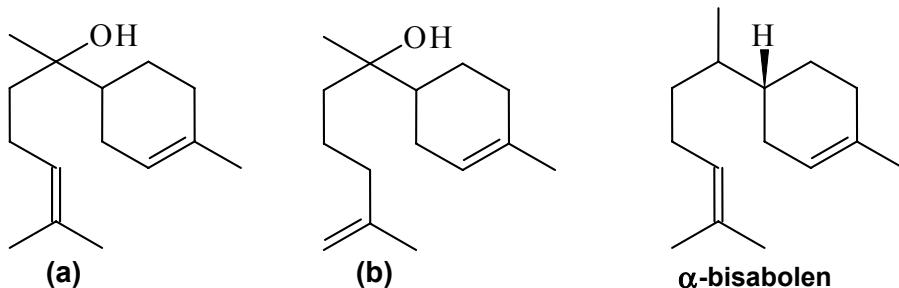
Ova grupа формира велику класу terpenoida који се налазе у биљкама, маховинама, гљивама и алгама. Више од 100 seskviterpenoidnih скелета је познато, а hiljade компонената је идентификовано. Обично се налазе са monoterpеноидима у етарским уљима. Слободни seskviterpenoidи су испарљивајућајединjenja за разлику од гликозида који нису испарљиви. Више биљке их акумулирају у специјалним секреторним структурима званим уљне жлезде. Прва испитивања seskviterpenoidа су вршена још у прошлом веку испитујући састав етарског уља кедра и каранфилића. Објашњења њихове хемијске структуре су показала да су то primarni derivati izoprena bruto formule

$C_{15}H_{24}$ . Prema osnovnom skeletu mogu se klasifikovati u tri grupe i to: aciklične, monociklične i biciklične seskviterpenoide.

**Aciklični** – seskviterpenoidni alkohol je farnezol. Najviše ga ima u etarskim uljima listova đurđevka (*Convallaria majalis*) i ruže (*Rosaceae*). Odgovoran je za njihove mirise.



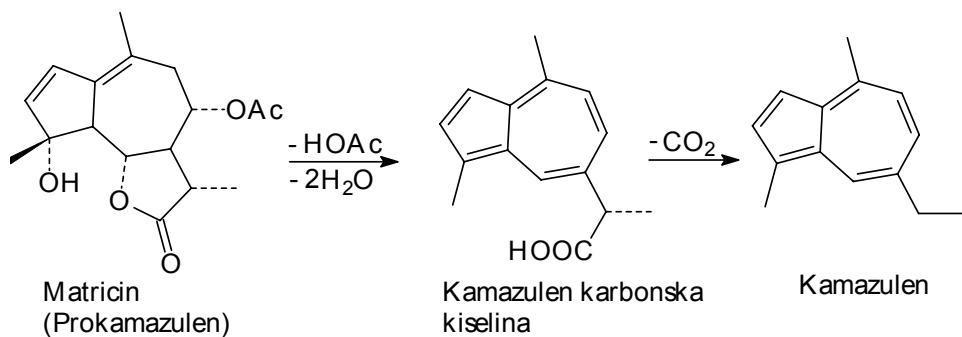
**Monocikliklični** – saskviterpenoidi nastaju ciklizacijom *cis*-farnezilpirofosfata kao npr. ugljovodonik - bisabolen, alkohol - (-)-bisabolol ili abscisinska kiselina. U etarskom ulju kamilice (*Matricaria chamomillae*) bisabolol se nalazi u dva izomerna oblika i to: izopropilidenskom (a) i izopropenilskom obliku (b)(slika 17-9).



Slika 17-9. Izomerni oblici  $\alpha$ -bisabolola:

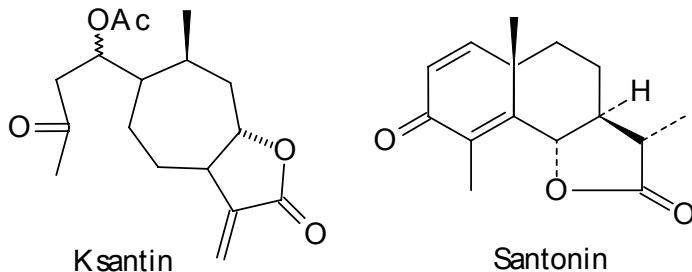
- (a) izopropilidenski
- (b) izopropenilski

**Biciklični** - seskviterpenoidi su karakteristični za etarska ulja mnogih biljnih vrsta, poput  $\beta$ -selenina u celeru (*Apium graveolens*) i matricina ili prokamazulena u etarskom ulju kamilice. U toku destilacije etarskog ulja kamilice matricin se prevodi u kamazulen karbonsku kiselinsku i kamazulen-biciklični seskviterpenoid koji je odgovoran za plavu boju etarskog ulja kamilice (slika 17-10).



Slika 17-10. Postdestilaciona transformacija matricina u kamazulen.

U biljkama su rasprostranjeni i biciklični seskviterpenski laktoni koji imaju različitu funkciju. Tako npr. iz *Xanthium pensylvanicum* je izolovan biciklični seskviterpenski lakton *ksantin* koji je antagonist auksinu. Većina seskviterpenskih laktona ima gorak ukus kao što je santonin iz pelina (*Artemisia absinthium*) (slika 17-11).



Slika 17-11.  
Strukture seskviterpenskih laktona.

Prisustvo epoksi i karbonil funkcionalnih grupa u strukturi seskviterpenskih laktona verovatno ima važnu ulogu u interakcijama biljaka sa drugim organizmima.

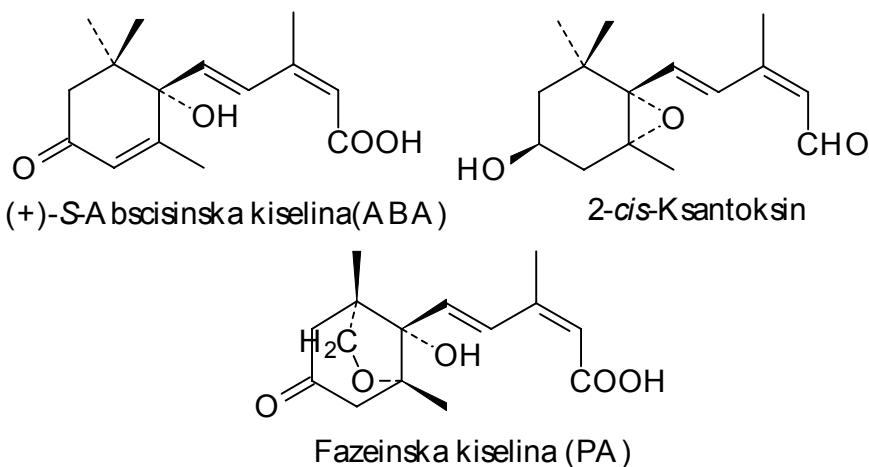
### 17.4.1. Biosinteza i funkcija

Seskviterpenoidi nastaju kondenzacijom IPP sa GPP stvarajući all-*trans*-farnezil pirofosfat (FPP) (slika 17-3). Biosinteza cikličnih seskviterpena je objašnjena pomoću hipotetičkog puta sa katjon- intermedijerima, u kojem su all-*trans*- FPP, 2-*cis*, 6-*trans*-FPP i nerolidil pirofosfat (NPP) prekursori. Ciklizacijom, hidridnim premeštanjem, kondenzacijama itd. uz sterna i elektronska razmatranja vode do nastajanja mnogih seskviterpenoida.

Ispitan je širok spektar bioloških aktivnosti seskviterpenoida- uključujući insekt-antifidne supstance, insekt-hormone i feromone, fitoaleksine, mikotoksine, antibiotike, regulatore rasta biljaka itd.

### 17.4.2. Abscisinska kiselina

Abscisinska kiselina (ABA, slika 17-12) je prisutna u svim mono- i dikotiledonim biljkama i u gimnospermama, ali ne u kopitnjaku (*Azazum europeum*) i mahovinama. Koncentracija ABA u tkivu široko varira sa visokim sadržajem u plastidima. Ona je bioliški aktivan molekul zajedno sa ksantoksinom i fazeinskom kiselinom.

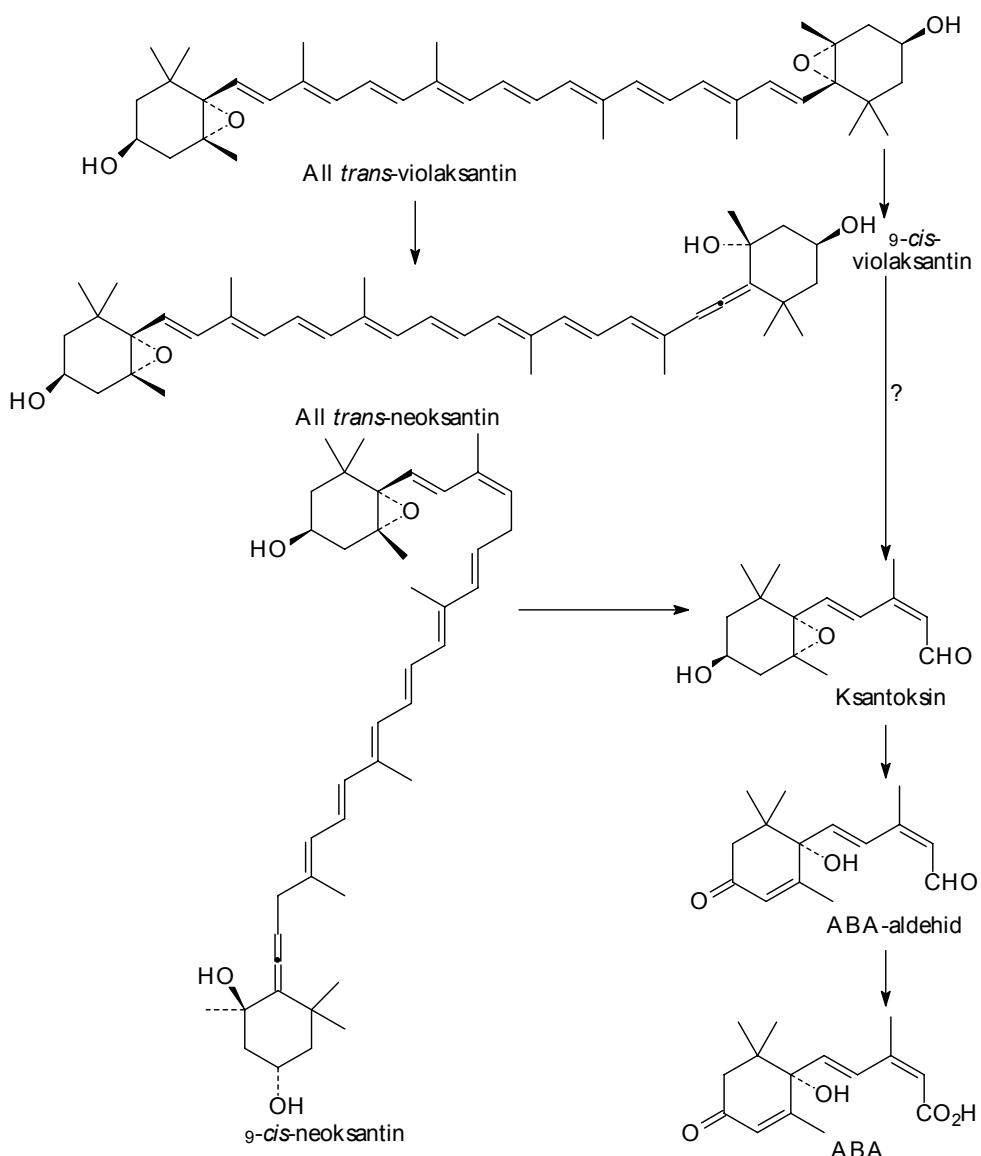


Slika 17-12. Abscisinska kiselina i njeni metaboliti.

#### a) Biosinteza i metabolizam ABA

ABA ima strukturu seskviterpenoida i za očekivati je da bude izvedena iz tri fuzionisane C<sub>5</sub> jedinice (slika 17-13). Teoretski postoje dva puta za konverziju MVA u ABA : direktni put preko FPP, i indirektni koji uključuje cepanje C<sub>40</sub> karotenoida.

Bilo je znatnih neslaganja poslednjih godina koji od puteva je operativniji u biljkama. Kasnih osamdesetih godina 20 veka je i eksperimentalno potvrđeno, o čemu je izvestio Peri (Parry, 1993), da je dominantniji indirektni put. U osnovi ovog puta sledi da se iz all-trans- violoksantina, preko all-trans- neoksantina i 9-cis- neoksantina "stije" do ABA, što je prikazano na slici 17-13.



Slika 17-13. Biosinteza abscisinske kiseline.

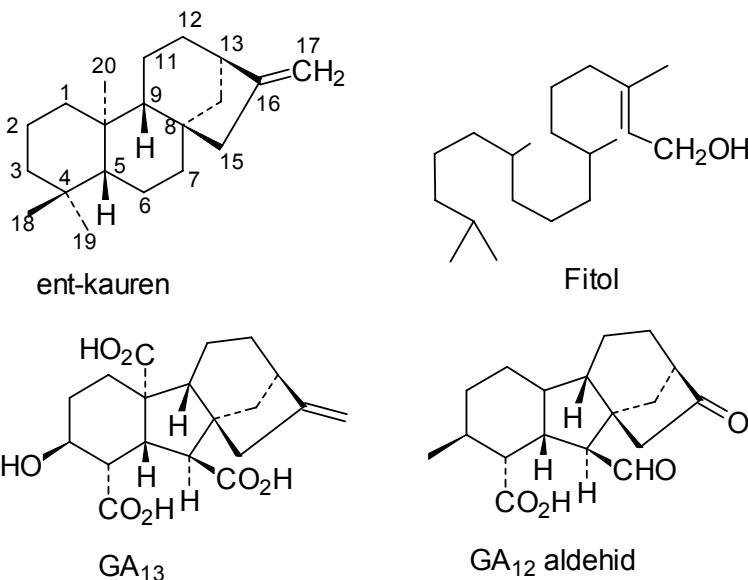
ABA se inaktivira u procesima katabolizma putem oksidacije i konjugacije. Primarni je oksidativni put preko 8-hidroksi ABA i fazeinske odnosno dihidrofazeinske kiseline koja se kasnije glikoziluje, dok se ABA konjuguje sa glukozom i privremeno odlaže u vakuole. Nivo ABA se povećava u biljkama u uslovima suše, a takođe fazeinske i dihidrofazeinske kiseline.

### b) Biološka uloga ABA

- ◆ ABA je regulator rasta biljaka. Najpoznatija njena funkcija je u odgovoru biljaka na uslove stresa izazvane sušom.
- ◆ ABA inicira zatvaranje stoma te joj se pripisuje uloga endogenog "antitranspiranta". Na ovaj način ona sprečava preteranu transpiraciju što je i osnovni mehanizam njenog delovanja u oslovima kada je biljka izložena visokim temperaturama.
- ◆ ABA takođe ima ključnu ulogu u razvojnim procesima kao regulator specifičnih gena.

## 17.5. Diterpenoidi

Diterpenoidi su C<sub>20</sub> komponente (opšte formule C<sub>20</sub> H<sub>36</sub>), izvedeni iz GGPP, često sa preuređenim skeletom. U principu se nalaze u višim biljkama i gljivama i uključuju gibereline (GAs) i kisele smole gimnospermi (golosemenica). Uglavnom su ciklične komponente sa nekoliko izuzetaka kao što je fitol koji je u obliku estra sastojak molekula hlorofila. Tipični primeri su pokazani na slici 17-14. Za razliku od monoterpenoida diperpenoidi nisu isparljiva jedinjenja.



Slika 17-14. Primeri nekih diterpenoida.

## 17.5.1. Giberelini

Giberelini su tetra ciklični diterpenoidi, esencijalni za normalan rast i razvoj biljaka. Do danas je identifikovano više od 100 giberelina, od čega oko 80 u višim biljkama i 30 u gljivama. Podeljeni su u dve strukturne grupe:

- ◆ C<sub>20</sub> –gibereline i
- ◆ C<sub>19</sub> –gibereline

Prvi sa C<sub>20</sub> atoma u skeletu su poznati kao (-)-*ent*-kauren i kao što je GA<sub>13</sub>, dok drugi sa jednim C atomom manje formiraju 19, 10-γ- lakton strukturu kao GA<sub>3</sub> (giberelinska kiselina, slika 17-14).

Trivijalna nomenklatura giberelina izvedena je iz prefiksa " broja A" kao npr. GA<sub>1</sub>; GA<sub>12</sub>...itd. Prefiks *ent* – se koristi za enantiomerne strukture i reversne stereohemijske oznake, kao i za hiralne centre ( npr. *ent* – kauren, slika 17-14). Giberelini se proizvode u minormnim količinama (µg/kg sveže mase) sa visokim sadržajem u embrionima ili endospermu, u poređenju sa niskim sadržajem u vegetativnim izdancima.

### a) Biološke funkcije giberelina

Giberelini su regulatori (hormoni) razvojnih procesa kao što su izduživanje stabla, razvoja voća i semena, kljanja i mirovanja semena. Najviše proučavana uloga giberelina je kontrola izduživanja internodia u stablu. Sadašnji nivoi tehnika omogućavaju da se odredene tačke na celularnom nivou moduliraju pomoću giberelina uključujući aktivnost jonskih kanala, ekspresiju gena i sl. Nisu svi giberelini biološki aktivni, a među aktivnim komponentama i strukturne karakteristike molekula doprinose povećanju njihove aktivnosti. C<sub>20</sub>-β GA-ni su aktivniji od C<sub>19</sub>-GA-na. Prisustvo 2β- hidroksilne grupe u strukturi smanjuje biološku aktivnost, dok 3β - hidriksilna grupa u C<sub>19</sub>-GA-ma dopronosi povećanju aktivnosti (kao npr. kod GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>). Kod žitarica giberelini stimuliraju sintezu α- amilaze i drugih enzima u toku nicanja semena isto tako indukuju i sintezu DNA kao i specifičnih infornacionih RNA.

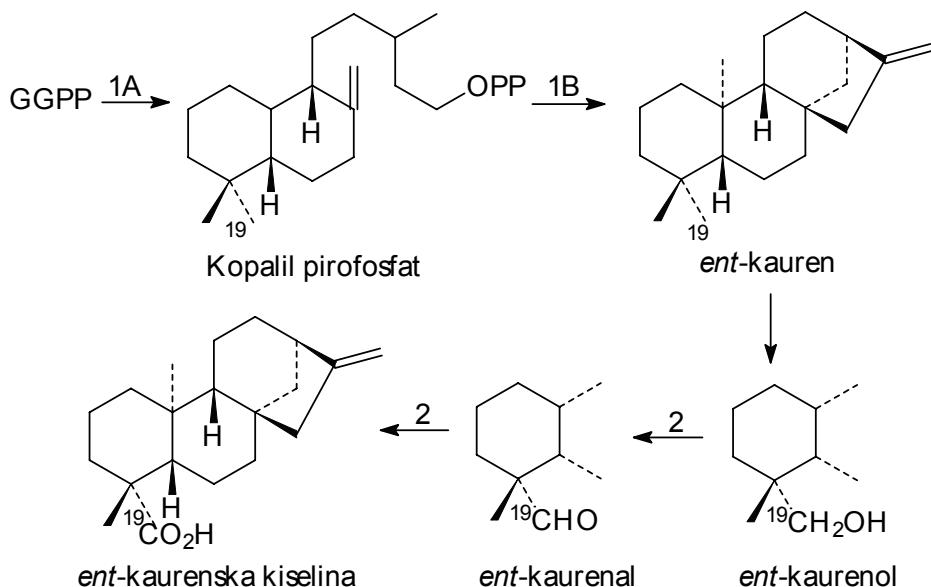
### b) Biosinteza giberelina

Nastajanje GA je široko proučavano u intaktnoj ćeliji i ekstraktima ćelija. Rane faze sinteze od MVA do GA<sub>12</sub>- aldehida su identične u višim biljkama i gljivama, ali putevi dalje sinteze se razlikuju u broju i položaju hidroksilnih grupa uvedenih pre oksidacije na C-20 što daje GA<sub>19</sub>-gibereline.

Prvi stepen na putu sinteze je konverzija geranilgeranil pirofosfata (GGPP) u *ent*-kauren, u ciklizaciji kopalil-pirofosfata (CPP) kao intermedijera. Reakcija je

katalizovana enzimom *ent*-kauren sintazom, koji ima dve aktivnosti, označene sa 1A i 1B, koji katalizuje konverziju GGPP do kopalil-pirofosfata (CPP) (1A) i ciklizaciju CPP do *ent*-kaurena (1B). Kauren sintaza je ključni enzim u biosintezi giberelina.

*Ent*-kauren se pomoću tri sekvenčne oksidacije konvertuje u *ent*-kaurensku kiselinsku koja je C<sub>19</sub> *ent*-kauren (slika 17-15). Reakcije oksidacije katalizuju membran-vezani enzim, kauren oksidaza. Svaki stepen oksidacije zahteva NADPH i citohrom P-450 (Cyt P-450).



Slika 17-15.

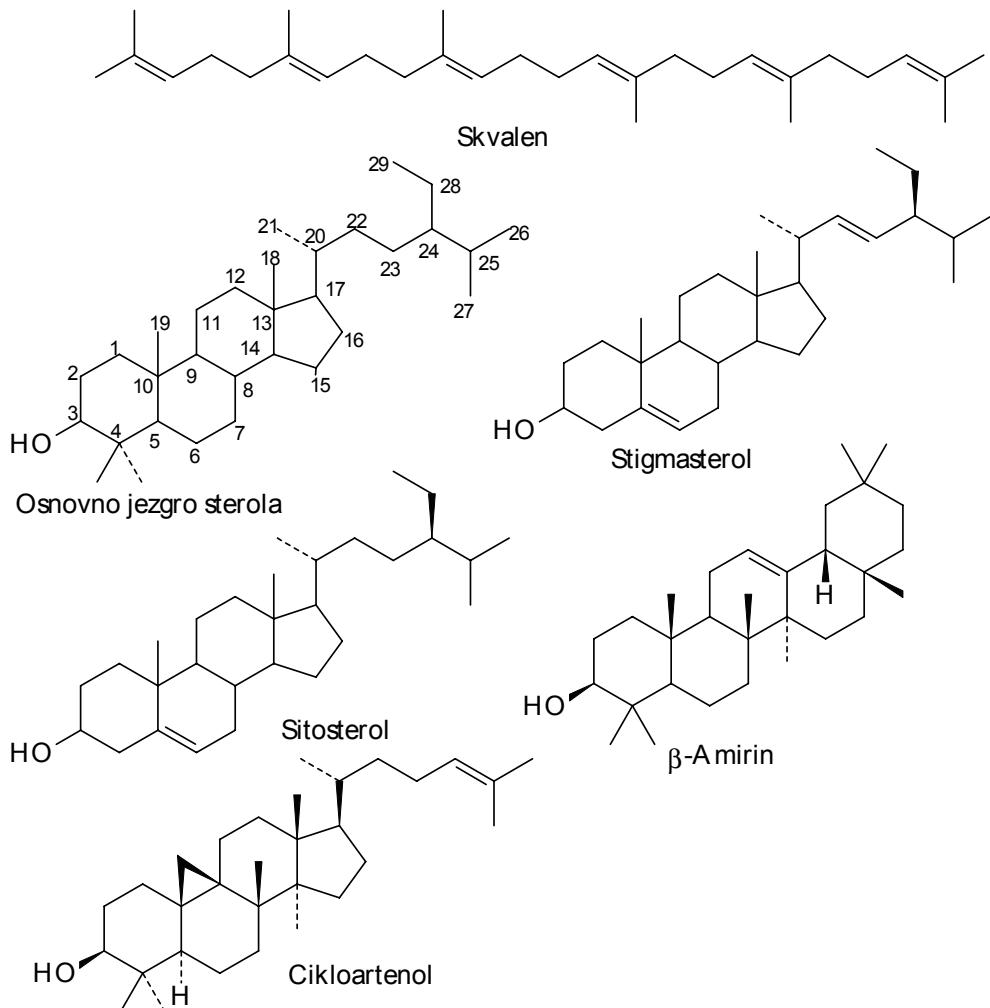
Biosinteza *ent*-kaurenske kiseline iz GGPP. Enzimi: 1A i 1B su *ent*-kauren sintetaza; 2 –je kauren oksidaza.

