

# Kdy je enzymu zima a kdy teplo

## Cíle

Studium enzymové aktivity v souvislosti se změnou teploty a přítomností fluoridů.

### Podrobnější rozbor cílů

- Zpracovat biologický materiál.
- Použít odpovídající instrumentální vybavení (tlakové čidlo Pasco) ke studiu aktivity katalázy při různé teplotě.
- Analyzovat a vyvodit závěry z grafu časové změny tlaku zaznamenané v průběhu enzymatické reakce.
- Na základě experimentálního zjištění určit teplotní optimum pro katalázu.
- Posoudit vliv přítomnosti další látky na aktivitu enzymu.

## Zadání úlohy

Prostudujte, zda může být činnost enzymu ovlivněna vnějšími podmínkami. Pokuste se zjistit, jak aktivita katalázy souvisí s teplotou prostředí, ve kterém se enzym vyskytuje. Dále ověřte působení fluoridů na studovaný enzym.

## Pomůcky

počítač s USB portem a nainstalovaným SW PASCO Capstone, datalogger PASCO SPARK, popř. USBLINK nebo PASCO Xplorer GLX, PASCO tlakové čidlo s příslušenstvím (PS-2107, popř. PS-2113A), PASCO teplotní čidlo (součást dataloggeru PASCO SPARK), (PASCO pH senzor (PS-2147)), třecí miska s tloučkem, zkumavka (6×), stojánek na zkumavky, kádinka 150 ml, kádinka 1000 ml, odměrný válec 100 ml, pipety 1–5 ml, střední gumová zátka s hadičkou pro napojení tlakového čidla (+ zkumavka pro měření tlaku), laboratorní lžička, stříčka s destilovanou vodou, nůž, varná konvice, termostatická ploténka (např. součást míchadla), chemikálie ( $H_2O_2$  3% roztok, 0,2 M roztok  $NaH_2PO_4$ , 0,2 M roztok  $Na_2HPO_4$ , 0,1 M roztok NaF), biologický materiál – bramborová hlíza, popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

### Zařazení do výuky

Experiment je vhodné zařadit v rámci učiva o enzymech, enzymové kinetice nebo o problematice funkce konkrétního enzymu – katalázy (především ochrana buňky před oxidačním působením peroxidu vodíku). ZŠ: demonstrace; SŠ: lab. cvičení, demonstrace

### Časová náročnost

Dvě vyučovací hodiny (2 × 45 min).

### Návaznost experimentů

Před provedením tohoto experimentu je vhodné mít zkušenost s tlakovým čidlem – např. z úlohy č. 2 (Stechiometrie chemické reakce).

### Mezipředmětové vztahy

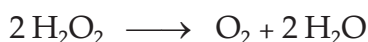
biologie (metabolismus, skladování potravin, ochrana před oxidujícími látkami)

## Teoretický úvod

V buňce je celá řada bílkovin (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 **biokatalyzátory**. Katalyzátor je látka, která ovlivňuje průběh chemické reakce, a to tak, že snižuje její počáteční aktivní energii ( $E_A$ ), a tím 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**.

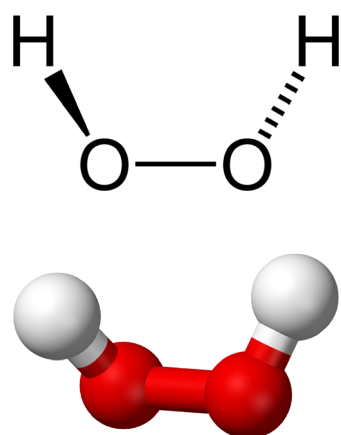
V souvislosti s problematikou enzymových reakcí musíme zavést několik základních pojmů. Látka, kterou enzym zpracovává, je označována jako **substrát**. Vznikající látka je nazývána **produkt**. Enzym je často složen z několika částí. Rozlišujeme tzv. **apoenzym**, který ke své funkci potřebuje ještě určitou nebílkovinnou část, která se nazývá **kofaktor**. Apoenzym s navázaným kofaktorem označujeme někdy jako **holoenzym**. Kofaktor je nejčastěji tzv. **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 např. ionty  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , nebo Fe-S komplexy.

