

# Poročilo za Biologijo

## Delovanje enostavnih katalizatorjev



Gimnazija Poljane

### 1. Teoretična osnova

**Vodikov peroksid** ( $H_2O_2$ ) je kemična snov, ki nastaja kot stranski proizvod pri kemičnih reakcijah v živih celicah. Je strupen, zato ga mora celica takoj razgraditi, pri tem pa sodeluje katalizator – to je v živih celicah encim katalaza.

**Encimi** so beljakovinski katalizatorji, ki jih proizvajajo vsi živi organizmi. Funkcija katalizatorjev je pospeševanje kemičnih reakcij, to pa počnejo tako, da nase (v svoj aktivni center), vežejo substrat – to je ena ali več snovi, med katerima bi reakcija naravno potekla veliko bolj počasi. Večina encimov sodeluje v katabolnih reakcijah, vendar jih kar nekaj sodeluje tudi pri anabolnih reakcijah. Encim **katalaza** je encim, ki pospešuje razkroj vodikovega peroksida, največ pa je najdemo v tkivih.

Anorganski **katalizatorji** imajo enako funkcijo kakor beljakovinski katalizatorji (encimi), vendar jih živi organizmi ne proizvajajo.

## 2. Nameni in cilji

Cilj vaje je bilo:

- spoznati razlike in podobnosti v delovanju anorganskega katalizatorja in encima
- spoznati dejavnike, ki vplivajo na delovanje encimov
- razumeti pomen encimov v živih celicah
- spoznati encim katalazo in njeno vlogo v celici
- spoznati ponovno delovanje encima
- razumeti denaturacijo encimov (beljakovin)
- razumeti vpliv različne koncentracije encima na razgradnjo substrata
- razumeti kako uloviti in dokazati kisik ( $O_2$ )
- ugotoviti, katera živalska in rastlinska tkiva imajo več encimov
- spoznati, da se lahko vodikov peroksid razgrajuje tudi brez encimov

## 3. Material

- |   |   |
|---|---|
| - erlenmajerica                           | -univerzalni indikatorski papir           |
| -manganov dioksid v prahu                 | -skalpel                                  |
| -sveža 3% raztopina vodikovega peroksida  | -raztopina natrijevega hidroksida (0,1 M) |
| -destilirana voda                         | -raztopina klorovodikove kisline (0,1 M)  |
| -koščki svežih govejih jeter in krompirja | -lesene trske                             |
| -standardne epruvete                      | -vžigalice                                |
| -pinceta                                  | -dve veliki epruveti                      |
| -steklena paličica                        | -gumijaste cevke                          |
| -termometer                               | -steklene cevke                           |
| -kopel z vrelo vodo                       | -preluknjani zamaški                      |
| -zmrznjena jetra                          | -gorilnik                                 |
| -kopel sobne temperature                  | -stativ s tremi mufami in prižemami       |
| -kremenčev pesek ( $SiO_2$ )              |   |

## 4. Metoda

### **1a. Razkroj vodikovega peroksida s segrevanjem**

Pripravite aparaturo za zbiranje plina, ki nastaja pri razgradnji vodikovega peroksida. Nato nalijte v epruveto 5 ml 3% raztopine vodikovega peroksida in jo previdno segrevajte tako, da se bo vodikov peroksid začel razkrajati v produkte razgradnje, od katerih je eden plin. Plin zbirajte v aparaturi. S tlečo trsko ugotovite, kateri plin je nastal.

### **2a. Učinek anorganskega katalizatorja**

Nalijte raztopino vodikovega peroksida v dve epruveti približno do višine 2 cm. V eno dodajte malo drobnega peska, v drugo pa približno enako količino manganovega dioksida. Pazite, da ne boste prenašali manganovega dioksida in kremenčevega peska z isto žličko.

### **3a. Učinek encima**

V dve čisti epruveti nalijte enaki količini vodikovega peroksida. V eno dodajte majhen košček jeter, v drugo pa enako velik košček krompirja. Košček jeter držite v epruveti s paličico, dokler reakcija ne poteče.