*Ent*-kaurenska kiselina se hidroksiluje do 7- hidriksi kaurenske kiseline enzimom kauren-hidroksilazom. Ova hidroksilacija zahteva O<sub>2</sub>, NADPH i Cyt-P-450. GA<sub>12</sub>-aldehid (slika 17-14) nastaje putem kontrakcije β-prstena sa 6 na 5 C-atoma, sa istiskivanjem na C-7. Ova dekompozicija β-prstena katalizovana je mikrozomalnim i solubilnim enzimima, koji zahtevaju različite kofaktore.

Svetlost indukuje biosintezu giberelina što je utvrđeno eksperimentima kod etioliranih biljaka u odnosu na biljke rasle u normalnim uslovima. Kod prvih je sadržaj giberelina bio znatno manji.

## 17.6. Triterpenoidi

C<sub>30</sub> terpenoidi (heksamerni derivati izoprena) nastaju "glava-glava" kondenzacijom dva FPP molekula stvarajući skvalen-prekursor svih triterpenoida (slika 17-16). Više od 4000 različitih molekula triterpenoida je izolovano i identifikovano, sa više od 40 skeletnih tipova, uključujući i uobičajeni pentaciclični sistem prstenova kao u  $\beta$ -amirinu. Ovi molekuli imaju kompleksnu strukturu i mogu biti alkaloidi, aldehidi ili karboksilne kiseline.



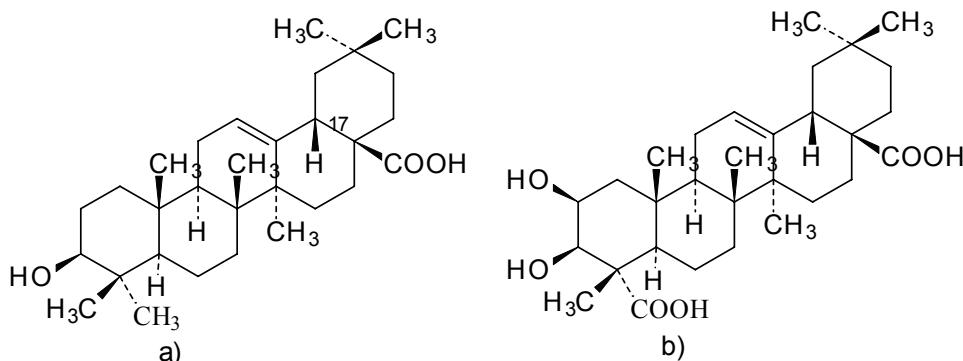
Slika 17-16. Neki fitosteroli nastali iz skvalena.

Na osnovu hemijske strukture mogu se podeliti u 4 strukturna tipa i to:

- ◆ -čiste triterpenoide
- ◆ -fitosterole
- ◆ -saponine i
- ◆ -kardenolide.

### 17.6.1. Čisti triterpenoidi

U čiste triterpenoide se ubrajaju pentaciklični triterpenoidi  $\alpha$ - i  $\beta$ - amirin. Najrasprostranjeniji derivat  $\beta$ - amirina je *oleanolna kiselina*. Ona se do 1% ( u odnosu na ukupnu suvu masu) nalazi u *Eugenii cariophylata*, a kao glikozid u šećernoj repi (*Beta vulgaris*), ljusci od jabuke, kaktusima itd. U lucerki se nalazi saponin koji hidrolizom daje pentaciklični triterpenoid *medikagenolnu kiselinu*.



Slika 17-17. Strukture oleanolne (a) i medikagenolne kiseline (b).

### 17.6.2. Fitosteroli

Steroli, članovi triterpenoidnih izoprenoida, se karakterišu pomoću  $3\beta$ -monohidroksi perhidro-1,2-ciklopentanofenantrenskog prsten sistema (slika 17-16). Brojevi koji označavaju C- atome u osnovnom skeletu sterola dati su prema preporuci IUPAC-IUB Komisije za nomenklaturu iz 1989. godine.

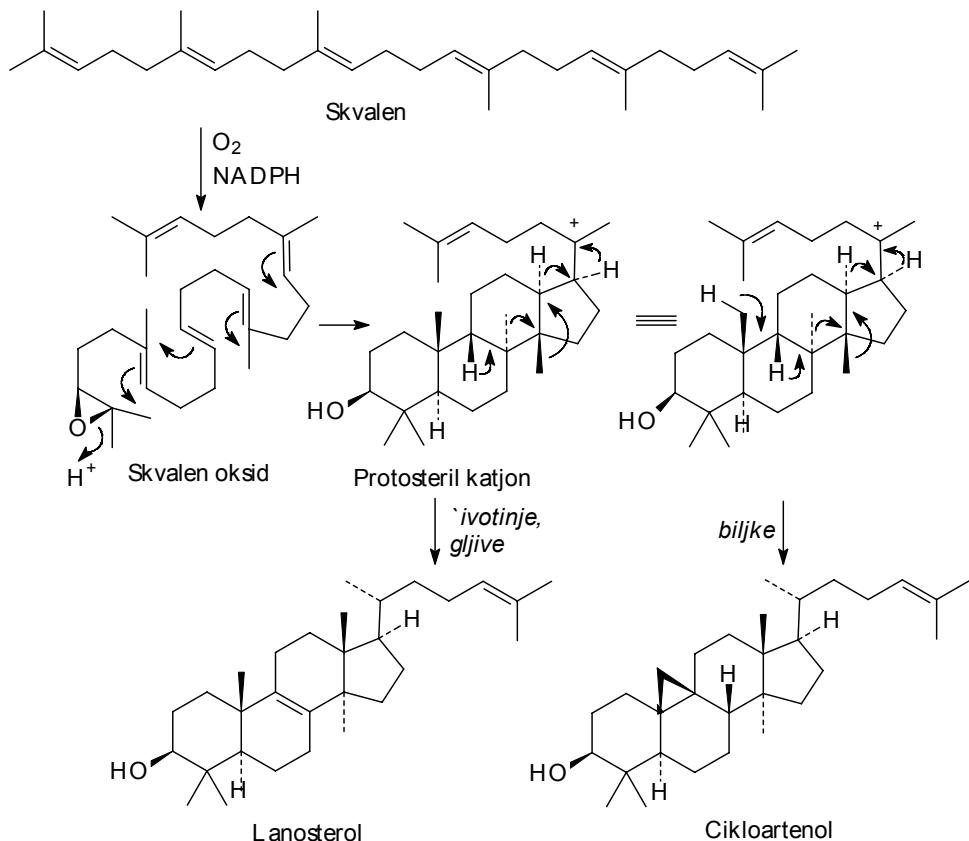
Više od 4000 triterpenoida je karakterisano, mada je samo oko 300 sterola pripisano biljkama. Steroli su često esterifikovani masnim kiselinama na C-3 hidroksilnoj grupi.

U osnovi, većina biljaka proizvodi sterole koji su alkilovani na C-24 što je tipično za stigmasterol i sitosterol (slika 17-16). Holesterol retko prelazi svega nekoliko procenata u smeši fitisterola. Kombinovanim hromatografskim metodama

(GC, HPLC, MS i NMR) je moguće izolovati, prečistiti i identifikovati sterole iz biljaka.

### a) Biosinteza

U osnovi je prihvaćeno da stepeni koji vode do skvalena iz HMG-CoA (slika 17-3) su isti kod životinja, biljaka i gljiva. Ključni enzim na ovom putu sinteze je skvalen-sintetaza, koja je izolovana i karakterisana iz kulture ćelija paradaiza od strane Hanleja i Čapela 1992. Skvalen-epoksidaza, koja katalizuje konverziju skvalena u 2,3-epoksid, je izolovana i karakterisana pre iz tkiva životinje nego biljaka. Ciklizacija skvalen 2,3 –epoksida u policiklične triterpenoide varira između vrsta. Enzimi uključeni u ovu ciklizaciju se nazivaju skvalen-epoksid ciklaze (EC 5.4.99.7), a ime dobijaju prema proizvodu reakcije kao npr. cikloartenol-ciklaza koja u višim biljkama i algama katalizuje nastajanje fitosterola( slika 17-18).



Slika 17-18. Biosinteza lanosterola i cikloartenola .

Proizvod ciklizacije skvalen-epoksida zavisi od konformacije skvalen-epoksida vezanog za enzim i prirode i položaja nukleofila ili baze na enzimu. Dva tipa ciklaze mogu biti predočena: jedan odgovoran za ciklizaciju skvalen-epoksida u konformaciji „*stolica-kada-stolica-kada*“ što vodi nastajanju tetracicličnih triterpenoida kao što su lanosterol i cikloartenol i drugi tip ciklaze odgovoran za nastajanje  $\beta$ -amirina iz skvalen-epoksida u konformaciji „*stolica-stolica-stolica-kada*“.

Dugačak je put od cikloartenola do drugih fitosterola. On uključuje pre svega demetilacije na C-4 i C-14 u pentacicličnom cikloartenolu. Enzimologija ovih demetilacija kao i redosled uklanjanja ni do danas nije jasan.

Faktori koji regulišu razlike u sadržaju sterola u biljkama od vrste do vrste nisu dobro karakterisani, kao ni mehanizmi kontrole izmene u sterolima za vreme rasta biljaka.

### b) Biološka funkcija fitosterola

Steroli imaju struktturnu ulogu u membranama biljaka, analogno holesterolu u ćeliji životinja. Plazma membrana ima izuzetno visok sadržaj sterola i visok odnos sterol:fosfolipid. Membrane hloroplasta sadrže samo male količine sterola.

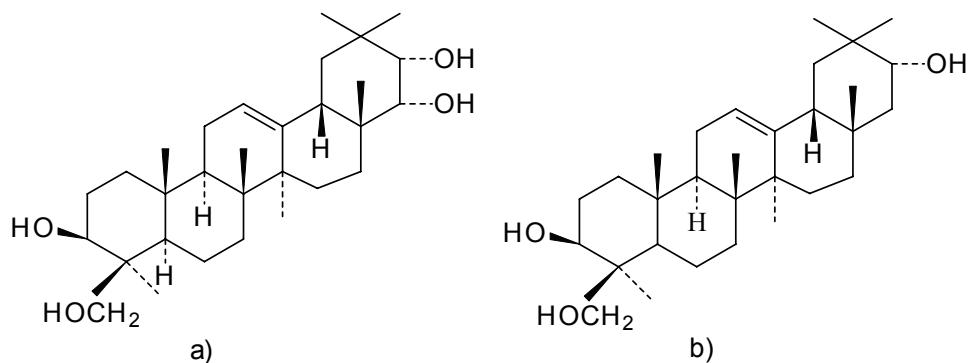
Steroli su važni za rast biljaka, što je pokazano u eksperimentima sa sintetičkim regulatorima rasta. Tako npr., 2R, 3S- enantiomer paklobutrazola redukuje visinu izdanka ječma i pokazuje prateću redukciju kod 4-demetyl sterola i 14  $\alpha$ -metil sterola. Zaostajanje u rastu može biti delimično otklonjeno pomoću holesterola, ali puna restauracija rasta zahteva tragove 24-etilsterola, kao što je stigmasterol. Može se reći da ćelija ima dva sterol-zahteva; jedan za „veliki“ sterol (veliki u smislu količine) za novu produkciju membrana deobom ćelije i drugi za 24-etilsterol za specifičnu stimulatornu funkciju. Francuski istraživač Ourison (Ourisson, 1994) je pokazao da je cikloartenol kod biljaka ekvivalent holesterolu sa aspekta bioloških funkcija u membranama. Ourison sugeriše da je cikloartenol primitivni surogat holesterola.

## 17.6.3. Saponini

Saponini su glikozilovani triterpenoidi široko prisutni u bilnjom svetu. Oni se rastvaraju u vodi, stvarajući stabilne pene slično sapunima. Tri glavne klase saponina su poznate kao: (a) steroid glikozidi, (b) steroid alkaloid glikozidi i (c) triterpenski glikozidi.

Sve tri klase imaju jednu ili više linearnih ili razgranatih ugljovodoničnih lanaca vezanih za aglikon (sapogenin). Saponini čiji je aglikon oleanolna kiselina nisu poželjni u procesu prerade šećerne repe, zbog čega se u selekciji ide ka sortama sa niskim sadržajem saponina.

Iz soje su izolovani saponini, koji u svojoj strukturi imaju dve vrste pentacicličnih triterpenoida : A i B. Izolovani sapogenini su nazvani *sojasapogenol A* i *sojasapogenol B*, njihove strikture su date na slici 17-19.



Slika 17-19. Strukture sapogenola A (a) i sapogenola B (b).

#### a) Biološka aktivnost saponina

Funkcija saponina u biljkama nije do kraja razjašnjena, mada se zna da ih štite od napada gljiva. Oni se koriste za liziranje eritrocita i ovo je standardna metoda za njihovu detekciju.

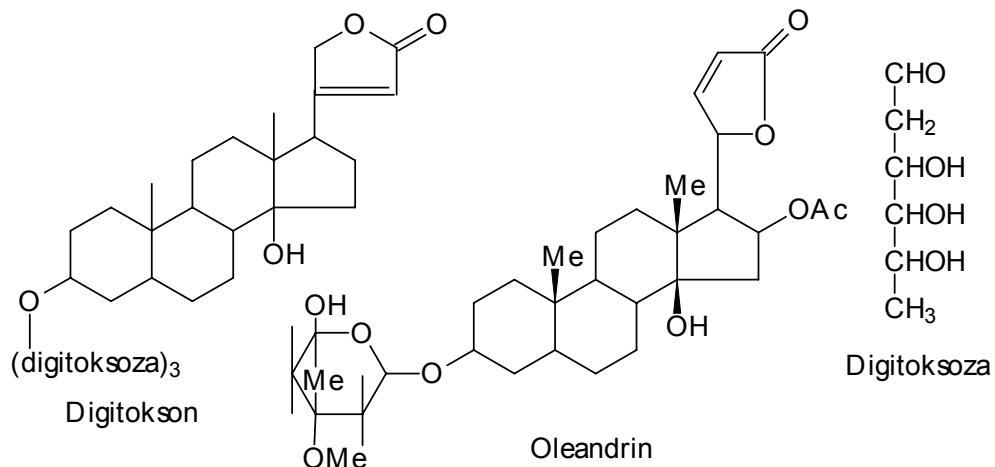
### 17.6.4. Kardenolidi

Kardenolidi su C<sub>23</sub> derivati steroida koji imaju kardičnu aktivnost i stoga se nazivaju još i srčanim glikozidima ili kardičnim glikozidima odnosno kardenolidima. Ova grupa jedinjenja se može podeliti u dve podgrupe na osnovu broja C-atoma:

- ◆ C<sub>23</sub> kardenolidi (sa petočlanim laktonskim prstenom) (slika 17-20) i
- ◆ C<sub>24</sub> kardenolidi (sa šestočlanim laktonskim prstenom).

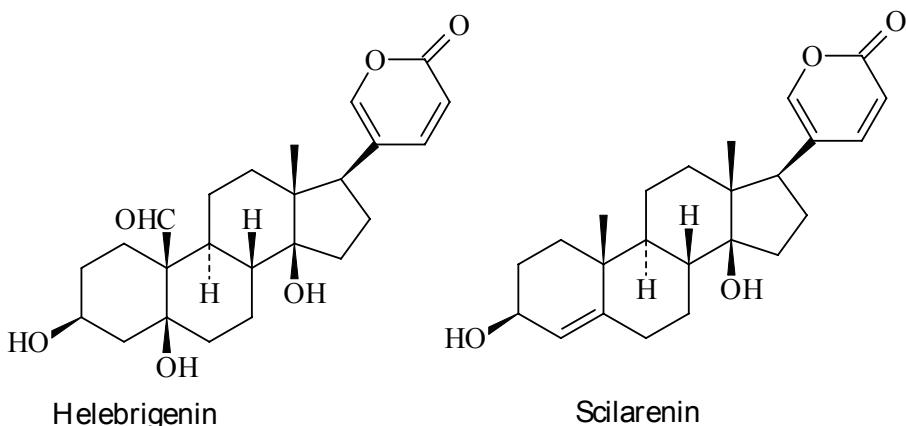
U C<sub>23</sub> kardenolide su svrstani srčani glikozidi koji se industrijski izoluju iz *Digitalis lanata*, *D. purpurea* i *Nerium oleander*. Značajni su kao aktivne supstance lekova. Iz *Digitalis lanata* i *Digitalis purpurea* izolovana su tri glikozida i to: *digitoksin*, *digoksin* i *gitoksin*. Aglikon digitoksina, digoksina i gitoksina je *digitoksigenin*, *digoksigenin* i *gitoksigenin*. Šećerna komponenta u svim glikozidima je *digitoksoza*. Srčani glikozidi iz digitalisa se koriste u farmaceutskoj industriji za proizvodnju lekova, koji se koriste u terapiji srčanih oboljenja. Srčani

glikozid *oleandrin* pored fiziološkog delovanja na srčani mišić pokazuje i insekticidnu aktivnost. Strukture navedenih C<sub>23</sub> kardenolida su date na slici 17-20.



Slika 17-20. Strukture nekih C<sub>23</sub> kardenolida.

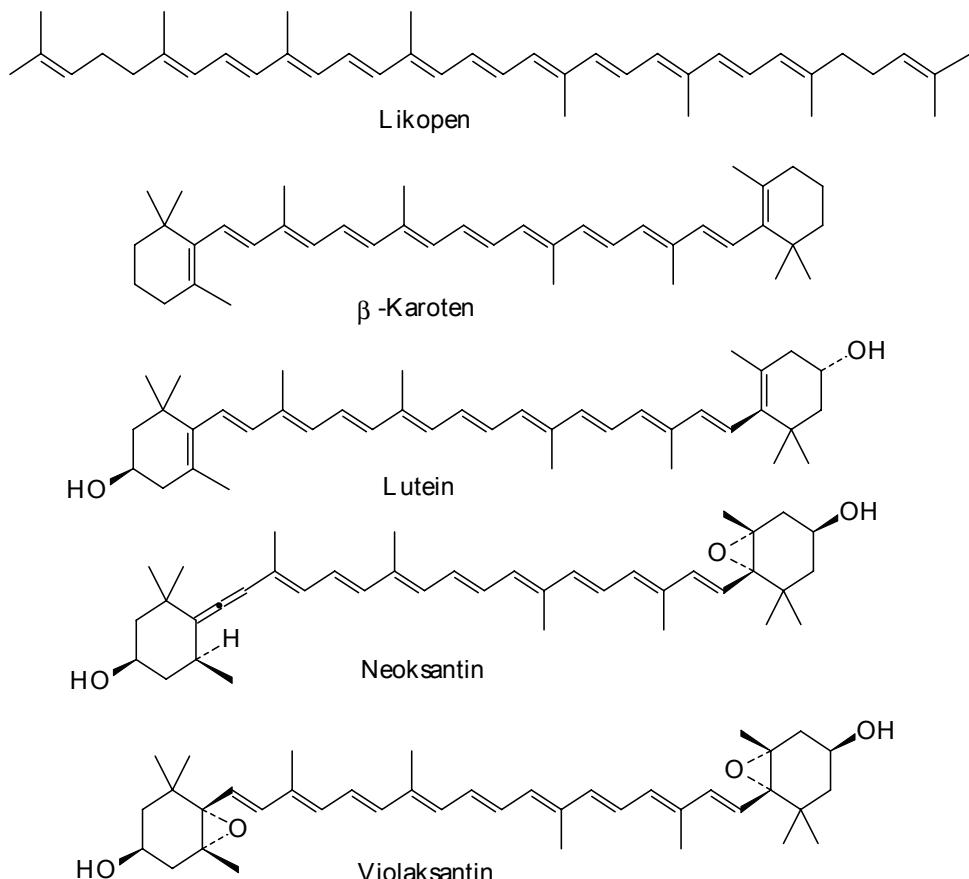
C<sub>24</sub> kardenolidi su *bufadienolidi*. Predstavnici ovih jedinjenja su helebrigenin izolovan iz biljaka *Heleborus* vrsta iz familije *Ranunculaceae* i scilarenin iz *Scilla maritima* iz familije *Lamiaceae*. Njihove strukture su date na slici 17-21.



Slika 17-21. Strukture nekih C<sub>24</sub> kardenolida.

## 17.7. Karotenoidi

Karotenoidi su obilna grupa u prirodi rasprostranjenih pigmenata, prisutni u svim zelenim tkivima, gde su konstituenti hloroplasta i odgovorni su najviše za žutu i crvenu boju cveća i voća. Preko 600 struktura je određeno, od kojih 150 je nađeno u fotosintetičkim tkivima. Svi karotenoidi imaju trivijalno i semisistematsko ime prema nomenklatiri IUB (*International Union of Biochemistry*). Karotenoidi su linearne visoko nezasićene alifatične i aciklične ugljovodonice zvane *karoteni* i njihovi oksidacioni proizvodi zvani *ksantofili*. Mogu biti aciklični (kao što je likopen, slika 17-22) ili da sadrže 5 ili 6-očlane prstenove na jednom ili na oba kraja molekula, kao što su  $\beta$ -karoten i lutein (slika 17-22). Po hemijskoj strukturi pripadaju tetra-terpenoidima i izgrađeni su iz 8 izoprenskih jedinica.



Slika 17-22. Tipični karotenoidi viših biljaka.

Zbog konjugovanog sistema dvogubih veza molekuli karotenoida teoretski mogu egzistirati u velikom broju geometrijskih izomera (*cis/trans* izomeri), mada u prirodi dominiraju all-*trans* oblici.

Najočiglednija strukturalna odlika u molekulu karotenoida je *hromofora* (izgrađena iz konjugovanih duplih veza) koja u karotenoidima iz tkiva biljaka varira u različitim obojenim nijansama od tri u bezbojnom fitoenu do 13 u kantaksantinu koji je crven. Ovaj sistem dvogubih veza čini ih osetljivim na izomerizacije i oksidativne degradacije, naročito za vreme procedura ekstrakcije i purifikacije.

### 17.7.1. Distribucija

U ovom odeljku neće biti reči o rasprostranjenosti karotenoida u prirodi već samo o njihovoj distribuciji u fotosintetičkim i ne-fotosintetičkim tkivima viših biljaka.

#### a) Fotosintetička tkiva

Karrenoide (karotene i ksantofile) akumuliraju u fotosintetičkim tkivima sve više biljke. Oba, karoteni i ksantofili su nađeni u listovima gde su dominantni,  $\beta$ -karoten, lutein, violaksantini neoksantin (sl. 17-22). Minorne komponente uključuju  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksanthin, zeaksantin, anteraksantin i lutein 5,6-epoksid. U osnovi karoteni čine 25% od ukupnih karotenoida. Ostatak čine ksantofili gde dominira lutein sa 45%. Za vreme starenja lista hloroplasti se raspadaju i dolazi do esterifikacije ksantofila.

U fotosintetički aktivnim hloroplastima karotenoidi su deo pigment-proteini kompleksa (PPCs) u tilakoidnim membranama. Jezgro kompleksa čini jedan  $\beta$ -karoten na 40 molekula hlorofila udruženi sa luteinom, violaksantinom i neoksantinom.

#### b) Ne-fotosintetička tkiva

Karotenoidi cvetnih latica mogu biti podeljeni u tri glavne grupe: (a) visoko-oksidovani karotenoidi kao što su auroksantin i flavoksantin; (b) karoten prisutan u visokim koncentracijama, kao što je  $\beta$ -karoten u *Narcissus* i (c) "species-species" kao što je kroketin u *Crocus*. Karotenoidi cveta su najčešće esterifikovani.

Distribucija karotenoida u plodovima je krajnje kompleksana i predmet je znatnih razlika među biljnim vrstama. U plodovima tokom zrenja oni mogu varirati od nekoliko pa do 50 kod nekih vrsta južnog voća. Njihova biosinteza u plodovima je autonomna i odvija se u njima nakon premeštanja iz matične biljke. Nezreli (zeleni) plodovi sadrže neke pigmente kao druga fotosintetička tkiva, ali nakon

sazrevanja diferencijacija hloroplasta u hromoplaste je česta i ne dešava se uvek, kao ni *de novo* sinteza karotenoida.

Prema Gudvinu (Goodwin, 1980) 8 glavnih grupa plodova mogu biti izdvojene prema sadržaju karotenoida; (i) jagoda- sa beznačajnom količinom; (ii) borovnica sa velikom količinom karotenoida hloroplasta; (iii) paradaiz- velika količina likopena i njegovih hidroksilovanih derivata; (vi) breskva- velika količina  $\beta$ -karotena i njegovih hidroksi-derivata; (v) crvena paprika- uobičajeni karotenoidi kao što je kapsantin; (vi) mandarin-paradaiz- sa poli-*cis*-karotenoidima; kao što je prolikopen; (vii) južno voće- sa apokarotenoidima kao što je persikaksantin i (viii) karambola (eng. carambola) sadrži znatnu količinu karoten epoksida.

