ENCIMI – eksperiment

Vaja: VODIKOV PEROKSID, ANORGANSKI KATALIZATORJI IN KATALAZA

Vodikov peroksid je snov, ki nastaja kot stranski produkt biokemijskih reakcij v živih celicah. Ker je strupen ga mora celica čim prej razgraditi. Pri razkroju sodelujeta dva encima: PEROKSIDAZA in KATALAZA. Katalazo najdemo v različnih rastlinskih in živalskih tkivih. Veliko jo je v korenu redkivice, repe, gomoljih krompirja in celicah jeter. Aktivnost katalaze merimo s spremljanjem količine sproščenega kisika pri razgradnji vodikovega peroksida.

Katalazo do kisika in vode lahko razkrojimo na več načinov: s segrevanjem, anorganskimi katalizatorji in encimi.

*Napiši, kemijsko enačbo razgradnje vodikovega peroksida in jo uredi.*

*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_*

1. **ANORGANSKI KATALIZATORJI**

Pri vaji boš uporabil/a različne anorganske snovi in iz rezultatov določil-/a, katera je najboljši katalizator. Potek reakcije boš ocenil-/a po naslednjem postopku.

0 = ni reakcije (ne opaziš nobene spremembe v epruveti z vodikovim peroksidom)

1 = počasna reakcija (izhajajo mehurčki, tvori se do 3 cm pene)

2 = zmerna reakcija (pena sega do polovice epruvete)

3 = hitra reakcija (pena sega do vrha epruvete)

4 = zelo hitra reakcija (ena izhaja iz epruvete)

PRIPOMOČKI

* 8 epruvet
* vodikov peroksid
* kremenČev pesek
* MnO2
* Fe2 O3
* CuO
* PbO2
* Al2O3
* ZnO
* 8 majhnih žličk

Nalij raztopino H2O2  v dve epruveti približno do višine 2 cm (5 ml). V eno epruveto dodaj malo drobnega peska, v drugo pa približno enako količino manganovega dioksida, v tretjo Fe2 O3,  in tako preizkusi še ostale anorganske spojine. Pazi, da ne boš prenašal-/a manganovega dioksida in kremenčevega peska z isto žličko in ostalih snovi z isto žličko.

REZULTATI

|  |  |
| --- | --- |
| Anorganska spojina | Hitrost reakcije |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Za razgradnjo vodikovega peroksida, bi izbral/a naslednji katalizator: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.

2. VPLIV KONCENTRACIJE SUBSTRATA NA HITROST ENCIMSKE REAKCIJE (delamo skupinsko)

Pri stalni koncentraciji encima hitrost encimske reakcije narašča z večanjem koncentracije substrata – do neke točke. Pri nizkih koncentracijah niso zasedena vsa aktivna mesta na prisotnih molekulah encima, ker ni dovolj molekul substrata, da bi jih zasedla. Ko povečamo koncentracijo substrata, je uporabljenih več in več aktivnih encimskih mest. Pri določeni koncentraciji so porabljena vsa encimska mesta in hitrost reakcije, se kljub dodanim molekulam substrata ne bo več povečevala.

MATERIAL

* suspenzija kvasovk (1 paket suhega kvasa/ 250 ml vode)
* različne koncentracije vodikovega peroksida (npr. 1 %, 3 %, 5 %, 10 %)
* injekcijske brizgalke
* epruvete z gumijastimi zamaški, stojalo za epruvete
* štoparica

POSTOPEK

V epruvete odmerimo 3 ml vodikovega peroksida določene koncentracije. Zamašimo z gumijastim zamaškom, v katerega zabodemo injekcijsko iglo. S pomočjo zgornjega dela injekcijske igle odmerimo 5 ml suspenzije kvasovk. Kvasovke iztisnemo v epruveto skozi nastavek igle. Bat injekcijske brizgalke se začne zaradi nastalega plinskega produkta hitro dvigovati. S pomočjo štoparice izmerimo čas določenega volumna plina (npr. - 10 ml). Izvedemo ustrezno št. ponovitev.

Postopek ponovimo z ostalimi koncentracijami.

REZULTATI

Nariši in označi tabelo in vanjo vnesi pridobljene rezultate.

VPRAŠANJA

1. Določi odvisno in neodvisno spremenljivko v tem eksperimentu.
2. Zakaj smo v poskusu uporabili suspenzijo kvasovk?
3. Razloži, zakaj je bila pri višjih koncentracijah vodikovega peroksida reakcija hitrejša?
4. Kakšne rezultate pričakujemo, če bi poskus ponovili s prekuhanimi kvasovkami?
5. Navedi vsaj eno idejo, ki bi eksperiment izboljšala.
6. DELOVANJE KATALAZE IZ JETR IN KROMPIRJA
7. ***. 1. Učinek encima***

V dve čisti epruveti nalij enaki količini (5 ml) H2O2, (to je približno 2 cm višine v epruveti). V eno dodaj za riževo zrno velik košček jeter, v drugo pa enako velik košček krompirja. Košček jeter drži v epruveti s pomočjo paličice, dokler reakcija ne poteče.

* 1. ***Ponovna uporaba encima***

Tekočino iz epruvete z jetri iz prejšnjega poskusa razdeli v 2 čisti epruveti. Tudi jetra razdelite na dva dela in dajte v vsako epruveto 1 košček. V prvo epruveto dodajte še svež košček jeter, v drugo pa dolijte še 1 ml svežega H2O2 .

***3.3 Vpliv velikosti delcev na delovanje encima***

Dajte nekaj koščkov jeter v velikosti riževih zrn v eno in nekaj enako velikih koščkov krompirja v drugo epruveto. V obe epruveti vsujte malo peska in ves material previdno zmečkajte s stekleno paličico. Nato dodajte še po dva ml H2O2.

