

Gimnazija Kranj

INHIBICIJSKA VLOGA ETANOLA V ENCIMSKI REAKCIJI RAZPADA VODIKOVEGA PEROKSIDA

Področje: biologija

Raziskovalna naloga

Avtor: Nejc Horvat

Mentor: dr. Petra Košir

Kranj, 2022

ZAHVALA

Rad bi se zahvalil dr. Petri Košir za mentorstvo pri izdelavi raziskovalne naloge in dr. Roku Rudežu za nasvete pri pisanju. Zahvaljujem se tudi laborantki Jasni Turel za dobavo pripomočkov in kemikalij ter navigacijo po biološkem laboratoriju.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	4
1. UVOD.....	6
2. TEORETIČNI DEL	6
3. EKSPERIMENTALNI DEL	7
3.1 Raziskovalno vprašanje in hipoteze.....	9
3.2 Preliminarni testi	10
3.3 Eksperimentalne spremenljivke	10
3.3.1 Neodvisna spremenljivka	10
3.3.2 Odvisna spremenljivka.....	11
3.3.3 Nadzor zunanjih faktorjev	11
3.4 Materiali.....	12
3.5 Metodologija	12
3.6 Varnost in skrb za okolje	13
4. ANALIZA PODATKOV IN REZULTATI	14
4.1 Neobdelani podatki	14
4.2 Obdelava podatkov	15
4.3 Grafični prikaz	16
4.4 Statistični test.....	17
5. ZAKLJUČEK IN RAZPRAVA	18
5.1 Sklepi	18
5.2 Evalvacija metode in statistične zanesljivosti	18
5.3 Nadaljnjo delo in izboljšave	20
6. VIRI IN LITERATURA.....	20

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv encima kot katalizatorja na potek reakcije z zmanjšanjem aktivacijske energije	7
Slika 2: Vpliv alosteričnega inhibitorja (nekompetitivnega) na nastanek produkta	8
Slika 3: Testiranje različnih koncentracij etanola in njihov vpliv na hitrost reakcije.....	10
Slika 4: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve brez etanola; v programu Logger Pro.....	14
Slika 5: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve s 30 % etanolom; v programu Logger Pro	14
Slika 6: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve s 60 % etanolom; v programu Logger Pro	15
Slika 7: Primer uporabljene linearne regresije na nizu podatkov (0 % etanol pri 5 % peroksidu).....	15
Slika 8: Graf hitrosti razpada vodikovega peroksida v kPa/s pri različnih koncentracijah substrata (1 - 5 %), v prisotnosti (30, 60 %) in odsotnosti (0 %) etanola	16

POVZETEK

Namen te raziskovalne naloge je podroben vpogled na kinetiko encima katalaze pri različnih koncentracijah etanola, njenega možnega inhibitorja, ki pa še ni najbolj raziskan. Katalaza je zelo raziskana kot del reakcijske poti v možganih na podganah, kjer jo spremlja etanol, vendar je v tej raziskovalni nalogi izpostavljen še etanolov obratni učinek – inhibicija katalaze *in vitro*.

Reakcija je izvedena na primeru vodikovega peroksida, kjer je katalazina aktivnost premo sorazmerna količini sproščenega plina kisika, ta pa povzroči spremembo tlaka v reakcijskem sistemu. Katalaza je bila pridobljena iz živalskega tkiva, govejih jeter, saj je prisotna v organih mnogih sesalcev. S pomočjo tlačnega senzorja je bilo v kontroliranem okolju izvedenih 25 meritev pri več koncentracijah etanola, rezultati prikazani kot srednje vrednosti teh meritev.

S pomočjo grafa hitrosti reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata so bile potrjene splošne lastnosti encimov, hkrati pa je bil etanol prikazan kot inhibitor katalaze, po predlaganem mehanizmu nekompetitivne inhibicije.

Ključne besede: katalaza, etanol, nekompetitivni inhibitor, tlak plina kisika

ABSTRACT

This research paper aimed to thoroughly examine the kinetics of enzyme catalase at different ethanol concentrations, due to ethanol being its possible, yet rarely researched, inhibitor. Catalase is generally well known as a part of a reaction pathway in the brain of rats, where it couples with ethanol, however this paper also shows its reverse effect – catalase's inhibition *in vitro*.

