

## Poročilo o laboratorijskem delu

# Delovanje enostavnih katalizatorjev

### UVOD

Encím je beljakovina ali beljakovinski kompleks, ki katalizira biokemične reakcije v živih ali neživih celicah, kar pomeni, da uravnava hitrost in smer teh reakcij, pri čemer se sam ne porablja. Encime izdelujejo živi organizmi. Encime RNA ali ribocime sestavlja RNA namesto beljakovin. Ribocimi katalizirajo le izrezovanje RNA.

Ko se molekula snovi (substrat), ki bo sodelovala v reakciji, ki jo katalizira encim, veže nanj, nastane kompleks encim-substrat. Encimi kot drugi katalizatorji znižajo aktivacijsko energijo reakcije. To pomeni da lahko reakcija poteče pri bistveno nižji temperaturi, saj je za nekatere reakcije potrebna tako visoka temperatura, da celica ne bi preživela. Njihovo ime ima pogosto končnico -aza, začne pa z imenom, ki označuje spojino, na katero delujejo. Primer: encim peroksidaza (včasih so ga imenovali tudi katalaza) razkrajata vodikov peroksid.

Mi smo pri laboratorijskem delu uporabljali oz. preizkušali katalazo. Katalaza je encim, ki se nahaja v tkivih, ki vsebujejo maščobe, zelenih listih in v vseh aerobnih celicah. Pri človeku se nahaja v jetrih. Pri večini aerobnih organizmov je katalaza pogosto navzoča v velikih koncentracijah, ni pa je pri obligatnih anaerobnih - pri tistih organizmih, kjer je kisik za njih toksičen.

Vodikov peroksid je tekočina s kemijsko formulo  $H_2O_2$  in nastaja kot stranski proizvod pri kemijskih reakcijah v živčnih celicah. Ker je strupen se ga mora celica znebiti in ga razgraditi. Pri razkroju sodeluje katalizator, ki reakcijo pospeši – encim. Zunaj telesa je  $H_2O_2$  brezbarven in se zlahka razkrajata v vodi in kisiku. Uporablja se kot pogonsko gorivo v raketah, razredčen (v obliki 3% raztopine) pa za dezinfekcijo in beljenje.

Pri tem laboratorijskem delu smo opazovali delovanje katalaze, ki pospešuje razkroj vodikovega peroksida. Primerjali smo njeno delovanje z delovanjem nebeljakovinskih katalizatorjev in ugotavljali, v kakšnih razmerjih deluje.

## Cilji:

- spoznali razlike in podobnosti v delovanju anorganskega katalizatorja in encima,
- spoznali dejavnike, ki vplivajo na delovanje encimov (pH, temperatura, velikost delcev),
- razumeli pomen encimov v živih celicah,
- spoznali encim katalazo in njeno vlogo v celicah.

## Material:

- erlenmajerica
- manganov dioksid v prahu
- sveža 3 % raztopina vodikovega peroksida
- destilirana voda
- koščki svežih govejih jeter in krompirja
- standardne epruvete
- valji s prostornino 350 ml
- pinceta
- termometer
- držalo za epruveto
- kopel z vrelo vodo
- ledena kopel
- kopel sobne temperature
- steklena paličica
- kremenčev pesek ( $\text{SiO}_2$ )
- univerzalni indikatorski papir
- skalpel
- raztopina natrijevega hidroksida (0,1 M)
- raztopina klorovodikove kisline (0,1 M)
- terilnica in pestilo
- lesene trske
- vžigalice
- dve veliki epruveti
- gumijaste cevke
- steklene cevke
- preluknjani zamaški
- gorilnik
- stativ s tremi mufami in prižemami

## **Postopek:**

### **❖ Delovanje katalizatorja in delovanje encima**

Nalijte raztopino  $\text{H}_2\text{O}_2$  v dve epruveti približno do višine 2 cm (5 ml). V eno dodajte malo drobnega peska, v drugo pa približno enako količino manganovega dioksida. Pazite, da ne boste prenašali  $\text{MnO}_2$  in kremenčevega peska z isto žličko.

