PASPort®

CHEMIE

laboratorní cvičení č. 15

rev. 1.0

15 • CHEMIE

pH optimum enzymu katalasy

Kdypak se náš enzym cítí nejlépe?

Obsah

Úvod 2
Cíle 2
Teoretický úvod 3
Motivace studentů 6
Doporučený postup 6
- Příprava úlohy 7
- Materiály pro studenty 8
- Záznam dat 8
- Analýza dat 8
- Syntéza a závěr 8
- Hodnocení 9
- Internetové odkazy 9

Pracovní návod 11
- Zadání úlohy 11
- Pomůcky 11
- Bezpečnost práce 12
- Teoretický úvod 12
- Příprava úlohy (praktická příprava) 14
- Postup práce 14
  - Nastavení HW a SW 14
  - Příprava měření 15
  - Vlastní měření (záznam dat) 16
  - Analýza naměřených dat 17

Pracovní list učitele 19
- Slovníček pojmů 19
- Teoretická příprava úlohy 20
- Vizualizace naměřených dat 21
- Vyhodnocení naměřených dat 22
- Závěr 23

Pracovní list studenta 25
- Slovníček pojmů 25
- Vizualizace naměřených dat 28
- Vyhodnocení naměřených dat 29
- Závěr 29

PASCO®

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 koncentrac některých iontů (Ca^{2+}). Stejně tak je možné studovat nekompetetivní inhibici s využitím např. 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 cičení jako jednohodinové.

Chemikálie

- ***Peoxid vodíku*** **H_2O_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 vodílu 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 nejrůznější funkcí. Jedny z velice důležitých buněčných součástí bílkovinné povahy jsou enzymy. **Enzymy** jsou jendoduché či složené **bílkoviny s katalytickou funkcí**. Proto je označujeme jako takzvané **biokatalyzátory**. Katlyzátor 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. Studiem 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 třebas 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:

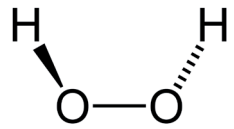
$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

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**

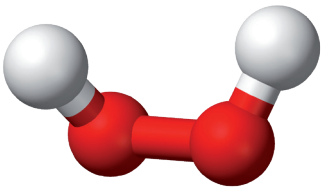
Látka není považována za nebezpečnou. Protože se fosforečnany podílí na eutrofizaci vod, zabraňte jejich úniku do kanalizace.

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 poškozovat 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 „okysličovadla", až na pár výjimek, ustoupilo a místo toho se začal využívat oxid dusičitý, který je ovšem prudce jedovatý. Využití peroxidu vodíku v rakerové 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.

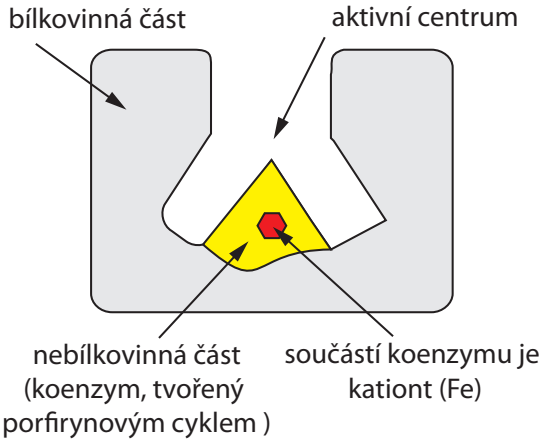
Označení „enzym" pochází z řečtiny a poprvé ho použil německý fyziolog a lékař Wilhelm Kühne roku 1878. Tímto termínem začali být později označovány látky, které štěpily bílkoviny mimo živé buňky (např. izolovaný pepsin).

První zmínka o katalase jako určité látce se objevuje v roku 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 vykrystaloval katalasu izolovanou z hovězích jater a v roce 1938 určil její molární hmotnost.