### **4a. Ponovna uporaba encima**

Tekočino iz epruvete z jetri iz prejšnjega poskusa razdelite v dve čisti epruveti. Tudi jetra razdelite na dva dela in dajte v vsako epruveto en košček. V prvo epruveto dodajte še svež košček jeter, v drugo pa dolijte še 1 ml svežega vodikovega peroksida.

### **5a. Vpliv velikosti delcev**

Dajte nekaj majhnih koščkov jeter v eno in nekaj enako velikih koščkov krompirja v drugo epruveto. V obe epruveti vsujete malo peska in ves material previdno zmečkajte s stekleno paličico. Nato dodajte še po 2 ml vodikovega peroksida.

### **6a. Vpliv temperature**

Kuhanim jetrom v epruveti dodajte približno 1 ml svežega vodikovega peroksida. Vzemite še dve epruveti in dajte v vsako 1 ml vodikovega peroksida. Eno epruveto postavite za pet minut v toplo vodno kopel (37°C), nato pa vanjo dodajte košček jeter. V drugo epruveto dodajte košček prej zmrznjenih jeter.

### **7a. Vpliv pH**

V vsako izmed treh čistih epruvet dajte majhen košček jeter in malo peska ter vse skupaj zmečkajte s stekleno paličico. V prvo epruveto dodajte 2 ml destilirane vode, v drugo pa 2 ml natrijevega hidroksida in v tretjo 2 ml klorovodikove kisline. Zapišite si pH vsake epruvete. V vsako epruveto vlijte še 2 ml vodikovega peroksida.

### **8a. Produkti razkroja vodikovega peroksida**

Plitvo posodo napolnite z vodo do treh četrtin. Napolnite z vodo še štiri epruvete in jih obrnite v plitvo posodo – ustje epruvet mora biti pod vodno gladino. Prosti konec cevi, ki je pritrjena na zamašek, vtaknite pod vodo v ustje epruvete. V terilnici zmečkajte približno 1 cm<sup>3</sup> jeter s približno enako količino drobnega peska. Mešanico dajte v 250 ml erlenmajerico in dolijte 100 ml vodikovega peroksida. Po petih sekundah zamažite erlenmajerico z zamaškom, na katerega je pritrjena cevka. Zberite štiri epruvete plina! Ko je prva polna, prestavite cevko v ustje druge, in tako naprej.

### **9a. Dokazovanje kisika**

Pod vsako epruveto dajte tlečo trsko, da preizkusite prisotnost dušika, obrnite pa jo z ustjem navzdol. Da preizkusite prisotnost kisika, epruveto obrnite z ustjem navzgor in vanjo vtaknite tlečo trsko.

## **5. Rezultati**

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

### **1a. Razkroj vodikovega peroksida s segrevanjem**

Po segrevanju je v epruveti ostala le še voda. Reakcija je potekala zelo počasi (v primerjavi s kasnejšimi reakcijami), in bi jo označila z 1.

### **2a. Učinek anorganskega katalizatorja**

<b>Epruvet a</b>	<b>Dodane snovi</b>	<b>Hitrost reakcije</b>
1	kremenčev pesek vodikov peroksid	0
2	manganov dioksid vodikov peroksid	2

### **3a. Učinek encima**

<b>Epruvet a</b>	<b>Dodane snovi</b>	<b>Hitrost reakcije</b>
1	košček krompirja vodikov peroksid	2
2	košček jeter vodikov peroksid	3

### **4a. Ponovna uporaba encima**

<b>Epruvet a</b>	<b>Dodane snovi</b>	<b>Hitrost reakcije</b>
------------------	---------------------	-------------------------

1	že uporabljen krompir vodikov peroksid	2
2	nov krompir vodikov peroksid	2

### 5a. Vpliv velikosti delčkov

Epruvet a	Dodane snovi	Hitrost reakcije
1	zdrobljen krompir vodikov peroksid kremenčev pesek	3
2	zdrobljena jetra vodikov peroksid kremenčev pesek	4