### **❖ Učinek encima**

V dve čisti epruveti nalijte enaki količini (2 ml)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V eno dodajte za riževno zrno velik košček jeter, v drugo pa enako velik košček krompirja. Košček jeter držite v epruveti s pomočjo paličice, dokler reakcija ne poteče.

### **❖ Ponovna uporaba encima**

Tekočino iz epruvete z jetri iz prejšnjega poskusa razdelite v 2 čisti epruveti. Tudi jetra razdelite na dva dela in dajte v vsako epruveto 1 košček. V prvo epruveto dodajte še svež košček jeter, v drugo pa dolijte še 1 ml svežega  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **❖ Vpliv velikosti delca na delovanje encima**

Dajte nekaj koščkov jeter v velikosti riževih zrn v eno in nekaj enako velikih koščkov krompirja v drugo epruveto. V obe epruveti vsujte malo peska in ves material previdno zmečkajte s stekleno paličico. Nato dodajte še po 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **❖ Vpliv temperature na delovanje encima**

Nekaj jeter na dnu epruvete postavite za 10 minut v vrelo vodo, eno epruveto postavite za 10 minut v toplo vodno kopel ( $37^\circ\text{C}$ ) in eno v ledeno. Potem vzemite epruvet iz njihovih vodnih kopeli in v vsako 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

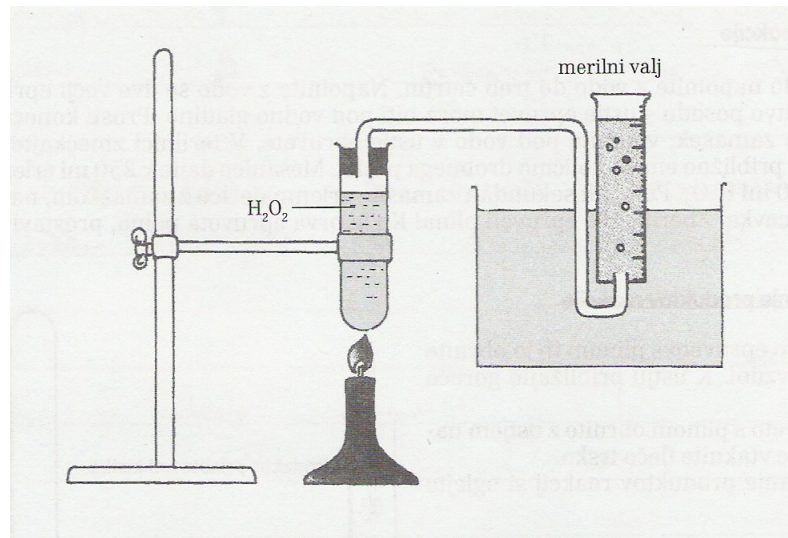
## ❖ Vpliv pH na delovanje encima

V vsako izmed treh čistih epruvet dajte majhen košček jeter. V prvo epruveto dodajte 2 ml destilirane vode, v drugo 2 ml natrijevega hidroksida in v tretjo 2 ml klorovodikove kisline. Zapišite si pH vsake epruvete tako, da na indikatorski papir kanete po 1 kapljico ali vode ali NaOH ali  $H_2SO_4$ . V vsako epruveto vlijte še 2 ml  $H_2O_2$ .

## ❖ Demonstrirana poskusa, ki sta bila izvedena preko profesorice in laboranta

### o Razkroj $H_2O_2$ s segrevanjem (brez katalizatorjev)

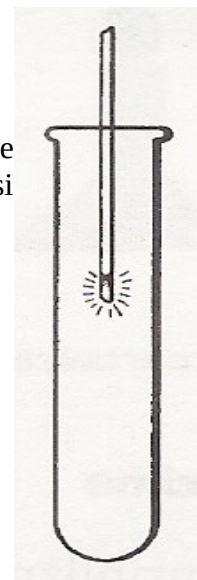
- Pripravite aparaturo za zbiranje plina (slika 1), ki nastaja pri razgradnji  $H_2O_2$ , nato nalijte v epruveto 5 ml 3 % raztopine  $H_2O_2$  in jo previdno segrevajte tako, da se bo  $H_2O_2$  začel razkrajati v produkte razgradnje, od katerih je eden plin. Plin zbirajte v aparaturi. S tlečo trsko ugotovite, kateri plin je nastal.



