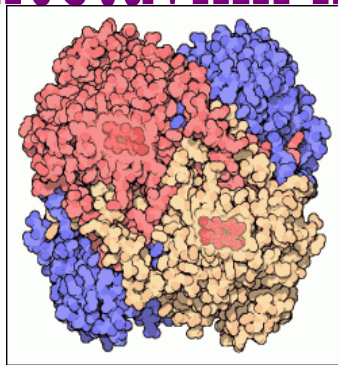


Delovanje enostavnih katalizatorjev



Encim katalaza

1. UVOD

Za vsako reakcijo je na začetku potrebna neka dodatna energija, pravimo, da se morajo molekule aktivirati in tej energiji pravimo **aktivacijska energija**. Ta poveča hitrost molekul in s tem tudi kinetično energijo molekul. Zaradi večje hitrosti se molekule med seboj močneje in hitreje trkajo, zato je tudi hitrost reakcije večja.

Aktivacijska energija pa se da s pomočjo **katalizatorjev** zelo znižati. Katalizatorji torej zmanjšajo aktivacijsko energijo in pospešijo kemično reakcijo. Katalizatorji se spajajo z molekulami, ki reagirajo, nato pa se odcepijo in povežejo z naslednjimi reagirajočimi molekulami. Torej se ne spreminjajo in ne porabljujejo. Pri laboratorijskem delu smo spoznali anorganski katalizator manganov dioksid – MnO_2 , ki razgrajuje vodikov peroksid – H_2O_2 . Katalizatorje v živih bitjih imenujemo biokatalizatorji oz. **encimi**. Ti omogočajo hitre reakcije že pri zmernih temperaturah. Encimi nastajajo v celicah in delujejo v celici ali pa zunaj nje. V vsakem organizmu je mnogo encimov, ki sodelujejo pri procesih presnove (metabolizmu).

Zgradba encimov:

- ⇒ kemično so **beljakovine ali proteini**
- ⇒ pogosto so proteidi, ko je na beljakovino vezan še dodaten **nebeljakovinski del** (koencim oz. prostetična skupina). Nebeljakovinski del so lahko: metalni oz. kovinski del, vitamini (pogosto iz skupine B) ali pa hem (porfirin).

Pri laboratorijskem delu smo spoznali tudi encim KATALAZO. Najdemo ga skoraj v vseh živih bitjih. Zgrajena je iz beljakovine in nebeljakovinskega dela – hema. Katalaza razgrajuje strupeni vodikov peroksid, ki nastaja v celici kot stranski produkt presnove. Hitrost reakcije je s katalazo deset milijon krat večja kot brez nje.

Ker encimi potekajo tudi zunaj organizma, lahko proučujemo reakcije v epruveti. Tako nas ne motijo druge kemične reakcije, ki potekajo sočasno v celici.

Lastnosti encimov:

- ⇒ so specifični, reagirajo le določene reakcije, ki so odvisne od molekularne strukture in oblike encima. Snovi na katere encimi delujejo imenujemo **substrati**. Encimska molekula se združi z molekulo substrata in nastane kompleks **encim-substrat**.
- ⇒ Katalitično delovanje je omejeno na aktivni center ali aktivno mesto.
- ⇒ Encimi se pri reakcijah ne porabljujejo.
- ⇒ Pogosto delujejo encimi obojestransko ali reverzibilno.

Na encimsko aktivnost vplivajo:

- ⇒ temperatura
- ⇒ pH
- ⇒ koncentracija substrata
- ⇒ koncentracija encima
- ⇒ inhibitorji (imajo podobno obliko kot substrat, vežejo se na aktivni center in s tem preprečijo delovanje encima)
- ⇒ aktivatorji (včasih pomembni za popolno ujemanje aktivnega mesta s substratom)

Namen in cilji vaje:

- ➔ spoznati razlike in podobnosti v delovanju anorganskega katalizatorja in encima
- ➔ spoznati dejavnike, ki vplivajo na aktivnost reakcije
- ➔ spoznati pomen encimov v živih celicah
- ➔ spoznati encim katalazo in njeno vlogo v celicah
- ➔ spoznati produkte reakcije med vodikovim peroksidom in katalazo
- ➔ spoznati zgradbo encimov
- ➔ spoznati, da se encimi ne porabljujejo
- ➔ spoznati potek dokazovanja produktov reakcije
- ➔ spoznati aparaturo za zbiranje plina