### 6a. Vpliv temperature

Epruvet a	Dodane snovi	Temperatur a	Hitrost reakcije
1	zmrznjena jetra vodikov peroksid	0°C	0
2	prekuhana jetra vodikov peroksid	90°C	0
3	košček jeter vodikov peroksid	37°C	4

### 7a. Vpliv pH

Epruvet	Dodane snovi	p	Hitrost
---------	--------------	---	---------

a		H	reakcije
1	destilirana voda košček jeter vodikov peroksid	7	3
2	košček jeter vodikov peroksid Na(OH)	10	1
3	košček jeter vodikov peroksid HCl	1	0

**8a in 9a.** Potem ko smo z izhajajočim plinom napolnili vse štiri epruvete, smo s tlečo trsko preverili vsako izmed njih, da smo preizkusili prisotnost kisika oziroma dušika. Kisik smo dokazali šele v zadnji epruveti, dušika pa nismo.

## **6. Diskusija**

**1a.** Potem, ko smo bili priča temu, da je po segrevanju vodikovega peroksida v epruveti ostala le še voda, lahko sklepamo, da tudi s segrevanjem lahko povzročimo razkroj vodikovega peroksida. A temperatura, na katero smo segreli vodikov peroksid, je previsoka, da bi jo lahko žive celice prenesle, prav tako pa bi povzročila denaturacijo večine telesnih beljakovin, zato lahko dokaj verjetno predvidevamo, da žive celice snovi ne razkrajajo s segrevanjem, temveč si pri tem pomagajo na drugačen način.

**2a.** Prva epruveta je služila le kontrolnemu poskusu, saj smo kremenčev pesek uporabljali kasneje pri vaji, morali pa smo dokazati, da kremenčev pesek ne reagira z vodikovim peroksidom. V drugo epruveto smo dodali manganov dioksid, ki je kataliziral katabolizem vodikovega peroksida. Reakcija je sicer potekla hitreje kakor pri segrevanju vodikovega peroksida, a v primerjavi z ostalimi je še vedno potekala precej počasi. Torej, če povzamemo, lahko predvidevamo, da se živi organizmi ne poslužujejo niti anorganskih katalizatorjev, saj reakcija še vedno poteka prepočasi, prav tako pa jih organizem ne bi mogel proizvajati sam, kar bi zelo otežilo dejansko razgrajevanje, saj je zelo dvomljivo, da bi si lahko organizem s hrano ali na kakšen drug način lahko priskrbel zadostno količino anorganskih katalizatorjev.

Vsaka kemijska reakcija ima določeno mejo, pod katero so molekule, ki naj bi v njej sodelovale, preveč neaktivne, t.i., imajo premalo energije, da bi lahko reagirale. Energiji, ki je potrebna, da se reakcija sploh zgodi, pravimo aktivacijska energija. Ena možnost, da dosežemo zadostno količino energije je segrevanje, a kot smo dognali na podlagi poskusa 1a, je to proces, ki bi organizmu

izredno škodoval. Iz tega sledi, da morajo živi organizmi uporabljati neke snovi, ki količino aktivacijske energije zadostno zmanjšujejo, te snovi pa imenujemo katalizatorji. Ker so celice živi organizem, je dejstvo, da kot katalizatorje uporabljajo encime, beljakovinske katalizatorje, ki jih organizem proizvaja sam.

