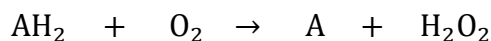
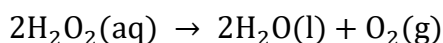


## Katalase

De fleste levende organismer skaffer sig energi ved at bruge oxygen til at forbrænde organisk stof. Det meste  $\text{O}_2$  omdannes direkte til  $\text{H}_2\text{O}$ , men en lille del af oxygenforbruget bliver til  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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  $\text{H}_2\text{O}_2$  til uskadelige stoffer. Mange celler indeholder enzymet katalase, som katalyserer en simpel spaltning af hydrogenperoxid:

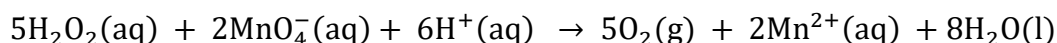


Man kan udvinde katalase af f.eks. gær, kartofler, selleri, peberrod, lever og blod. Vi udvinder katalase af gær.

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

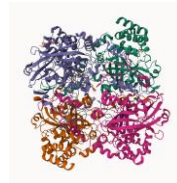
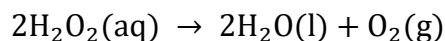
I de forsøg som udføres, følger man forløbet den enzymkatalyserede reaktionen der spalter hydrogenperoxid ved at udtage prøver af reaktionsblandinger til forskellige tidspunkter. Reaktionen standses ved at tilsætte syre til den udtagne prøve, hvorefter hydrogenperoxidkoncentrationen bestemmes ved en 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  $\text{O}_2(\text{g})$ .

**Før man fortsætter, skal man læse om sikkerhed og kemikalieaffald på side 9.**



## Fremstilling og gæropløsning – opløsningen kan deles mellem grupper

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.

Der skal benyttes en standardopstilling til titreranalyse med burette og magnetomrører. Klargør en burette med 0,0200 M  $\text{KMnO}_4$ . Husk at nulstille buretten og tøm spidsen for luft.

Desuden skal man bruge følgende:

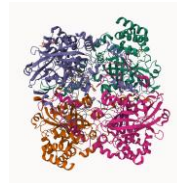
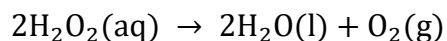
- fem 100 mL koniske kolber og en 250 mL koniske kolbe (alternativt bruges bægerglas).
- Måleglas bruges til  $\text{H}_2\text{O}_2$ -opløsningen, pufferopløsningen og svovlsyreopløsningen
- et stopur
- en flaske med 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (aq) (svovlsyre)
- en 10 mL fuldpipette og en 25 mL fuldpipette, pipettebold

Der anvendes følgende reaktionsblanding:

- 170 mL 0,2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (aq)
  - 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%  $\text{H}_2\text{O}_2$  og 20 mL pufferopløsning i en 250 mL kolbe.
  2. Derefter startes reaktionen ved at tilsætte 10,0 mL af enzymsuspensionen med pipette.
  3. Bland opløsningen ved at svinge kolben forsigtigt. Overfør med fuldpipette 25,0 mL af reaktionsblandingen til en 100 mL konisk kolbe. Samtidig med at stopuret startes, standses reaktionen i den udtagne prøve ved tilsætning af ca. 25 mL 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Dette er tiden  $t = 0$  minutter.

På helt samme måde udtages og standses 25,0 mL fra reaktionsblandingen i 250 mL kolben til de tidspunkter, som står i skemaet nedenfor. Lidt før det angivne tidspunkt overføres 25,0 mL af reaktionsblandingen til en ren 100 mL konisk kolbe, så tilsætningen af 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kan ske på præcis det angivne tidspunkt. **Noter det præcise tidspunkt, hvor syretilsætningen finder sted.** Efter tilsætningen af 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  titreres analyseopløsningerne hver gang med 0,0200 M  $\text{KMnO}_4$  som titrervæske til ækvivalenspunktet. Husk en magnet i den koniske kolbe. 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. (De grå felter er til senere beregninger.)

$t$	Titration Volumen 0,0200 M $\text{KMnO}_4$ (mL)	$[\text{H}_2\text{O}_2]$
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. Vi forventer, at reaktionshastigheden er proportional med substratkoncentrationen.