2. 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 epruvete
- ⇒ kopel z vrelo vodo
- ⇒ ledena voda
- ⇒ kopel sobne temperature
- ⇒ steklena paličica
- ⇒ kremenčev pesek (SiO₂)
- ⇒ univerzalni indikatorski papir
- ⇒ skalpel
- ⇒ raztopina natrijevega hidroksida (0,1 M)
- ⇒ raztopina klorovodikove kisline (0,1 M)
- ⇒ kristalizirka
- ⇒ terilnica in pestilo
- ⇒ lesene trske
- ⇒ vžigalice
- ⇒ dve veliki epruveti
- ⇒ gumijaste cevke
- ⇒ steklene cevke
- ⇒ preluknjani zamaški
- ⇒ gorilnik
- ⇒ stativ s tremi mufami in prižemami

3. POSTOPEK

Dr. Jože Drašler, prof. dr. Nada Gogala, mag. Meta Povž, prof. dr. Franc Sušnik, prof. dr. Tatjana Vrčkovnik, dr Branka Vesel, BIOLOGIJA, NAVODILA ZA LABORATORIJSKO DELO, DZS, Ljubljana, 2001, str. 20, 21, 22

4. REZULTATI

1. razkroj vodikovega peroksida s segrevanjem

Pri reakciji nastane plin kisik, ki smo ga dokazali s tlečo trsko.

Tabela št. 1: 2. delovanje anorganskega katalizatorja

Epruveta	Dodane snovi	Hitrost reakcije
1	vodikov peroksid + kremenčev pesek	0
2	vodikov peroksid + manganov dioksid	1

Tabela št. 2: 3. učinek encima

Epruveta	Dodane snovi	Hitrost reakcije
1	vodikov peroksid + košček jeter	3
2	vodikov peroksid + košček krompirja	1

Tabela št. 3: 4. ponovna uporaba encima

Epruveta	Dodane snovi	Hitrost reakcije
1	vodikov peroksid + nova jetra	0
2	vodikov peroksid + svež vodikov peroksid	3

Tabela št. 4: 5. vpliv velikosti delcev na delovanje encima

Epruveta	Dodane snovi	Hitrost reakcije
1	vodikov peroksid + zmečkana jetra + kremenčev pesek	4
2	vodikov peroksid + zmečkan krompir + kremenčev pesek	2

Tabela št. 5: 6. vpliv temperature na delovanje encima

Epruveta	Dodane snovi	Temperatura	Hitrost reakcije
1	vodikov peroksid + jetra	100°C	0
2	vodikov peroksid + jetra	37°C	4
3	vodikov peroksid + jetra	3°C	2

Tabela št. 6: 7. vpliv pH na delovanje encima

Epruveta	Dodane snovi	pH (brez dodanega vodikovega peroksida)	Hitrost reakcije
1	jetra + kremenčev pesek + vodikov peroksid + destilirana voda	6	3
2	jetra + kremenčev pesek + vodikov peroksid + HCl	1	0
3	jetra + kremenčev pesek + vodikov peroksid + NaOH	13	1

LEGENDA za hitrost reakcije:

