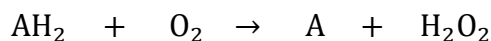
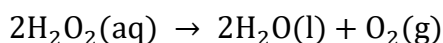


Katalase

De fleste levende organismer skaffer sig energi ved at bruge oxygen til at forbrænde organisk stof. Det meste O_2 omdannes direkte til H_2O , men en lille del af oxygenforbruget bliver til H_2O_2 (hydrogenperoxid). Det sker ved processer af følgende type:



Da hydrogenperoxid er en cellegift, er det vigtigt for cellen, at den har nogle enzymer, som hurtigt omdanner H_2O_2 til uskadelige stoffer. Mange celler indeholder enzymet katalase, som katalyserer en simpel spaltning af hydrogenperoxid:

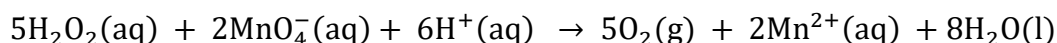


Man kan udvinde katalase af f.eks. gær, kartofler, selleri, peberrod, lever og blod. Vi udvinder katalase af gær.

Hydrogenperoxid er **substrat** for **enzymet** katalase. Øvelsen består af en række forsøg, hvor man måler på den enzymkatalyserede proces ved:

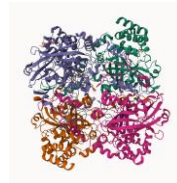
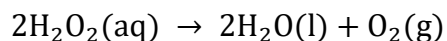
- forskellige substratkoncentrationer
- forskellige pH-værdier
- forskellige temperaturer

I de forsøg som udføres, følger man forløbet den enzymkatalyserede reaktionen der spalter hydrogenperoxid ved at udtage prøver af reaktionsblandinger til forskellige tidspunkter. Reaktionen standses ved at tilsætte syre til den udtagne prøve, hvorefter hydrogenperoxidkoncentrationen bestemmes ved en redoxtitrering (sur opløsning) med $0,0200 \text{ M KMnO}_4$:



Øvelsen starter med, at enzymet udvindes af gær. Denne del er udført af underviseren inden forsøget.

Et af forsøgene kræver en finvægt, og kan derfor desværre ikke udføres af eleverne på Falkonergården. Her følger man forløbet af reaktionen ved at placere en kolben med reaktionsblandingen på en vægt. Man måler tabet i masse i takt med at der dannes $\text{O}_2(\text{g})$.



Fremstilling og gæropløsning

Bland 1 g gærpulver med 200 mL vand i en blue cap-flaske. Omryst meget grundigt. Væsken er uklar, men skal ikke filtreres. Skriv "Omrystes før brug" på flasken. Man skal nemlig omryste flasken, hver gang man skal bruge af den.

Forsøg A. Substratkoncentrationens betydning.

Klargør en burette med 0,0200 M KMnO_4 . Husk at nulstille buretten og tøm spidsen for luft.

Desuden skal man bruge følgende:

- et antal 100 mL og 250 mL koniske kolber og bægerglas
- måleglas til H_2O_2 -opløsningen, pufferopløsningen og svovlsyreopløsningen
- et stopur
- en flaske med 2 M H_2SO_4
- en 10 mL automatpipette (eller fuldpipette) og en 25 mL fuldpipette

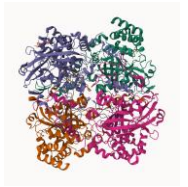
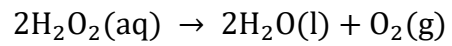
Der anvendes følgende reaktionsblanding:

- 170 mL 0,2% H_2O_2
 - 20 mL pufferopløsning, pH = 7
 - 10,0 mL enzymsuspension fra blue cap-flasken. Husk at ryste flasken inden brug!
1. Bland først 170 mL 0,2% H_2O_2 og 20 mL pufferopløsning i en 250 mL kolbe.
 2. Derefter startes reaktionen ved at tilsætte 10 mL af enzymsuspensionen med pipette.
 3. Omryst grundigt og overfør 25,0 mL af reaktionsblandingen til en anden kolbe (100 mL og evt. må et bægerglas bruges). Samtidig med at et stopur startes, standses reaktionen i den udtagne prøve ved tilsætning af ca. 25 mL 2 M H_2SO_4 . Dette er tiden $t = 0$ minutter.

