

POROČILO O LABORATORIJSKEM DELU

BIOLOGIJA

***DELOVANJE
ENOSTAVNIH
KATALIZATORJEV***

1. UVOD

Vodikov peroksid (H_2O_2) je kemična snov, ki nastaja kot stranski proizvod pri kemičnih reakcijah v živih celicah. Ker je strupen, ga mora celica takoj razgraditi. Pri razkroju sodeluje snov - katalizator - ki pospešuje kemične reakcije. Katalizatorje v živih celicah imenujemo encimi ali fermenti. Encimi so kemično beljakovine.

Pri tem laboratorijskem delu bomo opazovali delovanje encima katalaze, ki pospešuje razkroj vodikovega peroksida. Katalazo najdemo v tkivih. Primerjali bomo njeno delovanje z delovanjem nebeljakovinskih katalizatorjev in ugotovili v kakšnih razmerjih deluje.

Namen naše vaje je:

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

2. POSTOPEK

Material:

- manganov dioksid v prahu
- sveža 3 % raztopina vodikovega peroksida
- destilirana voda
- koščki svežih jeter in krompirja
- standardne epruvete
- menzura
- pinceta
- termometer
- kopel z vrelo vodo
- ledena kopel
- kopel sobne temperature
- steklena paličica
- droben pesek
- univerzalni indikatorski papir
- skalpel
- raztopina natrijevega hidroksida (0,1 M)
- raztopina klorovodikove kisline (0,1 M)
- 250 ml erlenmajerica
- kristalizirka
- terilnica in pestilo
- 2 veliki epruveti
- preluknjan zamašek

Metoda dela:

1. Učinek katalizatorja. Nalijemo raztopino vodikovega peroksida v dve epruveti približno do višine dveh centimetrov. V eno dodamo malo drobnega peska, v drugo pa približno

enako količino manganovega dioksida. Opazujemo reakcijo v obeh epruvetah in ocenimo hitrost reakcije!

- 2. Učinek encima.** V dve čisti epruveti nalijemo enaki količini (2 ml) vodikovega peroksida. V eno dodamo za riževno zrno velik košček jeter, v drugo pa enako velik košček krompirja. Košček jeter držimo s pomočjo paličice v epruveti, dokler reakcija ne poteče.
- 3. Ponovna uporaba encima.** Tekočino iz epruvete z jetri iz prejšnjega poskusa razdelimo v dve čisti epruveti. Tudi jetra razdelimo na dva dela in dodajmo v vsako epruveto košček. V prvo epruveto dodamo še svež košček jeter, v drugo pa dolijemo še 1 ml svežega vodikovega peroksida. Opazujemo in ocenimo hitrost reakcij.
- 4. Vpliv velikosti delčkov.** Damo nekaj koščkov jeter v velikosti riževih zrn v eno in nekaj enakih velikih koščkov krompirja v drugo epruveto! V epruveti vsujemo malo peska in ves material previdno zmečkamo s stekleno paličico. Nato dodamo v epruveti po 2 ml vodikovega peroksida. Določimo hitrost reakcije.
- 5. Vpliv temperature.** Damo nekaj zmečkanih jeter na dno epruvete in jo postavimo za 5 minut v vrelo vodo. Potem dodamo kuhanim jetrom približno 1 ml svežega vodikovega peroksida. Opazujemo in zapišemo hitrost reakcije. Vzamemo dve epruveti in damo v vsako 1 ml vodikovega peroksida. Postavimo za 5 minut eno epruveto v toplo vodno kopel (37°C), drugo pa v ledeno vodno kopel! Potem vzamemo obe epruveti iz njunih vodnih kopeli in v vsako dodamo košček jeter. Primerjamo hitrost reakcij.
- 6. Vpliv pH.** V vsako izmed treh čistih epruvet damo majhen košček jeter in malo peska ter zmečkamo s stekleno paličico. V prvo epruveto dodamo 2 ml destilirane vode, v drugo 2 ml natrijevega hidroksida in v tretjo 2 ml klorovodikove kisline. Zapišemo pH vsake epruvete! V vsako epruveto vlijemo še 2 ml vodikovega peroksida. Opazujemo in zapišemo hitrosti posameznih reakcij.
- 7. Proizvodi reakcije.** Pripravimo aparat za zbiranje plina. Plitvo posodo napolnimo z vodo do treh četrtin. Napolnimo z vodo še dve večji epruveti in ju obrnemo v plitvo posodo – ustje epruvet mora biti pod vodno gladino. Prosti konec cevi, ki je pritrjena na zamašek, vtaknemo pod vodo v ustje epruvete. V terilnici zmečkamo 1 cm³ jeter s približno enako količino drobnega peska. Mešanico damo v 250 ml erlenmajerico in dolijemo 100 ml vodikovega peroksida. Po petih sekundah zamašimo erlenmajerico z zamaškom, na katerega je pritrjena cevka. Zberemo dve epruveti plina! Ko je prva epruveta polna, prestavimo cevko v ustje druge.