0= ni reakcije

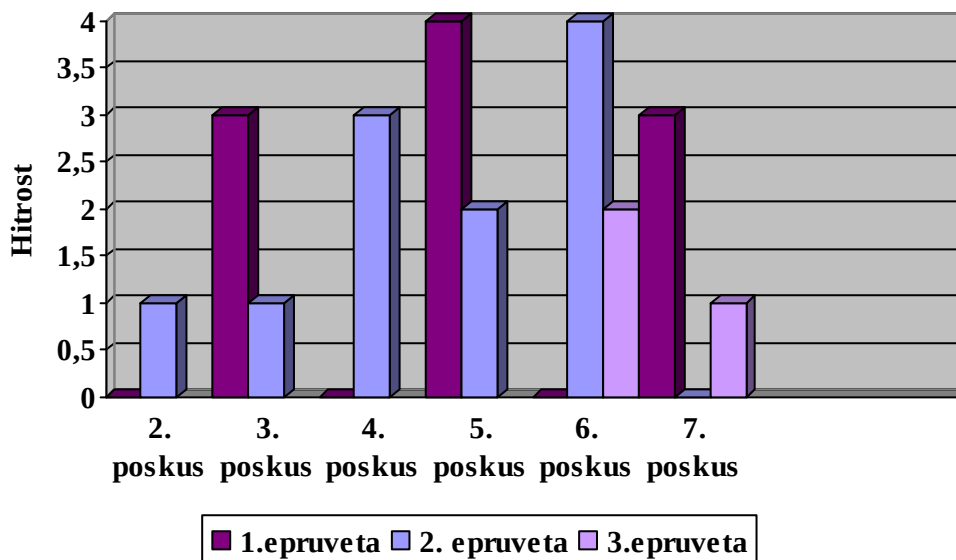
1= počasna reakcija

2= zmerna reakcija

3= hitra reakcija

4= zelo hitra reakcija

Graf 1: Hitrost reakcije pri različnih poskusih

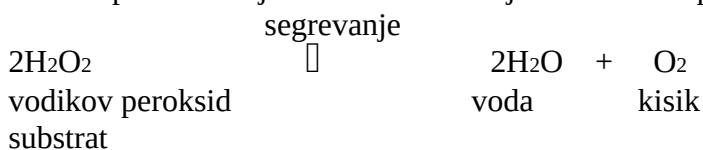


3. epruveta je bila uporabljena le pri poskusu 6. in 7.

5. RAZPRAVA

1. Razkroj H_2O_2 s segrevanjem

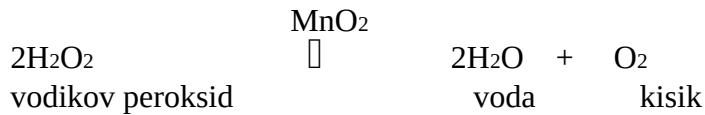
Produkt reakcije je bil plin kisik, ki smo ga zbrali v okrog obrnjene epruveti z vodo in ga dokazali s tlečo trsko, ki je zagorela. V epruveti pa je ostal drugi produkt reakcije, voda. Reakcija je potekala počasi in minilo je kar nekaj časa, da so začeli izhajati produkti. Reakcija je bila počasna, saj nismo dodali katalizatorja, ki bi znižal aktivacijsko energijo in s tem pospešil reakcijo. Za aktivacijsko energijo nam je v tem primeru služilo segrevanje. V živih celicah pa tako razgrajevanje s pomočjo segrevanja ni mogoče, saj pri taki temperaturi beljakovine denaturirajo. Tako za razpad celice uporabijo encim katalazo.



2. Delovanje anorganskega katalizatorja

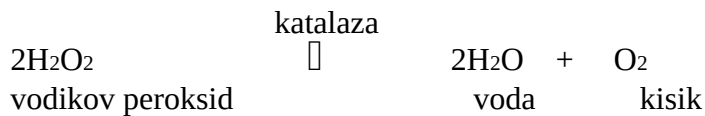
Ta poskus je bil kontrolni poskus. V epruveti s kremenčevim peskom ni prišlo do reakcije, saj kremenčev pesek – SiO_2 ni katalizator. S tem smo dokazali, da kremenčev pesek v kasnejših poskusih ne bo vplival na sam potek reakcije. Kremenčev pesek smo namreč uporabili za lažje drobljenje koščka jeter in krompirja. Ker je manganov dioksid – MnO_2 anorganski katalizator, ki razgrajuje vodikov peroksid – H_2O_2 , je v tem primeru reakcija potekla. To smo lahko videli, saj se je vsebina epruvete penila. Pri reakciji se je sprostil energija, ki je segrela epruveto. Iz tega lahko sklepamo da gre za eksotermno reakcijo. To reakcijo bi lahko pospešili tako, da bi dovajali toploto, saj MnO_2 ni encim in ne bi prišlo do denaturacije.

Že pri tem poskusu pa se nam poraja vprašanje, ali se katalizator (v tem primeru anorganski) porablja. To bi lahko dokazali podobno, kot kasneje pri poskusu št. 4. Po končani reakciji bi vsebino epruvete razdelili v dve epruveti (košček jeter in tekočino). V prvo bi dodali nov H_2O_2 v drugo pa nov košček jeter. Reakcija bi potekla le v epruveti, kateri smo dodali svež substrat, vodikov peroksid - H_2O_2 . V drugi epruveti pa reakcija ne bi potekla. Iz tega bi sklepali, da se katalizator pri reakcijah ne porablja.



