

Chemie – úloha č. 16



Autor: Tomáš Feltl

Kdy je enzymu zima a kdy teplo

Cíle

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

Zadání úlohy

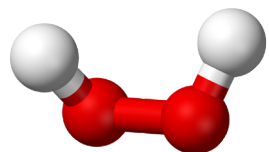
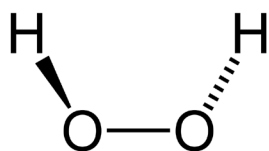
Prostudujte, zda může být činnost enzymu ovlivněna vnějšími podmínkami. Pokuste se zjistit, jak aktivita katalázy souvisí s teplotou prostředí, ve kterém se enzym vyskytuje. Dále ověřte působení fluoridů na studovaný enzym.

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

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 aktivační 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**.



Obr. 1: Strukturální vzorec a model molekuly peroxidu vodíku

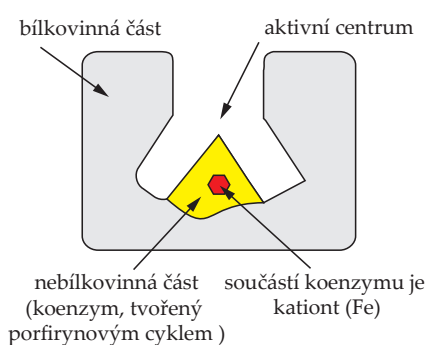
V souvislosti s problematikou enzymových reakcí musíme zavést několik základních pojmů. Látka, kterou enzym zpracovává, je označována jako **substrát**. Vznikající látka je nazývána **produkt**. Enzym je často složen z několika částí. Rozlišujeme tzv. **apoenzym**, který ke své funkci potřebuje ještě 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**

evropský
sociální
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVYOP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

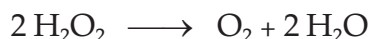
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obr. 2: Schématické znázornění enzymu katalázy

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:



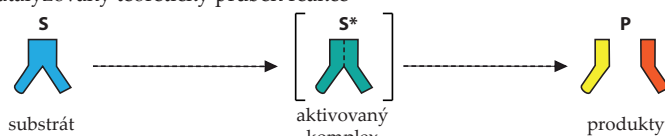
Peroxid vodíku vzniká při řadě metabolických reakcí (např. při fotorespiraci nebo při oxidaci mastných kyselin) a je pro buňku škodlivý. Proto je třeba, aby se buňka vznikajícího peroxidu vodíku zbavila, a to je právě úkol pro katalázu.

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

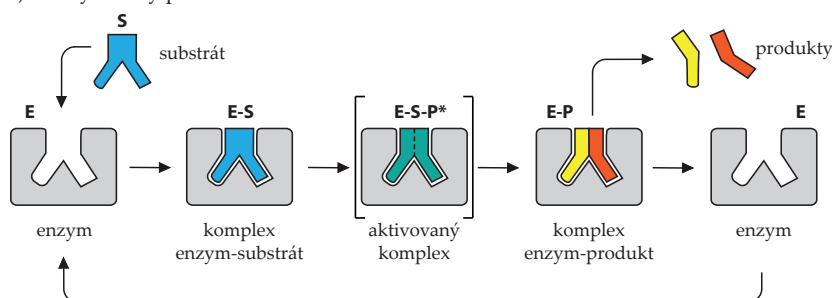
Kataláza je tetramer, skládající se ze čtyř polypeptidických řetězců, přičemž každý řetězec čítá přes 500 aminokyselin. Většina enzymů je značně citlivá na podmínky, ve kterých se vyskytuje. **Aktivita enzymu** se tak mění s celou řadou **faktorů** (pH, teplota, přítomnost dalších látek, ...). V této 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

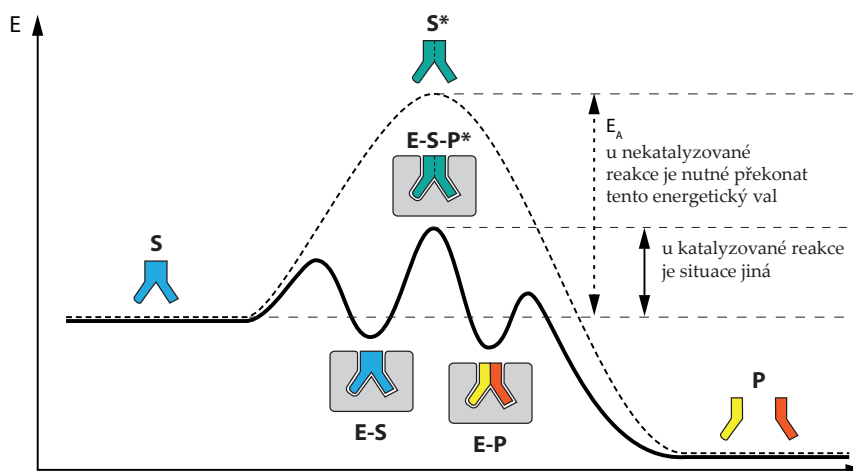
A) Nekatalyzovaný teoretický průběh reakce



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.)

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**.

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.

H₂O₂ (Xn, R 22-41, S 26-39)

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

Příprava úlohy

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**“.