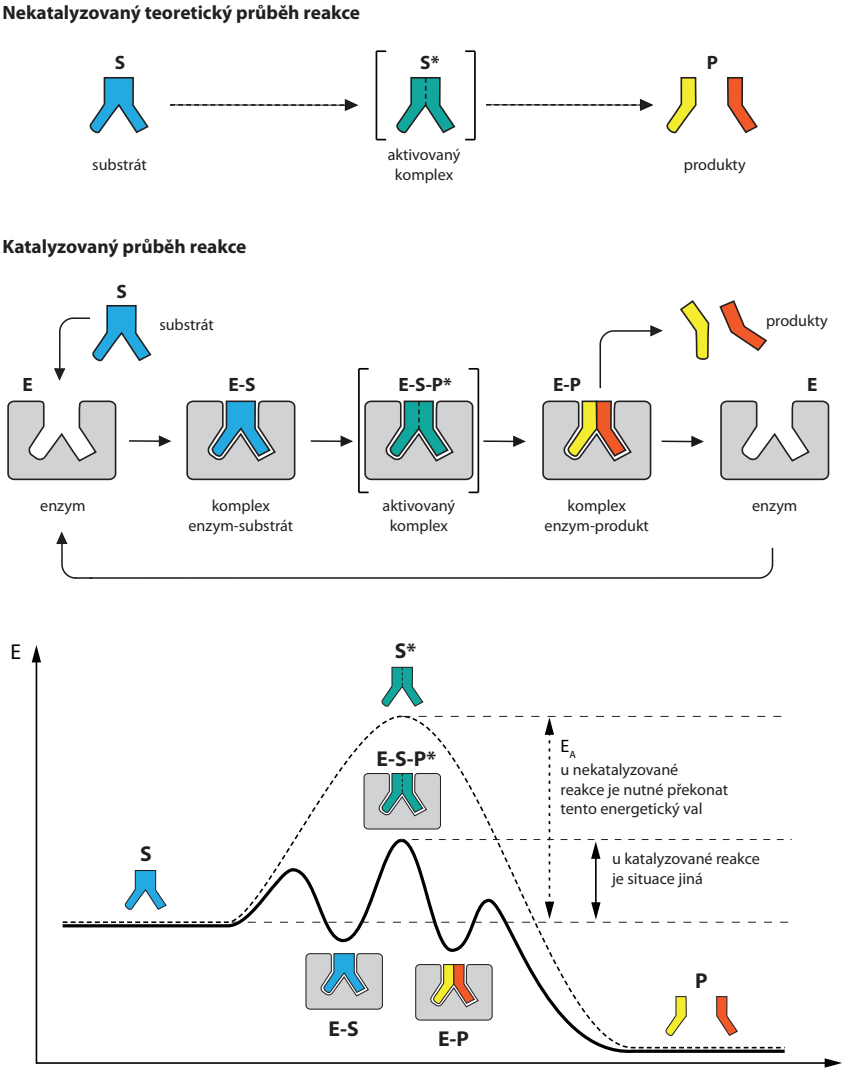
Aminokyselinová sekvence katalasy byla publikována v roce 1969 a v roce 1981 byl vytvořen její strukturní 3D model.

