

# Kristalizacija derivata inzulina uz dodatak halogenida ; Integrirani pristup poučavanju probavnih enzima

---

Jurković, Adela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:751123>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Adela Jurković

# **KRISTALIZACIJA DERIVATA INZULINA UZ DODATAK HALOGENIDA**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2018. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom red. prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović, izv. prof. dr. sc. Draginje Mrvoš-Sermek i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Dalibora Milića.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja pod nazivom Strukturno istraživanje bioloških makromolekula metodom rentgenske difrakcije, voditelj: red. prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović (119-1193079-1084).



## Zahvale

*Zahvaljujem se mentoricama red. prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović izv. prof. dr. sc. Draginji Mrvoš-Sermek na svojoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem i svim asistentima i tehničarkama sa Zavoda za opću i anorgansku kemiju na ljubaznosti i susretljivosti.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i potpori. Posebno hvala mojoj majci koja je u svim trenucima mog školovanja bila uz mene i bila moj najveći navijač.*

*Dodatno se zahvaljujem svim kolegama i kolegicama s Fakulteta koji su mi pružili moralnu potporu tijekom studija, a posebno mom Dušku na nesebičnom razumijevanju i podršci.*

*I konačno, ovaj rad ću posvetiti mojoj baki koje, na moju preveliku žalost više nema, a za koju znam da bi bila neizmjereno sretna i ponosna u ovom trenutku.*

Ada



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Inzulin .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Otkriće inzulina.....	3
2.1.2. Struktura inzulina.....	6
2.1.2.1. Primarna struktura inzulina.....	7
2.1.2.2. Monomer inzulina.....	8
2.1.2.3. Asocijacija molekula inzulina – dimer i heksamer.....	10
2.1.3. Biosinteza inzulina u organizmu .....	12
<b>2.2. Kristalizacija proteina .....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Osnove kristalizacije proteina.....	14
2.2.2. Metode kristalizacije .....	16
2.2.2.1. Metoda difuzije para .....	17
2.2.2.2. "Batch" kristalizacija .....	18
2.2.2.3. Metoda dijalize .....	16
2.2.3. Faktori koji utječu na rast proteinskih kristala.....	19
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Eksperimentalni postupci.....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Priprema otopina precipitantnih reagensa.....	23
3.1.2. Priprema otopine pufera.....	23
3.1.3. Priprema otopine proteina .....	25
3.1.4. Metoda kristalizacije .....	25
<b>3.2. Sakupljanje podataka metodom difrakcije rentgenskog zračenja na monokristalu .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Uvjeti kristalizacije .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Difrakcijska mjerenja.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Struktura cinkovog(II) klor-, cinkovog(II) jod-, kobaltovog(II) i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina .....</b>	<b>35</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>38</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>41</b>



<b>§ 7. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>METODIČKI DIO – INTEGRIRANI PRISTUP POUČAVANJU PROBAVNIH ENZIMA .....</b>	<b>XLIX</b>
<b>§ 8. UVOD.....</b>	<b>43</b>
8.1. Kemija kao nastavni predmet.....	43
8.2. Obrazovne strategije i metode .....	44
8.3. Razine znanja po Bloomovoj taksonomiji.....	45
<b>§ 9. UPUTA ZA NASTAVNIKE .....</b>	<b>49</b>
9.1. Probavni enzimi u nastavi kemije i biologije.....	49
9.2. Enzimski kataliza .....	53
9.2.1. Inhibicija enzimske reakcije.....	54
9.3. Probavni sustav i probavni enzimi čovjeka .....	55
9.4. Općenito o ugljikohidratima i proteinima uz pregled osnovnih dokaznih reakcija .....	58
9.5. Priprema za izvođenje dva integrirana nastavna blok-sata ponavljanja u 4. razredu gimnazije.....	65
<b>§ 10. UPUTA ZA UČENIKE .....</b>	<b>68</b>
10.1. Naputak za učenike.....	55
10.2. Listići za evaluaciju.....	55
10.3. Zadaci za provjeru znanja .....	55
<b>§ 11. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>99</b>
<b>§ 12. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>101</b>
<b>§ 13. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXXV</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### KRISTALIZACIJA DERIVATA INZULINA UZ DODATAK HALOGENIDA

Adela Jurković

Ovaj diplomski rad sastoji se od istraživačkog i metodičkog dijela. U istraživačkom dijelu rada opisana je kristalizacija halogenidnih i nehalogenidnih derivata goveđeg i ljudskog inzulina primjenom metode difuzije para viseće kapi. Korištene su Hampton Research VDX ploče od 24 spremnika. Ploče su držane u mraku na temperaturi od 20 °C. Varijacijom koncentracije precipitantnih reagensa, koncentracije proteina i veličine kapi dobiveni su monokristali derivata inzulina. Dodatkom natrijevog klorida i soli odgovarajućeg metala kristaliziraju sljedeći derivati inzulina: cinkov(II) klor-derivat goveđeg i ljudskog inzulina; kobaltov(II) klor-, niklov(II) klor-, manganov(II) klor-, bakrov(II) klor- i molibdenov(VI) klor-derivat ljudskog inzulina. Uz dodatak natrijevog jodida kristalizira cinkov(II) jod-derivat ljudskog inzulina, a uz dodatak soli odgovarajućeg metala kristaliziraju vanadijev(IV) i molibdenov(VI) derivat ljudskog inzulina. Strukture cinkovog(II) klor-, cinkovog(II) jod- i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina određene su rentgenskom strukturnom analizom, čime se dobio uvid u koordinaciju metalnih iona u inzulinu kao i u konformaciju molekule inzulina. Navedeni derivati kristaliziraju u trigonskom sustavu, u prostornoj grupi  $R3$ . Cinkov(II) klor-derivat pripada  $4Zn$  tipu ( $T_3R_3^f$  tipu). Cinkov(II) jod-derivat pripada  $2Zn$  tipu, ali i  $T_3R_3$  tipu koji je inače atipičan za  $2Zn$  tip. Kobaltov(II) klor-derivat ljudskog inzulina pripada  $2Zn$  tipu ( $T_6$  tipu).

U metodičkom dijelu rada pod naslovom *Integrirani pristup poučavanju probavnih enzima*, predložen je nastavni materijal za integrirani način izvođenja nastavne jedinice „Probavni enzimi“. Načinjen je pregled nastavnih programa iz kemije i biologije za osnovnu i srednju školu s osvrtom na probavne enzime i obrazovne ishode koji se očekuju za pojedino obrazovno razdoblje. Priložena je uputa za nastavnike, prijedlozi pokusa i testovi za samoocjenjivanje (grupe A i B) te zadaci za provjeru znanja. Nastavni materijal je prilagođen obrazovnom razdoblju četvrtog razreda gimnazije u završnom programskom dijelu.

(138 stranica (102+36), 73 slike, 3 sheme, 16 tablica, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: derivati inzulina/kristalizacija/metoda difuzije para viseće kapi/integrirano poučavanje/poučavanje kemije/probavni enzimi

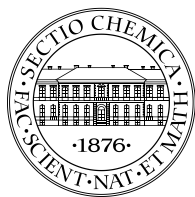
Mentori: red. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović  
izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek  
Neposredni voditelj: dr. sc. Dalibor Milić

Ocjenitelji:

1. red. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
  2. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
  3. izv. prof. dr. sc. Ines Radanović
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Datum diplomskog ispita: 29. svibnja 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### CRYSTALLIZATION OF INSULIN DERIVATIVES WITH ADDITION OF HALIDES

Adela Jurković

This thesis consists of two parts: the research and methodological one. In the research part of the thesis crystallization of halogen and non-halogen derivatives of bovine and human insulin by the hanging drop vapour diffusion method is described. Hampton Research VDX plates consisting of 24 wells were used. The plates were kept in the dark at 20 °C. Single crystals of insulin derivatives were obtained by variations in the concentration of the precipitant solution, protein concentration and drop size. The following insulin chloro derivatives were crystallized with addition of NaCl and a metal salt in the precipitant solution: zinc(II) chloro-derivative of bovine and human insulin; cobalt(II) chloro-, nickel(II) chloro-, manganese(II) chloro-, copper(II) chloro- and molybdenum(VI) chloro-derivatives of human insulin. By addition of NaI the zinc(II) iodo derivative of human insulin was crystallized. By addition of a metal salt vanadium(IV) and molybdenum(VI) derivatives of human insulin were crystallized. The X-ray diffraction experiment was conducted on the zinc(II) chloro, zinc(II) iodo and cobalt(II) chloro derivatives of human insulin to determine their molecular and crystal structure. The three mentioned derivatives were found to crystallize in the trigonal system,  $R\bar{3}$  space group. The zinc(II) chloro-derivative exhibits the 4Zn form ( $T_3R_3^f$  form). The zinc(II) iodo-derivative is of the 2Zn type, but also in the  $T_3R_3$  form, usually atypical for the 2Zn type; and the cobalt(II) chloro-derivative exhibits the 2Zn type ( $T_6$  form).

In the methodological part of the *Thesis* entitled *Integrated approach to teaching digestive enzymes*, teaching material for the integrated lesson unit "Digestive enzymes" is suggested. An overview of the teaching curriculum in chemistry and biology for elementary and high school, with the reference to digestive enzymes, was made. Instructions for teachers, tests for self-evaluation (groups A and B) with experiments and a knowledge assessment test for fourth grade high school students are enclosed.

(138 pages (102+36), 73 figures, 3 schemes, 16 tables, 67 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: crystallization/derivatives of insulin/vapour diffusion method/digestive enzymes/integrated teaching/teaching chemistry

Mentors: Professor Dubravka Matković-Čalogović  
Associate Professor Draginja Mrvoš-Sermek  
Assistant mentor: Dr. Dalibor Milić

Reviewers:

1. Professor Dubravka Matković-Čalogović
  2. Associate Professor Draginja Mrvoš-Sermek
  3. Associate Professor Ines Radanović
- Substitute: Associate Professor Sandra Radić Brkanac

Date of exam: 29th May 2018.



## § 1. UVOD

Proteinska kristalografija je omogućila uvid u strukturu najzastupljenijih bioloških makromolekula – proteina, a time i značajno doprinijela razumijevanju njihove funkcije u organizmu. Metoda difrakcije rentgenskog zračenja donijela je mogućnost promatranja proteina na atomskoj razini, gdje se koriste zrake valne duljine od oko 1 Å. Za ovu metodu proteini moraju biti u obliku kristala, jer jedino tako možemo dobiti signal dovoljne jačine za analizu strukture promatranog proteina.

Da bi se uopće moglo pristupiti određivanju kristalne strukture, potrebno je prirediti kristal odgovarajuće kvalitete. Taj proces je za male molekule nešto jednostavniji, dok je za proteine mnogo složeniji. Kristalni rast proteina je pod utjecajem brojnih faktora (pH-vrijednost pufera, temperatura, vrijeme rasta kristala, vibracije i zvuk, dodani ligand i koncentracija proteina), a to znači da je potrebno provesti puno eksperimenata da bi se našli najbolji uvjeti za kristalizaciju.

Povijest otkrića inzulina i njegov terapijski učinak predstavljali su paradigmu integracije fiziološkog i biokemijskog pristupa u eksperimentalnoj medicini. Inzulin je hormonski protein koji, osim što ima brojne uloge u organizmu, predstavlja prekretnicu u biokemiji. Naime, na njemu su Sanger i suradnici 1953. godine otkrili da proteini imaju definirani slijed aminokiselina, odnosno primarnu strukturu<sup>1</sup>. Inzulin nastaje u gušterači gdje se dio luči direktno u krv, a dio ostaje pohranjen u gušterači u obliku romboedarskih kristala koji sadrže cinkove ione<sup>2</sup>.

**Cilj ovog diplomskog rada** bio je prirediti, pomoću metode difuzije para viseće kapi, monokristale derivata inzulina uz dodatak halogenida i različitih soli esencijalnih metala. Promatralo se koji su najbolji uvjeti za dobivanje jediničnih kristala. Neki od dobivenih monokristala bili su podvrgnuti eksperimentu difrakcije rentgenskog zračenja, te im je analizirana struktura i određena koordinacija pripadajućeg metalnog iona.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

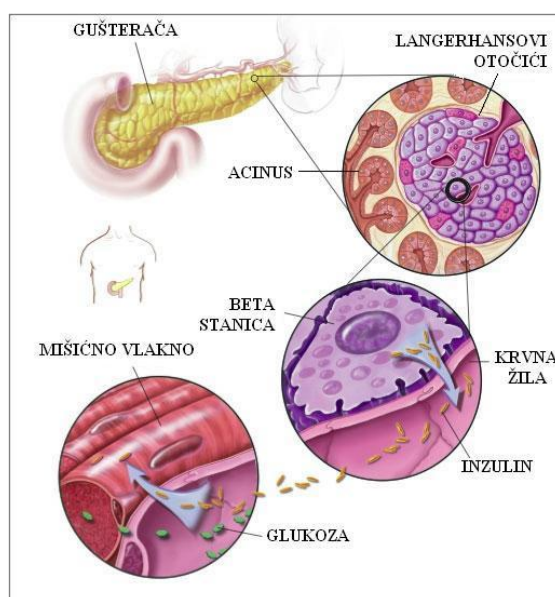
### 2.1. Inzulin

Istraživanja na inzulinu provode se već skoro sto godina. Razlog tome su brojne uloge koje ima u organizmu. Jedna od najvažnijih uloga koju ovaj peptidni hormon ima jest regulacija metabolizma glukoze, čime služi u održavanju homeostaze i sprječavanju šećerne bolesti ili dijabetesa. Inzulin također regulira i mnoštvo drugih staničnih procesa, kao što su sinteza proteina i masti, sinteza DNA i RNA, te rast i diferencijaciju stanica. Ipak, najviše se istraživao sam mehanizam djelovanja inzulina u organizmu što je dovelo do otkrića strukture inzulina, identifikacije njegovog prekursora (preproinzulina i proinzulina), mehanizma sekrecije, te identifikacije inzulinskog receptora.<sup>3</sup>

Znanstvenici Frederik G. Banting i Charles H. Best su 1921. godine otkrili hormon inzulin<sup>4</sup>, a tek trinaest godina kasnije, 1934. Hans Jensen i Earl A. Evans su dokazali da se radi o proteinu<sup>5</sup>. Naime, sve do tada se smatralo da su svi hormoni male molekule.

Prema kemijskom sastavu hormone dijelimo na: steroidne hormone, peptidne hormone i hormone tirozinske strukture. Posebne skupine hormona čine hormoni kukaca i biljni hormoni.<sup>6</sup> Hormoni su spojevi koji nastaju kao proizvodi žlijezda s unutarnjim izlučivanjem (endokrine žlijezde), pa tako hormon inzulin nastaje u gušterači i luči se direktno u krv. Gušterača se sastoji od Langerhansovih otočića i acinusa (slika 1). Langerhansovi otočići imaju endokrinu ulogu te ih sačinjavaju  $\alpha$ -stanice koje luče glukagon i  $\beta$ -stanice koje luče inzulin. Acinusi čine egzokrini dio gušterače i luče probavne enzime u kanale gušterače. Probavni enzimi se zatim iz gušterače luče u dvanaesnik.

Iako se inzulin akumulira u gušterači kao heksamer koji sadrži cinkove ione, aktivan je kao monomer koji ne sadrži cink<sup>7</sup>. Inzulin se u otopini nalazi u obliku dimera, ali se u romboedarskim kristalima nalazi u obliku heksamera s oktaedarski koordiniranim cinkovim ionom<sup>8</sup>. Cinkovi ioni su podložni zamjeni nekim drugim dvovalentnim metalnim kationima<sup>9</sup>. Zanimljivo je da do kristalizacije inzulina dolazi i u samom organizmu. Naime,  $\beta$ -stanice gušterače imaju spremišne vezikule s visokom koncentracijom cinkovih i kalcijevih iona u kojima se nakuplja višak inzulina i to u obliku kristala. Postoje istraživanja u kojima je dokazano da se ioni kalcija *in vivo* vežu za romboedarske kristale koji sadrže cink.<sup>2</sup>



**Slika 1.** Pojednostavljeni prikaz građe gušterače i mehanizma otpuštanja inzulina.

Sama svrha kristalizacije u tim vezikulama je efektivno skladištenje inzulina i zaštita molekula inzulina od proteolitičkih enzima. Budući da je monomer inzulina biološki aktivna forma koju prepoznaju receptori za inzulin u ciljnim stanicama, iznimno je važno da se kristalni heksameri inzulina otope i disociraju velikom brzinom. Izmjereno je da je vrijeme potrebno da aktivni inzulin dođe do stanica jetre samo nekoliko sekundi.<sup>10</sup>

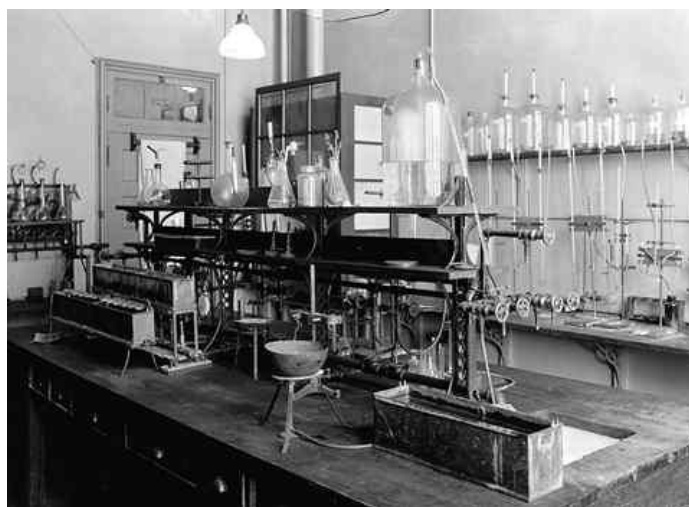
### 2.1.1. Otkriće inzulina

Prije otkrića inzulina, dijabetes je bila bolest čiji je ishod bila sigurna smrt. Liječnici su znali da je šećer bio poguban za pacijente sa šećernom bolesti, pa su ih često stavljali na rigorozne dijete. U najboljem slučaju, takav tretman je oboljelima produžio život za nekoliko godina, ali ih nikada nije spasio. Ponekad se događalo da su pacijenti čak i umirali od gladi. U 19. stoljeću, istraživanja na pacijentima umrlima od šećerne bolesti su pokazala da je došlo do oštećenja na gušterači. Tako je 1869. godine njemački student medicine, Paul Langerhans, otkrio nepoznate strukture u gušterači. Mislio je da se radi o limfnim žlijezdama, da bi tek 1893. godine poznati francuski histolog Edouard Laguesse te strukture nazvao Langerhansovi otočići, u čast znanstvenika koji ih je prvi otkrio.<sup>11</sup>

Od 1889. do oko 1920. godine u Njemačkoj, fiziolog Oskar Minkowski i liječnik Joseph von Mering provodili su pokuse na psima, pokušavajući otkriti kako uopće dolazi do

dijabetesa. U svojim istraživanjima su dokazali ako se gušterača odstrani psu, da će pas oboljeti od šećerne bolesti i također, ako se podveže kanal gušterače koji dovodi probavne enzime u dvanaesnik, da će pas razviti neke probavne probleme ali ne dijabetes. Zaključili su da gušterača ima dvije funkcije: proizvodnju probavnih enzima i proizvodnju tvari koja regulira količinu glukoze u krvi.<sup>12</sup> Sada su znali da je ključ u izolaciji te tvari. Međutim, jako sporo su napredovali sa izolacijom.

Krajem 1920. godine u Torontu, u Kanadi, kirurg Frederick Grant Banting postavio je hipotezu da probavni sokovi koje izlučuje gušterača mogu imati štetan učinak na tvari koje proizvode Langerhansovi otočići, pa je htio napraviti pokus u kojem bi podvezao kanale gušterače. To bi naravno imalo za posljedicu prestanak proizvodnje probavnih enzima gušterače, ali i samo njeno propadanje. On je htio izolirati spoj za koji je mislio da ima antidijabetički učinak, a kojeg luče stanice Langerhansovih otočića. Svoju ideju je iznio profesoru John McLeodu, vodećem stručnjaku koji se bavio dijabetesom u Kanadi, ali on nije pokazao interes za Bantingovu ideju. Banting ga je na kraju ipak uspio nagovoriti i McLeod mu je napokon dao laboratorij u kojem bi mogao provoditi svoja istraživanja (slika 2), deset pasa i medicinskog studenta da mu pomaže.<sup>13</sup> Student se zvao Charles Best.



**Slika 2.** Laboratorij u kojem su F. G. Banting i C. Best otkrili inzulin.

1921. godine su započeli s pokusima i to tako da su jednom psu odstranili gušteraču. Time su kod psa izazvali sljedeće simptome: porast razine glukoze u krvi, neutaživu žeđ i učestalo mokrenje, te sve veću slabost.<sup>12</sup> Bilo je očito da je pas obolio od šećerne bolesti. Drugom psu su podvezali kanale gušterače, čime je gušterača degenerirala, te su je na kraju i odstranili. U

njoj je preostalo na tisuće Langerhansovih otočića iz kojih su izolirali spoj koji su nazvali izletin. Spoj koji su oni nazvali izletin postao je poznat pod nazivom inzulin.<sup>14</sup> Ekstrakt izletina su ubrizgali psu koji je bolovao od šećerne bolesti (slika 3).



**Slika 3.** F. G. Banting (desno) i C. Best (lijevo) s jednim od pasa koji je bolovao od dijabetesa.

Psa su stavili na terapiju od nekoliko injekcija inzulina dnevno, pri čemu je primjećeno povlačenje svih simptoma dijabetesa. Svoje rezultate su podijelili s profesorom McLeodom ali on je htio da ponove postupak više puta, međutim zbog različite čistoće njihovih inzulinskih ekstrakata, rezultati nisu uvijek bili isti. Bez obzira na to, McLeod je vidio važnost njihovih rezultata, pa im je dao još financijskih sredstava i premjestio ih u veći laboratorij kako bi efikasnije mogli provoditi svoja istraživanja. Sve to je ubrzalo istraživanje.

Krajem 1921. godine, biokemičar Bertram Collip se pridružio istraživačkom timu.<sup>12</sup> Njegov zadatak je bio pročišćavanje inzulina do te mjere da bude pogodan za testiranje na ljudima. U tijeku istraživanja su otkrili da nije potrebno da gušterača degenerira, već su koristili neoštećene gušterače i to ne više od pasa, nego od goveda.

Testiranje na ljudima su Banting i Best započeli na sebi samima i njima ekstrakt inzulina nije štetio. Bez obzira na to, Collip je nastavio sa pročišćavanjem inzulina, te je također utvrdio koje su doze potrebne za liječenje, bez straha od predoziranja pacijenata.

1922. godine su već odabrali prvog pacijenta kojemu će davati inzulin. Bio je to četrnaestogodišnji dječak Leonard Thompson. Odmah čim je počeo primati inzulin, bilo mu je značajno bolje. Nakon toga su proširili svoje testiranje na veliki broj dobrovoljaca koji su isto болоvali od dijabetesa, te je i njima nakon primanja inzulina bilo bolje.

Vrlo brzo Banting i Best objavili su prvi rad o svojem otkriću. Tako je cijeli znanstveni svijet brzo saznao za inzulin. 1923. godine, Banting i McLeod su dobili Nobelovu nagradu za medicinu (slika 4).



Slika 4. Lice nagradne medalje za medicinu.

Banting se jako naljutio što je Nobelova nagrada išla njemu i McLeodu, a ne njemu i Bestu. Zato je odlučio novčani dio nagrade podijeliti s Bestom. Ne smijemo zaboraviti i McLeodovu ključnu ulogu u otkriću inzulina. Naime, on je otpočetak podržavao i financirao cijelo istraživanje. Vrlo brzo nakon otkrića inzulina, počelo je s njegovom masovnom proizvodnjom.

Iako inzulin nije lijek za dijabetes, on omogućava oboljelima gotovo normalan život. Kada se pojavio, bio je poput čuda i oboljeli za koje se mislilo da će umrijeti za nekoliko dana, bili su spašeni. Dijabetes je jedna od najraširenijih degenerativnih bolesti današnjice, s kojom se oboljeli bore do kraja života.

### 2.1.2. Struktura inzulina

Inzulin je protein i kao takav ima strukturu u kojoj razlikujemo četiri razine:

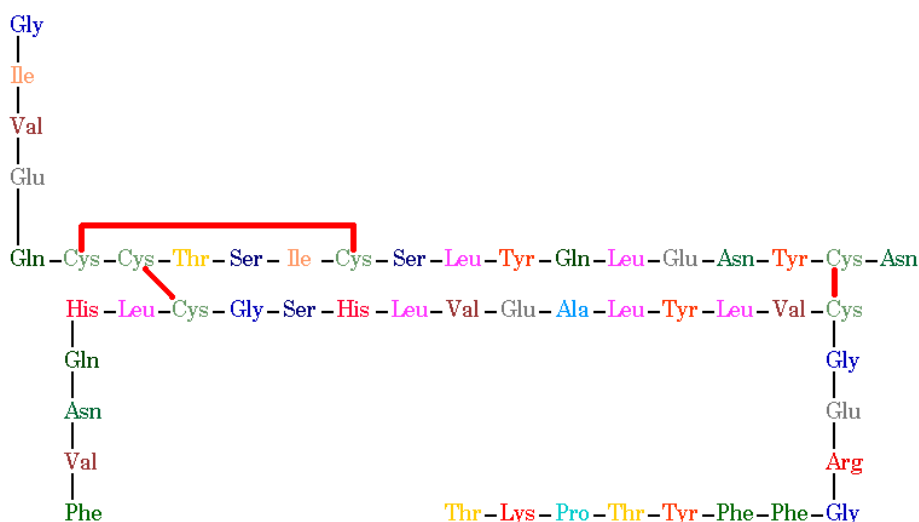
- a) **primarna struktura** – linearan slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu s istaknutim položajem disulfidnih veza;
- b) **sekundarna struktura** – obuhvaća geometrijski pravilne ponavljajuće prostorne strukture stabilizirane vodikovim vezama između karbonilnih i amino-skupina na polipeptidnoj okosnici (npr.  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča);
- c) **tercijarna struktura** – čini ukupnu trodimenzijsku strukturu koju zauzima jedan polipeptidni lanac;

d) **kvaterna struktura** – postoji kod onih proteina koji se sastoje od više polipeptidnih lanaca (podjedinica), međusobno asociranih nekovalentnim interakcijama.

### 2.1.2.1. Primarna struktura inzulina

Iako je inzulin otkriven 1921. godine, tek mu je 1953. određena primarna struktura. Primarnu strukturu goveđeg inzulina su odredili Frederick Sanger i suradnici<sup>1</sup>, a 1958. godine Sangeru je dodijeljena Nobelova nagrada iz područja kemije.

Ljudski inzulin je polipeptidni hormon ( $M_r = 5808$ )<sup>15</sup> koji se sastoji od dva polipeptidna lanca i 51 aminokiseline (lanac A sadrži 21 aminokiselinu i lanac B 30 aminokiseline). Lanci A i B su međusobno spojeni sa dva disulfidna mosta, a treći disulfidni most se nalazi unutar lanca A<sup>16</sup> (slika 5).



**Slika 5.** Primarna struktura ljudskog inzulina (disulfidni mostovi su označeni crtama crvene boje).

Prvo je bio određen slijed aminokiselina za goveđi inzulin, a ubrzo nakon toga za ljudski inzulin i različite druge životinjske inzuline. Uspoređujući slijedove aminokiselina, mogle su se uočiti manje razlike u A i B lancima (tablica 1). Budući da ljudske stanice prepoznaju svinjski i goveđi inzulin, te dvije forme su se koristile u liječenju dijabetesa sve dok nije metodom rekombinantne DNA pronađen efikasniji način proizvodnje inzulina.

**Tablica 1.** Razlike u sljedovima aminokiselina u lancima A i B između ljudskog, goveđeg i svinjskog inzulina.

VRSTA SISAVCA	LANAC A		LANAC B
	A8	A10	B30
Čovjek ( <i>Homo sapiens</i> L.)	Thr	Ile	Thr
Govedo ( <i>Bos taurus</i> L.)	Ala	Val	Ala
Svinja ( <i>Sus domestica</i> L.)	Thr	Ile	Ala

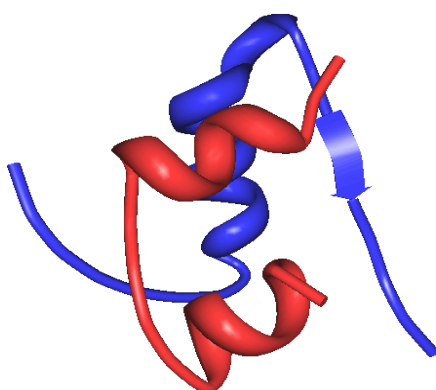
### 2.1.2.2. Monomer inzulina

U otopini pri neutralnom pH inzulin se nalazi u obliku monomera<sup>17</sup> i kao takav predstavlja aktivan oblik hormona. Monomer inzulina ima globularnu strukturu (slika 6) gdje je lanac B omotan oko kompaktnijeg lanca A. Unutrašnjost mu je hidrofobna, a površina većinom hidrofilna sa dvije hidrofobne regije.

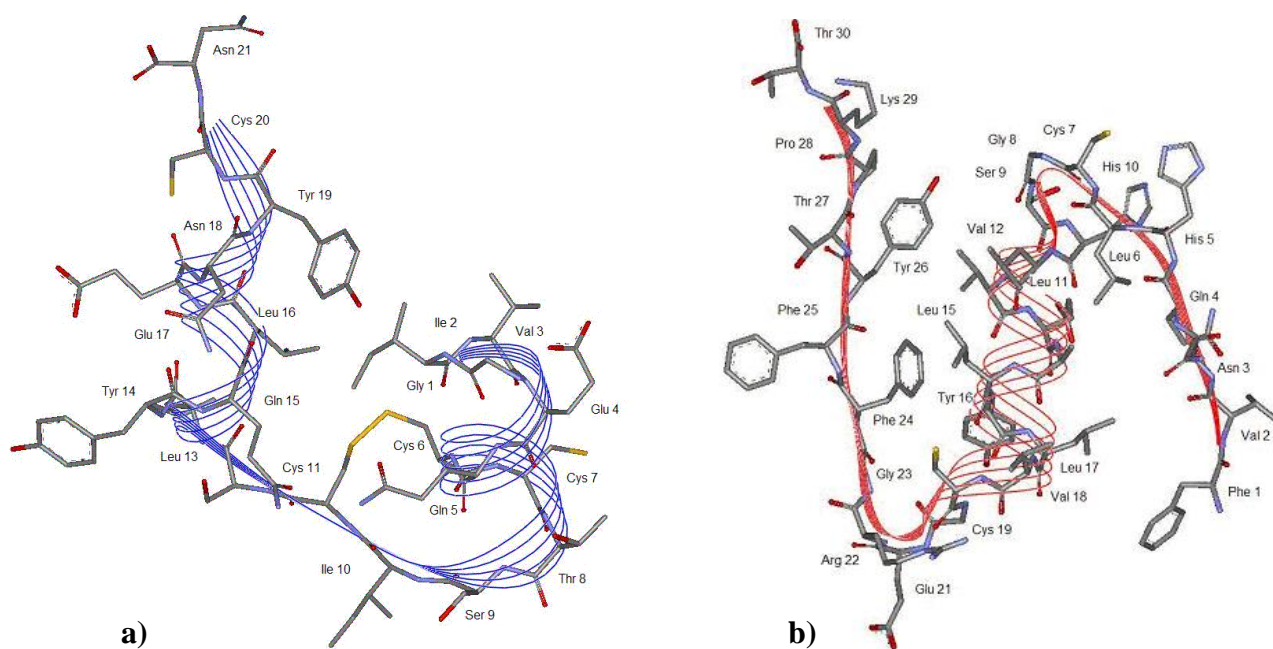
Do smatanja dolazi zbog disulfidnih veza između cisteina na položajima A7 i A20 s cisteinima na položajima B7 i B19. A7-B7 disulfidna veza se nalazi na površini, dok se A20-B19 disulfidna veza nalazi u unutrašnjosti molekule. Unutrašnjost monomera inzulina je izrazito stabilna, a toj stabilnosti pridonose intramolekulska A6-A11 disulfidna veza, kao i puno elektrostatskih interakcija između lanaca A i B (CysA11 i GlnB4, GluA4 i LysB29, CysA7 i HisB5, TyrA19 i PheB25, ArgB22 i AsnA21), te nepolarni ostaci aminokiselina obaju lanaca (LeuA16, LeuB11, LeuB15, IleA2 i PheB24).

**Lanac A** se sastoji od dvije antiparalelne  $\alpha$ -uzvojnice (IleA2-AlaA8 i LeuA13-TyrA19) koje su povezane okretom od SerA9 do SerA12, te stabilizirane disulfidnom vezom između CysA6 i CysA11 (slika 7a). N- i C- terminalni aminokiselinski ostaci stvaraju dodirnu površinu stabiliziranu van der Waalsovima između IleA2 i TyrA19.

**Lanac B** se sastoji od jedne  $\alpha$ -uzvojnice (SerB9-CysB19), te ima nepravilan V-oblik. Aminokiseline GlyB20 i GlyB23 omogućavaju takav oblik lanca. Posljedica takvog oblika je stvaranje van der Waalsovih veza između aminokiselina PheB24 i TyrB26, sa aminokiselinama  $\alpha$ -uzvojnice, LeuB15 i LeuB11 (slika 7b).



**Slika 6.** Prikaz monomera ljudskog inzulina. Lanac A je označen crvenom, a lanac B plavom bojom.



**Slika 7. a)** Struktura lanca A ljudskog inzulina (vrpčasti prikaz).

**b)** Struktura lanca B ljudskog inzulina (vrpčasti prikaz).

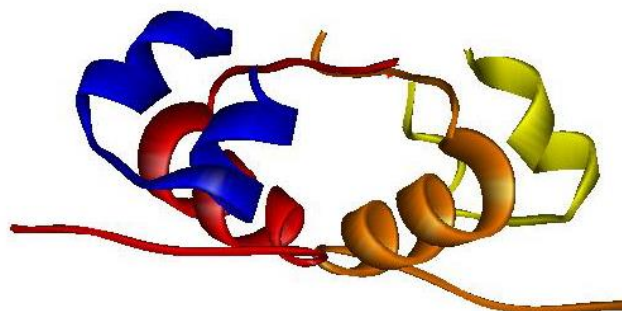


### 2.1.2.3. Asocijacija molekula inzulina – dimer i heksamer

Inzulin se može samoudruživati ili asociirati i pri tome stvara dimere, tetramere, heksamere ili veće agregate. Pri višim koncentracijama i u odsustvu cinkovih iona, inzulin asociira u dimere a uz prisustvo cinkovih iona tvori heksamere.<sup>8</sup>

Svaka molekula dimera se sastoji od dva monomera (monomera I i II), odnosno od četiri polipeptidna lanca (A, B, C i D). Monomer inzulina ima većinom hidrofilnu površinu sa dvije hidrofobne regije. Upravo te dvije hidrofobne regije omogućavaju asociiranje monomera u dimere. Dimeri nastaju tako da se  $\alpha$ -uzvojnice i C-terminalne aminokiseline B i D lanca pakiraju antiparalelno jedne prema drugima (slika 8).