3. *Učinek encima na H₂O₂*

V prvo epruveto smo dali košček jeter, v drugo pa košček krompirja. V obe smo nato nalili vodikov peroksid in v obeh epruvetah je reakcija potekla. V epruveti s koščkom jeter je bila reakcija dokaj hitra, predvsem pa hitrejša od reakcije pri krompirju. Pri reakciji je namreč sodeloval encim oz. biokatalizator katalaza, ki sodeluje pri razgradnji vodikovega peroksida in reakcijo pospeši s tem, da ji zmanjša aktivacijsko energijo. Katalaza je beljakovina in jo najdemo v tkivih rastlin in živali. Ker je reakcija hitrejša pri koščku jeter sklepamo, da je koncentracija katalaze pri živalih večja kot pri rastlinah. Vzrok tega lahko poiščemo v tem, da so rastline avtotrofi, živali pa heterotrofi. Rastline so pritrjene in se ne gibljejo, zaradi česar si hrano proizvedejo same. Same si proizvedejo boljše snovi in posledično proizvedejo tudi manj škodljivega vodikovega peroksida. Ker je manj škodljivih snovi kot je vodikov peroksid, rastline potrebujejo manj encimov, ki bi te snovi razgradili. V primeru vodikovega peroksida je ta encim katalaza. Na drugi strani pa so živali bolj aktivne, zato v njih potekajo bolj aktivni procesi presnove. Posledično proizvedejo več stranskega produkta vodikovega peroksida in zaradi tega vsebujejo več encima katalaze.



4. *Ponovna uporaba encima*

Pri tem poskusu smo ugotavljali ali se encim pri reakcijah porabi ali pa uniči. Tekočino in jetra iz prejšnjega poskusa smo razdelili v dve epruveti. V prvo smo dodali nov kos jeter v drugo pa svež vodikov peroksid. V prvi epruveti opazimo, da reakcija ne poteče, saj se je substrat (H₂O₂) že pri prejšnji reakciji razgradil. V drugi epruveti pa reakcija znova poteče, torej se encim pri prejšnji reakciji ni porabil ali spremenil. Encim se namreč le veže na substrat, zniža aktivacijsko energijo in s tem pospeši reakcijo. Po reakciji pa se encim od substrata nespremenjen loči. Torej se encimi pri reakcijah ne spremenijo in ne porabijo.

5. *Vpliv velikosti delcev na delovanje encima*

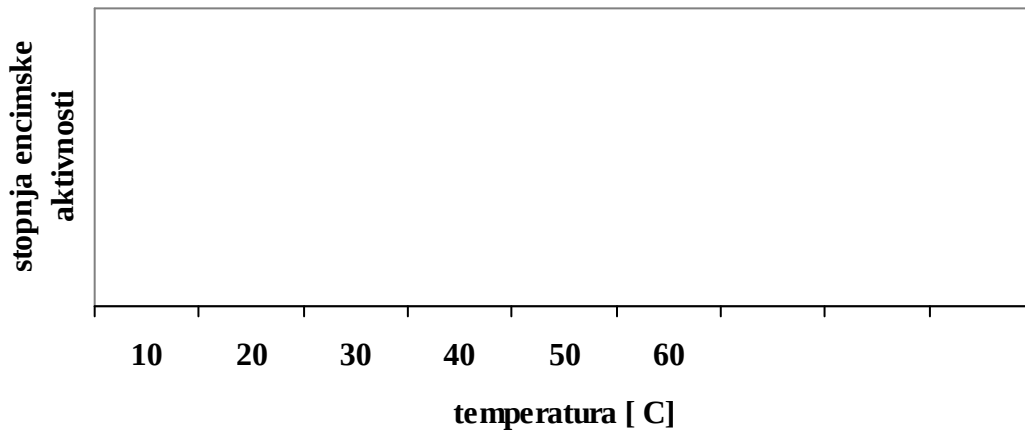
V prvo epruveto smo dali jetra in jih nato zmečkali, v drugo smo dali krompir in ga tudi zmečkali. Pri tem opazimo, da se živalske celice lažje mečkajo, saj nimajo celičnih sten, ki bi celico tako varovali. V obe epruveti smo nato dodali substrat H₂O₂. Hitrost reakcij smo primerjali s hitrosti reakcij iz poskusa 3. Reakcija je pri obeh zmečkanih virih encima katalaze potekala hitreje kot pri nezmečkanih. Ker smo tkivo zmečkali, je vodikov peroksid obdal tkivo po večji površini in tako reagiral z več encima. Prav tako smo poškodovali tudi celice, zato je več encimov prišlo iz tkiv na površino, kjer so lahko pospešili razgradnjo H₂O₂. V krajšem času je torej prišlo v stik s substratom več encimov in zato je bila reakcija hitrejša.