På samme måde standses reaktionen i udtagne prøver til de tidspunkter, som står i skemaet nedenfor. Lidt før det angivne tidspunkt overføres 25,0 mL af reaktionsblandingen til en ren kolbe, så syretilsætningen kan ske på præcis det angivne tidspunkt. **Noter i alle tilfælde det præcise tidspunkt, hvor syretilsætningen finder sted.**

Efter syretilsætningen titreres med 0,0200 M KMnO_4 til ækvivalenspunktet. Titreringen er færdig, når en enkelt dråbe fremkalder en svag rødfarvning i hele opløsningen. Farven skal holde sig i mindst 10 sekunder. Noter resultatet i skemaet.

t	Titration Volumen 0,0200 M KMnO_4 (mL)	$[\text{H}_2\text{O}_2]$	$\ln[\text{H}_2\text{O}_2]$
0 min.			
3 min.			
6 min.			
9 min.			
12 min.			



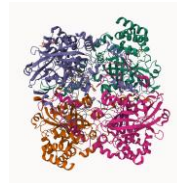
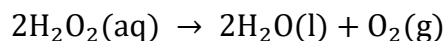
Efterbehandling

Anvend titreringsresultaterne til beregning af substratkoncentrationen, dvs. $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

Enzymkoncentrationen er konstant under forsøget. Reaktionshastigheden aftager, fordi substratkoncentrationen bliver mindre. Der er tale om relativt små substratkoncentrationer, og vi skal derfor forvente, at reaktionshastigheden er proportional med substratkoncentrationen:

$$v = k \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]$$

- Afbild $\ln[\text{H}_2\text{O}_2]$ som funktion af t . Følger reaktionen det anførte hastighedsudtryk?
- Aflæs hastighedskonstanten på grafen, og beregn halveringstiden.



Forsøg B. Betydning af pH.

Målingerne fordeles, så hvert hold kun gennemfører et eller to af forsøgene.

Der benyttes samme udstyr som tidligere, men bemærk, at der skal bruges en 5 mL fuldpipette, hvis man ikke bruger en automatpipette.

Der udføres forsøg med reaktionsblandinger, der har følgende sammensætning:

- 85 mL 0,2% H_2O_2
- 10 mL pufferopløsning ("pH-regulerende opløsning")
- 5,0 mL enzymsuspension

Der laves 6 forsøg, hvor der som pufferopløsning bruges:

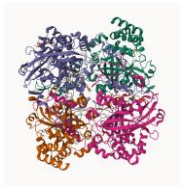
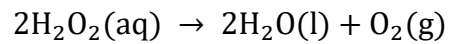
1. 0,1 M HCl
2. puffer, pH = 4
3. puffer, pH = 6
4. puffer, pH = 8
5. puffer, pH = 10
6. 0,1 M NaOH

Herved får man målingerne spredt ud på pH-skalaen. I hvert af forsøgene måles reaktionsblandingen nøjagtige pH-værdi med et pH-meter.

Forsørgsgangen svarer til forsøg A, men der skal kun udtages prøver to gange.

- Bland 0,2% H_2O_2 med den relevante pufferopløsning. Tilsæt enzymet og ryst blandingen, hvorefter der straks udtages 25 mL. Reaktionen standses ved syretilsætning (ca. 25 mL 2 M H_2SO_4) til den udtagne prøve, og samtidig startes stopuret.
- Et par minutter efter udtages en ny prøve på 25 mL, og der tilsættes syre, lige når uret passerer 3 minutter.
- De to prøver titreres med 0,0200 M KMnO_4 som tidligere.
- Denne prøve er ikke den, der er brugt ved titreringen. Mål reaktionsblandingen pH med et pH-meter. Anvend et 50 mL bægerglas eller et centrifugerør til målingen.

pH	Titration 1 – 0 min. Volumen 0,0200 M KMnO_4 (mL)	Titration 2 – 3 min. Volumen 0,0200 M KMnO_4 (mL)	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ved 0 min.	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ved 3 min.	k



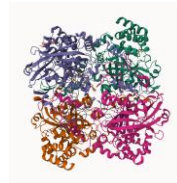
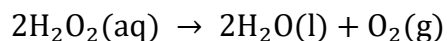
Efterbehandling

Bestem $[\text{H}_2\text{O}_2]$ til de to tidspunkter.