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

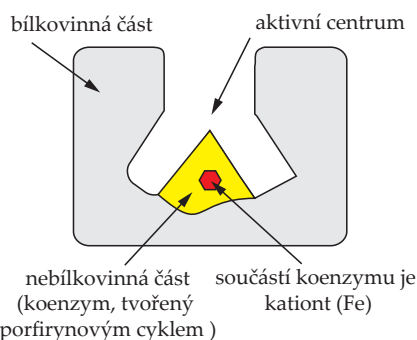


**Peroxid vodíku** vzniká při řadě metabolických reakcí (např. při fotorespiraci nebo při oxidaci mastných kyselin) a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba, aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je právě úkol pro katalázu.

Schéma **stavby katalázy** je na obrázku č. 2. Funkce enzymu coby katalyzátoru je schematicky znázorněna na obrázku č. 3 a 4.

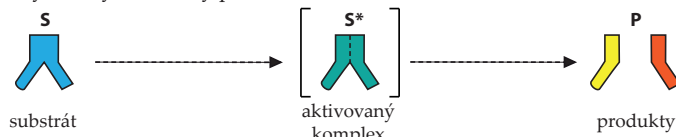


Obr. 1: Strukturní vzorec a model molekuly peroxidu vodíku

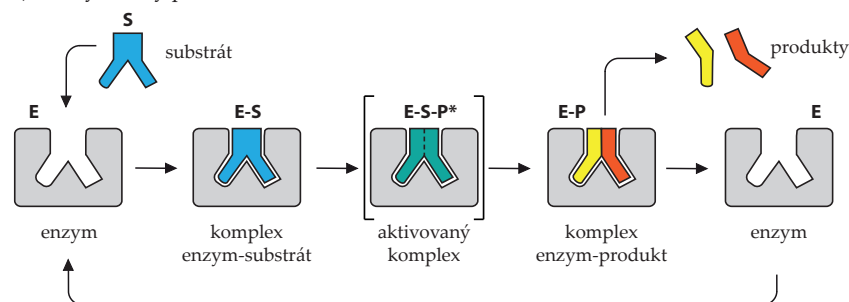


Obr. 2: Schématické znázornění enzymu katalázy

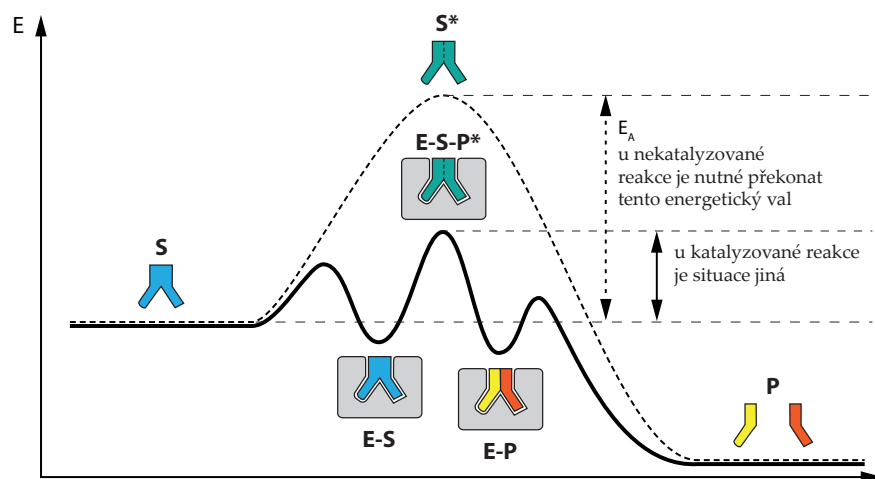
A) Nekatalyzovaný teoretický průběh reakce



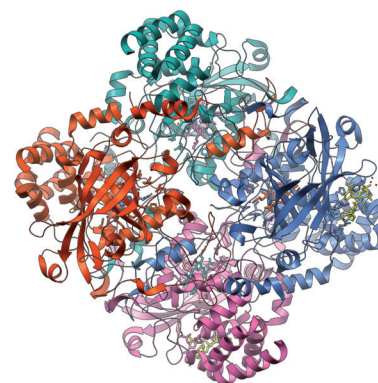
B) Katalyzovaný průběh reakce



Obr. 3: Porovnání nekatalyzovaného (A) a katalyzovaného (B) průběhu reakce štěpení substrátu.



