

## pH optimum enzymu katalasy

Když se náš enzym cítí nejlépe?

### Obsah

Úvod .....	2	Příprava úlohy (praktická příprava) .....	14
Cíle .....	2	Postup práce .....	14
Teoretický úvod .....	3	Nastavení HW a SW .....	14
Motivace studentů .....	6	Příprava měření .....	15
Doporučený postup .....	6	Vlastní měření (záznam dat) .....	16
Příprava úlohy .....	7	Analýza naměřených dat .....	17
Materiály pro studenty .....	8	Pracovní list učitele .....	19
Záznam dat .....	8	Slovníček pojmů .....	19
Analýza dat .....	8	Teoretická příprava úlohy .....	20
Syntéza a závěr .....	8	Vizualizace naměřených dat .....	21
Hodnocení .....	9	Vyhodnocení naměřených dat .....	22
Internetové odkazy .....	9	Závěr .....	23
Pracovní návod .....	11	Pracovní list studenta .....	25
Zadání úlohy .....	11	Slovníček pojmů .....	25
Pomůcky .....	11	Vizualizace naměřených dat .....	28
Bezpečnost práce .....	12	Vyhodnocení naměřených dat .....	29
Teoretický úvod .....	12	Závěr .....	29

 **Zařazení do výuky**

Experiment je vhodné zařadit v rámci učiva o enzymech, enzymové kinetice nebo o problematice funkce konkrétního enzymu – katalasy (především ochrana buňky před působením peroxidu vodíku).

 **Tip 1**

*Uvedená varianta experimentu sice studuje pH optimum katalasy, ale analogickým způsobem je možné zaměřit se na aktivitu enzymu v souvislosti s teplotou (teplotní optimim) nebo koncentrací některých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Stejně tak je možné studovat nekompetitivní inhibici s využitím např.  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Další možnou variantou je studium kinetiky katalasy s využitím různých koncentrací substrátu.*

 **Časová náročnost**

Dvě hodiny (2 × 45 min).

*Čas se vztahuje k základní uvedené variantě včetně úvodní diskuse a vyhodnocení výsledků. Pokud zadáte teoretickou přípravu např. samostatnou domácí formou a připravíte všechny potřebné roztoky, včetně pH pufrů, a na studentech zůstane pouze příprava vzorku s aktivním enzymem a měření aktivity, je možné koncipovat cíčení jako jednodinové.*

 **Chemikálie**

- Peroxid vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$

R 22–41

S 26–39

Souhrn:

*Zdraví škodlivý při požití. Nebezpečí vážného poškození očí. Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte osobní ochranné prostředky pro oči a obličej.*

*Nebezpečnost:  $X_n$*

## Úvod

V následujícím laboratorním cvičení využijí studenti tlakové čidlo ke zjištění aktivity enzymu katalasy. Enzymy jsou biokatalyzátory, bez kterých by nemohla fungovat žádná buňka. Náš vybraný enzym se účastní rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Protože činností tohoto enzymu vzniká kyslík v plynné formě, můžeme ke studiu aktivity enzymu použít tlakové čidlo.

Aktivita enzymů je závislá na celé řadě faktorů. V naší úloze se pokusíme zjistit, jak aktivita katalasy souvisí s hodnotou pH prostředí, ve kterém se enzym nachází.

## Cíle

Studenti by měli zvládnout:

- použít odpovídající instrumentální vybavení (tlakové čidlo Pasco) ke studiu aktivity katalasy při různém pH,
- analyzovat a vyvodit závěry z grafu časové změny tlaku zaznamenané v průběhu chemické reakce,
- na základě experimentálního zjištění určit pH optimum pro katalasu.

## Teoretický úvod

V buňce je celá řada bílkovin (proteinů) s nejrůznějšími funkcí. Jedny z velice důležitých buněčných součástí bílkovinné povahy jsou enzymy. **Enzymy** jsou jednoduché či složené **bílkoviny s katalytickou funkcí**. Proto je označujeme jako takzvané **biokatalyzátory**. Katalyzátor je látka, která ovlivňuje průběh chemické reakce, a to tak, že snižuje její aktivační energii ( $E_A$ ) a dochází k urychlení chemické reakce. Enzymy tak v buňce zodpovídají za řadu chemických reakcí, které by bez nich za normálních podmínek vůbec neprobíhaly. Studium enzymů se zabývá především **biochemie**. Oborem, který je zaměřený přímo na studium chování enzymů je tzv. **enzymologie**. V souvislosti s problematikou enzymových reakcí si musíme zavést několik základních pojmů. Látka, kterou enzym zpracovává, je označována jako **substrát**. Vznikající látka je nazývána **produkt**. Enzym je často složen z několika částí. Rozlišujeme tzv. **apoenzym**, který ke své funkci potřebuje ještě určitou **nebílkovinnou část**, která se nazývá **kofaktor**. Apoenzym s navázaným kofaktorem označujeme jako **holoenzym**. Kofaktor je nejčastěji **prostetická skupina, koenzym**, nebo zde může hrát specifickou roli konkrétní **iont**. **Prostetická skupina** je v určité fázi formování vlastního enzymu trvale navázána na apoenzym (často kovalentně), a tvoří součást aktivního centra enzymu. **Koenzym** je naopak součástí, která je vázána dočasně a zodpovídá např. za přenosy elektronů při redoxních reakcích (NAD, FAD...). Jako koenzymy přímo vystupují také některé vitamíny. Mezi **kofaktory z řad kationtů** patří třeba ionty  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , nebo Fe-S komplexy.

Enzym, kterým se budeme v naší úloze zabývat, se jmenuje **katalasa**, a má označení EC 1.11.1.6. Základní funkcí tohoto enzymu je přeměna peroxidu vodíku na kyslík a vodu:

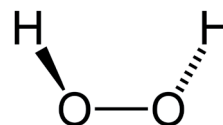


Peroxid vodíku vzniká při řadě metabolických reakcí (např. fotorespirace, oxidace mastných kyselin) a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba, aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je právě úkol pro katalasu.

- **Dihydrogenfosforečnan sodný**  $NaH_2PO_4$ ,  
a **hydrogenfosforečnan sodný**  $Na_2HPO_4$

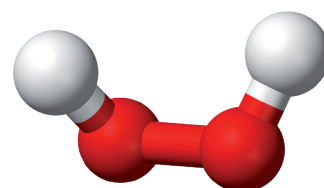
Látka není považována za nebezpečnou. Protože se fosforečnany podílí na eutrofizaci vod, zabraňte jejich úniku do kanalizace.

### Peroxid vodíku



Peroxid vodíku je kapalina, která má lehce kyselé vlastnosti a je silným oxidačním činidlem. Má také silné bělicí účinky (odbarvování vlasů). Nejčastěji se používá jako desinfekční a oxidační činidlo. Právě vinou svých silných oxidačních účinků může poškodit buňku. Na druhou stranu ho v určitých případech dokáží využít některé rostlinné buňky v boji proti patogenům.

Během druhé světové války byl peroxid vodíku používán jako raketové palivo, např. jako jednosložkové palivo – katalytickým rozkladem vznikal paroplyn (součást motorů raket V2, popřípadě z pozdější doby tzv. „raketový pás“ – „rocket belt“ z bondovek). Po válce se od použití peroxidu jako „okysličovačla“, až na pár výjimek, ustoupilo a místo toho se začal využívat oxid dusičitý, který je ovšem prudce jedovatý. Využití peroxidu vodíku v raketové technice však někde zůstalo zachováno (např. motory RD 107/108, což jsou hlavní motory prvního a druhého stupně ruské rakety R7 v současnosti známé ve své nejvýkonnější verzi jako Sojuz U.).



### Historie

Výzkumem biokatalyzátorů se zabývala řada významných vědců. Mezi nimi byl také Louis Pasteur, který zavedl pro biokatalyzátory vyvolávající kvašení pojem „fermenty“. Pasteur se domníval, že kvašení je proces vázaný na život. Tuto domněnku vyvrátil v samotném závěru devatenáctého století německý chemik Eduard Buchner, který byl za svou práci oceněn roku 1907 Nobelovou cenou za chemii.

Označení „enzym“ pochází z řečtiny a poprvé ho použil německý fyziolog a lékař Wilhelm Kühne roku 1878. Tímto termínem začali být později označovány látky, které štěpily bílkoviny mimo živé buňky (např. izolovaný pepsin).

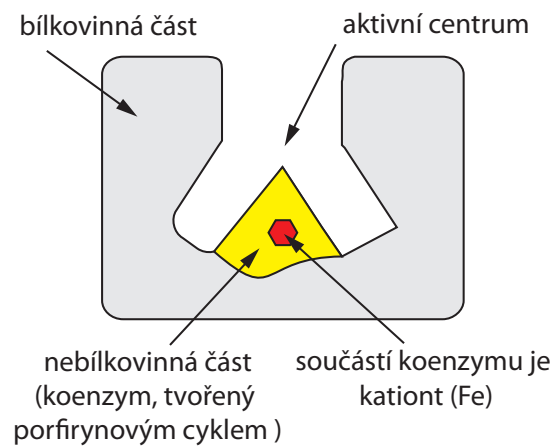
První zmínka o katalase jako určité látky se objevuje v roce 1811. Louis Jacques Thénard, objevitel peroxidu vodíku, pozoroval látku, která rozkládala peroxid vodíku. Avšak až v roce 1900 popsal a pojmenoval tuto látku Oscar Loew. Tento vědec zjistil přítomnost katalasy u řady rostlin i živočichů. V roce 1937 James B. Sumner vykryštoval katalasu izolovanou z hovězích jater a v roce 1938 určil její molární hmotnost.

Aminokyselinová sekvence katalasy byla publikována v roce 1969 a v roce 1981 byl vytvořen její strukturní 3D model.