I forsøg A viste vi, at reaktionen ved lave substratkoncentrationer er af første orden. Det betyder at den følger ligningen

$$\ln[\text{H}_2\text{O}_2] = -k \cdot t + \ln[\text{H}_2\text{O}_2]_0$$

- Beregn hastighedskonstanter ved de forskellige pH-værdier ved at indsætte de målte koncentrationer i denne ligning.
- Afbild de fundne værdier af hastighedskonstanten som funktion af pH. Kommenter grafens form, og angiv det omtrentlige pH-optimum for katalase.
- Er det rimeligt at formode, at vi kan standse reaktionen ved at tilsætte ca. 25 mL 2 M H_2SO_4 til de udtagne prøver?
Hvorfor afhænger et enzyms effektivitet af pH?



Forsøg C. Temperaturenens betydning.

Målingerne fordeles, så hvert hold kun gennemfører et eller to af forsøgene.

Bemærk at skemaet til denne øvelse er på side 7.

Der benyttes samme udstyr som tidligere. Ved opvarmning og nedkøling benyttes der varmeplader og isbade.

Der skal måles ved følgende temperaturer:

Ca. 5 °C, ca. 15 °C, stuetemperatur, ca. 27 °C, ca. 33 °C, ca. 40 °C, ca. 50 °C, ca. 60 °C og ca. 80 °C.

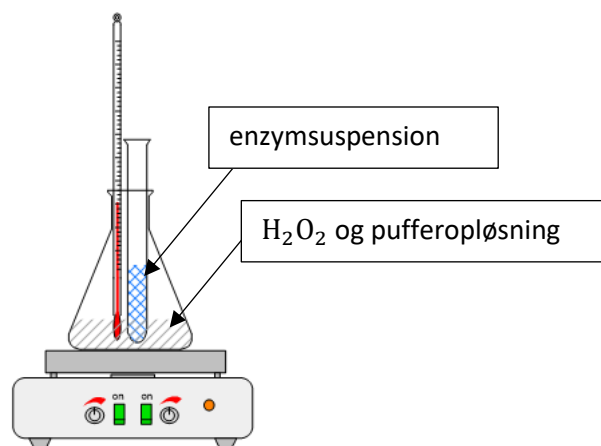
Reaktionsblandingsens nøjagtige temperatur aflæses under forsøget. Alle forsøgene udføres ved pH=7. Der anvendes følgende reaktionsblanding:

- 170 mL 0,2% H₂O₂
- 20 mL pufferopløsning, pH=7
- 10,0 mL enzymsuspension

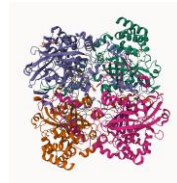
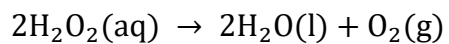
Opstilling til opvarmning af enzymsuspensionen og substratopløsningen inden reaktionen.

Man kan evt. benyttes en bunsenbrænder i stedet for en varmeplade.

En lignende opstilling benyttes ved nedkøling.



- Bland først 0,2% H₂O₂ og pufferopløsningen i en 250 mL konisk kolbe. 10 mL enzymsuspension overføres med pipette til et rent reagensglas (det skal også være rent på ydersiden). Placer reagensglasset med enzymsuspensionen ned i kolben, som derefter opvarmes eller nedkøles til den ønskede temperatur.
- Stands opvarmningen, så snart den pågældende temperatur er nået, og placer kolben på bordet. Tag reagensglasset op, og ryst det kortvarigt for at modvirke, at enzymsuspensionen bundfældes i reagensglasset. Ved nedkøling kan man hele tiden beholde opløsningerne i vandbadet, som er justeret så godt som muligt.
- Hæld derefter enzymsuspensionen ned i kolben. Efter grundig omrystning udtages en prøve på 25,0 mL. Så snart pipetten er tømt, standses reaktionen i den udtagne prøve ved syretilsætning (ca. 25 mL 2 M H₂SO₄).
- Samtidig startes uret. Efter 2,5 minutter måles reaktionsblandingsens temperatur. Kort før uret står på 5 minutter, udtages igen 25,0 mL. Tilsæt syre til den udtagne prøve præcis når uret passerer 5 minutter. Titrer de to udtagne prøver med 0,0200 M KMnO₄.



