

# N-trophy<sup>4</sup>

## Řešení chemie

Tým JuTeJa

Gymnázium, Brno, Vídeňská 47

Tereza Kadlecová; berunda.kadlecova@seznam.cz

Julie Přikrylová; jul.ca@centrum.cz

Jan Horáček; jan.horacek@seznam.cz

14. února 2014

## 1 Úvod

[1] Kataláza je enzym vyskytující se například v některých běžně dostupných potravinách či krvi, který mj. katalyzuje reakci přeměny peroxidu vodíku na kyslík a vodu (1).



## 2 Důkaz kyslíku

Z reakce 1 vystupuje kyslík  $O_2$  jako její plynný produkt. V praxi lze při nadbytku substrátu pozorovat uvolňující se bublinky z látky obsahující enzym, které stoupají směrem ke hladině, kde se uvolní.

Důkaz kyslíku provedeme za pomoci vědomosti o jeho účincích. Kyslík je nezbytnou složkou rychlé oxidace - hoření, kde vystupuje jako oxidační činidlo a reaguje s pálenou látkou za vzniku plamene (tedy velkého množství tepla a světla). Principem experimentu je tedy pozorování hoření, resp. intenzity produkovaného světla. Pokud se plamen pozorovatelně zvětší oproti hoření v běžné atmosféře, je kolem plamene vyšší koncentrace kyslíku, což by dokázalo, že reakce opravdu probíhá tak, jak jsme ji teoretiky popsali.

Do Erlenmeyerovy baňky jsme vložili cca 50ml 40% peroxidu vodíku a 5 g brambory. Okamžitě jsme pozorovali bublinky stoupající ke hladině. Na vzduchu jsme si zapálili špejli, po několika vteřinách jsme ji sfoukli a ještě doutnající jsme ji vložili nad hladinu do baňky. Špejle začala opět hořet. To je jasným důkazem přítomnosti kyslíku jako produktu reakce 1.

## 3 Stanovení látky s nejvyšší koncentrací katalázy

Při stanovování koncentrace (resp. jejich poměrů v různých látkách) jsme vycházeli z toho, že látka obsahující enzym slouží jako katalyzátor. Pokud tedy necháme reakci probíhat např. 1 minutu a pak změříme objem vyprodukovaných plynů během této minuty, dokážeme

tím stanovit relativní koncentrace katalázy v jednotlivých látkách. Měříme tedy vlastně rychlost reakce: čím větší rychlost, tím větší koncentrace katalyzátoru (katalázy) ve vstupní látce.

Jako potenciální látky s vysokou koncentrací katalázy jsme zvolili bramboru, kiwi a kvasnice.

Prvním nápadem pro velmi hrubé stanovení koncentrací byl jednoduchý balónek připevněný na Erlenmeyerovu baňku. Do balónku jsme nalili vždy stejný objem 40%  $H_2O_2$ , do baňky konstantní množství látky, u které chceme zjistit koncentraci, balónek jsme připevnili na baňku tak, aby se do ní peroxid ještě nevylił a po důkladném připevnění jsme obě látky smíchali. Tuto reakci jsme provedli se všemi třemi látkami. Kvasinky z ní vyšly nejlépe - balónek se sice nafoukl opravdu hodně, ale zato za mnohem kratší čas, než 1 minuta. Proto jsme museli přistoupit ke kvantitativnějšímu řešení problému.



Obrázek 1: Experiment s balónkem

Rozhodli jsme se jímát objem plynů reakce do odměrného válce ponořeného ve vaničce obsahující kohoutkovou vodu. Celou aparaturu přehledně znázorňuje obrázek 2.