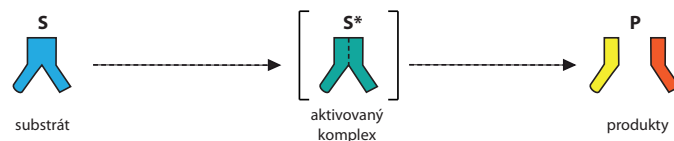
Eduard Buchner

Schéma stavby katalasy je na obrázku 1. Fungování enzymu je schematicky znázorněno na obrázku 2.

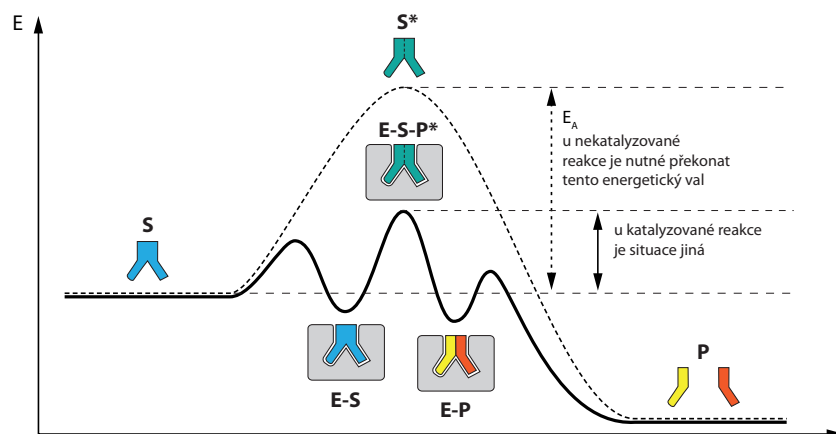
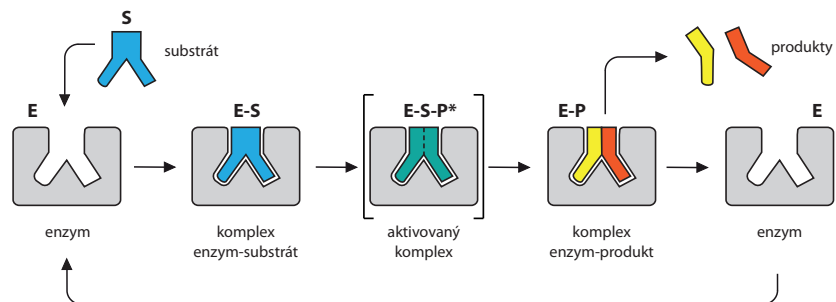


Obrázek 1 – schéma stavby enzymu katalasy

#### Nekatalyzovaný teoretický průběh reakce

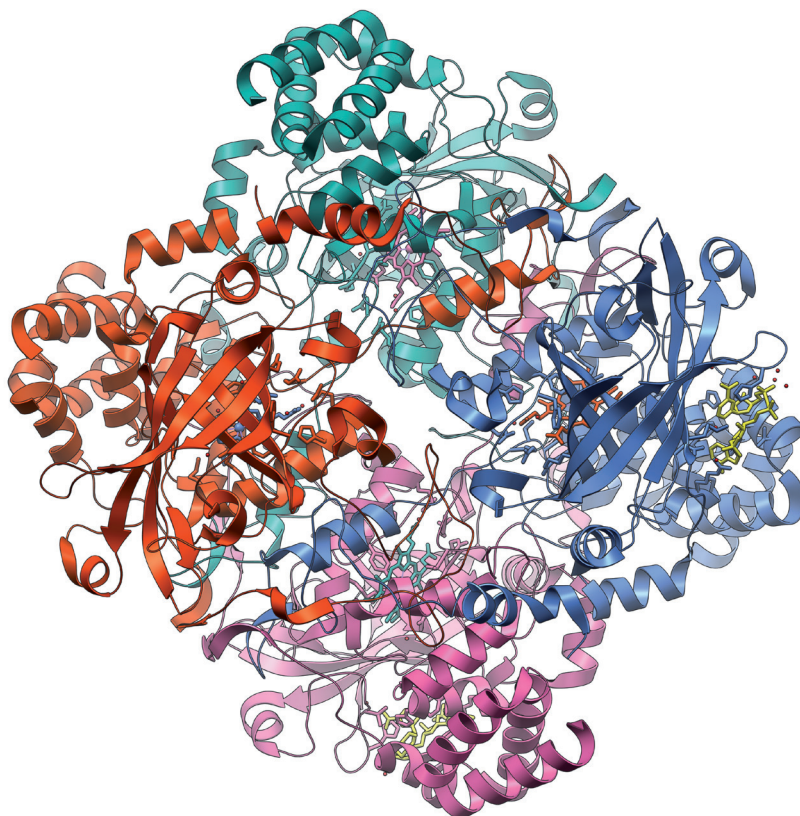


#### Katalyzovaný průběh reakce



Obrázek 2 – schéma fungování enzymu

Katalasa je tetramer skládající se ze čtyř polypeptidických řetězců, každý řetězec čítá přes 500 aminokyselin. Model katalasy je na následujícím obrázku č. 3, jednotlivé řetězce jsou odlišeny barevně.



Obrázek 3 – 3D model enzymu katalasy

Většina enzymů je dosti citlivá na podmínky, ve kterých se vyskytuje. Aktivita enzymu se tak mění s celou řadou faktorů (pH, teplota, přítomnost dalších látek, ...). My se v naší práci zaměříme na to, jakým způsobem bude ovlivňovat aktivitu enzymu katalasy různé pH. Využijeme k tomu skutečnost, že aktivitu enzymu můžeme přímo vztáhnout k rychlosti probíhající reakce. Protože je při reakci uvolňován plynný kyslík, můžeme ke sledování průběhu reakce použít manometr. Čím větší bude rychlost reakce, tím rychleji poroste měřený tlak. Protože je závislost v určité části lineární, proložíme touto částí přímkou a získáme její směrnici. Směrnice pro nás bude za daného pH „mírou“ aktivity katalasy.

Vzhledem k snadné dostupnosti a jednoduchému zpracování použijeme jako biologický materiál – zdroj katalasy – bramborové hlízy.

### **Na co je třeba pufr?**

K tomu, abychom udrželi určité pH v prostředí, kde bude naše enzymová reakce probíhat, použijeme tzv. pH pufr. Pufr, neboli tlumivý roztok, je roztok o takovém složení, které dokáže vyrovnávat určité změny v koncentraci obsažených látek a udržuje tak tuto koncentraci na konstantní hodnotě. V našem případě použijeme pufr, který je schopen udržovat stálý poměr koncentrací  $\text{H}_3\text{O}^+$  a  $\text{OH}^-$  iontů a tím udržuje stálou hodnotu pH. Mimo pH pufrů existuje celá řada dalších pufráčích systémů (např. pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , ...).

### **Není brambor jako brambor**

Při zjišťování pH optima katalasy můžeme dostat značně odlišné výsledky. Studované pH optimum může ovlivnit řada faktorů, jako je třeba doba a podmínky skladování bramborových hlíz.

Různé výsledky pracovních týmů ale mohou souviset také s nedostatečným vymytím použitého laboratorního nádobí. Katalasa je velice účinně inhibována relativně malými koncentracemi těžkých kovů. Jako kritická se ukázala především nutnost důkladného vymytí třech misek, které často obsahovaly různé těžko umytelné pozůstatky předchozích laboratorních cvičení :-).

 **Slovníček pojmů**

ENZYM

APOENZYM

KOFAKTOR

HOLOENZYM

KATALASA

pH OPTIMUM

Viz pracovní list (učitel).

 **Přehled pomůcek**

- počítač s USB portem
- PASPORT USB Link (Interface) nebo Xplorer
- PASPORT tlakové čidlo nebo chemický multisensor
- software DataStudio
- bramborová hlíza
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% roztok)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (c = 0,2 mol/l)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (c = 0,2 mol/l)
- třecí miska s tloučkem
- gumová zátka s hadičkou pro napojení tlakového čidla
- zkumavky (2 ks), střední
- kádinky 150 ml (4 ks)
- odměrný válec 100 ml
- pipety s balónkem (2 ks), 5 ml, 10 ml
- nůž, nůžky
- popisovač (lihový fix)
- stojánek na zkumavky
- *pracovní návod*
- *pracovní list*
- *ochranné pracovní pomůcky*

## Motivace studentů

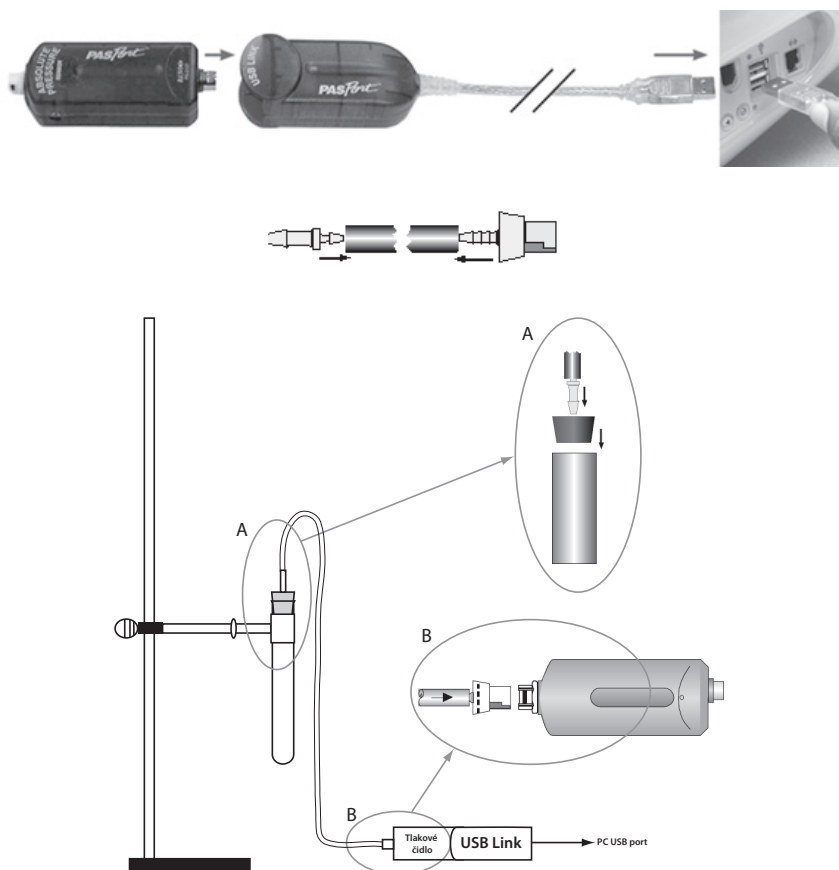
Na úvod si budeme demonstrovat funkci enzymů na každém studentovi. Připravíme na kostičky nakrájený chléb a rozdáme jej studentům. Chléb rozžvýkáme a budeme ho nějakou dobu v ústech převalovat. Samozřejmě že zakážeme spolknutí sousta.