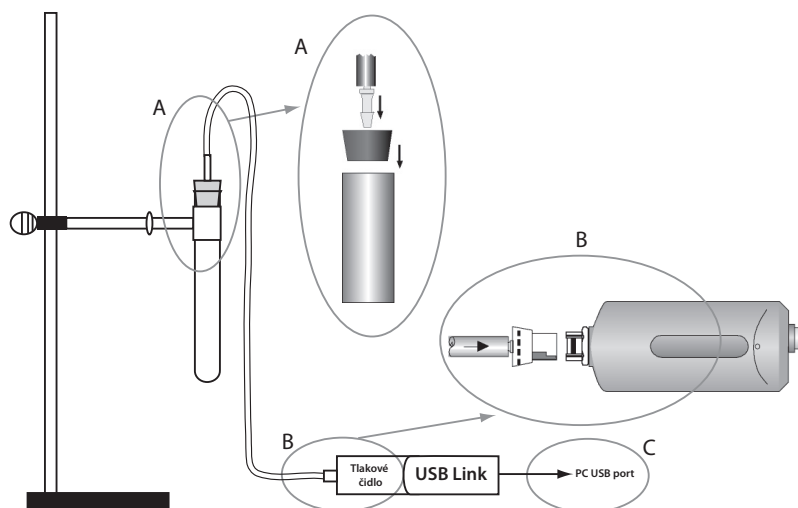
Postup práce

- 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 NaH₂PO₄ a 67 ml 0,2 M roztoku Na₂HPO₄. 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 vymyté, třecí misky.
 - c) Do třecí misky přidejte 3 ml připraveného fosfátového pufru (pH 7,1) a doplňte 27 ml vody.
 - d) 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.
 - e) 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“).

Nastavení HW a SW

- 1) Připojte tlakové čidlo přes PASCO SPARK nebo USB link rozhraní k počítači (viz obr. 5-C).
- 2) K dataloggeru PASCO SPARK připojte také teplotní čidlo.

- 3) Spusťte SW PASCO Capstone.
- 4) Na úvodní stránce vyberte rozvržení *Graph & Digits*.
- 5) V horní levé části klikněte na *Select Measurement* a zvolte *Absolute Pressure (kPa)*.
- 6) V horní pravé části klikněte na *Select Measurement* a zvolte *Temperature (°C)*.
- 7) V části grafu zvolte obdobným způsobem na ose *y Absolute Pressure (kPa)* a na ose *x Time (s)*.



Obr. 5: Schéma zapojení tlakového čidla

- 8) Dole na ovládacím panelu (*Controls*) nastavte vzorkování dat na 5 s při volbě *Common Rate*.
- 9) Proveďte několik testovacích měření (teplota varné ploténky, atmosférický tlak, ...). Data z těchto měření nakonec před započítáním „ostrého“ měření odstraňte.
 - a) V levé části *Tools* zvolte *Data Summary*. Každé z provedených měření je reprezentováno položkou s názvem *Run #číslo*.
 - b) Klikněte na položku, kterou chcete odstranit, např. *Run #1*. Vpravo se zobrazí ikonka ozubeného kola (*nastavení*) a za ním ikona čtvereček s červeným křížkem. Kliknutím na červený křížek a následně potvrzením (*Yes*) dojde ke smazání provedeného měření.
- 10) Tím jste připraveni k vlastnímu měření enzymové aktivity.

Příprava měření



Obr. 6: Připravené pracovní místo (varianta s dataloggerem)

- 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.

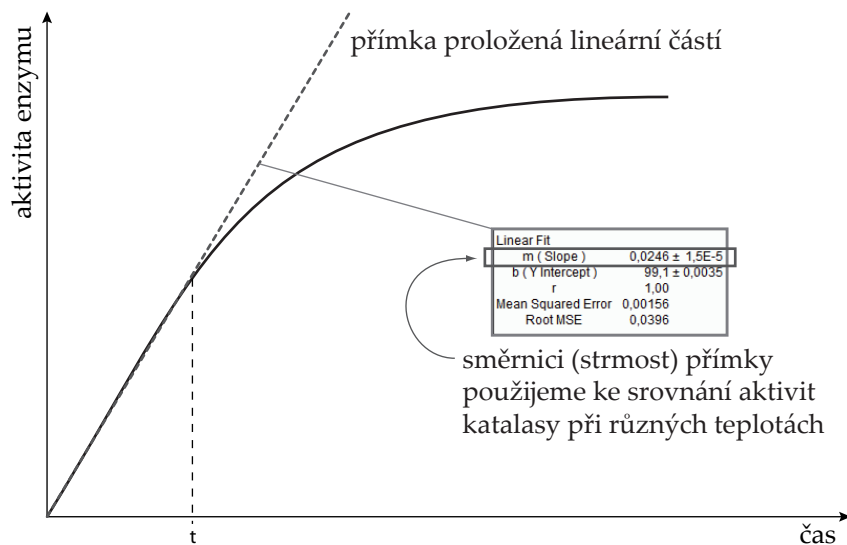
Zkumavka č.	1	2	3	4	5	6
Fosfátový pufr [ml]	3	3	3	3	3	2
Vzorek z brambor. hlízy [ml]	1	1	1	1	1	1
0,1 M NaF [ml]	0	0	0	0	0	1
3% H ₂ O ₂ [ml]	3	3	3	3	3	3
Teplota vodní lázně [°C] (přibližně)	15 (studená voda z kohoutku)	35	55	80	Vybrat optimální teplotu z exp. 1–4	Vybrat optimální teplotu z exp. 1–4

- 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 vedenou 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.
 - o První opakování provedte zcela identicky jako dříve.
 - o 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.

Analýza naměřených dat

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



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

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.