Stabilnost u dimeru se postiže stvaranjem vodikovih veza između monomera, i to između aminokiselina PheB24 (monomera I) i TyrD26 (monomera II), te aminokiselina TyrB26 (monomera I) i PheD24 (monomera II).

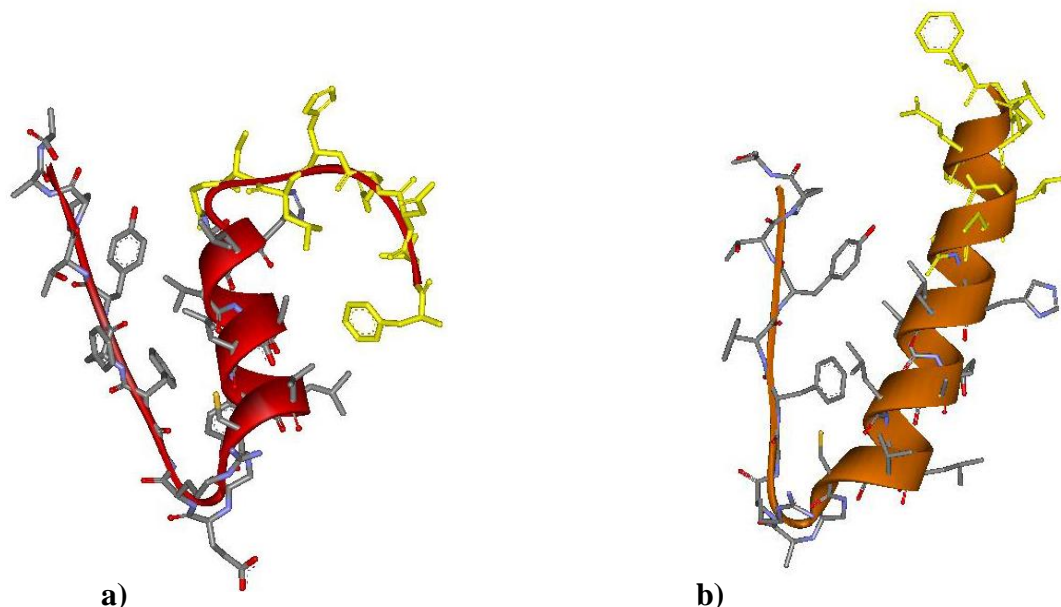


**Slika 8.** Prikaz dimera ljudskog inzulina. Lanac A je označen plavom, lanac B crvenom, lanac C žutom i lanac D narančastom bojom.

Prve monokristale inzulina je kristalizirao Abel 1926. godine<sup>18</sup>, a tek je Scott 1934. godine otkrio da se radi o kompleksu sa cinkom.<sup>9</sup> Trodimenzijska struktura inzulina određena je u laboratoriju Dorothy Hodgkin čak 35 godina kasnije (1969. godine). Radilo se o svinjskom 2Zn inzulinu, čija je struktura određena do razlučenja od 2,8 Å.<sup>19</sup> Nakon toga, riješen je velik broj struktura cinkovog(II) inzulina pri nižoj rezoluciji.

Prisustvo cinkovih iona uzrokuje kristalizaciju inzulina u obliku heksamera, koji ima kompaktni kuglasti oblik. Heksamer inzulina tvori romboedarske i monoklinske kristale. Mijenjanjem kristalizacijskih uvjeta moguće je prirediti kristale triju formi heksamera inzulina: **2Zn inzulina**, **4Zn inzulina** i **inzulina s fenolom**. Oznaka 2Zn značila je da se u

navedenom heksameru nalaze 2 cinkova iona, a oznaka 4Zn ukazivala je na prisustvo 4 cinkova iona. Međutim, kasnije se pokazalo da postoje 4Zn heksameri koji mogu sadržavati samo 2 cinkova iona, pa se prešlo na označavanje T (T kao napet, engl. *tense*) i R (R kao opušten, engl. *relaxed*) za opisivanje B lanca inzulinovog monomera.<sup>20</sup> Ta promjena u lancu B odnosi se na prvih osam aminokiselinskih ostataka (od PheB1 do GlyB8) i to ako je taj dio izdužen označava se sa T, odnosno ako ima oblik  $\alpha$ -uzvojnice označava se sa R (slika 9).



Slika 9. a) T oblik lanca B monomera inzulina.

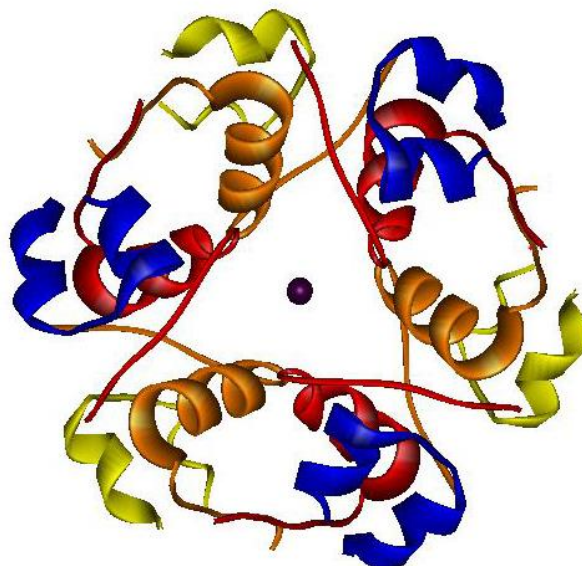
b) R oblik lanca B monomera inzulina.

Zato je točnije te tri forme heksamera inzulina označavati sa  $T_6$  (šest lanaca B je u izduženoj konformaciji),  $T_3R_3$  (tri lanca B su u izduženoj, a tri u konformaciji  $\alpha$ -uzvojnice) i  $R_6$  (šest lanaca B je u konformaciji  $\alpha$ -uzvojnice). Postoji još i  $R^f$  oznaka (f od engl. *frayed*), koja se koristi kada monomer u R obliku ima „istrošenu“  $\alpha$ -uzvojnica u kojoj su prva tri ogranka lanca B izdužena (PheB1-AsnB3).

Heksamere inzulina možemo ukratko okarakterizirati kao dimer koji se sastoji od trimera, budući da se sve promjene u strukturi odvijaju usporedno u trimerima koje sačinjavaju lanac A ili B.

2Zn, odnosno  $T_6$  heksamer se sastoji od dva identična dimera međusobno povezanih preko osi simetrije trećeg reda, te od dva iona cinka koji se također nalaze na toj osi (slika

10). Svaki ion cinka je oktaedarski koordiniran s tri atoma dušika iz HisB10, odnosno HisD10 (po jedan atom dušika iz svakog od tri dimera koji čine heksamer) i sa tri atoma kisika iz molekula vode.<sup>21</sup> Stabilizaciju ovom heksameru omogućuju vodikove veze između aminokiselina PheB1 i GluC17, GluB21 i AsnD3, te GlnB4 i LeuD17.



**Slika 10.** Prikaz 2Zn, odnosno T<sub>6</sub> heksamera ljudskog inzulina. Lanac A je označen plavom, lanac B crvenom, lanac C žutom i lanac D narančastom bojom.

Cinkovi ioni (na slici jedan iznad drugoga) su prikazani kao crni kružići.

4Zn heksamer ljudskog inzulina može sadržavati različit broj iona cinka u heksameru, te se označava kao T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> heksamer.<sup>22,23</sup> Ova forma inzulina kristalizira u prisustvu velike koncentracije kloridnih ili tiocijanatnih iona.

Treća forma heksamera ljudskog inzulina ili R<sub>6</sub> forma, kristalizira u prisustvu fenola i fenolnih derivata.<sup>24</sup>

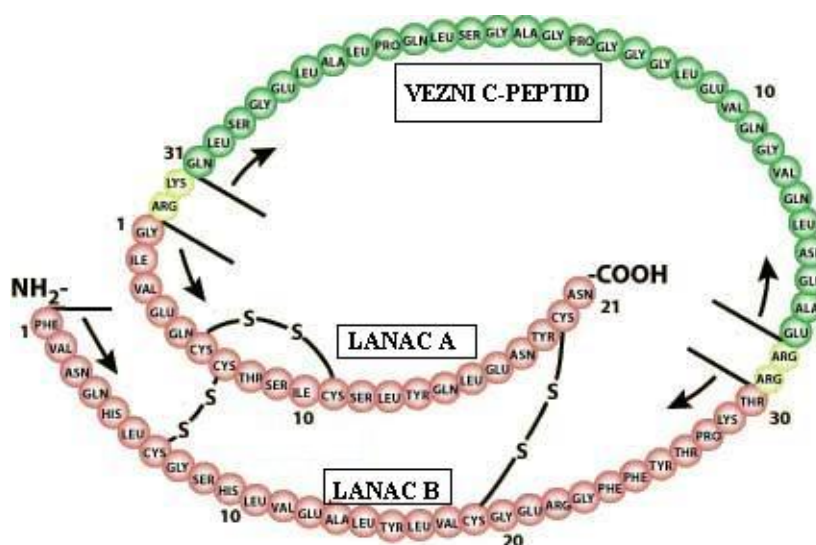
### 2.1.3. Biosinteza inzulina u organizmu

Preproinzulin i proinzulin su prekursori aktivnog hormona inzulina. Preproinzulin je jednolančani polipeptid molekulske mase 12 kDa, koji nastaje na ribosomima grubog endoplazmatskog retikuluma β-stanica gušterače. On ulazi u cisterne grubog endoplazmatskog retikuluma pomoću signalnog peptida. Signalni peptid čini hidrofobni N-

terminalni dio lanca preproinzulina koji se sastoji od 16 aminokiselina i on ne postoji u proinzulinu.

Signalna peptidaza, koja se nalazi na membrani grubog endoplazmatskog retikuluma, prepoznaje i odcijepi signalni peptid i preproinzulin odmah prolazi promjenu u konformaciji. Naime, dolazi do stvaranja disulfidnih veza koje sudjeluju u formiranju tercijarne strukture proinzulina, direktnog prekursora inzulina.<sup>3</sup>

Proinzulin, protein molekulske mase od 9 kDa, se sastoji od A i B lanca inzulina koji su međusobno spojeni veznim C-peptidom, te tako čine jedinstveni lanac<sup>25</sup> (slika 11).



**Slika 11.** Shematski prikaz molekule proinzulina s naznačenim disulfidnim vezama. Žute kuglice označavaju mjesto gdje dolazi do proteolize.

Iz grubog endoplazmatskog retikuluma proinzulin se transportira u Golgijev aparat, pa u sekretorne granule gdje prolazi proteolizu, pakiranje i skladištenje te se može oslobađati egzocitozom iz granula kao aktivni hormon inzulin.

Vezni C-peptid je polipeptidni segment proinzulina kojemu može varirati broj aminokiselina od 26 do 31. Na mjestima gdje su vezane dvije bazične aminokiseline (Arg-Arg i Lys-Arg) dolazi do proteolitičkog cijepanja proinzulina na inzulin i vezni C-peptid. Proinzulin također pokazuje svojstvo samoudruživanja kao i inzulin, formirajući dimere i cink(II) heksamere slične onima u inzulinu.<sup>26</sup> Trodimenzijska struktura proinzulina još nije

određena, iako su dobiveni pogodni monokristali za analizu.<sup>27</sup> Razlog bi mogao biti taj što vezni C-peptid ne zauzima stalnu orijentaciju u molekuli proinzulina.

Već su neko vrijeme poznate brojne funkcije inzulina a glavne su sljedeće:

- a) membranski transport glukoze, aminokiselina i nekih iona;
- b) povećano skladištenje glukagona;
- c) stvaranje triglicerida;
- d) stimulacija sinteze DNA, RNA i proteina.<sup>28</sup>

## 2.2. Kristalizacija proteina

Proteini, kao i mnoge druge molekule, mogu stvarati kristale ako se nalaze u odgovarajućim uvjetima. Dobivanje odgovarajućih monokristala pogodnih za rentgensku strukturnu analizu je najteži korak u kristalizaciji proteina. Glavni faktori koji utječu na kristalni rast proteina su sljedeći: pH vrijednost pufera, temperatura, vrijeme rasta kristala, vibracije i zvuk, dodani ligand i koncentracija proteina.

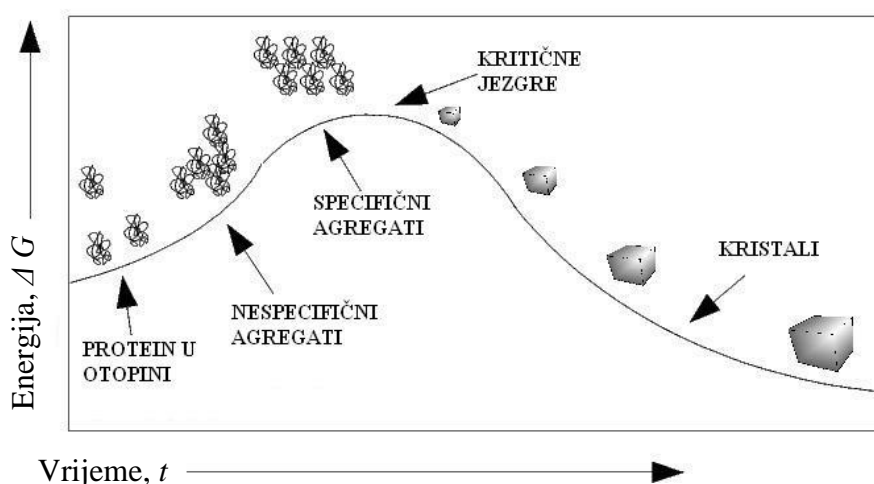
Kristalizacija proteina je vrlo nezahvalna i zbog osjetljive prirode proteinskih kristala. Naime, proteini posjeduju nepravilne površine čime nastaju veliki kanali unutar samog proteinskog kristala. Zato se između slabih nekovalentnih interakcija koje drže kristalnu rešetku na okupu, nalazi nekoliko slojeva molekula otapala.<sup>29</sup>

Proteini kristaliziraju na vrlo sličan način kao i male molekule. Njihov vanjski izgled se međusobno bitno ne razlikuje. Razlike se očituju u strukturi, njihovim fizikalnim i mehaničkim svojstvima, mehanizmu i kinetici rasta, te u uvjetima za nukleaciju i rast. Proteinski kristali su vrlo meki i općenito sadrže između 30 i 70 % vode, koja se nalazi na raznim mjestima unutar kristala. Zato možemo zaključiti da se proteinske molekule unutar proteinskog kristala nalaze u vodenom okruženju.<sup>30</sup>

### 2.2.1. Osnove kristalizacije proteina

Za početak je potrebno otopiti pročišćeni protein u odgovarajućem otapalu iz kojeg ga se može istaložiti u kristalnoj formi dodatkom soli ili nekog organskog spoja. Sam proces kristalizacije se obično sastoji od tri faze: **nukleacije, rasta kristala i prestanka rasta kristala.**<sup>31</sup>

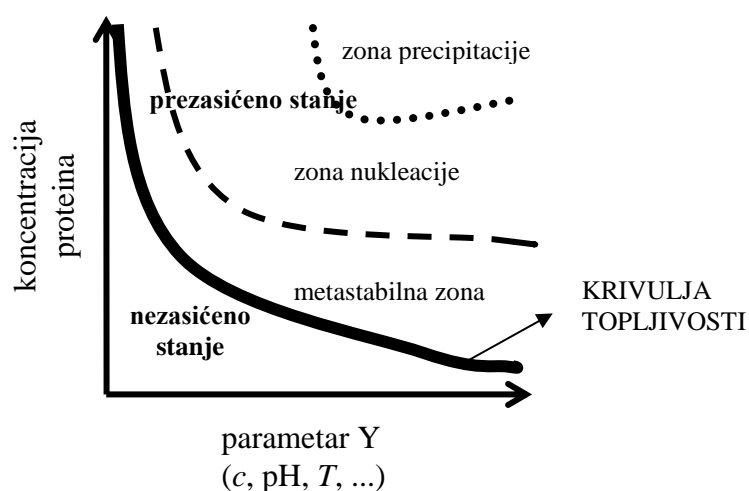
Da bi došlo do nukleacije ili formiranja malih agregata koji predstavljaju jezgre ili nukleuse (centre kristalizacije), potrebno je dovesti otopinu u prezasićeno stanje. Nužno je prezasićenje svesti na najnižu moguću razinu, jer inače dolazi do nastanka velikog broja nukleusa ili malih kristala, što nije od koristi. Rast kristala se javlja kada se formira nespecifični ili nepravilni agregat, nastao nasumičnim međumolekulskim interakcijama. Samo stvaranje kristalnih jezgara ne dovodi nužno do nastanka monokristala odgovarajuće veličine. Da bi se dobio kristal zadovoljavajuće veličine, protein mora savladati energetska barijeru nazvanu kritična veličina. Kada jezgra dosegne tu kritičnu veličinu, sposobna je za daljni rast (slika 12). U suprotnom, dolazi do otapanja jezgre i kristal se ne uspije formirati.



**Slika 12.** Prikaz nastanka kristala u ovisnosti slobodne energije o vremenu.<sup>32</sup>

Kada je sustav u ravnoteži, njegova slobodna energija je minimalna. U ovom slučaju minimalna energija se postiže kada su molekule proteina potpuno solvatizirane i kada nastanu kristali. U prezasićenom stanju sustav više nije u ravnoteži i zato teži ponovnom uspostavljanju ravnoteže ili, u ovom slučaju, ka stvaranju kristala.

Proces nukleacije i rasta kristala objašnjen je u dijagramu topljivosti proteina (slika 13). Na dijagramu topljivosti proteina se uočavaju dva prostora različitih koncentracija odvojenih krivuljom topljivosti, a to su: **zona premalog zasićenja (nezasićeno stanje)** i **zona prezasićenja (prezasićeno stanje)**. U području ispod krivulje otopina je nezasićena i tu neće doći do kristalizacije. Iznad krivulje topljivosti se nalazi zona prezasićenja i tu je za dani parametar  $Y$  (npr. koncentraciju precipitata), koncentracija proteina viša nego ona u ravnoteži.



Slika 13. Dijagram topljivosti proteina.

Područje prezasićenog stanja može se podijeliti, ovisno o razini prezasićenja, u sljedeće tri zone:

- 1) **zona precipitacije** ili područje gdje se suvišak molekula proteina odmah odijeli od otopine tvoreći amorfne agregate;
- 2) **zona nukleacije** ili područje u kojem se stvaraju kristali;
- 3) **metastabilna zona** ili područje gdje je moguć nastanak kristala, ali uz pomoć mehaničkog protresanja otopine ili uz dodatak kristalića kao poticaj za nukleaciju.<sup>33</sup>

Za priređivanje odgovarajućih monokristala, optimalni uvjeti su početak stvaranja jezgre u zoni nukleacije, odmah uz granicu s metastabilnom zonom.

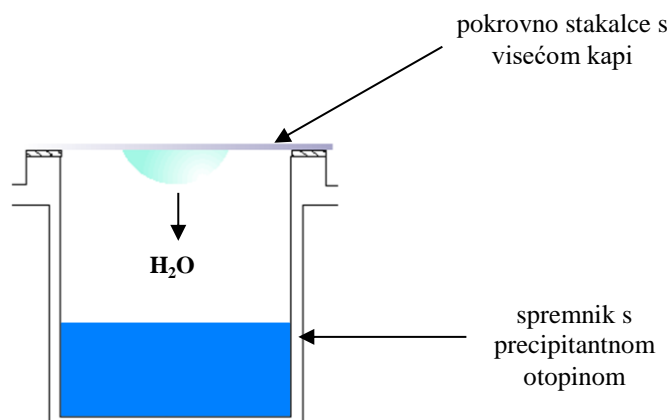
### 2.2.2. Metode kristalizacije

S vremenom se razvilo nekoliko metoda kojima se postiže kristalizacija proteina. Sve metode imaju isti cilj – dobivanje odgovarajućih monokristala, ali međusobno se razlikuju po nekim osnovnim principima. Najčešće se upotrebljavaju sljedeće metode: **metode difuzija para** (gdje razlikujemo *metodu viseće kapi* i *metodu sjedeće kapi*), zatim tzv. „batch“ **kristalizacija** i **metoda dijalize**.

### 2.2.2.1. Metoda difuzije para

Ova tehnika se koristi na dva načina: kao metoda viseće kapi i kao metoda sjedeće kapi. Metoda difuzije para u visećoj kapi (engl. *Hanging Drop Method*) je najčešće korištena metoda kristalizacije proteina<sup>34</sup> i to je metoda korištena u ovom radu.

Kod *metode viseće kapi*, kapi se priređuju tako da se na silikonizirano pokrovno stakalce nanose otopina proteina i precipitantna otopina (otopina spremnika) u omjeru 1:1. Zatim se stakalca stavljaju u utore na spremniku koji sadrži 1 cm<sup>3</sup> precipitantne otopine i to tako da kap visi iznad spremnika. Spremnik je na kraju potrebno hermetički zatvoriti ili pomoću masti nakon koje se stavlja odgovarajući poklopac, ili jednostavno gornji dio ploče oblijepiti prozirnom ljepljivom trakom (slika 14).

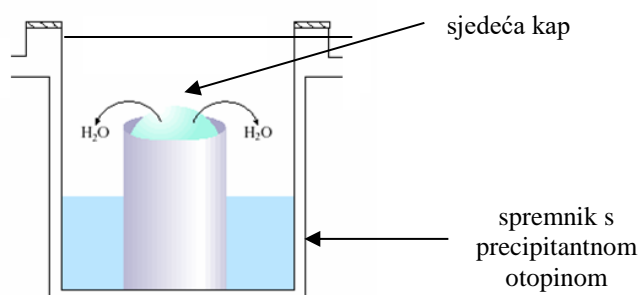


**Slika 14.** Shematski prikaz metode difuzije para u visećoj kapi s naznačenim smjerom isparavanja vode.

*Metoda sjedeće kapi* (engl. *Sitting Drop Method*) se koristi kada otopina proteina ima malu površinsku napetost i kada želimo upotrijebiti veći volumen kapi. Ovako kap ne može skliznuti sa silikoniziranog stakalca, već je smještena na posebnom mjestu u spremniku (slika 15).

Obje metode difuzije para funkcioniraju na principu isparavanja i difuzije vode ili lakohlapljive tekućine između otopina različitih koncentracija, čime se postiže prezasićenje u kapi (u otopini proteina). Koncentracija precipitata je manja u kapi nego u otopini, pa voda (ili lakohlapljiva tekućina) isparava iz kapi sve dok se koncentracija precipitata iz kapi ne izjednači s koncentracijom precipitata u spremniku.



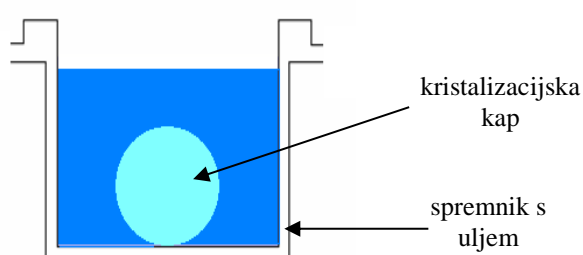


**Slika 15.** Shematski prikaz metode difuzije para u sjedećoj kapi s naznačenim smjerom isparavanja vode.

Kristalizacija proteina u kapi teče tako da se otopina proteina ukoncentrira isparavanjem ili difuzijom iz nezasićenog do prezasićenog stanja. Kako se pojavljuju prvi kristali, polako će se smanjivati koncentracija proteina sve dok ne dosegne krivulju topljivosti.

#### 2.2.2.2. „Batch“ kristalizacija

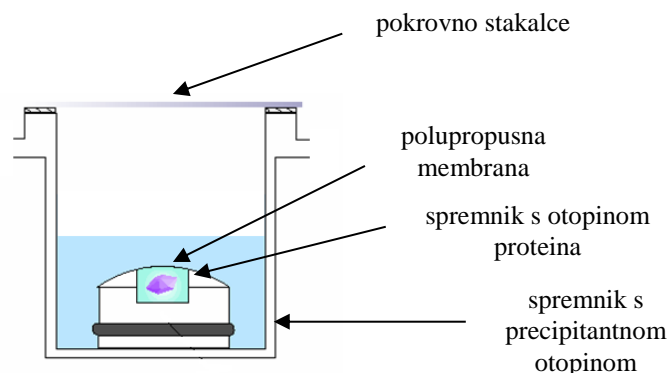
Kod ove najstarije metode kristalizacije proteina, koncentrirana otopina proteina se pomiješa s precipitantnom otopinom velike koncentracije. Na taj način se odmah dobiva prezasićena otopina iz koje kristali polako rastu. Kristalizacijska kap, koja se sastoji od uzorka otopine proteina i precipitata, prekrivena je uljem kako bi se spriječilo isparavanje (slika 16).



**Slika 16.** Shematski prikaz „Batch“ kristalizacije.

### 2.2.2.3. Metoda dijalize

Kod metode dijalize (engl. *Dialysis Method*) koncentracija makromolekula ostaje ista (koncentracija proteina) dok se koncentracija malih molekula (koncentracija precipitata) mijenja prolaskom kroz polupropusnu membranu (slika 17).



**Slika 17.** Shematski prikaz metode dijalize.

Polako se postiže ravnoteža između otopine proteina i precipitata u okolnom otapalu, a unutar membrane za dijalizu se postiže prezasićeno stanje molekula proteina. Tako s vremenom dolazi do kristalizacije, te se koncentracija proteina polako smanjuje.

### 2.2.3. Faktori koji utječu na rast proteinskih kristala

Svaki protein je jedinstven, stoga se parametri pogodni za kristalizaciju određuju posebno za svaki protein. Cilj je dobiti monokristale pogodne za rentgensku strukturnu analizu. Na uspješnost kristalizacije utječu različiti faktori, a oni glavni će biti detaljnije opisani kako slijedi u tekstu.

#### 2.2.3.1. pH-vrijednost pufera

Kontakti između molekula proteina su preduvjet za njihovo slaganje u kristalnu strukturu, a oni ovise o lokalnoj distribuciji naboja.

Elektrostatske interakcije između molekula proteina nastaju ionizacijom slobodnih karboksilnih i amino-skupina, te ionizacijom bočnih ogranaka koji sadrže ionizabilne skupine. Međutim, ako dođe do neutralizacije istih, kao što se i događa kod niske ili visoke vrijednosti

pH, može se dogoditi da se smanji količina elektrostatskih interakcija koje se stvaraju u proteinu. Tako manipulacijom i kontrolom relativnog broja nabijenih grupa možemo kontrolirati veličinu i kvalitetu kristala koji se treba formirati. To je najlakše postići variranjem vrijednosti pH pufera. Za neke proteine, kristalizacija se događa preko širokog raspona pH-vrijednosti, no u pravilu je unutar jedne pH jedinice. Većina proteina kristalizira u blizini fiziološke pH-vrijednosti ( $\text{pH} \approx 7$ ), ali ima i onih koji kristaliziraju iz otopina čija je pH-vrijednost ispod 5 ili iznad 9.<sup>32</sup> Pri tome uvijek treba voditi računa da ne dođe do denaturacije proteina.

pH-vrijednost je učinkovit kristalizacijski faktor zato jer proteini pokazuju pH ovisan minimum topljivosti te će se otapati, taložiti ili kristalizirati pri točno određenim vrijednostima pH. Minimum topljivosti može biti jednak izoelektričnoj točki proteina (pI), ali te ne mora uvijek biti tako zbog drugih kemijskih i fizikalnih čimbenika koji utječu na eksperiment kristalizacije.

#### 2.2.3.2. Temperatura

Temperatura često utječe na nukleaciju i na rast kristala, ali isto tako i na njihovu količinu, veličinu, kvalitetu i topljivost. Jedna od prednosti u variranju temperature kod kristalizacije je ta što možemo reverzibilno kontrolirati prezasićenje otopine. Time možemo povećati broj novonastalih kristala, ali i otkriti nove kristalizacijske uvjete. Često se variranjem u temperaturi možemo poslužiti ako želimo djelomično otopiti nastali kristal, te opet pokušati dobiti veći i pravilniji kristal ili samo ako želimo dobiti dodatni nukleacijski centar.

Obično se kristalizacija proteina vrši na temperaturi nešto nižoj od sobne (u rasponu od 18 do 24 °C) pa sve do 4 °C. Većina proteina je stabilnija i manje topljiva na nižoj temperaturi, te daju pravilnije monokristale. Iako to ne mora biti uvijek tako, potrebno je kristalizaciju provesti na različitim temperaturama da bi se utvrdila temperatura pri kojoj je protein najstabilniji i pri kojoj će dati pravilne monokristale pogodne za rentgensku strukturnu analizu.

### 2.2.3.3. Koncentracija proteina

Koncentraciju proteina povezujemo s prezasićenjem. Zato koncentraciju proteina biramo tako da je na početku postavljanja kristalizacije ispod stupnja zasićenja, a da za vrijeme uspostavljanja ravnoteže otopina polako postigne i prijeđe granicu zasićenja. Smanjenje koncentracije proteina usporava rast i javljaju se monokristali. Kristalizaciju je najbolje izvesti u rasponu koncentracije proteina od 3 do 10 mg cm<sup>-3</sup>. Veliki proteini zahtjevaju manju koncentraciju (obično od 2 do 5 mg cm<sup>-3</sup>), dok manji veću (obično od 20 do 50 mg cm<sup>-3</sup>).<sup>33</sup>

Na tržištu postoje i različiti kitovi koji omogućuju testiranje da li je koncentracija proteina povoljna za precipitirajući reagens koji će se koristiti pri kristalizaciji (slika 18). Takvi kitovi obično sadrže najčešće korištene precipitirajuće reagense koji se koriste za kristalizaciju.



**Slika 18.** Primjer krita koji se koristi za provjeravanje odgovarajuće koncentracije proteina za eksperiment kristalizacije.

### 2.2.3.4. Ostali faktori

Ostali faktori koji utječu na kristalizaciju proteina su: ligandi, vrijeme, te vibracije i zvuk.

Različiti metalni ioni i kofaktori sudjeluju u stabilizaciji proteinskog kristala, ali i određuju njegovu strukturu. Detaljnijom analizom primarne strukture proteina može se predvidjeti koji ligandi bi mogli doprinijeti stabilizaciji proteina.

Vrijeme potrebno za kristalizaciju monokristala može varirati u rasponu od nekoliko sati do nekoliko godina. Brzina rasta kristala je funkcija prezasićenosti, pa tako veliki kristali s minimalnim defektima nastaju kod nižeg prezasićenja i manje brzine rasta.

Vibracije i zvuk su također neki od faktora koji utječu na rast kristala. Naime, za dobivanje velikog monokristala pripremljena kristalizacijska ploča mora mirovati najmanje nekoliko dana do prvog pomicanja i provjeravanja da li su nastali kristali. Prijevremeno pomicanje može uzrokovati pojavu mnoštva mikrokristala.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Eksperimentalni postupci

Kristali klor-derivata goveđeg i ljudskog inzulina, kristali jod-derivata ljudskog inzulina, te nehalogeni derivati ljudskog inzulina priređeni su na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodosolovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Korišteni su komercijalno dostupni goveđi i ljudski inzulin proizvođača Sigma. Sve soli i ostali reagensi korišteni u eksperimentalnom dijelu (proizvođač: Kemika) su korišteni bez daljnjeg pročišćavanja.

Za podešavanje točne pH vrijednosti pufera, korišten je pH metar, Mettler Toledo MC226. Kristalizacija je provedena metodom difuzije para viseće kapi, koju je uveo Cutfield<sup>37</sup> te usavršio Xiao<sup>38</sup>. U eksperimentu su korištene Hampton Research VDX ploče.

Eksperimentalni uvjeti korišteni za kristalizaciju navedenih derivata inzulina navedeni su u Dodatku (tablica 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 i 12).

Kristali su promatrani svjetlosnim mikroskopom Olympus SZX 12 i snimljeni digitalnim fotoaparatom Olympus C-4040 ZOOM.

Preliminarno sakupljanje difrakcijskih podataka izvršeno je na instrumentu Oxford diffraction Xcalibur 3 s CCD detektorom s bakrenom anodom (Cu- $K\alpha$  zračenje) u struji dušika pri 100 K. Podaci pri većem razlučenju su zatim snimljeni u sinkrotronu Elettra u Trstu.

#### 3.1.1. Priprema otopina precipitantnih reagensa

##### a) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O

Odvagano je 1,65 g cinkovog(II) acetata dihidrata (molarna masa 219,51 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

b) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Co · 4H<sub>2</sub>O

Odvagano je 3,74 g kobaltovog(II) acetata tetrahidrata (molarna masa 249,08 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

c) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O

Odvagano je 2,18 g niklovog(II) nitrata heksahidrata (molarna masa 290,81 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

d) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O

Odvagano je 1,27 g manganovog(II) sulfata monohidrata (molarna masa 169,02 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

e) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu · H<sub>2</sub>O

Odvagano je 1,49 g bakrovog(II) acetata monohidrata (molarna masa 199,65 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

f) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O

Odvagano je 9,27 g amonijevog heptamolibdata tetrahidrata (molarna masa 1235,86 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

g) Priprema 0,15 mol dm<sup>-3</sup> otopine VOSO<sub>4</sub>

Odvagano je 1,22 g vanadilovog sulfata (molarna masa 163,01 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

h) Priprema 5 mol dm<sup>-3</sup> otopine NaCl

Odvagano je 14,61 g natrijevog klorida (molarna masa 58,44 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 50 mL s destiliranom vodom.

i) Priprema 5 mol dm<sup>-3</sup> otopine NaI

Odvagano je 18,73 g natrijevog jodida (molarna masa 149,89 g mol<sup>-1</sup>) i nadopunjeno do 25 mL s destiliranom vodom.

### 3.1.2. Priprema otopine pufera

Odvagano je 11,76 g natrijeva citrata dihidrata ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , molarna masa 293,97 g  $\text{mol}^{-1}$ ) i nadopunjeno do 40 mL s destiliranom vodom čime je dobivena otopina koncentracije 1 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Za podešavanje pH-vrijednosti na 6,4 korištena je vodena otopina limunske kiseline ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , molarna masa 210,14 g  $\text{mol}^{-1}$ ) koncentracije 1 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Vodena otopina limunske kiseline priređena je vaganjem 10,51 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i nadopunjivanjem do 50 mL s destiliranom vodom. Pomoću pH metra podešen je pH otopine na 6,4.

### 3.1.3. Priprema otopine proteina

Budući da ni ljudski ni goveđi inzulin nisu dobro topljivi u vodi, priređene su otopine u razrijeđenim kiselinama. Za kristalizaciju klor-derivata inzulina oba proteina su otopljena u 0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline do koncentracije od 3,00 mg  $\text{cm}^{-3}$  (3,00 mg inzulina otopljeno je u 1  $\text{cm}^3$  0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini HCl), odnosno do koncentracije od 7,50 mg  $\text{cm}^{-3}$  (7,50 mg inzulina otopljeno je u 1  $\text{cm}^3$  0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini HCl).

Za kristalizaciju jod-derivata inzulina, ljudski protein je otopljen u 0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini jodovodične kiseline do koncentracije od 3,00 mg  $\text{cm}^{-3}$  (3,00 mg inzulina otopljeno je u 1  $\text{cm}^3$  0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini HI), odnosno do koncentracije od 7,50 mg  $\text{cm}^{-3}$  (7,50 mg inzulina otopljeno je u 1  $\text{cm}^3$  0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopini HI).

