

GIMNAZIJA NOVO MESTO



4. LABORATORIJSKA VAJA (IMP BIOLOGIJA)

DELOVANJE ENOSTAVNIH KATALIZATORJEV

1 UVOD

Pri tem laboratorijskem delu bom opazovala delovanje encima katalaze, ki pospešuje razkroj vodikovega peroksida. Katalazo najdemo v tkivih. Primerjala bom njeno delovanje z delovanjem nebeljakovinskih katalizatorjev in ugotovila v kakšnih razmerjih deluje.

1.1 CILJI VAJE

Cilji vaje:

- 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 in
- spozntli encim katalazo in njeno vlogo v celicah.

1.2 TEORETIČNI DEL

Encimi so večinoma beljakovine, ki v bioloških sistemih pospešujejo kemijske reakcije in tako zmanjšajo aktivacijsko energijo. Delujejo kot katalizatorji v živih bitjih (biokatalizatorji). Pri tem se ne spreminjajo in ne porabljajo. Vežejo se na reagirajočo molekulo in znižajo njeno aktivacijsko energijo, da se reakcija lahko začne. Nato se sprostijo in vežejo na naslednjo molekulo. Encimi ne vplivajo na smer reakcije, ampak samo na njeno hitrost. Lahko so izredno specifični za substrate, ki jih pretvarjajo, vendar to ni nujno. Delujejo v vodnih raztopinah, pod milimi pogoji, pri sobni temperaturi in v okolici nevtralnega pH. Višje temperature encimsko delovanje pospešijo, a le do neke mere, saj pri previsoki temperaturi encimi propadejo(koagulirajo).Večina encimov deluje v notranjosti celic, nekateri pa zunaj njih. Na primer v prebavnem traktu. Ker encimi povečajo hitrost reakcij, se hitreje sprošča energija za delo, nekoliko pa se poviša temperatura organizma.

Snov s katero reagira encim, se imenuje podlaga(substrat). Encimska molekula se združi z molekulo substrata in nastane kompleks encim-substrat. Dela encimske in substratne molekule se prostorsko skladata. Pri taki vezavi se medatomske sile tako preuredijo, da se aktivacijska energija zmanjša in reakcija zlahka steče. Tisti del encimske molekule, ki se prostorsko prilega substratni molekuli, imenujemo aktivno mesto oz. aktivni center.

Nekateri encimi uporabljajo za svoje delovanje stranske verige aminokislin, drugi potrebujejo še dodatne kemijske komponente, ki jim pravimo kofaktorji. Ti so lahko eden ali več anorganskih ionov

(Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ali Zn^{2+}), lahko pa so to tudi razmeroma kompleksne organske molekule, ki jim pravimo koencimi. To so nebeljakovinski deli molekule. Vlogo koencima imajo mnogi vitamini in nekateri mikroelementi (železo, baker). Encime razvrščamo po reakcijah, ki jih katalizirajo. Poimenujejo se tako, da se imenu substrata, ki ga pretvarjajo, doda pripona »-aza«. Encimi so biološko posebno važna skupina proteinov, saj je vsa presnova v organizmu, ki jo imenujemo metabolizem, možna samo s posredovanjem (delovanjem) teh katalizatorjev. Snovi, ki jih encimi presnavljajo so substrati. Kemijsko, so vsi do sedaj znani encimi, proteini.

Na encimsko aktivnost delujejo poleg temperature še mnogi drugi dejavniki. Tako nekateri antibiotiki zavirajo delovanje specifičnih bakterijskih encimov, na vretenčarske oz. človeške encime pa ne delujejo. Na delovanje encimov vplivata tudi pH ter koncentracija substrata in encima. Tudi v različnih delih prebavne cevi, kjer pH ni enak, se delovanje encimov razlikuje. Tako lahko v enem predelu bolje delujejo tisti encimi, ki so aktivnejši v kislem okolju, in obratno.