Slika 1: Aparatura za zbiranje plina

### o Dokazovanje produktov reakcije

- Epruveto s plinom obrnite z ustjem navzgor. V ustje vtaknite tlečo trsko. Za dokazovanje produktov reakcij si oglejte sliko 2.



**LEGENDA:**

- 0 = ni reakcije
- 1 = počasna reakcija
- 2 = zmerna reakcija
- 3 = hitra reakcija
- 4 = zelo hitra reakcija

**Rezultati:****1. Delovanje katalizatorja in delovanje encima (kontrolni poskus)**

Slika 2: Poskus prisotnosti kisika

Tabela 1

EPRUVETA	Snov v H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hitrost reakcije
1	Pesek	0
2	MnO <sub>2</sub>	4

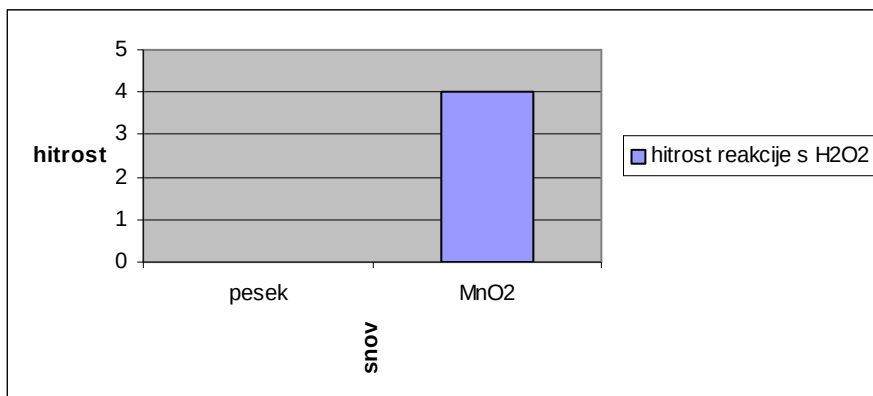
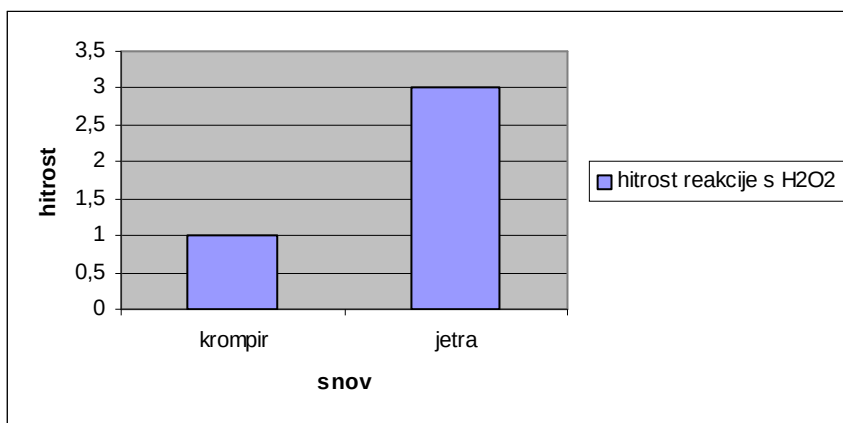
Slika 3: Hitrost reakcije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kontrolni poskus)**2. Učinek encima**

Tabela 2

EPRUVETA	Snov v H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hitrost reakcije
1	Krompir	1
2	Jetra	3