### 3.1.4. Metoda kristalizacije

Kristali klor-, jod- i nehalogenih derivata goveđeg i ljudskog inzulina dobiveni su metodom difuzije para viseće kapi pomoću Hampton Research VDX ploča (slika 19). Svaka ploča sastojala se od 24 spremnika (4 reda x 6 stupaca). Dimenzije pojedinog spremnika iznosile su 15,0 x 10,6 x 2,2 cm.

Nakon priređivanja potrebnih otopina proteina, uslijedilo je ispunjavanje svakog spremnika na Hampton Research VDX ploči s 1  $\text{cm}^3$  precipitantne otopine. Precipitantna otopina se sastojala od 100  $\text{mm}^3$  pufera (1 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopina natrijeva citrata podešena na vrijednost pH od 6,4 s 1 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopinom limunske kiseline), 100  $\text{mm}^3$  acetona, te varirajućih volumena 5 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopina natrijevog klorida (za klor-derivat) ili natrijevog jodida (za jod-derivat) i 0,15 mol  $\text{dm}^{-3}$  otopine određene soli (cinkovog acetata dihidrata,



kobaltovog(II) acetata tetrahidrata, niklovog(II) nitrata heksahidrata, manganovog(II) sulfata monohidrata, bakrovog(II) acetata monohidrata, amonijevog heptamolibdata tetrahidrata ili vanadilovog sulfata). Do 1 cm<sup>3</sup> spremnik je nadopunjen redestiliranom vodom.



**Slika 19.** Prikaz Hampton Research VDX ploča.

Eksperimentalni uvjeti korišteni za kristalizaciju klor- i jod-derivata inzulina se nalaze u tablicama u Dodatku.

Nakon što su svi spremnici na ploči ispunjeni 1 cm<sup>3</sup> precipitantnom otopinom, potrebno je nanijeti malu količinu otopine proteina u obliku kapi (volumena 1 ili 1,5 mm<sup>3</sup>) i na tu kap se nanosi precipitantna otopina istog volumena pomoću mikropipete na silikonizirano pokrovno stakalce. Stakalce s kapima je potrebno oprezno preokrenuti i staviti na nosače pojedinog spremnika, tako da kapi vise iznad spremnika. Kada se sva stakalca postave na spremnike, ploča se zatvara posebnom prozirnom ljepljivom trakom (slika 20).



**Slika 20.** Prozirna ljepljiva traka koja služi za zatvaranje Hampton Research VDX ploča.

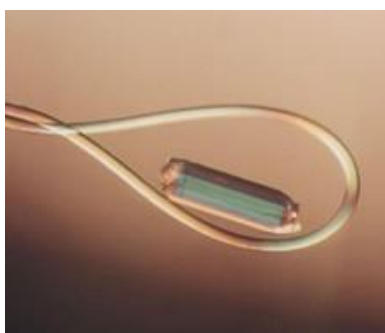
Ploče su držane u mraku, na temperaturi od 20 °C. Kristali počinju nastajati već nakon 3 do 5 dana, te mogu nastajati čak i do 6 mjeseci nakon postavljene kristalizacije. Nakon što su kristali nastali, promatrani su svjetlosnim mikroskopom i snimljeni digitalnim fotoaparatom (slike se nalaze u Dodatku).

Budući da se u kapi i spremniku nalaze različite koncentracije otopina precipitata, dolazi do isparavanja vode u spremnik. To dovodi do povećanja koncentracije proteina, čime započinje kristalizacija. Do uspješne kristalizacije nije lako doći, pa je potrebno varirati različite uvjete (temperaturu, koncentraciju precipitantnih reagensa, koncentraciju proteina i veličinu kapi), što uvjetuje veliku količinu ponavljanja eksperimenta.

### 3.2. Sakupljanje podataka metodom difrakcije rentgenskog zračenja na monokristalu

Svako nastajanje kristala ne mora nužno značiti da su ti kristali pogodni za snimanje metodom difrakcije rentgenskih zraka. Naime, da bi se moglo odrediti u kojem sustavu kristalizira određeni protein, potrebno je dobiti monokristale odgovarajuće kvalitete. Kada su takvi kristali dobiveni, vrši se eksperiment difrakcijskog zračenja<sup>34</sup>.

Pokrovno stakalce sa željenim kristalom se uzima pincetom i okrene, te stavlja pod mikroskop. Kristal se iz kapi zahvati najlonskom omčom (promjera od 0,05 do 1 mm), koja se nalazi na metalnom magnetskom nosaču, i ostaje unutar omče zbog površinske napetosti (slika 21).



**Slika 21.** Kristal uspješno uhvaćen u najlonsku omču.

Odabrani kristal se zatim iz kapi u kojoj se nalazio, prenosi u otopinu krioprotektanta (70 % matičnice i 30 % glicerol) gdje ga ostavimo na par minuta da bi se provjerilo da nije došlo do promjena na samom kristalu. Kristal je nužno prije samog snimanja na kratko držati u otopini krioprotektanta jer se snimanje odvija na 100 K, što lako može narušiti strukturu kristala budući da kristal proteina sadrži velik broj molekula vode.

Zatim se kristal opet zahvati najlonskom omčom i postavlja na goniometarsku glavu rentgenskog difraktometra (slika 22) gdje se naglo hladi u parama dušika pri temperaturi od 100 K.



**Slika 22.** Postavljanje kristala na goniometrijsku glavu rentgenskog difraktometra.

Eksperiment difrakcije rentgenskog zračenja proveden je na sljedećim kristalima: cinkovog(II) klor-derivata, cinkovog(II) jod-derivata i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina.

Kristali su snimljeni u sinkrotronu Elettra (slika 23) u Trstu (zračenje valne duljine 1,0 Å). Dobiveni podaci su obrađeni pomoću programskog paketa MOSFLM<sup>39</sup> te su određeni parametri jedinične ćelije za svaki kristal.



**Slika 23.** Multidisciplinarni sinkrotronski laboratorij Elettra u Trstu.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvjeti kristalizacije

Svaki protein je jedinstven, stoga se parametri pogodni za kristalizaciju određuju posebno za svaki protein. Tako se i u ovom slučaju mijenjanjem različitih kristalizacijskih uvjeta došlo do pogodnih jediničnih kristala halogenidnih i nehalogenidnih derivata goveđeg i ljudskog inzulina. U Dodatku se nalaze tablice u kojima su navedeni eksperimentalni uvjeti kod kojih je došlo do kristalizacije.

Optimalni uvjeti za kristalizaciju **cinkovog(II) klor-derivata goveđeg i ljudskog inzulina** su sljedeći (tablica 2): množinska koncentracija natrijevog klorida za goveđi derivat inzulina između 1,25 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>, odnosno za ljudski derivat inzulina između 0,75 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>, te koncentracija cinkovog(II) acetata dihidrata između 0,022 i 0,045 mol dm<sup>-3</sup> za oba derivata. Precipitantna otopina se sastojala od 100 mm<sup>3</sup> pufera, 100 mm<sup>3</sup> acetona te od rastućih volumena otopina cinkova acetata dihidrata i natrijeva klorida čime je varirana njihova koncentracija u matičnici. Na taj način se ispitaio utjecaj koncentracije proteina i soli (natrijevog klorida i cinkovog(II) acetata dihidrata) na kristalizaciju. Početna koncentracija proteina bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, a protein je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini klorovodične kiseline.

Kod nižih koncentracija obaju soli, nije došlo do nastanka kristala ili je nastalo puno sitnih kristalića koji su činili talog u kapima. Može se primjetiti iz rezultata da je ljudski klor-derivat inzulina kristalizirao i pri nižim koncentracijama natrijevog klorida, dok goveđi klor-derivat nije.

Za dobivanje kristala **cinkova(II) jod-derivata ljudskog inzulina**, optimalni uvjeti su (tablica 2): množinska koncentracija natrijevog jodida između 0,60 i 1,05 mol dm<sup>-3</sup> i množinska koncentracija cinkovog(II) acetata dihidrata od 0,022 mol dm<sup>-3</sup>. Precipitantna otopina se sastojala od 100 mm<sup>3</sup> pufera, 100 mm<sup>3</sup> acetona, te od stalnih volumena otopine cinkova(II) acetata dihidrata i rastućih volumena otopina natrijeva jodida. Na taj način se ispitaio utjecaj koncentracije proteina i soli (natrijevog jodida) na kristalizaciju. Početna koncentracija proteina bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> a protein je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini jodovodične kiseline. Porastom koncentracije natrijeva jodida,

nastajalo je sve više kristala, ali su pri najvećim ispitanim koncentracijama većinom bili srasli ili napukli. Uzrok tome je vjerojatno prevelika brzina rasta kristala.

Za **kristalizaciju kobaltova(II) klor-derivata ljudskog inzulina** su optimalni uvjeti sljedeći (tablica 2): množinska koncentracija natrijevog klorida između 1,00 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>, te kobaltovog(II) acetata tetrahidrata između 0,022 i 0,045 mol dm<sup>-3</sup>. Matičnica se sastojala od 100 mm<sup>3</sup> pufera, 100 mm<sup>3</sup> acetona, te od sve manjih volumena otopine kobaltova(II) acetata tetrahidrata i rastućih volumena otopina natrijeva klorida. Na taj način se ispitao utjecaj koncentracije proteina i soli (natrijevog klorida i kobaltovog(II) acetata tetrahidrata) na kristalizaciju. Početna koncentracija proteina bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> a protein je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini klorovodične kiseline.

Više puta su se nastojali dobiti kristali kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina. U ovom radu su navedeni kristalizacijski uvjeti na dvije ploče (tablica 8 i 10 u Dodatku) u kojima su nastali navedeni kristali. Naime, na ploči koja je stajala duže od pola godine, zamijećene su promjene boje precipitantne otopine i matičnice (od svijetlo ružičaste do ljubičaste) a kristali su bili ružičaste boje, što je i snimljeno (slika 52, 53 i 54 u Dodatku). Takve promjene u boji precipitantne otopine i matičnice su dokaz supstitucije iona cinka sa ionom kobalta u kristalu inzulina<sup>40</sup>.

Za dobivanje kristala **niklova(II) klor-derivata ljudskog inzulina** potrebni su ovi uvjeti (tablica 2): množinska koncentracija natrijevog klorida između 1,50 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>, te niklovog(II) nitrata heksahidrata između 0,030 i 0,037 mol dm<sup>-3</sup>. Precipitantna otopina se sastojala od 100 mm<sup>3</sup> pufera, 100 mm<sup>3</sup> acetona, te od sve manjih volumena otopine niklovog(II) nitrata heksahidrata i rastućih volumena otopina natrijeva klorida. Na taj način se ispitao utjecaj koncentracije proteina i soli (natrijevog klorida i niklovog(II) nitrata heksahidrata) na kristalizaciju. Početna koncentracija proteina bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> a protein je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini klorovodične kiseline.

Odgovarajući monokristali su nastali pri višim koncentracijama natrijevog klorida, dok pri manjim koncentracijama nije nastalo ništa ili puno malih kristalića koji su tvorili talog. U uvjetima navedenima u tablici 2 nastaju kristali pogodni za eksperiment difrakcije. Ti kristali su zadovoljavajuće veličine, te nisu napukli ili srasli.

**Tablica 2.** Prikaz optimalnih uvjeta za kristalizaciju cinkovog(II) klor-derivata goveđeg i ljudskog inzulina, te cinkovog(II) jod-, kobaltovog(II) klor-, niklovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina.

	DERIVAT INZULINA				
	GOVEĐI	LJUDSKI			
	cinkov(II) klor-derivat	cinkov(II) klor-derivat	cinkov(II) jod-derivat	kobaltov(II) klor-derivat	niklov(II) klor-derivat
$c(\text{NaCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	1,25 - 2,00	0,75 - 2,00	-	1,00 - 2,00	1,50 - 2,00
$c(\text{NaI}) / \text{mol dm}^{-3}$	-	-	0,60 - 1,05	-	-
$c(\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	0,022 - 0,045	0,022 - 0,045	0,022	-	-
$c(\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	-	-	-	0,022 - 0,045	-
$c(\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	-	-	-	-	0,030 - 0,037
$c(\text{pufer, C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pH (pufer, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
$V(10\% \text{ aceton}) / \text{mm}^3$	100	100	100	100	100
$\gamma(\text{inzulin}) / \text{mg cm}^{-3}$	3,00	3,00	3,00 i 7,50	3,00 i 7,50	3,00 i 7,50
$t / ^\circ\text{C}$	20	20	20	20	20

Kristali **manganovog(II) klor-, bakrovog(II) klor- i vanadijevog(IV) derivata ljudskog inzulina** su dobiveni samo u jednom spremniku odgovarajuće ploče.

Zanimljivo je da je dobiveni kristal manganovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina bio iznimno velik i pravilan (slika 58 u Dodatku), te da je bio jedini kristal na svojoj ploči. Njegovi kristalizacijski uvjeti su bili (tablica 3): množinska koncentracija natrijevog klorida od  $1,50 \text{ mol dm}^{-3}$ , te množinska koncentracija manganovog(II) sulfata monohidrata od  $0,022 \text{ mol dm}^{-3}$ . Na taj način se ispitaio utjecaj koncentracije proteina i soli (natrijevog klorida i niklovog(II) nitrata heksahidrata) na kristalizaciju. Početna koncentracija proteina bila je  $3,00 \text{ mg cm}^{-3}$ , a protein je bio otopljen u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline.

Kod kristalizacije bakrovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina, nije nastalo ništa ili je nastajalo jako puno sitnih kristalića. Tek u jednom spremniku su primjećeni, doduše manji, ali

pravilni kristali koji su se činili pogodnim za drugi dio eksperimenta (slika 59 u Dodatku). Kristalizacijski uvjeti tog spremnika su bili (tablica 3): množinska koncentracija natrijevog klorida od  $1,50 \text{ mol dm}^{-3}$ , te množinska koncentracija bakrovog(II) acetata monohidrata od  $0,037 \text{ mol dm}^{-3}$ . Početna koncentracija proteina bila je  $3,00 \text{ mg cm}^{-3}$ , a protein je bio otopljen u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline.

Pokušavalo se također dobiti kristale vanadijevog(IV) i vanadijevog(IV) klor-derivata. Međutim, samo su dobiveni kristali vanadijevog(IV) derivata ljudskog inzulina i to samo u jednom spremniku na ploči. Ostali spremnici ili nisu sadržavali ništa ili su imali puno malih kristalića. Kristalizacijski uvjeti pri kojima su dobiveni manji kristali i glatkih rubova (slika 70 u Dodatku) su (tablica 3) množinska koncentracija vanadilovog(IV) sulfata od  $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ . Početna koncentracija proteina bila je  $3,00 \text{ mg cm}^{-3}$ , a protein je bio otopljen u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline.

Optimalni uvjeti za dobivanje kristala **molibdenovog(VI) derivata ljudskog inzulina** bili su sljedeći (tablica 3): množinska koncentracija amonijevog heptamolibdata tetrahidrata između  $0,030$  i  $0,048 \text{ mol dm}^{-3}$ . Početna koncentracija proteina bila je  $3,00 \text{ mg cm}^{-3}$ , odnosno  $7,50 \text{ mg cm}^{-3}$ , a protein je bio otopljen u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline. Povoljni kristalizacijski uvjeti za dobivanje kristala molibdenovog(VI) klor-derivata ljudskog inzulina (tablica 3) razlikuju se od uvjeta za dobivanje kristala molibdenovog(VI) derivata ljudskog inzulina jedino u tome što je optimalna množinska koncentracija amonijevog heptamolibdata tetrahidrata bila između  $0,022$  i  $0,045 \text{ mol dm}^{-3}$ , te u tome što je u precipitantnu otopinu dodana otopina  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  natrijevog klorida čija je optimalna množinska koncentracija za kristalizaciju iznosila između  $1,00$  i  $2,00 \text{ mol dm}^{-3}$ . Početna koncentracija proteina bila je  $3,00 \text{ mg cm}^{-3}$ , odnosno  $7,50 \text{ mg cm}^{-3}$  a protein je bio otopljen u  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  otopini klorovodične kiseline.

Primjećeno je da je puno više kristala molibdenovog(VI) derivata nastalo pri većim nego pri manjim koncentracijama amonijevog heptamolibdata tetrahidrata, dok su skoro u većini spremnika na odgovarajućoj ploči dobiveni kristali molibdenovog(VI) klor-derivata ljudskog inzulina (slika 65, 66, 67, 68 i 69 u Dodatku).

Uvjeti za nastanak kristala povoljnijih za eksperiment difrakcije se nalaze u tablici na idućoj stranici.

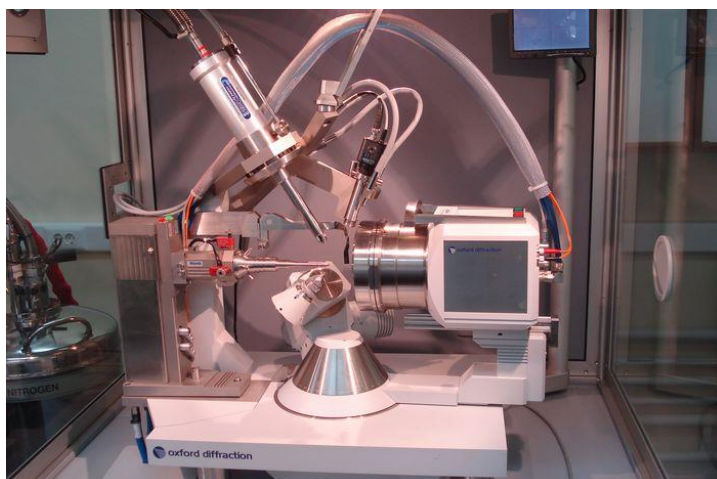
**Tablica 3.** Prikaz optimalnih uvjeta za kristalizaciju manganovog(II) klor-, bakrovog(II) klor-, vanadijevog(IV), molibdenovog(VI) i molibdenovog(VI) klor-derivata ljudskog inzulina.

	DERIVAT LJUDSKOG INZULINA				
	manganov(II) klor-derivat	bakrov(II) klor-derivat	vanadijev (IV) derivate	molibdenov(VI) derivat	molibdenov(VI) klor-derivat
$c(\text{NaCl}) / \text{mol dm}^{-3}$	1,50	1,50	-	-	1,00 - 2,00
$c(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	0,022	-	-	-	-
$c(\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	-	0,037	-	-	-
$c((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	-	-	-	0,030 - 0,048	0,022 - 0,045
$c(\text{VOSO}_4) / \text{mol dm}^{-3}$	-	-	0,015	-	-
$c(\text{pufer, C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) / \text{mol dm}^{-3}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pH (pufer, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
$V(10\% \text{ aceton}) / \text{mm}^3$	100	100	100	100	100
$\gamma(\text{inzulin}) / \text{mg cm}^{-3}$	3,00	3,00	3,00	3,00 i 7,50	3,00 i 7,50
$t / ^\circ\text{C}$	20	20	20	20	20

## 4.2. Difrakcijska mjerenja

Eksperiment difrakcije rentgenskih zraka na monokristalima cinkovog(II) klor-derivata i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina proveden je na sinkrotronu Elettra u Trstu, na liniji XRD1 s 2M Pilatus detektorom. Na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu je proveden eksperiment difrakcije rentgenskih zraka na monokristalu cinkovog(II) jodo-derivata ljudskog inzulina pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 3 difraktometra s CCD detektorom, s  $\text{Cu-K}_\alpha$  zračenjem (slika 24).





**Slika 24.** Oxford Diffraction Xcalibur 3 difraktometar.

Dobiveni podaci su obrađeni pomoću kompjutorskog programskog paketa MOSFLM<sup>39</sup> i tako su određeni parametri jedinične ćelije i kristalni sustav gore navedenih derivata ljudskog inzulina (tablica 4).

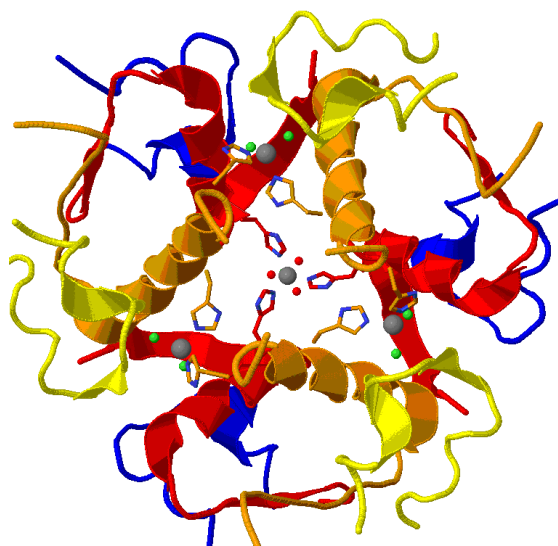
**Tablica 4.** Rezultati mjerenja dobiveni difrakcijom rentgenskih zraka na kristalima cinkovog(II) klor-derivata, cinkovog (II) jod-derivata i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina.

	LJUDSKI DERIVAT INZULINA		
	cinkov(II) klor-derivat	cinkov(II) jod-derivat	kobaltov(II) klor-derivat
KRISTALNI SUSTAV	trigonski	Trigonski	trigonski
	<i>R</i> 3	<i>R</i> 3	<i>R</i> 3
PROSTORNA GRUPA	(heksagonska rešetka)	(heksagonska rešetka)	(heksagonska rešetka)
TEMPERATURA / K	100	100	100
VALNA DULJINA / Å	1,00	1,00	1,00
NAJVEĆA REZOLUCIJA / Å	1,41	1,22	1,22
PARAMETRI JEDINIČNE ĆELIJE / Å	$a = b = 79,79$ $c = 36,78$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$a = b = 79,60$ $c = 37,28$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$a = b = 45,93$ $c = 116,98$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
BROJ REFLEKSA	16481	22138	26625

### 4.3. Struktura cinkovog(II) klor-, cinkovog(II) jod-, kobaltovog(II) i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina

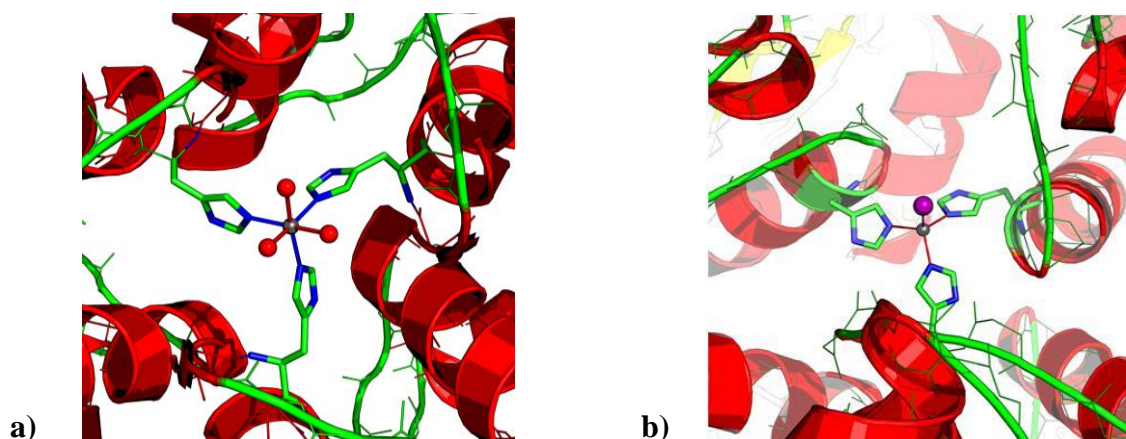
Cinkov(II) klor-derivat ljudskog inzulina pripada 4Zn tipu ( $T_3R_3^f$  tipu), kristalizira u trigonskom sustavu, u prostornoj grupi  $R3$ . Jedinična ćelija mu sadrži šest heksamera  $T_3R_3^f$  koji posjeduju kristalografsku os simetrije trećeg reda, a svaki heksamer sadrži četiri iona cinka. Asimetrična jedinica se sastoji od jednog  $TR^f$  dimera (lanci A, B, C, D) koji se sastoji od dva različita monomera. Upravo je  $T_3R_3^f$  struktura ljudskog inzulina prva riješena struktura proteina metodom difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku<sup>41</sup>. Međutim, u ovom slučaju nije došlo do dvostrukog produljenja (produljenje osi  $c$ ), kao što inače dolazi kod ovog derivata inzulina pri temperaturi od 100 K.

$T_3R_3^f$  heksamer sadrži četiri cinkova iona. Jedan cinkov ion je smješten na osi trećeg reda i oktaedarski je koordiniran sa tri atoma dušika iz HisB10 / HisF10, te s tri kisikova atoma iz tri molekule vode (slika 25) ili tetraedarski s tri dušikova atoma iz HisB10 / HisF10, te klorovim ionom. Naime, kod ovakve dualne koordinacije vjerojatnost za oktaedarsku ili tetraedarsku koordinaciju iznosi 50%.<sup>22</sup> Ostala tri cinkova iona su tetraedarski koordinirana s dva iona klora i dva dušikova atoma iz HisD5 / HisH5 (slika 25).



**Slika 25.** Prikaz oktaedarske i tetraedarske koordinacije cinkovih iona u  $T_3R_3^f$  heksameru cinkovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina. Cinkovi ioni su prikazani kao sivi, molekule vode kao crveni i ioni klora kao zeleni kružići.

**Cinkov(II) jod-derivat ljudskog inzulina** pripada 2Zn tipu, međutim  $T_3R_3$  tipu koji je inače atipičan za 2Zn tip. Cinkovi ioni na trigiri također imaju dualnu koordinaciju: oktaedarski su koordinirani s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i tri kisikova atoma iz tri molekule vode (slika 26a) ili tetraedarski s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i s jodidnim ionom (slika 26b). I ovdje je zastupljenost obje koordinacije podjednaka.

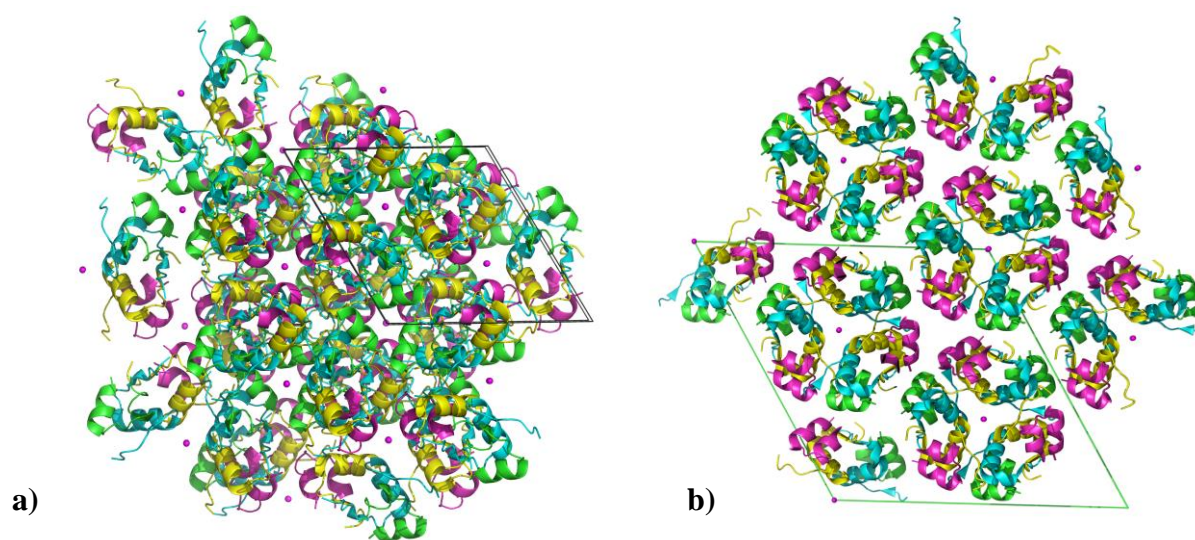


**Slika 26.** Prikazi dualne koordinacije cinkovih iona u  $T_6$  heksameru cinkovog(II) jodo-derivata ljudskog inzulina:

- a) Oktaedarska koordinacija cinkovog iona;
- b) Tetraedarska koordinacija cinkovog iona.

**Kobaltov(II) derivat ljudskog inzulina** pripada 2Zn tipu ( $T_6$  tipu)<sup>3</sup>, te mu se u jediničnoj ćeliji nalaze tri heksamera. Asimetrična jedinica sadrži jedan dimer,  $T_2$  (lanci A, B, C i D), koji se sastoji od dva identična monomera. Svaki heksamer se sastoji od dva iona kobalta koji su oktaedarski koordinirani s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i s tri kisikova atoma iz tri molekule vode.

U ovom radu dobiveni su drugačiji parametri jedinične ćelije za **kobaltov(II) klor-derivat ljudskog inzulina** (tablica 4). Iako je struktura kobaltovog(II) klor-derivata ista kao i ona kobaltovog(II) derivata, njegovo pakiranje u jediničnu ćeliju se razlikuje (slika 27a). Klorovi ioni su izazvali drugačije pakiranje, ali ne i promjenu koordinacije kobaltovog iona.



**Slika 27. a)** Dijagram pakiranja kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina (gledano duž  $c$  os).

**b)** Dijagram pakiranja kobaltovog(II) derivata svinjskog inzulina (gledano duž  $c$  os).

## § 5. ZAKLJUČAK

Pomoću metode difuzije para u visećoj kapi pri temperaturi od 20 °C nakon nekoliko dana dobiveni su sljedeći pravilni monokristali: cinkov(II) klor-derivat goveđeg i ljudskog inzulina, te cinkov(II) jod-, kobaltov(II) klor-, niklov(II) klor-, manganov(II) klor-, bakrov(II) klor-, vanadijev(IV), molibdenov(VI) i molibdenov(VI) klor-derivat ljudskog inzulina.

Kruti uzorak goveđeg i ljudskog inzulina otopljen je u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl za klor-derivat, odnosno 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HI za ljudski jod-derivat, do koncentracije od 3,00 i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>. Kristali su se stvarali iz kapi koje su sadržavale otopinu inzulina i precipitantnu otopinu. Precipitantna otopina se sastojala od pufera (1 mol dm<sup>-3</sup> vodena otopina natrijevog citrata dihidrata s pH vrijednošću podešenom na 6,4), acetona, redestilirane vode i otopina soli (za cinkove(II) klor-derivat NaCl i (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O, za cinkov(II) jod-derivat NaI i (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O, za kobaltov(II) klor-derivat NaCl i (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Co · 4H<sub>2</sub>O, za niklov(II) klor-derivat NaCl i Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, za manganov(II) klor-derivat NaCl i MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, za bakrov(II) klor-derivat NaCl i (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu · H<sub>2</sub>O, za vanadijev(IV) derivat VOSO<sub>4</sub> i za molibdenove(VI) derivate (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O sa ili bez dodatka NaCl).

Množinska koncentracija (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni pravilni monokristali cinkovog(II) klor-derivata goveđeg i ljudskog inzulina bila je između 0,022 i 0,045 mol dm<sup>-3</sup>. Ova dva derivata su se razlikovala po koncentracijama natrijevog klorida potrebnih za dobivanje monokristala i to na sljedeći način: za goveđi derivat optimalne koncentracije NaCl su bile između 1,25 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>, odnosno za ljudski derivat inzulina između 0,75 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni pravilni monokristali cinkovog(II) jod-derivata ljudskog inzulina bila je 0,022 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracije natrijevog jodida su bile između 0,60 i 1,05 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini jodovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup> i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Co · 4H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni pravilni monokristali kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina bila je između 0,022 i 0,045 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracije natrijevog klorida su bile između 1,00 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>. Početna

koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup> i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni pravilni monokristali niklovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina bila je između 0,030 i 0,037 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracije natrijevog klorida su bile između 1,50 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup> i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O pri kojoj je dobiven jedan pravilan monokristal manganovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina bila je 0,022 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracija natrijevog klorida je bila 1,50 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu · H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni manji pravilni monokristali bakrovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina bila je 0,037 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracija natrijevog klorida je bila 1,50 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija VOSO<sub>4</sub> pri kojoj su dobiveni manji pravilni monokristali vanadijevog(IV) derivata ljudskog inzulina bila je 0,015 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>.

Množinska koncentracija (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O pri kojoj su dobiveni pravilni monokristali molibdenovog(VI) klor-derivata ljudskog inzulina bila je između 0,022 i 0,045 mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracije natrijevog klorida su bile između 1,00 i 2,00 mol dm<sup>-3</sup>. Početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> bila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup> i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>. Za dobivanje pravilnih monokristala molibdenovog(VI) derivata ljudskog inzulina množinska koncentracija (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O bila je između 0,030 i 0,048 mol dm<sup>-3</sup>, a početna koncentracija proteina otopljenog u vodenoj otopini klorovodične kiseline koncentracije 0,02 mol dm<sup>-3</sup> iznosila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup> i 7,50 mg cm<sup>-3</sup>.

Dobiveni jedinični kristali cinkovog(II) klor-, cinkovog(II) jod- i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina su bili pogodni za prikupljanje difrakcijskih podataka. Eksperiment

difrakcije rentgenskih zraka na monokristalima cinkovog(II) klor-derivata i kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina proveden je na sinkrotronu Elettra u Trstu, na liniji XRD1 s 2M Pilatus detektorom.

Na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu je proveden eksperiment difrakcije rentgenskih zraka na monokristalu cinkovog(II) jod-derivata ljudskog inzulina pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 3 difraktometra s CCD detektorom, s Cu-K $\alpha$  zračenjem.

Cinkov(II) klor-, cinkov(II) jod- i kobaltov(II) klor-derivat ljudskog inzulina kristaliziraju u trigonskom sustavu, u prostornoj grupi  $R3$ . Cinkov(II) klor-derivat ima sljedeće parametre jedinične ćelije:  $a = b = 79,79 \text{ \AA}$ ,  $c = 36,78 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ , a vrlo slične ima i cinkov(II) jod-derivat:  $a = b = 79,60 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,28 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ . Dok kobaltov(II) klor-derivat ima neočekivano drugačije parametre jedinične ćelije:  $a = b = 45,93 \text{ \AA}$ ,  $c = 116,98 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ .

Cinkov(II) klor-derivat ljudskog inzulina pripada 4Zn tipu ( $T_3R_3^f$  tipu). Jedinična ćelija mu sadrži šest heksamera  $T_3R_3^f$ , a svaki heksamer sadrži četiri iona cinka. Jedan cinkov ion je smješten na osi trećeg reda i oktaedarski je koordiniran sa tri atoma dušika iz HisB10 / HisF10, te s tri kisikova atoma iz tri molekule vode ili tetraedarski s tri dušikova atoma iz HisB10 / HisF10 (dualna koordinacija), te klorovim ionom. Ostala tri cinkova iona su tetraedarski koordinirana s dva iona klora i dva dušikova atoma iz HisD5 / HisH5.

Cinkov(II) jod-derivat ljudskog inzulina pripada 2Zn tipu, te neočekivano  $T_3R_3$  tipu. Cinkovi ioni na trigiri također imaju dualnu koordinaciju: oktaedarski su koordinirani s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i tri kisikova atoma iz tri molekule vode ili tetraedarski s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i s jodidnim ionom.