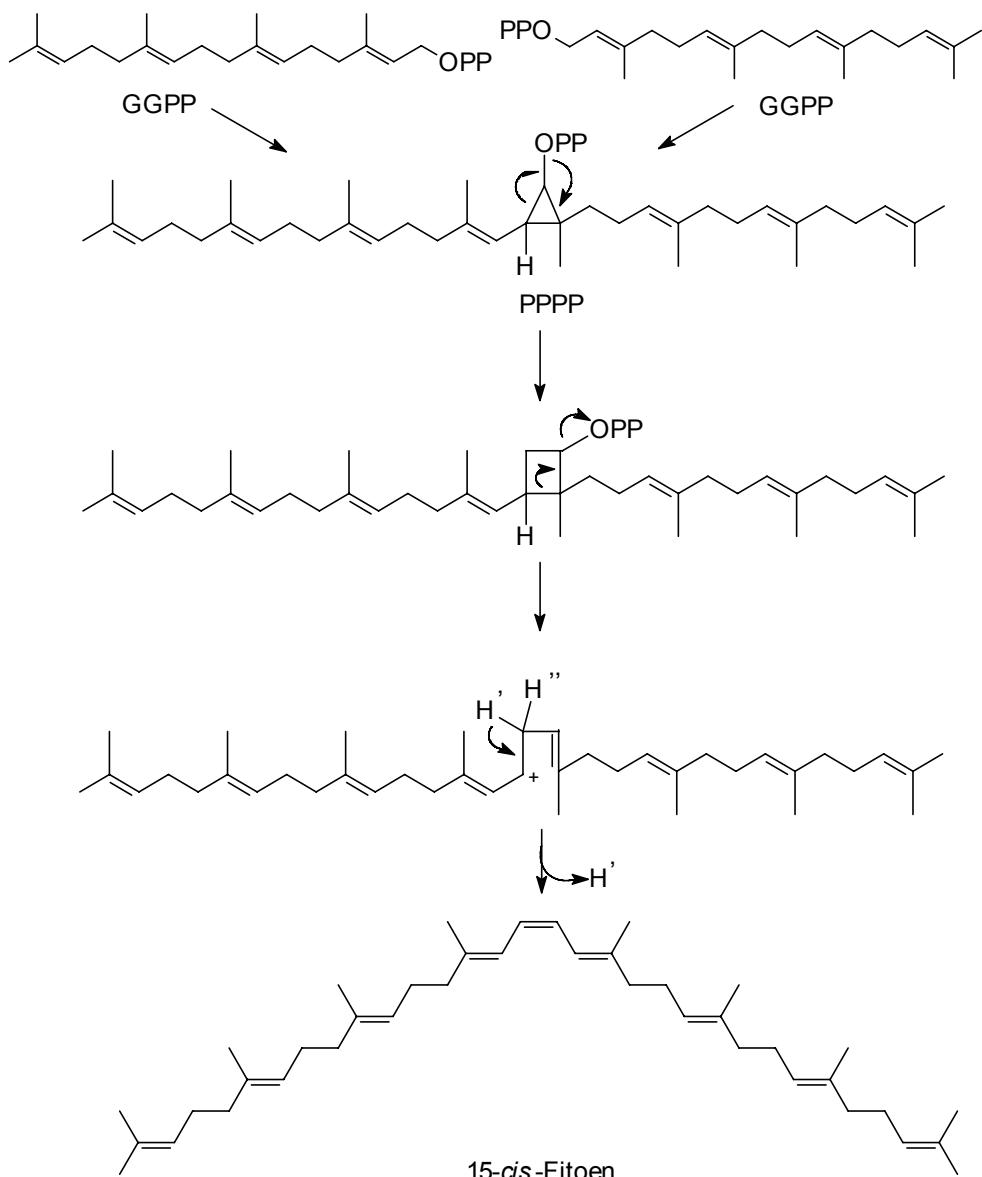
Antere i polen takođe sadrže karotenoide. Seme uglavnom sadrži karotenoide u tragovima sa izuzetkom kukuruza koji sadrži znatne količine  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina i zeaksantina.

## 17.7.2. Biosinteza i enzimologija

### a) Nastajanje fitoena iz GGPP

Prvi proučen stepen u nastajanju karotenoida je tzv. "glava-glava" kondenzacija (eng. *head-to-head*) dva molekula all-*trans* geranilgeranil pirofosfata (GGPP) preko ciklopropilkarbonil pirofosfata, prefitoen pirofosfata (PPPP) do oblika fitoena (slika 17-23). Konfiguracija fitoena u eukariotskim organizmima je dominantno 15-*cis*. U brojnim ekstraktima biljaka je dokazano da prekursori fitoena mogu biti i MVA i IPP. Za ovu biosintezu neophodan je Mn<sup>2+</sup> i on je univerzalan kofaktor, dok enzimi u plodovima paradaiza zahtevaju i ATP.

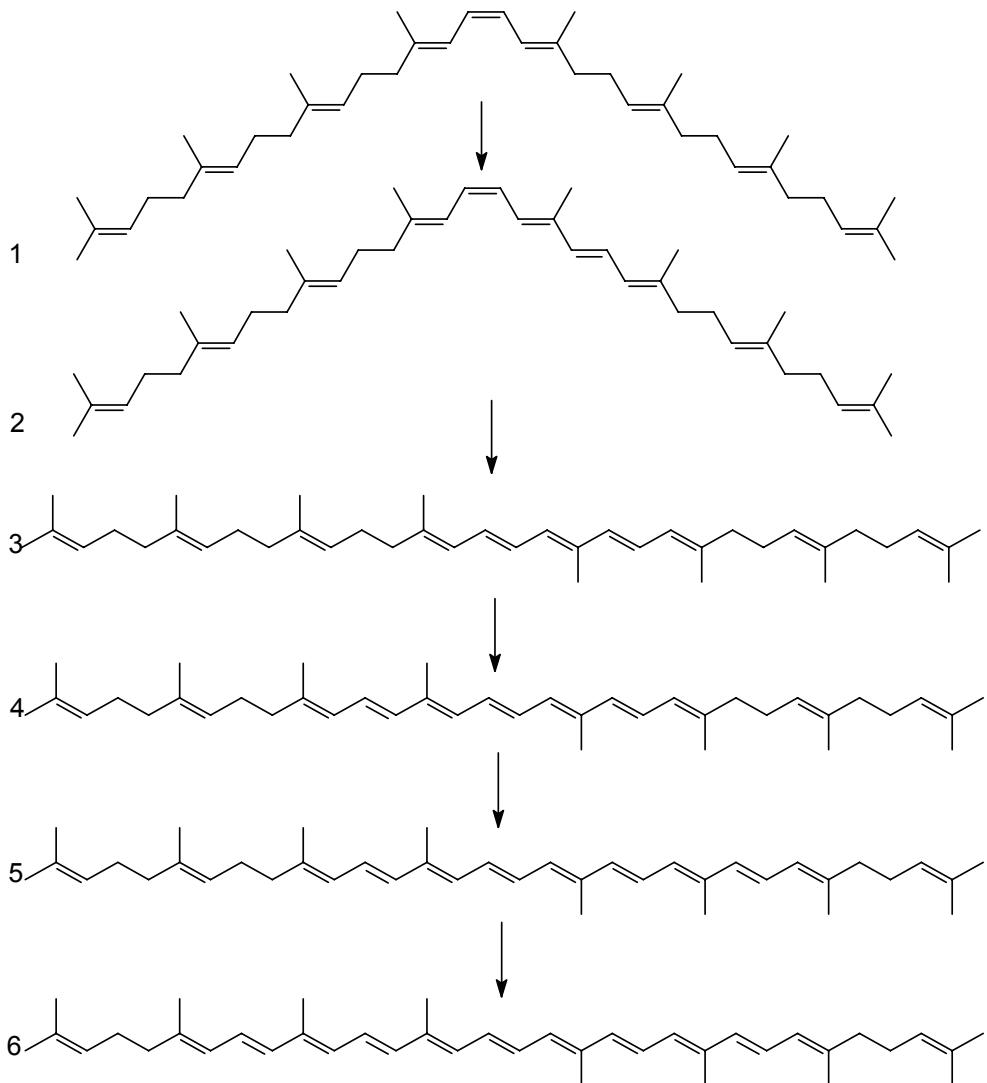
Ključni enzim u ovoj sintezi je fitoensintaza koja je locirana u stromi hloroplasta, hromoplasta i amiloplasta paprike (*Capsicum*) ili kao periferni membranski protein u unutrašnjoj membrani hromoplasta narcisa (*Narcissus*).



Slika 17-23. Formiranje 15-*cis* fitoena iz GGPP.

### b) Reakcije desaturacije i izomerizacije

Sekvence reakcije, od fitoena do likopena uključuju 4- stepena dehidrogenacija, alternativno na jednoj ili drugoj strani hromofore, uz intermedijere fitofluen,  $\zeta$ -karoten i neurosporen (slika 17-24).



Slika 17-24.

Desaturacija 15-*cis* fitoena (1) u all-*trans*-likopen (6), preko 15-*cis* fito-fluena (2), all- *trans*- fitofluena (3),  $\zeta$ -karotena (4) i neurosporena (5).

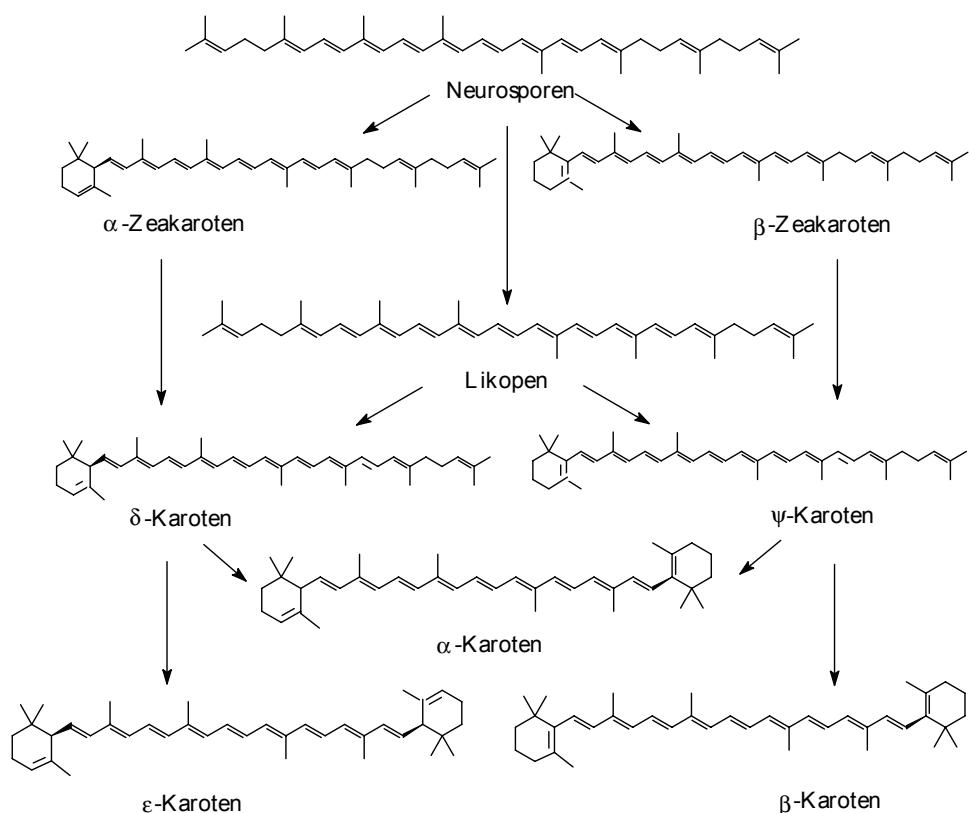
Međutim u višim biljkama 15-15' dupla veza se izomerizuje od *cis* do *trans* konfiguracije. Ove izomerizacije su verovatno ne enzimski katalizovane i vode ka fitofluenu.

U višim biljkama se odvijaju dve desaturacije: prvo, fitoen-desaturaza prevodi fitoен u fitofluen i  $\zeta$ - karoten i tada  $\zeta$ -karoten-desaturaza u drugoj

desaturaciji stvara neurosporen i likopen. Enzimi desaturaze su membran vezani unutar plastida i udruženi su u komplekse sa hloroplastima u listu spanaća i membranama hloroplasta u cvetu narcisa.

### c) Reakcije ciklizacije

Aliciklične grupe na krajevima polinezasićenog ugljovodoničnog lanca su česta karakteristika mnogih karotenoida. Tipični primer za to su  $\beta$ - i  $\epsilon$ -karotenoidi sa dva prstena (dve aliciklične grupe) nađeni u višim biljkama. Oba prstena se formiraju nezavisno jedan od drugoga, mada verovatno iz istog prekursora. Stereohemija ciklizacije prstenova je danas poznata (Britton, 1990\*). Sam tok ciklizacije verovatno teče prema shemi datoj na slici 17-25.



Slika 17-25. Reakcije ciklizacije u karotenogenezi.

#### d) Formiranje ksantofila

Aliciklični ksantofili sa supstituisanim kiseonikom na prstenovima su uobičajeni u višim biljkama, kao što su hidroksi-grupe na C<sub>3</sub> i C<sub>3'</sub> (lutein i zeaksantin, slika 17-22) ili epoksi grupe na C<sub>5,6</sub> ili C<sub>5',6'</sub> (violaksantin i neoksantin, sl. 17-22). Supstituisane grupe kiseonika u molekulu ksantofila su obično katalizovane pomoću cyt P-450 zavisne oksidaze mešane funkcije, mada se malo zna o enzimima biosinteze ksantofila. Konverzija zeaksantina u anteraksantin i violaksantin (tzv. "violaksantin ciklus") zahteva O<sub>2</sub> i NADPH.

### 17.7.3. Regulacija biosinteze

Regulacija karotenogeneze, kod svih karotenoida koji su esencijalni deo pigment-protein kompleksa (PPCs) u tilakoidima hloroplasta, je povezana sa nastajanjem hlorofila, proteina, lipida i razvojem hloroplasta. Jasno je da ovo mora biti regulisano mehanizmima koji kontrolisu snabdevanje karotenoida za PPCs, kao i za pojedinačne puteve metabolizma, pošto se biogeneza različitih karotenoida odvija u različitim mestima u hloroplastima. Brajton (Britton, 1993: *In Carotenoids in Photosynthesis*; A.J. Young and G.Britton, eds, pp 96-126. Chapman and Hall. London) je opisao neke faze u biosintezi karotenoida u hloroplastima i ukazao na opasnost uprošćavanja da sve biljne vrste imaju isti mehanizam regulacije. Faktori spoljašnje sredine, kao što su intenzitet svetlosti, uključujući adaptaciju na periode svetlosti, senka i mnogi drugi, imaju značajan efekat na nivo karotenoida u višim biljkama. O molekularnim mehanizmima karotenogeneze danas se malo zna. Zbog toga će u budućnosti "genske probe", a naročito enzimske analize *in vitro* u ovoj oblasti biti predmet interesovanja naučne javnosti.

### 17.7.4. Funkcija karotenoida

Osnovna uloga karotenoida u fotosintetičkim tkivima je fotozaštita, koja se ogleda u "gašenju" tripletog stanja hlorofila i "hvatanju" singlet kiseonika. Ove funkcije su povezane sa sposobnošću molekula karotenoida da učestvuje u fotohemiskim reakcijama kao što su: singlet-singlet energija, triplet-triplet energija, oksidacije, redukcije i izomerizacije. Druga esencijalna funkcija ogleda se u učešću karotenoida kao pomoćnih pigmenata u asimilaciji svetlosti, na šta ukazuje njihovo prisustvo u PPC.

Konačno, treba napomenuti da su karotenoidi prekursori u biosintezi esencijalnog biljnog hormona abscisinske kiseline.

## 17.8. Politerpenoidi

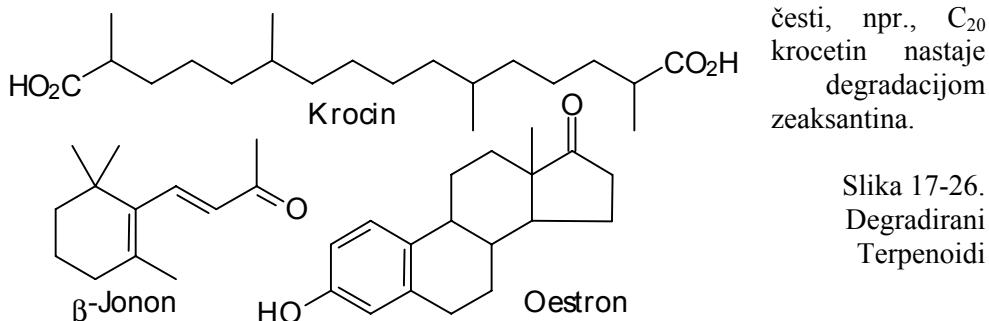
Politerpenoidi su jedinjenja velike molekulske mase, formule  $(C_5H_8)_n$ , široko rasprostranjeni u biljnom svetu. U prirodnog gumi, izoprenske jedinice imaju *cis*-konfiguraciju, dok su u gutaperki sve jedinice *trans*-konfiguracije. Studija biosinteze prirodne gume, sprovedena 50-tih i 60-tih godina 20. veka, upotrebom lateksa iz *Hevea brasiliensis*, ukazala je da se ekstenzija (produčavanje) izoprenskog lanca odigrava sukcesivnom adicijom IPP na postojeću gumu. Transferaza je rastvorljivi enzim koji je lociran na površinu čestica gume. Iako se pre smatralo da je guma u potpunosti izgrađena iz *cis*-izomera, postoji verovatnoća da su prisutne i druge veze, poput *trans*-1,4 veze. Terpenski alkoholi otvorenog lanca često se nazivaju "prenoli" ili "prenil"-jedinjenja. Više biljke, alge i neke gljive sadrže linearne nezasićene poliprenole koji imaju 45-115 ugljenikovih atoma vezanih raznolikim *cis*- i *trans*- vezama. Prvi otkriveni terpenski alkohol dugog lanca bio je  $C_{45}$  solanesol (danas preimenovan u *trans*-nona-prenol). Plastohinoni i ubihinoni imaju prenil bočne lance u strukturi. Funkcija ovih prenil alkohola nije sa sigurnošću utvrđena ali se zna da su mono-fosfatestri uključeni u biosintezu glikogena.

## 17.9. Ređe zastupljeni terpenoidi

U retke terpenoide u biljkama ubrajaju se dva osnovna strukturna tipa poznatiji kao degradirani terpenoidi i sesterterpenoidi.

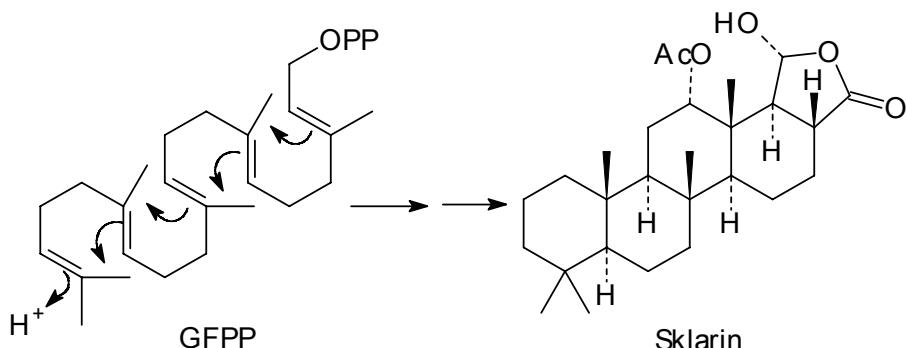
### 17.9.1. Degradirani terpenoidi

Utvrđeno je da se neki terpenoidi degradiraju *in vivo* pri čemu nastaju *nor*-ili *apo*-proizvodi. *Nor* se odnosi na gubitak metil-grupa, dok *apo* ukazuje na rascep na veće fragmente skeleta. Neki primeri su dati na slici 17-26. *Apo* karotenoidi su



## 17.9.2. Sesterterpenoidi

C<sub>25</sub> grupa izoprenoida, sesterterpenoidi, poznati su od 1965. g. Veruje se da nastaju produžavanjem GGPP kondenzacijom sa IPP, pri čemu nastaje geranilfernezil-pirofosfat (GFPP), osnovno jedinjenje ove klase čijom intramolekulskom ciklizacijom nastaju strukturalni predstavnici sesterterpenoida. *Sklarin* je tipičan sesterterpenoid nekih morskih organizama (slika 17-27). Obično su prisutni zajedno sa diterpenoidima, naročito u gljivama, lišajevima, morskoj travi i višim cvetnicama.



Slika 17.27. Intramolekulska ciklizacija GFPP u sklarin.

## Izvod

♣ Biljke sadrže značajnu količinu izoprenoidnih komponenata veoma različitih struktura i funkcija. Neki od njih su primarni metaboliti, kao steroidi, ali većina se sintetizuju u biljkama kao sekundarni metaboliti. U literaturi se ova grupa metabolita može naći pod različitim nazivima kao terpentinska ulja odnosno terpenoidi da bi se u novijoj odomaćio naziv *izoprenoidi*.

♣ Izoprenoidi su poznati još iz doba antike kao sastojci parfema, sapuna, začina i sl.

♣ Izoprenoidi su izgrađeni iz  $C_5$  jedinica izoprena, a nomenklatura glavnih klasa odražava broj prisutnih jedinica izoprena. Stoga se klasifikuju u nekoliko grupa: hemiterpenoide ( $5 C$  atoma;  $C_5$ ), monoterpenoide ( $C_{10}$ ), seskviterpenoide ( $C_{15}$ ), diterpenoide ( $C_{20}$ ), triterpenoide ( $C_{30}$ ), tetraterpenoide ( $C_{40}$ ) i politerpenoide sa  $n$  atoma ugljenika ( $C_n$ ).

♣ Etarska ulja su smeše mono- i diterpenoidea koja imaju karakterističan miris, koji može biti priјatan ili neprijatan.

♣ Wallach je prvi predložio "izoprensko pravilo" koje je kasnije Ružička proširio u "biogenetsko pravilo", a što sugerise da se sve klase izoprenoidea sintetizuju iz biohemski "aktivnog izoprena". Biohemski aktivne izoprenske jedinice se identificuju kao pirofosfatni (difosfatni) estri i to kao *dimetilalil pirofosfat* (DMAPP) i *izopentil pirofosfat* (IPP).

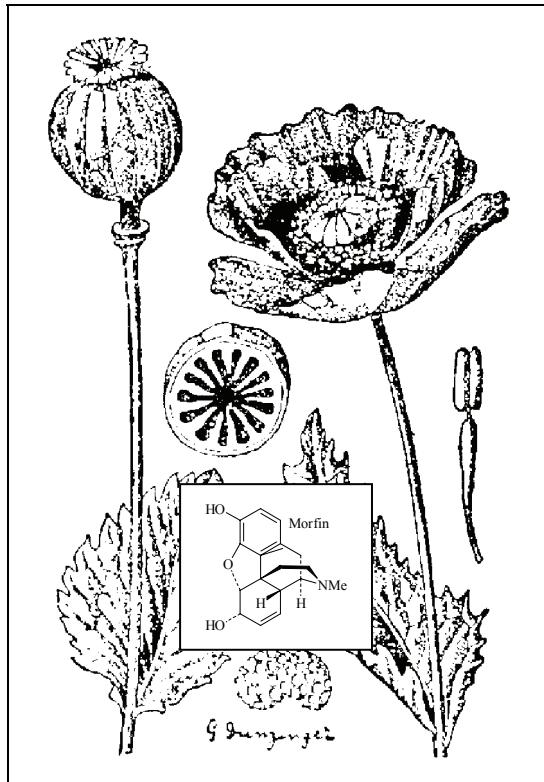
♣ Različite klase izoprenoidea, iz iste  $C_5$  jedinice, nastaju pomoću različitih kondenzacija, ciklizacija, intramolekulske premeštanja ili adicija.

♣ Kada grade izoprenoide dva ili više molekula izoprena se kondenzuju jedan sa drugim po sistemu "glava-rep".