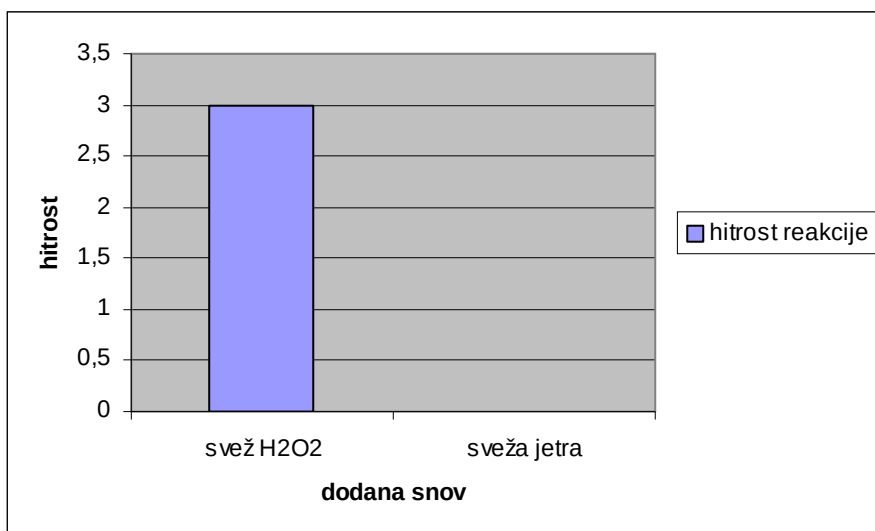


Slika 4: Hitrost učinka encima

### 3. Ponovna uporaba encima

Tabela 3

EPRUVETA	Snovi	Hitrost reakcije
1	Jetra iz prejšnjega poskusa + svež H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 - 3
2	Jetra iz prejšnjega poskusa + sveža jetra	0

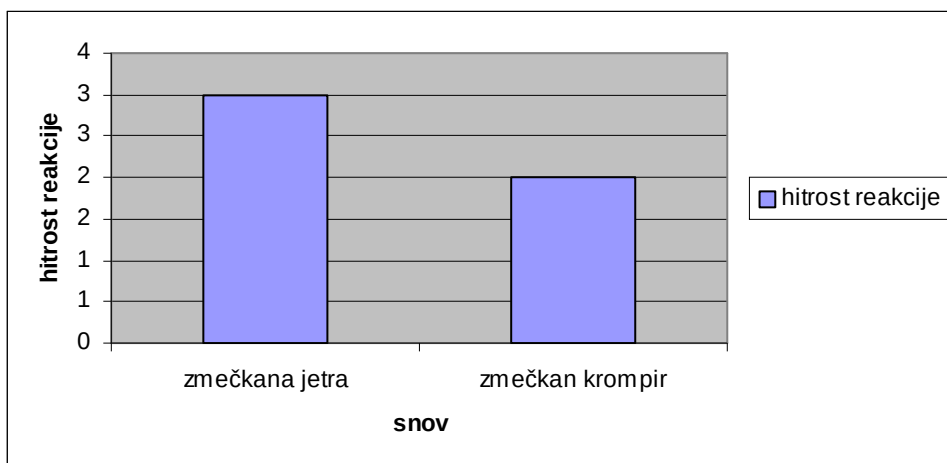


Slika 5: Hitrost pri ponovni uporabi encima

### 4. Vpliv velikosti delcev

Tabela 4

EPRUVETA	Snov	Hitrost reakcije
1	Zdrobljena jetra + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 - 4
2	Zdrobljen krompir + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 - 3