***3.4 Vpliv temperature na delovanje encimov***

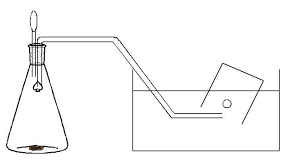
Nekaj zmečkanih jeter na dnu epruvete postavi za 5 minut v vrelo vodo. Potem dodajte kuhanim jetrom približno 1 ml svežega H2O2.  Vzemi 2 epruveti in daj v vsako 1 ml H2O2. Eno epruveto postavi za 5 minut v toplo vodno kopel (37 °C), drugo pa v ledeno. Potem vzemite obe epruveti iz njunih vodnih kopeli in v vsako dodajte košček jeter.

***3.5 Vpliv pH na delovanje encima***

V vsako izmed treh čistih epruvet dajte majhen košček jeter in malo peska ter vse skupaj zmečkaj s stekleno paličico. V prvo epruveto dodajte 2 ml destilirane vode, v drugo 2 ml natrijevega hidroksida in v tretjo 2 ml klorovodikove kisline. Zapišite si pH vsake epruvete. V vsako epruveto vlijte še 2 ml H2O2.

* 1. ***Produkti reakcije***

Plitvo posodo napolni z vodo do treh četrtin. Napolni z vodo še dve večji epruveti in ju obrni v plitvo posodo – ustje epruvet mora biti pod vodno gladino. Prosti konec cevi, ki je obrnjen na zamašek, vtakni pod vodo v ustje epruvete. V terilnici zmečkaj približno 1 cm3 jeter z enako količino drobnega peska. Mešanico daj v 250 ml erlenmajerico in dolij 100 ml vodikovega peroksida. Po petih sekundah zamaši erlenmajerico z zamaškom, na katerega je pritrjena cevka. Zberi dve epruveti plina. Ko je prva epruveta polna, prestavite cevko v ustje druge.



Slika 5: Shema eksperimenta (http://www.dijaski.net/gradivo/bio\_vaj\_delovanje\_enostavnih\_katalizatorjev\_48?r=1)

1. **.7 Dokazovanje produktov reakcije**

Vzemite prvo epruveto s plinom in jo obrnite z ustjem navzdol. K ustju približajte gorečo vžigalico. Drugo epruveto s plinom obrnite z ustjem navzgor. V ustje vtaknite talečo trsko.

**REZULTATI**

***1. Učinek encima***

1.1 Zapišite snovi v epruveti 1 in 2 ter ocenite in zapišite hitrost reakcije v preglednico.

Preglednica 1: Rezultati vaje 3.1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epruveta | Dodane snovi | Hitrost reakcije |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |

***2. Ponovna uporaba encima***

2.1 Zapiši snovi v epruveti 1 in 2 ter ocenite in zapišite hitrost reakcije v preglednico.

Preglednica 2: Rezultati vaje 3.2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epruveta | Dodane snovi | Hitrost reakcije |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |

***3. Vpliv velikosti delcev na delovanje encima***

3.1 Zapišite snovi v epruveti 1 in 2 ter ocenite in zapišite hitrost reakcije v preglednico.

Preglednica 3: Rezultati vaje 3.3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epruveta | Dodane snovi | Hitrost reakcije |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |

***4.Vpliv temperature na delovanje encimov***

4.1 Zapiši snovi v epruveti 1 in 2 ter ocenite in zapišite hitrost reakcije v preglednico.

Preglednica 4: Rezultati vaje 3.4

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epruveta | Dodane snovi | Hitrost reakcije |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |

***5. Vpliv pH na delovanje encimov***

5.1 Zapišite snovi v epruveti 1 in 2 ter ocenite in zapišite hitrost reakcije v preglednico.

Preglednica 5: Rezultati vaje 3.5

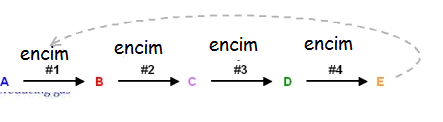
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Epruveta | Dodane snovi | Hitrost reakcije |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |

**VPRAŠANJA**

1. Od kod izhaja encim katalaza, ki si ga uporabil-/a v vaji?
2. Katera snov se je spremenila pri reakciji med H2O2  in jetri: H2O2, jetra ali obe? Odgovori s pomočjo ugotovitev pri postopku 3.
3. Pojasni vpliv okoljskih dejavnikov (pH medija, temperature) na delovanje katalaze.
4. Kako sta povezana velikost koščkov jeter in krompirja ter hitrost razgradnje vodikovega peroksida?
5. Katera snov ostane v erlenamajerici po končani reakciji, če odstranimo jetra in pesek?
6. Na osnovi produktov reakcije pojasni vlogo katalaze v celicah krompirja, jeter, kvasovk pri odstranjevanju strupenega vodikovega peroksida.
7. Na osnovi eksperimentov, ki si jih izvedel/a oblikuj pet sklepov o delovanju encimov.

Delovanje encimov je v celici natančno regulirano. Po prebranem besedilu v učbeniku Biologija celica in genetika na str. 104 in 105 reši spodnji nalogi.

1. V celici so encimi povezani v zaporeja encimskih reakcij, ki jih imenujemo tudi presnovne ali metabolne poti. Produkt ene reakcije je substrat za naslednjo reakcijo. Eno takšnih presnovnih poti predstavlja tudi spodnja shema.



Slika 6: Zaporedje encimskih reakcij (http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture26/Lecture26.htm)

Razloži, kdaj bosta delovala encima 1 in encim 2.