K tomu abychom rozpoznali změny stačí asi 3 minuty, ale někdy i výrazně méně. V následujících třech minutách můžeme říci několik úvodních informací o enzimech. Pak přejdeme k tomu, jaká látka je především obsažena v pečivu, když je jeho základem mouka, která má původ v obilných zrnech. Studenti odvodí, že se jedná o **škrob** (polysacharid). Při konzumaci škrobu nemáme sladký chuťový vjem. Ovšem nyní se studentů zeptáme, jak jejich sousto chutná. Většina odpoví, že sladce. Jak je to možné? Ve slinách je obsažený enzym, který se účastní štěpení škrobu na jednodušší sacharidy, které již jako sladké vnímáme. Tento enzym je tzv. **amylasa**, a studenti ho jistě znají z biologie jako **ptyalin**. Úvodní část můžeme uzavřít třeba tím, že ukážeme bramborovou hlízu a zmíníme katalasu jako enzym, jehož vlastnosti budeme nyní zkoumat.

## Doporučený postup

1. Každá pracovní skupina obdrží „pracovní návod“ a každý student dostane „pracovní list“. Studenti si nejprve přečtou návod a teprve pak začnou s přípravou vlastního experimentu.
2. Dopoučujeme, aby každý člen pracovní skupiny dostal svůj specifický úkol. Pro tříčlennou skupinu například:
  - *student 1* – vedoucí týmu – ručí za to, že skupina bude při práci postupovat podle pracovního návodu, koordinuje vyplňování pracovních listů a vyplněné pracovní listy vybírá (každý student si vyplní svůj pracovní list), dále připraví aparaturu potřebnou k měření a systém PASCO k měření tlaku (spuštění PC a SW DataStudio, kontrola připojení odpovídajícího čidla, ověření funkčnosti, ...),

- *student 2* – připraví fosfátové pufrы o různých hodnotách pH,
  - *student 3* – zpracuje biologický materiál (bramborovou hlízu).
3. Připojte zařízení přes USB rozhraní k počítači (viz obrázek 4).



Obrázek 4 – připojení tlakového čidla

4. Vyberte odpovídající soubor DataStudia (**15\_enzym\_katalasa\_pH\_optimum.ds**) a pokračujte podle postupu uvedeného v „pracovním návodu“.

## Příprava úlohy

Nechte studenty vyplnit (za domácí úkol nebo, pokud máme dvouhodinové praktikum, na začátku práce) slovníček a přípravnou část úlohy v „pracovním listu“. Je nezbytné, aby studenti tyto části vypracovali před vlastní experimentální činností.

Zjistěte, jak studenti přípravnou část úlohy vypracovali.

### Tip 2

Pokud chceme zajistit stejné pH optimum pro studovanou katalasu u všech pracovních skupin, je vhodné použít pro všechny stejnou bramborovou hlízu. Ideální je hlízu oloupat a celou zhomogenizovat. Následně potom rozdělit suspenzi jednotlivým skupinám. Tak by měly všechny skupiny stanovit stejné pH optimum.

## Materiály pro studenty

„Pracovní návod“ postupně provede studenty („krok za krokem“) celou úlohou.

„Pracovní list“ slouží studentům k zaznamenání získaných dat, jejich analýze a pochopení.

## Záznam dat

Postup při zaznamenávání dat je popsán v „pracovním listu“. Upozorněte studenty na to, že před vlastním započítáním měření je třeba úloze opravdu porozumět.

## Analýza dat

Naměřená data použijí studenti ke zodpovězení otázek v „pracovním listu“.

Upozorněte studenty na souhrnné otázky. V učitelské verzi pracovního listu jsou uvedeny typické odpovědi studentů.

## Syntéza a závěr

Po skončení experimentální činnosti shrneme získané poznatky o vlastnostech enzymů a závislosti jejich aktivity na pH prostředí. U různých enzymů může být pH optimum různě posunuté. I v případě katalasy můžeme zjistit různé pH optimum. Typicky se hodnota pH optima u námi studované katalasy pohybuje v rozmezí 6,8 až 7,5. Záleží ale na celé řadě faktorů (teplota, případně inhibitory, část použité hlízy, odrůda brambor, ...). Pokud všichni studenti nepracují s jednou bramborovou hlízou, musíme počítat s tím, že výsledky se mohou lišit. Zavedeme také diskusi i na další možné ovlivnění aktivity enzymů (viz teoretická příprava úlohy). Studenti řadu z možností nají z vlastní zkušenosti (denaturace povahením, použitím desinfekčního činidla (např. formaldehyd), použití inhibitoru (např. ionty těžkých kovů), atd. Nezapomeneme také na zdůraznění principu fungování enzymů jako biokatalyzátorů, k čemuž je vhodné znovu použít znázení reakční koordináty z teoretického úvodu.



## Hodnocení

(Viz dříve uvedené cíle.)

- Sestavili a použili studenti laboratorní zařízení správně?
- Postupovali korektně podle pracovního postupu?
- Pochopili studenti princip fungování enzymů?
- Vypracovali studenti správně své „pracovní listy“?
- Odpovídá stanovená hodnota pH optima pro katalasu hodnotám uvedeným v literatuře (hodnotě uvedené pedagogem)?
- Jsou studenti schopni zdůvodnit případné rozpory mezi předpokládaným a experimentálně zjištěným výsledkem?

## Internetové odkazy

### Problematika katalýzy

<http://en.wikipedia.org/wiki/Catalyst>

### Enzymy a jejich funkce

<http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>

### Enzymová katalýza

[http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme\\_kinetics](http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_kinetics)

### O enzymu katalase

<http://en.wikipedia.org/wiki/Catalase>

### Peroxid vodíku

[http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen\\_peroxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_peroxide)



### Pasco zdroje

Na stránkách [www.pasco.com](http://www.pasco.com) a [www.pasco.cz](http://www.pasco.cz) naleznete řadu dalších zdrojů.





## CHEMIE

laboratorní cvičení č. 15

15

• CHEMIE

## pH optimum enzymu katalasy (návod)

### Zadání úlohy

Prostudujte enzym katalasu pocházející z bramborové hlízy. Zaměřte se na studium aktivity katalasy v prostředí s různým pH. Z naměřených hodnot stanovte pro katalasu pH optimum, tj. pH při kterém vykazuje katalasa největší aktivitu (katalyzovaná reakce probíhá nejrychleji).

### Pomůcky

- počítač s USB portem
- PASPORT USB Link (Interface) nebo Xplorer
- PASPORT tlakové čidlo nebo chemický multisenzor
- software DataStudio
- bramborová hlíza
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (3% roztok)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ )
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ )
- třecí miska s tloučkem
- zkumavky (2 ks), střední
- kádinky 150 ml (4 ks)
- odměrný válec 100 ml
- pipety s balónkem (2 ks), 5 ml, 10 ml
- gumová zátka s hadičkou pro napojení tlakového čidla
- nůž, nůžky
- popisovač (lihový fix)
- stojánek na zkumavky
- *pracovní návod*
- *pracovní list*
- *ochranné pracovní pomůcky*

PRACOVNÍ NÁVOD



## Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. S chemikáliemi zacházejte vždy dle instrukcí pedagoga. Nikdy nepipetujte ústy (vždy používejte balónek). V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

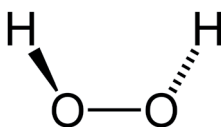
## Teoretický úvod

V buňce je celá řada bílovin (proteinů) s nejrůznější funkcí. Jedny z velice důležitých buněčných součástí bílkovinné povahy jsou enzymy. **Enzymy** jsou jednoduché či složené **bílkoviny s katalytickou funkcí**. Proto je označujeme jako takzvané **bio-katalyzátory**. Katalyzátor je látka, která ovlivňuje průběh chemické reakce, a to tak, že snižuje její aktivační energii ( $E_A$ ) a dochází k urychlení chemické reakce. Enzymy tak v buňce zodpovídají za řadu chemických reakcí, které by bez nich za normálních podmínek vůbec neprobíhaly. Problematikou enzymů se zabývá především **biochemie**. Oborem, který je zaměřený přímo na studium enzymů je tzv. **enzymologie**. V souvislosti s problematikou enzymových reakcí si musíme zavést několik základních pojmů. Látka, kterou enzym zpracovává, je označována jako **substrát**. Vznikající látka je nazývána **produkt**. Enzym je často složen z několika částí. Rozlišujeme tzv. **apoenzym**, který ke své funkci potřebuje ještě určitou **nebílkovinnou část**, která se nazývá **kofaktor**. Apoenzym s navázaným kofaktorem označujeme jako **holoenzym**. Kofaktor je nejčastěji **prostetická skupina**, **koenzym**, nebo zde může hrát specifickou roli konkrétní **iont**. **Prostetická skupina** je v určité fázi formování vlastního enzymu trvale navázána na apoenzym (často kovalentně), a tvoří součást aktivního centra enzymu. **Koenzym** je naopak součástí, která je vázána dočasně a zodpovídá např. za přenosy elektronů při redoxních reakcích (NAD, FAD...). Jako koenzymy přímo vystupují také některé vitamíny. Mezi **kofaktory z řad kationtů** patří třeba ionty  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , nebo Fe-S komplexy.