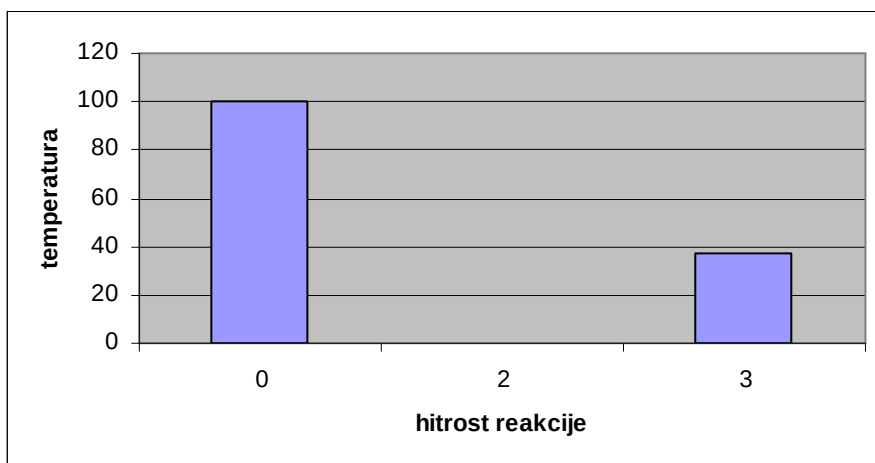


Slika 6: Hitrost reakcije glede na velikost delcev

## 5. Vpliv temperature

Tabela 5

EPRUVETA	Snovi	Temperatura	Hitrost reakcije
1	Jetra + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100°C	0
2	Jetra + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37°C	3 – 4
3	Jetra + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0°C	2 – 3

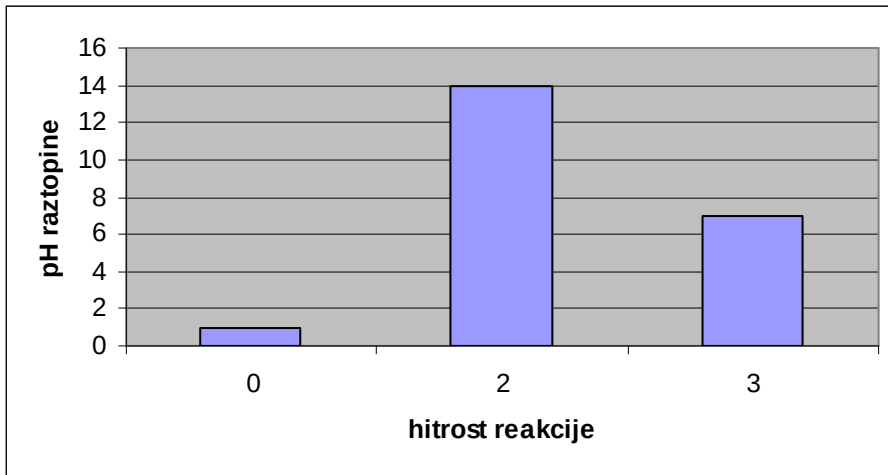


Slika 7: Vpliv temperature na hitrost reakcije

## 6. Vpliv pH

Tabela 6

EPRUVETA	Dodana snov	pH	Hitrost reakcije
1	NaOH	14	1 – 2
2	H <sub>2</sub> O	7	2 – 3
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0



Slika 8: Vpliv pH na hitrost reakcije



## Razprava:

Po končanih 2 šolskih urah smo dosegli cilje, zastavljene ob začetku dela. Prvi poskus ki smo ga opravili je bil kontrolni poskus. Pri njem smo hoteli dokazati, da pri nadaljnjih poskusi, ko bomo uporabili pesek skupaj z jetri, pesek nima nobene funkcije pri razpletu reakcije, saj je poskus pokazal, ne vpliva na hitrost reakcij. Po končanem drugem poskusu smo pokazali, koliko je v krompirju in koliko je v jetrih katalaze. Tudi v krompirju je prisotna katalaza a v manjših količinah. Potem smo ocenjevali hitrost pri reakciji in ugotovili, da pri krompirju reakcija poteče zelo počasi, pri koščku jeter pa hitreje, a ne tako hitro kot pri  $MnO_2$ , ker so jetra v 1 kosu.

Pri tretjem poskusu smo uporabili jetra iz prejšnjega poskusa in jih razdelili na 2 dela. Ko smo dali vsakega v svojo epruveto in dodali potrebno, se v epruveti, kjer smo dodali sveža jetra ni zgodilo nič, saj se je  $H_2O_2$  porabil že v prejšnjem poskusu in zaradi tega katalaza ni imela svojega substrata, medtem ko je v drugi epruveti reakcija ponovno potekla, saj je encimi pri reakcijah ne porabijo in bi reakcija potekla tudi po 20. ali pa 100. poskusu. Preverili smo tudi, kaj se zgodi, če v epruveto iz prejšnjega poskusa, kjer smo vzeli ven jetra, ponovno dodamo  $H_2O_2$ . Reakcija je potekla, ker se je iz jeter nekaj encimov katalaze preneslo na steno epruvete in ponovno reagiralo z  $H_2O_2$ .