Kobaltov(II) derivat ljudskog inzulina pripada 2Zn tipu ( $T_6$  tipu), te mu se u jediničnoj ćeliji nalaze tri heksamera. Svaki heksamer se sastoji od dva iona kobalta koji su oktaedarski koordinirani s tri dušikova atoma iz tri HisB10 / HisD10 i s tri kisikova atoma iz tri molekule vode. Iako je struktura kobaltovog(II) klor-derivata ista kao i ona kobaltovog(II) derivata, njegovo pakiranje u jediničnu ćeliju se razlikuje. Klorovi ioni su izazvali drugačije pakiranje, ali ne i promjenu koordinacije kobaltovog iona.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. F. Sanger and E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* **53** (1953) 353-366.
2. C. P. Hill, Z. Dauter, E. J. Dodson, G. G. Dodson and M. F. Dunn, *Biochemistry* **30** (1991) 917-924.
3. URL: <http://www.endotext.org/diabetes/diabetes1/diabatesframe1.html>, 25.10. 2011.
4. F. G. Banting and C. H. Best, *J. Lab. Clin. Med.* **7** (1922) 251-266.
5. H. Jensen and E. A. Evans, *The Journal of Biological Chemistry*, **108 (No.1)** (1934) 1-9.
6. Z. Kniewald, *Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena*, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb (1993)
7. S. A. Bearson and R. S. Yalow, *Am. J. Med.* **40** (1966) 676.
8. B. Prugovečki et al., *Croat. Chem. Acta* **82** (2) (2009) 433-438.
9. D.A. Scott and A.M. Fisher, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **55** (1934) 206.
10. G. Gold and G.M. Grodsky, *Experientia* **40** (1984) 1105-1114.
11. URL:<http://www.world-medicinehistory.com/2011/06/discovery-of-islets-of-langerhans.html>, 4.11.2011.
12. URL: <http://www.nobelprize.org/educational/medicine/insulin/discovery-insulin.html>, 4.11.2011.
13. URL:  
<http://inventors.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http://www.pbs.org/wgbh/aso/databank/entries/dm22in.html>, 5.11.2011.
14. URL: <http://www.medicalnewstoday.com/info/diabetes/discoveryofinsulin.php>, 5.11.2011.
15. J.F. Hansen and J. Brange, *Prot. Eng.* **1** (1987) 250.
16. A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith and R. Kitai, *Biochemical J.* **60** (1955) 541.
17. B.H. Frank, A.H. Pekar and A.J. Veros, *Diabetes Supp.(2a)* **21** (1972) 486.
18. J. J. Abel, *Proc. US Nat. Acad. Sci.* **12** (1926) 132-140.
19. M. J. Adams, T. L. Blundell, E. J. Dodson, G. G. Dodson, M. Vijayan, E. N. Baker, M. M. Harding, D. C. Hodgkin, B. Rimmer, S. Sheat, *Nature* **224** (1969) 491.
20. N. C. Kaarsholm, H. C. Ko and M. F. Dunn, *Biochemistry* **28** (1989) 4427-4435.
21. G. D. Smith, W. A. Pangborn and R.H. Blessing, *Acta Cryst.* **D59** (2003) 474-482.



22. E. Ciszak and G. D. Smith, *Biochemistry* **33** (1994) 1512-1517.
23. E. Ciszak, J. M. Beals, B. H. Frank, J. C. Baker, N. C. Carter and G. D. Smith, *Structure* **3** (1995) 615-622.
24. G. D. Smith, E. Ciszak, L. A. Magrum, W. A. Pangborn and R.H. Blessing, *Acta Cryst.* **D56** (2000) 1541-1548.
25. D. F. Steiner and P. C. Oyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57** (1967) 473-480.
26. B. H. Frank and A. J. Veros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32** (1968) 155-160.
27. W. W. Fullerton, R. Potter, B. W. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 1213-1219.
28. D. F. Steiner, *Harvey Lectures* **78** (1983) 191-228.
29. G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear*, Academic Press, San Diego (1993)
30. URL: [http://www.mitegen.com/products/jen\\_screens/Background\\_Information.pdf](http://www.mitegen.com/products/jen_screens/Background_Information.pdf), 14.11.2011.
31. URL: <http://people.pwf.cam.ac.uk/ml527/Publications/assets/Leunissen-literatureresearch.pdf>, 14.11.2011.
32. URL: <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Crystals/Theory/phases.html>, 14.11.2011.
33. URL: <http://web.mit.edu/physics/benedek/ArticlesMore/asherie2004.pdf>, 14.11.2011.
34. R. S. Rowlett, *Protein X-Ray Crystallography Methods*, 2<sup>nd</sup> Edition, Department of Chemistry, Colgate University, 2005.
35. URL: [http://hamptonresearch.com/tips\\_a\\_to\\_z.aspx?l=p](http://hamptonresearch.com/tips_a_to_z.aspx?l=p), 15.12.2011.
36. URL: <http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Crystallization/tipsandtricks.html>, 15.12.2011.
37. S. M. Cutfield, D. Phil, Thesis, University of Oxford, 1975.
38. B. Xiao, D. Phil, Thesis, University of York, 1990.
39. Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Cryst.* **D50** (1994) 760-763.
40. J. Nicholson, L. Perkins, and F. Körber, *Recent Res. Dev. Mol. Biol.* **3** (2006) 1-16.
41. R. B. Von Drele, P. W. Stephens, G. D. Smith and R. H. Blessing, *Acta Crystallogr.* **D56** (2000) 1549-1553.

## § 7. DODATAK

Dodatak sadrži eksperimentalne uvjete korištene za uspješnu kristalizaciju derivata inzulina metodom difuzije para u visećoj kapi.

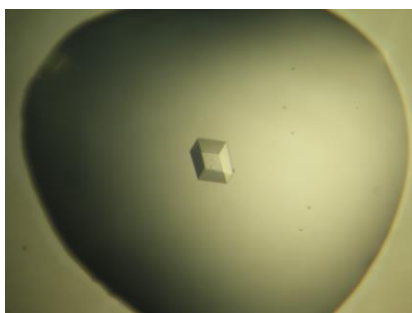
Svaka kućica tablice predstavlja jedan spremnik Hampton Research VDX ploče. Ukupni volumen precipitantne otopine u svakom spremniku Hampton Research VDX ploče iznosio je  $1 \text{ cm}^3$ . Sve vrijednosti u tablicama su izražene u  $\text{mm}^3$ .

Kristali su promatrani pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus SZX 12) i snimani pomoću digitalnog fotoaparata (Olympus C-4040 ZOOM).

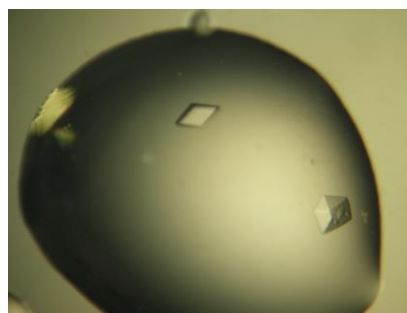
**Tablica 5.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije cinkovog(II) klor-derivata goveđeg inzulina (20.10.2009.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početna masena koncentracija goveđeg inzulina iznosila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, te je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl. Na pokrovna stakalca su nanošene otopine proteina u obliku kapi (gore: 1 i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup>) koje su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

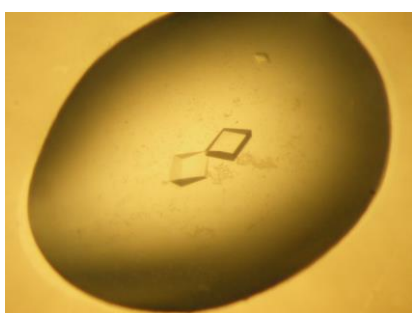
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno sitnih d: puno sitnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno sitnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki srasli, nepravilan d: <b>slika 28</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, srasli d: veliki, pravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, pravilna d: veliki, nepravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilan d: <b>slika 29</b>
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno sitnih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 30</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 31</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: mali, srasli d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: veliki, nepravilan
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno sitnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno sitnih d: puno sitnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno sitnih d: puno sitnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan i tri mala nepravilna d: dva mala, pravilna	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 32</b> d: <b>slika 33</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: velik, pravilan d: dva velika, pravilna
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno sitnih d: <b>slika 34</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: velik, pravilan d: velik, nepravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: velik, srasli d: <b>slika 35</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: veliki, nepravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, srasla d: četiri velika, nepravilna



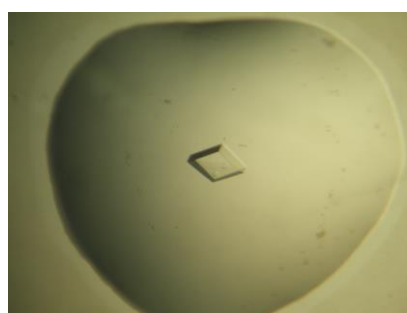
**Slika 28.**



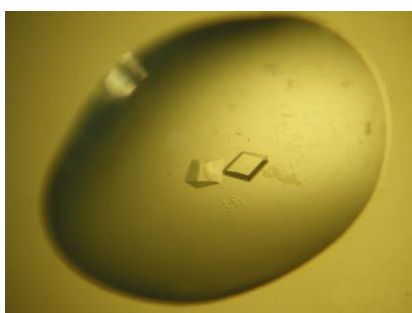
**Slika 29.**



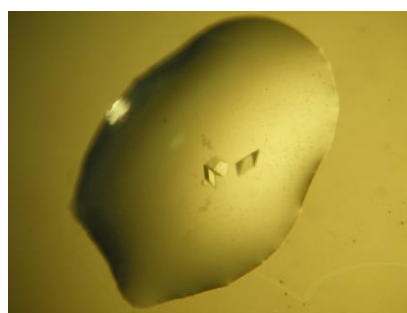
**Slika 30.**



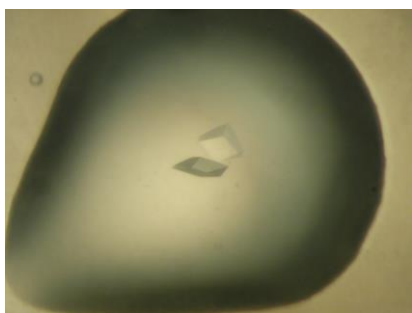
**Slika 31.**



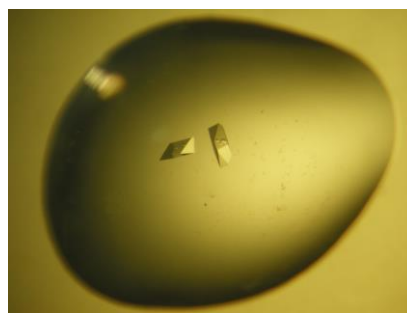
**Slika 32.**



**Slika 33.**



**Slika 34.**

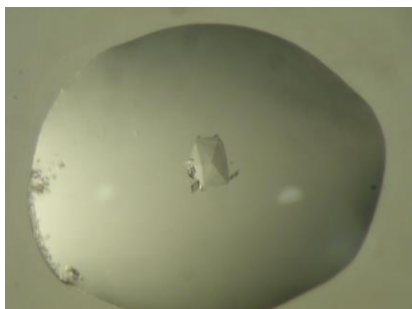


**Slika 35.**

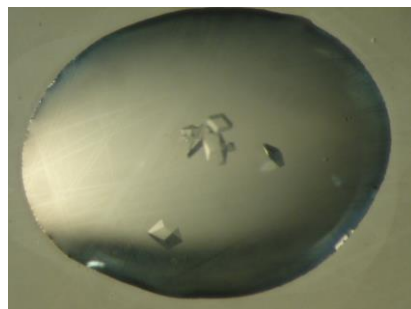
**Tablica 6.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije cinkovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina (8.02.2010.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početna masena koncentracija ljudskog inzulina iznosila je 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, te je bio otopljen u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl. Na pokrovna stakalca su nanošene otopine proteina u obliku kapi (gore: 1 i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup>) koje su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

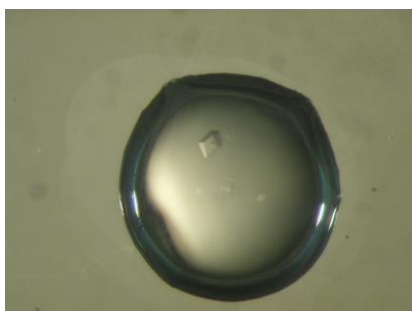
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: <b>slika 36</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: dva velika, srasla
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: mali, pravilan d: puno malih, pravilnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 37</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 38</b> d: veliki, srasli	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: mali, srasli d: veliki, srasli	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, srasla d: puno malih, sraslih
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 39</b> d: <b>slika 40</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, sraslih d: puno velikih, sraslih
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, pravilnih d: puno malih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: <b>slika 41</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: <b>slika 42</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, pravilnih d: veliki, nepravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: <b>slika 43</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: puno malih



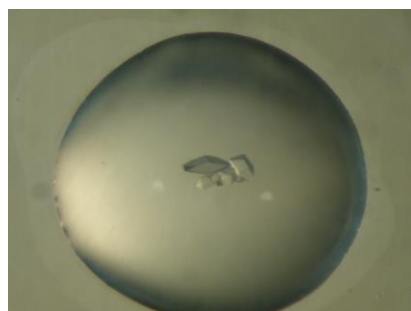
**Slika 36.**



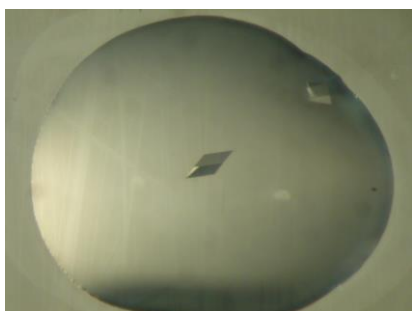
**Slika 37.**



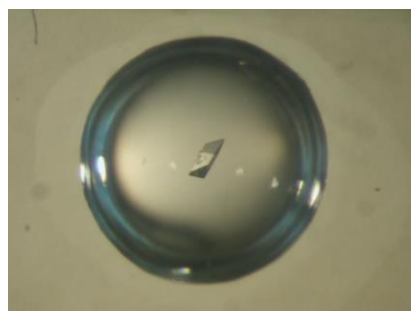
**Slika 38.**



**Slika 39.**



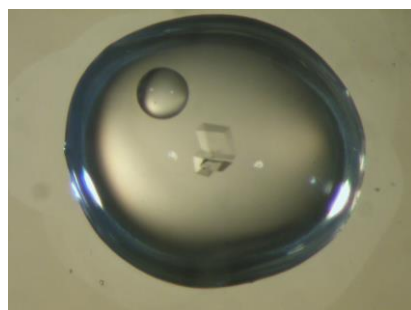
**Slika 40.**



**Slika 41.**



**Slika 42.**

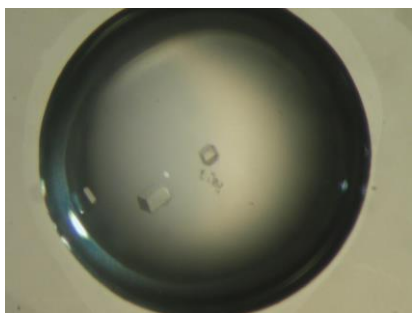


**Slika 43.**

**Tablica 7.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije cinkovog(II) jod-derivata ljudskog inzulina (8.02.2010.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HI i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

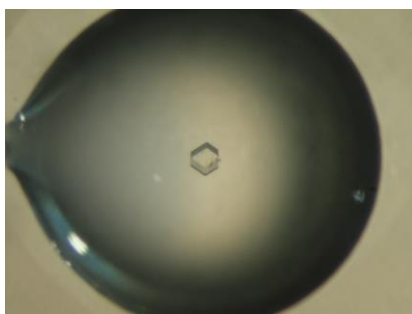
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 100 mm <sup>3</sup> NaI 550 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 105 mm <sup>3</sup> NaI 545 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, sraslih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 110 mm <sup>3</sup> NaI 540 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 115 mm <sup>3</sup> NaI 535 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 120 mm <sup>3</sup> NaI 530 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 44</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 125 mm <sup>3</sup> NaI 525 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilni, srasli d: ništa
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 130 mm <sup>3</sup> NaI 520 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, sraslih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 135 mm <sup>3</sup> NaI 515 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 45</b> d: nekoliko malih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 140 mm <sup>3</sup> NaI 510 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilan, srasli d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 145 mm <sup>3</sup> NaI 505 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika (pravilan i nepravilan) d: <b>slika 46</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaI 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, sraslih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 155 mm <sup>3</sup> NaI 495 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, sraslih d: puno malih, sraslih
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 160 mm <sup>3</sup> NaI 490 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 165 mm <sup>3</sup> NaI 485 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika kristala, srasla d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 170 mm <sup>3</sup> NaI 480 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilni, srasli d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 175 mm <sup>3</sup> NaI 475 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 47</b> d: puno malih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 180 mm <sup>3</sup> NaI 470 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 48</b> d: puno malih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 185 mm <sup>3</sup> NaI 465 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan i puno malih d: puno malih, sraslih
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 190 mm <sup>3</sup> NaI 460 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 49</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 195 mm <sup>3</sup> NaI 455 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaI 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki,, nepravilan, srasli d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 205 mm <sup>3</sup> NaI 445 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilan, srasli d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 210 mm <sup>3</sup> NaI 440 mm <sup>3</sup> voda ----- g: pet velikih, nepravilnih d: nekoliko malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn ·2H <sub>2</sub> O 215 mm <sup>3</sup> NaI 435 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih



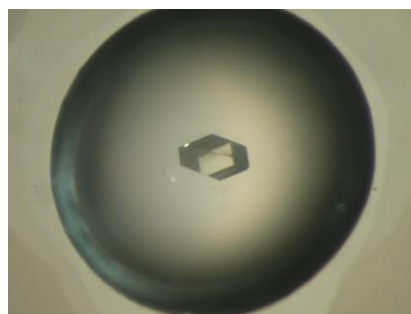
**Slika 44.**



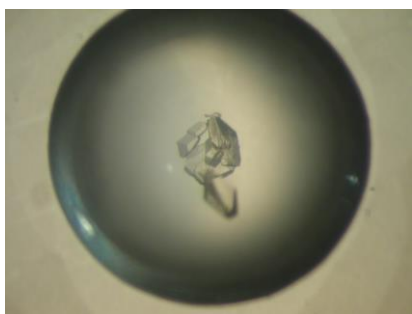
**Slika 45.**



**Slika 46.**



**Slika 47.**



**Slika 48.**

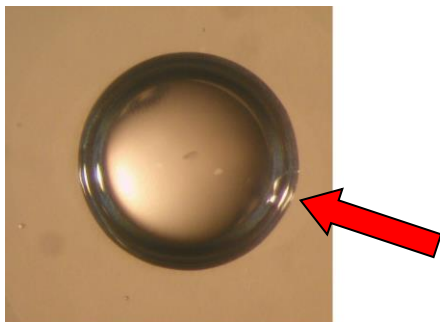


**Slika 49.**

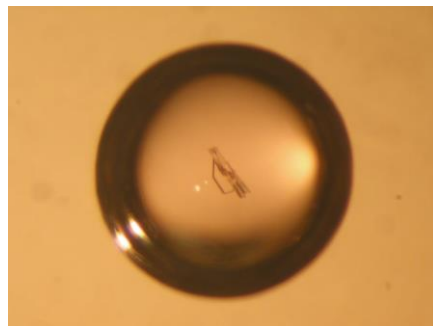


**Tablica 8.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije kobaltovog(II) klor-derivata ljudskog inzulina (8.02.2010.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C. Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

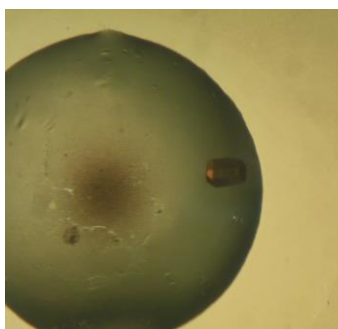
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: mali, nepravilan, srasli	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 50</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 51</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: veliki, nepravilni, srasli	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih, nepravilnih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilni, srasli d: puno malih, nepravilnih, sraslih
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih, nepravilnih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan, srasli d: veliki, pravilan, srasli	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, nepravilnih, sraslih d: puno malih
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: mali, nepravilni d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 52</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 53</b> d: <b>slika 54</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilni, srasli d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilni, srasli d: puno malih
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 150 mm <sup>3</sup> NaCl 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 250 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno velikih, nepravilnih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 350 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa



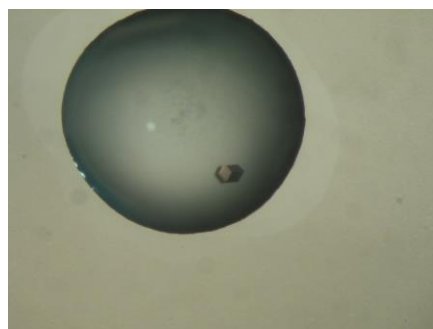
**Slika 50.**



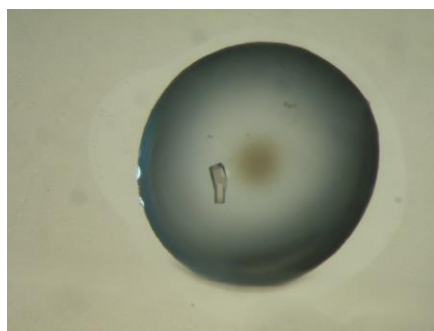
**Slika 51.**



**Slika 52.**



**Slika 53.**

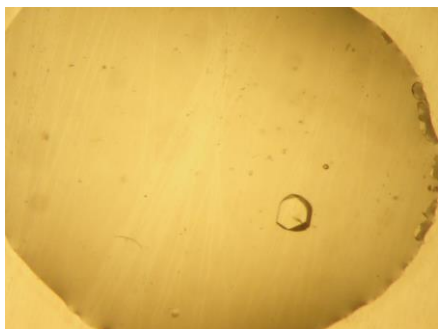


**Slika 54.**

**Tablica 9.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije niklovog(II) klor-derivata (A i B red) i manganovog(II) klor-derivata (C i D red) ljudskog inzulina (7.04.2011.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

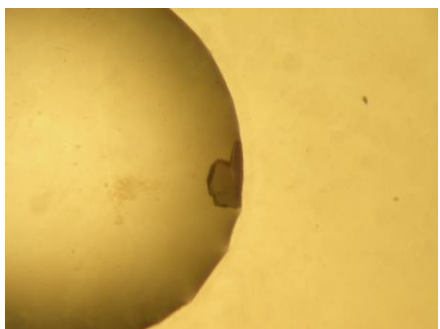
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 55</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilan, srasli d: <b>slika 56</b>
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: <b>slika 57</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: veliki, nepravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: ništa
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 58</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa



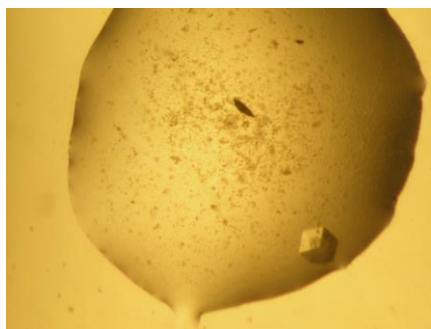
**Slika 55.**



**Slika 56.**



**Slika 57.**

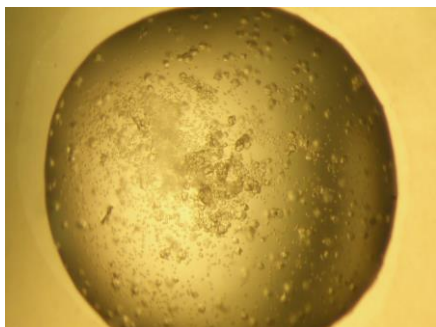


**Slika 58.**

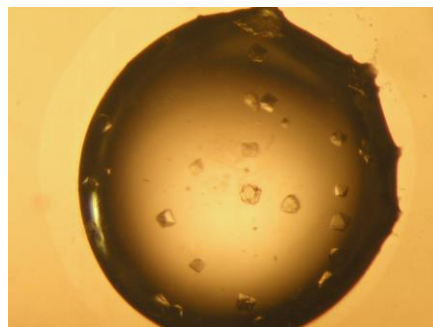
**Tablica 10.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije bakrovog(II) klor-derivata (A i B red) i kobaltovog(II) klor-derivata (C i D red) ljudskog inzulina (8.04.2011.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

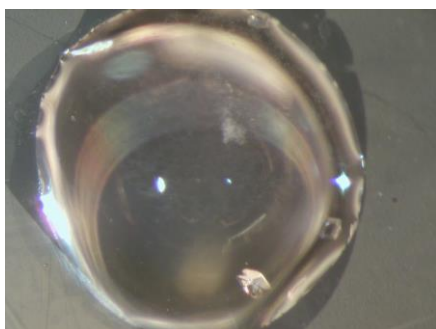
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 59</b> d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 60</b> d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 61</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 62</b> d: <b>slika 63</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, nepravilnih, sraslih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 64</b> d: nekoliko manjih, nepravilnih, sraslih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Co ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa



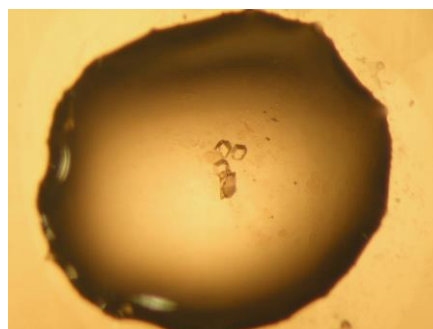
**Slika 59.**



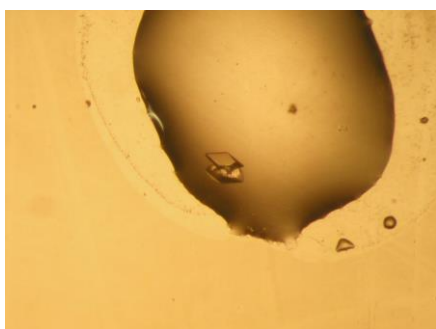
**Slika 60.**



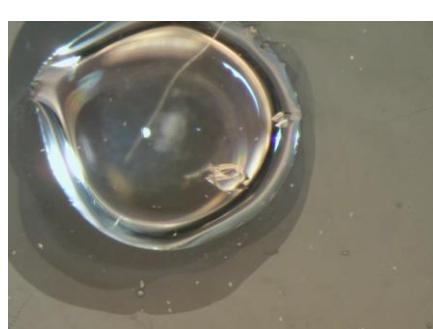
**Slika 61.**



**Slika 62.**



**Slika 63.**

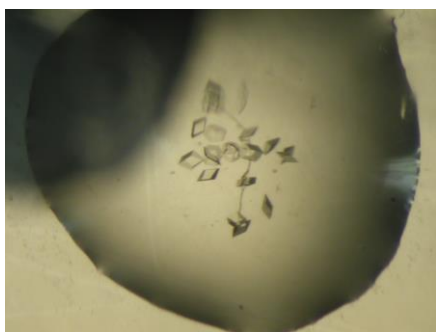


**Slika 64.**

**Tablica 11.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije molibdenovog(VI) (A i B red) i molibdenovog(VI) klor-derivata (C i D red) ljudskog inzulina (8.04.2011.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

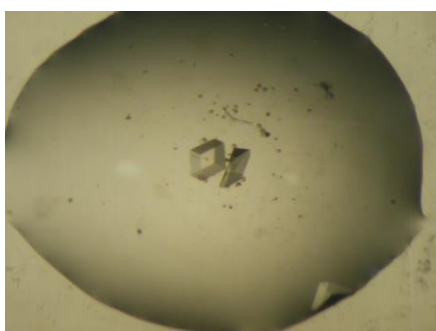
	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 320 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 480 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: veliki, pravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 280 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 520 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 260 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 540 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: veliki, pravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 240 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 560 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 220 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 580 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 600 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, nepravilan d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 180 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 620 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 160 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 640 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 140 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 660 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 120 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 680 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 100 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 700 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, nepravilna, srasla d: veliki, pravilan	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, nepravilnih, sraslih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: tri velika, nepravilna d: dva velika, nepravilna	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika nepravilna d: dva velika, nepravilna	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 65</b> d: <b>slika 66</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih, nepravilnih, sraslih d: puno malih, nepravilnih
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 67</b> d: dva velika, pravilna	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: veliki, pravilan d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, nepravilna, srasla d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 68</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 69</b> d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: dva velika, nepravilna d: dva velika, nepravilna



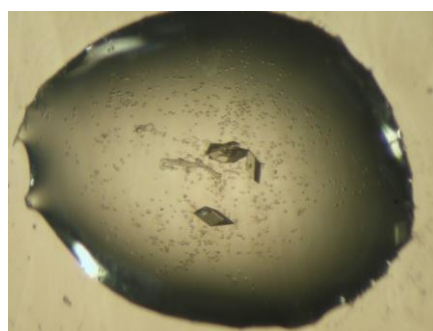
**Slika 65.**



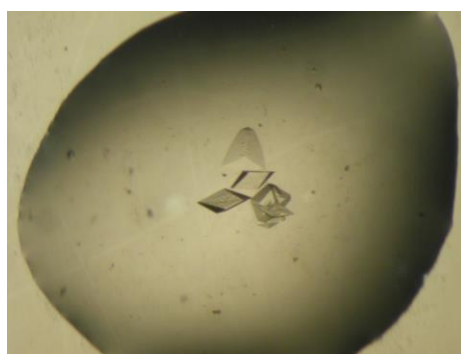
**Slika 66.**



**Slika 67.**



**Slika 68.**



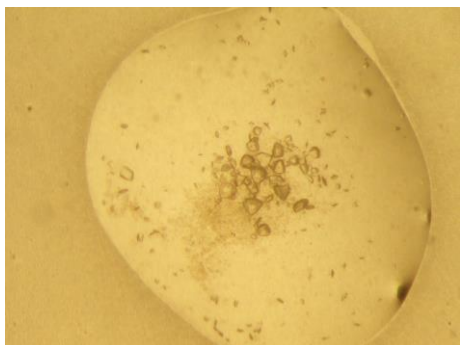
**Slika 69.**



**Tablica 12.** Eksperimentalni uvjeti kristalizacije vanadijevog(IV) (A i B red) i vanadijevog(IV) klor-derivata (C i D red) ljudskog inzulina (8.04.2011.) metodom difuzije para u visećoj kapi pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Početne koncentracije ljudskog inzulina od 3,00 mg cm<sup>-3</sup>, odnosno 7,50 mg cm<sup>-3</sup> su otopljene u 0,02 mol dm<sup>-3</sup> otopini HCl i u obliku kapi su nanošene na pokrovna stakalca (gore: 1 mm<sup>3</sup> 3,00 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina i dolje: 1,5 mm<sup>3</sup> 7,50 mg cm<sup>-3</sup> otopine proteina), te su pomiješane s kapima istih volumena precipitantne otopine.

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 320 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 480 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 500 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 280 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 520 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 260 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 540 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 240 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 560 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 220 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 580 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa
<b>B</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 600 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 180 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 620 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 160 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 640 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 140 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 660 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 120 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 680 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 100 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 700 mm <sup>3</sup> voda ----- g: <b>slika 70</b> d: puno malih
<b>C</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 200 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 300 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 300 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 400 mm <sup>3</sup> NaCl 100 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 200 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 300 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 250 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 400 mm <sup>3</sup> NaCl 150 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: ništa
<b>D</b>	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 200 mm <sup>3</sup> NaCl 400 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 300 mm <sup>3</sup> NaCl 300 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 200 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 400 mm <sup>3</sup> NaCl 200 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 200 mm <sup>3</sup> NaCl 450 mm <sup>3</sup> voda ----- g: ništa d: ništa	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 300 mm <sup>3</sup> NaCl 350 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih	100 mm <sup>3</sup> pufer 100 mm <sup>3</sup> aceton 150 mm <sup>3</sup> VOSO <sub>4</sub> 400 mm <sup>3</sup> NaCl 250 mm <sup>3</sup> voda ----- g: puno malih d: puno malih



**Slika 70.**



Adela Jurković

**INTEGRIRANI PRISTUP POUČAVANJU  
PROBAVNIH ENZIMA**

**Metodički dio**

Zagreb, 2018. godina.



## § 8. UVOD

### 8.1. Kemija kao nastavni predmet

Prirodne znanosti pružaju jedinstvenu sliku o svijetu što nas okružuje i zato bi trebale biti temelj općeg obrazovanja svakog čovjeka. Važno je shvatiti da se svi fizikalno-kemijsko-biološki procesi u prirodi odvijaju međusobno povezano. U hrvatskim školama se nastava iz prirodoslovne grupe predmeta izvodi strukturno nepovezano, pa između ostalog, učenici imaju poteškoća u razumijevanju i povezivanju srodnih pojmova i koncepata. Kako se prelazi s makroskopskog do atomarnog poimanja pojmova, stupanj apstrakcije je sve veći i time je nastavno gradivo sve teže razumljivo, što uzrokuje gubitak interesa kod učenika za prirodoslovnu grupu predmeta.

Učenici će najlakše upamtiti i razumijeti kemijske i biološke promjene na temelju vlastitog iskustva, odnosno izvođenjem pokusa. Učestala obrazovna praksa je da se nastava kemije i biologije izvodi frontalnim oblikom rada, u kojem su učenici samo pasivni sudionici. Suvremena škola manje inzistira na poznavanju činjenica, a više na razvijanju sposobnosti. Svrha učenja kemije i biologije je da se na osnovu malog broja odabranih činjenica, kod učenika razvije sustav mišljenja koji će omogućiti primjenu stečenog znanja i iskustva, te ih osposobiti za daljnji život.

Predmet priroda koji se uvodi u 5. i 6. razredu osnovne škole u Republici Hrvatskoj, prethodi nastavnim predmetima biologiji i kemiji. Kemija i biologija se kao nastavni predmeti uvode u 7. i 8. razredu osnovne škole. U srednjoškolskoj nastavi se kemija i biologija poučavaju kao A i B nastavni program. Program A se odnosi na poučavanje kemije i biologije tijekom sve četiri godine, a program B samo na prva dva razreda srednjih strukovnih škola. Satnica nastave kemije, odnosno biologije, za osnovnu školu kao i za oba programa srednje škole iznosi 70 sati godišnje.<sup>1</sup>

**Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada** je potaknuti kod budućih nastavnika kemije i biologije kreativnost i interdisciplinarni pristup pri obradi i usustavljanju neke nastavne cjeline ili jedinice. Povezivanjem nastavnih sadržaja prirodoslovnih predmeta prikladnim nastavnim strategijama, metodama i postupcima, moguće je postići znanstveno utemeljeno stvaranje koncepata i trajnost usvojenih znanja.

## 8.2. Obrazovne strategije i metode

U didaktici se pod strategijom misli na skup postupaka koji dovode do ostvarivanja nekih ciljeva, a pod metodom na način aktiviranja sudionika odgojno-obrazovnog procesa. Strategije obuhvaćaju nastavne metode i postupke specifične za određena odgojno-obrazovna područja.