♣ Ispitan je širok spektar bioloških aktivnosti izoprenoidea koje su izraz hemijske strukture i oblika molekula. Brojni monoterpenoidi poseduju antimikrobnu aktivnost. Seskviterpenoidi pokazuju svojstva insekt-antifidne supstance, insekt-hormona i feromona, fitoleksina, mikotoksina, antibiotika, regulatora rasta biljaka itd. Funkcija saponina u biljkama nije do kraja razjašnjena, mada se zna da ih štite od napada gljiva. Osnovna uloga karotenoida u fotosintetičkim tkivima je fotozaštita, koja se ogleda u "gašenju" tripletnog stanja hlorofila i "hvatanju" singlet kiseonika itd.

# 18.

## Metabolizam alkaloida, cijanogenih glikozida i glukozinolata



### 18.1. Alkaloidi

- 18.1.1. Rasprostranjenost
- 18.1.2. Detekcija prisustva
- 18.1.3. Biosinteza
- 18.1.4. Akumulacija i skladištenje
- 18.1.5. Transport
- 18.1.6. Obnavljanje alkaloida
- 18.1.7. Funkcija

### 18.2. Cijanogeni glikozidi i glukozinolati

- 18.2.1. Cijanogeni glikozidi
- 18.2.2. Glukozinolati

*Papaver somniferum L.*

Biljke proizvode širok spektar sekundarnih metabolita. Mnogi od njih funkcionišu kao alelojedinjenja i služe kao zaštitne hemijske komponente protiv biljojeda, mikroorganizama ili u kompeticiji biljaka. Istovremeno, boje i mirisi privlače insekte opršivače i životinje koje raznose seme i plodove biljaka. Početkom 20. veka smatralo se da sekundarni metaboliti nemaju određene funkcije u biljkama i da predstavljaju azotne otpadne proizvode, slično urei ili mokraénoj kiselini kod životinja. S obzirom da je azot ograničavajući nutrijent u ishrani biljaka, ova pretpostavka je malo verovatna i nije potkrepljena eksperimentalnim podacima.

Do danas je poznato preko 13.000 sekundarnih metabolita koji sadrže azot. Kako je svega oko 10% biljaka analizirano modernim fotohemiskim tehnikama (HPLC, kapilarna GLC, masena spektrometrijam, NMR),, može se sa sigurnošću pretpostaviti da je stvarni broj značajno veći. Osnovne grupe jedinjenja iz ove kategorije su alkaloidi, amini, neproteinske aminokiseline, cijanogeni glikozidi i glukozinolat.

Većina sekundarnih metabolita sa azotom nastaju iz aminokiselina koje daju ugljenikov skelet i/ili azot. Pored 20 proteinskih aminokiselina, kao prekursori u biosintezi pojavljuju se i neke druge., poput ornitina. Enzimi uključeni u proces biosinteze sekundarnih metabolita sa azotom obuhvataju dekarboksilaze trans-aminaze, amin-oksidaze, oksido-reduktaze, peroksidaze, hidrolaze, N- ili O-metiltransferaze, acil-CoA-transferaze, mono- i deoksigenaze, fenolaze i nekoliko "sintaza", koji su svi specifični i stereo-selektivni enzimi visokog afiniteta prema određenom supstratu. Mnoga prirodna jedinjenja sa azotom u prorodi su evoluirala u odbrambena jedinjenja koja deluju na određene molekule u životinjskim ćelijama, npr. na receptore neurotransmitera (nikotin, efedrin, ergot alkaloidi,  $\beta$ -karbonil alkaloidi). Da bi ispunili ovu funkciju, molekuli moraju biti sintetizovani u stereo-hemijski "ispravnoj" konfiguraciji. Zbog toga su u biosintezu alkaloida uključeni visoko-specifični enzimi. Čak i  $\beta$ -glukozidaze biljaka pokazuju značajnu specifičnost, što je razumljivo s obzirom da u slučaju potrebe one moraju osloboditi ranije formirane odbrambene supstance, kao što su glukozinolati i cijanogeni. Manje specifični su samo degradirajući enzimi, kao što su neke esteraze, druge hidrolaze i peroksidaze, koji mogu razarati mikrobne fitotoksine zbog čega su šire supstratne specifičnosti. Ranije se smatralo da sekundarni metaboliti nastaju bez pomoći enzima ili uz prisustvo nekih opštih i nespecifičnih enzima. S obzirom na veliki broj sekundarnih jedinjenja samo mali broj enzimskih studija biosinteze je do danas proučen, što stvara široko polje za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Pošto alkaloidi i druga alelojedinjenja sa azotom prvenstveno služe kao odbrambena jedinjenja, potrebno je da budu prisutni u visokim koncentracijama i na pravom mestu u pravo vreme. Ovo zahteva visoko koordiniran sekundarni metabolizam, što se može videti na primeru nastajanja alkaloida koje je često zavisno od faze razvoja biljke. Njihov sadržaj i sastav može da varira sa godišnjim ili čak dnevnim ciklusom. Efekti alelojedinjenja zavise od doze. Da bi bile

efikasne, biljke moraju uskladištiti dovoljne količine odbrambenih jedinjenja, obično na strateškim mestima ( epidermalno tkivo, ili biljni delovi značaji za reprodukciju i/ili opstanak, kao što su kora, cvetovi, seme ili plodovi). Da bi sprečile bilo kakav vid intoksikacije sopstvenog metabolizma, biljke moraju uskladištiti alelojedinjenja u vakuolama, lateksu, smolnim kanalima ili u mrtvim tkivima.

Biljke koje proizvode seme bogato energetskim materijama (ugljenim hidratima, lipidima i proteinima), po pravilu, zajedno sa njima stvaraju i akumuliraju snažna hemijska odbrambena jedinjenja. To su najčešće alkaloidi, neproteinske aminokiseline, cijanogeni glikozidi, glukozinolati, inhibitori proteaza, lektini ili drugi toksalbumini. Njihovo prisustvo u semenu može biti međusobno isključivo, tj. semena leguminoza uskladište ili alkaloidne (npr. hinolizidinske, pirolizidinske) ili neproteinske aminokiseline ali nikad oboje istovremeno. Prilikom nicanja dolazi do razlaganja rezervnih materija u semenu, što uključuje i odbrambena jedinjenja sa azotom. To znači da ona imaju dvostruku ulogu- kao rezervoari azota i u zaštiti biljaka.

Pored izučavanja biosinteze ovih metabolita, potrebno je poznavati i njihov intra- i inter- celularni trasport, specifično nakupljanje u određenim ćelijama i tkivima, kao i lociranje u organelama. Ovo je od primarne važnosti sa aspekta razumevanja funkcionalne uloge ovih sekundarnih metabolita u biologiji biljke.

## 18.1. Alkaloidi

Do danas je opisano više od 12.000 struktura alkaloida, a njihova definicija se često menjala tokom godina. Ispriča, ova klasa sekundarnih jedinjenja bila je ograničena samo na biljne baze sa heterocikličnim atomom azota u strukturi. Baze sa egzocikličnim azotom nazivane su "pseudoalkaloidi". Druge definicije alkaloida su zahtevale da poreklo strukture alkaloida potiče od aminokiselina, ili, da ove baze pokazuju farmakološku aktivnost. Danas, definicija alkaloida je mnogo pragmatičnija, i obuhvata sve prirodne prozvode koji sadrže azot a nisu klasifikovani u peptide, neproteinske aminokiseline, amine, cijanogene glikozide, glukozinolate, kofaktore, fitohormone ili primarne metabolite (poput purinskih i pirimidinskih baza). Iz ovog razloga je čak i jedan broj bakterijskih i gljivičnih antibiotika uključen u alkaloidne.

### 18.1.1. Rasprostranjenost

Prisustvo alkaloida utvrđeno je u oko 15% biljaka, bakterija, gljiva, pa čak i životinja. U biljnom carstvu alkaloidi se sreću u primitivnim grupama kao što su *Lycopodium* ili *Equisetum*, u golosemenicama i skrivenosemenicama. U višim

biljkama (angiosperme), neke familije sadrže veći broj alkaloidnih predstavnika nego druge. Bogate alkaloidima su *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, *Fabaceae*, *Boraginaceae*, *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Liliaceae*, *Gentaceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae* i *Rutaceae*.

Specifični tipovi alkaloida su ograničeni na određene taksonomske jedinice i zato su važni za sistematiku, taksonomiju i filogeniju biljaka. Npr., benzilizohinolinski alkaloidi su tipični za *Papaveraceae*, *Berberidaceae* i *Ranunculaceae* koje su najverovatnije filogenetski povezane. Ipak, teže je objasniti situacije gde se specifični alkaloidi sintetizuju na odgovarajući stereochemijski način u sistematskim jedinicima koje nisu povezane. Primer za ovo su ergot alkaloidi koji nastaju u gljivama (*Claviceps*) ali takodje i u članovima familije *Convolvulaceae*, kao i hinolizidinski alkaloidi, tipični za neke leguminoze ali prisutni i u nekim vrstama familije *Berberidaceae* (*Caulophyllum*, *Leontice*). Pored toga, tragovi ovih jedinjenja su otkriveni i u čelijskim kulturama nepovezanih familija.

### 18.1.2. Detekcija prisustva

Radi utvrđivanja prisustva alkaloida u biljkama, obično se kao prvi korak koristi hromatografija na tankom sloju (TLC) biljnih ekstrakata. Prisustvo pokazuje određeni broj reagenasa koji daju tipične bojene reakcije, kao što su Dragendorfov i Majerov reagens. Pošto su alkaloidi obično prisutni u kompleksnim smešama koje se sastoje iz 2-5 dominantna alkaloida i 20-50 pratećih, metoda TLC je neodgovarajuća za njihovo razdvajanje. Za to su pogodnije metode HPLC i kapilarna GLC. Ovaj poslednji metod je posebno pogodan pošto se GLC može direktno kuplovati (povezati) sa masenim spektrometrom (MS) koji daje podatke o masenim spektrima i za jedinjenja prisutna u veoma malim količinama. Kako je veliki broj alkaloida analiziran pomoću masene spektrometrije, postoji velika kolekcija masenih spektara koja omogućuje identifikaciju najvećeg broja već poznatih alkaloida. HPLC je manje osetljiva metoda nižeg kapaciteta separacije. Teoretski, HPLC se takodje može kuplovati sa MS, ali ovi instrumenti nisu u širokoj upotrebi. HPLC ima glavnu prednost da omogućuje izolaciju jedinjenja u miligramskim količinama što dalje omogućuje njenu struktturnu identifikaciju pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR).

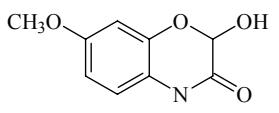
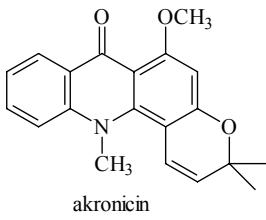
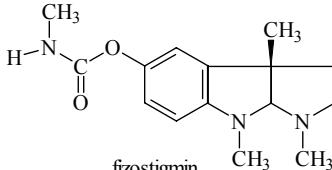
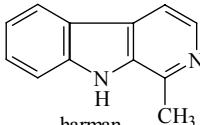
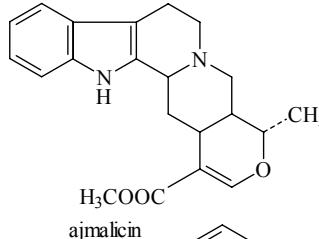
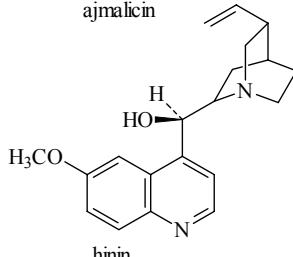
### 18.1.3. Biosinteza

Skelet većine alkaloida izведен je iz aminokiselina (slike 18-1a,b,c,d) iako se često kombinuju i delovi struktura drugih biosintetičkih puteva, npr. terpenoida.

Prekursor Amino kiselina	Tip alkaloida	Primeri strukturna formule	Nalaženje
Ornitin	pirolizidinski	 senecionin	<i>Senecio</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Heliotropium</i> , idr. <i>Boraginaceae</i>
	tropanski	 kokain	<i>Solanaceae</i> , <i>Erythroxylum</i> , ( <i>Hyoscyamus</i> , <i>Datura</i> , <i>Atropa</i> , <i>Duboisia</i> ) i druge <i>Genistae</i>
	nikotinski	 nikotin	<i>Nicotiana</i> spp. (tragovi u mnogim drugim biljkama)
Lizin	hinolizidinski	 lupanin	<i>Lupinus</i> , <i>Cytisus</i> , <i>Genista</i> , <i>Baptisia</i> , <i>Thermopsis</i> , <i>Laburnum</i> , <i>Caulophyllum</i>
Asparaginska kiselina	areka	 arekolin	<i>Areca catechu</i>

Slika 18-1a. Prekursori alkaloida, tipovi i njihovo nalaženje.

Pored toga, kod nekih alkaloida (npr. steroidnih), azot dobijen iz glutamina ili nekog drugog  $\text{NH}_2$  izvora se inkorporira na kraju biosintetičkog puta, tj. skelet alkaloida ne potiče iz aminokiselina. Detaljn opis biosintetičkih puteva do danas je objašnjen samo za nekoliko alkaloida

Prekursor Amino kiselina	Tip alkaloida	Primeri struktura	Nalazenje
Antranilna kiselina	benzoksazinski	 dimboacridine	<i>Gramineae</i>
	akridonski	 akronicin	<i>Acronychia, Melicope, Rutaceae</i>
Triptofan	indolski	 fizostigmine	<i>Physostigma venenosum</i>
	$\beta$ -karbolinski	 harman	<i>Loganiaceae, Apocynaceae, Zygophyllaceae</i>
monoterpen indolski		 ajmalicine	<i>Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae</i>
hinolinski		 hinidine	<i>Cinchona, Camptotheca acuminata</i>

Slika 18-1b.

Prekursor Amino kiselina	Tip alkaloida	Primeri struktura	Nalazene
Fenilalanin/ Tirozin	amarilidinski		<i>Amaryllidaceae</i>
	benzilizohinolinski		<i>Papaveraceae,</i> <i>Apocynaceae</i>
	protoberberinski		<i>Berberidaceae,</i> <i>Papaveraceae</i>
	morfinski		<i>Papaveraceae</i>
	eritrinski		<i>Erythrina</i>

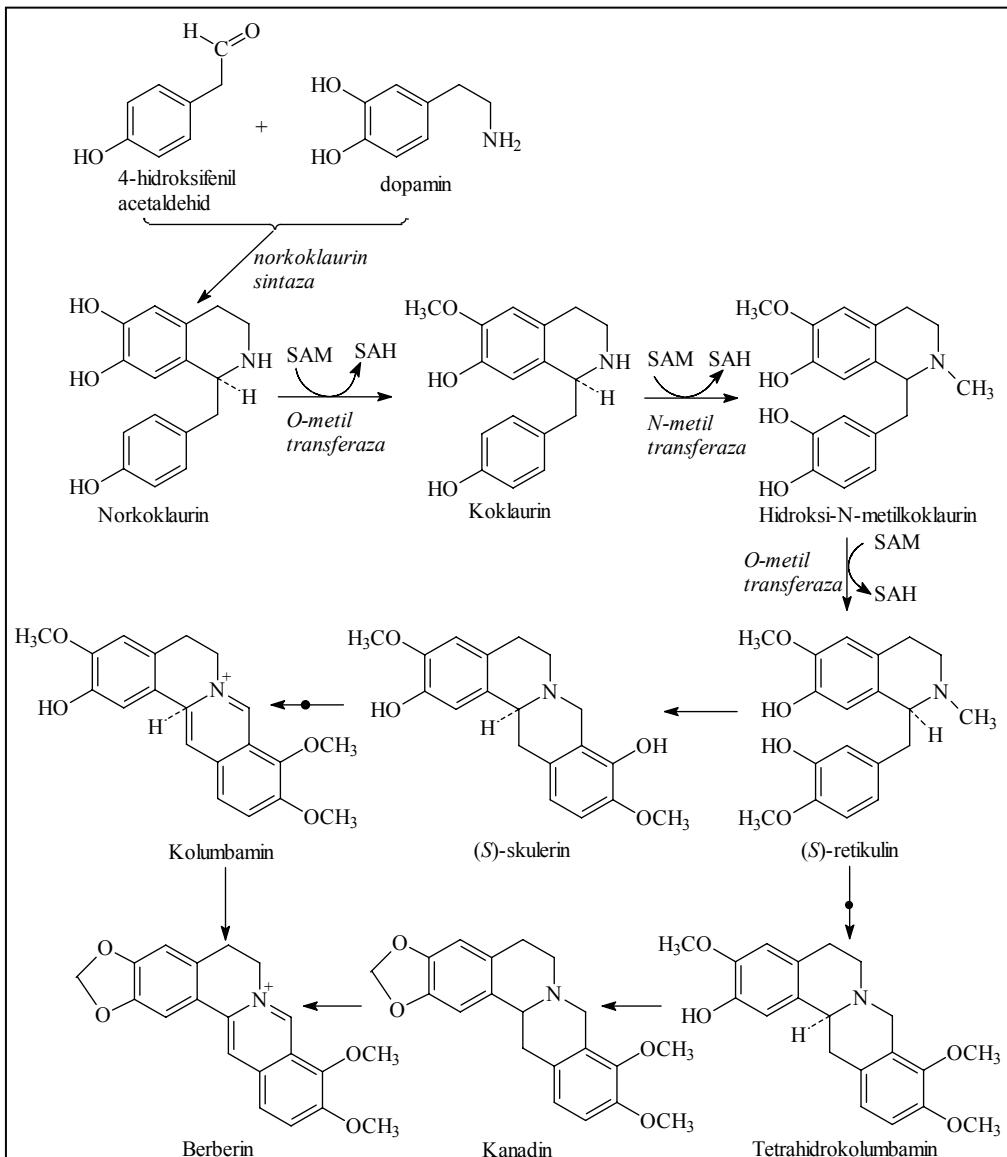
Slika 18-1c.

Prekursor Amino kiselina	Tip alkaloida	Primeri struktura	Nalazenje
Fenilalanin/ Tirozin	Feniletil- izohinolinski	<p>kolhicin</p>	<i>Colchicum,</i> <i>Gloriosa superba</i>
	betacijaninski/ betaksantinski	<p>gljive</p>	
steroidni	betanidin	<p><i>Solanum, Veratrum</i></p> <p>tomatin</p>	

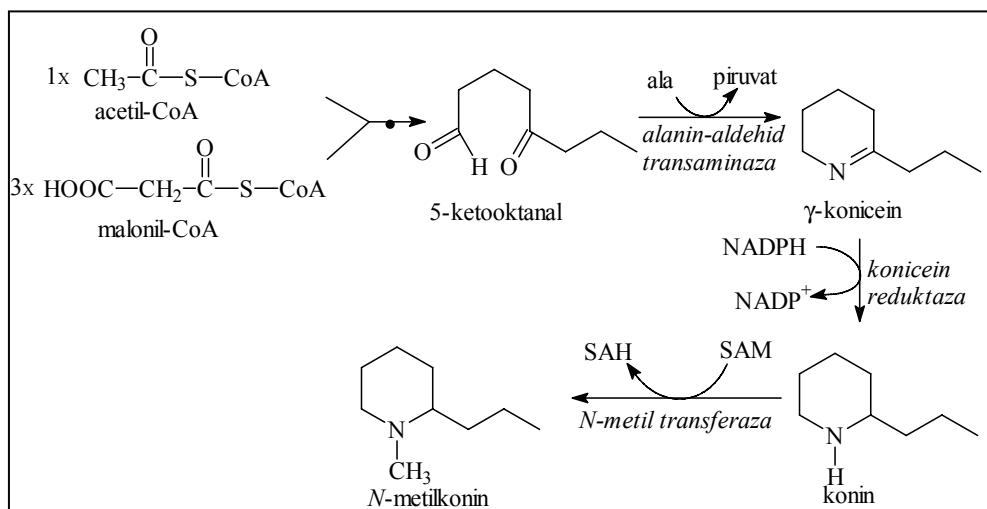
Slika 18-1d.

Kod većine drugih slučajeva, putevi se baziraju na "inteligentnoj pretpostavci" i nekim preliminarnim eksperimentima sa prekursorima. Ovi eksperimenti često uključuju ishranu intaktnih biljaka, ili u novije vreme kultura ćelija i tkiva, sa radioaktivno obeleženim markerima ( $^3\text{H}$  ili  $^{14}\text{C}$ ). Nakon više časova, dana ili nedelja, alkaloidi se izoluju i određuje se da li i kako se prekursor inkorporirao pomoću metoda autoradiografije, scintilacionog brojanja, radio-TLC, -GLC ili -HPLC. U novije vreme, koriste se i ne-radioaktivni  $^{13}\text{C}$  prekursori. Upotreboom  $^{13}\text{C}$ -NMR moguće je pratiti inkorporaciju bilo kog ugljenikovog atoma. Drugi, mnogo zahtevniji pristup koji je objasnio veći broj biosintetičkih puteva, obuhvata izolaciju i karakterizaciju enzima koji katalizuju određene reakcije. U najnovije vreme, izolovani su prvi geni koji kodiraju enzime biosinteze alkaloida, kao što su triptofan dekarboksilaza, ornitin dekarboksilaza, striktozidin sintaza, enzim berberinskog mosta i hiosciamin-6 $\beta$ -hidroksilaza i niz drugih. Korišćenjem

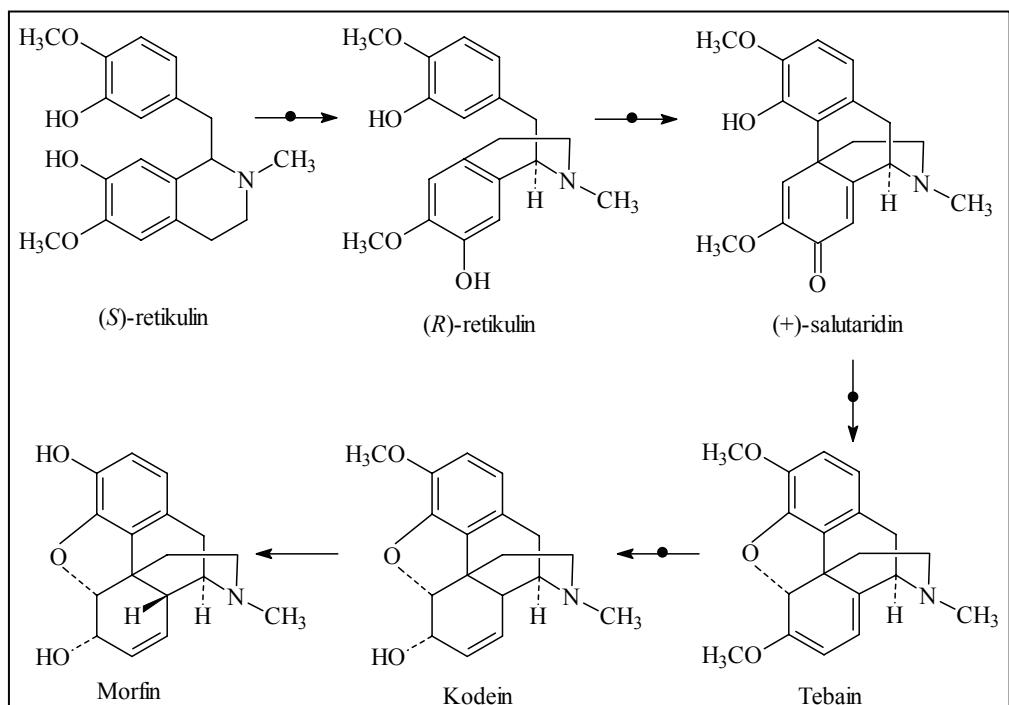
ovih enzima biće moguće uticati na metabolizam alkaloida u transgenim biljkama. Neki od biosintetičkih puteva koji su određeni na enzimskom nivou, a produkuju konin, morfin, berberin, ajmalicin i hiosciamin su primerima predstavljeni na slikama 18-2 do 18-6.