Pri četrtem poskusu smo koščka krompirja in jeter zmečkali in ju izpostavili  $H_2O_2$ . rezultati so pokazali, da je tu reakcija potekla hitreje kot pri drugem poskusu, saj je bila snov, na kateri smo eksperimentirali zmečkana in je zato hitreje prišlo do reakcije, kot če sta snovi v večjem kosu.

Pri vplivu temperature na hitrost reakcije smo jetra izpostavili 3 različnim okoljem. Prvi košček je bil v vroči kopeli, drugi v vodi sobne temperature in tretji v mrzli vodi. Epruveto iz vroče kopeli je bilo potrebno najprej ohladiti, saj bi se lahko  $H_2O_2$  razgradil zaradi tega. Ko smo v ohlajeno epruveto dodali  $H_2O_2$  reakcija ni potekla, ker je beljakovinski del katalaze zakrknil zaradi izpostavljenosti visokim temperaturam. Pri jetrih, ki so bila na sobni temperaturi je reakcija potekla hitro, pri jetrih iz mrzle vode pa je potekla počasi.

Sledil je še poskus vpliva pH na katalazo. Najprej smo preverili pH baze, kisline in vode in nato te tekočine dodali jetrom. Ko smo potem dodali  $H_2O_2$  se v kislini ni zgodilo nič, ker kislina denaturira beljakovine kar pomeni da je naredila katalazo neuporabno. V bazi je reakcija potekla zelo počasi, v vodi pa je potekla normalno.

Na koncu smo opravili še demonstriran poskus dokazovanja produktov reakcija – kisika, enkrat vmes med našimi samostojnimi poskusi pa nam je laborant demonstriral razkroj  $H_2O_2$  s segrevanjem. Dokaz produkta reakcije oz. kisik smo dokazali s tlečo trsko, ki ob stiku s kisikom zagori.

## Zaključki:

- ✓  $\text{H}_2\text{O}_2$  lahko razgradimo s segrevanjem, manganovim dioksidom in s katalazo.
- ✓ V jetrih je prisotnih več encimov katalaze kot v krompirju, ki pa še hitreje reagirajo, če so kosi krompirja in jeter zmečkani.
- ✓ Ugotovili smo, da se encimi ne porabljajo ampak samo opravijo svoje delo na substratu in preidejo na novega.
- ✓ Pri razgradnji  $\text{H}_2\text{O}_2$  s segrevanjem nastaneta kisik in vodik, pri razgradnji s katalazo pa vodik in voda.
- ✓ Hitrost reakcije je odvisna od temperature, saj pri visokih temperaturah ne poteče, ker beljakovinski dej zakrknje.
- ✓ Enako velja pri pH, saj kisline denaturirajo beljakovinski del encima.
- ✓ Tleča trska ob prisotnosti enega od produktov reakcije (kisika) zagori.

## Literatura:

- Zapiski in navodila pri pouku
- Biologija; navodila za laboratorijsko delo; Jože Drašler [et al.] , zbrala Smilja Pevec; 1. izd., 5. natis – Ljubljana: DZS, 2001
- Biologija laboratorijsko delo; Smilja Pevec; 2. izd., 5. natis; Ljubljana: DZS, 2003
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Encim> (26. 12. 2006)
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Katalaza> (26. 12. 2006)
- [http://sl.wikipedia.org/wiki/Vodikov\\_peroksid](http://sl.wikipedia.org/wiki/Vodikov_peroksid) (26. 12. 2006)
- Biologija, shematski pregledi/ W. R. Pickering; prevod Aleš Sojar/ 2. natis/ Ljubljana : Tehniška založba Slovenije, 2002