The process was modelled on the reaction of hydrogen peroxide decomposition, where the enzymatic activity is directly proportional to the amount of released oxygen gas, which can be measured as the pressure change in the reaction system. Catalase was extracted from an animal tissue source, bovine liver, as it is often present in many mammalian organs. Using a pressure sensor, 25 measurements at multiple ethanol concentrations were carried out in a controlled environment, the results shown as means of these measurements.

With a graph of reaction rate at different substrate concentrations, general properties of enzymes were tested, as well as ethanol being proven as an inhibitor of catalase, proposed to act as a non-competitive inhibitor.

Key words: catalase, ethanol, non-competitive inhibitor, pressure of oxygen gas

1. UVOD

Encimi so biološke molekule, ki imajo ključno vlogo v živih organizmih. Še posebej zanimiv encim je katalaza, saj je v mnogih živih bitjih izjemno razširjena in tudi ena izmed najbolj razširjenih beljakovin v celici (Benoit, 2016), komercialno pomembna in za namene tega poskusa tudi zelo dostopna. Katalaza je zelo raziskan encim, za katerega je bilo najdenih že veliko inhibitorjev, kot so kalijev cianid, vodikov sulfid in hidroksilamin (Keilin in Hartree, 1934).

Pri pouku biologije smo obravnavali etanol kot možen inhibitor alkoholnega vrenja v kvasovkah, ki naj bi že pri 15% popolnoma inhibiral njihovo delovanje, tako da me je zanimalo če je to zaradi kakšnih metabolnih poti v enoceličarjih, ki so povezani s katalazo, saj je znano, da je prisotna v kvasu. Etanol je obsežno raziskan v *in vivo* raziskavah na podganah, kjer naj bi bil del encimskega sistema za nadzor acetaldehida v možganih sesalcev, kjer je prisotna tudi katalaza. Raziskave kot so Aragon et al., 1985 in Amit, 1988 kažejo, da je aktivnost katalaze v krvi in možganih pogan vzročno povezana s prostovoljno izpostavljenostjo etanolu. To kaže na prisotnost biološkega sistema, ki s katalazo kontrolira afiniteto za zaužitje alkohola (Amit, 1988). Odločil sem se raziskati še inhibicijsko vlogo etanola na biološke encime, saj je v znanstvenih člankih sploh ni moč najti, vendar bi bilo to vredno testirati in ugotoviti kakšen je efekt etanola s katalazo *in vitro*.

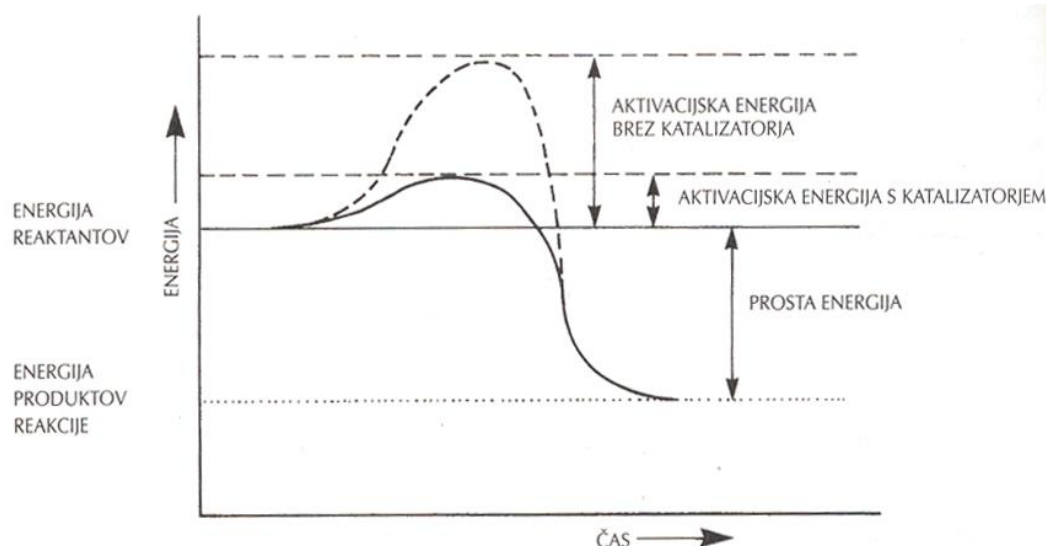
Cilj raziskovalne naloge je ugotoviti kako aktivnost katalaze korelira s prisotnostjo etanola, ter ali je etanol bodisi kompetitiven ali nekompetitiven inhibitor reakcije, s testiranjem encimske aktivnosti pri različnih koncentracijah etanola, merjene kot hitrost tvorbe plina kisika.