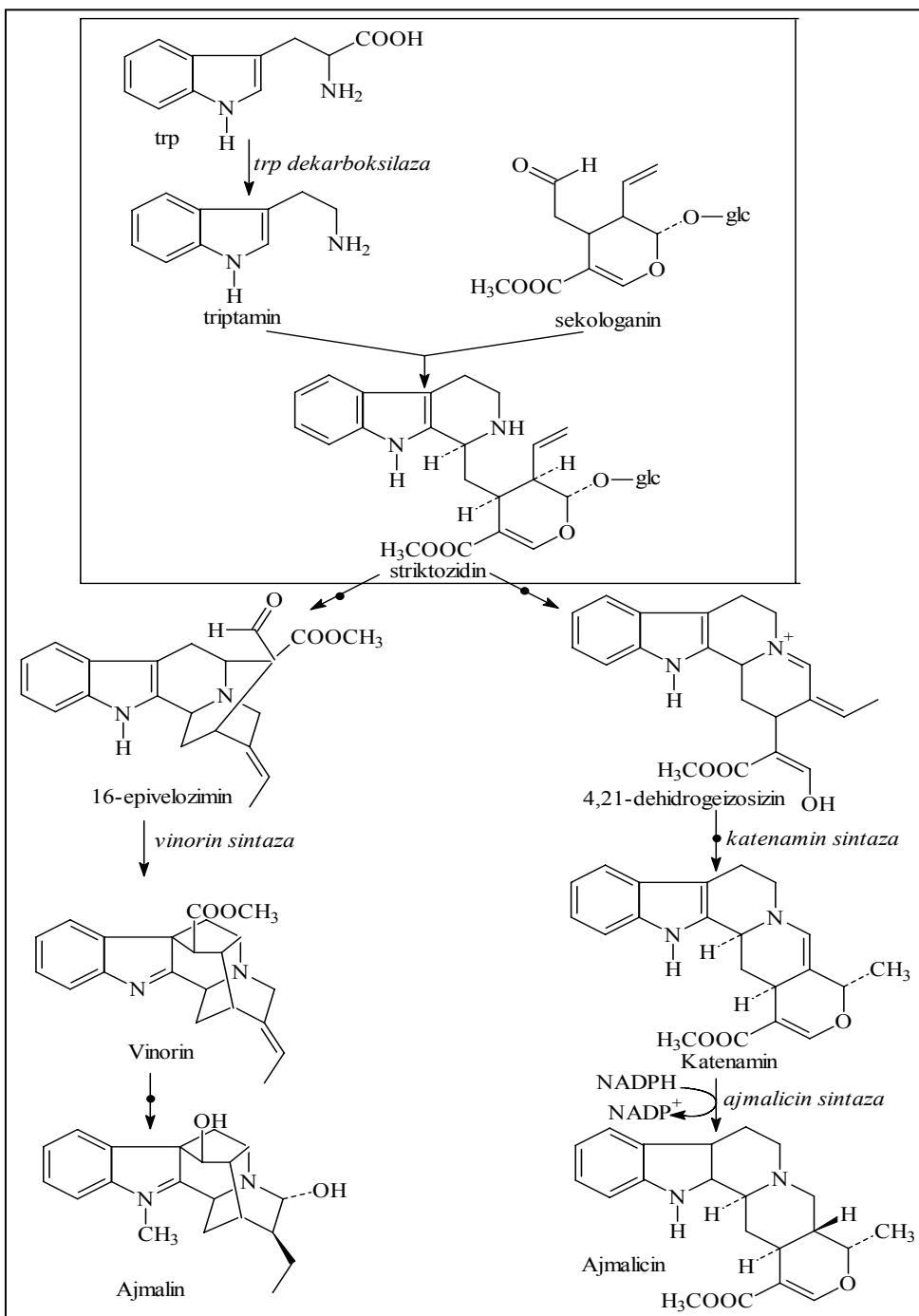
Slika 18-2. Biosinteza protoberberinskih alkaloida.



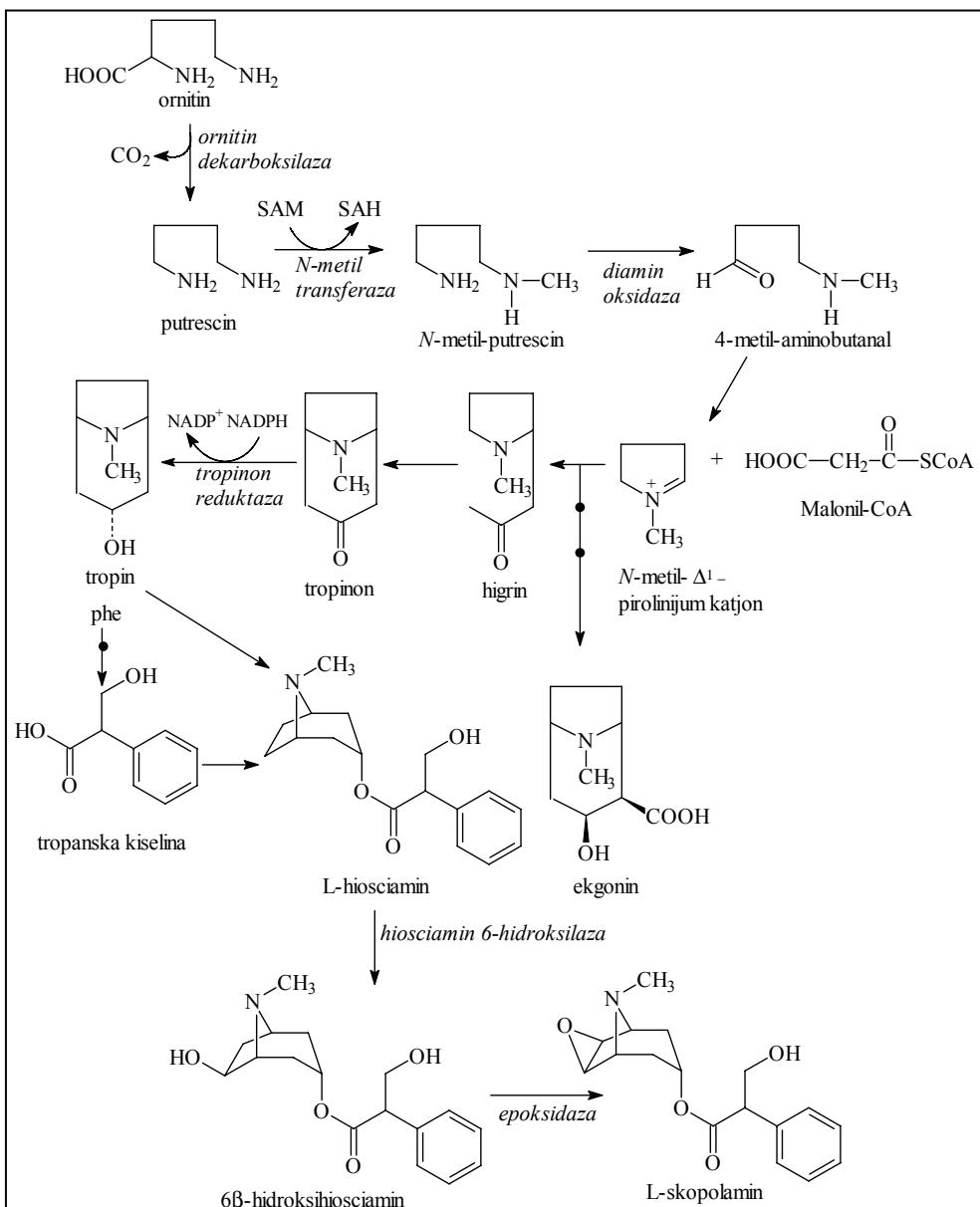
Slika 18-3. Biosinteza *Conium* alkaloida. Skraćenice: SAM , S-adenozil-L-metionin; SAH, S-adenozil-L-homocistein.



Slika 18-4. Biosinteza morfinanskih alkaloida.



Slika 18-5. Biosinteza monoterpen-indolskih alkaloida.



Slika 18-6. Biosinteza tropanskih alkaloida.

U navedenim biosintezama očigledno je da je put geneze bilo koje grupe alkaloida veoma kompleksan i uključuje serije enzima i intermedijera do krajnjeg proizvoda. Ovo je specifičnost biljne ćelije.

## 18.1.4. Akumulacija i skladištenje

Iako su egzaktna mesta sinteze alkaloida u biljnim ćelijama određena samo kod nekih vrsta, zna se pouzdano da najveći broj ovih jedinjenja nastaje u citoplazmi. U biosintezi berberina ključna mesta su vezikule vezane za membrane. Hloroplasti nisu samo mesta fotosinteze i za nju vezanih procesa, već i mesta različitih biosintetskih puteva, poput onih vezanih za metabolizam masnih kiselina i aminokiselina. Pored toga, hinolizidinski alkaloidi (HA) se sintetizuju u stromi hloroplasta, pri čemu su i alkaloidi i njihovi aminokiselinski prekursori locirani u istoj organeli. Sinteza HA je regulisana svetlošću i pokazuje dnevni ritam. Regulacija svetlošću najverovatnije potiče od 1) raspoloživosti u lizinu (on takođe nastaje tokom dana), 2) promeni u koncentraciji vodoničnih jona u stromi na pH 8 (enzimi sinteze HA imaju pH optimum 8), i 3) redukciji HA enzima pomoću tioredoksina (redukovani tioredoksin nastaje u uslovima iluminacije).

Alkaloidi ne nastaju u međućelijskom prostoru niti u vakuolama. Ipak, čini se da vakuole funkcionišu kao glavna organela za skladištenje alkaloida (tabela 18-1).

Tabela 18-1. Skladištenje alkaloida u vakuolama.

Alkaloid	Biljni rod
<b>Lisne vakuole:</b>	
Lupanin	<i>Lupinus</i>
Spartein	<i>Cytisus, Lupinus</i>
Hiosciamin	<i>Atropa</i>
Nikotin	<i>Nicotiana</i>
S-skulerin, S-retikulin	<i>Fumaria</i>
Betalaini	<i>Beta, Chenopodium</i>
Kapsaicin	<i>Capsicum</i>
<b>Lateks vezikula:</b>	
Sangvinarin	<i>Chelidonium</i>
Berberin	<i>Chelidonium</i>
Morfin	<i>Papaver</i>

Mnoge biljke proizvode lateks, koji osim što ima lepljiva svojstva, često sadrži odbrambena hemijska jedinjenja kao što su alkaloidi (morfin i njemu povezane benzilizohinolinske alkalioide kod *Papaveraceae*; protoberberin i benzofenantridinske alkalioide u *Chelidonium*; lobelin i druge piperidinske alkalioide u *Lobelia*) i terpenoidi (npr. forbolestrin). Alkaloidi su selektivno izdvojeni u male lateks vezikule (prečnika  $<1 \mu\text{m}$ ) i dosežu lokalnu koncentraciju do 1 mol.

Neki alkaloidi nastaju u svim biljnim organima ali češći je slučaj da su mesta nastanka alkaloida vezana specifično za određene organe ili tkiva. S obzirom da se kod eukariota regulacija većine gena odvija na *ćelija*-, *tkivo*-, *organ*-specifičan način, ni geni sinteze alkaloida nisu izuzetak, pri čemu su odgovarajući promotori regulisani odgovarajućim regulatornim proteinima. Ovi zaključci su značajni za interpretaciju rezultata dobijenih u suspenziji kulture ćelija. Dok je sinteza alkaloida aktivna u diferenciranim sistemima (kulture korena i izdanka), u neizdiferenciranim suspenzijama kulture ćelija ona je obično redukovana ili čak odsutna. Veruje se da je odgovarajući gen za alkaloid jednostavno “isključen”. Zbog toga je produkcija berberina i sangvinarina u kulturi ćelija pre izuzetak nego pravilo.

Alkaloidi se skladište najviše u tkivima koja su značajna za preživljavanje i reprodukciju, što uključuje mlada tkiva aktivnog rasta, koru korena i stabla, cvetove (naročito semena), klijance i fotosintetički aktivna tkiva. Sadržaj alkaloida u skladišnim organima može biti dosta visok, do 10% suve mase u nekim slučajevima, što je važno ako alkaloidi funkcionišu kao efektivne odbrambene supstance. U nekim zeljastim biljkama alkaloidi se skladište u epidermalnom i subepidermalnom tkivu (npr. kokain, kolhicin, akonitin, steroidni alkaloidi, nikotin, veratrin, buksin, konin) što je prvenstveno u funkciji odbijanja sitnih neprijatelja (insekata i mikroorganizama). U nekim biljkama koncentracija HA se kreće i do 200 mmol u epidermalnom tkivu, dok u mezofilnom tkivu doseže svega 5 mmol. Da bi dospeli do ovih mesta akumulacije alkaloidi se transportuju sa manjih i većih udaljenosti.

Neke biljke poseduju tipične ćelije za skladištenje alkaloida, tzv. idioblasti. Idioblasti su registrovani u rodovima *Corydalis* (za koridalin), *Sanguinaria* (za sangvinarin), *Ruta* (za rutakridonin), *Catharanthus* (za indolske alkaloide) i u *Macleaya* (za protopin).

Strukture alkaloida obično variraju između mesta sinteze i mesta njihove akumulacije, s obzirom da može doći do velikog broja sekundarnih supstitucija na mestima akumulacije. Alternativno, transport može biti i selektivan, distribucijom različitih smeša. Pored toga, profil alkaloida semena i kljianaca često se razlikuje od onog u odraslim biljkama. Vrste alkaloida i njihov sadržaj obično se menjaju tokom razvića biljaka i godišnjeg ciklusa. Uopšteno, koncentracija alkaloida se značajno smanjuje sa starošću tkiva pa tako u skinutim listovima alkaloidi mogu biti potpuno odsutni. U nekim biljkama koncentracija alkaloida se čak menja u toku dnevnog ciklusa (tabela 18-2). Na sintezu alkaloida i njihovo skladištenje mogu uticati stresni faktori spoljašnje sredine, poput ozleda i infekcija.

Tabela 18-2. Nastajanje alkaloida tokom dnevnog ciklusa.

<b>Alkaloidi</b>	<b>Maksimum sinteze alkaloida</b>	<b>Biljni izvor</b>
Hinolizidinski	rano podne i veče	<i>Lupinus, Cytisus, Baptisia,</i>
Tropanski	veče, ponoć	<i>Atropa</i>
Nikotinski	ponoć	<i>Nicotiana</i>
Morfinski	podne	<i>Papaver</i>

### 18.1.5. Transport

Određeni broj alkaloida se sintetizuje i skladišti u svim delovima biljaka, dok su drugi ograničeni na određene organe. Alkaloidi se mogu sintetizovati i zatim transportovati u mnoge organe udaljene od mesta sinteze. Ovo zahteva transport na veću udaljenost, obično putem simplasta i apoplasta. Ipak, čini se da je češći put transporta onaj preko floema i ksilema. O ovome postoji mali broj rezultata istraživanja pošto je teško tehnički izvesti uzorkovanje soka iz ksilema i floema.

Pored transporta na veću udaljenost, postoji i transport na malu udaljenost i intracelularni transport. Uopšteno, alkaloidi se sintetizuju u citosolu ili vezikulama vezanim za membrane (endoplazmatični retikulum, mitohondrije, hloroplasti), ali se akumuliraju i raspoređuju u vakuolama (tabela 18.1).

Nakupljanje velikih koncentracija alkaloida je preduslov njihove alelohemijske uloge kao odbrambenih jedinjenja. S obzirom da ove velike koncentracije mogu ometati normalni metabolizam, alelohemikalije se skladište na sigurnom, u vakuolama često specijalizovanih ćelija ili tkiva (kao što je epidermis). Vakuole ovih alkaloid-nakupljajućih ćelija nazvane su "toksične" ili "odbrambene" organele.

Skladištenje alkaloida u vakuolama ili vezikulama podrazumeva da oni moraju proći tonoplast i zatim se akumulirati unutar vakuole nasuprot gradijentu koncentracije. Za prolazak kroz tonoplast moguća su tri mehanizma: 1) prosta difuzija (odvija se u slučaju lipofilnih alkaloida, npr. nikotin, ajmalicin, vinblastin, kolhicin), 2) transport omogućen nosačem (u slučaju polarnih i alkaloida sa električnim nabojem, što je pravilo za većinu alkaloida u fiziološkim uslovima, npr. hiosciamin, luponin, retikulin, skulerin, senacionin) i 3) fuzija sa membranom (npr. berberin).

Kako su alkaloidi izolovani nasuprot gradijentu koncentracije u vakuolama ili lateks vezikulama, postavlja se pitanje pokretačke snage za povećanu akumulaciju. U nekim slučajevima, vezikule ili vakuole sadrže jedinjenja za vezivanje ili kompleksiranje alkaloida. Na primer, lateks vezikule *Chelidonium majus* sadrže 500-1200 mmol helidoninske kiseline koja vezuje ili kompleksira berberin i benzofenantridinske alkalioide. Može se eksperimentalno pokazati da helidoninska kiselina deluje kao vezujući agens koji uzrokuje očigledni transport naviše koji rezultira u koncentraciji alkaloida u vezikulama od 500-1200 mmol. Protonacija, organske kiseline ili specifični peptidi sačinjavaju druge vezujuće mehanizme.

Postoje dokazi da aminokiseline i neki joni se transportuju u vakuole pomoću transporteru koji se pokreću tzv. proton-supstrat antiport mehanizmom. Protoni se obogaćuju u vakuolama koje uopšteno imaju koncentraciju vodoničnih jona od 0.001-1 mmol (= pH 6-3) pomoću proton-translocirajućih ATP-aza i pirofosfataza. Analogno tome, pretpostavlja se da se transport alkaloida pomoću nosača postiže mehanizmom proton-alkaloid antiport.

### 18.1.6. Obnavljanje alkaloida

Alkaloidi nisu krajnji proizvodi metabolizma ali se mogu degradirati što se čini verovatnim s obzirom da je azot ograničavajući nutrijent za biljke. Alkaloidi uskladišteni u semenu delimično degradiraju tokom klijanja i nicanja i azot iz njih se verovatno koristi u sintezi aminokiselina. Degradativni put još nije u potpunosti objasnjen. Pored ovog vida reciklacije vezanog za razvojne procese biljaka, ustanovljeno je da se jedan broj alkaloida neprestano metabolički "obnavlja" (engl. "turn over"), sa periodom polu-života između 2 i 48 h. Primeri za ovo su nikotin, HA i tropanski alkaloidi. "Turn over" alkaloida je često veoma značajan u kulturama ćelija: kultura *Lupinus* kalusa je čak sposobna da živi na hinolizidinskom alakloidu sparteinu kao jedinom izvoru azota više od šest meseci. Kako objasniti ovaj fenomen? Velik broj alkaloida su alelohemikalije i deluju na molekule, npr. receptore neurotransmitera (tropanski alkaloidi, nikotin itd.). Zbog ovih interakcija neophodna je odgovarajuća stereohemijska konfiguracija. Pošto alkaloidi mogu sponatno da oksiduju ili racemizuju – i time izgube svoju aktivnost, neophodan je konstantan "turn over" i kontinuirana produkcija alkaloida kojom se obezbeđuje stalno prisustvo i raspoloživost dovoljnih koncentracija aktivne supstance, slično situaciji kao kod "turn over" proteina.

## 18.1.7. Funkcija

Kao što je navedeno, biologija alkaloida je usko povezana sa osnovnom fiziologijom biljaka. Mnoga od navedenih svojstava ne bi imala smisla ako ova jedinjenja ne bi posedovala životne funkcije za svog proizvođača. Glavna uloga alkaloida je u hemijskoj odbrani od biljojeda (i to od insekata, drugih artropoda i kičmenjaka) što se vidi iz činjenice da mnogi alkaloidi imaju visok afinitet za receptore neurotransmitera koji su prisutni samo u životinjama. U nekim slučajevima, alkaloidi igraju dodatnu ulogu u odbrani od mikroorganizama (bakterija, gljiva i virusa) pa čak i u interakcijama između samih biljaka (alelopatija).

Alkaloidi su svakako jedinjenja sa mnogo svrha, i oni, u zavisnosti od situacije, mogu biti aktivni u više od jedne interakcije sa spoljašnjom sredinom. Na primer, HA su najvažnije odbrambene supstance u leguminozama protiv insekata i drugih biljojeda, ali oni takodje utiču i na bakterije, gljive, virusе i čak na klijanje drugih biljaka. Pored toga, koriste se i kao degradabilna jedinjenja za transport i skladištenje azota.

Alkaloidi odbijaju ili odvraćaju mnoge životinje od hranjenja i ako se unesu u organizam su toksični. Za ljude i druge kičmenjake mnogi imaju gorak ili opor ukus. Uobičajeni vidljivi efekat intoksikacije alkaloidima kod mikroorganizama i drugih biljaka je redukcija porasta. Iako sva jedinjenja nisu detaljno istražena, ustanovljen je veoma veliki broj ćelijskih i molekulskih komponenti koje alkaloidi selektivno inhibiraju ili moduliraju. Kao posledica ovih interakcija, loš rad organa (srca, pluća, jetre, bubrega, CNS) može rezultirati u smanjenju reprodukcije i fertilitetu kod životinja i drugih organizama, ili ih jednostavno ubiti.

Tokom evolucije, mnogi alkaloidi su počeli da se upotrebljavaju u humanoj medicin kao lekovi. Korišćenjem u netoksičnim koncentracijama, ove alelohemikalije mogu imati pozitivan efekat.

Tabela 18-3. Stimulacija sinteze nekih alkaloida izazvana ozledom tkiva ili napadom mikroba kao izazivača.

Alkaloid	Izazivači	Biljni materijal
Ajmalicin	gljive	kultura ćelije <i>Catharanthus</i>
Kantin-6-on	kvasci/gljive	kultura ćelije <i>Ailanthus</i>
Hiosciamin	ozleda	biljke <i>Atropa</i>
Liriodenin	ozleda	biljke <i>Liriodendron</i>
Metilksantini	NaCl	kultura ćelije <i>Coffea</i>
Nikotin	ozleda	biljke <i>Nicotiana</i>

Da bi imali efekta, alkaloidi moraju biti prisutni u pravo vreme, na pravom mestu i u odgovarajućoj koncentraciji. Čini se da su metabolizam i biohemija alkaloida optimizovani i koordinirani u većini sistema kako bi mogli da ispune ove potrebe. Interesantna promena se može videti u nekim biljkama nakon ranjavanja ili napada mikroba. Primeri su dati u tabeli 18-3.

Tada dolazi do povećane sinteze alkaloida, odn. u slučajevima opasnosti je produkcija odbrambenih jedinjenja stimulisana.

Koliko je efikasna odbrana alkaloidima? U lupini, koja inače proizvodi visoke koncentracije HA, odabrani su mutanti koji akumuliraju alkaloide samo u tragovima. Zatim su oba varijeteta lupine, i onaj sa velikim i onaj sa malim sadržajem alkaloida, posejani na otvorenom, bez zaštite. Dok je lupina sa malim sadržajem bila u potpunosti prihvatljiva za biljojede i štetočine kao hranivo, ona sa velikim sadržajem alkaloida ostala je gotovo netaknuta (tabela 18-4.). Iako je potrebno još eksperimentalnih podataka, čini se da je odbrambena uloga alkaloida nesumnjiva.

Tabela 18-4. Biljojedi gorkih i slatkih lupina.

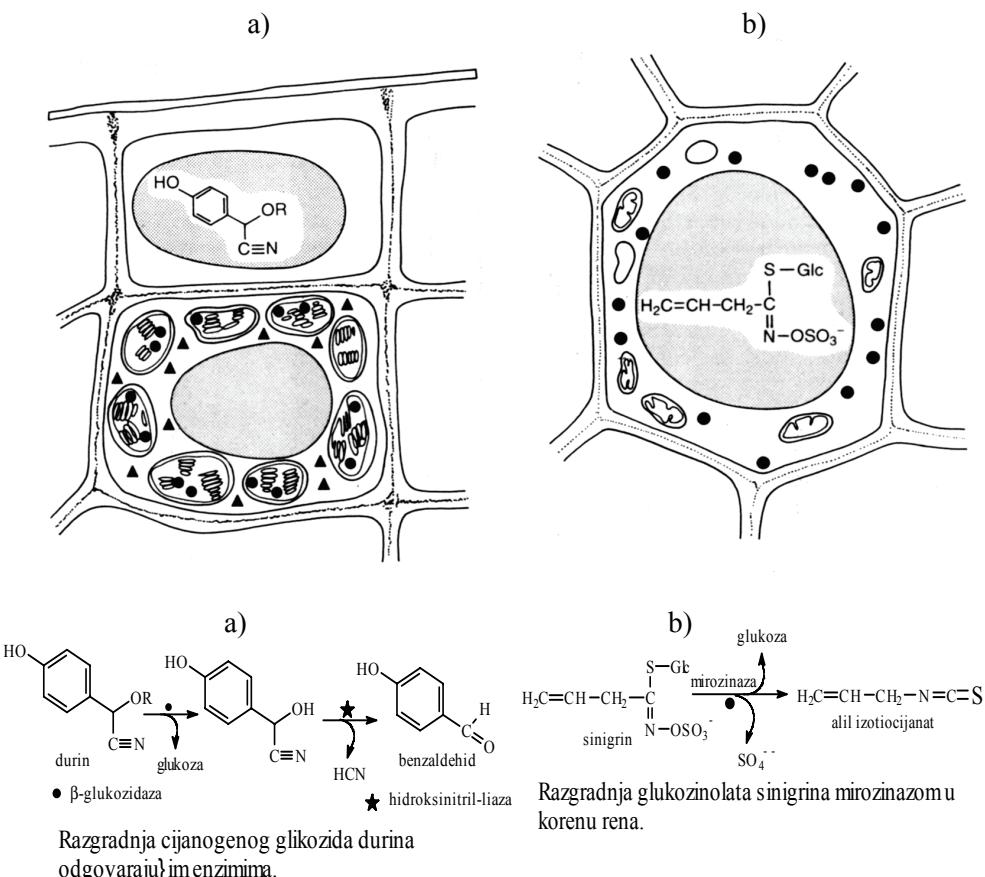
Vrsta lupine	Biljojedi	Sadržaj alkaloida <sup>a</sup>	% pojedene biljne hrane
<i>Lupinus albus</i>	zečevi	visok nizak	0-5% 100%
	lisne vaši	visok nizak	0% 100%
	insekti	visok nizak	0% 100%

<sup>a</sup>Visok sadržaj = 1-3 mg HA/g sveže mase; nizak sadržaj = < 0,1 mg/g sveže mase. <sup>b</sup> M. albifrons specifično akumulira HA i koristi ih u odbrani protiv predadora.