V jetrih imamo poseben encim, ki ga imenujemo katalaza. Prisoten je pri živalih in rastlinah. Njegov namen je, da razgrajuje strupen vodikov peroksid. Ta nastaja kot stranski produkt v metabolizmu. Če bi ostal v celici, bi lahko poškodoval nukleinske kisline in druge biomolekule. Reakcija njegove razgradnje je termodinamično ugodna, vendar brez pomoči katalizatorja poteka le počasi. Pri razgradnji se sproščajo mehurčki plinastega O_2 .

2 MATERIAL IN METODE

Uporabila sem naslednje materiale in pripomočke:

- erlenmajerica,
- manganov dioksid v prahu,
- sveža 3% raztopina vodikovega peroksida,
- destilirana voda,
- koščki svežih govejih jeter in krompirja,
- epruvete,
- pinceta,
- termometer,
- držalo za epruveto,
- kopel z vrelo vodo,
- ledena kopel,
- kopel sobne temperature,
- steklena paličica,
- kremenčev pesek,
- univerzalni indikatorske papir,
- skalpel,
- raztopina natrijevega hidroksida,
- raztopina klorovodikove kisline,
- kristalizirka,
- terilnica in pestilo,
- lesene trske in
- vžigalice.

Hitrost reakcij smo označevali po tabeli iz navodil:

0 = ni reakcije

1 = počasna reakcija

2 = zmerna reakcija

3 = hitra reakcija

4 = zelo hitra reakcija

Prvi poskus je bila demonstracija razkroja vodikovega peroksida s segrevanjem brez katalizatorjev. Demonstrirala nam je profesorica mentorica, obenem pa smo dijaki aktivno sodelovali. V stekleno epruveto smo kanili nekaj kapljic H_2O_2 in epruveto počasi segrevali nad špiritnem gorilniku, tako dolgo, da H_2O_2 izgine. Bili smo pozorni na stene epruвет in kot rezultat poskusa smo zapisali snov, ki se je nabrala na stene epruвет.

Pri drugem poskusu sem preučevala delovanje katalizatorja. Nalila sem raztopino H_2O_2 v dve epruveti približno do višine 1 cm. V eno sem dodala malo drobnega peska, v drugo pa približno enako količino manganovega dioksida (MnO_2). Za vsako snov sem zamenjala žlički, da ne bi prišlo do mešanja med snovmi.

Pri tretjem poskusu sem preverjala učinek encima. V tri čiste epruvete sem nalila enaki količini H_2O_2 (do 1 cm). V eno sem dodala riževo zrno velik košček jeter, v drugo enako velik košček krompirja in v tretjo epruveto eno žličko kvasa. Opazovala sem tako dolgo, dokler se ni reakcija v epruveti ustavila.

Dokazovanje produktov reakcije in ponovno uporabo encima sem raziskovala kot 4. in 5. točko poskusov. Pri četrtem poskusu sem dokazovala plin, ki je nastal po poteku reakcije. Vzela sem epruveto, v kateri je bilo največ mehurčkov plina. S tlečo trsko sem ta plin dokazala. Pri petem pa sem epruveto iz prejšnjega poskusa izpraznila in nato jetra prelila s svežim H_2O_2 .

S šestim poskusom sem raziskovala vpliv velikosti delcev na delovanje encima. Imela sem dva enaka koščka krompirja. Pri prvem delu poskusa sem za grah velik kos krompirja na deski sesekljala in z žličko stresla v epruveto. Prelila sem z H_2O_2 . Pri drugem delu poskusa sem cel košček krompirja vstavila v drugo epruveto in jo prelila z H_2O_2 . Primerjala sem hitrost reakcije v obeh epruветah.

Vpliv temperature na delovanje encima sem raziskovala pod zaporedno številko 7. H_2O_2 sem za ta poskus pripravila že na začetku ure, krompir pa sem dodala, ko sem prišla do poskusa 6. Tu sem raziskovala delovanje encima, ki je bil izpostavljen temperaturi $100^{\circ}C$, $37^{\circ}C$ in $0^{\circ}C$. V tri epruvete sem nalila 1 cm H_2O_2 . Prvo sem vstavila v ledeno kopel, drugo v kopel ogreto na približno $37^{\circ}C$, tretjo pa sem pustila na stojalu. V prvi dve sem vstavila svež košček krompirja, v tretjo pa prekuhan košček. Primerjala sem hitrost kemijske reakcije v vseh epruветah.