Raziskovalno vprašanje: Kako koncentracija etanola vpliva na encimsko aktivnost katalaze v reakciji razpada vodikovega peroksida v živalskem jetrnem tkivu in kakšna vrsta inhibicije je prisotna?

V raziskovalni nalogi je najprej predstavljeno teoretično ozadje encimskih reakcij in določanja encimatske aktivnosti, potem določanje primernih koncentracij snovi za eksperiment skozi preliminarna testiranja, nazadnje pa še izvedba laboratorijskega eksperimenta z analizo podatkov.

2. TEORETIČNI DEL

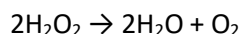
Encimi so biološki katalizatorji, ki pospešujejo biokemične reakcije v organizmih. Da se jih ekstrahirati iz celic in uporabiti v številnih komercialno pomembnih procesih. Njihova glavna funkcija je pospešiti reakcijo, ne da bi se sami porabili v procesu, z znižanjem aktivacijske energije reakcije. Snov, ki ji rečemo substrat se veže na aktivno mesto določenega encima in tvori produkte reakcije. Ker so encimi beljakovine, na njih vpliva koncentracija substrata in encima samega, pa tudi pH in temperatura, zato je treba zadnji dve spremenljivki v raziskavi skrbno nadzorovati (Robinson, 2015).



Slika 1: Vpliv encima kot katalizatorja na potek reakcije z zmanjšanjem aktivacijske energije¹

Katalaza je eden najbolj raziskanih encimov v biologiji. Je tetramerna, sestavljena iz štirih podenot. Ena molekula katalaze lahko vsako sekundo pretvori milijone molekul vodikovega peroksida v vodo in kisik. Katalazo najdemo v skoraj vsakem živem organizmu. V bioloških raziskavah se pogosto uporabljajo goveja jetra in enoceličarji, kot so kvasovke, visoke koncentracije katalaze pa najdemo tudi v številnih rastlinah (črni gram, sončnica, bombaž, bučna in številna druga semena). Katalaza je uporabna tudi v številnih industrijskih postopkih, kot sredstvo za oksidacijo, beljenje in sterilizacijo ter za odstranjevanje vodikovega peroksida. Velikokrat je povezana z glukozno oksidazo (Singh et al., 2019; Temple in Ough, 1975).

Reakcija, ki jo bo ta raziskovalna naloga preučila je razgradnja vodikovega peroksida, ki ga katalizira katalaza (Temple in Ough, 1975):