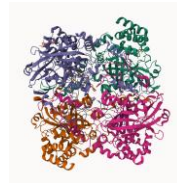
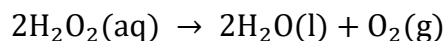
$$v = k \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]$$

Da er der tale om en reaktion af 1. orden. Nedbrydningen af hydrogenperoxid kan i det tilfælde beskrives ved den eksponentielle udvikling givet ved:

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-kt}$$

Her betegner  $c(t)$  den aktuelle stofmængdekonzentration af  $\text{H}_2\text{O}_2$ , altså  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ , til tidspunktet  $t$  (målt efter starten af reaktionen),  $c_0$  betegner  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  i tiden  $t = 0$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ , og  $k$  er hastighedskonstanten.

- Benyt resultaterne fra titreranalyserne til at bestemme  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  til hvert af de fem tidspunkter. (Den grå kolonne i tabellen.)
- Afbild  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  som funktion af  $t$  og udfør eksponentiel regression. Argumenter for om reaktionen følger det anførte hastighedsudtryk.
- Bestem hastighedskonstanten med enhed og beregn halveringstiden.
- Afbild  $\ln([\text{H}_2\text{O}_2])$  som funktion af  $t$  og kommenter på punktplottets udseende. Benyt punktplottet til at afgøre, om reaktionen følger det anførte hastighedsudtryk og bestem hastighedskonstanten.
- Er det rimeligt at formode, at vi kan standse reaktionen ved at tilsætte ca. 25 mL 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  til de udtagne prøver?



## 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.

Der udføres forsøg med reaktionsblandinger, der har følgende sammensætning:

- 85 mL 0,2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (aq)
- 10 mL pufferopløsning ("pH-regulerende opløsning")
- 5,0 mL enzymsuspension

Der laves 6 forsøg, hvor der som pufferopløsning bruges:

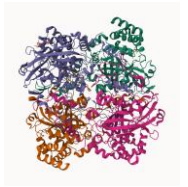
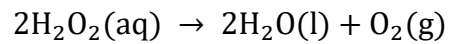
1. 0,1 M HCl
2. puffer, pH = 4
3. puffer, pH = 6
4. puffer, pH = 8
5. puffer, pH = 10
6. 0,1 M NaOH

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

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

- Bland 0,2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  med den relevante pufferopløsning. Tilsæt 5,0 mL af enzymsuspensionen og sving kolben for god blanding. Udtag straks 25,0 mL. Reaktionen standses ved syretilsætning (ca. 25 mL 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) til den udtagne prøve, og samtidig startes stopuret.
- Et par minutter efter udtages en ny prøve på 25,0 mL, og der tilsættes syre, lige når uret passerer 3 minutter.
- De to prøver titreres med 0,0200 M  $\text{KMnO}_4$  som tidligere.
- Nedenstående prøve er ikke den, der er brugt ved titreringen:  
Mål *reaktionsblandingsens* pH med et pH-meter. Anvend et 50 mL bægerglas eller et centrifugerør til målingen.

pH	Titration 1, 0 min. Volumen 0,0200 M $\text{KMnO}_4$ (mL)	Titration 2, 3 min. Volumen 0,0200 M $\text{KMnO}_4$ (mL)	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ved 0 min.	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ved 3 min.	$k$



## Efterbehandling

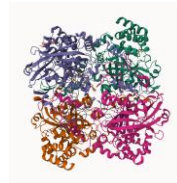
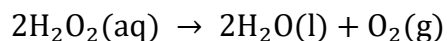
Bestem  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  til de to tidspunkter.

I forsøg A viste vi, at reaktionen ved lave substratkoncentrationer er af første orden. Det betyder at den følger ligningen beskrevet tidligere (se side 3):

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-kt}$$

Bestem hastighedskonstanter ved de forskellige pH-værdier ved at indsætte de målte koncentrationer i ovenstående ligning og ved derefter at løse ligningen.

- Afbild de fundne værdier af hastighedskonstanter 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  til de udtagne prøver?
- Forklar, hvorfor et enzyms effektivitet afhænger af pH.