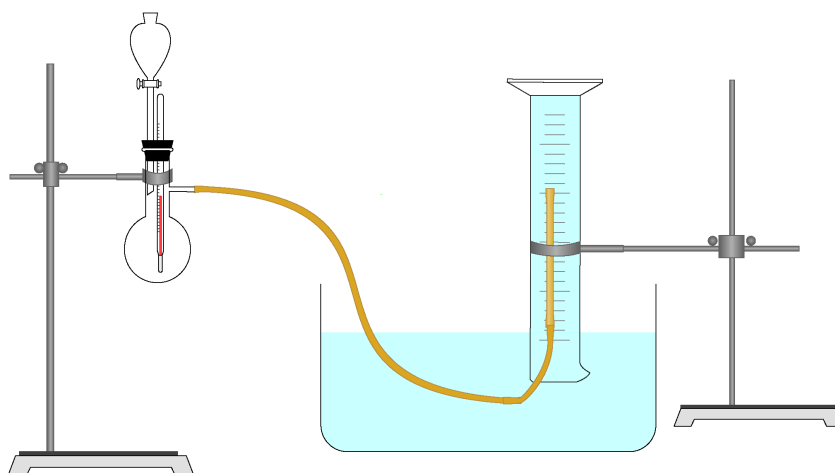
Do frakční baňky jsme vložili 1 g analyzované látky a do dělicí nálevky jsme si připravili 20 ml 5 %  $H_2O_2$ . Problém této aparatury tkví v tom, že po vytečení veškerého peroxidu do baňky má soustava snahu nasát vzuch do válce z okolní atmosféry přes otevřený ventil dělicí nálevky a tím vyrovnat rozdíl hladin ve válci a ve vaničce. Tomu je zapotřebí zabránit. My jsme to dělali tak, že jsme uzávěr zavřeli ihned po vylití veškerého peroxidu a začali měřit od rysky, na které v tomto momentě byla hladina vody. Resp. jsme vždy na stopkách počítali čas potřebný k produkci např. 50 ml plynu. Válec měl kapacitu 250 ml s první ryskou na 50 ml.

Teorie říká, že rychlost reakce je závislá také na  $pH$ . Potřebovali jsme sjednotit  $pH$  všech látek, u kterých určujeme koncentraci enzymu, protože např. kiwi má poměrně odlišné  $pH$  od brambory. K tomu jsme použili fosfátový pufr. Namíchali jsme si ho z  $K_2HPO_4$  a  $KH_2PO_4$  podle Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice [2].

$$pH = pK + \log_{10} \left( \frac{c_{K_2HPO_4}}{c_{KH_2PO_4}} \right) \quad (2)$$

Stanovili jsme si požadovaný objem pufru, vypočetli poměr množství dvou složek pufru a podle molární hmotnosti stanovili jejich gramáž. Pak už jsme jen vyrobili pufr.

Do experimentu vstupovalo vždy 20 ml pufru s  $pH$  7, 20 ml 5 %  $H_2O_2$  a 1 g analyzované látky.



Obrázek 2: Aparatura na jímání plynů

Po chvíli se ukázalo, že jediná látka s výsledky pozorovatelnými v rozumném čase jsou kvasnice. Kiwi a brambora obsahovaly tak málo enzymu, že jsme sice viděli bublinky kyslíku, ale objem produktů byl pod měřitelnost odměrným válcem v rozumném čase. Látkou s nejvyšší koncentrací katalázy jsou tedy kvasnice.

Pro úplnost přikládáme naměřená data v tabulce 1.

## 4 Parametry reakce

[3] Teorie enzymatické kinetiky říká, že vliv na rychlost reakce má její teplota a pH.

### 4.1 Teplota

Se zvyšující teplotou roste rychlost reakce podle přirozeného pravidla, které říká, že objekty s větší teplotou mají větší energii, rychleji se pohybují a snáze reagují. To dokazují například námi naměřená data 2. Teorie říká, že s klesající teplotou by měla rychlost reakce klesat, to jsme ale neověřovali, protože jsme neměli vhodné laboratorní vybavení na nízké teploty.

Experimentálně jsme zjistili, že po překročení teploty zhruba  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  reakce vůbec neprobíhá. To je proto, že zhruba kolem této teploty dochází k denaturaci bílkovin. To je v podstatě změna jejich konformace, která má za následek nefunkčnost katalázy jako katalyzátoru přeměny  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ .

Troufli bychom si tedy říci, že teplota kolem  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  je teplotou, při které reakce probíhá nejrychleji (nejlepší reakční podmínky).

Měření 1

Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5%
Typ látky obsahující enzym	kvasinky
Hmotnost látky obsahující enzym	1.00 g
Objem pufru	20 ml
Objem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml
Teplota reakce	22.5 °C
pH pufru	7.00

Příprava pufru pH = 7	
Hmotnost K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> v pufru	1.44 g
Hmotnost KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v pufru	0.54 g
Objem pufru	400 ml
M <sub>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</sub>	228.23 g/mol
M <sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub>	136.09 g/mol
pK	6.8
Koncentrace K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.016 mol/dm <sup>3</sup>
Koncentrace KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.010 mol/dm <sup>3</sup>
pH pufru	7.00

Čas od předchozího měření [s]	Objem plynu [ml]	Rychlost reakce [ml/s]
0	75.00	#HODNOTA!
29	100.00	0.86
54	150.00	0.93
66	200.00	0.76

Tabulka 1: Kvasinky při pH = 7

## 4.2 pH

Každý enzym má pH, při kterém reaguje optimálně. My jsme si vyrobili stejný pufr, ale s jiným poměrem složek tak, abychom vytvořili mírně zásadité a mírně kyselé prostředí (konkrétně pH 6 a 8). V těchto pufrech jsme prováděli stejnou reakci. Data 3 a 4 dokazují, že rychlost reakce v obou směrech klesá.