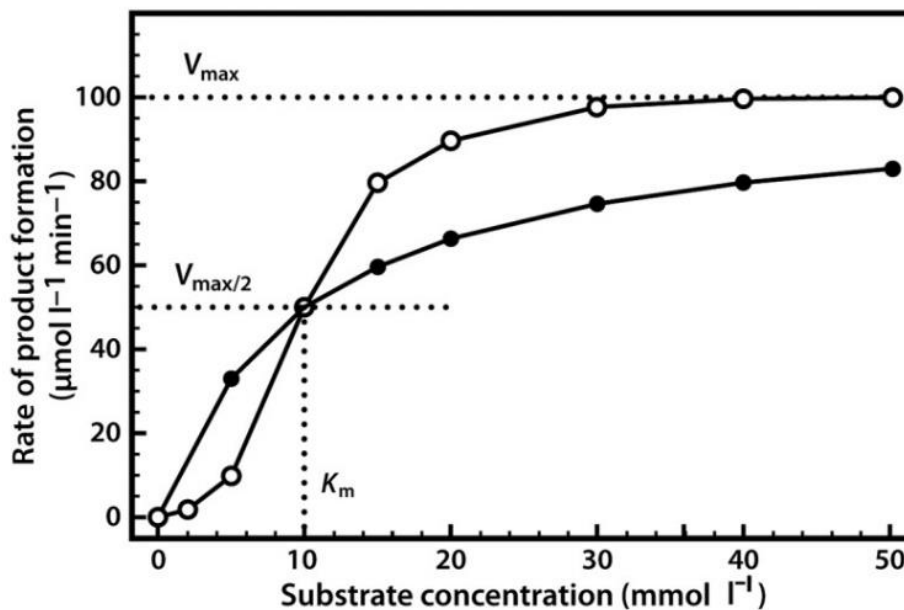


Glavna vloga katalaze je razstrupljanje nevarnih reaktivnih kisikovih vrst, kot je H_2O_2 , ki lahko povzroči poškodbe DNA, staranje in različne bolezni (Nicholls et al., 2000). Prav tako igra vlogo pri presnovi etanola v kombinaciji z alkoholno dehidrogenazo, čeprav je bila večina raziskav o tem opravljenih samo na podganah (Handler in Thurman, 1989).

Inhibitorji so kemikalije, ki znižujejo aktivnost encimov. Delujejo tako, da neposredno (kompetitivni inhibitorji) ali posredno (nekonkurenčno) vplivajo na katalitične lastnosti aktivnega mesta (Robinson, 2015). Etanol naj bi bil nekompetitivni inhibitor razgradnje vodikovega peroksida, kar je tudi eno od dejstev, ki bodo preizkušeni v tem eksperimentu (Temple in Ough, 1975).

¹ Vse slike so citirane v 6. Viri in literatura – Viri slik.

Nekompetitivni inhibitorji reagirajo z encimom na alosteričnem mestu (prevod »allosteric site«, ni uradne slovenske ustreznice), torej mestu, ki se razlikuje od aktivnega mesta encima (Delaune in Asayouri, 2021). Inhibitor fizično ne blokira aktivnega mesta, vendar prepreči kasnejšo reakcijo. Večina nekompetitivnih inhibitorjev je kemično različnih od substrata (medtem ko so kompetitivni z njim podobni) in njihove inhibicije ni mogoče premagati s povečanjem količine substrata pri višjih koncentracijah. Inhibitorji zmanjšajo koncentracijo aktivnega encima v raztopini (takega, ki bi lahko kataliziral reakcijo), zmanjšajo V_{max} in maksimalni tlak reakcije (Robinson, 2015), kar pomeni, da nastane manj produkta kakor bi ga v višjih koncentracijah nastalo pri reakciji brez encima ali z nekompetitivnim inhibitorjem, in prav to bo uporabljeno kot dokaz, če je etanol kompetitiven ali ne.



Slika 2: Vpliv alosteričnega inhibitorja (nekompetitivnega) na nastanek produkta; kompetitiven inhibitor z belo barvo, nekompetitiven s črno (Robinson et al., 2015)

V tem poskusu bodo uporabljene tri snovi: katalaza kot encim, vodikov peroksid substrat in etanol kot inhibitor reakcije.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Raziskovalno vprašanje in hipoteze

Dopolnjeno raziskovalno vprašanje: Kako različne koncentracije etanola (0, 30, 60 %) vplivajo na reakcijsko hitrost razgradnje vodikovega peroksida z encimom katalazo iz govejih jeter, merjeno kot sprememba tlaka sproščenelega plina kisika skozi čas pri različnih koncentracijah vodikovega peroksida (1, 2, 3, 4, 5 %) pri konstantni temperaturi (37°C) in pH (7), z uporabo tlačnega senzorja, in kakšno vrsto inhibicije to predstavlja?