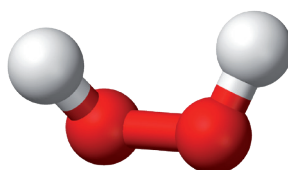
Enzym, kterým se budeme v naší úloze zabývat, se nazývá **katalasa**, a má označení EC 1.11.1.6. Základní funkcí tohoto enzymu je přeměna peroxidu vodíku na kyslík a vodu:



Peroxid vodíku vzniká při řadě metabolických reakcí (např. fotosynthese, oxidace mastných kyselin) a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba, aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je právě úkol pro katalasu.

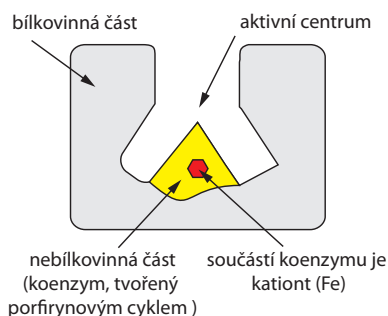


$H_2O_2$  – strukturní vzorec

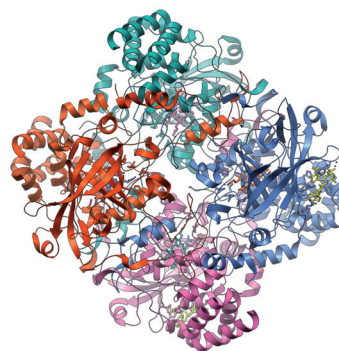


$H_2O_2$  – 3D model

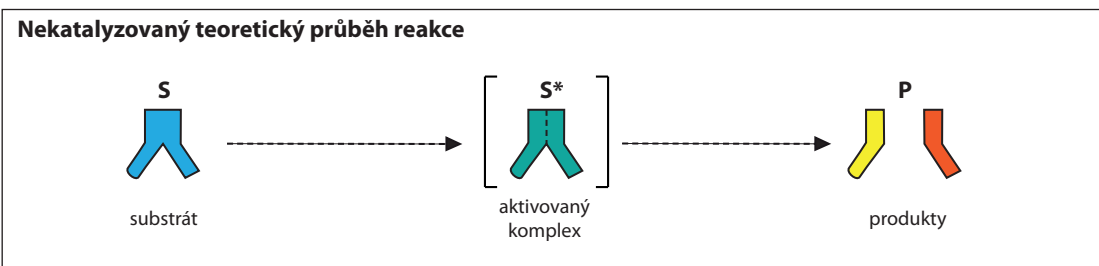
Schéma stavby katalasy je na obrázku 1. Fungování enzymu je schematicky znázorněno na obrázku 2. Katalasa je tetramer skládající se ze čtyř polypeptidických řetězců, každý řetězec čítá přes 500 aminokyselin. Prostorový model katalasy je na obrázku 3, jednotlivé řetězce jsou odlišeny barevně



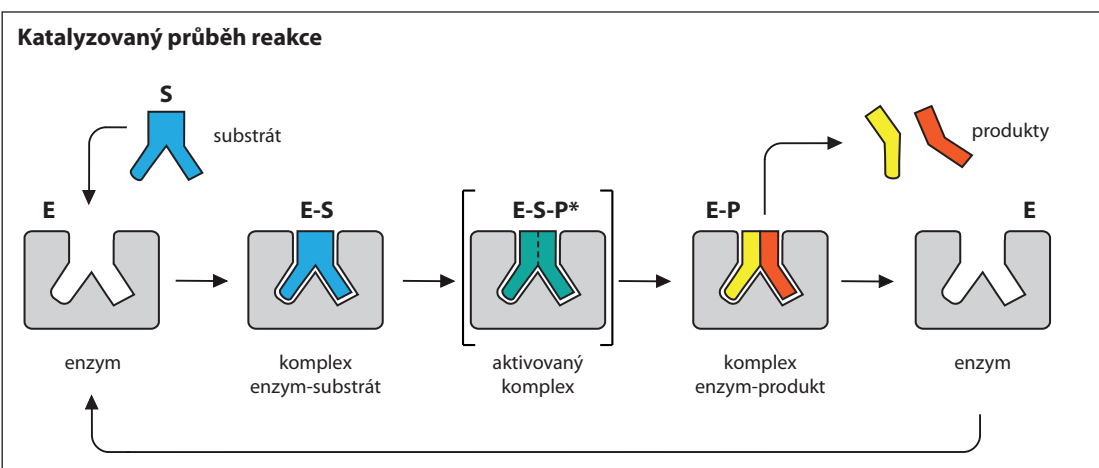
Obrázek 1: Schéma stavby podjednotky enzymu katalasy



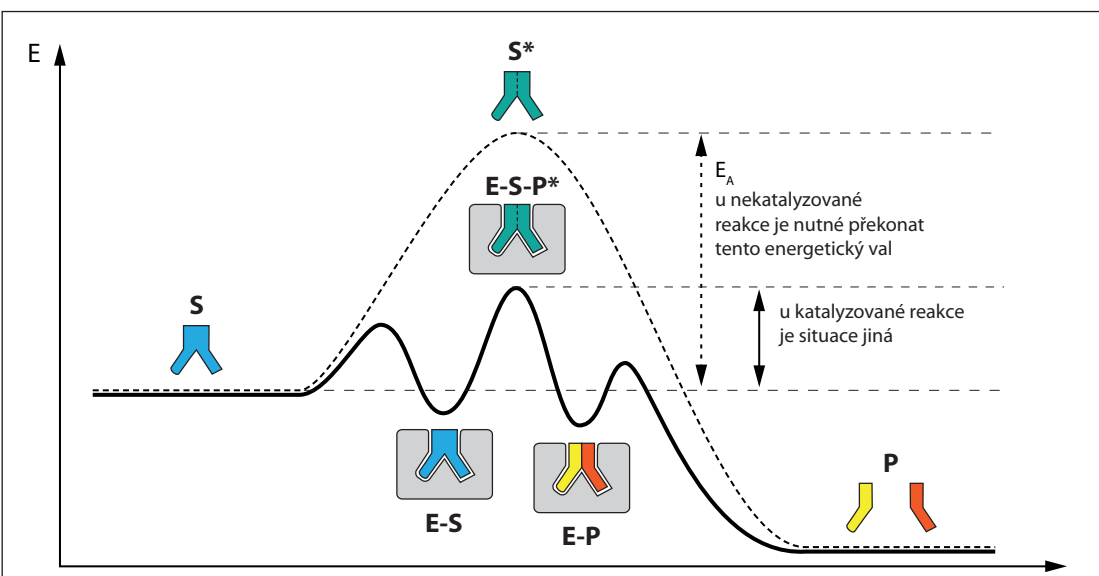
Obrázek 3: 3D model enzymu katalasy



Obrázek 2a: Schéma nekatalyzované reakce



Obrázek 2b: Schéma katalyzovaného průběhu reakce



Obrázek 2c: Reakční koordináta pro nekatalyzovanou a katalyzovanou reakci

Většina enzymů je dosti citlivá na podmínky, ve kterých se vyskytuje. Aktivita enzymu se tak mění s celou řadou faktorů (pH, teplota, přítomnost dalších látek, ...). My se v naší práci zaměříme na to, jakým způsobem bude ovlivňovat aktivitu enzymu katalasy prostředí s různou hodnotou pH. Využijeme k tomu skutečnost, že aktivitu enzymu můžeme přímo vztáhnout k rychlosti probíhající reakce. Protože je při reakci uvolňován plynný kyslík, můžeme ke sledování průběhu reakce použít manometr (tlakoměr). Čím větší bude rychlost reakce, tím rychleji poroste měřený tlak. Protože je závislost v určité části lineární, proložíme touto částí přímkou a získáme její směrnici. Směrnice pro nás bude za daného pH „mírou“ aktivity katalasy.

K tomu, abychom udrželi určité pH v prostředí, kde bude naše enzymová reakce probíhat, použijeme tzv. pufr. **Pufr**, neboli tlumivý roztok, je roztok o takovém složení, které dokáže vyrovnávat určité změny v koncentraci obsažených látek a udržuje tak tuto koncentraci na konstantní hodnotě. V našem případě použijeme pufr, který je schopen udržovat stálý poměr koncentrací  $\text{H}_3\text{O}^+$  a  $\text{OH}^-$  iontů a tím udržuje stálou hodnotu pH.

Vzhledem k snadné dostupnosti a jednoduchému zpracování použijeme jako biologický materiál – zdroj katalasy – bramborové hlízy.

1. ***V následujícím praktickém cvičení prostudujte aktivitu enzymu katalasy v prostředí s různým pH.***
2. ***Z naměřených hodnot stanovte pH optimum pro katalasu.***

## Příprava úlohy (praktická příprava)

Nejprve zpracujte slovníček a teoretickou přípravu na „pracovním listě“ a teprve potom začněte pracovat v laboratoři.

## Postup práce

### Nastavení HW a SW

1. Připojte tlakové čidlo přes USB rozhraní (PASSPORT USB interface nebo Xplorer) k počítači. Tím se automaticky otevře konfigurační dialog.