**3a.** Pri tretjem poskusu smo v epruveti, v katerih je bilo nekaj vodikovega peroksida, dodali košček krompirja in košček jeter. Oboje je zgrajeno iz celic živega organizma in oboje je tkivo, in kakor vemo, se katalaza - encim, ki razgrajuje vodikov peroksid - nahaja v tkivih živih organizmov. Potem ko smo dodali obe tkivi, sta reakciji potekli bistveno hitreje kakor pri segrevanju ali dodajanju manganovega dioksida, a med njima je bila še vedno opazna razlika. Vodikov peroksid, v katerega smo dodali košček jeter, je razpadal bistveno hitreje kakor tisti, kateremu smo dodali košček krompirja. Iz tega lahko povzamemo, da je v jetrih, več encima katalaze, oziroma, da hitreje pride do izraza. To, da je v jetrih več katalaze, je zelo logično, saj so jetra organ, v katerih poteka največ katabolnih reakcij v živalih in ljudeh, kar pomeni, da mora biti koncentracija katalaze v jetrih bistveno večja kakor, npr., v maščobnem tkivu.

**4a.** S tem poskusom smo dokazovali, da so katalizatorji - v tem primeru encim katalaza - le sodelujoč element pri reakciji in se pri poteku le-te ne porablja. To smo storili tako, da smo že uporabljen košček jeter dali v drugo epruveto, v katero smo dodali vodikov peroksid, saj se je prejšnji substrat razgradil. Reakcija je ponovno potekla, prav tako kakor smo predvidevali, in potrdila našo hipotezo o tem, da se katalizatorji pri reakciji ne porablja, temveč samo sodelujejo pri razgradnji, ali, redkeje, izgradnji snovi, potem ko je reakcija končana, pa se katalizator zopet loči od snovi.

**5a.** Pri tem poskusu smo dokazovali, da ima velikost delcev dodanega tkiva vpliv na hitrost reakcije. Predvidevali smo, da bomo z drobljenjem dodanega koščka dosegli, da se bo koncentracija encima katalaze razporedila na večjo površino, prav tako pa se je bo z drobljenjem celic v tkivu več sprostito. Potem, ko smo zmečkanemu(zdrobljenemu) tkivu dodali vodikov peroksid, je reakcija potekla še hitreje kakor prej, kar je potrdilo našo predpostavko. S tem, ko smo katalazo razporedili po večji površini, smo dosegli, da se je lahko več encimov hkrati vezalo na substrat, kar je pomenilo, da se je substrat hitreje razgrajeval. Pri procesu drobljenja tkiva smo prav tako ugotovili, da je krompir težje zdrobiti, logični vzrok tega pa je dejstvo, da imajo rastlinske celice tudi celično steno, ki jim daje večjo trdnost, zato je bilo krompir tudi težje zdrobiti kakor jetrca, saj so ta iz živalskih celic, ki pa nimajo celične stene, temveč le s holesterolom okrepljeno celično membrano.

**6a.** Pri tem poskusu smo se lotili vprašanja vpliva temperature na delovanje encimov. Na podlagi predhodnega znanja smo postavili hipotezo, da bodo previsoke ali prenizke temperature upočasnile in v končni fazi celo povsem onespobile delovanje encimov, saj so tej kemično beljakovine, to pa pomeni, da se v zanje neprimernih razmerah denaturirajo, previsoke oziroma prenizke temperature pa so za veliko beljakovin vzrok denaturacije. Tako smo v eno izmed epruvet dodali prekuhana jetra, v drugo zmrznjena, tretjo pa smo za kakih pet minut postavili v vodo sobne temperature in nato dodali košček jeter. V vse tri epruvete smo dodali tudi vodikov peroksid ter nato opazovali reakcije, iz katerih je bilo kmalu razvidno, da je bila naša hipoteza o

denaturaciji encimov pravilna. V epruveti s koščkom zmrznjenih jeter reakcija sploh ni potekla, kar dokazuje, da je prenizka temperatura denaturirala encim katalazo. V epruveti s prekuhanimi jetri prav tako ni bilo nobene reakcije, kar dokazuje, da previsoka temperatura prav tako denaturira katalazo. V tretji epruveti, ki smo jo prej segreti z vodo sobne temperature, je reakcija potekla najhitreje v primerjavi z vsemi prejšnjimi (kar vključuje tudi vse ostale poskuse), kar pomeni, da katalaza najbolje deluje pri sobni temperaturi.