Hipoteza 1: Aktivnost encima se bo razlikovala pri različnih koncentracijah substrata in bo naraščala s povečano koncentracijo substrata.

Naraščanje aktivnosti s koncentracijo je v splošnem značilno za vse encime, vendar se nato pri najvišjih koncentracijah vrednost ustali (uporablja se tudi angleški izraz »to plateau«). To bo opazno tudi pri dodatku etanola, vendar pri visokih koncentracijah etanola razlika morda ne bo vidna, če bo reakcija tako upočasnjena, da bo praktično ničta ne glede na koncentracijo (popolna inhibicija aktivnosti).

Ničelna hipoteza: Aktivnost encima se ne bo razlikovala glede na koncentracijo vodikovega peroksida.

Hipoteza 2: Dodajanje etanola bo znižalo hitrost reakcije pri vsaki koncentraciji substrata, pri čemer bodo višje koncentracije etanola imele večji efekt in tako bo možno opaziti nižjo spremembo tlaka v enoti časa.

Ta hipoteza je predlagana, ker naj bi etanol, če je nekompetitiven inhibitor, spremenil konformacijo encima do te točke, da molekula ne bo več mogla katalizirati reakcije (Temple in Ough, 1975). Pri nižjih koncentracijah etanola bo manj molekul encima spremenjenih, zato bo reakcija vsaj deloma še potekla (ni popolne inhibicije).

Ničelna hipoteza: Etanol ne bo imel pomembnega vpliva na reakcijo razgradnje H₂O₂ s katalazo.

Hipoteza 3: Etanol bo deloval kot nekompetitivni inhibitor in bo znižal maksimalni reakcijski tlak, torej tudi skupen volumen izločenega plina kisika.

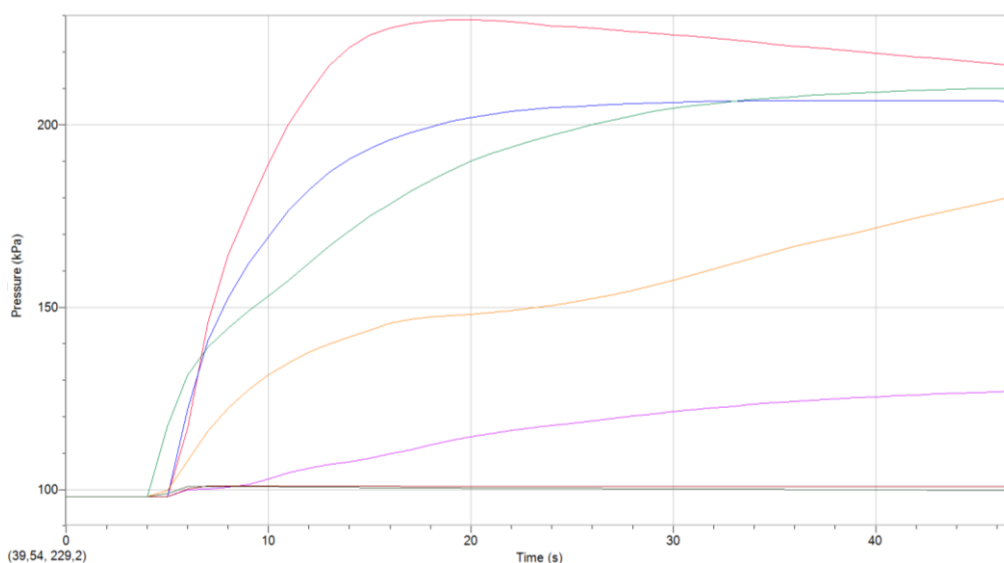
Krivulja grafa reakcijske hitrosti bo imela enako splošno obliko pri vseh koncentracijah etanola, vendar ne bo dosegla enakega maksimalnega tlaka, saj je to značilnost nekompetitivne inhibicije. To je posledica ireverzibilne vezave inhibitorja na alosterično mesto katalaze (Delaune in Asayouri, 2021), zaradi česar vse več molekul ne more razgraditi vodikovega peroksida. Če je hipoteza resnična, bo aktivnost katalaze z etanolom še vedno naraščala z naraščajočo koncentracijo substrata, pri višjih pa ne bo dosegla enakega največjega tlaka kot katalaza brez prisotnega etanola, torej nasprotno od tega kar bi se zgodilo s kompetitivnim inhibitorjem.