2. Vyberte a otevřete odpovídající konfigurační soubor DataStudia

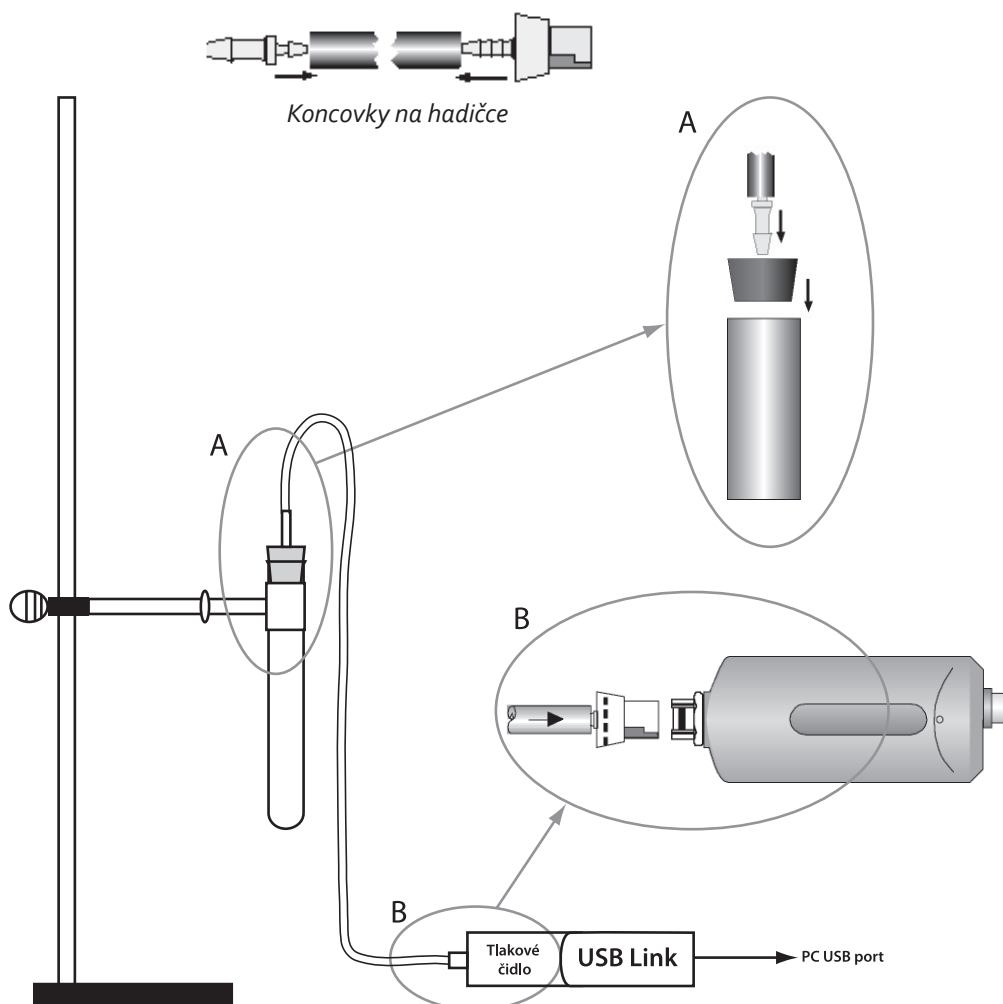
**15\_enzym\_katalasa\_pH\_optimum.ds**

**Poznámka:** Konfigurační soubory automaticky otevřou potřebná okna a nastaví výchozí parametry (rychlost snímání atd.). V této úloze budete měřit pouze

*pomocí tlakového čidla. V případě, že používáme některé z multisenzorových řešení, budeme ostatní čidla ignorovat (nebudeme je do úlohy přidávat).*

### Příprava měření

1. Před započítím práce si přečtete celý „pracovní návod“.
2. Sestavte jednoduchou aparaturu, kterou budeme k provedení experimentu potřebovat.
  - I. Na stojan uchytníme křížovou svorku a do ní držák na zkumavky.
  - II. Před upnutím zkumavky do držáku ji dobře zkontrolujeme. Zkumavka nesmí vykazovat známky poškození (např. jemné praskliny na dně).
  - III. Připravíme si gumovou zátku, kterou můžeme zkumavku těsně uzavřít. Zátka musí být provrtána a těsně osazena spojovacím dílem umožňujícím připojení hadičky. Hadička má na druhém konci osazený spojovací díl pro připojení tlakového čidla.



*Zapojení tlakového čidla – sestavená aparatura*

**IV. Na závěr je vhodné provést test těsnosti připravené aparatury!**

## 3. Připravte si následující pH pufrů:

- I. Na pracovní plochu si připravte čtyři 150 ml kádinky. Kádinky si popište hodnotami pH budoucích pufrů: 5,7 – 6,5 – 7,1 – 8,0.
- II. Podle následující tabulky připravte roztoky pufrů:

Označení kádinky:	pH 5,7	pH 6,5	pH 7,1	pH 8,0
Objem 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	93,5 ml	68,5 ml	33 ml	5,3 ml
Objem 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6,5 ml	31,5 ml	67 ml	94,7 ml

- III. V případě, že máte k dispozici pH elektrodu, můžete měřením hodnotu pH ověřit a zapsat si přesně změřenou hodnotu pH. (*Nezapomeňte, že pH elektrodu je třeba před vlastním měřením zkalibrovat pomocí komerčně dodávaných kalibračních pH pufrů!*)

## 4. Příprava roztoku (suspenze) obsahujícího katalasu:

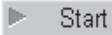
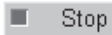
- I. Z vnitřní části **bramborové hlízy** odřízneme část asi o hmotnosti 4 g. Kousek rozřežeme na co nejmenší kousíčky a z nich navážíme 3 g.
- II. Navážené malé nařezané kousky následně nasypeme do čisté, pečlivě vymyté, třecí misky.
- III. Do třecí misky přidáme 3 ml připraveného fosfátového pufru (pH 7,1) a doplníme 27 ml vody.
- IV. Poté rozetřeme obsah třecí misky na jemnou řídkou kaši, kterou přelejeme do větší zkumavky a necháme alespoň 10 minut odstát. Tím dojde k usazení větších kousků na dně zkumavky.  
*Tip: Pokud máte k dispozici centrifugu, můžete usazování výrazně urychlit tím, že připravený vzorek při mírných otáčkách zcentrifugujete.*
- V. Horní neusazenou část použijeme v dalším kroku jako vzorek, obsahující mimo jiné i náš studovaný enzym – katalasu.

**Vlastní měření (záznam dat)**

Vlastní měření aktivity katalasy provedeme v sestavené aparatuře

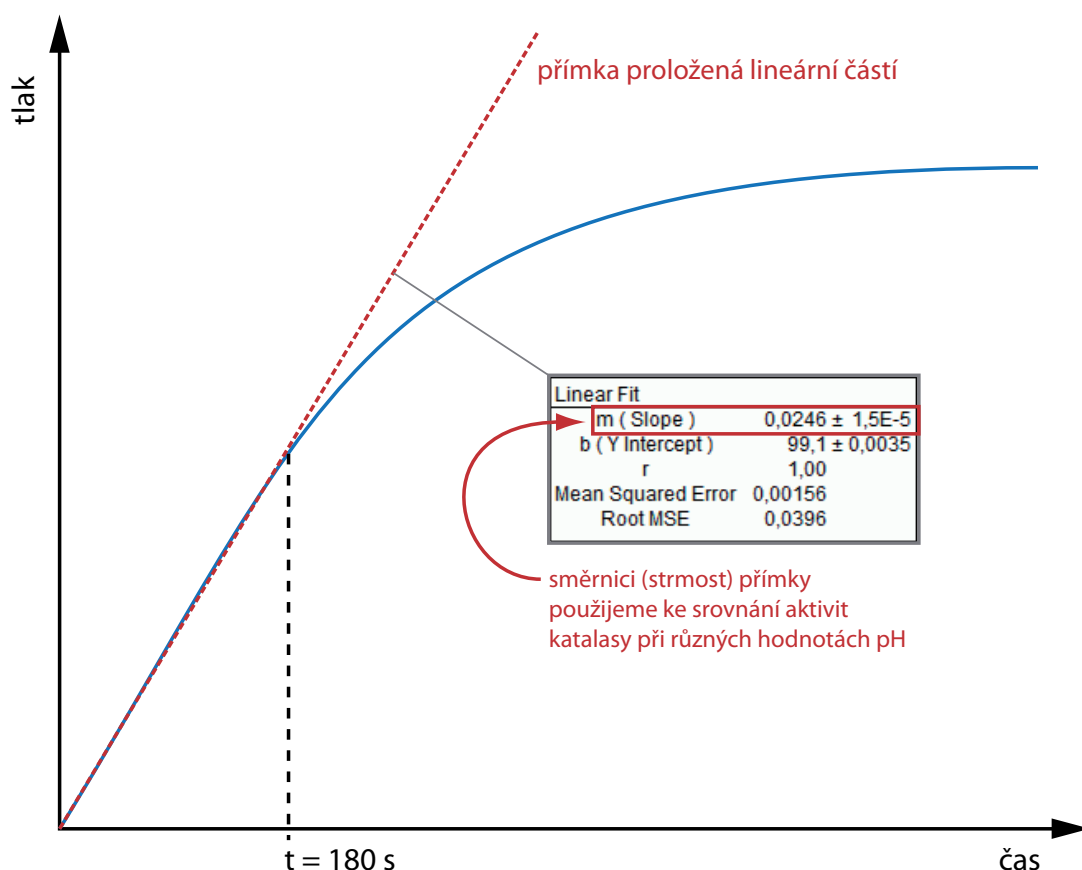
1. Připravíme si čtyři zkumavky, které si označíme odpovídající hodnotou pH.
2. Do zkumavek napipetujeme postupně 3 ml zvoleného pH pufru a přidáme 1 ml připraveného vzorku s katalasou. Před dalším měřením necháme vše 3–5 minut odstát při pokojové teplotě.
3. Vezmeme zkumavku s hodnotou pH 5,7 a obsah přepipetujeme do zkumavky uchycené na stojanu, ve které bude probíhat měření tlaku uvolňovaného kyslíku (aktivity katalasy).
4. Reakci zahájíme přidáním 3 ml 3% roztoku peroxidu vodíku do „měřicí zkumavky“. Po přidání ještě znovu obsah zkumavky nasajeme do pipety a znovu vypustíme, čímž dojde k dostatečnému promíchání.