8. poskus je bil v znamenju vpliva pH na delovanje encima. V tri čiste epruvete sem vstavila košček krompirja. V prvo sem nalila navadno vodo do višine 1 cm, v drugo pa sem vstavila enako količino

NaOH in v tretjo prav toliko HCl. V vsaki epruveti sem izmerila pH vrednost. Na koncu sem še dodala H₂O₂ in sem primerjala hitrost kemijskih reakcij.

Pri zadnji, 9. nalogi sem zapisala enačbo za kemijsko reakcijo, ko zaradi delovanja temperature, katalizatorja ali encima vodikov peroksid razpade na dva produkta.

3 REZULTATI

Pri poskusih sem označevala hitrost reakcije:

0 = ni reakcije

1 = počasna reakcija

2 = zmerna reakcija

3 = hitra reakcija

4 = zelo hitra reakcija

Poskus 1: Razkroj vodikovega peroksida s segrevanjem brez katalizatorjev

Ob segrevanju vodikovega peroksida se je na stenah epruvet nabrala voda.

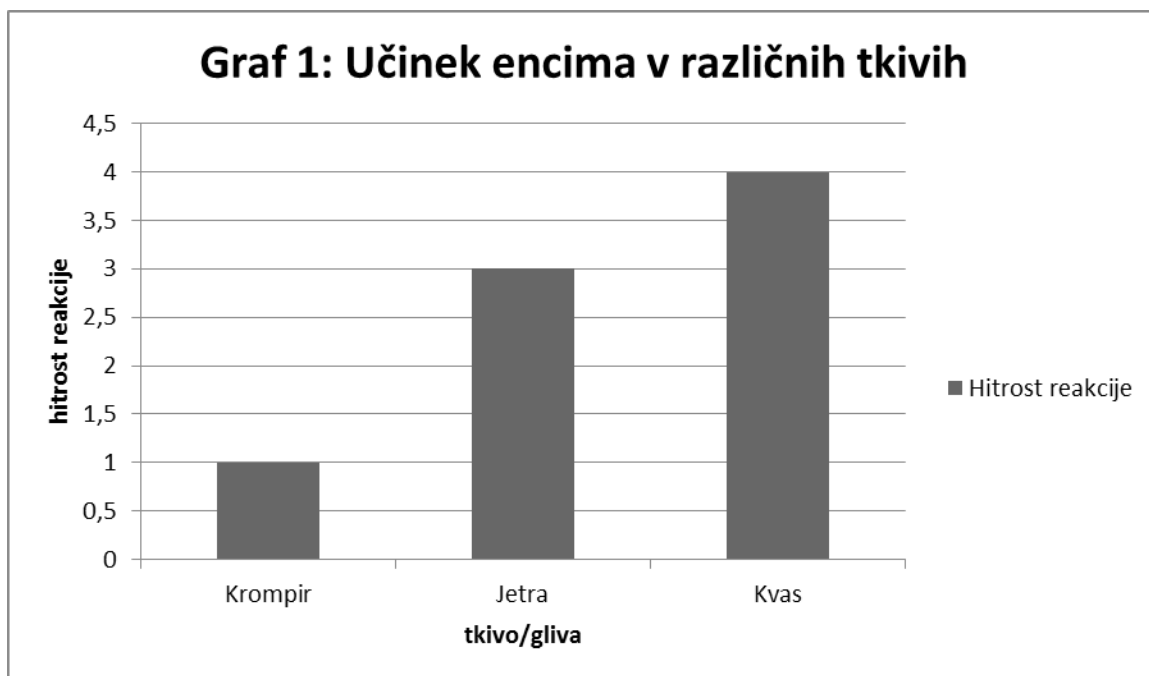
Poskus 2: Delovanje katalizatorja

V epruveti z manganovim dioksidom je reakcija burna in epruveta je topla na otip. V drugi epruveti, kjer je pesek ni vidne reakcije in ob otipu epruvete nisem začutila temperaturne razlike.