3. REZULTATI

Vaja	Številka epruvete	Vsebina epruvete	Hitrost reakcije
-------------	------------------------------	-------------------------	-------------------------

Učinek katalizatorja	1	H ₂ O ₂ + pesek	0
	2	H ₂ O ₂ + MnO ₂	4
Učinek encima	1	H ₂ O ₂ + jetra	3
	2	H ₂ O ₂ + krompir	2
Ponovna uporaba encima	1	H ₂ O ₂ + uporabljena jetra + sveža jetra	0
	2	H ₂ O ₂ + uporabljena jetra + 1 ml svežega H ₂ O ₂	4
Vpliv velikosti delčkov	1	zmečkana jetra + pesek + 2 ml H ₂ O ₂	4
	2	zmečkan krompir + pesek + 2 ml H ₂ O ₂	3
Vpliv temperature	1	H ₂ O ₂ (ledena kopel) + jetra	0
	2	H ₂ O ₂ (pri 37°C) + jetra	4
	3	H ₂ O ₂ (vrela kopel) + jetra	3
Vpliv pH	1	jetra + pesek + H ₂ O ₂ + dest. voda (pH=7)	4
	2	jetra + pesek + H ₂ O ₂ + NaOH (pH=13)	0
	3	jetra + pesek + H ₂ O ₂ + HCl (pH=1)	0/1

Legenda:

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

GRAFIKON HITROSTI REAKCIJ

4. RAZLAGA, DISKUSIJA

1. Učinek katalizatorja

Prva epruveta: reakcija ni potekla, torej pesek ni katalizator za razgradnjo H_2O_2 .

Druga epruveta: reakcija je bila hitra, pod vplivom manganovega dioksida (MnO_2), ki je anorganski katalizator in ga najdemo v naravi.

2. Učinek encima

Ugotavljali smo delovanje biokatalizatorja, encima katalaze, ki je beljakovina in jo najdemo v tkivih. Reakcija je bila hitrejša ob prisotnosti jeter, kot pa pri prisotnosti krompirja, torej je encima več v jetrih.

3. Ponovna uporaba encima

Ugotavljali smo, če se encim uniči ali porabi pri reakcijah. V prvo epruveto smo dali H_2O_2 , jetra iz prejšnje epruvete in še sveža jetra. Do reakcije ni prišlo, ker ni bilo več substrata (H_2O_2). V drugo epruveto smo dali reagiran H_2O_2 , jetra iz prejšnje epruvete in nekaj novega substrata. Reakcija je potekla, torej se v prejšnji reakciji encim ni porabil. Encimi reakcije le pospešijo, ni jih v produktih, ne uničijo se in se ne porabijo.

4. Vpliv velikosti delčkov

Ugotavljali smo, če velikost delcev krompirja in jeter vpliva na hitrost reakcije. S peskom smo ju zdrobili na manjše koščke, tako se je iz tkiv sprostilo več katalaze in reakcija je potekla hitreje kot v drugem poskusu, kjer smo uporabili večje kose jeter in krompirja.

5. Vpliv temperature

Ugotavljali smo vpliv temperature na delovanje katalaze. Najhitreje je reakcija potekla pri $37^\circ C$ (optimalno območje). V epruveti, ki je bila v ledeni vodi, je reakcija potekla počasneje, v tisti, ki je bila v vreli vodi pa reakcija sploh ni potekla. Torej je bila temperatura previsoka in beljakovine so spremenile svojo obliko (so koagulirale).

6. Vpliv pH

Ugotavljali smo, v kakšnem pH okolju encim deluje najbolje. Nekateri encimi delujejo najbolje v kislem okolju, drugi v bazičnem in nekateri v nevtralnem.

Katalaza najbolje deluje v nevtralnem okolju (destilirana voda), znaki reakcije so se kazali v kislem (dodana klorovodikova kislina) v bazičnem okolju (dodan natrijev hidroksid) pa reakcija ni potekla, ker je encim koaguliral.

7. Proizvodi reakcije

Ugotavljali smo, kaj pospešuje razgradnjo strupenega vodikovega peroksida (H_2O_2), ki je stranski produkt živih celic in obenem strupen, tako da ga morajo celice dovolj hitro razgraditi. Taka reakcija je uspešna s katalizatorjem.

Ko segrevamo vodikov peroksid, razpade na kisik in vodo.

Enačba reakcije:



Plin, ki je nastajal ob segrevanju, smo zbirali v okrog obrnjeni epruveti z vodo, da nam ni uhajal. Dokazali smo ga tako, da smo dali v epruveto tlečo trsko, ki je zagorela, torej je bil nastali plin O₂.

Razpad vodikovega peroksida torej povzroči visoka temperatura. V živih celicah pa to ni mogoče, saj pri taki temperaturi beljakovine spremenijo svojo obliko. Tako za razpad celice uporabijo encim katalazo.

5. ZAKLJUČKI

Ugotovili smo, da se encim pri reakciji ne spremeni, porabi ali uniči, reakcijo le pospešuje. Na hitrost delovanja encima vplivajo temperatura, pH in velikost delcev.

Dokazali smo tudi naslednje:

- da so beljakovinski katalizatorji učinkovitejši od nebeljakovinskih,
- da večja površina delcev pospeši reakcijo,
- da je učinkovitost katalaze največja v nevtralnem, najmanjša pa v kislem okolju
- da pri razgradnji vodikovega peroksida nastaja kisik

Opomba:

Rezultati niso najbolj natančni, saj smo hitrost reakcije ocenili na prosto oko in ker delci niso bili vedno enako veliki.

6. VIRI in LITERATURA

- Peter Stušek, Andrej Podobnik, Nada Gogala: BIOLOGIJA 1, Celica, DZS, Ljubljana 2003.
- Biologija – Navodila za laboratorijsko delo
- List z navodili za vajo
- INTERNET:
 - <http://ro.zrsss.si/projekti/kmetijstvo/mlekoinm/encim.htm>

Priloga:

Odgovori na vprašanja iz delovnega zvezka.