## Forsøg C. Temperaturens 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.

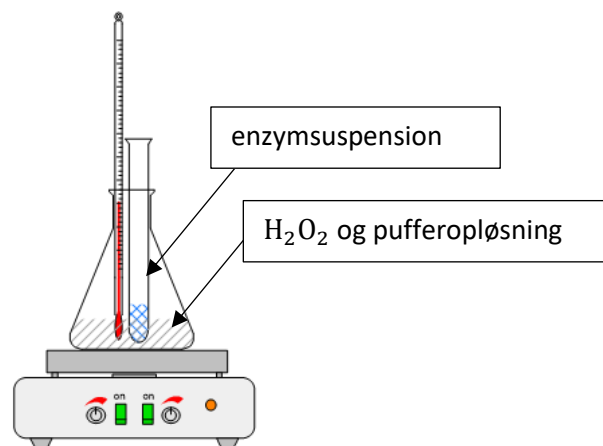
Reaktionsblandingsens nøjagtige temperatur aflæses under forsøget. Alle forsøgene udføres ved pH=7. Der anvendes følgende reaktionsblanding:

- 170 mL 0,2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 20 mL pufferopløsning, pH=7
- 10,0 mL enzymsuspension

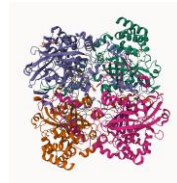
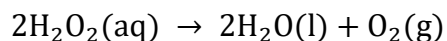
Opstilling til opvarmning af enzymsuspensionen og substratopløsningen inden reaktionen.

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

En lignende opstilling benyttes ved nedkøling.



- Bland først 0,2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og pufferopløsningen i en 250 mL konisk kolbe. 10,0 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 blanding 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- 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 KMnO<sub>4</sub>. Mål igen temperaturen i reaktionsblandingen.



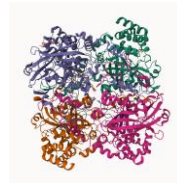
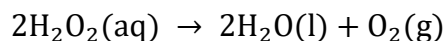
Temp.	Titring 1, 0 min. Volumen 0,0200 M KMnO <sub>4</sub> (mL)	Titring 2, 5 min. Volumen 0,0200 M KMnO <sub>4</sub> (mL)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] 0 min.	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] 5 min.	k

## Efterbehandling

- Beregningerne udføres som i forsøg C.
- Tegn en graf der viser, hvordan hastighedskonstanten afhænger af temperaturen. Forklar grafens forløb.
- Kommenter på forsøgets design, og kom med forslag til, hvordan man kan forbedre forsøget.
- 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.

## Generelle spørgsmål om katalase

- Forklar om aminosyrer og proteinets primære, sekundære, tertiære og kvaternære struktur. Brug en PDB-fil og vis udsnit af strukturer.
- Forklar, hvad der menes med et enzyms aktive center.
- Brug en PDB-fil til at vise et aktivt center i katalase.
  - Forklar om det aktive centers rolle i forbindelse med de udførte forsøg.



### 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% $\text{H}_2\text{O}_2$	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%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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.

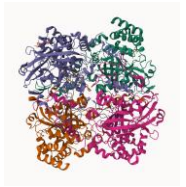
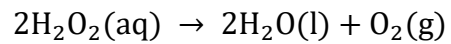
Derefter sættes kolben op på vægten, som nulstilles. Samtidig med nulstillingen startes et stopur.

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.



### SIKKERHED

Der bæres kittel og briller ved alle forsøg.

### RISICI

- 0,0200 M kaliumpermanganat giver brune pletter på huden og på tøj.
- 2 M svovlsyre er ætsende.

### AFFALD

- Overskydende  $\text{KMnO}_4$  fra buretten opsamles i en fælles beholder.
- Opløsningen efter titreranalysen hældes i vasken og der skylles efter med vand.
- Gærblandingen hældes i vasken.

### RENGØRING

- Underviseren rengør fuldpipetterne. Men efterlader dem på bordet ved det sted, man udførte eksperimentet.
- Man lader buretten stå i stativet. Den skylles igennem to gange med demineraliseret vand.
- Alt andet glasudstyr skylles med vand fra vandhanen og placeres i den korrekte opvaskekasse.