Poskus 3: Učinek encima (encim v živalskem in rastlinskem tkivu ter glivah)

TKIVO/GLIVA	HITROST REAKCIJE
Krompir (rastlinsko tkivo)	1
Jetra (živalsko tkivo)	3
Kvas (gliva)	4

Tabela 1: Hitrost reakcije pri posameznem tkivu/glivi.



Poskus 4: Dokazovanje produktov reakcije

S tlečo trsko sem dokazala prisotnost kisika (plin).

EPRUVETA S/Z	PRISOTNOST KISIKA
Krompirjem	ne
Jetri	da
Kvasom	da

Tabela 2: Prisotnost kisika v epruveti.

Poskus 5: Ponovna uporaba encima

S ponovno uporabo jeter iz prejšnjega poskusa sem ugotovila, da je hitrost reakcije šibkejša, saj se burnost reakcije giba med ocenama 2 in 3.

Poskus 6: Vpliv velikosti delcev na delovanje encima

Pri sesekljanem koščku krompirja je reakcija potekla hitreje, kot pa v epruveti v kateri je bil cel košček krompirja.

Poskus 7: Vpliv temperature na delovanje encima

TEMPARATURA	HITROST REAKCIJE	
	SUROV KROMPIR	PREKUHAN KROMPIR
0°C (ledena kopel)	Malo manj burna*	/
37°C (topla kopel)	Bolj burna*	/
100°C	/	Ni reakcije

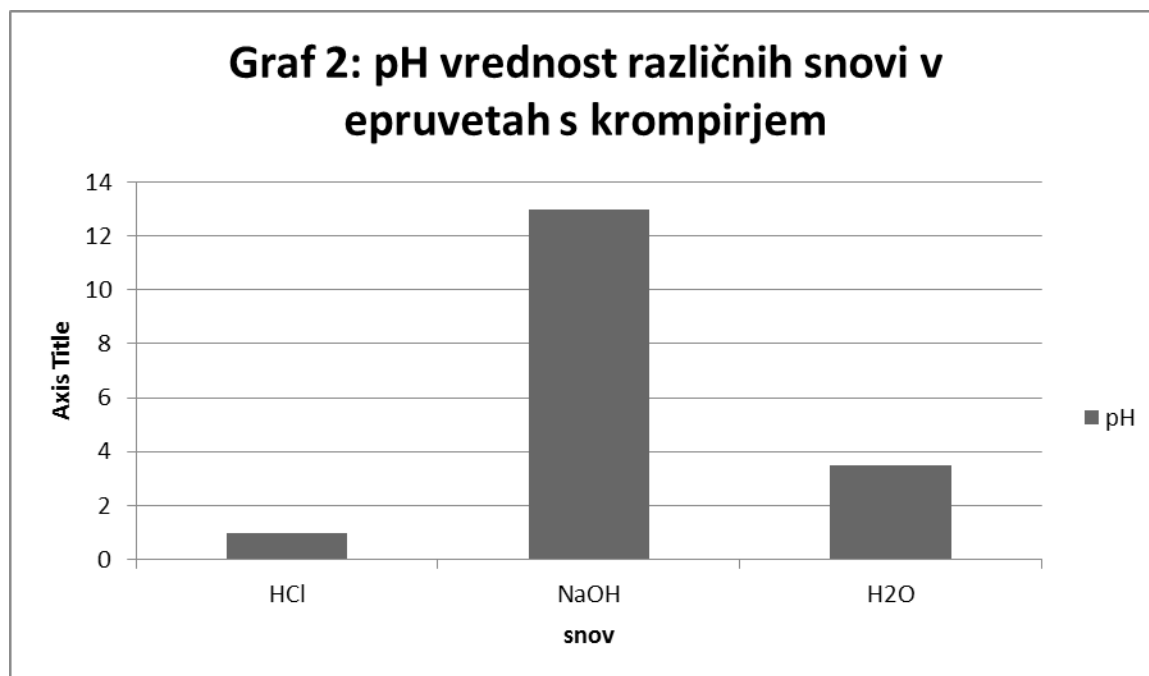
*kot pri surovem krompirju + H₂O₂

Tabela 3: Vpliv temperature na delovanje encima na krompir.