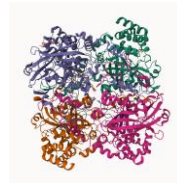
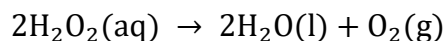
Temp.	Titration 1 – 0 min. Volume 0,0200 M KMnO ₄ (mL)	Titration 2 – 5 min. Volume 0,0200 M KMnO ₄ (mL)	[H ₂ O ₂] 0 min.	[H ₂ O ₂] 5 min.	<i>k</i>

Efterbehandling

Beregningerne udføres som i forsøg C. Tegn en graf der viser hvordan hastighedskonstanten afhænger af temperaturen. Forklar grafens forløb.

Ved de høje temperaturer er hastighedskonstanten ikke en "ægte" konstant. Forudsætningen for at reaktionen er af første orden, er nemlig, at enzymkoncentrationen er konstant. Det er den ikke ved høj temperatur, da enzymet denaturerer under forsøget.

Ved lav temperatur (formentlig under 35°C) skal man forvente at hastighedskonstanten følger Arrhenius' ligning. Det skulle altså være muligt at bestemme aktiveringsenergien ved et Arrhenius-plot. Desværre er det ikke så nemt at få så gode resultater, at aktiveringsenergien kan bestemmes med rimelig nøjagtighed.



Forsøg D. "Ret store" substratkoncentrationer.

Forsøgene beskrives men udføres ikke. Data udleveres. Til de to forsøg bruges følgende:

	<u>Forsøg 1</u>	<u>Forsøg 2</u>
4% H_2O_2	170 mL	85 mL
Vand	0 mL	85 mL
puffer, pH=7	20 mL	20 mL
Enzymsuspension	10,0 mL	10,0 mL

I forsøg 1 anvendes dobbelt så stor substratkoncentration som i forsøg 2. Vi skal følge reaktionens forløb ved at følge reaktionsblandingsens masse. Den aftager, fordi det dannede oxygen forlader systemet. Der anvendes en elektronisk vægt, som helst skal kunne måle massen med 0,001 grams nøjagtighed. Den skal være afskærmet mod træk.

Bland de angivne volumener af 4% H_2O_2 , vand (kun forsøg 2) og puffer i en 250 mL kolbe.

Reaktionen startes ved at tilsætte 10,0 mL enzym-suspension. Blandingen omrystes grundigt. Den skal have lov at stå et par minutter for at sikre, at opløsningen mættes med oxygen.

Derefter sættes kolben op på vægten, som nulstilles. Samtidig med nulstillingen startes et stopur.

Aflæs vægten hvert minut i 4 minutter.

t	Forsøg 1	Forsøg 2
0 min.	0,000 g	0,000 g
1 min.		
2 min.		
3 min.		
4 min.		

Efterbehandling

I forsøg 1 er substratkoncentrationen dobbelt så stor som i forsøg 2. Er reaktionshastigheden dobbelt så stor i forsøg 1 som i forsøg 2?

Hvordan kan man forklare dette resultat? Hvad skal vi forvente der sker med reaktionshastigheden, hvis vi anvender endnu større substratkoncentrationer?

Man kunne frygte at enzymet hurtigt ville ødelægges af de ret store hydrogenperoxidkoncentrationer. Tyder måleresultaterne på, at der sker en mærkbar ødelæggelse af enzymet i de 4 minutter, målingerne varer?

Beregn massen af den mængde oxygen, der dannes, hvis reaktionen i forsøg 1 får lov at løbe helt til ende.