Eduard Buchner

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

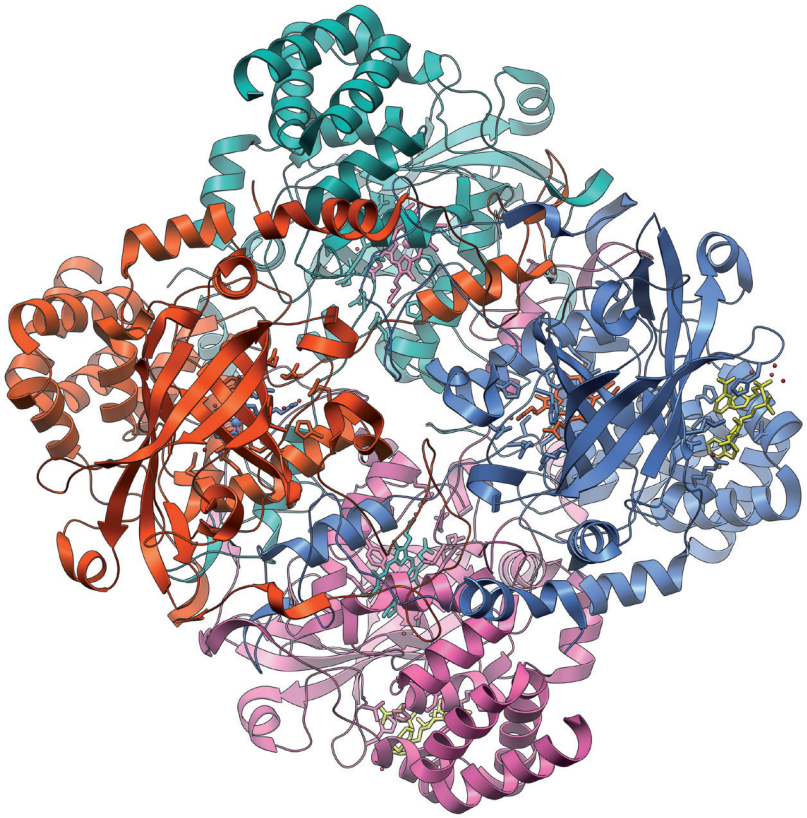


Obrázek 1 – schéma stavby enzymu katalasy



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 přímku 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 pH 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 H_3O^+ a OH^- iontů a tím udržuje stálou hodnotu pH. Mimo pH pufry existuje celá řada dalších pufračních systémů (např. pro ionty Ca^{2+}, 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 bramborovýh 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 třecích 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_2O_2 (3% roztok)
- NaH_2PO_4 (c = 0,2 mol/l)
- Na_2HPO_4 (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.

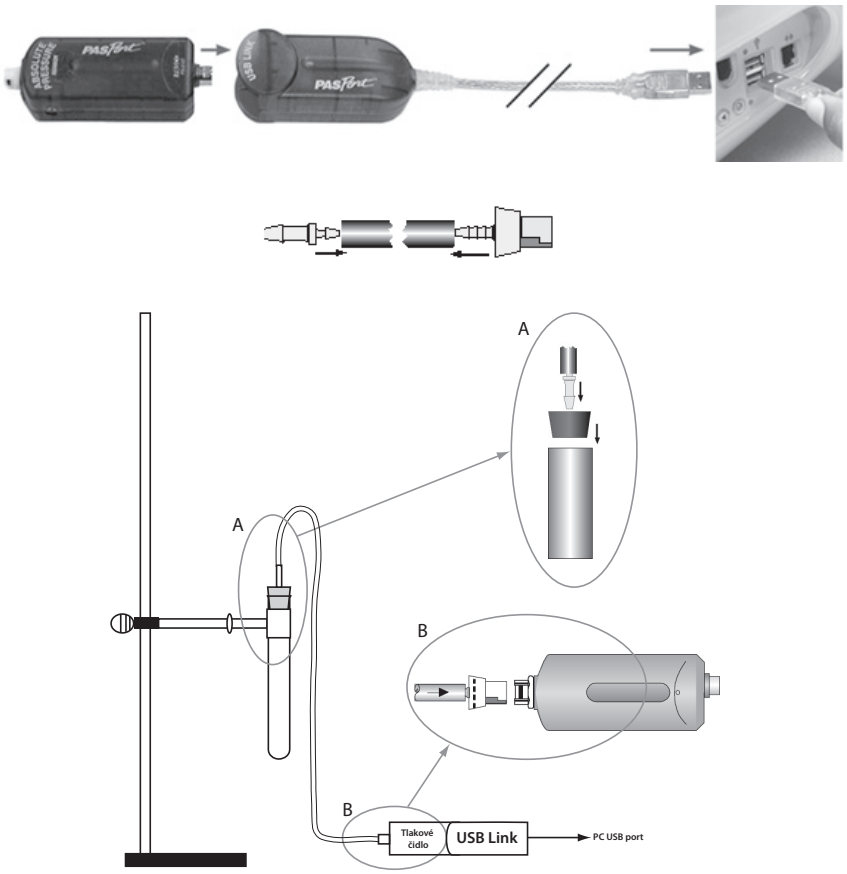
K tomu abychom rozpoznali změny stačí asi 3 minuty, ale někdy i výrazně méně. V následujících třech minutách můžeme říci několik úvodních informací o enzymech. Pak přejdeme k tomu, jaká látka je především obsažena v pečivu, když je jeho základem mouka, která má původ v obilných zrnech. Studenti odvodí, 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 spefický 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 pufry 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 započetím 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, případné 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 znají z vlastní zkušenosti (denaturace povařením, 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 znázonění 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

O enzymu katalase
http://en.wikipedia.org/wiki/Catalase

Peroxid vodíku
http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_peroxide

Pasco zdroje

Na stránkách ***www.pasco.com*** a ***www.pasco.cz*** naleznete řadu dalších zdrojů.