Poskus 8: Vpliv pH na delovanje encima

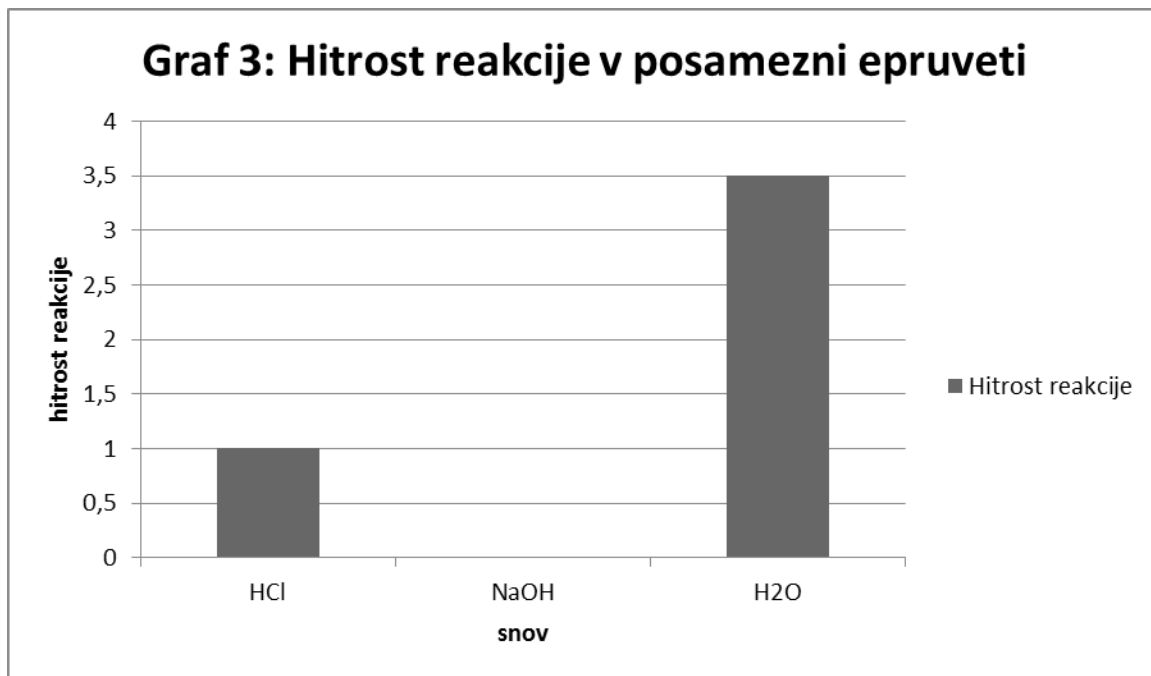
SNOV	pH
HCl	1
NaOH	13
H ₂ O	7

Tabela 4: pH vrednosti različnih snovi v epruveh s krompirjem.

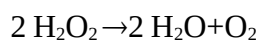


SNOV + H ₂ O ₂	HITROST REAKCIJE
HCl	1
NaOH	0
H ₂ O	3

Tabela 5: Hitrost reakcije v epruveh s snovjo, krompirjem in dodanim H₂O₂.



Poskus 9: Produkti reakcije



4 RAZPRAVA

Pri demonstraciji prvega poskusa, ki jo je vodila mentorica, sem opazila po segrevanju da se je na stenah epruvete pojavil kondenz. Kondenz je oblika vode v vodni pari. Vodikov peroksid zaradi delovanja temperature razpade na vodo in kisik. Seveda, zaradi visoke temperature, v živih celicah ni mogoča razgradnja vodikovega peroksida, saj pri taki temperaturi beljakovine v živih celicah spremenijo svojo obliko. Tako za razpad celice uporabijo encim katalazo.