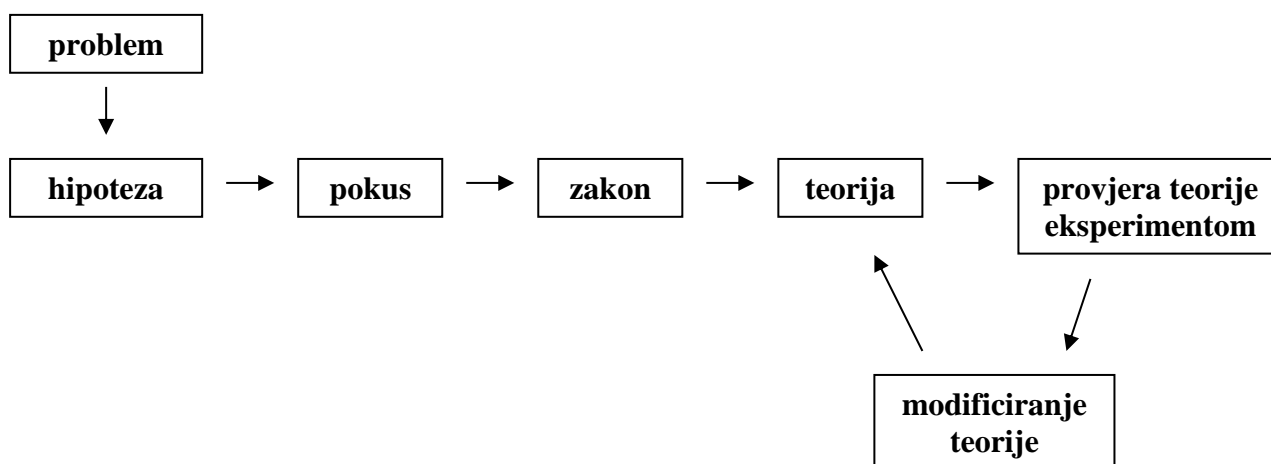
**U prirodoslovnom području su dominantne strategije učenja otkrivanjem i strategija učenja poučavanjem.** Dok se učenje otkrivanjem temelji na učenikovom vlastitom iskustvu, učenje poučavanjem se temelji na variranju odnosa između tri bitna činitelja tzv. didaktičkog trokuta (nastavnika, učenika i nastavnih sadržaja).

Učenje otkrivanjem sadrži sve etape spoznajnog procesa. Polazi od uočavanja i definiranja problema, preko vlastite aktivnosti u pronalaženju rješenja do izvođenja zaključaka i nalaženja rješenja. Učenje otkrivanjem se još zove i iskustveno učenje jer se do spoznaja dolazi vlastitim iskustvom. Poučavanje je nešto skraćeni proces učenja, ono nije temeljeno na vlastitom iskustvu nego se koriste iskustva drugih ljudi, sistematizirana u različitim izvorima. Poučavanje također polazi od problema, postavljanja pitanja, hipoteza, ali se rješavanje problema, traženje odgovora ne provodi vlastitim iskustvom nego se odgovori traže i nalaze već gotovi.<sup>1,2,3</sup>

**Strategija poučavanja** se služi trima metodama: problemsko poučavanje, heurističko poučavanje i programirano poučavanje. Problemsko poučavanje polazi od definiranja problema, i to tako da u tome aktivno sudjeluju učenici definiranjem vlastitog viđenja problema i uočavanjem suprotnosti onoga što znaju i onoga što opažaju. Nakon definiranja problema traže se odgovori. Heurističko poučavanje također polazi od problema, a učenik se postupno vodi do rješenja pomoću raznih dijaloških postupaka. U programiranoj nastavi sadržaji i vještine koje učenik treba naučiti su predočeni unaprijed određenim redoslijedom. Nakon svakog koraka učenik odgovara ili odabire jedno od ponuđenih rješenja sljedeći nastavne upute. Bitno je da učenik odmah dobiva povratnu informaciju i to ne samo u obliku točnog ili netočnog odgovora, već da učenika upućuje na ispravno zaključivanje.<sup>1</sup>

**Učenje otkrivanjem** se služi sljedećim metodama: istraživanjem, projektom i simulacijom. Metoda istraživanja u nastavi kemije sadrži sve elemente znanstvene metode (shema M-1). Najprije je potrebno definirati problem, a zatim formulirati hipotezu (pretpostavku). Hipoteza je rezultat misaonog eksperimenta. Nakon formuliranja hipoteze slijedi prikupljanje podataka, što se u nastavi kemije i biologije čini pokusom

(eksperimentom) kojeg izvode učenici, ali i neposrednim promatranjem pojava u prirodi. Na temelju prikupljenih podataka se traži zakon kojim se mogu opisati uočene promjene. Rezultat pokusa se pokušava objasniti suvremenom teorijom.



Shema M-1. Opis strategije istraživanja.<sup>1</sup>

Metoda simulacije se primjenjuje kada sudjelovanje u stvarnim situacijama nije moguće, pa se polazi od neke problemske situacije, te se izdvaja zamišljena okolnost koja traži rješenje.

Projekt je složenija metoda u strategiji učenja otkrivanjem. Svaki se pokus koji izvode učenici ili demonstrira nastavnik može metodički obraditi i kao mali istraživački projekt.<sup>1,2</sup>

Ne postoje točno određena pravila kada će se i kako primijeniti ove strategije i metode u pojedinim nastavnim situacijama. Izbor pojedine strategije ovisi ponajprije o cilju i sadržaju učenja.

### 8.3. Razine znanja po Bloomovoj taksonomiji

Znanje je logički pregled činjenica i generalizacija o objektivnoj stvarnosti koje je čovjek usvojio i trajno zadržao u svojoj svijesti.<sup>3</sup> Učenje je kompleksan proces koji obuhvaća usvajanje znanja, vještina i navika, te se njime trajno mijenja ponašanje pojedinca.

Znanje je višeslojno i hijerarhijski organizirano, te se u tome više autora slaže. Međutim, različiti autori imaju različite taksonomije ili klasifikacije znanja. Najpoznatija je ona Benjamina Samuela Blooma i suradnika iz 1956. godine („*Taxonomy of educational objectives: the classification of educational goals*“).<sup>4</sup> On je promatrao učenje kao proces u



kojem nadograđujemo prethodna znanja u cilju razvoja složenijih razina razumijevanja. Prema njegovu se prijedlogu oblici učenja dijele u tri kategorije: **kognitivnu, afektivnu i psihomotoričku**. Svaka kategorija se dijeli na razine i to od najjednostavnije prema najsloženijoj spoznajnoj domeni.

**Kognitivna kategorija** uključuje učenje i primjenu stečenog znanja. U okviru ove kategorije Bloom razlikuje šest hijerarhijskih razina učenja. Svaka razina pojedine kategorije sadrži *ključne glagole* koji omogućavaju definiranje kvalitativnih i kvantitativnih ishoda učenja na osnovu kojih učenici mogu pokazati usvojena znanja, vještine i stavove.

#### ➤ 1. Činjenično znanje

Usvajanje činjeničnog znanja je najniži obrazovni cilj. Znanje se definira kao sjećanje na prije naučene sadržaje. Odnosi se na temeljna znanja koja student mora steći da bi shvatio smisao predmeta koji uči. To se prisjećanje može odnositi na široki raspon sadržaja: od usvajanja terminologije, preko prisjećanja na specifične činjenice, pa sve do sjećanja na složene teorije. Sve što treba postići na toj razini znanja jest prisjetiti se određene informacije, koje ne mora nužno značiti i razumijevanje. Primjerice, učenik treba *memorirati, definirati, opisati, označiti, nabrojati, prepoznati*.

#### ➤ 2. Razumijevanje

Razumijevanje se definira kao sposobnost promišljanja o značenju usvojenih činjenica. Ta se kognitivna kategorija znanja može pokazati interpretiranjem naučenih činjenica, sažimanjem, objašnjavanjem ili predviđanjem učinaka ili posljedica. Ovaj je obrazovni cilj viši od prethodnog jednostavnog prisjećanja na informacije i predstavlja također najniži stupanj razumijevanja. Primjerice, za tu razinu znanja učenik treba *znati interpretirati slike, karte, tablice i grafikone, verbalne zadatke prevesti u formule, na temelju činjenica predvidjeti posljedice, navesti primjer, interpretirati, preoblikovati (parafrazirati)*.

#### ➤ 3. Primjena

Primjena se odnosi na sposobnost uporabe naučenih pravila, zakona, metoda ili teorija u novim, konkretnim situacijama. Primjerice, na toj spoznajnoj razini učenik treba *znati riješiti matematički problem, konstruirati grafikon ili krivulju, demonstrirati ispravnu uporabu neke metode ili postupka*.

#### ➤ 4. Analiza

Na analitičkoj razini znanja učenik mora biti sposoban naučene sadržaje razdvojiti na sastavne dijelove i razumjeti organizacijsku strukturu. Pri tome učenik mora znati odrediti sastavne

dijelove i odnose među njima kao i organizacijske principe. Ovaj je obrazovni cilj viši od razine razumjevanja i razine primjene, jer je za tu razinu znanja potrebno združeno razumjevanje sadržaja i organizacijske strukture materijala. Primjerice, na toj razini učenik mora *uspoređivati, suprotstavljati, prepoznati neizrečene pretpostavke, razlikovati činjenice od zaključaka, razlikovati uzrok od posljedice, odrediti značaj podataka, analizirati organizacijsku strukturu djela.*

#### ➤ 5. Sinteza

Sintetizirati znači iz pojedinačnih dijelova stvoriti novu cjelinu. Obrazovni cilj u ovom slučaju ističe kreativno ponašanje s naglaskom na formuliranje novih obrazaca ili struktura. Primjeri obrazovnih ciljeva sintetičke razine znanja jesu: *spodobnost kombinacije, postavljanja hipoteze, planiranja, reorganizacije, održati dobro organizirani govor (predavanje), predložiti plan pokusa.*

#### ➤ 6. Procjena

Procjena znači sposobnost svrhovite prosudbe vrijednosti materijala (govora, istraživačkog izvještaja, projekta). Prosudbe se moraju temeljiti na točno definiranim kriterijima. Obrazovni ciljevi ovog područja su najviši u spoznajnoj hijerarhiji jer sadrže elemente svih prethodnih razina uz dodatak sposobnosti prosudbe vrijednosti utemeljene na točno definiranim kriterijima. Primjeri obrazovnih ciljeva ove razine znanja jesu: *prosuditi primjerenost zaključaka iz prikazanih podataka, prosuditi logičnu postojanost pisanog materijala ili predavanja.*<sup>5</sup>

**Afektivna kategorija** se odnosi na sređivanje raspona i vrijednosti. U okviru ove kategorije razlikuje se sljedećih pet hijerarhijskih razina učenja: prihvaćanje (uključuje svjesno praćenje), reagiranje (odnosi se na aktivno sudjelovanje i reagiranje), usvajanje vrijednosti (čini procjenu osobe u odnosu s nekim objektom, događajem ili ponašanjem), organiziranje vrijednosti (odnosi se na organizaciju vrijednosti prema prioritetima na osnovu usporedbe i izučavanja odnosa) i vrijednosno prosuđivanje (čini posjedovanje osobnog sustava vrijednosti kojim se kontrolira osobno ponašanje).

Posljednju kategoriju po Bloomu čini **psihomotorna kategorija** koja uključuje razvoj tijela i vještina. Ona se dijeli također na pet hijerarhijskih razina učenja, a to su: imitacija (odnosi se na praćenje i ponavljanje operacije koju netko pokazuje), manipulacija (čini izvođenje određene radnje uz uputu od nastavnika), razvoj preciznosti (uključuje precizno ali sporo izvođenje određene radnje), artikulacija (čini sposobnost koordinacije više radnji uz

primjenu dvije ili više vještina), automatizacija (odnosi se na istovremeno izvršavanje više operacija primjenom različitih vještina s lakoćom).<sup>6</sup>

**Revidirana taksonomija** Andersona i Krathwohla<sup>7</sup> se pojavila 45 godina nakon Blooma i njegove tzv. „prave taksonomije“. Ovdje je šest razina kognitivne kategorije zamijenjeno glagolima, jer se smatra da su tako bolje opisani načini kako doći do pojedinog obrazovnog ishoda.



**Shema M-2.** Usporedba šest razina kognitivne kategorije prema Bloomu (lijevo) i prema revidiranoj taksonomiji Andersona i Krathwohla (desno).

Taksonomija kognitivnog ponašanja predstavlja shemu prema kojoj se klasificiraju obrazovni ishodi i standardi. Sve kategorije su složene hijerarhijski, gdje jednostavnija postignuća prethode složenijim (shema M-2).

Ovakve taksonomije služe kao pomoć nastavniku pri definiranju obrazovnih ishoda i učeničkih postignuća za pojedinu nastavnu jedinicu, iako je teško točno izmjeriti koje su sve kategorije zadovoljene nakon izvođenja svake nastavne jedinice.

## § 9. UPUTA ZA NASTAVNIKE

### 9.1. Probavni enzimi u nastavi kemije i biologije

S probavnim enzimima učenici se prvi puta susreću u nastavi kemije u 8. razredu osnovne škole u sklopu nastavne cjeline „Enzimi“, a u nastavi biologije u istom razredu u sklopu nastavne cjeline „Građa, uloga i bolesti probavnih organa“.

U ovom diplomskom radu predložen je nastavni materijal za integrirani način izvođenja nastavne jedinice „Probavni enzimi“ s učenicima 4. razreda gimnazije. Budući da se radi o dva-blok sata ponavljanja namijenjena za kraj 4. razreda gimnazije, očekuje se da su učenici u ovoj fazi školovanja stekli odgovarajuća znanja i postignuća na nastavi iz kemije i biologije (prirode) navedena u tablici M-1.

**Tablica M-1.** Nastavne teme i očekivani obrazovni ishodi iz kemije i biologije (ili prirode) koji prethode integriranoj nastavnoj jedinici „Probavni enzimi“ za učenike 4. razreda gimnazije u spiralnom slijedu pojmova.

Nastavne teme	Predmet i Razred	Obrazovni ishodi
Protok tvari i energije	PRIRODA, 6.	- navesti povezanost protoka tvari i energije sa životnim procesima u biljkama i životinjama te odnosima u hranidbenim lancima <sup>8</sup>
Raznolikost živoga svijeta	BIOLOGIJA, 7.	- razlikovati način ishrane autotrofnih i heterotrofnih organizama, saprofita i parazita <sup>8</sup>
Kemijske reakcije i energija	KEMIJA, 7.	- zapamtiti i objasniti da kemijske reakcije uvijek prati promjena energije između promatranoga reakcijskog sustava i okoline
Brzina kemijske reakcije		- uočiti da sustav može izmijeniti energiju s okolinom u obliku topline i rada
		- povezati promjenu koncentracije reaktanata, povišenje temperature i dodatak katalizatora s promjenom brzine kemijske reakcije
		- uočiti da su katalizatori tvari koje ubrzavaju kemijske reakcije, a na kraju reakcije ostaju nepromijenjeni
		- navesti primjenu katalizatora u svakodnevnom životu (enzimi, kvasac, kruh, alkoholno vrenje itd.) <sup>8</sup>

Nastavne teme	Predmet i Razred	Obrazovni ishodi
<p>Osnove kemijskog računa</p> <p>Kovalentna veza</p>	KEMIJA, 1.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- definirati i objasniti pojmove relativna atomska i relativna molekulska masa, brojnost jedinki, množina jedinki, Avogadrov broj, molarna masa, molarni volumen, te moći objasniti njihove pripadajuće mjerne jedinice</li> <li>- primjeniti navedene pojmove i njihove pripadajuće mjerne jedinice u računskim zadacima</li> <li>- definirati i objasniti pojmove elektronske konfiguracije-pravilo okteta</li> <li>- razlikovati i prepoznati na primjeru jednostruku, dvostruku i trostruku kovalentnu vezu</li> <li>- razlikovati pojmove zajednički i nepodijeljeni elektronski par</li> <li>- odrediti usmjerenost kovalentne veze u prostoru i građu molekula na temelju zajedničkih i nepodijeljenih elektronskih parova</li> <li>- prepoznati na primjeru molekule koje odstupaju od pravila okteta<sup>9</sup></li> </ul>
<p>Energija i kemijske promjene</p> <p>Otopine</p> <p>Kemijska kinetika</p> <p>Kiseline, baze i soli</p>	KEMIJA, 2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- objasniti uzroke energijskih promjena do kojih dolazi tijekom promjene agregacijskog stanja ili tijekom kemijske reakcije</li> <li>- povezati kemijsku energiju i kemijsku vezu</li> <li>- razlikovati pojmove sustav i okolina</li> <li>- razlikovati pojmove egzotermne i endotermne promjene</li> <li>- prikazati dijagramom rezultate termokemijskog pokusa</li> <li>- izračunati reakcijsku entalpiju</li> <li>- izraziti kemijski sastav smjese tvari (omjeri, udjeli, koncentracije, molalitet) te na jedan način izražen kemijski sastav izraziti na drugi način (primjerice, pretvoriti masenu u množinsku koncentraciju)</li> <li>- objasniti i razlikovati pojmove: kataliza, katalizator i inhibitor</li> <li>- objasniti pojam enzima i ulogu enzimskih funkcija u živim sustavima</li> <li>- grafički obraditi rezultate mjerenja brzine kemijske reakcije</li> <li>- definirati i razlikovati pojmove kiselina i baza u okviru Brønsted-Lowryjeve i Lewisove teorije</li> <li>- predvidjeti ishode jednostavnih kiselinsko-baznih kemijskih reakcija</li> <li>- predvidjeti pH-vrijednost vodenih otopina različitih tvari</li> </ul>



Nastavne teme	Predmet i Razred	Obrazovni ishodi
Energija i životni procesi	BIOLOGIJA, 1.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- definirati metabolizam kao skup svih biokemijskih procesa u stanici</li> <li>- objasniti proces fotosinteze u biljci (na razini opće jednadžbe fotosinteze) objasniti stanično disanje kao proces kojim aerobni organizmi dolaze do energije (na razini opće jednadžbe staničnog disanja)</li> <li>- objasniti vrenje kao proces kojim anaerobni mikroorganizmi dolaze do energije (na razini opće jednadžbe alkoholnog vrenja)<sup>9</sup></li> </ul>
Ugljikohidrati (monosaharidi, disaharidi, polisaharidi); Aminokiseline i proteini; Enzimi	KEMIJA, 4.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prikazati strukture biološki važnih molekula (šećeri, aminokiseline, proteini) Lewisovim strukturnim formulama, kondenziranim strukturnim formulama, molekulskim formulama, formulama s veznim razlomljenim crticama, te prostornim prikazom s punim klinom i crtanim klinom</li> <li>- objasniti pojam i navesti primjer asimetrično supstituiranog ugljikova atoma</li> <li>- shematski prikazati opću formulu molekule aminokiseline i objasniti nastajanje peptidne veze između dvije molekule aminokiseline</li> <li>- prepoznati peptidnu vezu na strukturnom prikazu polipeptida</li> <li>- navesti najrasprostranjenije monosaharide, disaharide i polisaharide u prirodi</li> <li>- navesti i pokusima pokazati tipične dokazne reakcije bioloških molekula (šećera i proteina), te napisati odgovarajuće jednadžbe kemijskih reakcija</li> <li>- objasniti i razlikovati primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu proteina</li> <li>- uočiti na primjeru i navesti međumolekulske sile i interakcije u primarnoj, sekundarnoj, tercijarnoj i kvaturnoj strukturi proteina</li> <li>- pokazati pokusom da su enzimi proteini</li> <li>- razlikovati i definirati pojmove: enzim, supstrat, aktivno mjesto, aktivator i inhibitor<sup>9</sup></li> </ul>
Kompleksni spojevi	KEMIJA, 3.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- poznavati temeljne pojmove o kompleksnim spojevima<sup>9</sup></li> </ul>
Građa, uloga i bolesti probavnih organa  Izmjena tvari, protok energije i zdrava prehrana	BIOLOGIJA, 8.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- imenovati dijelove probavnoga sustava i opisati njihovu ulogu</li> <li>- obrazložiti ulogu probave u razgradnji hrane</li> <li>- povezati građu probavnoga sustava čovjeka s ishranom namirnicama biljnoga i životinjskoga podrijetla</li> <li>- obrazložiti važnost hrane kao izvora gradivnih tvari, energije i zaštitnih tvari</li> <li>- razlikovati najvažnije sastojke hrane i obrazložiti utjecaj prehrane na zdravlje<sup>8</sup></li> </ul>

Nastavne teme	Predmet i Razred	Obrazovni ishodi
Metabolički i probavni sustav	BIOLOGIJA, 3.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- razlikovati sastojke hrane koji su izvor energije u organizmu i koji izgrađuju organizam</li> <li>- opisati probavne organe i odrediti njihov položaj u tijelu</li> <li>- povezati građu organa za probavu s njihovom ulogom</li> <li>- opisati enzimsko djelovanje ptijalina i pepsina</li> <li>- objasniti ulogu jetre i gušterače u probavi hrane</li> <li>- objasniti ulogu žuči u probavi hrane</li> <li>- usporediti ulogu tankog i debelog crijeva u probavi hrane<sup>9</sup></li> </ul>

## 9.2. Enzimska kataliza

U živoj stanici se odvijaju bezbrojne kemijske reakcije, od kojih je za mnoge važno i nužno da se odvijaju brzo. Brzina kemijske reakcije ovisi o energiji aktivacije, tj. o energiji potrebnoj da se raskinu postojeće kemijske veze. Brzina većine spontanijih kemijskih reakcija nije dovoljna za normalno funkcioniranje stanice. No, u biološkim sustavima su prisutni enzimi koji značajno ubrzavaju kemijske reakcije i imaju funkciju katalizatora.

Enzimi kao i ostali katalizatori, snižavaju energiju aktivacije i time značajno ubrzavaju kemijsku reakciju. Iako mehanizam enzimski katalizirane reakcije može biti identičan mehanizmu nekatalizirane reakcije, često se enzimski katalizirana reakcija odvija drugačijim reakcijskim putem od nekatalizirane. Naravno, u oba slučaja je promjena standardne reakcijske Gibbsove energije,  $\Delta_r G^\circ$  ista (definirana početnim i konačnim stanjem), a time i konstanta ravnoteže,  $K$ . To zapravo znači da enzim (ili neki drugi katalizator) proporcionalno ubrzava polaznu i povratnu reakciju i ne djeluje na konstantu ravnoteže.<sup>10</sup>

Enzimi su općenito globularni proteini, te mogu biti građeni od samo nekoliko desetaka ili čak do preko 2500 aminokiselina. Mnogi enzimi su puno veći od supstrata na koji djeluju. Mjesto u kojem dolazi do katalize zovemo aktivno mjesto enzima. Krajem 19. stoljeća smatralo se da supstrat mora oblikom odgovarati aktivnom mjestu (model ključa i brave), no danas se zna da aktivno mjesto oblikom odgovara supstratu tek nakon vezanja (model izazvanog pristajanja).<sup>10,11</sup>

Karakteristično svojstvo enzimске katalize je da se kemijska reakcija događa unutar aktivnog mjesta enzima, a ne u otopini. Reakcijom između enzima i supstrata nastaje



kompleks enzim-supstrat, a na kraju enzimske reakcije nastaje produkt i enzim izlazi iz reakcije nepromijenjen. Enzimi su visokospecifični i samo jedan enzim obično katalizira samo jednu reakciju pod određenim fizikalno-kemijskim uvjetima. U organizmu, enzimi kataliziraju reakcije koje su međusobno povezane unutar metabolizma.<sup>10</sup>

Enzimsku aktivnost moguće je učenicima približiti jednostavnim analogijama. Ovdje ću navesti jedan primjer iz literature. Zamislite dijete (ono neka predstavlja enzim) s iglom kako buši balone (neka baloni predstavljaju supstrat) u velikoj prostoriji. Ako se u prostoriji nalazi samo jedno dijete i po jedan balon svaka tri metra, u sekundi se ne bi probušilo baš previše balona. Ako biste dodavali sve više balona u prostoriju, dijete ne bi moralo daleko trčati do svakog idućeg balona, pa bi se brzina bušenja povećala. Ako bi baloni bili toliko brojni da im se razina pruža do djetetova struka, dijete bi jako brzo bušilo balone pa dodavanje još balona u prostoriju ne bi više doprinosilo brzini bušenja balona (dijete bi doseglo najveću brzinu ili  $V_m$ ). Kada bi se u prostoriji nalazilo još jedno dijete, brzina bušenja bi se udvostručila.

Utjecaj temperature na enzime (ili na dijete, u ovom slučaju) je isti kao i na proteine. Previsoka ili preniska temperatura će dovesti do denaturacije enzima (ili do onesposobljavanja svih aktivnosti djeteta), a na optimalnoj temperaturi će enzimska aktivnost biti najveća (odnosno, dijete će imati najpovoljnije uvjete za bušenje balona).<sup>12</sup>

### 9.2.1. Inhibicija kemijske reakcije

Inhibitori enzimske reakcije mogu biti ireverzibilni i reverzibilni. Karakteristično je za **ireverzibilnu inhibiciju** da dolazi do potpunog gubitka enzimske aktivnosti nakon nekog vremena, te se enzimska aktivnost može povratiti samo određenim kemijskim metodama. Ako je **inhibitor reverzibilan**, povrat enzimske aktivnosti može se ostvariti bilo fizikalnim bilo kemijskim putem. Naime, enzim i reverzibilni inhibitor nalaze se u kemijskoj ravnoteži i uklanjanjem inhibitora pomiče se ravnoteža prema nastajanju slobodnog enzima.

Razlikujemo tri vrste reverzibilnih inhibitora:

➤ 1. Kompetitivni (konkurentni) inhibitor

Ovaj inhibitor je po svojoj strukturi sličan supstratu, pa se veže u aktivno mjesto enzima i tako konkurira supstratu pri vezanju za slobodni enzim.

➤ 2. Nekompetitivni (nekonkurentni) inhibitor

Ovaj inhibitor se veže u mjestu bitnom za aktivnost enzima, ali ne u samom aktivnom mjestu.

### ➤ 3. Akompetitivni (akonkurentni) inhibitor

Ovaj inhibitor se ne veže na slobodni enzim, nego na neki drugi oblik (na primjer, na kompleks enzim-supstrat).<sup>10</sup>

Ako želimo povući analogiju kao i onu kod enzimske katalize od maloprije, sa djetetom koje buši balone, onda možemo reći da je ireverzibilna inhibicija analogna onesposobljavanju svih aktivnosti djeteta. Kompetitivna inhibicija se događa onda kada su neki baloni napravljeni od debele gume koja se ne može probušiti. Broj probušenih balona u sekundi bi onda ovisio o tome koliko ima balona napravljenih od gume koja se može probušiti i koliko ima onih od debele gume koja se ne može probušiti. Nekompetitivna inhibicija bi se dogodila onda kada bismo djetetu zavezali ruke iza leđa određeni dio vremena, pa bi dijete bušilo balone onda kada mu ruke ne bi bile zavezane, a onaj dio vremena kada bi mu ruke bile zavezane ne bi bušilo balone.<sup>12</sup>

## **9.3. Probavni sustav i probavni enzimi čovjeka**

Probavni sustav je dobar primjer na kojem se može učenicima objasniti i približiti kako enzimi u ljudskom organizmu vrše ključne funkcije za život.

Svim živim bićima za rast i razvoj potrebna je energija. Jedan od najvažnijih izvora energije je hrana. Autotrofni organizmi mogu iz anorganskih tvari primljenih iz okoliša sintetizirati organske spojeve koristeći se svjetlosnom energijom (fotoautotrofi) ili kemijskom energijom oslobođenom u različitim kemijskim reakcijama (kemoautotrofi). Za razliku od autotrofnih organizama, heterotrofni organizmi ovisni su o organskim spojevima koje su sintetizirali autotrofni organizmi.

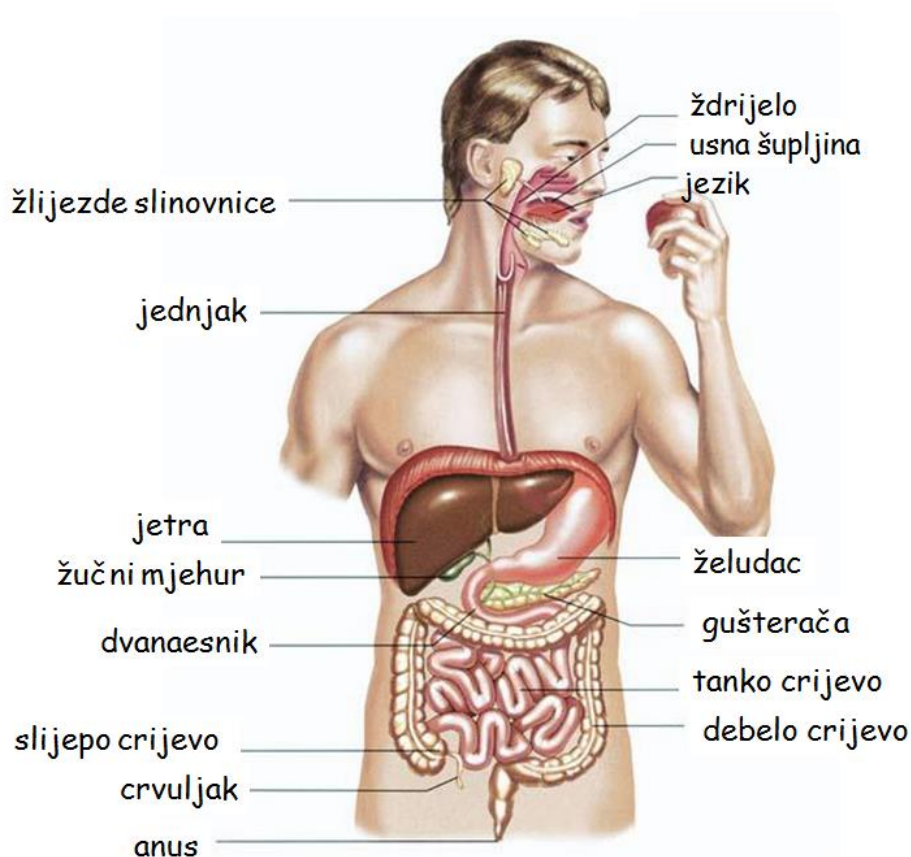
Čovjek spada u heterotrofne organizme, u svejede. Za ljudsko zdravlje važna je uravnotežena i raznovrsna prehrana. Tvari koje sadrži naša hrana velikim dijelom je građena od bioloških molekula (ugljikohidrata, masti i proteina) koje predstavljaju najvažniji izvor energije za naš organizam.

Osnovna zadaća probavnog sustava je pretvorba hrane u sastojke koji se mogu apsorbirati u krvotok ili limfu. Taj proces se zove probava. Obuhvaća mehaničko usitnjavanje, gibanje i miješanje hrane te djelatnost raznih enzima koji razgrađuju ugljikohidrate, bjelancevine i masti (amilaze, proteaze i lipaze).<sup>13</sup>

Probavni sustav (slika M-1) proteže se gotovo čitavom dužinom našeg tijela – od usta, kroz vrat, prsnu i trbušnu šupljinu sve do završnog crijeva i analnog otvora. Probavilo je u

osnovi duga cijev, koja je sastavljena od niza probavnih organa koji se nadovezuju jedan na drugi, ne samo u slijedu već i u funkciji. Unutar probavnog sustava djeluju i probavne žlijezde s izlučivanjem probavnih sokova u probavilo. To su tri para žlijezda slinovnica, gušterača i jetra.<sup>14</sup>

Probavni kanal čine usta, ždrijelo, jednjak, želudac, tanko crijevo, debelo crijevo i analni otvor. Hrana se prima u probavni sustav te razgrađuje do osnovnih građevnih jedinica koje se apsorbiraju kroz sluznicu crijeva i iskorištavaju u organizmu. Nakon toga se neiskorišteni i štetni produkti probave odstranjuju iz organizma.<sup>12</sup>



Slika M-1. Shema anatomije probavnog sustava.

**Usta** čine početak probavnog kanala. U njima se nalaze zubi koji mehanički ustinjuju hranu, mišićni jezik koji miješa hranu i izvodni kanali žlijezda slinovnica koji luče slinu čija je pH-vrijednost od 5,6 do 7,6. Slina sadrži *enzim ptijalin (amilazu)* koja u ustima razgrađuje oko 70 % škroba na maltozu i glukozu. Slina, osim što probavlja škrob, služi i za „podmazivanje“ čime se olakšava žvakanje i gutanje hrane. Gutanje je refleksna reakcija, prilikom koje

epiglotis zatvara prolaz hrane u nosnu šupljinu ili dušnik. Dok hrana prolazi kroz **ždrijelo**, blokirano je središte za disanje.

Daljni dio probavila je **jednjak** – mišićna cijev, okomito položena između ždrijela i želuca. Kada je jednjak prazan, on je stisnut i stijenke su mu priljubljene. Progutana hrana putuje u obliku malih kuglica jednjakom podmazanim sluzi prema želucu, uzastopnim stezanjem mišićne stijenke, peristaltikom.

**Želudac** je prošireni dio probavne cijevi čovjeka, koji se sastoji od ulaznog dijela jednjaka u želudac, tijela želuca i vodoravno položenog izlaznog dijela koji se veže na dvanaesnik. Stijenka želuca građena je od nekoliko slojeva mišića, čije su kontrakcije važne za miješanje hrane i potiskivanje tog sadržaja (himusa) u dvanaesnik. U stijenci želuca nalaze se brojne žlijezde koje luče probavne sokove i sluz. Probavni želučani sokovi sastoje se od vode, soli, probavnih enzima i klorovodične kiseline. Od enzima najvažniji je pepsin, koji se zapravo luči prvo kao inaktivni oblik pepsinogen koji se aktivira uz prisutnost klorovodične kiseline. **Pepsin je proteaza**, odnosno služi za probavljanje bjelančevina i najaktivniji je u jako kiselom mediju (kada je pH-vrijednost oko 2). Ta jaka kiselost je također važna za uništavanje bakterija koje dospiju u želudac. Probava bjelančevina započinje u želucu pa se hrana bogata bjelančevinama najduže zadržava u želucu.

Lučenje želučanog soka regulirano je živčanim putem i hormonima, te ima tri faze. Prva faza (moždana faza) zbiva se prije nego hrana dospije u želudac, a potaknuta je vidnim, mirisnim ili okusnim podražajima koji pokreću sekreciju želučanih žlijezda. U drugoj fazi (želučana faza) hrana dolazi u želudac te podraživanjem sluznice želuca potiče lučenje hormona gastrina. Gastrin krvlju djeluje na stanice sluznice želuca i potiče lučenje želučanog soka. U trećoj fazi (crijevna faza) sadržaj želuca, koji je ušao u početni dio tankog crijeva, potiče lučenje hormona koji će putem krvi smanjiti lučenje želučanog soka i kontrakcije želuca. U želucu se luče u malim količinama i želučane **lipaze, enzimi za razgradnju masti**. Međutim, njihov je učinak u želucu slab, jer ti enzimi ne mogu optimalno djelovati u njegovom kiselom mediju.

Sadržaj želuca prolazi u **dvanaesnik – početni dio tankog crijeva**. Na dvanaesnik se nadovezuje srednji dio ili jejunum, te krajnji dio ili ileum. Unutarnja površina crijeva je zbog brojnih crijevnih resica oko 10 puta veća od ukupne površine kože, a takva velika površina služi za apsorpciju hranjivih tvari kroz sluznicu u krvotok. U dvanaesniku se zbiva intenzivna razgradnja hranjivih tvari jer na himus djeluje niz enzima. Enzime izlučuju žlijezde u sluznici

tankog crijeva. Himus koji stiže iz želuca ima nisku pH-vrijednost. Hidrogenkarbonatnim ionima koje izlučuju Brunnerove žlijezde u lumen crijeva, neutralizira se himus do pH-vrijednosti od oko 8.

