



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
- H_2O_2 (3% roztok)
- NaH_2PO_4 ($c = 0,2 \text{ mol/l}$)
- Na_2HPO_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.

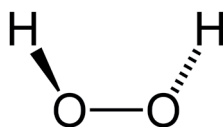
Teoretický úvod

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.

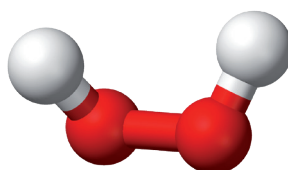
Enzym, kterým se budeme v naší úloze zabývat, se nazývá **katalasa**, a má označení EC 1.11.1.6. Základní funkcí tohoto enzymu je přeměna peroxidu vodíku na kyslík a vodu:



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.

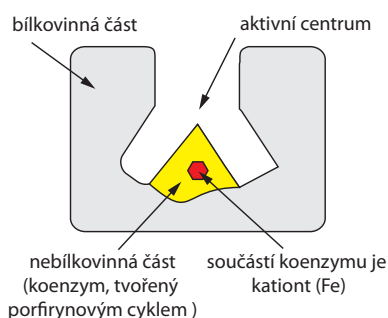


H_2O_2 – strukturní vzorec

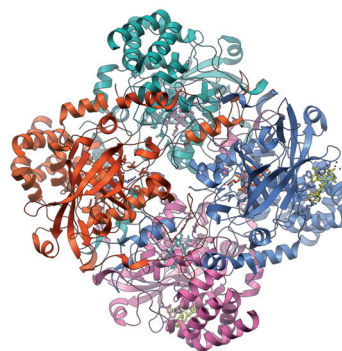


H_2O_2 – 3D model

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

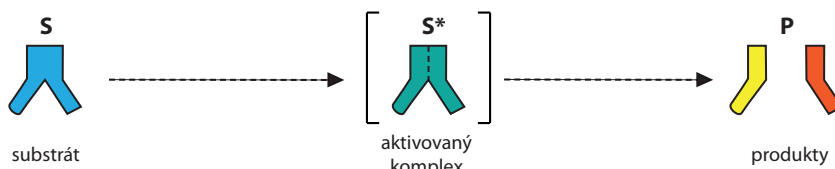


Obrázek 1:
Schéma stavby
podjednotky
enzymu katalasy



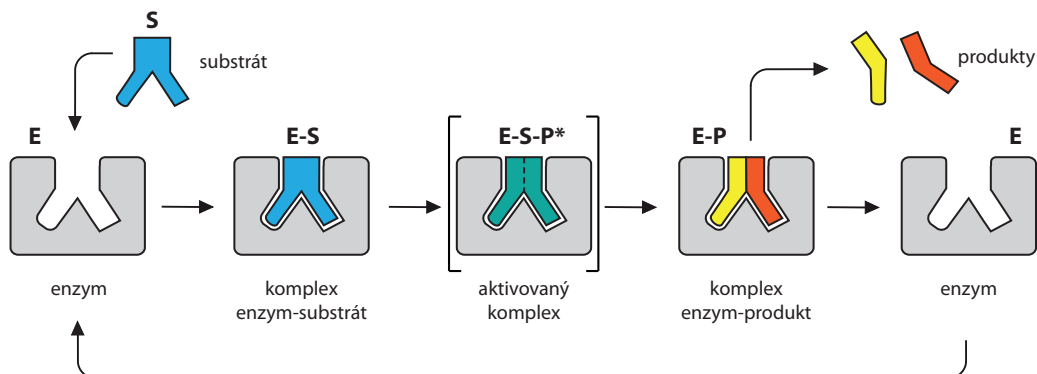
Obrázek 3:
3D model
enzymu
katalasy

Nekatalyzovaný teoretický průběh reakce

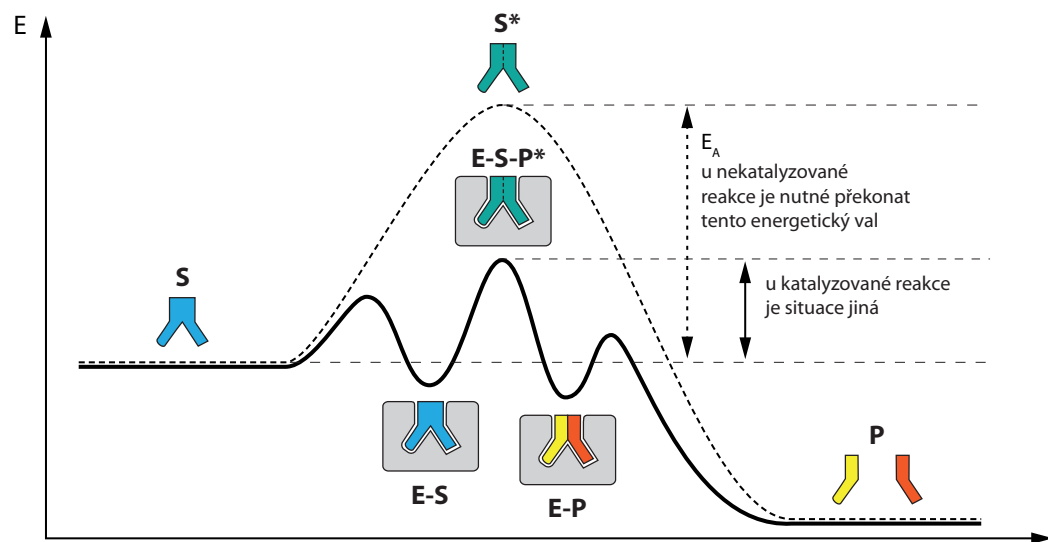


Obrázek 2a:
Schéma
nekataly-
zované
reakce

Katalyzovaný průběh reakce



Obrázek 2b:
Schéma
kataly-
zovaného
průběhu
reakce



Obrázek 2c:
Reakční
koordináta
pro nekataly-
zovanou
a kataly-
zovanou
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. 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 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