Obr. 4: Srovnání nekatalyzované (čárkovaná křivka) a katalyzované (plná křivka) reakce z pohledu energetických změn v jejím průběhu (Křivka vyjadřující změny energie v průběhu reakce se nazývá reakční koordináta.)



Obr. 5: Model enzymu katalázy

**Kataláza** je tetramer, skládající se ze čtyř polypeptidických řetězců, přičemž každý řetězec čítá přes 500 aminokyselin. Model katalázy je na obrázku č. 5.

Většina enzymů je značně citlivá na podmínky, ve kterých se vyskytuje. **Aktivita enzymu** se tak mění s celou řadou **faktorů** (pH, teplota, přítomnost dalších látek, ...). V této úloze se zaměříme na to, jakým způsobem bude ovlivňovat aktivitu enzymu katalázy prostředí s různou teplotou. 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 dané teploty „mírou“ aktivity katalázy.

Při sledování reakce katalázy potřebujeme udržet nejen stálou teplotu, ale také stálé **pH prostředí**, ve kterém bude daná enzymová reakce probíhat. K udržení stálé hodnoty pH 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.

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

## Motivace

Na úvod si budeme demonstrovat funkci enzymů na každém studentovi. Připravíme na kostičky nakrájený chleba a rozdáme jej studentům. Každý student chléb rozžvýká a bude ho nějakou dobu v ústech přealovat. Samozřejmě 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 polysacharidu škrobu na jed-

nodušší sacharidy, které již jako sladké vnímáme. Tento enzym se nazývá **amyláza** a studenti ho jistě znají z biologie jako **ptyalin**. Úvodní část můžeme uzavřít třeba tím, že ukážeme bramborovou hlízu a zmíníme katalázu jako enzym, jehož vlastnosti budeme nyní zkoumat.

## Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

$H_2O_2$  (Xn, R 22-41, S 26-39)

NaF (T, R 23/24/25, S 26-45)

## Příprava úlohy

Podmínkou zdárného provedení tohoto experimentu je bramborová hlíza či jiný materiál, ve kterém je obsaženo dostatečné množství příslušného enzymu (katalázy).

K úspěšnému provedení je potřeba také čerstvý peroxid vodíku, který naředíme na finální 3% roztok až těsně před laboratorním cvičením.

Před cvičením je také třeba připravit 0,2 M roztoky hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného (doporučujeme připravit 1 l každého roztoku).

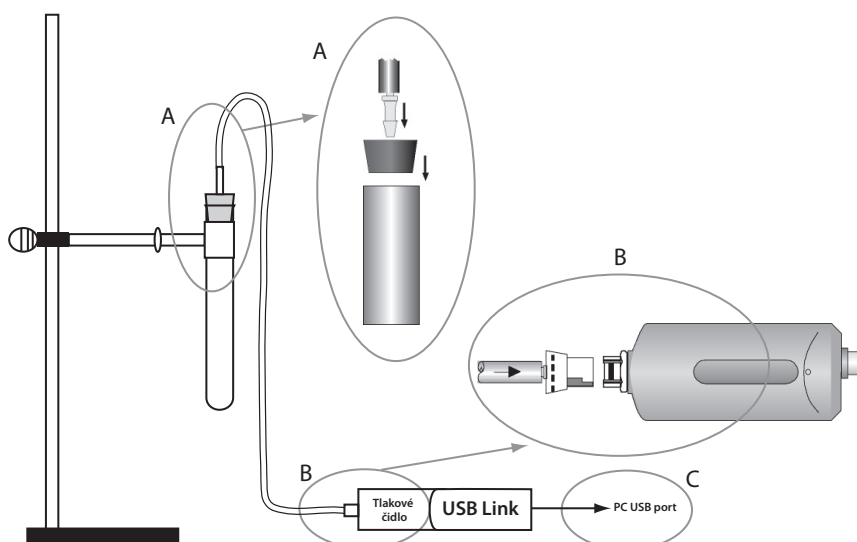
Úloha umožňuje pracovat paralelně na několika částech. Ideální jsou tříčlenné pracovní skupiny. První žák pracuje na bodu č. 1 – **sestavuje aparaturu** a dále se věnuje části „**Příprava měření**“. Druhý žák **připraví pH pufr** – bod č. 2 – a **zpracuje biologický materiál** dle bodu č. 3. Třetí žák se věnuje části „**Nastavení HW a SW**“.