**7a.** Pri tem poskusu smo ugotavljali, kakšen vpliv ima pH na delovanje encimov in na hitrost poteka reakcij. Zopet smo vzeli tri čiste epruvete, vanje pa smo dodali koščke jeter, ki smo jih nato zmečkali s paličico. V prvo epruveto smo nato dodali destilirano vodo, v drugo natrijev hidroksid, v tretjo pa klorovodikovo kislino. Vsaki epruveti smo nato izmerili pH vrednost in si jo zapisali, nato pa smo v vse tri epruvete dodali še vodikov peroksid in opazovali reakcije. Pri tisti, kjer smo dodali destilirano vodo, je reakcija potekla z že prej videno hitrostjo, torej, kakor da vode ne bi bili dodali, medtem ko je bilo pri preostali dveh epruvetah očitno, da so encimi vsaj delno denaturirali. Pri tisti, kjer smo dodali natrijev hidroksid, je reakcija potekla zelo počasi, s podobno hitrostjo kakor pri segrevanju, pri tisti, kjer smo dodali klorovodikovo kislino, pa reakcije sploh ni bilo. S tem lahko pridemo do sklepa, da odmik od nevtralnega pH v eno ali drugo smer povzroči denaturacijo encimov.

**8a in 9a.** Pri teh dveh zelo tesno povezanih poskusih smo najprej lovili izhajajoči plin, ki nastaja pri razpadanju vodikovega peroksida, nato pa smo še dokazovali, kaj ta plin je, ki naj bi bil na podlagi naših hipotez kisik. V štiri epruvete smo ujeli ves izhajajoči plin - ujeli smo ga tako, da smo cevke napeljali pod vodo v z vodo napolnjene epruvete, ki so bile z ustjem obrnjene navzdol. To smo storili zato, da v njih ni bilo zraka, zaradi katerega bi bili pogoji preizkusa prisotnosti kisika in dušika okrnjeni. Potem ko smo to storili, smo v vse epruvete vtaknili tlečo trsko, s katero smo preizkusili prisotnost kisika, ki pa smo jo dokazali le v zadnji epruveti. Predvidevam, da je temu tako zato, ker je pri reakciji iz erlenmajerice - tam je reakcija potekala - izhajal zrak, ki je bil še v njej, v tem zraku pa kisika ni dovolj, da bi trska zagorela. Prisotnosti dušika nismo dokazali, ker pri tej reakciji ne more nastajati, saj ga v spojini vodikovega peroksida sploh ni.

## **7. Zaključek**

Če povzamemo celotno razpravo in rezultate poizkusov, lahko z gotovostjo trdimo naslednje:

- Encim katalaza najbolje delujejo v okolju, kjer se temperatura giblje okoli 35°C
- Delovanje anorganskega katalizatorja je počasnejše od organskega
- V živalskih tkivih je več encima katalaze
- Rastlinska tkiva je težje zdrobiti
- Pri razkrajanju vodikovega peroksida nastaja voda in kisik
- pH, ki je višji ali nižji od nevtralnega, denaturira encim katalazo
- Velikost delcev tkiva, ki vsebuje encim, opazno vpliva na hitrost reakcije, ki poteče bistveno hitreje
- Encimi se pri reakciji ne porablajo, temveč le sodelujejo
- Živi organizmi za razkrajanje vodikovega peroksida uporabljajo encim katalazo

Če sklepe in zaključke primerjam s cilji, ki smo si jih zastavili na začetku vaje, ugotovim, da smo pri vaji dosegli vse cilje, jih razložili, dokazali in razumeli.



## **8. Literatura**

-Drašler J, Gogala N., Povž M., Sušnik F., Verčkovnik T., Vesel B., *Biologija: Navodila za laboratorijsko delo*, DZS, Ljubljana 2010

-Stušek P., Podobnik A., Gogala N., Celica, DZS, Ljubljana 1997