Ipak, nijedna odbrana nije apsolutna. Iako hemijska odbrana deluje na većinu potencijalnih neprijatelja, obično postoje i specijalizovani izuzeci nastali tokom evolucije koji su se specijalizovali za zaštitu od toksina. Ovaj fenomen se najbolje vidi kod onih insekata koji su visoko specifični prema biljci domaćinu. Neki od ovih insekata usvajaju ishranom alkaloida, skladiše ih, i koriste za svoju sopstvenu zaštitu ili zaštitu svog potomstva. Drugi pak dodatno transformišu alkaloide u feromone ili ih koriste kao morfogene. Poznati su dobro proučeni primeri kod pirolizidinskih i hinolizidinskih alkaloida.

## 18.2. Cijanogeni glikozidi i glukozinolati

Obe grupe sekundarnih metabolita sa azotom (N) se odlikuju brojnim neobičnim karakteristikama. U osnovi nastaju iz aminokiselina kao prekursora i kao glikozidi se skladište u vakuolama. Oni funkcionišu kao "prefabrikovane" zaštitne komponente koje se aktiviraju  $\beta$ -glukozidazom u kom slučaju se obrazuje strašno toksičan cijanid iz cijanogena ili izotiocijanat iz glukozinolata (slika 18-7).



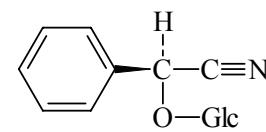
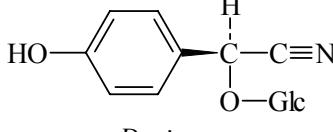
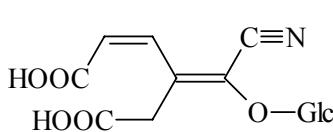
Slika 18-7.

Razlaganje cijanogenih glikozida (a) i glukozinolata (b) odgovarajućim enzimima:  
 $\beta$ -glukozidaza; hidroksinitril-liaza i mirozinaza.

## 18.2.1. Cijanogeni glikozidi

### a) Struktura i osobine cijanogenih glikozida

Cijanogeni glikozidi su derivati 2-hidroksinitrila koji su često oblika glikozida sa  $\beta$ -D-glukozom. Oni su optički aktivni molekuli sa hiralnim centrom na C-2 i mogu biti *S* ili *R*-konfiguracije (slika 18-8).

Cijanogeni glikozidi	Prekursor	Cijanogeni glikozidi	Prekursor
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}\equiv\text{N} \\   \\ \text{O}-\text{Glc} \\ \text{Linamarin} \end{array}$	valin	 <i>Prunasin</i>	fenilalanin
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}\equiv\text{N} \\   \\ \text{O}-\text{Glc} \\ \text{Lotaustralin} \end{array}$	izoleucin	 <i>Sambunigrin</i>	fenilalanin
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}\equiv\text{N} \\   \\ \text{CH}_2 \\ \text{O}-\text{Glc} \\ \text{Proakakipetalin} \end{array}$	leucin	 <i>Durin</i>	tirozin
$\begin{array}{c} \text{HOCH}_2 \\   \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{C}\equiv\text{N} \\   \\ \text{O}-\text{Glc} \\ \text{Kardiospermin} \end{array}$	leucin	 <i>Triglochinin</i>	tirozin

Slika 18-8. Strukture nekih uobičajenih cijanogenih glikozida.

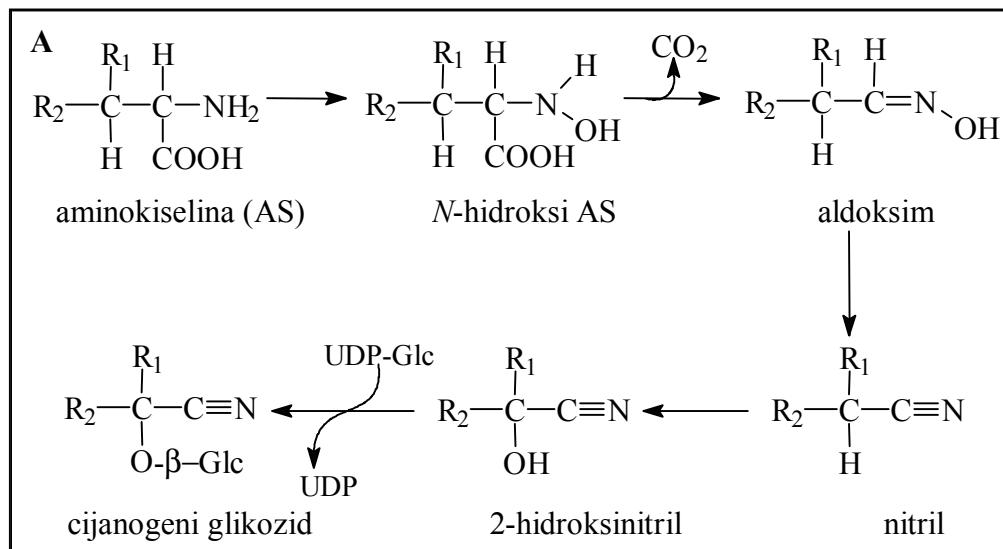
Poznato je 60 cijanogenih glikozida koji su široko distribuirani u mnogim biljkama, naročito u familijama *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Gramineae* i *Araceae*, kao i u nekim insektima npr. *Zigaenidae* (Lepidoptera) koji se hrane biljkama sa cijanogenima ali ih i sintetizuju. U nekim članovima *Sapindaceae* su opisani cijanolipidi i neke gljive i bakterije stvaraju HCN mehanizmima koji ne uključuju cijenogene i cijanilipide.

Cijanogeni glikozidi lako hidrolizuju u razblaženim kiselinama do nitrila koji se potom dalje razlažu do aldehida ili ketona i HCN.

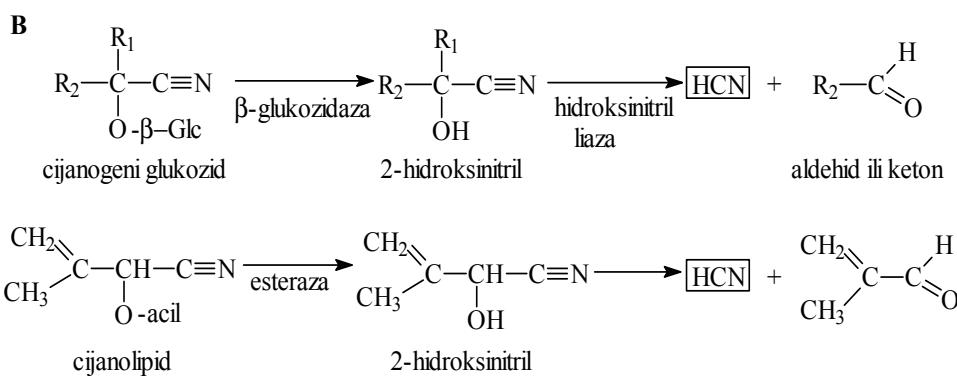
### b) Biosinteza i funkcija cijanogenih glikozida

Cijanogeni glikozidi su derivati L-aminokiseline koji nastaju u reakcijama katalizovanim multienzimskim kompleksom. Sama biosinteza teče u mikrozomima i čini se da je kanalisan proces. U prvoj fazi reakcije amino grupa L-aminokiseline se hidroksiluje enzimom N-monoooksigenazom. Nakon oksidativne dekarboksilacije N-hidroksil-L-aminokiselina se prevodi u aldoksim. Stepen od aldoksima do nitrila je katalizovan aldoksim dehidratazom. Nitril se tada hidrolizuje u CO<sub>2</sub> pomoću nitril monoooksigenaze stvarajući ključni intermedijer 2-hidroksinitril (ili cijanohidrin). Glukoziltransferaza formira β-glukozid koristeći aktiviranu glukozu, kao UDP-glukuzu.

U slučaju opasnosti, kada su biljke napadnute biljojedima ili drugim organizmima kompartimenti ćelije se razgrađuju i cijanogeni glikozidi dolaze u kontakt sa aktivnom β-glikozidazom koja iste hidrolizuje stvarajući 2-hidroksinitril (cijanohidrin) (slika 18-7 i 18-9a i b).



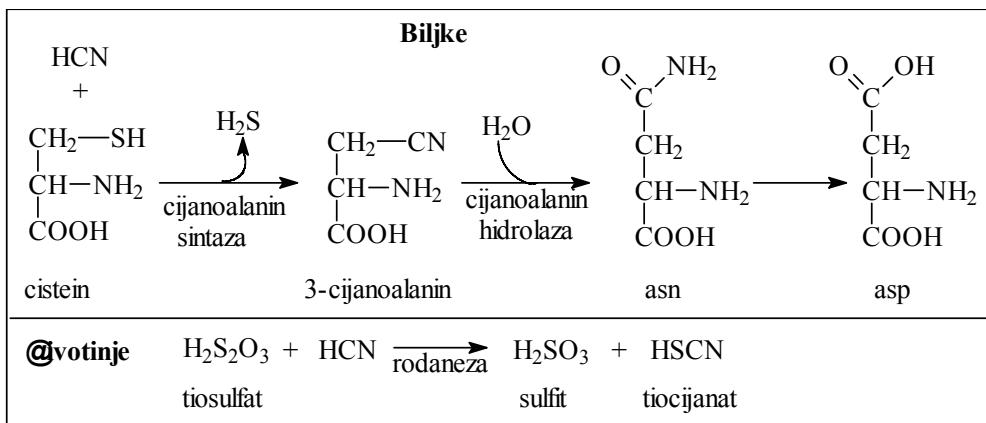
Slika 18-9a. Biosinteza i aktivacija u odbrani (degradacija) cijanogena:  
**(a)** biosinteza cijanogenih glikozida.



Slika 18-9b. Biosinteza i aktivacija u odbrani (degradacija) cijanogena:  
(b) aktivacija cijanogena

Ovaj potom se razgrađuje dalje do odgovarajućeg aldehida ili ketona i HCN pomoću hidroksinitril-liaze. U cijanolipidima masna kiselina se hidrolizuje esterazom do 2-hidroksinitrila i odgovarajućeg aldehida i HCN (slika 18-9b).

HCN je visoko toksičan za životinje i mikroorganizme jer inhibira enzime respiratornog lanca (npr. citohrom oksidaze) i veže se za druge enzime koji sadrže jone teških metala. Letalna doza HCN za čoveka i životinje je 0,5-3,5 mg/kg, a nakon oralne upotrebe konzumiranjem biljaka sa cijanogenim glikozidima koji sadrže do 500 mg HCN /100 g semena dolazi do smrti. Životinje mogu brzo detoksificirati male količine HCN pomoću rodenaze (slika 18-10).



Slika 18-10. Detoksifikacija HCN u biljkama i životinjama.

Isto tako brojne herbivore kako je saopšteno (Seigler, 1991) odolevaju niskim koncentracijama HCN. Ipak cijanogeni se mogu smatrati zaštitnim hemijskim komponentama.

Cijanogeni glikozidi nastaju u citoplazmi, a skladište se u centralne vakuole. U listovima *Sorghum*-a skladište se u specifičnim tkivima, a potom premeštaju u epidermalne vakuole (slika 18-7a). Odgovarajuća  $\beta$ -glukozidaza i hidroksinitril liaza prisutne u okolnim mezofilnim ćelijama slobodno "putuju" do cijanogenih glikozida. Tako u prostoru uređeni, cijanogeni glikozidi zauzimaju strateški favorizovan položaj i pošto epidermalna tkiva budu napadnuta malim herbivorama ili mikroorganizmima mogu biti brzo aktivirani. Budući da se HCN ne može skladištiti u biljkama kao slobodna cijanovodonična kiselina to je njeno akumuliranje odbrambene hemikalije genijalno rešenje. Pošto su cijanogeni glikozidi polarne supstance oni ne mogu prolaziti kroz biomembrane prostom difuzijom kao što je tonoplast vakuola. Pošto eksperimentom nije dokazano postojanje "posrednika" u transportu cijanogena verovatnija je olakšana izmena iz citoplazme u vakuole.

Osim njihove uloge kao respiratornih otrova cijanogeni glikozidi kao takvi ili kao odgovarajući aldehidi ili ketoni su često i repellenti (imaju efekat odvraćanja). Dodatno oni mogu služiti kao rezervni izvori azota u nekim biljkama, slično neproteinskim aminokiselinama ili nekim alkalijama. Cijanogeni glikozidi nisu krajnji proizvodi metabolizma već se podvrgavaju obrtu (eng. turnover), zbog čega je postignuta ravnoteža u brzini akumulacije, biosinteze i razgradnje. Očigledno da  $\beta$ -glukozidaza nije neminovno uključena u cijanogenezu i njena uloga u nekim biljkama je limitirana.

HCN je takođe veoma toksičan za biljke koje ga sintetizuju. Zaštita od autotoksičnosti je u postojanju puta detoksikacije koji uključuje kondenzaciju HCN sa L-cisteinom proizvodeći 3-cijanoalanin pomoću  $\beta$ -cijanoalanin sintaze PALP-zavisnog enzima (slika 18-10). Cijanoalanin hidrolizuje pomoću  $\beta$ -cijanoalanin hidrolaze do L-asparagina (asn).

## 18.2.2. Glukozinolati

Glukozinolati su veoma slični cijanogenima u mnogim osobinama ali sadrže sumpor kao dodatni atom, zbog čega se mogu klasifikovati i kao tioglukozidi. Kada hidrolizuju glukozinolati oslobođaju D-glukozu, sulfat i nestabilan aglikon, koji može obrazovati izotiocijanat (obično nazvan "senf ulje") kao glavni proizvod pod određenim uslovima, ili tiocijanat, nitril ili cijano-epitioalkan. Izotiocijanati su odgovorni za karakterističan ljut ukus senfa i rena.

### a) Struktura i osobine glukozinolata

Više od 80 strukturno različitih glukozinolata je nadeno u višim dikotiledonim biljkama (slika 18-11), u redu Capparales, koji uključuje familije *Capparidaceae*, *Cruciferae*, *Resedaceae*, *Moringaceae* i druge.

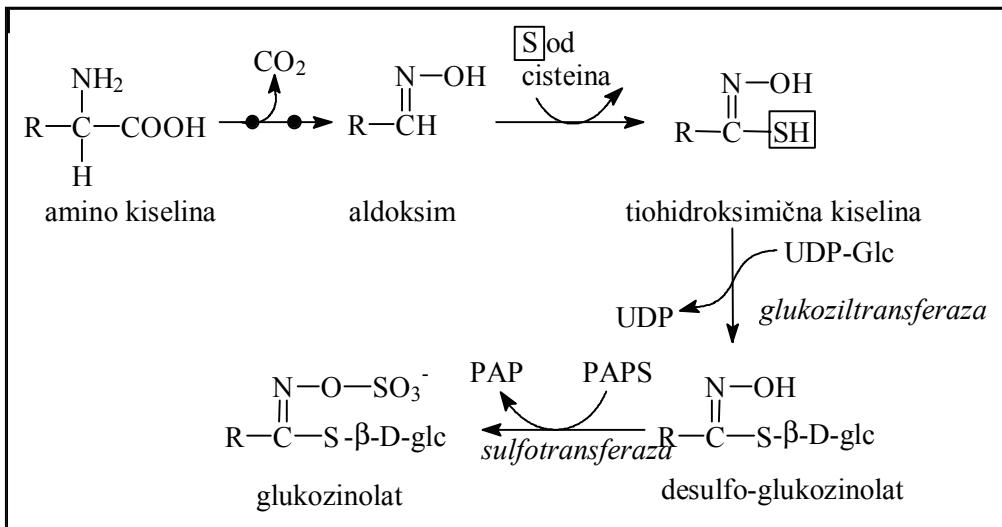
Glukozinolati (GS)	Izotiocijanati (itc)
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}(\text{S-Glc})=\text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \\ \text{glukokaparin} (= \text{metil-GS}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{N}=\text{C}=\text{S} \\ \text{metil-itc} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{S-Glc})=\text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \\ \text{sinigrin} (= \text{alil-GS}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S} \\ \text{alil-itc} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{S}-\text{(CH}_2)_3-\text{C}(\text{S-Glc})=\text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \\ \text{glukoibervirin} (= 3\text{-metiltiopropil-GS}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{S}-\text{(CH}_2)_3-\text{N}=\text{C}=\text{S} \\ 3\text{-metiltiopropil-itc} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C}(\text{S-Glc})=\text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \\ \text{glukotropeolin} (= \text{benzil-GS}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S} \\ \text{benzil-itc} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}(\text{S-Glc})=\text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \\ \text{sinalbin} (= 4\text{-hidroksibenziel-GS}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S} \\ 4\text{-hidroksibenziel-itc} \end{array}$

Slika 18-11. Strukture nekih glukozinolata i odgovarajućih izotiocijanata.

Glukozinolati su polarni molekuli koji se formiraju u citoplazmi, a skladište u vakuolama kao što je ilustrovano za ren (slika 18-7b). Oni su prilično stabilni na neutralnim pH vrednostima i nalaze se u obliku soli sa katjonima kao što je  $\text{K}^+$ . Svi delovi biljaka mogu akumulirati glukozinolate, ali seme i koren su naročito bogati ovim alelohemikalijama. Koncentracije su obično 0,1-0,2% u svežem listu, do 0,8% u korenju i do 8% u semenu.

### b) Biosinteza i funkcija glukozinolata

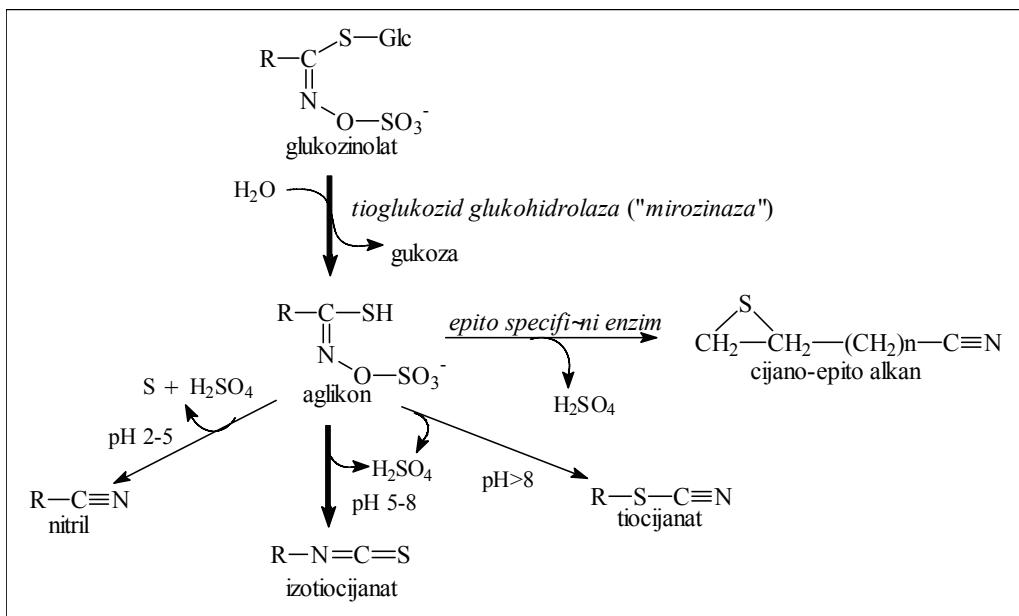
Obe proteinske i neproteinske aminokiseline služe kao prekursori u biosintези glukozinolata. Put vidi do odgovarajućeg aldoksima što je analogno putu biosinteze cijanogena (slika 18-12).



Slika 18-12. putevi biosinteze glukozinolata.

Aldoksim se konvertuje u tiohidroksimičnu kiselinu koja je ključni intermedijer koristeći L-cistein kao izvor sumpora. Tioglukozid nastaje u sledećem stepenu uz pomoć UDP-glukozo: tiohidroksimat glukoziltransferaze. Transfer sulfatne grupe je katalizovan sulfotransferazom koristeći fosfoadenozin-fosfatosulfat (PAPS) kao aktivni donor sulfata. Glukozinolati se dalje mogu modifikovati raznim hidroksilacijama, oksidacijama i drugim supstitucijama, kao što je npr. izvođenje sinigrina iz glukoibervirina.

Sve biljke iz kojih su izolovani glukozinolati poseduju enzim tioglukozid glukohidrolazu (poznatija kao mirozinaza, molske mase 125-150 KDa) koji može hidrolizovati glukozinolate do D-dlukoze i odgovarajućeg aglikona koji se potom spontano reanžira do izotiocianata. Ove hidrolaze koje mogu biti aktivirane askorbinskom kiselinom, se skladište daleko od vakuole u ćelijskom zidu i u endoplazmatičnom retikulumu, Goldžijevim vezikulama i mitohondrijama. Kod tkiva u raspadanju ili ćelija sa membranama povećane permeabilnosti, enzim i njegov supstrat obično zajedno oslobadaju ljut, repelentan (onaj koji odvraća) i antibiotični izotiocianat. Zavisno od uslova sredine, enzima i drugih prisutnih komponenata, aglikon se može reanžirati (preuređeni) do izotiocianata kao glavnog proizvida, ili do nitrila, tiocianata ili cijano-epitioalkana, ili oksazolin-2-tiona (slika 18-13).



Slika 18-13. Degradacija glukozinolata.

Aklil-, alkenil-, metiltioalkil- i benzil-izotiocianat su lipofilne, (rastvorljivi u mastima) isparljive alelohemikalije sa ljutim mirisom i ukusom. 4-Hidroksibenzilij i metilsulfinil i metilsulfonilalkil-izo-tiocianat nisu isparljivi i nemaju ljut miris ali imaju inače slične osobine. Izocijanati lako prodiru kroz biološke membrane pri čemu izazivaju bolne iritacije u kontaktu sa epidermisom i sluznicom. Pored toga oni mogu uzrokovati bronhitis, upalu pluća, gastroenteritis, dijareju, poremećaj u funkciji rada srca i bubrega. Derivati oksazolidin-2-tiona, kao što su progoitrin, glukokonringin, glukobarbarin i glukosisimbrin, inhibiraju oksidaciju jodata u jod što dovodi do pojave gušavosti. Joni rodanida stupaju u interakcije sa raznim enzimima i takođe utiču na funkcije tiroidne žlezde. Izotiocianati su antibiotici; osim što čine bakterijske i glijivične ćelije propustljivim, oni mogu istovremeno reagovati i sa raznim ćelijskim komponentama.

Zato se glukozinolati mogu smatrati odbrambenim supstancama koje se aktiviraju u slučaju opasnisti. Imaju širok spektar aktivnosti i čine se važnim naročito u interakcijama biljka-biljojed, ali takođe i kod odnosa biljka-biljka i biljka-mikroorganizmi. Kao i u slučaju drugih aleojedinjenja i u slučaju glukozinolata došlo je do formiranja specijaliziranih organizama tokom evolucije koje privlače glukozinolati, ulja slaćice (gorušice). Čovek se može smatrati "zavisnim" od glikozinolata pošto koristi biljke koje ih sadrže, i to kao začine i kao hranu (npr. kupus, rotkvica, ren, slačica(senf) i dr).