### Ověření hodnoty pH pufru

V pracovním postupu je uvedena příprava pufru pH 7,1 smísením 33 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu a 67 ml hydrogenfosforečnanu. Vhodné je ověřit pH výsledného, takto připraveného, pufru s využitím pH elektrody. Část s ověřením pH není v pracovním návodu zařazena, nicméně ve vyšších ročnících mohou tuto část studenti bez problémů zvládnout.

## Postup práce

- 1) **Sestavte jednoduchou aparaturu, kterou budete k provedení experimentu potřebovat.**
  - a) Připravte si stojan s držákem na zkumavky.
  - b) Před upnutím zkumavky do držáku ji dobře zkontrolujte. Zkumavka nesmí vykazovat známky poškození (např. jemné praskliny na dně).
  - c) Připravte si gumovou zátku, kterou můžete 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 (viz obr. 6).
  - d) *Na závěr je vhodné provést test těsnosti připravené aparatury.*
- 2) **Připravte si fosfátový pH pufr**
  - a) Do 150 ml kádinky odměřte 33 ml 0,2 M roztoku  $NaH_2PO_4$  a 67 ml 0,2 M roztoku  $Na_2HPO_4$ . Tím jste si připravili pH pufr, který bude udržovat pH prostředí přibližně na hodnotě 7,1.
  - b) 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!)*
- 3) **Příprava roztoku (suspenze) obsahujícího katalázu**
  - a) Z vnitřní části bramborové hlízy odřízněte část asi o hmotnosti 4 g. Kousek rozřežte na co nejmenší kousíčky a z nich navažte asi 3 g.
  - b) Navážené malé nařezané kousky následně nasypete do čisté, pečlivě



Obr. 6: Schéma zapojení tlakového čidla

- vymyté, třecí misky.
- Do třecí misky přidejte 3 ml připraveného fosfátového pufru (pH 7,1) a doplňte 27 ml vody.
  - Poté rozetřete obsah třecí misky na jemnou řídkou kaši, kterou přelejte do větší zkumavky a nechte alespoň 5 minut odstát. Tím dojde k usazení větších kousků na dně zkumavky.
  - Horní neusazenou část použijete v dalším kroku jako vzorek, obsahující mimo jiné i studovaný enzym – katalázu.
- 4) **Připravte a ověřte vše potřebné pro realizaci měření** (viz „Nastavení HW a SW“, „Příprava měření“ a následně „Vlastní měření“).

#### Zařazení centrifugace

Pokud máte k dispozici centrifugu, můžete usazování výrazně urychlit tím, že připravený vzorek při mírných otáčkách zcentrifugujete.

### Nastavení HW a SW

- Připojte tlakové čidlo přes PASCO SPARK nebo USB link rozhraní k počítači (viz obr. 6-C).
- K dataloggeru PASCO SPARK připojte také teplotní čidlo.
- Spusťte SW PASCO Capstone.
- Na úvodní stránce vyberte rozvržení *Graph & Digits*.
- V horní levé části klikněte na *Select Measurement* a zvolte *Absolute Pressure (kPa)*.
- V horní pravé části klikněte na *Select Measurement* a zvolte *Temperature (°C)*.
- V části grafu zvolte obdobným způsobem na ose *y* *Absolute Pressure (kPa)* a na ose *x* *Time (s)*.
- Dole na ovládacím panelu (*Controls*) nastavte vzorkování dat na 5 s při volbě *Common Rate*.
- Proveďte několik testovacích měření (teplota varné ploténky, atmosférický tlak, ...). Data z těchto měření nakonec před započítáním „ostrého“ měření odstraňte.
  - V levé části *Tools* zvolte *Data Summary*. Každé z provedených měření je reprezentováno položkou s názvem *Run #číslo*.
  - Klikněte na položku, kterou chcete odstranit, např. *Run #1*. Vpravo se zobrazí ikonka ozubeného kola (*nastavení*) a za ním ikona čtveřiček s červeným křížkem. Kliknutím na červený křížek a následně potvrzením (*Yes*) dojde ke smazání provedeného měření.
- Tím jste připraveni k vlastnímu měření enzymové aktivity.