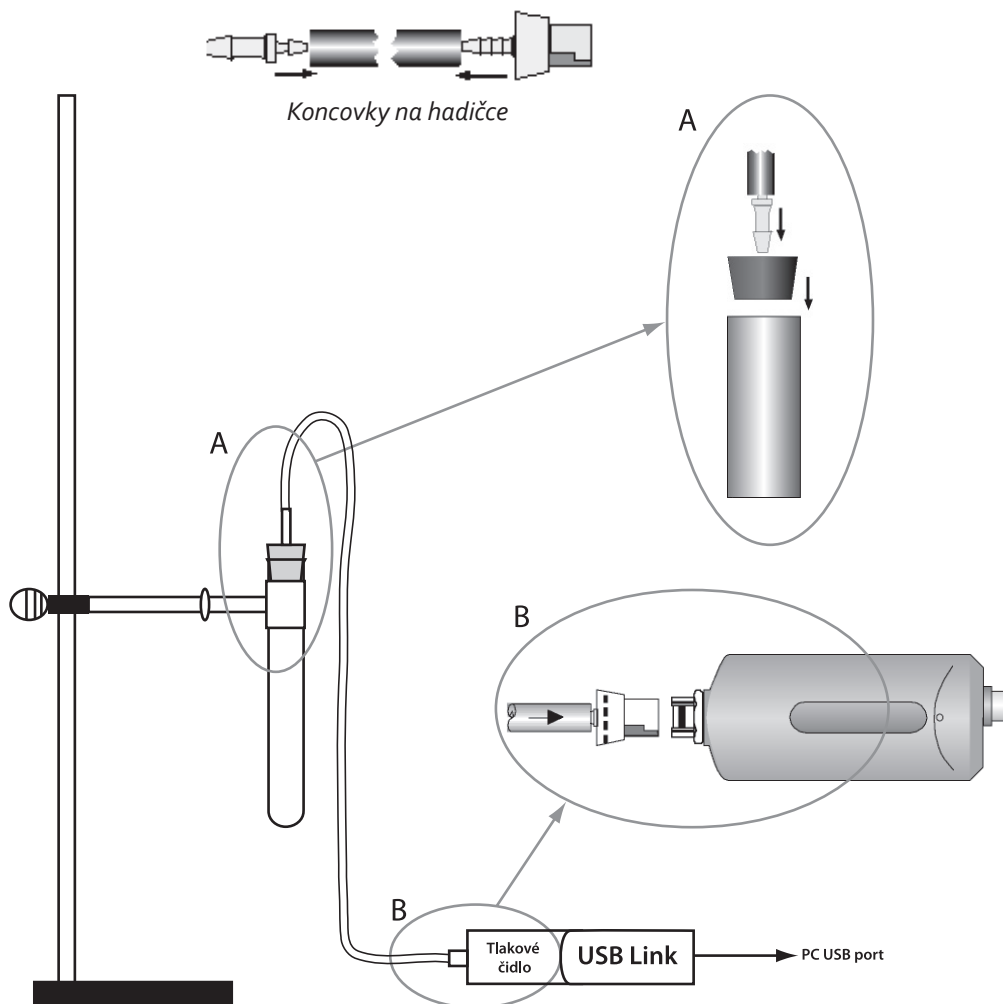
15_enzym_katalasa_pH_optimum.ds

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 uchyťme 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 NaH_2PO_4	93,5 ml	68,5 ml	33 ml	5,3 ml
Objem 0,2 M Na_2HPO_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 elektrody 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)

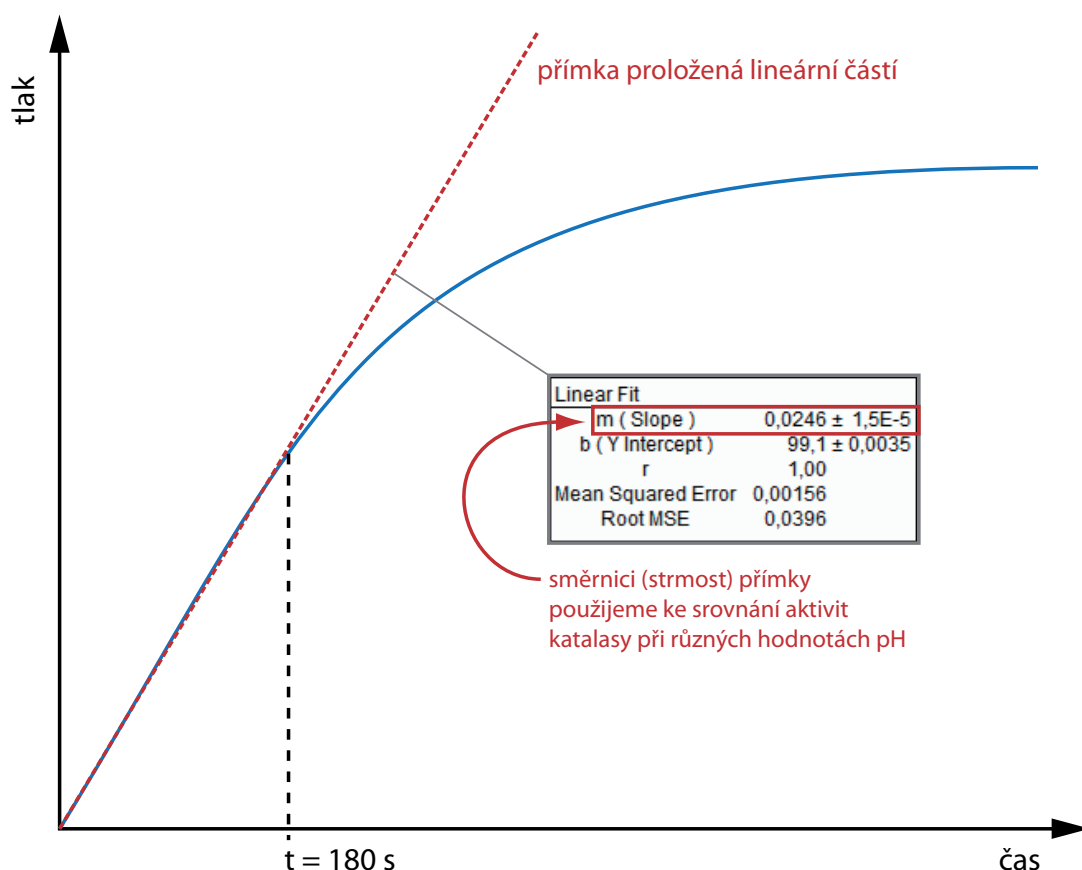
Vlastní měření aktivity katalasy provedeme v sestavené aparatuře

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 nejblíže lineárnímu průběhu. Následně zvolíme z horního menu grafu **Fit** → **Linear Fit** a ze zobrazeného „štítku“ parametrů si do tabulky přepíšeme hodnotu směrnice.

4. Na základě velikosti směrnice označte v tabulce to pH, při kterém probíhá reakce nejrychleji.
5. Následně vyneste 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.