## Izvod

♣ Do danas je poznato preko 13.000 sekundarnih metabolita koji sadrže azot. Kako je svega oko 10% biljaka analizirano modernim fotohemijskim tehnikama (HPLC, kapilarna GLC, masena spektrometrija, NMR),, može se sa sigurnošću pretpostaviti da je stvarni broj značajno veći. Osnovne grupe jedinjenja iz ove kategorije su alkaloidi, amini, neproteinske aminokiseline, cijanogeni glikozidi i glukozinolat.

♣ Mnoga prirodna jedinjenja sa azotom u prorodi su evoluirala u odbrambena jedinjenja koja deluju na određene molekule u životinjskim ćelijama, npr. na receptore neurotransmitera (nikotin, efedrin, ergot alkaloidi,  $\beta$ -karbonil alkaloidi). Da bi ispunili ovu funkciju, molekuli moraju biti sintetizovani u stereo-hemiji "ispravnoj" konfiguraciji. Zbog toga su u biosintezu alkaloida uključeni visoko-specifični enzimi.

♣ Do danas je opisano više od 12.000 struktura alkaloida, a njihova definicija se često menjala tokom godina. Isprva, ova klasa sekundarnih jedinjenja bila je ograničena samo na biljne baze sa heterocikličnim atomom azota u strukturi. Baze sa egzocikličnim azotom nazivane su "pseudoalkaloidi".

♣ Prisustvo alkaloida utvrđeno je u oko 15% biljaka, bakterija, gljiva, pa čak i životinja. U biljnom carstvu alkaloidi se sreću u primitivnim grupama kao što su *Lycopodium* ili *Equisetum*, u golosemenicama i skrivenosemenicama. U višim biljkama (angiosperme), neke familije sadrže veći broj alkaloidnih predstavnika nego druge

♣ Skelet većine alkaloida izведен je iz aminokiselina iako se često kombinuju i delovi struktura drugih biosintetičkih puteva, npr. terpenoida.

♣ Cijanogeni glikozidi su derivati 2-hidroksinitriла koji su često oblika glikozida sa  $\beta$ -D-glukozom. Oni su optički aktivni molekuli sa hiralnim centrom na C-2 i mogu biti *S* ili *R-konfiguracije*.

♣ Cijanogeni glikozidi su derivati L-aminokiselina koji nastaju u reakcijama katalizovanim multienzimskim kompleksom.

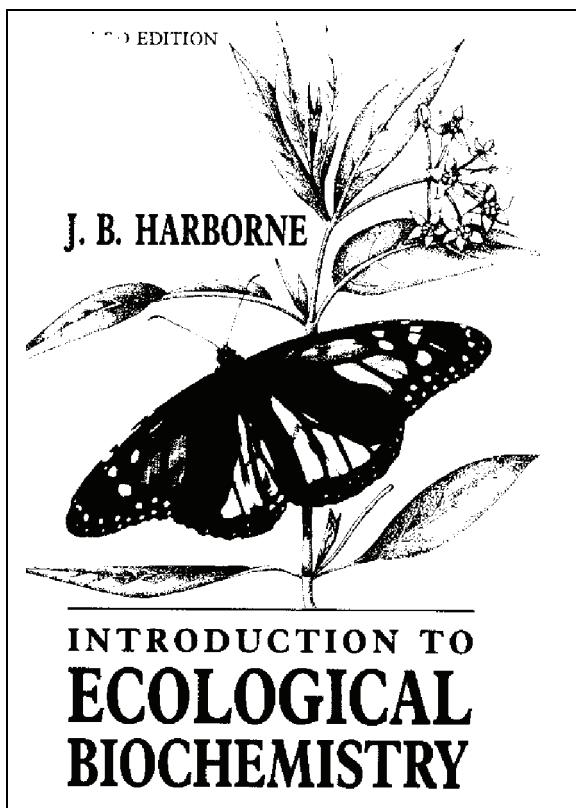
♣ Glukozinolati su veoma slični cijanogenima u mnogim osobinama ali sadrže sumpor kao dodatni atom, zbog čega se mogu klasifikovati i kao tioglukozidi.

♣ Obe proteinske i neproteinske aminokiseline služe kao prekursori u biosintezi glukozinolata. Put vidi do odgovarjućeg aldoksima što je analogno putu biosinteze cijanogena.

•

# 19.

## Biohemija ekologija biljaka



- 19.1. Odnos biljka-životna sredina
- 19.2. Reakcija biljaka u odnosu na biljojede: produkcija toksina
  - 19.2.1. Hemijska odbrana
  - 19.2.2. Biljni toksini
  - 19.2.3. Troškovi hemijske odbrane
- 19.3. Indukovani fitohemijski odgovor na biljojede
  - 19.3.1. Indukcija fitohemijskih supstanci u biljkama
  - 19.3.2. *De novo* sinteza inhibitora proteinaza
  - 19.3.3. Povećanje sinteze toksina
  - 19.3.4. Isparljiva jedinjenja koja privlače predatore biljojeda

*Biljka kao atraktant i/ili repelent*

Najveći broj biohemijских istraživanja odvija se na biljkama gajenim pod optimalnim uslovima, npr. u staklari. Čak i kada se ispituju biljke gajene u poljskim uslovima, one su najčešće dobro zaštićene od različitih oblika stresa. To podrazumeva zaštitu od neadekvatne ishrane (đubrenjem), suše (navodnjavanjem), bolesti, štetočina i drugih biljaka (prskanjem) kao i od sisara biljojeda (fizičkim preprekama). Ovo ne važi za samoniklo bilje. Prirodna vegetacija koja naseljava nekultivisane delove kopna mora da se bori za opstanak u prirodnom okruženju. Istorija evolucije biljnog carstva je istorija konstantnog prilagođavanja - adaptacije, na stresove iz spoljašnje sredine kao i na opasnost od životinja biljojeda. Ipak, uprkos ovakvim pritiscima spoljašnjeg okruženja, gotovo da nema staništa na Zemlji gde se biljke ne mogu sresti.

Razloge što su biljke ipak uspešno preživljavale tokom evolucije treba tražiti u njihovoј izuzetnoj fleksibilnosti da se prilagode velikoj raznolikosti sredine i uslova za život koji vladaju na ovoj planeti. Biljke su se prilagođavale putem promena u morfološkim i anatomske karakteristikama (npr. bodlje umesto listova u pustinjskim krajevima), pomoću fizioloških adaptacija (npr. smanjenje transpiracije u vreme najveće vrućine) ili na biohemijске načine. Poslednjih godina poklanja se sve veća pažnja i na načine biohemijskog prilagođavanja biljaka različitim spoljašnjim uslovima. Biohemijска adaptacija uključuje kako primarni tako i sekundarni metabolizam. Ona može biti fokusirana na faktore spoljašnje sredine (suša, mraz, salinitet, teški metali) ili na odnos biljaka prema drugim živim bićima, bez obzira da li su to bakterije, gljive, insekti, mekušci ili sisari biljojedi.

Istraživanje biohemijске adaptacije biljaka na ekološke faktore je osnovni predmet proučavanja biohemijске discipline "Ekološka biohemija", ili "Hemijska ekologija" kako se još često naziva.

## 19.1. Odnos biljka-životna sredina

U tabeli 19-1. navedeni su neki primeri biohemijске adaptacije biljaka na različite oblike stresa izazvanog različitim spoljašnjim uslovima. Svaka reakcija biljke uključuje jednu ili više promena u biohemiji biljne ćelije što može podrazumevati i razvoj nekog novog metaboličkog puta. Do ovoga dolazi u slučaju fotosintetičke adaptacije u uslovima tropske i suptropske klime, kada se aktivira Hatch-Slack-ov C<sub>4</sub> ciklus (put). Tada dolazi do nakupljanja metabolita male molekulske mase kojih inače ima samo u tragovima, iz pula ugljenih hidrata i aminokiselina. Primer za ovo je iminokiselina prolin do čije akumulacije dolazi u biljkama izloženim stresu suše i visokim koncentracijama soli. Ovo jedinjenje pokazuje zaštitno, tj. osmotsko dejstvo unutar biljne ćelije. Slično dejstvo pokazuje i zwitter-jonska supstanca glicin-betain, koja takodje nastaje u uslovima visokih koncentracija soli u zemljištu.

Tabela 19-1. Biohemski reakcije biljaka na različite stresne uslove.

Vrsta stresa	Biohemski odgovor
Visoke temperature (vlažni suptropski uslovi)	<i>Kratkoročno:</i> proteini toplotnog stresa; <i>dugoročno:</i> C <sub>4</sub> (Hatch-Slack) fotosinteza
Suša (puštinje)	Metabolizam krasulaceinske kiseline; povećana produkcija abscisinske kiseline; povećanje sadržaja prolina ili pinitola.
Niske temperature (arktička ili alpijska područja)	Nakupljanje šećera i/ili poliola; sinteza specijalnih vrsta proteina; povećanje udela nezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima hloroplasta.
Zaslanjenost (morska obala, slane močvare)	Nakupljanje citoplazmatskih osmolita (prolin, glicin-betaein).
Teški metali (zemljишta kontaminirana olovom, cinkom, niklom itd.)	Enzimske modifikacije na površini korena; vezivanje metala za mesta na ćelijskim zidovima korena; nakupljanje /detoksikacija pomoću peptidnih helata.

Druge reakcije na stresne uslove mogu biti i promene u nivou biljnih hormona. Naprimjer, u biljkama podvrgnutim uslovima suše, dolazi do povećanog nakupljanja abscisinske kiseline u zaštitnim ćelijama listova, sa ciljem da se zatvore stome i tako smanji gubitak vode transpiracijom. Umesto abscisinske kiseline, u nekim biljkama (npr. vinova loza) može doći do akumulacije nekih drugih jedinjenja, poput fazeinske kiseline.

Jedna od biohemskih promena je takođe i sinteza specijalnih vrsta proteina kao što su proteini toplotnog stresa i stresa izazvanog niskim temperaturama, koji se ne sreću u ne-stresiranim biljkama. Ovi proteini mogu imati posebnu ulogu u ograničavanju oštećenja u ćelijama ili njihovim membranama. U slučaju adaptacije na kontaminaciju teškim metalima u zemljишtu (cink, bakar, olov), biljke sintetizuju proteine ili peptide koji zahvaljujući prisustvu cisteina mogu da stvaraju helatne komplekse sa ovim metalima tzv. metalotionine.

Helatirajuću sposobnost takođe pokazuju i neke organske kiseline, poput limunske i oksalne kiseline.

Biohemiske reakcije biljaka se često nalaze u pozitivnoj korelaciji sa fiziološim ili anatomskim adaptacijama. Istovremeno, biohemski odgovor biljaka na stresne uslove može se porediti sa sličnim reakcijama u životinjama. Primer za ovo je sinteza proteina toplotnog stresa u uslovima blagog temperaturnog šoka, u roku od dva časa nakon šoka, što je zajedničko za mikroorganizme, životinje i biljke. Tako npr. u soji, predinkubacija biljaka na temperaturi od 40° C, štiti biljke soje od izlaganja temperaturi od 45° C u istom trajanju, što bi inače bilo letalno za njih. Poznate su dve grupe proteina toplotnog stresa, male i velike molekulske mase, i predstavnici obe grupe su prisutni u biljkama sve dok traju povećane spoljne tempreture. Ovi proteini se prenose kroz ćeliju do određenih mesta, npr. jedra, sa ciljem da omoguće neophodnu zaštitu od povećanja temperature. Ekološki značaj ovih proteinova u biljkama još nije u potpunosti razjašnjen ali je evidentno da su prisutni u pustinjskim biljkama omogućavajući im da podnesu visoke dnevne temperature.

Različitost u biohemskim odgovorima biljaka i životinja najbolje se uočava kada je u pitanju adaptacija na trovanje teškim metalima. Tako biljke vrše detoksifikaciju teških metala stvarajući helatne komplekse sa njima pomoću malih peptida nazvanih fitohelatini, čija je opšta formula: (glutamil-cisteinil)<sub>n</sub>, glicin, gde je  $n=2-8$ , i koji nastaju iz glutationa. Nasuprot tome, životinje smanjuju potencijalno otrovne koncentracije metala poput cinka, bakra ili olova time što ih helatiraju proteinima zvanim metalotioninima koji sadrže druge ostatke aminokiselina pored cisteina, glutaminske kiseline i glicina. Pored navedenog, treba imati u vidu da adaptacija biljaka takođe uključuje i sprečavanje metala da dospeju u biljku ili njihovo vezivanje za ćelijske zidove na površini korena.

Postoje razlike između samih biljaka u adaptivnom odgovoru na toksični nivo metala u zemljištu, kao i na vrstu teškog metala koji je prisutan. Jedan od primera adaptacije biljaka prirodnom selekcijom na visoke koncentracije toksičnih metala je vrsta trave, *Festuca ovina*. Ova biljka prekriva napuštena zemljišta rudnika olova i cinka već nakon nekoliko godina nakon završenih rudarskih radova. Ona se istovremeno sreće i na zemljištima koja prirodno sadrže neuobičajeno visoke koncentracije nekih drugih potencijalno toksičnih metala kao što su bakar, kadmijum i nikal. Biohemiska adaptacija ove vrste obuhvata spečavanje ulaska metala u biljku, njihovo vezivanje za ćelijske zidove ili, što je najčešći slučaj, helatiranjem katjona i njihovim transportom kroz biljku do odgovarajućih organela (npr. vakuole). Ove biljke-akumulatori su korisne kao indikatori prisustva teških metala u zemljištima. Tako npr. australijska vrsta *Hybanthus floribundus* je indikator za prisustvo nikla u zemljištu i može da akumulira ovaj metal do 22% suve mase.

Većina biljaka uginjava u uslovima uzgoja u prisustvu malih količina natrijum hlorida, dok neke vrste, nazvane halofite, rastu i razvijaju se na zaslanjenim staništima gde NaCl može biti prisutan i do 20% u zemljištu. Ovo se

postiže kontrolom usvajanja i transporta NaCl u biljci tako da ćelijski metabolizam nije ugrožen stresom. Osnovna adaptacija se ogleda u akumulaciji netoksičnih supstanci u citoplazmi kao što su prolin i glicin-betaein. Ovi molekuli pokazuju zaštitni efekat na osmotsku regulaciju uravnotežujući smanjeni vodni potencijal izazvan akumulacijom jona Na i Cl u vakuolama. Koncentracija citoplazmatskih osmolita u halofitama može biti dosta visok. Tako npr. u halofiti *Triglochin maritima*, čak 10-20% svog nadzemnog dela biljke sačinjava prolin, dok nivo glicin-betaaina u *Suaeda monoica* doseže 0.5 g u 10 g suve mase.

Poznata je korelacija između sadržaja masnih kiselina i otpornosti na niske temperature, tj. mržnjenje. Povećanje u odnosu nezasićenih prema zasićenim masnim kiselinama u membranskim lipidima povezano je sa stepenom tolerancije na mržnjenje u više dikotiledonih biljaka. Ovo povećanje je korisno za biljku s obzirom da se time povećava fluidnost membrane na nižim temperaturama. Ove su promene ograničene na frakcije fosfatidilglicerola u membranama hloroplasta. Biljke sa većim udedom *cis*-nezasićenih masnih kiselina (npr. linoleinska) kao što je spanać su otporne na mržnjenje, dok su vrste poput tikvice, koje sadrže samo mali ideo *cis*-nezasićenih kiselina, podložne mržnjenju. U monokotiledonim vrstama se sreće drugačiji sistem zaštite. U membranama hloroplasta u biljkama pšenice i raži otpornim na niske temperature, uočeno je povećanje sadržaja trans- $\Delta^3$ -heksadekanske kiseline. Ovakva zaštita hloroplasta omogućuje nastavak fotosinteze kada se spoljna temperatura poveća iznad tačke mržnjenja.

## 19.2. Reakcija biljaka u odnosu na biljojede: produkcija toksina

### 19.2.1. Hemjska odbrana

Uopšteno govoreći, biljke su otporne na biljojede (herbivore). Da nije tako, veoma mali broj biljnih vrsta bi danas postojao s obzirom na potencijal životinja za eksponencijalni rast populacije. Zelene biljke i dalje dominiraju Zemljom iako je poznata sposobnost životinja da se prejedaju i uništavaju biljke. Iz ovog proizilazi da se biljke u najvećoj meri ponašaju repellentno u odnosu na životinje kao njihova hrana, uprkos nutritivnih vrednosti, i stoga toksično u najširem smislu. I pored toga, postoji selektivna sposobnost fitofagnih insekata i životinja koja im omogućuje ograničenu ishranu biljkama.

Odrambeni mehanizmi biljaka su bazirani kako na fizičkim tako i na hemijskim faktorima. Mehanizmi fizičke odbrane protiv biljojeda podrazumevaju čvrst epidermis, naslage kutikule, bodlje, trnove i bodljikave dlake. Oblici odbrane kao u slučaju trava adaptiranih prema ispaši obuhvataju rastenje nisko, blizu zemlje

kao i vegetativnu reprodukciju ispod površine zemlje. Drveće u umerenom pojasu izbegava biljojede tako što formira većinu lisne mase izvan domaćaja biljojeda. Pored toga, hemijska odbrana je od velikog značaja i omogućena je toksinima i repellentnim supstancama koje stvara sama biljka. Ovi toksići imaju ključnu ulogu u zaštiti biljaka od preterane ispaše.

Raširena je zabluda da ljudi mogu konzumirati samonikle biljne vrste bez rizika. Mnoge "lekovite" biljke često sadrže opasne količine otrovnih agenasa; lišće gaveza (*Sympytum officinale*) na primer, sadrži pirolizidinske alkaloide koji su kumulativni otrovi jetre. Komparativna analiza sekundarnih biomolekula gajenih biljaka i njihovih divljih srodnika je pokazala u mnogim slučajevima da su toksični agensi ili eliminisani ili je njihova koncentracija smanjena u procesu domestikacije. Krompir je dobar primer gde su oplemenjivanje i selekcija uspešno eliminisali otrovne steroidne alkaloide iz tkiva krtole. Krtole divljih vrsta krompira su i dalje zadržale toksični nivo alkaloida, kao što je slučaj i sa lišćem, izdancima, cvetovima i plodovima kultivisanog krompira.

Smatra se da sve zelene biljke poseduju potencijal da budu toksične za biljojede zahvaljujući sekundarnim metabolitima koji se akumuliraju u njima. Toksičnost biljnih hemijskih supstanci je relativna, i zavisi od doze, vremenskog perioda unočenja, starosti i zdravstvenog stanja životinja, mehanizma apsorpcije i načina ekskrecije. Toksičnost biljaka se može prevazići indukovanjem detoksikujućih sistema unutar samih životinja, tako da i uslovno otrovne biljke mogu biti konzumirane od strane adaptiranog biljojeda.

Nisu svi biljni delovi obavezno toksični. Plodovi, po pravilu, ne sadrže toksine budući da imaju ulogu hrane za biljojede sa ciljem boljeg rasejavanja biljke. Ali čak i neki zreli plodovi mogu sadržati toksične supstance za neke biljojede. Prisustvo jedinjenja, kao što su hidrolizujući tanini u plodovima *Caesalpinia coriaria* odbija neodgovarajućeg raznosača semena od jedenja ploda. Nasuprot tkivu samog ploda, semena unutar ploda su obično zaštićena toksinima. Tako npr., seme gorkog badema sadrži letalne količine cijanogenog glikozida amigdalina. Obični badem kojeg koristimo u ishrani predstavlja mutanta dobijenog selekcijom, kojem nedostaje ovaj odbrambeni mehanizam.

## 19.2.2. Biljni toksini

Postoji veliki broj različitih biljnih toksina koji su do danas opisani (tabela 19-2). Najveći deo sačinjavaju sekundarni metaboliti. Neki toksini su opšteg karaktera dok su neki specifični samo za određene grupe biljojeda.

Tabela 19-2. Osnovne klase biljnih toksina.

Klase jedinjenja*	Primer	Toksičnost
Alkaloidi (10000)	senecionin, <i>Senecio jacobaea</i>	Kumulativni hepatotoksin goveda.
Kardenolidi (200)	ouabain, <i>Acokanthera ouabaio</i>	Srčani otrov
Cijanogeni glikozidi (60)	amigdalin, <i>Prunus amygdalus</i> (badem)	Univerzalni toksin
Furanokumarini (400)	ksantotoksin, <i>Pastinaca sativa</i> (paštrnak)	Toksičan za mukušce, alergen za čoveka.
Glukozinolati (150)	sinigrin,	Oštećuje tiroид, jetru i bubrege goveda.
Iridoidi (250)	<i>Brassica oleracea</i> (uljana repica) aukubin, <i>Aucuba japonica</i>	Toksičan za sisare, ptice i insekte.
Izoflavonoidi (1000)	rotenon, <i>Derris elliptica</i>	Insekticid i otrov za ribe.
Neproteinske aminokiseline (400)	β-cijanoalanin, seme <i>Vicia sativa</i>	Neurotoksin; LD <sub>50</sub> u miša je 13.4mk/kg.
Peptidi (50)		Toksičan za srčani mišić sisara.
Poliacetileni (650)	viskotoksin, bobice <i>Viscum album</i>	Toksičan za ovce i goveda.
Proteini (100)	oenantetoksin, koren <i>Oenanthe crocata</i>	Letalna doza za čoveka 0.5 mg.
Hinoni (800)	abrin, seme <i>Abrus precatorius</i>	Izaziva ekcem lica kod ovaca.
Saponini (600)	hipericin, <i>H. perforatum</i> (list kantariona)	Toksičan za puževe.
Seskviterpenski laktoni (3000)	lematoksin, <i>Phytolacca dodecandra</i>	
	himenoksin, <i>Hymenoxys odorata</i>	Stočni otrov

\* Približan broj poznatih struktura dat je u zagradama

Osnovne klase sekundarnih metabolita koje su toksične za životinje nabrojane su u tabeli 19-2, i dati su primjeri kao i znaci toksičnog efekta.

Najšira podela toksina izvršena je na biosintetičkoj osnovi na toksine sa azotom i toksine koji ne sadrže azot. Najpoznatiji toksini sa azotom su alkaloidi, biosintetički izvedeni iz aminokiselinskih prekursora. Ova jedinjenja su od davnina korišćena u svrhe trovanja. Iako je opšta toksičnost biljnih alkaloida u sisarima široko prihvaćena, njihov teratogeni efekat je poznat tek u novije vreme. Odrasle ženke krave i ovce mogu unositi ishranom alkaloide u količinama koje ne izazivaju smrt jedinke, ali kao rezultat toga može doći do pojave urođenih mana na mладuncima. Defektni mладunci obično ispoljavaju oštećenja u skeletu i imaju nisku stopu preživljavanja. U druge toksine sa azotom se ubrajaju neproteinske aminokiseline, cijanogeni glikozidi, glukozinolati, izvesni peptidi i proteini.

Toksini biljaka koji ne sadrže azot su uglavnom terpenoidnog porekla. Obuhvataju iridoide, seskviterpenske laktone, kardenolide i saponine koji svi biosintetički potiču iz mevalon-laktona i izopentenil-pirofosfata. Ostale klase terpenoida takođe imaju toksične članove, kao što su npr. monoterpen tujon, ili diterpen acetilandromedol u lišću *Rhododendron-a*. Izoflavonoidi, hinoni i furanokumarini navedeni u tabeli 14-2. potiču od šikimske kiseline i njihove biosinteze i svojstva su diskutovana u poglavlju o fenolima.

### 19.2.3. Troškovi hemijske odbrane

Sinteza sekundarnih metabolita predstavlja veliki napor za biljku s obzirom da ona zahteva stalni i stabilni dotok prekursora iz primarnog metabolizma, zajedno sa enzimima i kofaktorima bogatih energijom (ATP, NADH itd.). Pod uobičajenim uslovima, fotosinteza se obezbeđuje više nego adekvatno snabdevanje prekursorima za jedinjenja ugljenika (npr. za biosintezu terpenoida). Nasuprot tome, usvajanje azota od strane biljaka je ograničeno i dolazi do kompeticije između sinteze azotnih jedinjenja kao što su alkaloidi i sinteze proteina. Tako su troškovi sinteze alkaloida procenjeni na 5 g fotosintetičkog CO<sub>2</sub> po gramu toksina, za razliku od 2.6 g koliko iznose za fenolna jedinjenja. Naravno, ovi troškovi moraju biti balansirani sa zahtevom za dalji rast biljke pa se sve biljke ugrožene biljojedima, uslovno govoreći, susreću sa dilemom: rastiti ili se braniti.