Obr. 7: Připravené pracovní místo (varianta s dataloggerem)

### Udržování stálé teploty

V průběhu měření aktivity enzymu je důležité udržet co nejstálější teplotu. Toho dosahujeme použitím co největšího objemu vody, a případně termostatem ploténky. Alternativou je např. izolace naší experimentální soustavy s využitím uzavíratelné polystyrénové krabice, nebo polystyrénového bloku s vyříznutým otvorem pro kádinku.

### Příprava měření

- 1) Experiment bude probíhat ve zkumavce ponořené ve vodní lázni. Připravte si horkou vodu ve varné konvici pro rychlou přípravu vodní lázně s požadovanou teplotou.
- 2) Vyzkoušejte také umístit svoji velkou kádinku na varnou ploténku pod připravený stojan tak, aby bylo jednoduše možné ponořit do ní měřicí zkumavku. Otestujte termostat varné ploténky.

### Vlastní měření a záznam dat

- 1) Vlastní měření aktivity katalázy proveděte v sestavené aparatuře takto
  - a) Připravte si šest zkumavek, které si označte jako 1, 2, 3, 4, 5 a 6.
  - b) Smísením horké vody z varné konvice se studenou si připravte vodní lázeň o požadované teplotě. Teplota nemusí být zcela přesná. Přehled prováděných experimentů najdete v tabulce č. 1.

Zkumavka č.	1	2	3	4	5	6
Fosfátový pufr [ml]	3	3	3	3	3	2
Vzorek z brambor. hlízy [ml]	1	1	1	1	1	1
0,1M NaF [ml]	0	0	0	0	0	1
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ml]	3	3	3	3	3	3
Teplota vodní lázně [°C] (přibližně)	15 (studená voda z kohoutku)	35	55	80	Vybrat optimální teplotu z exp. 1–4	Vybrat optimální teplotu z exp. 1–4

- c) Do měřicí zkumavky napipetujte 3 ml fosfátového pH pufru (7,1) a 1 ml připraveného vzorku s katalázou.
- d) Zkumavku vložte do vodní lázně. Do vodní lázně vložte také teploměr. Před dalším měřením nechte vše 3–5 minut odstát.
- e) Reakci zahajte přidáním 3 ml 3% roztoku peroxidu vodíku do „měřicí zkumavky“. Po přidání ještě znovu obsah zkumavky nasajte do pipety a znovu vypusťte, aby došlo k dostatečnému promíchání.
- f) Zkumavku uzavřete gumovou zátkou s napojenou hadičkou vedoucí k tlakovému čidlu.

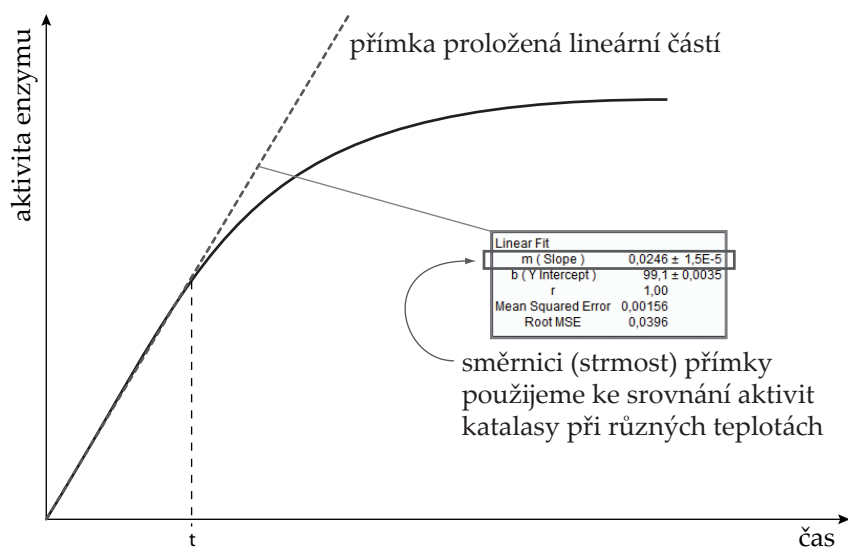
- g) Zaznamenávání dat zahajte kliknutím na tlačítko *Record* v dolní levé části aplikace *Capstone*.
- h) Pozorujte průběh reakce. Záznam změny tlaku provádějte minimálně 2 minuty. *Optimální doba záznamu je většinou 2–6 minut.*
- i) Pro ukončení měření tlaku klikněte na tlačítko *Stop*.
- j) Zreagovaný obsah zkumavky přelijte do kádinky s odpadem (zlikvidujte dle instrukcí pedagoga).
- k) Měřicí zkumavku několikrát dobře propláchněte destilovanou vodou. Vezměte zkumavku označenou číslem 2 a celý postup zopakujte pro zbývající teploty (viz tabulka v bodě 1b).
- l) Vyberte teplotu, při níž probíhala reakce nejrychleji (viz analýza naměřených dat), a experiment při této teplotě zopakujte.
  - První opakování proveďte zcela identicky jako dříve.
  - U druhého opakování pipetujte do měřicí zkumavky pouze 2 ml fosfátového pH pufru (7,1) a navíc přidejte 1 ml 0,1 M roztoku NaF.
- m) Naměřené údaje vyhodnoťte.