Ničelna hipoteza: Etanol ne deluje kot nekompetitivni inhibitor, saj maksimalni tlak v reakciji z etanolom ne bo stalno nižji kot v kontrolnem stanju brez etanola.

3.2 Preliminarni testi

Preliminarni testi so testirali kakšne koncentracije reagentov so najprimernejše za izvajanje poskusa. Širok razpon koncentracij vsake od treh snovi (katalaza, etanol, vodikov peroksid) so bile uporabljene. Ugotovljeno je bilo, da je jetrna suspenzija 13 g/L primerna za reakcije s spodaj napisanimi koncentracijami etanola in peroksida².

Koncentracija etanola mora biti relativno nizka, da ne bi bila inhibicija prevelika, saj potem ne bi bilo mogoče opazovati reakcijskih trendov zaradi prevelikega znižanja v reaktivnosti. Testiranih je bilo več koncentracij v razponu od 1 % do 70 %, del rezultatov je prikazan spodaj na sliki. Ugotovljeno je bilo, da je 30 % etanol najprimernejši za opis danega trenda. Odločil sem se, da v raziskavi uporabim še 60 % etanol kot dvakratnik prvega, da vidim kakšen vpliv ima podvojitev koncentracije. Tretji pogoj, ki bo testiran v metodologiji pa je seveda kontrolni pogoj brez etanola (naravna aktivnost encima).



Slika 3: Testiranje različnih koncentracij etanola in njihov vpliv na hitrost reakcije; grafi v Logger Pro

Tudi koncentracija vodikovega peroksida je bila preizkušena in ugotovljeno je bilo, da je bila reakcija pri koncentracijah nad 5 % preveč burna, epruvete je takrat že razneslo, tako da se bo v metodologiji uporabljala 5 % kot najvišja koncentracija za merjenje peroksida.

3.3 Eksperimentalne spremenljivke

3.3.1 Neodvisna spremenljivka

Manipulirani sta dve različni neodvisni spremenljivki:

- **Koncentracija etanola (inhibitorja)** – reakcijo opazujemo v prisotnosti (30, 60 %) in odsotnosti (0 %) etanola. 0 % etanol nakazuje samo dodatek destilirane vode. Izbira koncentracij je razložena v podpoglavju 3.2 Preliminarni testi. Vse tri se razlikujejo za 30 %, da se prikaže približno enak narast v koncentraciji in njen vpliv na reakcijo.
- **Koncentracija substrata** – 1, 2, 3, 4 in 5 % vodikov peroksid je bil uporabljen, medtem ko 0 % za kontrolo. Tudi te so bile določene s preliminarnimi testi. Za končni graf aktivnosti encima, je treba reakcijo izvesti pri več koncentracijah substrata, saj iz tega lahko ugotovimo dejanski trend, ki nam pomaga določiti tip inhibicije, absolutna hitrost reakcije pri tem ni v pomoč.

² Peroksid v tej raziskovalni nalogi pomeni okrajšavo za »vodikov peroksid«.

Z dvema spremenljivkama zagotovimo, da vidimo tako učinek različnih koncentracij substrata pri isti koncentraciji etanola kot tudi razlike različnih koncentracij etanola pri isti koncentraciji substrata.

3.3.2 Odvisna spremenljivka

Odvisna spremenljivka je hitrost reakcije (v kPa/s), ki je bila merjena kot sprememba tlaka skozi čas, zaradi sproščanja kisika v reakciji – več sproščenega plina pomeni višjo spremembo tlaka in s tem hitrejšo reakcijo.