5. Zkumavku uzavřeme gumovou zátkou s napojenou hadičkou vedenou k tlakovému čidlu.
6. Zaznamenávání dat zahajete kliknutím na tlačítko **Start** (  Start ).
7. Pozorujte průběh reakce. Záznam změny tlaku provádějte minimálně 3 minuty, (nebo případně tak dlouho, až se dosažený tlak ustálí).  
*Optimální doba záznamu je většinou 3–6 minut.*
8. Pro ukončení měření tlaku klikněte na tlačítko **Stop** (  Stop ).
9. Zreagovaný obsah zkumavky zlikvidujte dle instrukcí pedagoga.
10. Měřicí zkumavku několikrát dobře propláchněte. Vezměte zkumavku označenou hodnotou pH 6,5 (viz bod 3) a celý postup zopakujte. Stejně tak postupujte pro pH 7,1 a pH 8,0.

### Analýza naměřených dat

1. Typický průběh reakce je zobrazen na následujícím grafu. V průběhu našeho měření zaznameneáme většinou pouze úvodní lineární část křivky.



2. S využitím naměřených křivek doplňte tabulku v „pracovním listu“.
3. Pro každou křivku vybereme pomocí myši tu úvodní část, která je nejbližší lineárnímu průběhu. Následně zvolíme z horního menu grafu **Fit** → **Linear Fit** a ze zobrazeného „štitku“ parametrů si do tabulky přepíšeme hodnotu směrnice.

4. Na základě velikosti směrnice označte v tabulce to pH, při kterém probíhá reakce nejrychleji.
5. Následně vynesete do grafu hodnotu směrnice proti hodnotám pH prostředí.
6. Své výsledky v *DataStudios* uložte (nabídka **File** → **Save Activity As...**) na místo, které máte vyhrazeno k ukládání svých souborů.
7. Odpovězte na otázky v „pracovním listu“.
8. Dle instrukcí učitele uklidte své pracovní místo.

## CHEMIE

15

• CHEMIE

laboratorní cvičení č. 15

**pH optimum enzymu katalasy  
pracovní list (učitel)****Slovníček pojmů**

S využitím dostupných zdrojů vysvětlíte následující pojmy:

**Enzym:**

*Enzymy jsou jednoduché či složené bílkoviny s katalytickou funkcí. Proto je označujeme jako takzvané biokatalyzátory. Katalyzátor je látka, která ovlivňuje průběh chemické reakce, a to tak, že ovlivní její aktivační energii ( $E_A$ ) – dochází k urychlení chemické reakce.*

**Apoenzym:**

*Apoenzym je hlavní bílkovinná část enzymu, který ke své funkci potřebuje často ještě určitou nebílkovinnou část.*

**Kofaktor:**

*Nebílkovinná součást enzymu. Kofaktor je nejčastěji prostetická skupina, koenzym, nebo zde může hrát specifickou roli konkrétní iont. Prostetická skupina je v určité fázi formování vlastního enzymu trvale navázána na apoenzym (často kovalentně), a tvoří součást aktivního centra enzymu. Koenzym je naopak součástí, která je vázána dočasně a zodpovídá např. za přenosy elektronů při redoxních reakcích (NAD, FAD...). Jako koenzymy přímo vystupují také některé vitamíny. Mezi kofaktory z řad kationtů patří třeba ionty  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , nebo Fe-S komplexy.*

**Holoenzym:**

Apoenzym s navázaným kofaktorem označujeme někdy jako holoenzym.

**Katalasa:**

Katalasa je enzym s označením EC 1.11.1.6 a je obsažen prakticky v každé buňce. Základní funkcí tohoto enzymu je přeměna peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Peroxid vodíku vzniká při řadě metabolických reakcí a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je právě úkol pro katalasu.

**pH optimum:**

Jako pH optimum je označováno takové pH, při kterém je aktivita enzymu největší.

**Teoretická příprava úlohy**

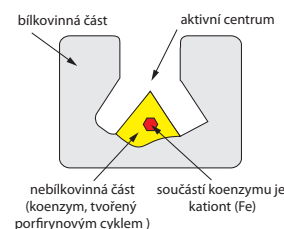
1. Jedna z rolí bílkovin v buňce je právě funkce biokatalyzátorů – enzymů. Jaké další role bílkoviny mají?

*Proteiny hrají celou řadu důležitých rolí. Mezi ně patří např.: strukturní proteiny (mechanická opora), pohybové proteiny (pohyb uvnitř buněk a celých buněk i celých tkání), zásobní proteiny (skladování molekul a iontů), transportní proteiny (přenos malých molekul), receptorové proteiny (detekce chemických a fyzikálních signálů), regulační proteiny (aktivace a deaktivace – např. transkripce DNA), signální proteiny (přenos signálů), speciální proteiny (např. protimrazové), a další.*

2. Z jakých typických částí se může enzym skládat?

Popište a zakreslete.

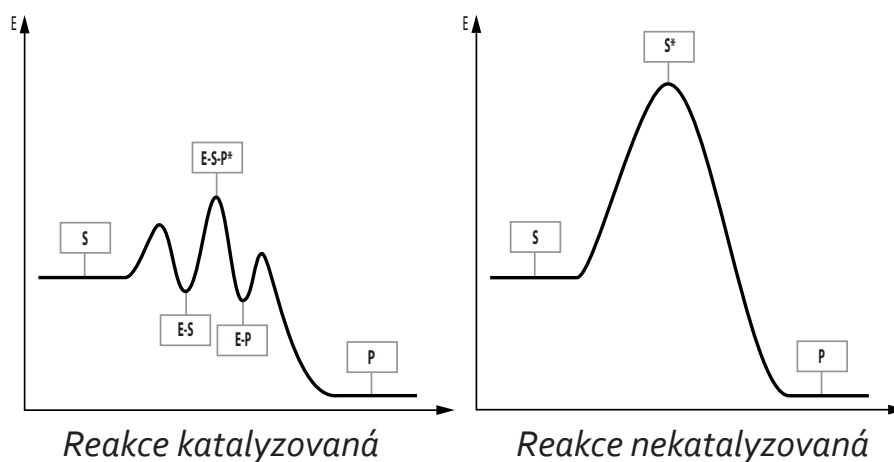
*Funkční enzym je často tvořen bílkovinnou částí, tzv. apoenzymem, a částí nebílkovinnou, tzv. kofaktorem.*



3. Který z grafů zachycuje průběh katalyzované a nekatalyzované reakce?

Doplňte volná políčka o popisky. Popisky jsou uvedeny v rámečku pod oběma grafy (pozice nesouvisí s konkrétním grafem).

Řešení:



## 4. Proč probíhá katalyzovaná reakce výrazně rychleji než reakce nekatalyzovaná?

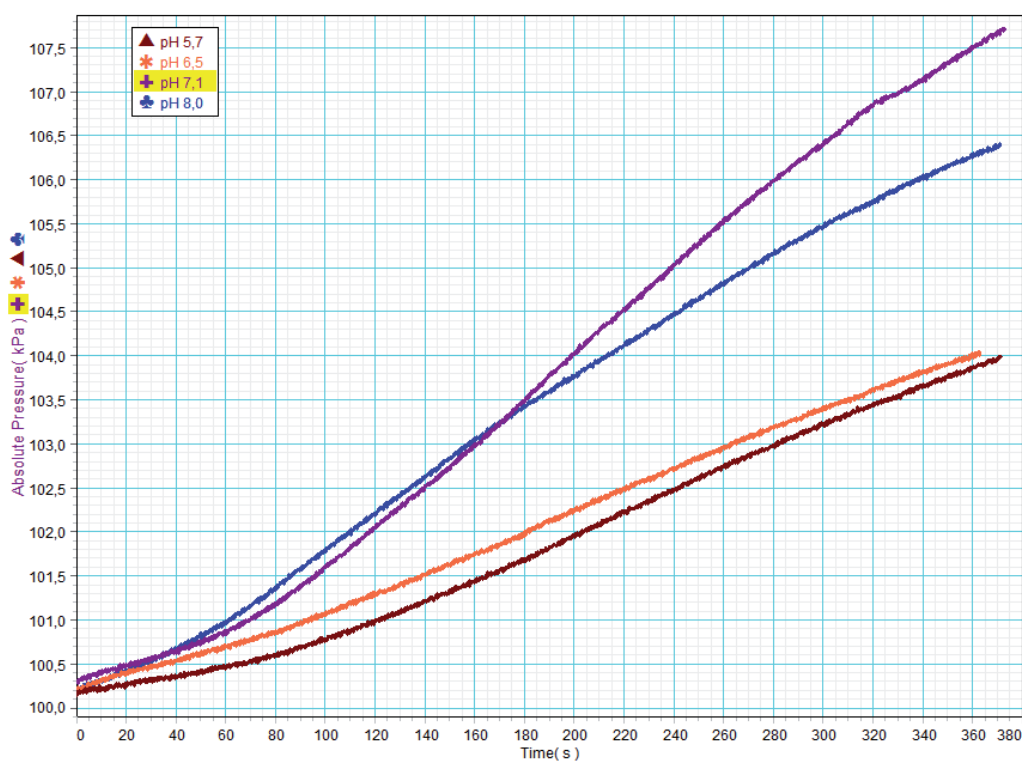
*Princip katalyzátoru spočívá v tom, že celá reakce je vedena „jinou cestou“. Na této cestě je řada mezistupňů (přechodných stavů/komplexů), a aktivační energie těchto dílčích „etap cesty“ je výrazně nižší, než aktivační energie nekatalyzované reakce. Často nalezneme v literatuře formulaci, že působením katalyzátoru dojde ke snížení aktivační energie.*

*Pro snažší pochopení můžeme studentům uvést příklad ze sportovní „praxe“. Pokud bude na překážkové dráze stát 3 m vysoká překážka, nikdo z běžců ji nemůže překonat. Vezmeme-li ale motorovou pilu (takový náš „katalyzátor“) a vyrobíme tři 1 metrové překážky, nebude s nimi mít žádný s běžců problém.*

*Díky výše uvedenému probíhá katalyzovaná reakce podstatně rychleji než reakce nekatalyzovaná.*

## Vizualizace naměřených dat

1. Zakreslete křivky změny tlaku při různých hodnotách pH. Křivky by měly vystihovat rozdíly v rychlosti (aktivitě katalasy při různých pH).