Pri delovanju katalizatorja v prvi epruveti reakcija ni potekla, torej pesek ni katalizator za razgradnjo vodikovega peroksida. V drugi epruveti pa je bila reakcija hitra, pod vplivom manganovega dioksida, ki je znan kot anorganski katalizator in ga najdemo v naravi.

Pri poskusu, kjer smo ugotavljali učinek encima, smo ugotovili, da je bila reakcija najhitrejša ob prisotnosti kvasovk, zelo burna je bila tudi pri prisotnosti jeter, manj burna pa je bila ob prisotnosti krompirja. Razlika je očitna, ker živalska tkiva vsebujejo več katalaze kot rastlinska, ker v njih poteka mnogo več celičnega dihanja in s tem sproti nastaja več vodikovega peroksida. Tudi rastline razgrajujejo vodikov peroksid, a pri njih se odvija mnogo manj celičnega dihanja, zato imajo tudi manj katalaze.

Največ mehurčkov plina je bilo v dveh epruvetah: s jetri in s kvasom. Dokazan plin je kisik. Tako sem dokazala, da v krompirju ni kisika, v epruvetah z jetri in kvasom pa sem dokazala kisik s tlečo trsko, ki v kisiku zagori s plamenom.

Pri ponovni uporabi encima sem dala jetra iz prejšnje epruvete in nekaj novega substrata. Reakcija je potekla, torej sklepam, da se v prejšnji reakciji encim ni porabil. Encimi reakcije le pospešijo, ni jih v produktih, ne uničijo se in se ne porabijo.

Ugotavljala sem, če velikost delcev krompirja vpliva na hitrost reakcije. Ker sem krompir sesekljala se je iz tkiv sprostilo več katalaze in reakcija je potekla hitreje kot v drugem poskusu, kjer sem enak, a cel košček krompirja prelila z vodikovim peroksidom.

Ugotavljali smo tudi vpliv temperature na delovanje katalaze. Najhitreje je reakcija potekla pri 37 stopinjah – to je optimalno območje.

V epruveti, ki je bila v ledeni vodi je reakcija potekla počasneje, tista katera je bila v vreli vodi pa reakcija sploh ni potekla, ker je bila temperatura previsoka in beljakovine so koagulirale oziroma spremenile svojo obliko. V enem izmed poskusov smo ugotavljali tudi, v kakšnem pH okolju encim deluje najbolje. Katalaza najbolj deluje v nevtralnem okolju (destilirana voda; pH = 7), znaki reakcije so se kazali v kislem (klorovodik; pH = 1), v bazičnem okolju (natrijev hidroksid; pH = 13) pa reakcija ni potekla, ker je encim koaguliral.

Ugotavljali smo, kaj pospešuje razgradnjo strupenega vodikovega peroksida, ki je stranski produkt živih celic in obenem strupen, tako da ga morajo celice dovolj hitro razgraditi. Razgradijo ga s pomočjo katalizatorja. Ko segrevamo vodikov peroksid razpade na kisik in vodo.

5 ZAKLJUČKI

Ugotovila sem, da se encim pri reakcije ne spremeni, porabi ali uniči, reakcijo le pospeši. Na hitrost delovanja encima vplivajo temperatura, pH in velikost delcev. Dokazala sem tudi, da večja površina delcev pospeši reakcijo. Učinkovitost katalaze je največja v nevtralnem pH, najmanjša pa v kislem okolju. Ugotovila sem tudi, da pri razgradnji vodikovega peroksida nastaja kisik in da so beljakovinski katalizatorji učinkovitejši od nebeljakovinskih.

6 VIRI IN LITERATURA

- Peter Stušek, Andrej Podobnik, Nada Gogala: BIOLOGIJA 1, Celica, DZS, Ljubljana 2003.