Za vsako koncentracijo substrata se meritev hitrosti petkrat ponovi, tako da zagotavljamo točnost rezultatov. Hitrost se meri s senzorjem tlaka Vernier, ki je povezan z aplikacijo Logger Pro na prenosnem računalniku. Obstaja šest različnih koncentracij substrata (0, 1, 2, 3, 4, 5 %), vsaka se ponovi petkrat in pri treh različnih koncentracijah etanola (0, 30, 60 %), tako da bo opravljenih 90 meritev, s čimer dobimo večkrat ponovljene in zanesljive empirične rezultate.

3.3.3 Nadzor zunanjih faktorjev

Tabela 1: Zunanje spremenljivke in razlogi za njihov nadzor

Spremenljivka	Razlog za nadzor	Način nadzora
Temperatura reakcijske zmesi	Temperatura lahko vpliva na hitrost reakcije, kot pojasnjuje teorija trkov, pri čemer povišana temperatura potencialno zviša hitrost. Pri zelo visokih temperaturah je poleg tega možna tudi denaturacija katalaze.	Uporabljena je laboratorijska vodna kopel, pri 37°C, kar je optimalna temperatura za delovanje katalaze. Ista temperatura je bila uporabljena za vsako meritev. Vse epruvete so bile postavljene v kopel (suspenzija jeter, etanol in tudi peroksid), pri čemer je bil uporabljen termometer, da se je določilo kdaj zmes temperaturo doseže.
Koncentracija encima in njegov vir	Nekonstantna koncentracija encima lahko vpliva na hitrost reakcije pri različnih meritvah, zato mora biti vedno enaka. Prav tako lahko vir katalaze (jetra, kvasovke...) vpliva na hitrost.	Ves uporabljen encim prihaja iz istega vira, sveže kupljenih govejih jeter. Vse meritve so bile poleg tega tudi opravljene v enem dnevu, da ni bila encimska suspenzija že postana. Pred dodatkom suspenzije v reakcijsko zmes pri vsaki meritvi, je bila tudi temeljito premešana, da se prepreči usedanje neraztopljenih koščkov jeter na dno čaše.
Volumen reagentov	Ne samo koncentracije, tudi količine (volumni) substanc morajo biti kontrolirani, da so proporcionalno enaki v vseh ponovitvah.	V vsaki ponovitvi so uporabljeni enaki volumni snovi, zmerjeni z avtomatsko pipeto, ki poveča zanesljivost meritve.
Volumen epruвет in celotne reakcijske zmesi	Razlike v kumulativnih volumnih reakcijskih zmesi lahko povzročijo razlike v začetnem tlaku, kar lahko vpliva na rezultate. Prav tako lahko oblika epruвет vpliva na tlak.	V meritvah, kjer etanola ni, je uporabljena destilirana voda, da se zapolni enaka prostornina kot jo ima etanol, saj bi bil lahko brez dodatka vode začetni tlak nekoliko nižji. Poleg tega so si uporabljene epruvete vse enake, da ne bi oblika posode vplivala na tlak.
Čistost spojin	Neppravilno ravnanje z opremo ali mešanje substanc, lahko vpliva na koncentracijo le teh.	Avtomatska pipeta je vsakič očiščena z destilirano vodo, ko je uporabljena za merjenje volumna druge snovi.

Merilna oprema	Uporaba različnih naprav pri različnih ponovitvah eksperimenta, lahko zaradi različnih merskih napak, vpliva na točnost rezultata.	Isti tlačni senzor, ista avtomatska pipeta in ista steklovina so uporabljeni v vseh merjenjih, da so merske napake konstantne.
Čas meritev	Če je epruveta prepozno zatesnjena, lahko večja količina kisika pobegne, kar zmanjša celotni tlak v rezultatu.	Epruvete so zatesnjene z zamaškom v najkrajšem možnem času po začetku reakcije, povsod je trajalo približno sekundo.