U dvanaesnik **gušterača** luči *pankreasnu amilazu* (koja razgrađuje škrob i glikogen do disaharida), *pankreasnu lipazu* te *razne proteaze (tripsin, kimotripsin i karboksipolipeptidaze)*. Gušterača, osim ove egzokrine uloge, ima i endokrinu ulogu (luči hormone glukagon i inzulin). pH-vrijednost gušteračinog soka iznosi između 7,1 i 8,3 a sastoji se od prethodno navedenih enzima, vode i hidrogenkarbonatnih iona. Pankreasna lipaza razgrađuje masti na glicerol i masne kiseline. Međutim, da bi se masti enzimima razgradile, potrebna je žuč koja služi emulgiranju (raspršivanju) masti u male kapljice.

Žuč se stvara u **jetri**, organu koji je ključni organ metabolizma i probave u organizmu, te obavlja mnoge i ključne zadaće. Iz jetre izlazi žučovod koji se ulijeva u dvanaesnik. Prostorno gledano, jetrene stanice su između krvnih i žučnih kapilara. Smjer strujanja žuči suprotan je smjeru strujanja krvi. Jetrene stanice preko žuči izlučuju žučne kiseline, žučne boje i ostale otpadne tvari. Žučne kiseline pomažu u probavi masti kao emulgatori, a žučne boje su ostatak razgrađenog hemoglobina iz propalih eritrocita. Žučna boja, bilirubin, u crijevu dalje se razgrađuje pomoću bakterija u slične žutosmeđe spojeve, koji stolici daju karakterističnu boju.

**Srednji i završni dio tankog crijeva** važni su za završetak probave enzimima te za apsorpciju produkata enzimske razgradnje hranjivih tvari u krvotok ili limfu. Od *amilaza*, ovdje se luče *saharaza, maltaza, izomaltaza i laktaza*, koje pomažu u razgradnji disaharida na monosaharide. Također se luče *lipaze* koje razgrađuju preostale masti i *proteaze (aminopolipeptidaze i dipeptidaze)* koje razgrađuju polipeptide i dipeptide.

Glavna zadaća **debelog crijeva** je reapsorpcija vode i elektrolita iz lumena crijeva u krvotok te oblikovanje i pohrana izmeta. Probavna cijev završava **analnim otvorom**.<sup>13,14,15</sup>

#### 9.4. Općenito o ugljikohidratima i proteinima uz pregled osnovnih dokaznih reakcija

➤ **Ugljikohidrati** su spojevi biljnog i životinjskog porijekla. Dijelimo ih na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Monosaharidi i disaharidi su dobro topljivi u vodi i slatkog okusa, te ih zovemo šećeri.

**Monosaharidi** su po građi najjednostavniji ugljikohidrati i kemijskim reakcijama se ne mogu razgraditi na jednostavnije. Među najvažnije monosaharide ubrajamo heksoze, molekulske formule  $C_6H_{12}O_6$ . Takvi su monosaharidi, na primjer, glukoza (polihidroksi-aldehid ili aldoza) i fruktoza (polihidroksi-keton ili ketoza). Svi monosaharidi koji sadrže aldehidnu skupinu ili aldoze, pokazuju reakcije svojstvene za aldehide, odnosno njihova aldehidna skupina može se oksidirati u karboksilnu skupinu što ih čini reducirajućim šećerima. Isto tako, svi monosaharidi koji sadrže keto skupinu ili ketoze (osim fruktoze koja u lužnatoj otopini može prijeći u glukoze i manozu<sup>20</sup>), pokazuju reakcije svojstvene za ketone, te se oni ne mogu oksidirati pa time spadaju u nereducirajuće šećere.

**Oligosaharidi** sadrže 2 do 10 monosaharidnih jedinki vezanih u jednu molekulu. Najvažniji oligosaharidi jesu **disaharidi**. Oni nastaju kondenzacijom dviju molekula monosaharida uz izdvajanje jedne molekule vode, pa im je molekulska formula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Disaharidi se lako mogu hidrolizirati toplom otopinom razrijeđenih kiselina ili djelovanjem enzima. Među najpoznatije disaharide ubrajamo saharozu, laktozu i maltozu.

- **Saharoza** (sastoji se od molekula glukoze i fruktoze povezanih  $\alpha$ -1,2-glikozidnom vezom); Saharoza, poznata kao običan šećer, hidrolizom daje u jednakim količinama glukoze i fruktoze (tzv. invertni šećer). Saharoza ne pokazuje reakcije na aldehide, ali otopina koja se dobije nakon hidrolize daje pozitivan test na aldehide.
- **Laktoza** (sastoji se od molekula galaktoze i glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom); Laktoza je disaharid koji se nalazi u mlijeku sisavaca, pa se zato i naziva mliječnim šećerom. Laktoza je reducirajući disaharid jer sadrži slobodnu poluacetalnu skupinu u molekuli glukoze.
- **Maltoza** (sastoji se od dvije molekule glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom); Maltoza se dobiva iz biljnih i životinjskih polisaharida, škroba i glikogena. Ima je u proklijalu ječmu gdje je nastala kao rezultat enzimske hidrolize škroba. Maltoza je reducirajući disaharid jer sadrži slobodnu poluacetalnu skupinu u jednoj molekuli glukoze.<sup>16</sup>

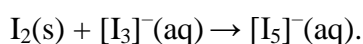
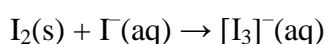
**Tablica M-2.** Pregled dokaznih reagensa, njihovog kemijskog sastava i odgovarajućih kemijskih promjena za reducirajuće šećere (monosaharide i disaharide).

Dokazni reagens	Kemijski sastav	Jednadžba kemijske reakcije i opis promjene
Trommerov reagens	$V(\text{vodena otopina CuSO}_4) : V(\text{vodena otopina NaOH}) = 1 : 1$	<p><u>Za monosaharid:</u>  <math>\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq}) + 2 \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 4 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7(\text{aq}) + \text{Cu}_2\text{O}(\text{s}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p><u>Za disaharid:</u>  <math>\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}(\text{aq}) + 2 \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 4 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}(\text{aq}) + \text{Cu}_2\text{O}(\text{s}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p>(<math>\text{Cu}^{2+}</math> ioni koji čine otopinu plavom, u prisustvu reducirajućeg šećera se reduciraju stvarajući crveni talog, <math>\text{Cu}_2\text{O}</math>, dok se šećer oksidira u karboksilnu kiselinu)</p>
Fehlingov reagens	$V(\text{Fehling I}) : V(\text{Fehling II}) = 1 : 1$ Fehling I $\Leftrightarrow$ vodena otopina $\text{CuSO}_4$ Fehling II $\Leftrightarrow$ vodena otopina kalij-natrij tartarata i vodena otopina NaOH	<p><u>Za monosaharid:</u>  <math>\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq}) + 2 \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 4 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7(\text{aq}) + \text{Cu}_2\text{O}(\text{s}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p><u>Za disaharid:</u>  <math>\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}(\text{aq}) + 2 \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 4 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}(\text{aq}) + \text{Cu}_2\text{O}(\text{s}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p>(<math>\text{Cu}^{2+}</math> ioni koji čine otopinu plavom, u prisustvu reducirajućeg šećera se reduciraju stvarajući crveni talog, <math>\text{Cu}_2\text{O}</math>, dok se šećer oksidira u karboksilnu kiselinu)</p>
Tollensov reagens	vodena otopina $\text{AgNO}_3(\text{aq})$ i par kapi vodene otopine NaOH, uz snažno mućkanje dokapavati kap po kap razrijeđene vodene otopine $\text{NH}_3$ sve dok se smeđi talog, $\text{Ag}_2\text{O}(\text{s})$ , ne otopi  (napomene za uspješan ishod pokusa: • epruveta gdje se priređuje reagens mora biti potpuno čista i odmašćena • Tollensov reagens se priprema uvijek svjež)	<p><u>Za monosaharid:</u>  <math>\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq}) + 2 [\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+(\text{aq}) + 2 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7(\text{aq}) + 2 \text{Ag}(\text{s}) + 4 \text{NH}_3(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p><u>Za disaharid:</u>  <math>\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}(\text{aq}) + 2 [\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+(\text{aq}) + 2 \text{OH}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}(\text{aq}) + 2 \text{Ag}(\text{s}) + 4 \text{NH}_3(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}(\text{aq})</math></p> <p>(<math>\text{Ag}^+</math> ioni se reduciraju iz otopine u obliku elementarnog srebra, stvarajući efekt zrcala na stijenkama epruvete, dok se reducirajući monosaharid ili disaharid oksidira)</p>

**Polisaharidi** su velike molekule sastavljene od nekoliko desetaka do nekoliko tisuća monosaharidnih jedinica povezanih u jednu molekulu. Sastav im se može prikazati formulom  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Oni se također kemijskim reakcijama mogu razložiti na monosaharide. Polisaharidi su teško topljivi ili netopljivi u vodi i nisu slatkog okusa. Najvažniji polisaharidi su škrob, glikogen i celuloza, a izgrađeni su od glukoze kao osnovne jedinice. Razlikuju se samo po načinu kako su molekule glukoze povezane međusobno.

Škrob je bijeli prah netopljiv u hladnoj vodi, a u toploj nabubri. On je smjesa dvaju različitih polimera, amiloze i amilopektina. Amiloza je netopljiva u vodi, dok je amilopektin topljiv. Po tome možemo zaključiti da među njima postoji razlika u načinu vezivanja molekula glukoze u polimer.<sup>16</sup>

**Lugolova otopina** je žutosmeđe boje i koristi se kao *dokazni reagens za škrob*, te se priprema tako da se u 100 mL destilirane vode najprije otopi 2 g kalijeva jodida i potom doda 1 g joda. Jod je topljiv u kalijevu jodidu, pri čemu nastaju polijodidni ioni (trijodidni i pentajodidni anioni)  $[I_3]^-$  i  $[I_5]^-$  :



Molekule amiloze su linearne a molekule amilopektina razgranate građe. U amilozi je 200 do 400 ostataka glukoze međusobno povezano  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Osnovni građevni element je, prema tome, maltoza, a molekule maltoze su međusobno povezane  $\alpha$ -glikozidnim vezama. Molekula amiloze čini uzvojnica sa šest molekula glukoze u jednom uzvoju. Plava boja uzoraka koji sadrže škrob potječe od kompleksnog spoja amiloze i iona  $[I_5]^-$  ugrađenih u unutrašnjost uzvojnice amiloze. Amilopektin se sastoji od nekoliko stotina do nekoliko tisuća ostataka glukoze međusobno povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama u duge lance koji su međusobno povezani  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama, tako da su njegove molekule razgranate. Lanac se grana nakon prosječno svakih 25 ostataka glukoze. Zbog takvog grananja amilopektin ne može činiti uzvojnica kao amiloza, pa s Lugolovom otopinom daje blijedo crvenosmeđe obojenje.<sup>16,17</sup>

➤ **Bjelančevine ili proteini** su biološke molekule izgrađene od aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Aminokiseline su organske kiseline koje, osim karboksilne skupine,  $-COOH$ , sadrže i amino-skupinu,  $-NH_2$ . Upravo zato aminokiseline imaju svojstva kiselina i baza. U građi prirodnih proteina u pravilu sudjeluje samo 20 različitih aminokiselina, koje se međusobno razlikuju po građi bočnog ogranka.<sup>16</sup>



Uz iznimku glicina, aminokiseline koje ulaze u sastav proteina, imaju najmanje jedan kiralni centar, a to je  $\alpha$ -ugljikov atom (tablica M-3). Sve te aminokiseline, osim cisteina, imaju apsolutnu konfiguraciju (*S*). Aminokiselinama se obično pripisuje D-konfiguracija ili L-konfiguracija i to prema načelima koja se primjenjuju kod ugljikohidrata. Osnova za označavanje je  $\alpha$ -amino-skupina. Tako sve aminokiseline koje nastaju translacijom na ribosomima eukariota imaju konfiguraciju L, a one koje prolaze posttranslacijske modifikacije enzimima ili se nalaze kao sastavni dio peptidoglikanske ovojnice kod bakterija imaju D konfiguraciju.<sup>18,19</sup>

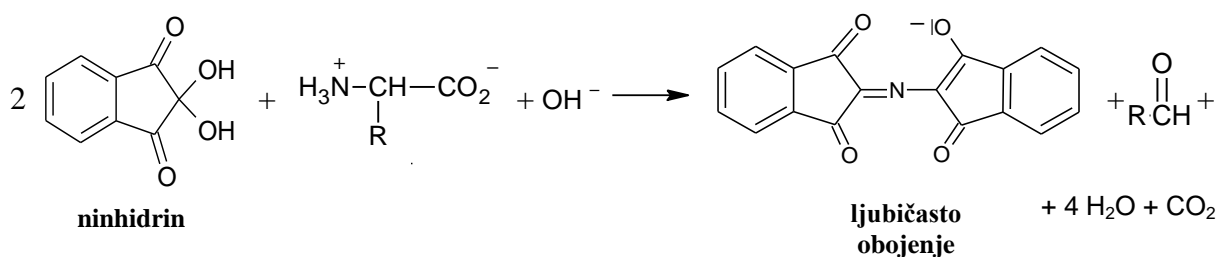
Iz tablice M-3 je vidljivo da neke aminokiseline mogu imati više od jedne karboksilne i amino-skupine ili da imaju i neke druge funkcijske skupine kao sastavni dio bočnog ogranka, koje im daju dodatna kemijska svojstva.

**Tablica M-3.** Pregled imena, struktura i kratica aminokiselina koje ulaze u sastav proteina.<sup>19</sup>

IME	STRUKTURA	KRATICA	IME	STRUKTURA	KRATICA
Glicin		Gly, G	L-asparagin		Asn, N
L-alanin		Ala, A	L-glutamin		Gln, Q
L-valin		Val, V	L-fenilalanin		Phe, F
L-leucin		Leu, L	L-tirozin		Tyr, Y
L-izoleucin		Ile, I	L-triptofan		Trp, W

IME	STRUKTURA	KRATICA	IME	STRUKTURA	KRATICA
L-serin		Ser, S	L-asparaginska kiselina		Asp, D
L-treonin		Thr, T	L-glutaminska kiselina		Glu, E
L-prolin		Pro, P	L-lizin		Lys, K
L-cistein		Cys, C	L-histidin		His, H
L-metionin		Met, M	L-arginin		Arg, R

Za **dokazivanje aminokiselina** koristi se *test s ninhidrinom*, koji otopinu oboji ljubičasto. U ovoj reakciji se aminokiselina dekarboksilirala i prešla u aldehid koji ima jedan atom ugljika manje od ishodne aminokiseline, uz oslobađanje ugljikova(IV) oksida:

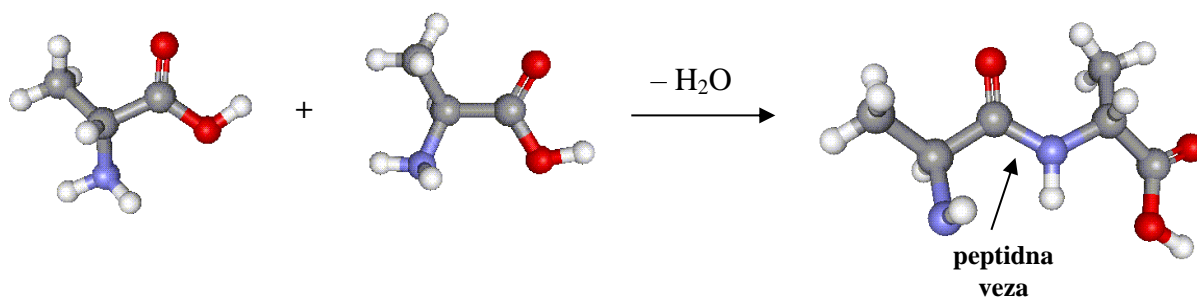


Slika M-2. Opća jednađba kemijske reakcije neke aminokiseline s ninhidrinom.

Za **dokazivanje benzenske jezgre u bočnom ogranku aminokiselina** koristi se **ksantoproteinska reakcija** (grč. *ksanthos* – žut). Naime, dušična kiselina reagira s onim aminokiselinama koje sadržavaju benzenske jezgre (fenilalanin, tirozin i triptofan) te nastaju

aromatski nitroso spojevi koji su općenito žute boje. Dodatkom amonijaka (lužine) žuta boja produkta promijeni se u narančastu. Ako koža ili nokti dođu u doticaj s dušičnom kiselinom, oboje se žuto jer nastaje ista reakcija.<sup>16,17</sup>

Proteine čine polipeptidni lanci građeni od mnoštva aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Peptidna veza nastaje vezanjem  $\alpha$ -karboksilne skupine jedne aminokiseline na  $\alpha$ -amino-skupinu druge aminokiseline, uz izdvajanje jedne molekule vode:



**Slika M-3.** Nastajanje peptidne veze na primjeru dvije molekule alanina. Ugljikovi atomi su prikazani kao sive, vodikovi atomi kao bijele, kisikovi atomi kao crvene i dušikovi atomi kao plave kuglice.

**Biuret reakcija** koristi se za *dokazivanje peptidne veze* ili iste veze u nekom sličnom spoju, na primjer, biuretu,  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ , pa otuda i potječe naziv te reakcije. Svi proteini i produkti njihova raspada, daju ovu reakciju.<sup>17</sup> Ova reakcija temelji se na nastajanju crvenoljubičastog kompleksa u lužnatom mediju, između  $\text{Cu}^{2+}$  iona i N-atoma iz amino-skupina.

Veza između probavnog sustava, njegovih enzima i dokaznih reakcija navedenih u ovom poglavlju, vidljiva je iz tablice M-4 na idućoj stranici.

**Tablica M-4.** Pregled enzimske razgradnje hranjivih tvari u pojedinim dijelovima čovjekovog probavnog sustava, te kemijskih reagensa (dokaznih reakcija) kojima se neki supstrati i produkti probave mogu dokazati.

Dio probavnog sustava u kojem dolazi do enzimske reakcije	Supstrati i njihovi pripadajući dokazni reagensi (dokazne reakcije)	Enzimi	Produkti enzimske razgradnje i njihovi pripadajući dokazni reagensi (dokazne reakcije)
USTA	• škrob (Lugolova otopina)	▫ ptijalin (amilaza)	▪ maltoza i glukoza (Fehlingov reagens, Trommerov reagens, Tollensov reagens)
ŽELUDAC	• proteini (biuret reakcija)	▫ pepsin (proteaza)	▪ polipeptidi (biuret reakcija)
GUŠTERAČA (DVANAESNIK)	• škrob (Lugolova otopina) • masti • proteini (biuret reakcija)	▫ pankreasna amilaza ▫ pankreasna lipaza ▫ razne protease	▪ disaharidi (samo za reducirajuće: Fehlingov reagens, Trommerov reagens, Tollensov reagens) ▪ glicerol i masne kiseline ▪ polipeptidi (biuret reakcija)
TANKO CRIJEVO	• disaharidi (samo za reducirajuće: Fehlingov reagens, Trommerov reagens, Tollensov reagens) • masti • polipeptidi (biuret reakcija)	▫ amilaze (saharaza, maltaza, izomaltaza i laktaza) ▫ lipaze ▫ proteaze (aminopolipeptidaze i dipeptidaze)	▪ monosaharidi (samo za reducirajuće: Fehlingov reagens, Trommerov reagens, Tollensov reagens) ▪ glicerol i masne kiseline ▪ aminokiseline (ksantoproteinska i ninhidrinska reakcija)

### 9.5. Priprema za izvođenje dva integrirana nastavna blok-sata ponavljanja u 4. razredu gimnazije

**Škola:** Gimnazija

**Predmet:** Integrirana nastava kemije i biologije

**Nastavna cjelina:** Biološki važni spojevi

**Nastavna jedinica:** Probavni enzimi

**Cilj:** Ponoviti probavne enzime integrirajući nastavne sadržaja iz kemije i biologije pomoću testa za samoocjenjivanje.

**Obrazovni ishodi:**

1. Prepoznati koje su namirnice bogate kojim biološkim spojevima, te opisati za svaku biološku molekulu njen probavni put (uz navođenje pripadajućih organa i opisivanje djelovanja odgovarajućih enzima probavnog sustava).
2. Navesti i pokusima pokazati tipične dokazne reakcije bioloških molekula (šećera i proteina), te napisati odgovarajuće jednadžbe kemijskih reakcija.
3. Zaključiti iz grafičkog prikaza i rješavanjem računskog zadatka iz termodinamike važnost hrane kao izvora energije.
4. Na temelju primjera strukturne formule organskog spoja moći prepoznati asimetrično supstituirani ugljikov atom.
5. Na temelju kemijskog naziva tvari napisati njezinu kemijsku formulu (ili obrnuto).
6. Na temelju primjera strukturne formule organskog spoja izračunati relativnu molekulsku masu spoja, prepoznati i imenovati funkcijske skupine i vrstu interakcija između dva organska spoja.<sup>9</sup>

**Prethodna znanja:** opisana u tablici M-1.

**TIJEK RADA:**

Etapa	Teze	Strategije, metode i postupci <sup>1,2</sup>	Nastavna sredstva i pomagala
I. (15 min)	<b>Uvod</b> Preko piramide zdrave prehrane objasniti važnost raznolike prehrane. Pomoću primjera prehrambenih namirnica ponoviti osnovne biološke molekule. Navesti podjelu organizama s obzirom na način uzimanja hrane. Objasniti i ponoviti proces dobivanja energije iz hranjivih tvari (preko pojednostavljenog prikaza procesa staničnog disanja i fotosinteze). Ukratko ponoviti dijelove i funkciju organa probavnog sustava čovjeka, te navesti najvažnije enzime probavnih organa.	<b>Problemsko poučavanje</b> (izlaganje, razgovor i odgovori na pitanja učenika)	• Power-point prezentacija, projektor.

Etapa	Teze	Strategije, metode i postupci <sup>1,2</sup>	Nastavna sredstva i pomagala
II. (90 min)	<b>Test za samoocjenjivanje</b> Učenici izvode pokuse u skupini, te samostalno odgovaraju na pitanja svoje grupe (A ili B) u radnom listiću. Za to vrijeme je stalno na bijeloj ploči projiciran popis najvažnijih reagensa i njihov sastav.	<b>Programirano poučavanje</b> (učenici podijeljeni u manje skupine, na grupe A i B, rješavaju radne listiće)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Power-point prezentacija, projektor.</li> <li>• Pribor, kemikalije i radni listići (pogledati od str. 68 do str. 94).</li> </ul>
III. (65 min)	<b>Valorizacija</b> Učenici samostalno boduju svoj test dok se točni odgovori i broj bodova projiciraju projektorom, uz diskusiju o svakom zadatku. Kada se projiciraju i diskutiraju rješenja grupe A, učenici koji su rješavali grupu B, bilježe rješenja zadataka iz grupe A u naknadno dobiven prazan radni listić grupe A (i obratno). <u>Napomena:</u> Nastavnik bi trebao na kraju dodatno pregledati učeničke listiće i dodijeljene bodove.	<b>Problemsko i heurističko poučavanje</b> (rasprava o rješenjima zadataka i rezultatima pokusa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Listić za evaluaciju.</li> <li>• Power-point prezentacija, projektor.</li> <li>• Ploča i kreda.</li> </ul>
IV. (10 min)	<b>Provjera znanja</b> Učenici rješavaju test s kratkim zadacima za provjeru usvojenosti sadržaja i obrazovnih ishoda.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zadaci za provjeru znanja (nalaze se od str. 95 do str. 97).</li> </ul>

**Literatura za nastavnike:**

- 1) M. Sikirica, *Zbirka kemijskih pokusa za osnovnu i srednju školu*, Školska knjiga, Zagreb, 2011.
- 2) M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
- 3) M. Sikirica, D. Mrvoš-Sermek, M. Tašner, *Praktikum iz metodike nastave kemije II. dio*, Skripta za internu upotrebu, PMF, Kemijski odsjek, Zagreb, 2008.
- 4) K. B. Abel, D. R. Halenz, *J. Chem. Educ.* **69** (1992) 9.
- 5) L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymocko, *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2007.
- 6) S. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.

**Literatura za učenike:**

- 1) Propisani gimnazijski udžbenici iz kemije i biologije (nalaze se na str. 101 i 102)

## § 10. UPUTA ZA UČENIKE

### 10.1. Naputak za učenike

**Cilj vježbe:** Načiniti karakteristične dokazne reakcije bioloških molekula i druge odabrane pokuse s uzorcima koji sadrže biološke molekule, te na temelju vlastitih opažanja, zaključaka i predznanja iz kemije i biologije, usustavljeno i integrirano ponoviti svojstva, građu i funkciju bioloških molekula (ugljikohidrata, proteina i probavnih enzima) zajedno s građom i ulogom probavnog sustava.

#### Mjere opreza:

☞ **Kemijsko posuđe** je stakleno i lako lomljivo. **Oprez od posjekotina u slučaju razbijanja kemijskog posuda!**

☞ **Oprez od opekline, rad s plamenikom!**

☞ Pri **zagrijavanju tvari u epruvetama**, otvor epruvete treba okrenuti **od sebe**, ali tako da se otvor epruvete **ne okrene prema drugoj osobi!**

☞ **Sadržaj epruvete se zagrijava** od površine tekućine prema dnu epruvete, odnosno **odozgo prema dolje uz lagano protresanje!**

☞ **Oprez od upalnih procesa na koži, rad s kiselinama i lužinama!**

### 10.2. Listići za evaluaciju

PROBAVNI ENZIMI
-----------------

#### GRUPA A

📖 **Jeste li znali?** Čak je oko 75 % odraslih ljudi u svijetu netolerantno na laktozu, disaharid koji je jedan od glavnih sastojaka svih mliječnih proizvoda. Netolerancija na laktozu je uzrokovana smanjenom aktivnošću enzima laktaze. Enzim laktaza, kod osoba bez tog metaboličkog poremećaja, u dvanaesniku razgrađuje laktozu na glukozu i galaktozu, te se ti monosaharidi zatim apsorbiraju u krv. Kod osoba koje su netolerantne na laktozu, ne dolazi do razgradnje laktoze na navedene monosaharide i apsorpcije u krv, već laktoza ide dalje probavnim sustavom do crijeva gdje uzrokuje probavne smetnje.<sup>21</sup>

➤ **POKUS 1. Slatki okus mlijeka**

**Pribor:** stalak s 2 epruvete, električni grijač za vodu, laboratorijska čaša od 250 mL s vodovodnom vodom (vodena kupelj), drvena hvataljka.

**Kemikalije:** mlijeko, Fehlingov reagens (otopina Fehlinga I i Fehlinga II).

**Postupak:**

① Priredite vodenu kupelj: laboratorijsku čašu od 250 mL napunite do pola s vodovodnom vodom i stavite grijati.

② **Promotrite uzorke u epruvetama 1 i 2.**

③ Uzmite **epruvetu 1** u kojoj se nalazi mlijeko, te u nju ulijte sav reagens (otopina Fehlinga I i Fehlinga II) koji se nalazi u **epruveti 2**. **Promotrite uzorak nakon miješanja** sadržaja u epruvetama 1 i 2.

④ Uronite **epruvetu 1** u čašu s vodovodnom vodom koja vrije (vodena kupelj) 2 do 3 minute do vidljive promjene. **Pažljivo promatrajte uzorak tijekom zagrijavanja.**

⑤ Nakon što više ne uočavate nikakve promjene uzorka kojeg zagrijavate, **pažljivo drvenom hvataljkom** izvadite **epruvetu 1** iz vodene kupelji i stavite je na stalak.

☞ **OPAŽANJA 1.** Opišite uzorke prije i nakon njihovog miješanja, te zabilježite opažanja koja ste uočili tijekom i na kraju zagrijavanja.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

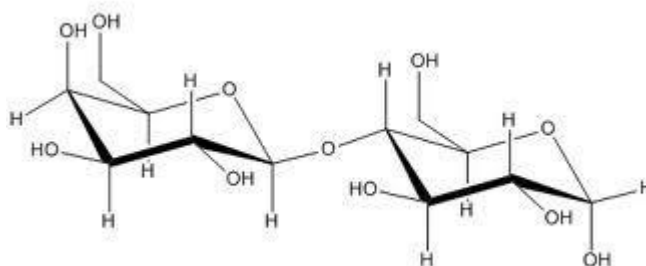
<p>Uzorak u epruveti 1 je mutan i bijele boje, a uzorak u epruveti 2 je tamnoplave boje. Uzorak je nakon miješanja sadržaja u epruveti 1 i 2 tamnoplave boje, a zagrijavanjem, boja mu se mijenjala iz plave do žute i konačno do crvenosmeđe uz pojavu crvenog taloga.</p>	<p>Po 1 bod za točan opis uzoraka u epruvetama 1 i 2 prije miješanja (<i>ukupno 2 x 1 bod = 2 boda</i>). 1 bod za točan opis uzorka nakon miješanja sadržaja u epruvetama, po 1 bod za svaku točno navedenu boju uzorka tijekom zagrijavanja (<i>ukupno 2 x 1 bod = 2 boda</i>) i 1 bod za uočavanje pojave crvenog taloga.</p> <p><i>Ukupno 2 boda + 2 boda + 1 bod = 5 bodova.</i></p>
---	--

**PITANJE 1.** a) Koju funkcionalnu skupinu sadrže organski spojevi koji se mogu oksidirati, a daju pozitivnu reakciju s Fehlingovim reagensom?

b) Kako se nazivaju ugljikohidrati koji sadrže tu funkcijsku skupinu?



c) Na temelju strukturnog prikaza molekule laktoze izračunajte njenu relativnu molekulsku masu.



d) Vodeći se opažanjima pod 1, pripadnom jednažbom kemijske reakcije objasnite rezultat pokusa.

e) Je li laktoza oksidans ili reducens u ovoj kemijskoj promjeni?

**OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:**

a) Spojevi koji daju pozitivnu reakciju s Fehlingovim reagensom i koji se mogu oksidirati moraju sadržavati aldehidnu skupinu.

b) Ugljikohidrati koji sadrže aldehidnu skupinu se nazivaju aldoze.

c)  $M_r(C_{12}H_{22}O_{11}) = 342,3$ .

d)  $C_{12}H_{22}O_{11}(aq) + 2 Cu^{2+}(aq) + 4 OH^{-}(aq) \rightarrow C_{12}H_{22}O_{12}(aq) + Cu_2O(s) + 2 H_2O(aq)$

e) Laktoza je reducens u ovoj kemijskoj promjeni.

a) 1 bod

b) 1 bod

c) 2 boda

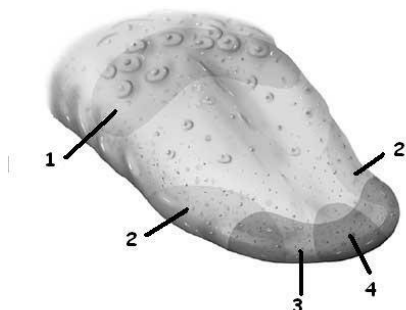
d) 3 boda za točno napisanu jednažbu kemijske reakcije.

e) 2 boda

*Ukupno 1 bod + 1 bod + 2 boda + 2 boda + 2 boda = 7 bodova.*

**PITANJE 2.** Na slici se nalazi jezik s označena četiri osnovna receptorska sustava za okus.

Navedite primarne okuse značajne za točno određene regije na jeziku označene brojevima.



1) \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_

3) \_\_\_\_\_

4) \_\_\_\_\_

**OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:**

1) gorko

2) kiselo

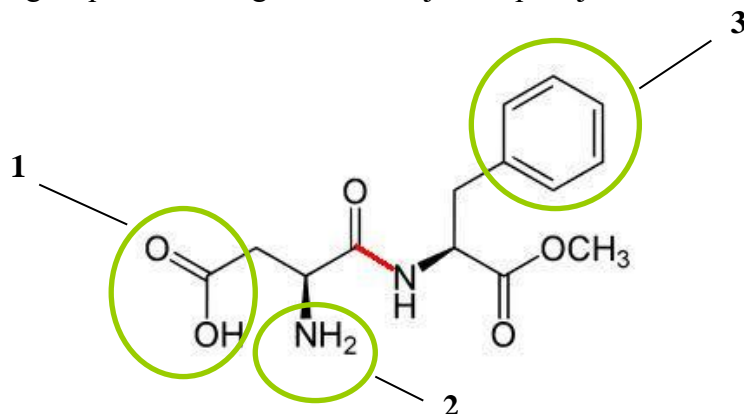
3) slano

4) slatko

Po 1 bod za svaki točan odgovor.

*Ukupno 4 x 1 bod = 4 boda.*

PITANJE 3. Fiziologija okusa je složena pojava, koja još u potpunosti nije razjašnjena. Vjeruje se da okus za, na primjer slatko, potječe od međudjelovanja molekula sladila i točno određenih receptorskih mjesta na jeziku. Proces je brz i reverzibilan, ali nema dokaza da se radi o kemijskoj reakciji. Prirodna sredstva za zaslađivanje, kao i sintetička, jednako djeluju na naše receptore na jeziku iako nemaju nužno iste strukturne karakteristike.<sup>18</sup> Proučite strukturnu formulu molekule aspartama, umjetnog sladila, koji je jedan od najzastupljenijih sladila u tzv. „light“ prehrani i odgovorite na sljedeća pitanja:



a) Koja je molekulska formula ovog spoja?

\_\_\_\_\_

b) Imenujte vezu označenu crvenom bojom na prikazu.

\_\_\_\_\_

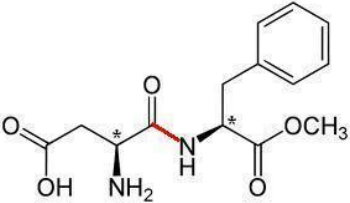
c) Na strukturnoj formuli aspartama su zaokružene i brojevima (od 1 do 3) označene neke funkcijske skupine koja ta molekula sadrži. Imenujte te organske funkcijske skupine:

① \_\_\_\_\_; ② \_\_\_\_\_; ③ \_\_\_\_\_.

d) Označite zvjezdicom na strukturnoj formuli aspartama (gore) asimetrične ugljikove atome.

\_\_\_\_\_

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) <math>C_{14}H_{18}O_5N_2</math>.</p> <p>b) Crvenom bojom je označena peptidna veza.</p> <p>c) Zaokružene su:</p> <p>① karboksilna skupina;</p> <p>② amino-skupina;</p> <p>③ fenilna skupina.</p> <p>d)</p> 	<p>a) 2 boda</p> <p>b) 2 boda</p> <p>c) Za svaku točno navedenu skupinu po 1 bod (ukupno 3 x 1 bod = 3 boda).</p> <p>d) Po 1 bod za svaki točno označeni asimetrični ugljikov atom (ukupno 2 x 1 bod = 2 boda).</p> <p>Ukupno 2 boda + 2 boda + 3 boda + 2 boda = 9 bodova.</p>
--	---

## ➤ POKUS 2. Čaša mlijeka - čaša zdravlja

**Pribor:** stalak s 2 epruvete, stakleni štapić, 2 kapalice, menzura od 5 mL.

**Kemikalije:** mlijeko, vodena otopina natrijevog hidroksida ( $w = 10\%$ ), vodena otopina modre galice ( $w = 1\%$ ), crveni i plavi indikatorski papir, univerzalni indikatorski papir.