6. *Vpliv temperature na delovanje encima*

Iz poskusa opazimo, da se hitrost reakcije večja s temperaturo vendar le do optimalne temperature, kjer je stopnja encimske aktivnosti največja. Ta optimalna temperatura je pri večini encimov v vrednosti okrog 40°C. V našem primeru je bila reakcija najhitrejša pri 37°C, kar sovпада z optimalno temperaturo. Če encim preveč segrevamo pride do denaturacije in poruši se struktura encima. To se je zgodilo s prekuhanimi jetri.

V ozkem temperaturnem obsegu potekajo encimske reakcije hitreje pri višjih temperaturah, ker se z višanjem temperature poveča hitrost molekul in s tem tudi kinetična energija. Posledično se molekule med seboj močneje in hitreje trkajo in kemične reakcije potekajo hitreje. Ker je hitrejše gibanje molekul več encimov pride v stik s substratom v krajšem času.

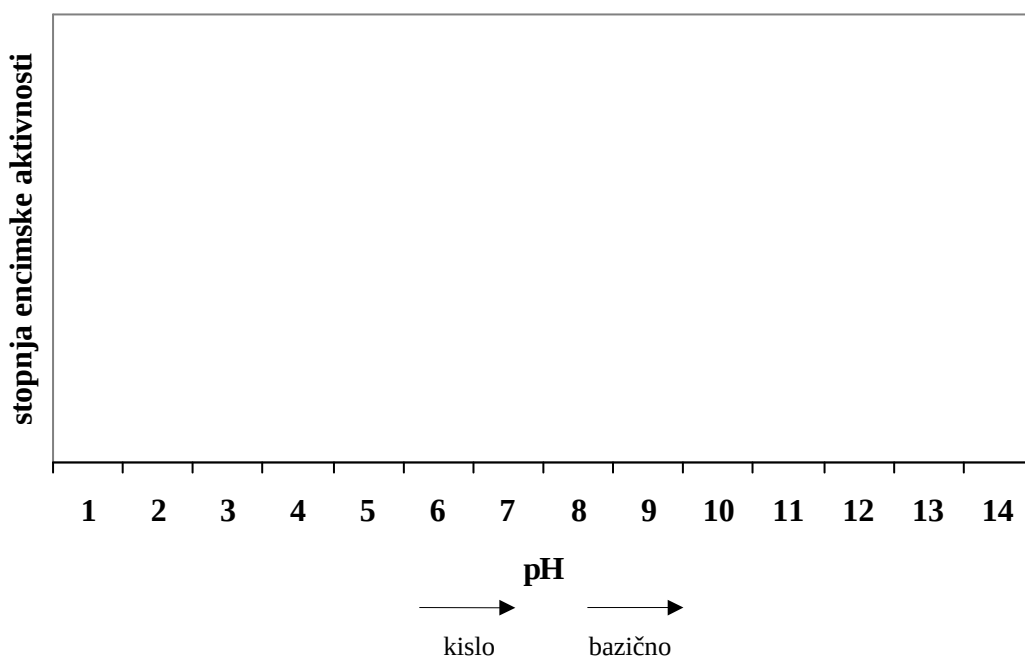
Graf 2: Vpliv temperature na delovanje encima



7. *Vpliv pH na delovanje encima*

Aktivnost encima in hitrost reakcije sta odvisni tudi od pH. Reakcija je bila najhitrejša pri destilirani vodi s pH-jem 6. Reakcija sploh ni potekla v epruveti s kislino HCl, ki je imela pH 1. Počasna pa je bila reakcija pri NaOH s pH 13. Iz tega lahko vidimo, da encimi delujejo le v nevtralnem okolju, največkrat je to voda. V primeru kislega ali bazičnega okolja reakcija ne poteče oziroma je upočasnjena, to je odvisno od moči kisline oz. baze. To je posledica tega, da močne kisline oz. baze prav tako povzročijo denaturacijo encima. Spremeni se struktura encima in posledično encim ne pride v stik s substratom, zato reakcija ne poteče.

