

| TÉMA | ENZÝMY |
|-------------------|---|
| Úloha 26: | Stanovenie aktivity katalázy. |
| Princíp: | <p><i>Kataláza (EC 1.11.1.6) je všeobecne rozšírený enzým, ktorý katalyzuje rozklad peroxidu vodíka podľa rovnice:</i></p> $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ <p><i>Kataláza je tetramér, t.j. skladá sa zo štyroch polypeptidových reťazcov, pričom každý z nich obsahuje jeden hem ($M_r = 240\,000$ g/mol). Peroxid vodíka, ktorý môže vznikáť v organizme pri pôsobení niektorých flavínových dehydrogenáz, je nebezpečný pre bunkové štruktúry a kataláza pôsobí ako "detoxikačný enzým". Samotný enzým sa rozkladá nadbytkom substrátu. Preto sa stanovenie aktivity katalázy robí pri 0 °C, aby sa zabránilo jej rýchlemu rozkladu.</i></p> <p><i>Číslo premeny (angl. turnover number) tohto enzýmu je jedno z najvyšších vôbec; udáva sa hodnota 5×10^5 s⁻¹. Aktivita katalázy sa vyjadruje prostredníctvom rýchlosti monomolekulovej reakcie rozkladu peroxidu vodíka. Pretože sa rýchlosť reakcie pre rozklad enzýmu substrátom rýchlo mení, stanoví sa závislosť rýchlostnej konštanty reakcie prvého poriadku a extrapoluje sa na čas $t = 0$ min. Získaná hodnota rýchlostnej konštanty vynásobená koncentráciou peroxidu vodíka v čase $t = 0$ min predstavuje počiatočnú rýchlosť reakcie. Priebeh reakcie sa sleduje manganometrickým stanovením nerozloženého peroxidu vodíka vo vzorkách, odobraných v pravidelných intervaloch z inkubačnej zmesi, podľa rovnice:</i></p> $5 H_2O_2 + 2 KMnO_4 + 3 H_2SO_4 \rightarrow 2 MnSO_4 + K_2SO_4 + 5 O_2 + 8 H_2O$ |
| Reagencie: | <ol style="list-style-type: none"> 1. roztok peroxidu vodíka (zmiešať 1 ml 30 % H_2O_2 so 6 ml 0,1 M fosforečnanového tlmivého roztoku s pH 6,8 a doplniť na objem 100 ml destilovanou vodou) 2. 0,1 M fosforečnanový tlmivý roztok s pH 6,8 3. 1 M roztok kyseliny sírovej 4. 0,0025 M roztok manganistanu draselného 5. roztok katalázy (riedenie: 0,1 ml/100 ml, aktivita pôvodného neriedeného roztoku enzýmu: 450 450 U/ml, pričom 1 g enzýmu = 111 ml, aktivita ~ 50 000 U/mg) 6. 0,1 % roztok síranu manganatého (pred začiatkom titrácie manganistanom pridávame 1 – 3 kvapky. Reakcia uvedená v princípe je autokatalyzovaná Mn^{2+} iónmi, a preto je prítomnosť malého množstva Mn^{2+} iónov v roztoku pred titráciou užitočná.) |
| Materiál: | odmerná banka s objemom 50 ml, vodný kúpeľ s kúskami ľadu, sklenené pipety s nastavcom, titračné banky širokohrdlé (6 ks), byreta s objemom 25 ml |
| Postup: | <p>Do 50 ml odmernej banky napipetujeme 2,5 ml roztoku peroxidu vodíka (substrát), 3,3 ml fosforečnanového tlmivého roztoku s pH 6,8 a doplníme destilovanou vodou po značku. Roztok dobre premiešame, prelejeme do titračnej banky a vložíme do kúpeľa, ktorý obsahuje vodu a kúsky ľadu. Súčasne vložíme do kúpeľa aj skúmavku s pripraveným, vhodne zriedeným roztokom katalázy (enzým). Inkubujeme 10 min. Medzitým pipetujeme do ďalších 5 titračných baniek po 5 ml 1 M H_2SO_4 (zastaví reakciu) a pridáme po 3 kvapky $MnSO_4$.</p> <p>Pre vyhodnotenie výsledkov je dôležité získať informáciu o koncentrácii H_2O_2 na začiatku reakcie, teda v čase $t = 0$ min. Vzhľadom na to, že pridanie enzýmu k roztoku H_2O_2 okamžite spúšťa reakciu, pre správne určenie koncentrá-</p> |

| | |
|----------------------|---|
| | <p>cie H_2O_2 v čase $t = 0$ min postupujeme tak, že do prvej titračnej banky obsahujúcej H_2SO_4 a $MnSO_4$ pridáme 5 ml roztoku H_2O_2 bez enzýmu. Až potom do zvyšných 45 ml inkubovaného roztoku H_2O_2 rýchlo pripipetujeme 1 ml enzýmu, reakčnú zmes premiešame a zaznamenáme čas. Od tejto chvíle začneme merať čas a v intervaloch 3, 6, 9 a 12 minút odoberáme z reakčnej zmesi po 5 ml, ktoré pridávame postupne do zvyšných štyroch titračných baniek s H_2SO_4 a $MnSO_4$. Nakoniec všetky banky titrujeme roztokom $KMnO_4$ do rovnakého svetloružového sfarbenia a zaznamenávame príslušné spotreby.</p> |
| Vyhodnotenie: | <p>Titraciou reakčných zmesí roztokom $KMnO_4$ stanovíme koncentráciu enzýmom nerozloženého H_2O_2 v časoch 0, 3, 6, 9 a 12 minút. Pre výpočet koncentrácie použijeme nasledujúcu rovnicu:</p> $\frac{c(H_2O_2) \cdot V(H_2O_2)}{5} = \frac{c(KMnO_4) \cdot V(KMnO_4)}{2}$ <p>kde $V(H_2O_2) = 5$ ml, $c(KMnO_4) = 0,0025$ M a $V(KMnO_4)$ je spotrebovaný $KMnO_4$ v ml.</p> <p>Rýchlostnú konštantu (k_t) reakcie prvého poriadku vypočítame podľa vzťahu:</p> $k_t = \frac{2,303}{t} \log \frac{c(H_2O_2)_{t=0}}{c(H_2O_2)_t}$ <p>kde t je čas v minútach, $c(H_2O_2)_{t=0}$ je koncentrácia substrátu v čase $t = 0$ min a $c(H_2O_2)_t$ je aktuálne množstvo substrátu v čase t (3, 6, 9, 12 min).</p> <p>Získané hodnoty k_t vynesieme do grafu oproti času a priesečník lineárnej závislosti s osou y odpovedá hodnote k v čase $t = 0$ min (k_0). Vynásobením hodnoty k_0 s hodnotou koncentrácie H_2O_2 v čase $t = 0$ min získame počiatočnú rýchlosť reakcie v M/min. Túto hodnotu vynásobíme objemom reakčnej zmesi v litroch, t.j. 0,046 (45 ml roztoku H_2O_2 + 1 ml enzýmu), čím získame počet molov H_2O_2, ktoré sa rozloží za 1 min v 46 ml reakčnej zmesi. Po vynásobení číslom 10^6 (premena z mol na μmol) a 10^3 (riedenie enzýmu) získame aktivitu katalázy v jednotkách μmol/min (U) na 1 ml pôvodného neriedeného roztoku enzýmu.</p> |
| Záver: | Uvedieme hodnotu aktivity katalázy pri danej teplote a pH (0 °C, pH 6,8). |