**Postupak:**

① Uzmite **epruvetu 3** u kojoj se nalazi mlijeko, te u nju ulijte 2 mL vodene otopine natrijevog hidroksida. Zatim promiješajte otopinu staklenim štapićem i provjerite univerzalnim indikatorskim papirom je li otopina lužnata. U slučaju da otopina nije lužnata, dodajte još vodene otopine natrijevog hidroksida.

② Dobivenoj otopini dodajte **kap po kap** vodenu otopinu bakrova(II) sulfata, ali **tako da nakon svake kapi lagano protresete otopinu i čim dođe do prve promjene boje prestanete dodavati otopinu bakrova(II) sulfata. Brojite koliko kapi ste dodali!**

☞ **OPAŽANJA 2.** Opišite uzorak nakon provedenog koraka 1 i 2.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>Nakon dodavanja otopine natrijevog hidroksida u mlijeko nema promjene boje, dok nakon dodavanja otopine modre galice otopina poljubičasti.</p>	<p>1 bod za opažanje ljubičaste boje otopine.</p>
---	---

PITANJE 4. a) Kako se zove ova dokazna reakcija?

b) Što možete zaključiti na temelju opažanja 2, koju biološku molekulu sadrži mlijeko?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Ova dokazna reakcija se zove biuret reakcija.	Po 1 bod za svaki točan odgovor.
b) Mlijeko sadrži proteine (bjelančevine).	Ukupno 2 x 1 bod = 2 boda.

③ Pomoću crvenog i plavog indikatorskog papira provjerite pH-vrijednost vodene otopine modre galice.

PITANJE 5. a) Je li pH-vrijednost vodene otopine modre galice veća, manja ili jednaka 7?

b) Pripadnom jednadžbom kemijske reakcije objasnite pH-vrijednost vodene otopine modre galice.

c) U epruveti 4 nalazi se uzorak mlijeka. **Dodajte u taj uzorak jednak broj kapi vodene otopine modre galice koji ste dodali u epruvetu 3 u koraku 2.** Usporedite ova opažanja sa opažanjima pod 2.

d) Zašto je potrebno dodati lužinu prije dodatka vodene otopine modre galice u uzorak mlijeka?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) pH vodene otopine modre galice je manji od 7.	a) 1 bod
b) $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2+}(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) \rightarrow [\text{Cu}(\text{OH})(\text{OH})_3]^+(\text{aq}) + \text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$	b) 2 boda za točno napisanu jednadžbu kemijske reakcije.
c) Nakon dodatka otopine modre galice u mlijeko, nastalo je svijetlo plavo obojenje a ne ljubičasto.	c) 1 bod
d) Lužinu je potrebno dodati da bi se deprotonirali dušikovi atomi peptidnih veza iz proteina mlijeka koji ulaze u koordinaciju iona bakra(II). Novonastali kompleks je obojao otopinu ljubičasto. <sup>20</sup>	d) 3 boda za odgovor na tragu navedenog.
	Ukupno 1 bod + 2 boda + 1 bod + 3 boda = 7 bodova.

PITANJE 6. a) Gdje započinje probava bioloških molekula koje sadrži mlijeko, a koje ste dokazali u pokusu 2?

b) Kako se zove aktivni oblik enzima probavnog sustava koji prvi djeluje na biološke molekule dokazane u pokusu 2?

c) Čime je aktiviran taj enzim?

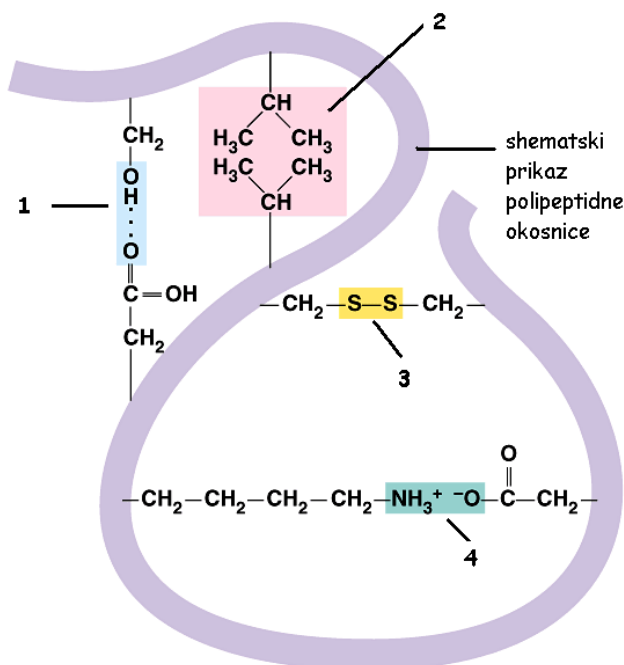
**OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:**

- a) Probava proteina započinje u želucu.  
 b) Aktivni oblik enzima koji prvi djeluje na proteine se zove pepsin.  
 c) Taj enzim je aktiviran klorovodičnom kiselinom.

Po 1 bod za svaki točni odgovor.

Ukupno 3 x 1 bod = 3 boda.

PITANJE 7. U probavnom sustavu dolazi do razgradnje proteina na manje sastavne dijelove kao što su polipeptidi, oligopeptidi, tripeptidi, dipeptidi i pojedinačne aminokiseline. Na sljedećoj slici se nalazi shematski prikaz tercijarne strukture nekog polipeptidnog lanca. Imenujte **interakcije i veze** između aminokiselinskih ogranaka označenih brojevima (od 1 do 4 na slici) koje će se u probavnom sustavu razoriti djelovanjem različitih proteaza.



- 1) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_  
 3) \_\_\_\_\_  
 4) \_\_\_\_\_

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

1) vodikova veza 2) van der Waalsove sile 3) disulfidna veza 4) ionske elektrostatske interakcije	Po 2 <i>boda</i> za svaki točni odgovor.  <i>Ukupno 4 x 2 boda = 8 bodova.</i>
--	--

**PITANJE 8.** Nakon narušene kvaterne, tercijarne, sekundarne i primarne strukture proteina u hrani probavnim enzimima, ostale su samo aminokiseline. Odgovorite na sljedeća pitanja:

a) Prikažite shematski opću formulu molekule **najjednostavnije** aminokiseline.

b) Je li ta najjednostavnija aminokiselina optički aktivna i zašto?

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) $\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	a) 1 <i>bod</i> b) 2 <i>boda</i>
b) Najjednostavnija aminokiselina nije optički aktivna molekula, jer ugljikov atom nije asimetričan.	<i>Ukupno 1 bod + 2 boda = 3 boda.</i>

➤ **POKUS 3. Razgradi me nježno**<sup>17</sup>

**Pribor:** stalak s 3 epruvete, 2 kapalice, menzura od 5 mL, električni grijač za vodu, mali tarionik s tučkom, žličica, laboratorijska čaša od 250 mL s vodovodnom vodom (vodena kupelj), drvena hvataljka, stakleni štapić, kutija od lijeka Panaze.

**Kemikalije:** kapsula Panaze, vodena otopina Kremfixa ( $w = 1\%$ ), destilirana voda, vodena otopina natrijevog hidroksida ( $w = 10\%$ ), vodena otopina modre galice ( $w = 1\%$ ), univerzalni indikatorski papir.

**Postupak:**

① Priredite vodenu kupelj: laboratorijsku čašu od 250 mL napunite do pola s vodovodnom vodom i stavite grijati.

② U malom tarioniku s tučkom usitnite sadržaj kapsule Panaze, te pola usitnjenog praha stavite u **epruvetu 5** u kojoj se nalazi vodena otopina Kremfixa.

③ Nakon toga, neka **jedan član vaše grupe drži epruvetu 5 u ruci**, povremeno ju protresajući, sve dok ne dođete do koraka 9 postupka ovog pokusa!

④ U **epruvetu 6** u kojoj se nalazi vodena otopina Kremfixa, dodajte 1 do 2 mL vodene otopine natrijevog hidroksida i 1 do 2 mL vodene otopine modre galice (Trommerovog reagensa).

⑤ Uronite **epruvetu 6** u čašu s vodovodnom vodom koja vrije (vodena kupelj) na dvije minute.

⑥ Ugasite plamenik i **epruvetu 6 oprezno s drvenom hvataljkom stavite na stalak**.

☞ **OPAŽANJA 3.** Opišite uzorak u epruveti 6 nakon provedenog pokusa, te obrazložite vaša opažanja.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

Otopina u epruveti 6 nije promijenila boju (ostala je plava), što znači da uzorak ne sadrži reducirajuće tvari (tvari koje sadrže aldehidnu skupinu).	1 bod za opažanje da nije došlo do promjene boje i 1 bod za točno objašnjenje opažanja.  <i>Ukupno 1 bod + 1 bod = 2 boda.</i>
---	---

**PITANJE 9.** a) Napišite vrstu jedinki iz reakcijske smjese u epruveti 6 odgovorne za boju otopine prije i poslije zagrijavanja.

b) Koje biološke molekule obično dokazujemo Trommerovim reagensom?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ ioni su odgovorni za boju otopine prije i poslije zagrijavanja. b) Trommerovim reagensom obično dokazujemo (reducirajuće) šećere.	a) 2 boda b) 1 bod  <i>Ukupno 2 boda + 1 bod = 3 boda.</i>
---	---

⑦ Drugu polovicu usitnjenog praha prebacite u **epruvetu 7**, te u nju ulijte 2 mL vodene otopine natrijevog hidroksida i **staklenim štapićem miješajte sve dok se većina praha nije otopila**. Zatim provjerite univerzalnim indikatorskim papirom je li otopina lužnata. U slučaju da otopina nije lužnata, dodajte još vodene otopine natrijevog hidroksida.

⑧ Dobivenoj otopini dodajte **kap po kap** vodenu otopinu bakrova(II) sulfata, ali **tako da nakon svake kapi lagano protresete otopinu i čim dođe do prve promjene boje prestanete dodavati otopinu bakrova(II) sulfata**. Laboratorijsku čašu od 250 mL s vodovodnom vodom stavite natrag da se grije (vodena kupelj).

PITANJE 10. a) Ako znate da je gušterača probavna žlijezda koja izlučuje probavne enzime kojima se razgrađuju ugljikohidrati, proteini i masti, imenujte tri specifične grupe enzima neophodne za njihovu probavu. Te iste skupine enzima se nalaze u kapsuli Panaze, pa provjerite svoj odgovor na pakiranju!

b) Na temelju opažanja u koracima 7 i 8 zaključite što su enzimi po kemijskom sastavu.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Za probavu ugljikohidrata, proteina i masti neophodne su amilaze, proteaze i lipaze. b) Enzimi su proteini po kemijskom sastavu.	a) Po <i>1 bod</i> za svaki točno navedeni enzim ( <i>ukupno 3 x 1 bod = 3 boda</i> ). b) <i>1 bod</i>  <i>Ukupno 3 boda + 1 bod = 4 boda.</i>
--	---

☉ Sada neka član vaše grupe koji je držao **epruvetu 5** u kojoj se nalazi vodena otopina Kremfixa i pola usitnjenog praha, doda 1 do 2 mL vodene otopine natrijevog hidroksida i 1 do 2 mL vodene otopine modre galice (Trommerovog reagensa). **Promotrite uzorak u epruveti!**

☼ Uronite **epruvetu 5** u čašu s vodovodnom vodom koja vrije (vodena kupelj) na 2 do 3 minute.

☞ **OPAŽANJA 4.** Opišite uzorak u epruveti 5 nakon provedenog koraka 9 ovog pokusa.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

Uzorak je poprimio plavu boju.	<i>1 bod</i>
--------------------------------	--------------

☞ **OPAŽANJA 5.** a) Opišite uzorak u epruveti 5 nakon grijanja.

b) Usporedite ova opažanja s onima koje ste naveli u opažanjima 3, te navedite koja tvar je mogla uzrokovati razliku u rezultatima.

c) Zaključite i objasnite što se dogodilo na kraju s uzorkom u epruveti 5.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Otopina u epruveti 5 je poprimila crvenosmeđu boju nakon grijanja.	a) <i>1 bod</i> b) <i>1 bod</i>
---	------------------------------------



<p>b) U opažanjima 3 nije došlo do promjene boje, jer nije bio dodan sadržaj Panaze.</p> <p>c) Amilaza iz tablete Panaze je djelovala na složeni šećer iz vodene otopine Kremfixa, razgrađujući ga na jednostavnije (reducirajuće) šećere.</p>	<p>c) 2 boda za objašnjenje na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 1 bod + 1 bod + 2 boda = 4 boda.</i></p>
--	---

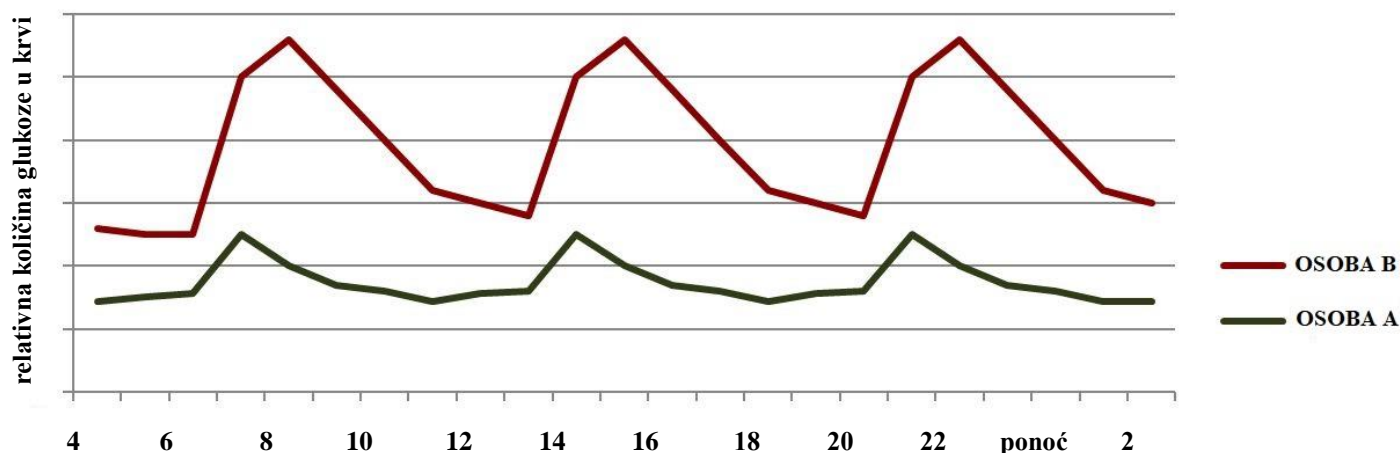
**PITANJE 11.** a) Kakva žlijezda je gušterača s obzirom na to gdje izlučuje svoje produkte?

b) Koje hormone izlučuje gušterača?

**OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:**

<p>a) Gušterača je endokrina i egzokrina žlijezda (žlijezda s unutarnjim i vanjskim lučenjem).</p> <p>b) Gušterača izlučuje inzulin i glukagon.</p>	<p>a) 1 bod</p> <p>b) 1 bod</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 1 bod + 1 bod = 2 boda.</i></p>
---	--

**PITANJE 12.** Proučite grafikon<sup>22</sup> koji prikazuje usporedbu promjene u koncentraciji glukoze u krvi dviju osoba tijekom 24 sata, te odgovorite na sljedeća pitanja:



a) Koliko puta su obje osobe jele u toku dana?

b) Boluje li osoba A ili osoba B od šećerne bolesti? Objasnite odgovor na temelju podataka iz grafikona.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Obje osobe su jele tri puta u toku dana. b) Osoba B boluje od šećerne bolesti jer na kraju dana ima povišenu količinu glukoze u krvi, dok se kod osobe A količina glukoze u krvi na kraju dana vratila na početnu vrijednost.	a) 2 boda b) 2 boda za točno navedenu osobu koja boluje od šećerne bolesti i 2 boda za točno objašnjenu količinu glukoze ili kod osobe A ili kod osobe B (ukupno $2 \times 2 \text{ boda} = 4 \text{ boda}$ ).  <i>Ukupno 2 boda + 4 bodova = 6 bodova.</i>
---	--

PITANJE 13. Sva hrana koju unosimo u organizam se razgrađuje djelovanjem probavnih enzima. Pritom nastaju hranjive tvari i njihove sastavne molekule, koje krv raznosi do svake stanice tijela. Također dolazi i do oslobađanja energije koja je neophodna za funkcioniranje organizma. Mnoga tkiva i organi mogu upotrebljavati masti i proteine iz hrane kao izvore energije, međutim mozak, jedan od najvažnijih organa u našem tijelu, za svoje funkcioniranje nužno mora imati dostupnu glukozu.

a) Glukoza je prema IUPAC-u 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanal. Nacrtajte njenu kondenziranu strukturnu formulu.

b) Prikažite jednadžbom kemijske reakcije izgaranje jedne molekule glukoze.

c) Sada sve reaktante i produkte (osim glukoze) iz pretvorbe koju ste napisali pod b) prikažite pomoću Lewisovih strukturnih formula.

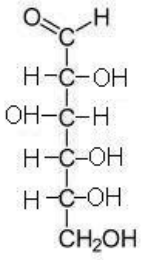
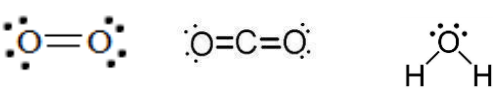
d) Pomoću zadanih podataka za entalpije stvaranja<sup>23</sup>, izračunajte reakcijsku entalpiju za pretvorbu koju ste napisali pod b):

$$\Delta_f H^\circ (\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6, \text{s}) = -1274 \text{ kJ mol}^{-1}$$


$$\Delta_f H^\circ (\text{CO}_2, \text{g}) = -393,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta_f H^\circ (\text{H}_2\text{O}, \text{g}) = -241,8 \text{ kJ mol}^{-1}$$

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) </p> <p>b) <math>C_6H_{12}O_6(s) + 6 O_2(g) \rightarrow 6 CO_2(g) + 6 H_2O(g)</math></p> <p>c) </p> <p>d) Traži se <math>\Delta_f H^\circ(C_6H_{12}O_6, s) = ?</math>          Jednadžba izgaranja glukoze glasi:  <math>C_6H_{12}O_6(s) + 6 O_2(g) \rightarrow 6 CO_2(g) + 6 H_2O(g)</math>          Prema navedenoj jednadžbi kemijske reakcije za reakcijsku entalpiju možemo pisati  <math>\Delta_f H^\circ = 6 \Delta_f H^\circ(CO_2, g) + 6 \Delta_f H^\circ(H_2O, g) - \Delta_f H^\circ(C_6H_{12}O_6, s)</math>          gdje smo odmah uvrstili stehiometrijske brojeve i zanemarili elementarne tvari jer su im entalpije stvaranja po definiciji jednake nuli.          Uvrštavanjem vrijednosti dobivamo:  <math>\Delta_f H^\circ = [6 \cdot (-393,5) + 6 \cdot (-241,8) - (-1274)] \text{ kJ/mol} = -2537,8 \text{ kJ/mol}</math>          Reakcijska entalpija za izgaranje glukoze prema zadanoj jednadžbi iznosi <math>-2537,8 \text{ kJ/mol}</math>.</p>	<p>a) 2 boda          b) 2 boda          c) Po 2 boda za svaku točno nacrtanu strukturu (ukupno <math>3 \times 2 \text{ boda} = 6 \text{ bodova}</math>).          d) 2 boda za točno napisan izraz reakcijske entalpije za zadanu jednadžbu izgaranja glukoze, 2 boda za točno uvrštene vrijednosti, te 2 boda za točno izračunatu vrijednost reakcijske entalpije (ukupno <math>3 \times 2 \text{ boda} = 6 \text{ bodova}</math>).</p> <p style="text-align: right;"><i>Ukupno 2 boda + 2 boda + 6 bodova + 6 bodova = 16 bodova.</i></p>
--	--

**GRUPA B**

 **Jeste li znali?** Ruski psiholog Ivan Pavlov istraživao je izlučivanje probavnih enzima želuca i žlijezda slinovnica. Eksperimentirajući sa psima, dokazao je da tim izlučivanjem upravlja mozak. Miris hrane ili čak sama pomisao na nju bila je dovoljna da izazove izlučivanje. Ta su mu istraživanja 1904. godine donijela Nobelovu nagradu.<sup>24</sup>

➤ **POKUS 1. Cure mi sline**

**Pribor:** stalak s 2 epruvete (označene kao A1 i A2), kapalica, menzura od 10 mL.

**Kemikalije:** vodena otopina Kremfixa ( $w = 1 \%$ ), Lugolova otopina ( $w = 5 \%$ ), slina, destilirana voda

**Postupak:**

- ① U menzuri sakupite 4 mL sline i dodajte 1 mL destilirane vode, te cijeli sadržaj menzure ulijte u **epruvetu A1** gdje se nalazi vodena otopina Kremfixa.
- ② Nakon toga dodajte u **epruvete A1 i A2 po kap Lugolove otopine**. U **epruveti A2** se nalazi samo vodena otopina Kremfixa.
- ③ **Promotrite epruvete A1 i A2 nakon dodavanja Lugolove otopine.**
- ④ **Epruvetu A1 držite u ruci 2 do 3 minute uz lagano protresanje do vidljive promjene.**

☞ **OPAŽANJA 1.** a) Opišite Lugolovu otopinu, te uzorke u epruvetama prije i poslije dodavanja Lugolove otopine.

b) Opišite promjenu na kraju pokusa.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Lugolova otopina je tekućina žuto-smeđe boje. Uzorci u epruvetama bili su prozirni te su nakon dodatka Lugolove otopine poprimili plavo obojenje. b) Plavo obojenje iz epruvete A1 je nestalo.	a) <i>1 bod</i> za točan opis Lugolove otopine i <i>1 bod</i> za točan opis uzoraka prije i poslije dodavanja Lugolove otopine ( <i>ukupno 1 bod + 1 bod = 2 boda</i> ). b) <i>1 bod</i>
<i>Ukupno 2 boda + 1 bod = 3 boda.</i>	

**PITANJE 1.** a) Lugolova otopina je vodena otopina joda u kalijevom jodidu. Koji ion nastaje reakcijom joda i jodinog iona? Prikažite ga pomoću Lewisove strukturne formule i navedite naziv geometrijskog oblika jedinke.

b) Koja se biološka molekula obično dokazuje Lugolovom otopinom, te u koju skupinu bioloških molekula ona pripada?

c) Objasnite obojenje u epruvetama A1 i A2 nakon koraka 2 u pokusu, ako znate da su za njega odgovorni ioni pod a) i biološka molekula koju ste naveli pod b)?

d) Što možete zaključiti na temelju opažanja **na kraju pokusa**?

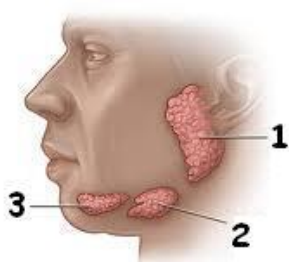
## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) Reakcijom joda i jodidnog iona nastaje trijodidni anion, <math>[I_3]^-</math>. Lewisov prikaz:  <math>[\ddot{I}-I-\ddot{I}]^-</math> Molekula je linearnog oblika.</p> <p>b) Lugolovom otopinom dokazujemo škrob, koji pripada u polisaharide (ugljikohidrate).</p> <p>c) Plavo obojenje u epruvetama A1 i A2 nakon koraka 2 u pokusu potječe od kompleksnog spoja škroba (amiloze) i trijodidnih iona koji se ugrađuju u unutrašnjost uzvojnice (molekule).</p> <p>d) Slina je razgradila škrob na jednostavnije šećere (na maltozu i glukozu).</p>	<p>a) Po 1 bod za ime iona, 2 boda za Lewisov prikaz tog iona i 2 boda za naziv geometrijskog oblika jedinice (ukupno 1 bod + 2 boda + 2 boda = 5 bodova).</p> <p>b) Po 1 bod za odgovor škrob i 1 bod za odgovor da škrob spada u polisaharide (ugljikohidrate) (ukupno 2x 1 bod = 2 boda).</p> <p>c) 2 boda za odgovor na tragu navedenog.</p> <p>d) 1 bod za odgovor da se škrob slinom razgradio na jednostavnije šećere.</p> <p style="text-align: right;"><i>Ukupno 5 bodova + 2 boda + 2 boda + 1 bod = 10 bodova.</i></p>
--	---

PITANJE 2. a) Navedite koja se biološka molekula razgrađuje djelovanjem amilaze u ustima?

b) Koje je drugo ime za amilazu koju izlučuju žlijezde slinovnice?

c) Na slici je prikazano brojevima (od 1 do 3) tri para žlijezda slinovnica. Uz odgovarajući broj navedite hrvatsko ime pripadajućeg para žlijezdi slinovnica:



1) \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_

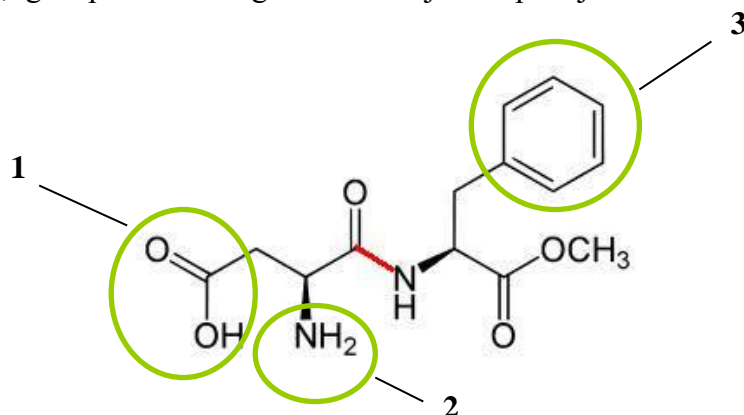
3) \_\_\_\_\_

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) Škrob se razgrađuje djelovanjem amilaze u ustima.</p> <p>b) Ptijalin je drugo ime za amilazu koju izlučuju žlijezde slinovnice.</p> <p>c) Žlijezde slinovnice:</p> <p>① podušna žlijezda slinovnica;</p> <p>② podvilična (podčeljusna) žlijezda slinovnica;</p> <p>③ podjezična žlijezda slinovnica.</p>	<p>a) 1 bod</p> <p>b) 1 bod</p> <p>c) Po 1 bod za svaku točno navedenu žlijezdu slinovnicu uz pripadajući broj na slici (ukupno 3 x 1 bod = 3 boda).</p> <p style="text-align: right;"><i>Ukupno 1 bod + 1 bod + 3 boda = 5 bodova.</i></p>
--	---

**PITANJE 3.** Fiziologija okusa je složena pojava, koja još u potpunosti nije razjašnjena. Vjeruje se da okus za, na primjer slatko, potječe od međudjelovanja molekula sladila i točno određenih receptorskih mjesta na jeziku. Proces je brz i reverzibilan, ali nema dokaza da se radi o kemijskoj reakciji. Prirodna sredstva za zaslađivanje, kao i sintetička, jednako djeluju na naše receptore na jeziku iako nemaju nužno iste strukturne karakteristike.<sup>18</sup> Proučite

strukturu formulu molecule aspartama, umjetnog sladila, koji je jedan od najzastupljenijih sladila u tzv. „light“ prehrani i odgovorite na sljedeća pitanja:



a) Koja je molekulska formula ovog spoja?

---

b) Imenujte vezu označenu crvenom bojom na prikazu.

---

c) Na strukturalnoj formuli aspartama su zaokružene i brojevima (od 1 do 3) označene neke funkcijske skupine koja ta molekula sadrži. Imenujte te organske funkcijske skupine:

① \_\_\_\_\_; ② \_\_\_\_\_; ③ \_\_\_\_\_.

d) Označite zvjezdicom na strukturalnoj formuli aspartama (gore) asimetrične ugljikove atome.

---

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a)  $C_{14}H_{18}O_5N_2$ .

b) Crvenom bojom je označena peptidna veza.

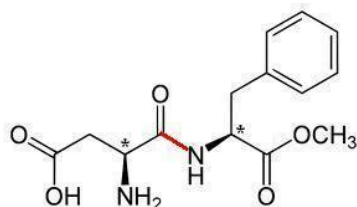
c) Zaokružene su:

① karboksilna skupina;

② amino-skupina;

③ fenilna skupina.

d)



a) 2 boda

b) 2 boda

c) Za svaku točno navedenu skupinu po 1 bod (ukupno 3 x 1 bod = 3 boda).

d) Po 1 bod za svaki točno označeni asimetrični ugljikov atom (ukupno 2 x 1 bod = 2 boda).

*Ukupno 2 boda + 2 boda + 3 boda + 2 boda = 9 bodova.*

➤ **POKUS 2. Nisam nepobjediv**<sup>17</sup>

**Pribor:** stalak sa 7 epruveta (označene od B1 do B7), 6 kapalica, stakleni štapić, plamenik, menzura od 5 mL, šibice.

**Kemikalije:** vodena otopina etanola ( $w = 96\%$ ), vodena otopina klorovodične kiseline ( $w = 10\%$ ), vodena otopina bakrova(II) sulfata ( $w = 10\%$ ), vodena otopina olovova(II) acetata ( $w = 10\%$ ), vodena otopina bjelanjka ( $w = 50\%$ ), vodena otopina natrijevog hidroksida ( $w = 10\%$ ), vodena otopina modre galice ( $w = 1\%$ ), crveni i plavi indikatorski papir, univerzalni indikatorski papir.

**Postupak:**

- ① U svih 7 epruveta nalazi se oko 1 mL vodene otopine bjelanjka.
- ② **Epruvetu B1** polako zagrijavajte, te promorite što se događa sa sadržajem u epruveti.

☞ **OPAŽANJA 2.** Opišite kako djeluje zagrijavanje na vodenu otopinu bjelanjka.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

Vodena otopina bjelanjka postaje sve mutnija i gušća, na kraju zagrijavanja se primjećuje zgrušani bjelanjak bijele boje.	
---	--

*1 bod za odgovor na tragu navedenog.*

- ③ U **epruvetu B2** dodajte 5 kapi vodene otopine etanola i lagano promućkajte. **Promotrite sadržaj epruvete B2** nakon dodatka vodene otopine etanola.
- ④ U **epruvetu B3** dodajte 5 kapi vodene otopine klorovodične kiseline i lagano promućkajte. **Promotrite sadržaj epruvete B3** nakon dodatka vodene otopine klorovodične kiseline.
- ⑤ U **epruvetu B4** dodajte 5 kapi vodene otopine bakrova(II) sulfata i lagano promućkajte. **Promotrite sadržaj epruvete B4** nakon dodatka vodene otopine bakrova(II) sulfata.
- ⑥ U **epruvetu B5** dodajte 5 kapi vodene otopine olovova(II) acetata i lagano promućkajte. **Promotrite sadržaj epruvete B5** nakon dodatka vodene otopine olovova(II) acetata.

☞ **OPAŽANJA 3.** a) Opišite kako djeluje dodatak vodenih otopina etanola, klorovodične kiseline, bakrova(II) sulfata i olovova(II) klorida na vodenu otopinu bjelanjka.

b) Objasnite opažanja koja ste naveli pod a).

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) U sve 4 epruvete dolazi do zgrušavanja bjelanjka.	a) <i>1 bod</i>
b) Struktura bjelanjka se narušila (došlo je do denaturacije).	b) <i>1 bod</i> za objašnjenje na tragu navedenog.
<i>Ukupno 1 bod + 1 bod = 2 boda.</i>	

⑦ Uzmite **epruvetu B6**, te u nju ulijte 2 mL vodene otopine natrijevog hidroksida. Zatim promiješajte otopinu staklenim štapićem i provjerite univerzalnim indikatorskim papirom je li otopina lužnata. U slučaju da otopina nije lužnata, dodajte još vodene otopine natrijevog hidroksida.

⑧ Dobivenoj otopini dodajte **kap po kap** vodenu otopinu bakrova(II) sulfata, ali **tako da nakon svake kapi lagano protresete otopinu i čim dođe do prve promjene boje prestanete dodavati otopinu bakrova(II) sulfata. Brojite koliko kapi ste dodali!**

☞ **OPAŽANJA 4.** Opišite uzorak u epruveti B6 nakon provedenog koraka 7 i 8.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

U slučaju dodavanja otopine natrijevog hidroksida u suvišku dolazi do nastajanja bijelog taloga, dok nakon dodavanja otopine modre galice otopina poljubičasti.	Po <i>1 bod</i> za opažanje taloga i <i>1 bod</i> za opažanje ljubičaste boje otopine.
<i>Ukupno 2 x 1 bod = 2 boda.</i>	

PITANJE 4. a) Kako se zove ova dokazna reakcija?

b) Što možete zaključiti na temelju opažanja, koju biološku molekulu sadrži bjelanjak?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

a) Ova dokazna reakcija se zove biuret reakcija.	Po <i>1 bod</i> za svaki točni odgovor.
b) Bjelanjak sadrži proteine (bjelančevine).	<i>Ukupno 2 x 1 bod = 2 boda.</i>

⑨ Pomoću crvenog i plavog indikatorskog papira provjerite pH-vrijednost vodene otopine modre galice.

PITANJE 5. a) Je li pH-vrijednost vodene otopine modre galice veća, manja ili jednaka 7?



b) Pripadnom jednadžbom kemijske reakcije objasnite pH-vrijednost vodene otopine modre galice.

c) U epruveti B7 nalazi se uzorak bjelanjka. **Dodajte u taj uzorak jednak broj kapi vodene otopine modre galice koji ste dodali u epruvetu B6 u koraku 8.** Usporedite opažanja sa opažanjima 4.

d) Zašto je potrebno dodati lužinu prije dodatka vodene otopine modre galice u uzorak bjelanjka?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

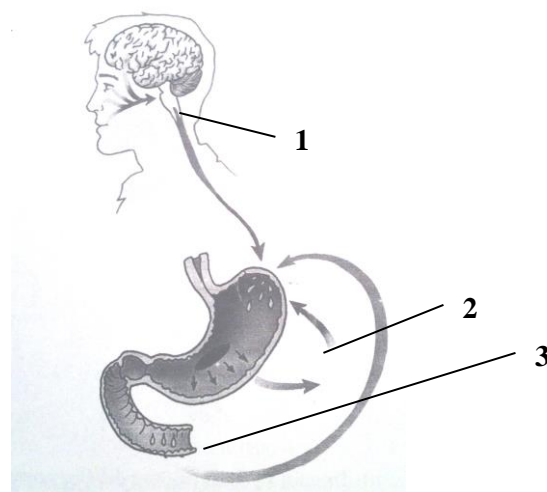
<p>a) pH vodene otopine modre galice je manji od 7.            b) <math>[\text{Cu}(\text{OH})_2]^{2+}_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} \rightarrow [\text{Cu}(\text{OH})(\text{OH})_2]^{+}_{(\text{aq})} + \text{H}_3\text{O}^{+}_{(\text{aq})}</math>            c) Nakon dodatka otopine modre galice u mlijeko, nastalo je svijetlo plavo obojenje a ne ljubičasto.            d) Lužinu je potrebno dodati da bi se deprotonirali dušikovi atomi peptidnih veza iz proteina mlijeka koji ulaze u koordinaciju iona bakra(II). Novonastali kompleks je obojao otopinu ljubičasto.<sup>20</sup></p>	<p>a) 1 bod            b) 2 boda za točno navedenu jednadžbu kemijske reakcije.            c) 1 bod            d) 3 boda za odgovor na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 1 bod + 2 boda + 1 bod + 3 boda = 7 bodova.</i></p>
--	--

**PITANJE 6.** Lučenje želučanog soka regulirano je živčanim putem i hormonima. Hrana u želucu potiče lučenje želučanog soka čiji **kontrolni mehanizam** ima tri faze (**označen brojevima od 1 do 3**). Taj kontrolni mehanizam je prikazan na slici<sup>22</sup>. Odgovorite:

a) Od čega se sve sastoji želučani sok?

b) Iz slike možete vidjeti kojim je sve podražajima pokrenuta sekrecija želučanih žlijezda u prvoj fazi, pa navedite ta tri podražaja.

c) Koji se hormon izlučuje u drugoj fazi lučenja i pri tom djeluje na sluznicu želuca?