Graf 3: Vpliv pH na delovanje encima



8. *Produkti reakcije*

Na koncu smo si ogledali še poskus, s katerim smo hoteli dokazati produkte reakcije razgradnje vodikovega peroksida. Epruvete prej napolnjene z vodo smo napolnili s plinom, ki je nastal pri reakciji. Ustje epruvete smo obrnili navzgor in v epruveto dali tlečo trsko. Pri prvi epruveti se ni nič zgodilo. Poskusili smo z drugo epruveto. Tleča trska je zagorela. S tem smo dokazali enega izmed produktov reakcije in sicer plin kisik. To da tleča trska ni zagorela pri prvi epruveti si lahko razlagamo s tem, da je bilo v erlenmajerici še nekaj zraka, ki je na začetku izhajal iz nje. Koncentracija kisika tako v prvi epruveti ni bila tako velika, da bi tleča trska zagorela. Naslednjo epruveto smo obrnili z ustjem navzdol in pod njo dali tlečo trsko, s katero se ni nič zgodilo. Če bi plamen rahlo počil, bi pomenilo, da je produkt reakcije tudi vodik.

Drugi produkt reakcije pa je voda – H_2O , ki bi ostala v erlenmajerici, če bi odstranili jetra in kremenčev pesek.

Slika 1: Aparatura za dokazovanje produktov reakcije

Pri tej vaji bi se prav tako lahko vprašali, kako količina encima vpliva na hitrost reakcije. To bi dokazali tako, da bi v različne epruvete dali različno količino vira encima katalaze, npr. jeter, in enako količino vodikovega peroksida. Hitrost reakcije bi bila največja v epruveti z največ encima, torej v epruveti z največ jeter.

Pri laboratorijskem delu pa smo se srečali tudi z nekaterimi napakami oz. stvarmi, ki bi jih lahko izboljšali. Neprimerna se mi zdi lestvica od 1 do 4, ki smo jo uporabili za določevanje hitrosti reakcije. Težje se je odločiti za vrednost pri majhni lestvici kot pa če bi lahko izbirali med vrednostmi od 1 do 10. Prav tu se lahko pokažejo tudi napake, saj je od vsakega posameznika odvisno kako oceni hitrost reakcije. Zanimiv je tudi izmerjeni pH destilirane vode, ki meri 6, točna vrednost destilirane pH pa je 7 – nevtralnno. Tudi tu je lahko prišlo do napak zaradi nenatančnosti primerjanja barvnih odtenkov na univerzalnem indikatorskem papirju. Pri poskusu 6 bi lahko prišlo do nenatančnosti, saj ni nujno, da smo obe tkivi, jetra in krompir, enako zmečkali, zato hitrost ni popolnoma primerljiva.

6. ZAKLJUČEK

Razgradnjo strupenega vodikovega peroksida v neškodljivo vodo in kisik pospešuje anorganski katalizator manganov dioksid (najdemo ga v naravi) ali pa encim katalaza (v tkivih živih organizmov). Rastline proizvedejo manj encima katalaze, saj ga ne potrebujejo, ker niso aktivne in so avtotrofi, torej si ne proizvedejo same toliko neškodljivih snovi. Ravno obratno je pri živalih. Moramo se zavedati pomembnosti delovanja encimov, saj so za nas življenjskega pomena. Brez encimov ne bi mogle potekati reakcije kot je npr. razpad vodikovega peroksida. Za razpad le-tega je namreč potrebna visoka temperatura, ki pa bi povzročila spremembo beljakovin, encimi pa to aktivacijsko energijo močno zmanjšajo. Katalizatorji (encimi in anorganski katalizatorji) se spajajo z molekulami, ki reagirajo, pospešijo reakcijo, nato pa se odcepijo in povežejo z naslednjimi reagirajočimi molekulami. Pri tem se ne spreminjajo in ne porabljajo. Na aktivnost reakcije vplivajo temperatura (optimalna pri okoli 40°C), pH (optimalen v nevtralnem okolju) in velikost delcev (manjši kot so, večja je hitrost). Reakcija poteka hitreje tudi če tkivo, v katerem se nahaja, zmečkamo (poškodujemo celice v katerih se encim nahaja), ker se tako sprosti več encima. Kremenčev pesek le pomaga pri razdrobitvi tkiva, v katerem je encim, in ni katalizator, zato ne sodeluje pri reakciji.

7. VIRI

- ⇒ Dr. Jože Stušek, prof.dr. Nada Gogala, mag. Meta Povž, prof. dr. Franc Sušnik, prof. dr. Tatjana Verčkovnik, dr. Branko Vesel, BIOLOGIJA NAVODILA ZA LABORATORIJSKO DELO, DZS, Ljubljana, 2001
- ⇒ Peter Stušek, Andrej Podobnik, Nada Gogala, BIOLOGIJA 1 CELICA, DZS, Ljubljana 1997