Kompeticija za izvore sirovina odigrava se na različite načine, i mnoge teorije su postavljene u poslednje vreme koje objašnjavaju fenotipske razlike do kojih dolazi u sekundarnom metabolizmu pa tako i u hemijskoj odbrani. Hipoteza nazvana "rast-diferencijacija odnos", pri čemu pojam diferencijacija obuhvata sinteze sekundarnog metabolizma, ima u svojoj osnovi postojanje fiziološke "razmene" između rastenja i diferencijacije. Ova hipoteza sugerise podelu zeljastih biljaka u dve grupe. Prva obuhvata biljke u kojima dominira proces rastenja, sa veoma brzim porastom i slabom hemijskom odbranom, ali sa razvijenim visoko

inducibilnim odbrambenim sistemom. U drugoj grupi biljaka dominira diferencijacija, one imaju spor porast, visok sadržaj toksina ali i slabo razvijenu inducibilnu otpornost.

Ove hipoteze pomažu u objašnjavanju mnogih razlika koje su prisutne u hemijskoj odbrani cvetnica. One takođe ukazuju zbog čega dolazi do povećanja u koncentraciji sekundarnih metabolita u biljkama u uslovima stresa izazvanog spoljašnjim uslovima. Rastenje biljaka na zemljишima siromašnim azotom ili u uslovima suše, može dovesti do toga da biljka prestane da formira nove listove, i da preusmeri prekursore i energiju u sekundarne sinteze. Ogledi izvedeni na biljci *Heterotheca subaxillaris*, u čijoj hemijskoj odbrani dominiraju monoterpeni, ilustruju promene do kojih dolazi u rastenju i metabolizmu, pa su tako mlađi i nežniji listovi bogatiji u terpenima nego stariji i grublji listovi, tj. biljka prvenstveno štiti mlađe listove. Kada je nivo nutrijenata u zemljištu zadovoljavajući, biljka je tolerantnija prema insektima koji se hrane njenim listovima, i produkciju monoterpena održava na umerenom nivou. I obratno, u uslovima nitratnog stresa, ogledi su pokazali da produkcija terpena raste tako da se insekti više ne mogu uspešno hraniti. Ove promene se mogu sagledati kao dinamička reakcija na biljojede u situacijama kada biljka ne može formirati nove listove i kada je osjetljivija na gubitak listova.

## 19.3. Indukovan fitohemijski odgovor na biljojede

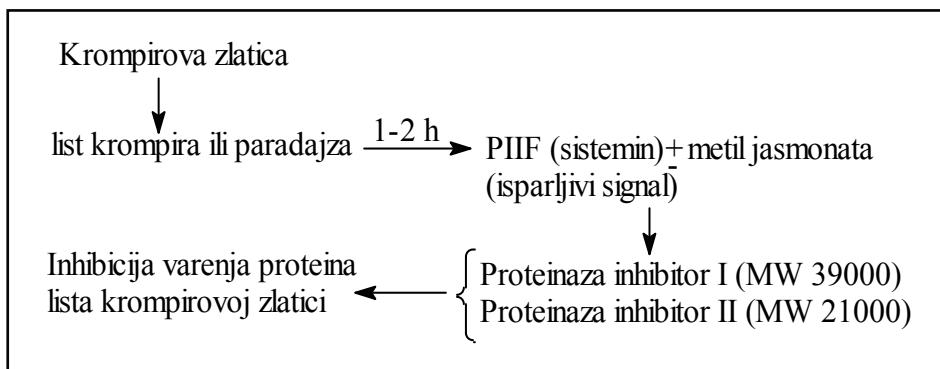
### 19.3.1. Indukcija fitohemijskih supstanci u biljkama

Jedan od načina kojim biljke redukuju metaboličke troškove sinteze i skladištenja toksina za hemijsku odbranu ogleda se u produkciji odbrambenih agenasa u trenutku kada su neophodni, tj. tek nakon što je biljka napadnuta od strane biljojeda. Ovaj mehanizam je prvo opisan u ogledima biljne patologije, kada je ustanovljeno da biljke mogu odgovoriti na gljivičnu infekciju putem *de novo* sinteze antifungalnih agenasa, na samom mestu napada. Ova jedinjenja, nazvana fitoaleksini, nastaju u roku od nekoliko časova nakon infekcije i dosežu maksimum nakon 48 h. Danas se zna da ishrana insekata na biljnim tkivima može proizvesti dinamički odgovor vezan za nastalo oštećenje. Hranjenje insekata ima sistemski efekat i cela biljka reaguje na ovu činjenicu. Iako se ovo može poistovetiti sa mehaničkim oštećenjima (npr. bušenje rupe u listu), reakcija je ipak dosta različita od reakcije na ozledu od insekata.

Do danas su poznata tri osnovna tipa odbrane biljaka indukovane biljojedima. Prvi, nazvan "PIIF indukcija", podrazumeva produkciju potpuno novih odbrambenih agenasa odn. sintezu inhibitora proteinaza, u roku od 24 h. Zahvaljujući njima, listovi postaju neukusni i ishrana insekata je sprečena. Drugi tip indukovane odbrane ogleda se u povećanoj sintezi pojedinih klasa toksina, koji su već prisutni i pre napada ali u manjim količinama. I u ovom slučaju postiže se efekat odbojnog ukusa listova i ovaj efekat se povećava u roku od nekoliko dana od indukcije. Treći, i najinteresantniji tip indukovane odbrane podrazumeva produkciju isparljivih jedinjenja na mestu hranjenja na listu što ima za posledicu privlačenje parazita insekata. Ovi paraziti dolaze na listove i uništavaju insekte biljojede. Ova tri tipa odbrane indukovane biljojedima biće detaljnije objašnjena u narednim potpoglavljima.

### 19.3.2. *De novo* sinteza inhibitora proteinaza

Utvrđeno je da krompirova zlatica koja se hrani listovima krompira i paradajza može da izazove brzo nakupljanje inhibitora proteinaza u biljci, čak i u onim delovima koji su udaljeni od mesta napada. Ovaj proces je omogućen induktivnim faktorom inhibitora proteinaza (PIIF), koji se oslobađa u sistem sprovodnih sudova biljke. U roku od 48 h od oštećenja listova oni mogu nakupiti do 2% rastvorljivih proteina koje čini smeša dva inhibitora proteinaza. Nakon što krompirova zlatica detektuje prisustvo inhibitora proteinaza u listovima biljke, ona izbegava dalju ishranu i seli se na drugu biljku (slika 19-1.).



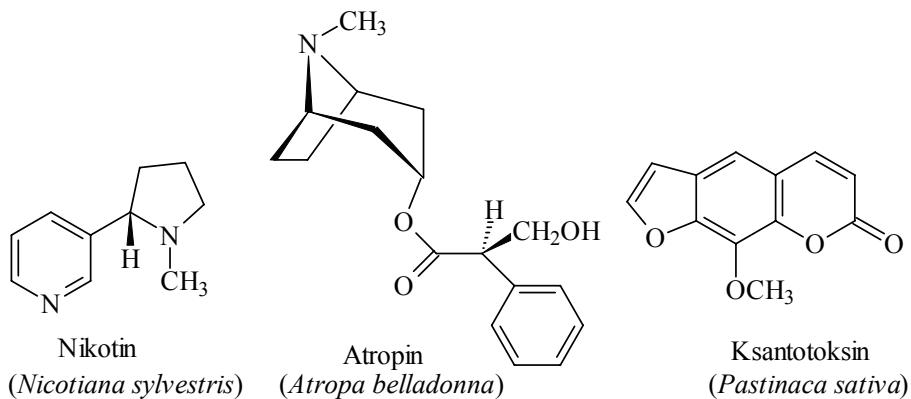
Slika 19-1. *De novo* sinteza inhibitora proteinaze u lišću krompira i paradajza.

Teorijski gledano, kada se unesu sa hranom, ovi inhibitori imaju nepovoljno dejstvo na sposobnost insekta da vari i iskoriscava biljne proteine s obzirom da oni inhibiraju enzime hidrolize proteina, pre svega tripsin i himotripsin.

Do indukcije PIIF dolazi i nakon mehaničkih oštećenja biljnog tkiva i još nije u potpunosti razjašnjeno u kojoj meri je ovaj efekat specifičan u odnosu na biljojede koji se hrane ispašom. Priroda hemijskog signala PIIF je istražena u biljkama paradajza i utvrđeno je da je to mali protein nazvan *sistemin*. Sistemin je 10.000 puta aktivniji od oligosaharida koji takođe imaju sposobnost da aktiviraju ovaj odbrambeni sistem. Jedno isparljivo jedinjenje, metabolit masnih kiselina metil-jasmonat, može isto da bude uključeno u proces signalizacije. Aktivnosti koje nalikuju PIIF otkrivene su u ekstraktima 37 biljnih vrsta iz 20 familija što ukazuje da je ovaj mehanizam opštег tipa. Ekološki eksperimenti su takođe pokazali da indukcija PIIF u paradajzu smanjuje ishranu larve *Spodoptera littoralis* u roku od 48 h, pri čemu su efekat odbijanja pokazali najviše mladi listovi.

### 19.3.3. Povećanje sinteze toksina

U mnogim biljkama je uočen oblik indukovane odbrane koji je povezan sa PIIF sistemom, ali se istovremeno veoma razlikuje od njega. Efekat je relativno brz i listovi postaju neukusni u roku od nekoliko časova do nekoliko dana. Efekat može biti kratkog dejstva i nestati nakon što prestane ishrana insekta, ili dugog trajanja, pri čemu se može produžiti i na sledeću vegetativnu sezonu kod drveća. Ove hemijske promene podrazumevaju povećanje koncentracije postojećih toksina (slika 19-2.), dovoljne da dovede do odbijanja biljojeda.



Slika 19-2. Supstance čija se koncentracija povećava u biljkama kao odgovor na napade insekata.

Ovo povećanje sinteze toksina uočeno je u dve alkaloidne biljke. Prva je divlja vrsta duvana *Nicotiana sylvestris*, koja sadrži nikotin i nornikotin kao dominantne alkaloide. Ishrana larvi *Manduca sexta* na listovima duvana dovodi do povećanja od 220% u sadržaju alkaloida u celoj biljci, u trajanju od 5-10 dana. Do nešto manjeg povećanja (170%) dolazi kada mehanička oštećenja lista ne obuhvataju i sekundarne lisne nerve. Zato larve izbegavaju presecanje lisne nervature i time umanjuju reakciju biljke koja može ići i do 400% povećanja sadržaja alkaloida u odnosu na kontrolu gde je simulirano oštećenje lista uključujući i presecanje lisnih nerva. Nikotin i nornikotin se sintetizuju u korenu biljke odakle se transportuju u listove. Slični eksperimenti sa tropanskim alkaloidima u listovima *Atropa acuminata* pokazali su maksimalno povećanje od 153-164% u odnosu na kontrolu, osam dana nakon mehaničkog oštećenja ili u slučaju ishrane puža. Dalja istraživanja su pokazala da je bilo dovoljno da se ukloni svega 9% od lisne površine i da se izazove maksimalna reakcija biljke.

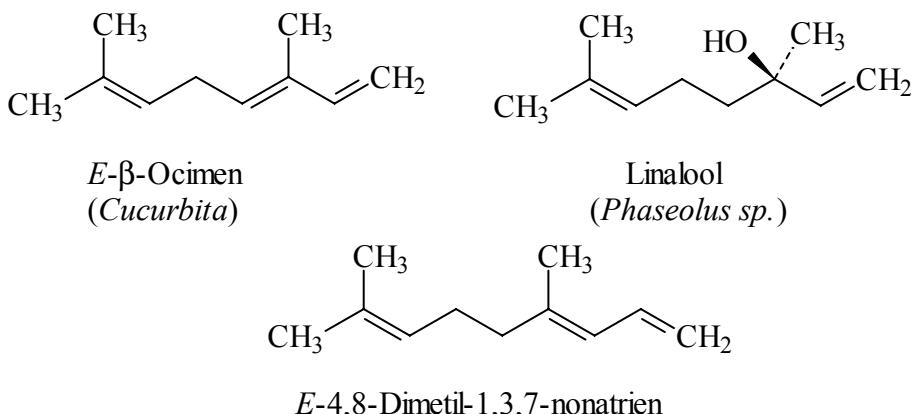
Drugi, dobro istraženi primer indukovane hemijske odbrane je divlji paštrnak (*Pastinaca sativa*), koji proizvodi pet furanokumarina u listovima. Veštačko oštećenje povećalo je sintezu furanokumarina do 162% u odnosu na kontrolu, dok je ishrana insekta *Trichoplusia ni* povećala sintezu za 215%. Larve ovog insekta rastu veoma sporo na listovima u kojima je došlo do indukcije, a veštački hranjene larve gde su u hranu dodati furanokumarini pokazale su isti efekat. Reakcija uljane repice (*Brassica napus*) na napad insekata ili oštećenje lista je sasvim drugačija, i uključuje masivnu akumulaciju idolskih glukozinolata prisutnih u kontroli samo u tragu.

Ipak, ne pokazuju sve biljke ove reakcije indukovanih promena u hemizmu zaštite od predatora ili ozleda. Za svaku biljku koja pokazuje pozitivan odgovor postoji i biljka gde ne dolazi do vidljivih promena u promeni ukusa i efekta odbijanja. Čini se da je brz indukovani odgovor slab ili ga uopšte nema u listovima biljaka koje sporo rastu. Faktori sredine takođe određuju intenzitet reakcije biljke. I konačno, reakcija može nestajati sa starenjem biljke i, kao pratećom pojavom, povećanjem otpornosti na ispašu. Tako npr., dvogodišnja stabla *Pinus contorta* reaguju na defolijaciju povećanjem koncentracije terpena i tanina u iglicama, dok 10-ogodišnja stabla ne pokazuju nikakvo povećanje.

#### 19.3.4. Isparljiva jedinjenja koja privlače predatore biljojeda

Možda najinteresantniji oblik interakcije između biljaka i životinja, koji uključuje indukovane hemijske promene, predstavlja sposobnost nekih biljaka da kao reakciju na biljojede oslobođaju isparljiva hemijska jedinjenja koja su posebno privlačna za parazite njihovih biljojeda. Ovi predatori biljojeda zatim dolaze do biljke i uništavaju svoj plen time pomažući biljci. Posebno je dobro istražen primer

paukove grinje (*Tetranychus urticae*) i njenog predatora *Phytoseiulus persimilis*. Hemijsko jedinjenje koje se oslobođa je specifično za pojedine biljne vrste. Krastavac napadnut paukovom grinjom oslobođa  $\beta$ -ocimen i 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien (slika 19-3.), koji su samo umereno privlačni za grinje-predatore, dok jedna vrsta boranije oslobođa smešu linaloola,  $\beta$ -ocimena, nonatriena i metilsalicilata koji je izraziti atraktant.



Slika 19-3. Isparljiva jedinjenja biljaka koja privlače predatore.

Druga prednost za biljke leži u tome da oslobođena isparljiva jedinjenja mogu signalizirati nenapadnute okolne biljke usled čega se one mogu bolje pripremiti na napad paukove grinje. Primer za ovo su klijanci pamuka. Sistematično oslobođanje isparljivih hemijskih jedinjenja koja posreduju u interakcijama biljka-biljojed-predator, uočeno je i u nekim drugim biljnim sistemima. Tako je otkriveno da klijanci kukuruza napadnuti insektom *Spodoptera exigua*, oslobođaju isparljive susptance koje privlače parazitsku osu, *Cotesia marginiventris*, koja zatim napada biljojeda. Do reakcije dolazi u celoj biljci a ne samo na mestu oštećenja. Među supstancama koje se oslobođaju ističe se linalool koji se pre oštećenja oslobođa u količini od  $1 \text{ ng h}^{-1}$ , a nakon napada insekta od  $110 \text{ ng h}^{-1}$ .

## Izvod

♣ Neke biljke mogu koncentrisati svoju hemijsku odbranu na akumulaciju jedne klase toksina (npr. smeše pirolizidinskih alkaloida), dok druge mogu sintetizovati različite klase istovremeno (npr. flavonoide, glukozinolate i kardenolide). One mogu proizvoditi samo jedan dominantni toksin (npr. morfin u *Papaver somniferum*), ili podjednake količine supstanci različitih struktura (npr. pet furanokumarina u divljem paštrnaku) koje sinergističkim dejstvom obezbeđuju efektnu odbranu od napada insekata.

♣ Uprkos obilju sekundarnih metabolita prisutnih u biljci, ne postoji apsolutna fizička ili hemijska zaštita protiv biljojeda. Uvek postoji neki fitofagii insekt ili sisar biljojed koji može savladati tu odbranu, obično putem detoksifikacije i daljim metabolizmom biljnog toksina. Uklanjanje toksina na ovaj način je veliki napor za životinjske organizme u smislu energetskih potreba i sinteze novih enzima, te su ovi procesi ograničeni.

♣ Neke životinje (npr. koza) reaguju na prisustvo toksina u biljkama tako što konzumiraju male količine raznih biljnih vrsta čime prevazilaze ovaj problem. Druge životinje, kao guske na primer, praktikuju "geofagiju" i mešaju biljni materijal sa glinom da bi se prisutni toksini vezali za nju. Ponekad, detoksifikacija u životinjama stvara nove metabolite koji su štetniji nego prvobitni biljni toksin. Ovo je slučaj sa pirolizidinskim alkaloidima, kada nastaje novo jedinjenje – pirol, koji je hepatotoksičan

♣ Kao rezultat ko-evolucije biljaka i životinja, gde se tokom evolucije odvijala "trka u naoružavanju", postignuta je ravnoteža u prirodnim populacijama i životinjama je omogućeno da se ograničeno i selektivno hrane hranom biljnog porekla.

# Bibliografija

- Barrett, G. C., ed. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. New York: Chapman and Hall, 1985.
- Barrow, G. M. *Physical Chemistry for the Life Sciences*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1981.
- Bender, M. L., R. L. Bergeron, and M. Komiyama. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*. New York: J. Wiley, 1984.
- Bezkorovainy, A., and M. Rafelson. *Concise Biochemistry*. New York: Marcel Dekker Inc, 1996.
- Blaber, M., Zhang, X., and W.B. Matthews. Structural basis of amino acid  $\alpha$ -helix propensity. *Science* **260**, 1637-1640 (1993).
- Bodner, G. M. Metabolism: Part I Glycolysis, or the Embden-Meyerhoff Pathway. *J.Chem. Ed.* **63**, 566-570 (1986).
- Bodner, G. M. Lipids. *J.Chem. Ed.* **63**, 772-775 (1986).
- Bramley, M.P. Isoprenoid Metabolism. In *Plant Biochemistry* (P.M.Dey and J.B.Harborne, eds.), pp 417-437. Academic Press, London, 1997.
- Branden, C. and J. Tooze. *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, 1991.
- Britton, G. In *Carotenoids: Chemistry and Biology*. (N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth, R.F. Taylor, eds), pp.167-184. Plenum, New York. 1990.
- Campbell, M. K. *Biochemistry*. San Francisco: Sounders College Publishing, 1991.
- Chothia, C. Principles that Determine the Structures of Proteins. *Ann Rev. Biochem.* **53**, 537-572 (1984).
- Chothia, C., and V. A. Finkelstein. The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 1007-1039 (1990).

Clore, G. M. and M. A. Gronenborn. Two-, three-, and four-dimensional NMR methods 43 for obtaining larger and more precise three-dimensional structures of proteins in solution. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 29-63 (1991).

Cullis, R. R., and J. M. Hope. Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in Vance D. E. and Vance J. (Eds.). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, 1991.

Dey, P.M. In *Methods in Plant Biochemistry* (P.M. Dey, ed.), pp. 189-218. Academic Press, London, New York, 1990.

Dey, P.M., and J.B.Harborne. *Plant Biochemistry* (P.M.Dey, J.B.Harborne, ads.), Academic Press, London, 1997.

Dewick, M.P. *Medicinal Natural Products*, John Wiley and Sons. New York, 1997.

Gašić, O. *Biohemija biljaka*. Beograd: Naučna knjiga, 1992.

Gašić, O., M.Popović, R.Đurković. *Biohemija domaćih životinja*. Univerzitet u Novom Sadu, 1998.

Gašić, O., M.Popović, R.Djurković. *Biološki aktivna jedinjenja biljaka fruške gore, Tom I – Alkaloidi*. Matica srpska, 1997.

Goodwin, T.W. *Biochemistry of Carotenoids*, Vol.1. Chapman and Hall, London, 1980.

Goodwin, T.W., and E.I. Mercer. *Introduction to Plant Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edn. Pergamon Press, Oxford, 1990.

Hammes, G. *Enzyme Catalysis and Regulation*. Academic Press, New York, 1982.

Harborn, J.B. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall, London, 1984.

Harborne, J.B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London, 1988.

Hatifi, Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation Systems. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1065 (1985).

Jeffrey, G. A. and W. Saenger. Hydrogen Bonding in Biological Structures. Springer-Verlag, 1991.

Jungerman, K., and H. Mohler. *Biochemie*. Berlin: Springer-Verlag, 1980.  
Karlson, R. *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga, 1988.

Kindl, H., and Wobel, G. *Biochemie der Pflanzen*. Springer-Verlag, Heildeberg, 1987.

Lenindžer, A. *Osnovi biohemije*. Moskva: "MIR", 1985.

Leegood, R.C. Enzymes of the Calvin cycle. In *Methods in Plant Biochemistry* (P.J.Lea, ed.), pp. 15-37. Academic Press, London, 1990.

Mathews, C. K., and K. E. Van Holde. *Biochemistry*. New York: Publising Company INC, 1996.

Metzler, D. *Biochemistry - The chemical reactions of living cells*. Moskva: "MIR", 1980.

Neuberger, A., and Deenen, L.L.M. *New Comprehensive Biochemistry*. Oxford: Elsevier, 1985.

Niketić, V. *Principi strukture i aktivnosti proteina*. Beograd: Hemijski fakultet, 1995.

Nikolov, T. *Opšta biohemija*. Sofia: Nauka i Iskustvo, 1985.

Ourisson, G. *J.Plant.Physiol.* 143, 434-439 (1994).

Parry, A.D. In *Methods in Plant Biochemistry*, Vol.9 (P.J.Lea, ed.), pp. 381-402. Acad.Press, London, 1993.

Plummer, D. *Biochemistry - The chemistry of life*. London: McGraž-Hill Book Company, 1989.

Popović, M. *Proučavanje aktivnosti enzima metabolizma azota u različitim inbred linijama kukuruza i suncokreta*. Doktorska disertacija, Novi Sad, 1988.

Popović, M. *Istraživanja alkaloidnih biljaka*. Biološki aktivne materije viših biljaka, gljiva i bakterija (D.Stevanović, ed.), pp 39-42. Univerzitet u Novom Sadu, PMF, 1998.

Purton, M.E. Trends in Biochemistry Sciences - TIBS. Cambridge: The international Union of Biochemistry and Elsevier Trends Journals, Reference Edition, Vol. 15., 1990.

Pyun, H.J., Wagschal, K.C., Jung, D.I., Coates, R.M., Croteau, R. *Arch.Biochem.Biophys.*, 143, 434-439 (1994).

Rapoport, T. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258, 931-936 (1992).

Saenger, W. Structure and dynamics of water surrounding biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 93-114 (1987).

Sarić, M. Lekovite biljke SR Srbije. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, 1989.

Seigler.D.S. The Chemical Participants. Vol.1 Herbivores-Their Interactions with Secondary Plant Merabolites (G.A. Rosenthal and M,R, Berenbaum, eds), pp 35-77. Acad Pres, New York, 1991.

Singer, S. J. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 247-296 (1990).

Singer, S. J., and G. L. Nicholson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).

Stryer, L. *Biochemistry* 3<sup>nd</sup> ed. New York: W.N.Freeman and Company, 1988.

Toniolo, C. and E. Benedetti. The polypeptide 3<sub>10</sub>-helix. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 350-353 (1991).

Unwin, N., and R. Henderson. The Structure of Proteins in Biological Membranes. *Sci. Amer.* **250** (2), 78-94 (1984).

Voet, D., and J. Voet. *Biochemistry* 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1995.

Yang, A. S. and B. Honig. Electrostatic effects on protein stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 40-45 (1992).

White, A., Handler, P., Smit, E., Hill, R., and I. Leman. *Principles of Biochemistry*. Moskva: "MIR", 1981.

Wolfe, H.D. *General Organic and Biological Chemistry*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986.