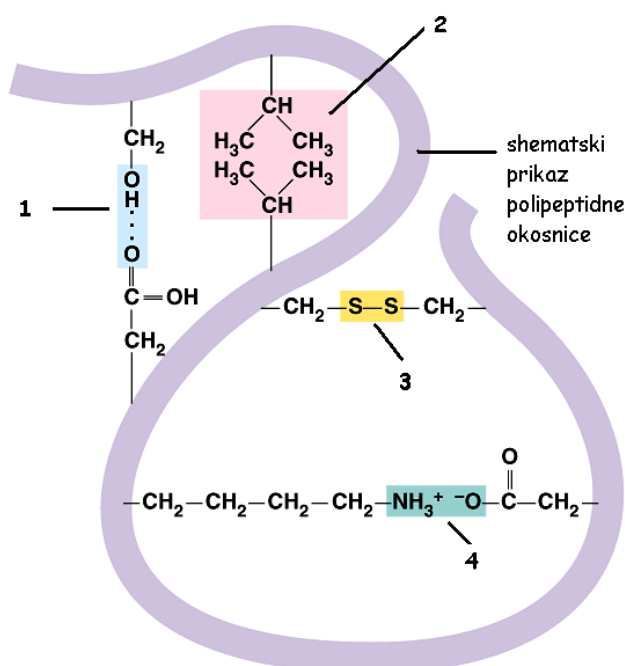


d) Opišite pomoću slike treću fazu lučenja želučanih žlijezda.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) Želučani sok se sastoji od vode, sluzi, soli, enzima i klorovodične kiseline.  b) Sekrecija želučanih žlijezda je pokrenuta vidnim, mirisnim i okusnim podražajima.  c) Izlučuje se gastrin.  d) U trećoj fazi sadržaj želuca, koji je ušao u početni dio tankog crijeva, potiče lučenje hormona koji će putem krvi smanjiti lučenje želučanog soka i kontrakcije želuca.</p>	<p>a) Po 0,5 boda za svaki točno navedeni sastojak želučanog soka (<i>ukupno 5 x 0,5 boda = 2,5 boda</i>).  b) Po 0,5 boda za svaki točno navedeni podražaj (<i>ukupno 3 x 0,5 boda = 1,5 bod</i>).  c) 1 bod  d) 2 boda za objašnjenje na tragu navedenog.   <i>Ukupno 2,5 boda + 1,5 bod + 1 bod + 2 boda = 7 bodova.</i></p>
---	---

**PITANJE 7.** U probavnom sustavu dolazi do razgradnje proteina na manje sastavne dijelove kao što su polipeptidi, oligopeptidi, tripeptidi, dipeptidi i pojedinačne aminokiseline. Na sljedećoj slici se nalazi shematski prikaz tercijarne strukture nekog polipeptidnog lanca. Imenujte **interakcije i veze** između aminokiselinskih ogranaka označenih brojevima (od 1 do 4 na slici) koje će se u probavnom sustavu razoriti djelovanjem različitih proteaza.



- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_
- 4) \_\_\_\_\_

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>1) vodikova veza  2) van der Waalsove sile  3) disulfidna veza  4) ionske elektrostatske interakcije</p>	<p>Po 2 boda za svaki točni odgovor.   <i>Ukupno 4 x 2 boda = 8 bodova.</i></p>
---	---


**PITANJE 8.** Nakon narušene kvaterne, tercijarne, sekundarne i primarne strukture proteina u hrani probavnim enzimima, ostale su samo aminokiseline. Odgovorite na sljedeća pitanja:

a) Prikažite shematski opću formulu molekule **najjednostavnije** aminokiseline.

b) U kojem se obliku u vodenoj otopini nalaze aminokiseline? Objasnite svoj odgovor.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a)</p> $\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ <p>b) U vodenoj otopini aminokiselina disocira kao karboksilna kiselina. Nastali vodikov ion (<math>\text{H}^+</math>) protonira amino skupinu (<math>-\text{NH}_2</math>), odnosno dolazi do intramolekulske reakcije uz nastajanje dipolnog (zwitter) iona.</p>	<p>a) 1 bod b) 2 boda za objašnjenje na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 1 bod + 2 boda = 3 boda.</i></p>
--	--

 **Jeste li znali?** Jetra je jedini organ u našem tijelu koji ima sposobnost regeneracije. Međutim, važno je napomenuti da čovjek kojemu se odstrani dio jetre, taj dio neće ponovno „narasti“ već će se samo povratiti prvotna funkcija. To je moguće čak ako čovjeku ostane samo 25 % jetre.<sup>26</sup>

➤ **POKUS 3. Jetra može svašta**<sup>17,25</sup>

**Pribor:** stalak sa 6 epruveta (označene od C1 do C6), žličica, pinceta, komadić svježeg krumpira, komadić svježe pileće jetre, komadić prokuhanog krumpira, komadić prokuhane pileće jetre, drvene trešćice, šibice.

**Kemikalije:** manganov dioksid, vodena otopina vodikovog peroksida (w = 5 %).

**Postupak:**

① U svim epruvetama (označenima od C1 do C6) se nalazi vodena otopina vodikovog peroksida.

② Pripremite tinjajuću trešćicu. **Tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C1 i promotrite što se dogodilo.**

③ Pripremite tinjajuću trešćicu. U **epruvetu C2** dodajte na vrh žličice manganova dioksida,  $MnO_2$ . **Brzo tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C2, te promatrajte što se događa.**

☞ **OPAŽANJA 5.** a) Usporedite promjene u epruvetama C1 i C2 nakon koraka 3.

b) Objasnite svoja opažanja.

c) Pripadnom jednadžbom kemijske reakcije potkrijepite svoja opažanja.

d) Objasnite ulogu manganovog dioksida u ovoj reakciji.

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) Nakon koraka 3 i dodatka manganova dioksida u epruvetu C2, počeli su se razvijati mjehurići. U epruveti C1 nije došlo do nikakve promjene.</p> <p>b) U epruveti C2 razvijao se plin koji podržava gorenje, dok tog plina u epruveti C1 nema.</p> <p>c) Vodikov peroksid se raspao na kisik i vodu:  <math>2 H_2O_2(aq) \rightarrow O_2(g) + 2 H_2O(l)</math></p> <p>d) Manganov dioksid je bio katalizator.</p>	<p>a) Po 1 bod za opažanje mjehurića u epruveti C2 i po 1 bod za opažanje da nije došlo do promjene u epruveti C1  <i>(Ukupno 1 bod + 1 bod = 2 boda).</i></p> <p>b) 1 bod za opažanje da nastali plin u epruveti C2 podržava gorenje i da ga nema u C1.</p> <p>c) 2 boda za točno napisanu jednadžbu kemijske reakcije.</p> <p>d) 2 boda.</p> <p style="text-align: right;"><i>Ukupno 2 boda + 1 bod + 2 boda + 2 boda = 7 bodova.</i></p>
---	---

④ Pripremite tinjajuću trešćicu. U **epruvetu C3** dodajte komadić svježeg krumpira. **Brzo tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C3, te promatrajte što se događa.**

⑤ Pripremite tinjajuću trešćicu. U **epruvetu C4** dodajte komadić prokuhanog krumpira. **Brzo tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C4, te promatrajte što se događa.**

☞ **OPAŽANJA 6.** a) Opišite promjene u epruveti C3 i u epruveti C4 nakon koraka 4 i 5.

b) Što ste doznali ispitujući sadržaje tinjajućom trešćicom u epruvetama C3 i C4 nakon koraka 4 i 5?

c) Na temelju svih opažanja tijekom ovog pokusa, što mislite da se dogodilo sa vodikovim peroksidom u epruveti C3?

d) Objasnite promjene u epruveti C4 na temelju opažanja pod a) i b).

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) U epruveti C3 su se počeli razvijati mjehurići nakon dodatka sirovog komadića krumpira, a u epruveti C4 nema promjene nakon dodatka prokuhanog komadića krumpira.  b) U epruveti C3 se oslobodio plin koji podržava gorenje.  c) Vodikov peroksid se raspao (na kisik i vodu).  d) Aktivna tvar koju sadrži krumpir je kuhanjem izgubila svoju katalitičku moć.</p>	<p>a) Po 1 bod za opažanje mjehurića u epruveti C3 i po 1 bod za opažanje da nema promjene u epruveti C4 (<i>ukupno 2 x 1 bod = 2 boda</i>).  b) 1 bod  c) 1 bod  d) 2 boda za objašnjenje na tragu navedenog.   <i>Ukupno 2 boda + 1 bod + 1 bod + 2 boda = 6 bodova.</i></p>
---	--

⊗ Pripremite tinjajuću trešćicu. U **epruvetu C5** dodajte pincetom komadić svježe jetre. **Brzo tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C5, te promatrajte što se događa.**

⊗ Pripremite tinjajuću trešćicu. U **epruvetu C6** dodajte pincetom komadić prokuhane jetre. **Brzo tinjajuću trešćicu prinesite blizu površine otopine u epruveti C6, te promatrajte što se događa.**

☞ **OPAŽANJA 7.** a) Opišite promjene u epruveti C5 i u epruveti C6 nakon koraka 6 i 7.

b) Što ste doznali ispitujući sadržaje tinjajućom trešćicom u epruvetama C5 i C6 nakon koraka 6 i 7?

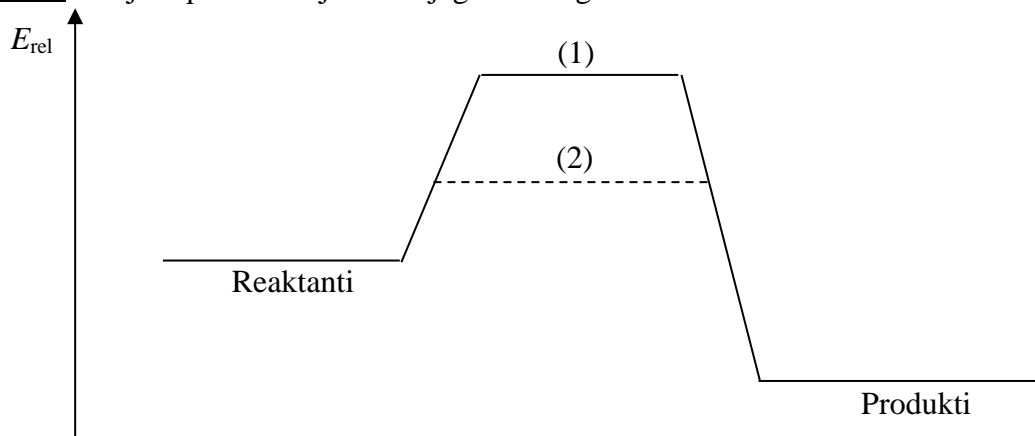
c) Na temelju svih opažanja tijekom pokusa, što možete zaključiti koji sastojci jetre su mogli djelovati u epruveti C5?

d) Zaključite kako povišenje temperature djeluje na funkciju sastojaka koje ste naveli pod c) prema opažanjima pod a) i b).

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) U epruveti C5 su se počeli razvijati mjehurići nakon dodatka komadića jetre, a u epruveti C6 nema promjene nakon dodatka prokuhanog komadića jetre.</p> <p>b) U epruveti C5 se razvio plin koji podržava gorenje, dok u epruveti C6 nije.</p> <p>c) Enzimi iz jetre su djelovali na vodikov peroksid.</p> <p>d) Povišenjem temperature enzimi iz jetre su izgubili svoju aktivnost (denaturirali su se).</p>	<p>a) Po 1 bod za opažanje mjehurića u epruveti C5 i po 1 bod za opažanje da nema promjene u epruveti C6 (ukupno <math>2 \times 1 \text{ bod} = 2 \text{ boda}</math>).</p> <p>b) 1 bod</p> <p>c) 1 bod</p> <p>c) 2 boda za objašnjenje na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;">Ukupno 2 boda + 1 bod + 1 bod + 2 boda = 6 bodova.</p>
--	---

PITANJE 9. Pažljivo proučite sljedeći dijagram i odgovorite:



a) Pridružite izraz *prijelazno stanje bez katalizatora*, odnosno *prijelazno stanje s katalizatorom* brojevima (1), odnosno (2) označenim na dijagramu. Obrazložite odgovor.

b) Na temelju dijagrama odredite kakva je reakcija s obzirom na izmjenu energije između sustava i okoline.

c) Navedite izraz kojim biste izračunali ukupnu reakcijsku entalpiju prikazanu ovim dijagramom.

d) Pomoću navedenog dijagrama obrazložite vrijednost reakcijske entalpije enzimima katalizirane i nekatalizirane reakcije.

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) (1) <i>prijelazno stanje bez katalizatora;</i> (2) <i>prijelazno stanje s katalizatorom.</i> U kataliziranoj reakciji se troši manje energije (manja je energija aktivacije ili “energetsko brdo”).</p> <p>b) S obzirom na izmjenu energije između sustava i okoline, na temelju dijagrama se može zaključiti da se radi o egzotermnoj reakciji (sustav je izgubio dio energije).</p> <p>c) <math>\Delta_r H = \sum_P  v_R  \Delta_f H(P) - \sum_R  v_P  \Delta_f H(R)</math></p> <p>d) Vrijednost reakcijske entalpije je ista kod enzima katalizirane i nekatalizirane reakcije, jer katalizatori (enzimi) samo mijenjaju put kojim se reakcija odvija.</p>	<p>a) 1 bod za točno pridružene izraze s brojevima na dijagramu i 2 boda za odgovor na tragu navedenog (ukupno 1 bod + 2 boda = 3 boda).</p> <p>b) 2 boda za odgovor na tragu navedenog.</p> <p>c) 2 boda</p> <p>d) 2 boda za odgovor na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 3 boda + 2 boda + 2 boda + 2 boda = 9 bodova.</i></p>
---	--

**PITANJE 10.** Jetra je ključni organ metabolizma i probave u organizmu, tzv. „biokemijska tvornica“. Od brojnih funkcija koje vrši, jedna od njih je i izlučivanje žuči iz jetrenih stanica.

Odgovorite:

a) Čemu služe žučne kiseline?

---

b) Koje stanice se razgrađuju u jetri, te svojom razgradnjom daju žučnu boju, bilirubin?

---

c) Što se događa dalje s bilirubinom u probavnom sustavu?

---

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>a) Žučne kiseline služe za razgradnju masti.</p> <p>b) Eritrociti se razgrađuju u jetri.</p> <p>c) Bilirubin dalje u crijevima razgrađuju bakterije u žutosmeđe spojeve, odgovorne za boju stolice.</p>	<p>a) 1 bod</p> <p>b) 1 bod</p> <p>c) 2 boda za odgovor na tragu navedenog.</p> <p style="text-align: center;"><i>Ukupno 1 bod + 1 bod + 2 boda = 4 boda.</i></p>
--	---

**PITANJE 11.** Sva hrana koju unosimo u organizam se razgrađuje djelovanjem probavnih enzima. Pritom nastaju hranjive tvari i njihove sastavne molekule, koje krv raznosi do svake stanice tijela. Također dolazi i do oslobađanja energije koja je neophodna za funkcioniranje organizma. Mnoga tkiva i organi mogu upotrebljavati masti i proteine iz hrane kao izvore energije, međutim mozak, jedan od najvažnijih organa u našem tijelu, za svoje funkcioniranje nužno mora imati dostupnu glukozu.

a) Glukoza je prema IUPAC-u 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanal. Nacrtajte njenu kondenziranu strukturnu formulu.

b) Prikažite jednadžbom kemijske reakcije izgaranje jedne molekule glukoze.

c) Sada sve reaktante i produkte (osim glukoze) iz pretvorbe koju ste napisali pod b) prikažite pomoću Lewisovih strukturnih formula.

a) Glukoza je prema IUPAC-u 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanal. Nacrtajte njenu kondenziranu strukturnu formulu.

b) Prikažite jednadžbom kemijske reakcije izgaranje jedne molekule glukoze.

c) Sada sve reaktante i produkte (osim glukoze) iz pretvorbe koju ste napisali pod b) prikažite pomoću Lewisovih strukturnih formula.

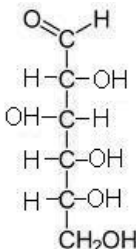
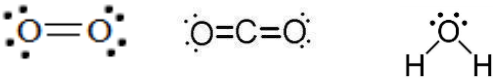
d) Pomoću zadanih podataka za entalpije stvaranja<sup>23</sup>, izračunajte reakcijsku entalpiju za pretvorbu koju ste napisali pod b):

$$\Delta_f H^\circ (\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6, \text{s}) = -1274 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta_f H^\circ (\text{CO}_2, \text{g}) = -393,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta_f H^\circ (\text{H}_2\text{O}, \text{g}) = -241,8 \text{ kJ mol}^{-1}$$

#### OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

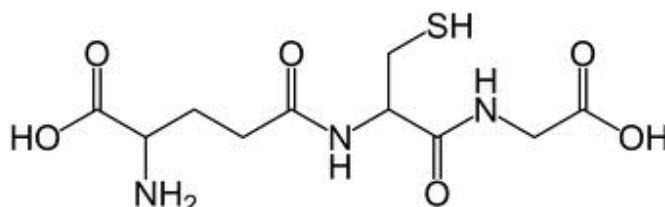
<p>a)</p>  <p>b) <math>\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{s}) + 6 \text{O}_2(\text{g}) \rightarrow 6 \text{CO}_2(\text{g}) + 6 \text{H}_2\text{O}(\text{g})</math></p> <p>c)</p> 	<p>a) 2 boda</p> <p>b) 2 boda</p> <p>c) Po 2 boda za svaku točno nacrtanu strukturu (ukupno 3 x 2 boda = 6 bodova).</p> <p>d) 2 boda za točno napisan izraz reakcijske entalpije za zadanu jednadžbu izgaranja glukoze, 2 boda za točno uvrštene vrijednosti, te 2 boda za točno izračunatu vrijednost reakcijske entalpije (ukupno 3 x 2 boda = 6 bodova).</p>
--	---



<p>d) Traži se <math>\Delta_r H^\circ(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6, \text{s}) = ?</math> Jednadžba izgaranja glukoze glasi: <math>\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{s}) + 6 \text{O}_2(\text{g}) \rightarrow 6 \text{CO}_2(\text{g}) + 6 \text{H}_2\text{O}(\text{g})</math> Prema navedenoj jednadžbi kemijske reakcije za reakcijsku entalpiju možemo pisati <math>\Delta_r H^\circ = 6 \Delta_f H^\circ(\text{CO}_2, \text{g}) + 6 \Delta_f H^\circ(\text{H}_2\text{O}, \text{g}) - \Delta_f H^\circ(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6, \text{s})</math> gdje smo odmah uvrstili stehiometrijske brojeve i zanemarili elementarne tvari jer su im entalpije stvaranja po definiciji jednake nuli. Uvrštavanjem vrijednosti dobivamo: <math>\Delta_r H^\circ = [6 \cdot (-393,5) + 6 \cdot (-241,8) - (-1274)] \text{ kJ/mol} = -2537,8 \text{ kJ/mol}</math> Reakcijska entalpija za izgaranje glukoze prema zadanoj jednadžbi iznosi <math>-2537,8 \text{ kJ/mol}</math>.</p>	<p><i>Ukupno 2 boda + 2 boda + 6 bodova + 6 bodova = 16 bodova.</i></p>
--	---

### 10.3. Zadaci za provjeru znanja

☒ **Zadatak 1.** Izračunajte relativnu molekulsku masu sljedeće molekule prikazane strukturnim prikazom:



OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

$M_r(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}) = 307,3.$	<i>1 bod</i>
--	--------------

☒ **Zadatak 2.** U koju skupinu bioloških molekula biste svrstali molekulu iz zadatka 1? Zaokružite točan odgovor!

- a) u masti i ulja
- b) u ugljikohidrate
- c) u peptide

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

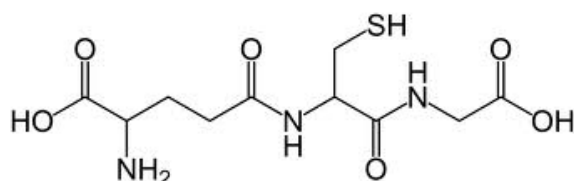
Točan odgovor je: c) u peptide	<i>1 bod</i>
-----------------------------------	--------------

☒ **Zadatak 3.** Koja specifična grupa enzima može razgraditi molekulu iz zadatka 1 na monomere?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

Peptidaze mogu razgraditi molekulu iz zadatka 1 na aminokiseline.	<i>1 bod</i>
---	--------------

☒ **Zadatak 4.** Na strukturnom prikazu molekule **prikažite strelicama** koje veze pucaju djelovanjem enzima kojeg ste naveli u zadatku 3. Kako se zovu te veze?



OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>Veze koje bi pucaju djelovanjem proteaza se zovu peptidne veze.</p>	<p>Po 1 bod za svaku točno smještenu strelicu i 1 bod za odgovor peptidne veze.</p> <p><i>Ukupno 2 strelice x 1 bod + 1 bod = 3 boda.</i></p>
--	---

☒ **Zadatak 5.** Maseni udio selenija u enzimu peroksidazi (izoliranom iz eritrocita) iznosi 0,29 %. Koja je molarna masa tog enzima, ako pretpostavimo da u 1 molu enzima ima 1 mol selenija?

OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

<p>Zadano je:  <math>w(\text{Se}) = 0,29 \%</math>          Traži se:  <math>M(\text{peroksidaze}) = ?</math></p> <p>- iz definicije masenog udjela slijedi da 100 g enzima sadrži 0,29 g selenija:  <math>m(\text{Se}) = 0,29 \text{ g}</math>  <math>m(\text{enzima}) = 100 \text{ g}</math>          - prema pretpostavci u zadatku množina selenija jednaka je množini enzima:  <math>n(\text{Se}) = n(\text{enzim})</math>  <math>m(\text{Se}) : M(\text{Se}) = m(\text{enzim}) : M(\text{enzim})</math>  <math>M(\text{enzim}) = \frac{m(\text{enzim}) \cdot M(\text{Se})}{m(\text{Se})}</math>  <math>M(\text{enzim}) = \frac{100 \text{ g} \cdot 78,96 \text{ g mol}^{-1}}{0,29 \text{ g}}</math>  <math>M(\text{enzim}) = 2,7 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}</math></p> <p>Molarna masa enzima peroksidaze je <math>2,7 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}</math>.</p>	<p><i>1 bod za <math>m(\text{Se})</math> i <math>m(\text{enzima})</math> koja slijedi iz definicije masenog udjela i 2 boda za točno izračunatu molarnu masu enzima iz pretpostavke iz zadatka da je množina selenija jednaka množini enzima.</i></p> <p><i>Ukupno 1 bod + 2 boda = 3 boda.</i></p>
---	---

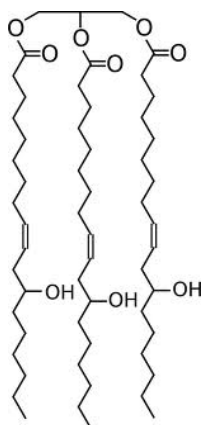
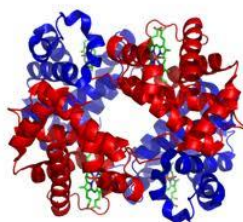
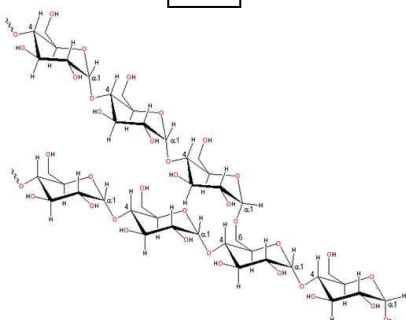
☞ **Zadatak 6.** Povežite strelicama **dva točna i cjelovita niza** (povezujući odgovarajuće slike sa pripadajućim pojmovima od 1 do 4):

1) slika namirnice → 2) prikaz biološke molekule koju namirnica sa slike sadrži → 3) dokazna reakcija ili dokazni reagens za dokazivanje bioloških molekula iz pripadajuće namirnice → 4) mjesto u probavnom sustavu gdje **započinje** probava bioloških molekula iz pripadajuće namirnice.

1



2



3

biuret reakcija

Fehlingov reagens

Lugolova otopina

4


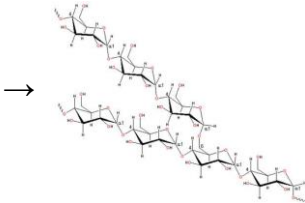

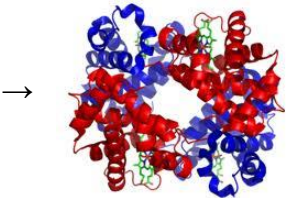
jetra

usta

želudac

## OČEKIVANI UČENIČKI ODGOVOR:

Ispravni i cjeloviti nizovi su:

1	2	3	4	
	→ 	→ Lugolova otopina	→ usta	Za svaki točno navedeni član niza 1 bod (ukupno 4 x 1 bod = 4 boda).  Ukupno 2 niza x 4 boda = 8 bodova.
	→ 	→ biuret reakcija	→ želudac	

**Prijedlog ocjena:**

10-11 bodova – dovoljan (2)

12-13 bodova – dobar (3)

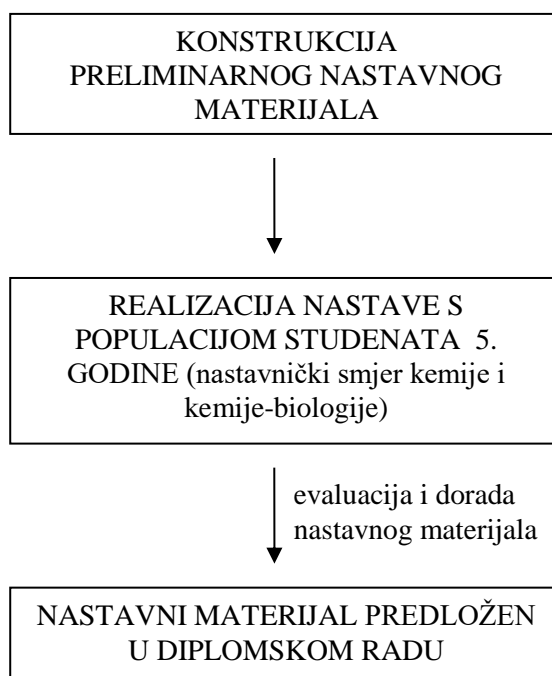
14-15 bodova – vrlo dobar (4)

16-17 bodova – odličan (5)

## § 11. ZAKLJUČAK

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada bio je osmisliti novi nastavni materijal koji bi buduće nastavnike kemije i biologije potaknuo na kreativnost i interdisciplinarni pristup pri obradi i usustavljanju nastavne jedinice „Probavni enzimi“. Nastavni materijal je prilagođen obrazovnom razdoblju četvrtog razreda gimnazije u završnom programskom dijelu, u obliku radionice iz kemije i biologije kroz dva blok-sata. Nastojalo se povezati nastavne sadržaje iz kemije i biologije prikladnim nastavnim strategijama, metodama i postupcima, te tako kod učenika postići znanstveno utemeljeno stvaranje koncepata i trajnost usvojenih znanja koja imaju uporabnu vrijednost u svakodnevnom životu.

Integrirana nastavna jedinica „Probavni enzimi“ probno je provedena sa studentima pete godine nastavničkog smjera kemije i kemije-biologije u okviru kolegija Metodika nastave kemije sa svrhom prilagođavanja preliminarnog nastavnog materijala i tjeka sata. Potom je nastavni materijal doraden i predložen kao metodički dio ovog diplomskog rada (shema M-3).



Shema M-3. Prikaz tijeka stvaranja nastavnog materijala.

Nastavni materijal se sastoji od uputa za nastavnike i uputa za učenike. Uputa za nastavnike sadrži pregled očekivanih učeničkih obrazovnih ishoda iz kemije i biologije koji prethode nastavnoj jedinici „Probavni enzimi“, odgovarajuću teoretsku osnovu i pripremu za izvođenje navedene nastavne jedinice. Uputa za učenike sadrže radne listiće za dvije skupine učenika (grupa A i B). Svaki radni listić ima po tri opisa pokusa, uz koje se traže učenička opažanja, te rješavanje teoretskih i računskih zadataka.

Na kraju upute za učenike se nalazi test za samoocjenjivanje, shema bodovanja s navedenim očekivanim učeničkim opažanjima, zaključcima i odgovorima koja se učenicima projicira u vremenu predviđenom za valorizaciju. Test za samoocjenjivanje čini šest zadataka za provjeru znanja.

Budući da je ova radionica namijenjena za učenike na samom kraju četvrtog razreda srednje škole, pretpostavlja se da su učenici stekli odgovarajuću razinu teoretskog znanja, vještinu i izvježbanost u izvođenju pokusa, koje bi im omogućili uspješno i zabavno izvođenje ovog dvostrukog blok-sata.

Učestalijim interdisciplinarnim pristupom popraćenim primjerima iz svakodnevnog života prilikom izvođenja pojedinih nastavnih jedinica, zasigurno bi učenici lakše i uspješnije savladavali zadano školsko gradivo, a nastavnici bi više surađivali i međusobno si olakšavali posao.

## § 12. LITERATURNI IZVORI

1. M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
2. L. Bognar, M. Matijević, *Didaktika*, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
3. V. Poljak, *Didaktika*, Školska knjiga, Zagreb, 1985.
4. B. S. (Ed.) Bloom, M. D. Engelhart, E. J. Furst, W. H. Hill and D. R. Krathwohl, *Taxonomy of educational objectives: the classification of educational goals; Handbook I: Cognitive Domain*, New York, David McKay, 1956.
5. URL: <http://www.carnet.hr/referalni/obrazovni/spzit/pismeni/teorija/bloom>, 11.01.2012.
6. URL:  
[http://www.os-vnazor-trenkovo.skole.hr/dokumenti?dm\\_document\\_id=50&dm\\_dnl=1](http://www.os-vnazor-trenkovo.skole.hr/dokumenti?dm_document_id=50&dm_dnl=1),  
12.01.2012.
7. L.W. (Ed.) Anderson, D.R. (Ed.) Krathwohl, P.W. Airasian, K.A. Cruikshank, R.E. Mayer, P.R. Pintrich, J. Raths and M. C. Wittrock, *A taxonomy for learning, teaching, and assessing: A revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives* (Complete edition), New York, Longman, 2001.
8. URL: <http://public.mzos.hr>, 25.01.2012.
9. URL: <http://www.ncvvo.hr>, 25.01.2012.
10. L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymocko, *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York, 2007.
11. URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>, 5.03.2012.
12. K. B. Abel, D. R. Halenz, *J. Chem. Educ.* **69** (1992) 9.
13. I. Regula, M. Slijepčević, *Životni procesi*, Udžbenik iz biologije za treći razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2004.
14. O. P. Springer, B. Pevalek-Kozlina, *Biologija 3*, Udžbenik za treći razred gimnazije, Profil, Zagreb, 1997.
15. Ž. Lukša, S. Mikulić, *Život 3*, Udžbenik za treći razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2010.
16. M. Sikirica, B. Korpar-Čolig, *Organska kemija*, Udžbenik iz kemije za četvrti razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 2004.



17. M. Sikirica, *Zbirka kemijskih pokusa za osnovnu i srednju školu*, Školska knjiga, Zagreb, 2011.
18. S. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
19. URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Amino\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid), 22.05.2012.
20. C. R. Noller, *Kemija organskih spojeva*, Tehnička knjiga, Zagreb, 1967.
21. URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Lactose\\_intolerance](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactose_intolerance), 12.02.2012.
22. URL: <http://www.bloodsugarbattles.com/blood-sugar-level-chart.html>, 15.05. 2018.
23. P. Atkins, J. de Paula, J. Keeler, *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2017.
24. D. Novoselić, Lj. Vidović, *Čovjek i zdravlje*, Udžbenik iz biologije za strukovne škole, Alfa, Zagreb, 2009.
25. L.C. Bering, *J. Chem. Educ.* **71** (1994) 241.
26. URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Liver>, 5.03.2012.

## § 13. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Adela Jurković

Datum rođenja: 09. listopada 1983.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

### Obrazovanje

1991.–1992. Osnovna škola Miroslav Krleža, Zagreb

1992.–1993. Osnovna škola Städtische Grundschule Jülich Nord, Jülich, Njemačka

1993.–1998. Osnovna škola Miroslav Krleža, Zagreb

1998.–2002. XVI. jezična gimnazija, Zagreb

2002.–2018. PMF, Biološki odsjek, dodiplomski studij biologije i kemije, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2008. časopis Priroda, članak: „Ah ta divna svjetleća stvorenja!“ (broj 970., 7-8 mjesec)

2009. časopis Priroda, članak: „Opasnost: mora postaju sve kiselijaa“ (broj 981., 7-8 mjesec)

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Deseti hrvatski biološki kongres, Osijek, 14.-20. rujna 2009., Abstr. p. 334.

A. Jurković, I. Radanović: Utjecaj dobi dana na pamćenje učenika tijekom nastave prirode.

2. Osmi susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 18. i 19. veljače 2010., Abstr. p. 95.

A. Jurković, D. Milić, D. Matković-Čalogović: Kristalizacija kloro-derivata govedeg inzulina.

3. 10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zagreb, July 5-15, 2010, Abstr. p. 80.

A. Jurković, D. Matković-Čalogović: Crystallization of the chloro-derivative of human insulin.

4. Jedanaesti hrvatski biološki kongres, Šibenik, 16.-21. rujna, 2012., Abstr.

A. Jurković, D. Mrvoš-Sermek, I. Radanović: Integrirani pristup poučavanju probavnih enzima.

5. 26th European Crystallographic Meeting, Technische Universität Darmstadt (ur.). - Darmstadt, August 29-September 02, 2010, Abstr.

B. Prugovečki, A. Jurković, and D. Matković-Čalogović: Crystallization and structure of the human Co-insulin derivative - a new crystal form.

6. 3rd International school of crystallization, Granada, May 21-25, 2012, Abstr. p. 123.

I. Pulić, B. Prugovečki, A. Jurković, D. Matković-Čalogović: Crystallization of Insulin Derivatives.

## Publikacije

1. A. Jurković, Utjecaj dobi dana na pamćenje učenika tijekom nastave Prirode, *Educatio Biologiae* 1 (2014) 55-62.