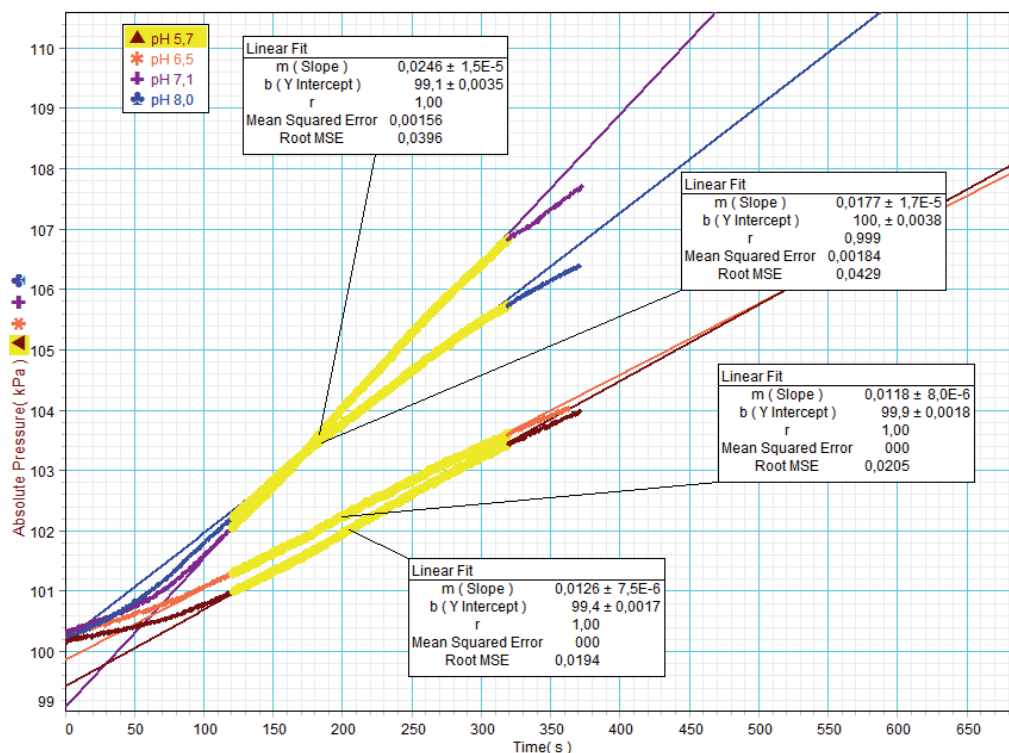


2. Bylo možné průběh reakce sledovat vizuálně? Šlo by posoudit rozdíly v aktivitě při různých pH bez měření změny tlaku?

*Ano, bylo možné přímo pozorovat uvolňující se plynný kyslík ve formě bublinek. Rozdíly v intenzitě však byly malé, a tak by bez měření tlaku nebylo možné pH optimum jednoznačně stanovit.*

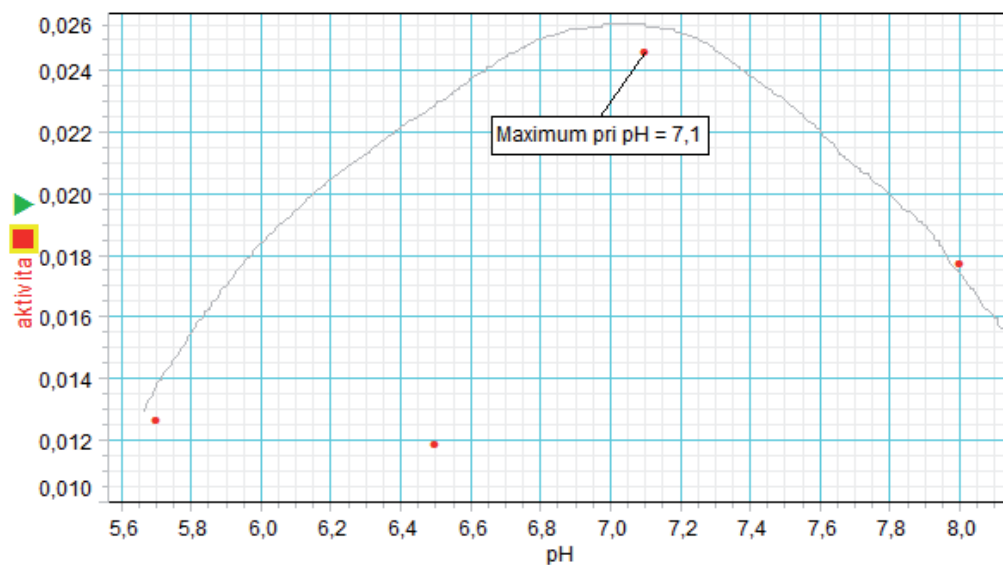
## Vyhodnocení naměřených dat

1. S využitím **DataStudia** proložte úvodní lineární částí jednotlivých naměřených křivek přímkou a vyplňte následující tabulku:



pH prostředí	Směrnice proložené přímkou (aktivita)	Jde o pH optimum?
5,7	0,0126	ne
6,5	0,0118	ne
7,1	0,0246	ano
8,0	0,0177	ne

2. Sestrojte graf závislosti aktivity enzymu na pH prostředí.



## Závěr

1. Jaká je hodnota vašeho zjištěného pH optima katalasy?  
*Různé odpovědi, typicky v rozmezí 6,8–7,5. V našem ukázkovém případě pH = 7,1.*
2. Odpovídá tato hodnota předpokladu (hodnotám uvedeným v literatuře)?  
*Různé odpovědi podle zjištěné hodnoty. V našem případě ANO, odpovídá.*
3. Jaké faktory mohly při stanovení aktivity váš výsledek zkreslit?  
*Většina enzymů je dosti citlivá na podmínky, ve kterých se vyskytuje. Aktivita enzymu se tak mění s celou řadou faktorů (pH, teplota, přítomnost dalších látek v roztoku, ...). Kritickým faktorem tak mohla být čistota použitého chemického nádobí, kdy i nepatrné zbytky některých látek mohou aktivitu výrazně ovlivnit. Stejně tak mohl výsledek zkreslit faktor stáří (a způsob skladování) bramborových hlíz, nebo vlastní odrůda brambor.*
4. Enzym rozkládající peroxid vodíku (katalasa) je přítomný téměř ve všech buňkách aerobních organismů. Vysvětlete proč?  
*Peroxid vodíku vzniká při řadě metabolických reakcí a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je úkolem pro katalasu. Je tedy zřejmé, že takovýto (nebo podobný) enzym bude třeba v každé buňce.*
5. Kdy řekneme o nějaké látce, že vystupuje v rámci chemického děje jako katalyzátor?  
*Klasický katalyzátor je látka, která do reakce vstoupí, ovlivní její průběh (rychlost reakce) a na konci reakce vystupuje z reakce v nezměněné podobě. Princip ovlivnění průběhu reakce spočívá v ovlivnění aktivační energie (viz dříve).*





## Pracovní list studenta

skupina:.....

jméno:..... třída:..... datum:.....

### Slovníček pojmů

S využitím dostupných zdrojů vysvětlete následující pojmy:

**Enzym:**

**Apoenzym:**

**Kofaktor:**

**Holoenzym:**

**Katalasa:**

**pH optimum:**

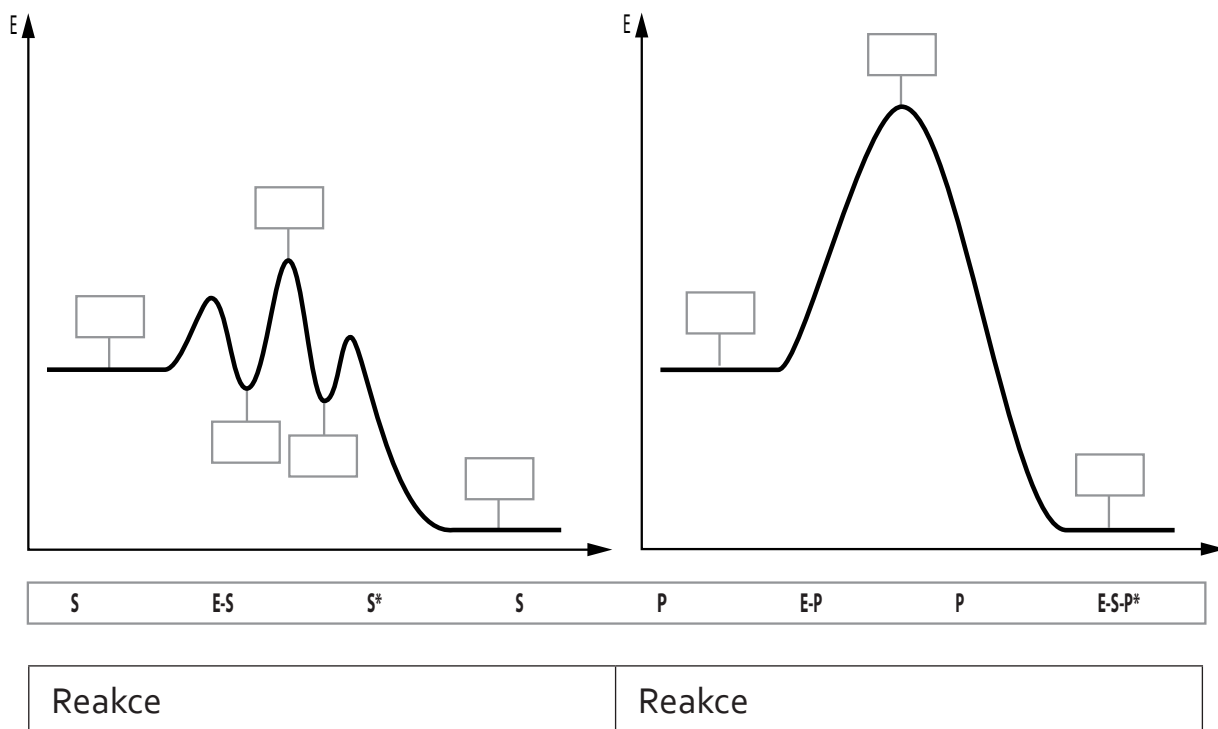
### **Teoretická příprava úlohy**

1. Jedna z rolí bílkovin v buňce je funkce biokatalyzátorů – enzymů. Jaké další role bílkoviny mají?

2. Z jakých typických částí se může enzym skládat? Popište a zakreslete.

3. Který z grafů zachycuje průběh katalyzované a nekatalyzované reakce?

Doplňte volná políčka o popisky. Popisky jsou uvedeny v rámečku pod oběma grafy (pozice nesouvisí s konkrétním grafem).



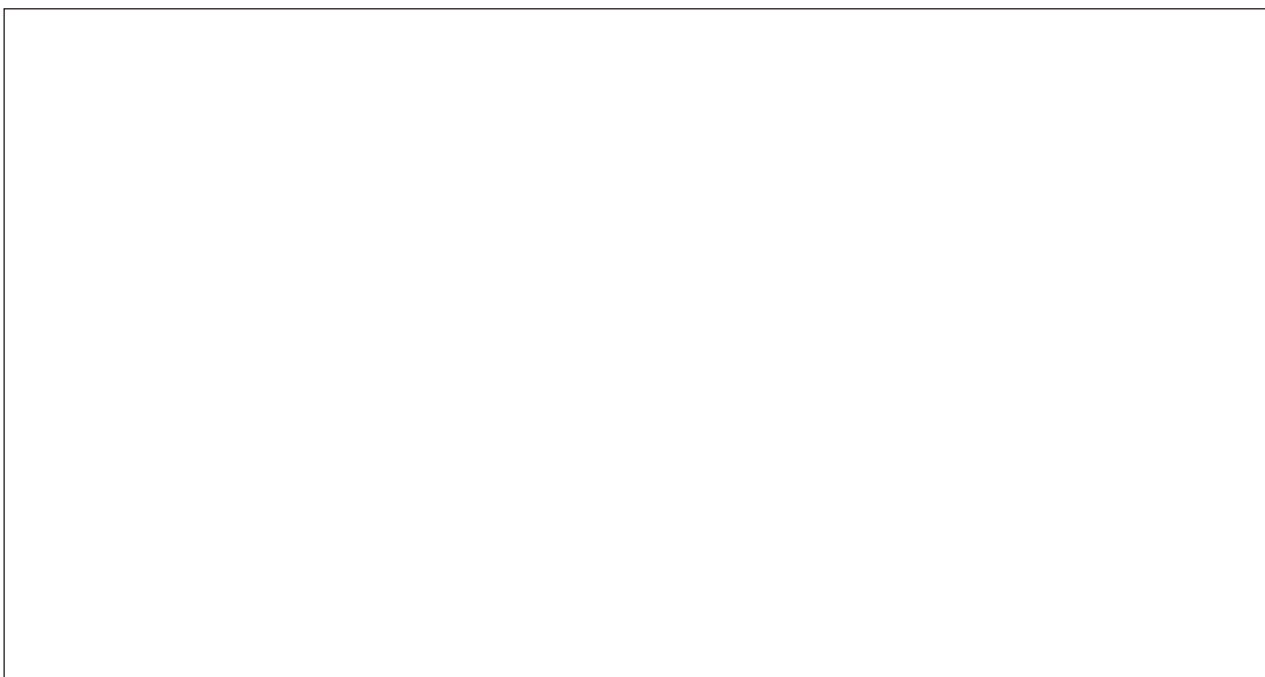
4. Proč probíhá katalyzovaná reakce výrazně rychleji než reakce nekatalyzovaná?

## Vizualizace naměřených dat

1. Zakreslete křivky změny tlaku při různých hodnotách pH. Křivky by měly vystižovat rozdíly v rychlosti (aktivitě katalasy při různých pH).



2. Bylo možné průběh reakce sledovat vizuálně? Šlo by posoudit rozdíly v aktivitě při různých pH bez měření změny tlaku?



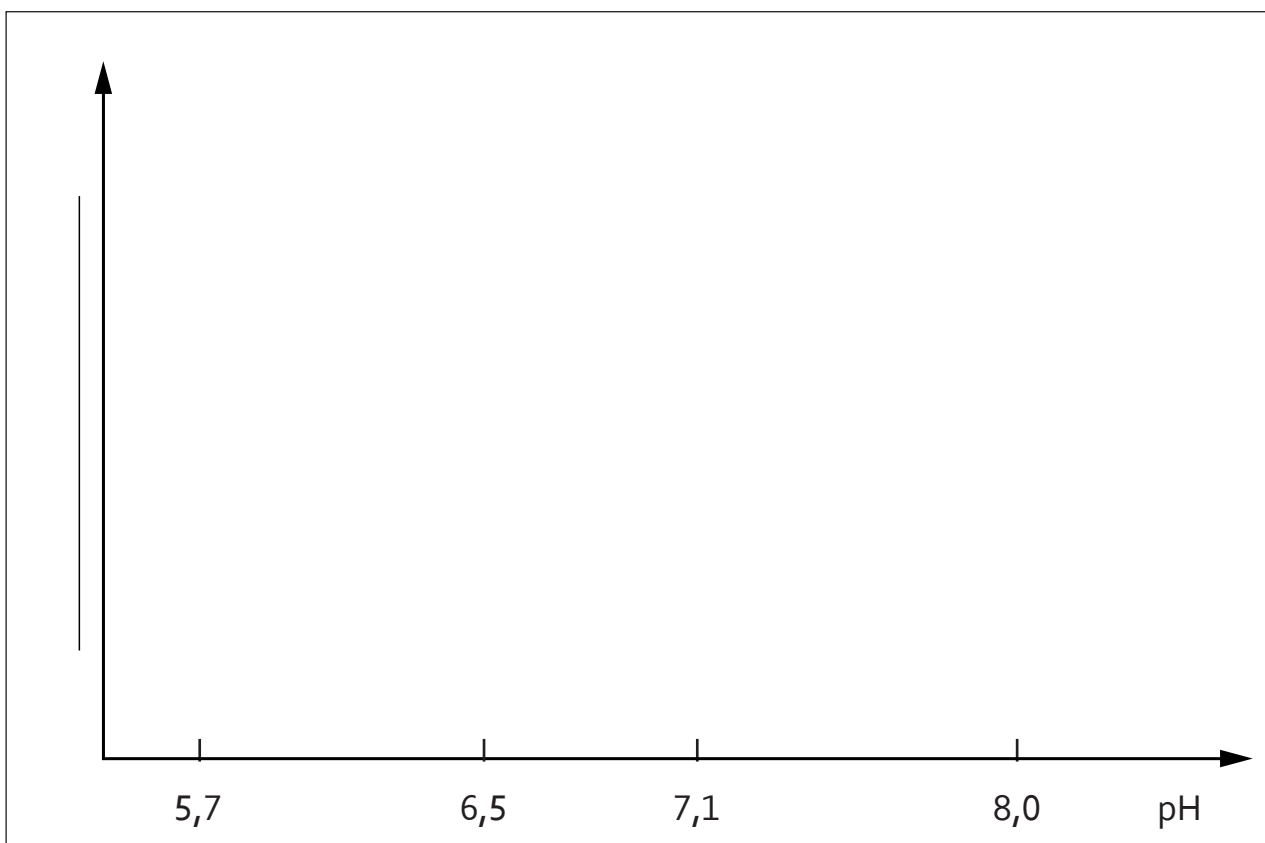
A large empty rectangular box provided for the student to write their answer to the second question.

## Vyhodnocení naměřených dat

1. S využitím *DataStudia* proložte úvodní lineární částí jednotlivých naměřených křivek přímkou a vyplňte následující tabulku:

pH prostředí	Směrnice proložené přímkou (aktivita)	Jde o pH optimum?
5,7		
6,5		
7,1		
8,0		

2. Sestrojte graf závislosti aktivity enzymu na pH prostředí.



## Závěr

1. Jaká je hodnota vašeho zjištěného pH optima katalasy?

2. Odpovídá tato hodnota předpokladu (hodnotám uvedeným v literatuře)

3. Jaké faktory mohly při stanovení aktivity váš výsledek zkreslit?

4. Enzym rozkládající peroxid vodíku (katalasa) je přítomný téměř ve všech buňkách aerobních organismů. Vysvětlete proč?

5. Kdy řekneme o nějaké látce, že vystupuje v rámci chemického děje jako katalyzátor?