### Fluorid sodný

NaF je toxická látka. Upozorněte žáky na tuto skutečnost před započatím praktické práce. Určete centrální nádobu, kde se bude schraňovat odpad z provedených měření.

## Analýza naměřených dat

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



Obr. 8: Ukázka analýzy grafu s využitím výběru lineární části pro lineární regresi.

- 2) S využitím naměřených křivek **doplňte tabulku v pracovním listu.**
- 3) Pro každou křivku vyberte pomocí myši (nástroj *Select Range* z horního menu grafu) tu úvodní část, která je nejbližší lineárnímu průběhu. Následně zvolte z horního menu grafu *Fit* → *Linear* a ze zobrazeného „štitku“ parametrů si do tabulky přepište hodnotu **směrnice** (hodnota *m*).
- 4) Na základě velikosti směrnice označte v tabulce teplotu, při které probíhá reakce nejrychleji.
- 5) Porovnejte rychlost reakce bez NaF a s NaF. Pokud se hodnoty odlišují, vypočtete procentuální změnu v aktivitě v důsledku přítomnosti NaF.
- 6) Následně vynesete do grafu hodnotu směrnice proti hodnotám teploty prostředí (využijte tabulkový kalkulátor, např. MS Excel).
- 7) Své výsledky v SW *Capstone* si uložte (nabídka *File* → *Save Experiment*).

**Hodnocení výsledků**

Náš experiment můžeme rozdělit do dvou částí. První je „hledání“ teplotního optima enzymu, druhá pak ovlivnění činnosti enzymu určitou látkou. Obě dvě části jsou zastoupeny v pracovním listu ve formě tabulek i grafů. Vzhledem k tomu, že pracujeme s biologickým materiálem, mohou se výsledky jednotlivých skupin značně lišit. (Na výsledky může mít vliv stáří bramborové hlízy, doba skladování, odrůda, ...) Pokud chceme srovnávat absolutní výsledky jednotlivých skupin, je vhodné, aby všichni pracovali se stejnou bramborovou hlízou.

**Syntéza a závěr**

Na závěr je vhodné žákům shrnout:

- Jak můžeme obecně charakterizovat katalyzátor.
- Co jsou to enzymy, jak vypadají a jak pracují.
- Jakou roli hraje v buňkách kataláza.
- Jaká je hodnota zjištěného teplotního optima katalázy. Jaké hodnoty se uvádí v literatuře.
- Jaké faktory mohly při stanovení aktivity náš výsledek zkreslit.
- Jaký vliv má na katalázu NaF.

**Hodnocení práce žáků**

- Nastudovali si žáci teorii předem?
- Sestavili a použili žáci měřicí aparaturu správně?
- Postupovali žáci korektně podle pracovního návodu?
- Porozuměli žáci uvedené problematice?
- Vypracovali žáci správně své pracovní listy?
- Získali žáci předpokládané výsledky?
- Interpretovali žáci výsledky správně?
- Shrnuli žáci nové poznatky v závěru?

**Informační zdroje**

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Catalysis>
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Enzymy>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Catalase>
- VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2011, xxv, 1428, 53 p. ISBN 04-709-1745-8.