Enzym jako takový se skládá z aminokyselin, z nichž některé obsahují bazické a jiné zase kyselé skupiny. Jejich stupeň disociace závisí na pH. Stupeň disociace pak ovlivní konformaci enzymu, která může a nemusí být výhodná pro naši reakci.

Ideální pH pro naši reakci je tedy zhruba 7.

## Poděkování

- Gymnázium Vídeňská za přístup k laboratorům.
- RNDr. Olze Langerové, naší chemikářce, za asistenci v laboratorích.
- Tomáši Fialovi za konzultace.

## Reference

- [1] [www.studiumchemie.cz](http://www.studiumchemie.cz) *Databáze chemických pokusů: Katalasa v bramborě*  
<http://www.studiumchemie.cz/pokus.php?id=74>

První výsledek googlu pro klíčová slova "brambora peroxid vodíku". Takto jsme zjistili, že jde o katalázu.

## Měření 6

Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5%
Typ látky obsahující enzym	kvasinky
Hmotnost látky obsahující enzym	1.00 g
Objem pufru	20 ml
Objem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml
Teplota reakce	62 °C
pH pufru	7.00

po zahřátí jsme počkali 2 minuty

Příprava pufru pH = 7	
Hmotnost K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> v pufru	1.44 g
Hmotnost KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v pufru	0.54 g
Objem pufru	400 ml
M <sub>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</sub>	228.23 g/mol
M <sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub>	136.09 g/mol
pK	6.8
Koncentrace K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.016 mol/dm <sup>3</sup>
Koncentrace KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.010 mol/dm <sup>3</sup>
pH pufru	7.00

Čas od předchozího měření [s]	Objem plynu [ml]	Rychlost reakce [ml/s]
0.0	50.00	#HODNOTA!
6.5	100.00	7.69
5.5	150.00	9.09
6.0	200.00	8.33
6.0	250.00	8.33

Tabulka 2: Kvasinky při 62 °C

- [2] Wikipedia *Henderson–Hasselbalch equation*  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Henderson%E2%80%93Hasselbalch\\_equation](http://en.wikipedia.org/wiki/Henderson%E2%80%93Hasselbalch_equation)
- [3] Wikipedia *Enzyme: Kinetics*  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme#Kinetics>

## Měření 8

Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5%
Typ látky obsahující enzym	kvasinky
Hmotnost látky obsahující enzym	1.00 g
Objem pufru	20 ml
Objem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml
Teplota reakce	26 °C
pH pufru	8.00

po zahřátí jsme počkali 2 minuty

Čas od předchozího měření [s]	Objem plynu [ml]	Rychlost reakce [ml/s]
0.0	50.00	#HODNOTA!
170.0	75.00	0.15
325.0	100.00	0.08

Příprava pufru pH = 8	
Hmotnost K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> v pufru	3.617 g
Hmotnost KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v pufru	0.136 g
Objem pufru	400 ml
M <sub>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</sub>	228.23 g/mol
M <sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub>	136.09 g/mol
pK	6.8
Koncentrace K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.040 mol/dm <sup>3</sup>
Koncentrace KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.002 mol/dm <sup>3</sup>
pH pufru	8.00

Tabulka 3: Kvasinky při pH = 8

## Měření 9

Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5%
Typ látky obsahující enzym	kvasinky
Hmotnost látky obsahující enzym	1.00 g
Objem pufru	20 ml
Objem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml
Teplota reakce	26 °C
pH pufru	5.98

po zahřátí jsme počkali 2 minuty

Čas od předchozího měření [s]	Objem plynu [ml]	Rychlost reakce [ml/s]
0.0	50.00	#HODNOTA!
63.0	75.00	0.40
52.0	100.00	0.48
48.0	125.00	0.52
55.0	150.00	0.45
62.0	175.00	0.40
84.0	200.00	0.30

Příprava pufru pH = 6	
Hmotnost K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> v pufru	0.46 g
Hmotnost KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v pufru	1.81 g
Objem pufru	400 ml
M <sub>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</sub>	228.23 g/mol
M <sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub>	136.09 g/mol
pK	6.8
Koncentrace K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.005 mol/dm <sup>3</sup>
Koncentrace KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.033 mol/dm <sup>3</sup>
pH pufru	5.98

Tabulka 4: Kvasinky při pH = 6