3.4 Materiali

- Vernier tlačni senzor (± 4 kPa)
- Prenosni računalnik s programom Logger Pro 3.8
- Laboratorijska vodna kopel ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- 3 mL kapalke (x3)
- 5,00 ($1 \pm 0,008$ %) mL avtomatska pipeta
- Nastavki za avtomatsko pipeto (x10)
- Ročni mešalnik
- Epruvete (x26)
- pribl. 700 mL destilirane vode
- Filtrirni papir ali gaza
- Stekljeni lij
- 100 mL čaše (x5)
- 250 ml čaša (x1)
- 50 ml $\pm 0,08$ mL merilni valj
- 100 ml $\pm 0,8$ mL merilna bučka
- 2,6 g govejih jeter
- pribl. 150 mL 10 % vodikovega peroksida
- pribl. 120 mL 75 % etanola
- Termometer ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)
- Stojalo za epruvete (x1)
- Namizna tehnična
- Nož in škarje
- Pinceta

3.5 Metodologija

1. 13 g/L encimsko suspenzijo se pripravi z 2,6 g govejih jeter in 200 mL destilirane vode. Suspenzijo temeljito premešamo z mešalnikom in filtriramo skozi filtrirni papir ali gazo (položeno v lij) v 250 mL čašo. Vsakič preden encim damo v epruveto, suspenzijo premešamo, tako da je encim sorazmerno razporejen po vsej tekočini.

2. Različne koncentracije vodikovega peroksida (0, 1, 2, 3, 4 in 5 %) pripravimo z razredčitvijo 10 % H_2O_2 v 100 mL merilni bučki. Z merilnim valjem se nameri količino vodikovega peroksida, ki se nato prenese v bučko. Bučko napolnimo z vodo do standardne črte za 100 mL. Za 0 % vodikov peroksid se uporabi destilirana voda.

Tabela 2: Postopek redčenja za vodikov peroksid

Volumen 10% vodikovega peroksida (mL)	Volumen vode (mL)	Končni volumen (mL)	Končna koncentracija (%)
0	100	100	0
10	90	100	1
20	80	100	2
30	70	100	3
40	60	100	4
50	50	100	5

3. 30% in 60% etanol sta pridobljena z redčenjem 75% etanola po enaki metodi kot za vodikov peroksid v koraku 2.

Tabela 3: Postopek redčenja za etanol

Volumen 75% etanola (mL)	Volumen vode (mL)	Končni volumen (mL)	Končna koncentracija (%)
40	60	100	30
80	20	100	60

4. Senzor je priključen na računalnik s programom Logger Pro, osi na grafu so prilagojene za merjenje tlaka skozi čas za 3 minute. Podatki se zbirajo vsako sekundo.

5. Kot kontrolo se najprej izvede reakcija brez vodikovega peroksida (njegov volumen zavzame destilirana voda), torej z 2 mL suspenzije jeter, 4 mL 0 % etanola in 2 mL destilirane vode ter reakcija z 2 mL suspenzije jeter, 4 mL 30 % etanola in 2 mL destilirane vode ter reakcija z 2 mL suspenzije jeter, 4 mL 60 % etanola in 2 mL destilirane vode. S tem je bila pokazana nična aktivnost, ker ni prisotnega substrata, ki bi bil kataliziran. Te reakcije potekajo po istem postopku kot reakcije, ki vsebujejo substrat (koraki 6 – 10).

6. Z ročno pipeto v epruveto vlijemo 2 mL 1 % vodikovega peroksida. V drugo epruveto vlijemo 2 mL jetrne suspenzije in 4 mL destilirane vode. Pred uporabo pipete jetrno suspenzijo premešamo.

7. Obe epruveti damo v stojalo za epruvete v vodni kopeli in ju pustimo tam, da raztopine dosežejo zahtevano temperaturo, ki jo zaznamo s termometrom. Termometer speremo z destilirano vodo pred vsakim merjenjem, da ne pride do kontaminacije snovi.

8. Jetrno suspenzijo z dodano destilirano vodo prenesemo v epruveto, ki vsebuje peroksid, takoj zapremo s tlačnim senzorjem in podatke zbiramo 3 minute. Ko se meritev ustavi, se graf shrani v Logger Pro. Za pridobitev vrednosti hitrosti na grafu, bo v Logger Pro uporabljena funkcija »linearna regresija« na naraščajočem delu grafa.

9. Vse epruvete se očistijo z destilirano vodo.

10. Postopek od 6 – 9 se ponovi še štirikrat, da dobimo 5 meritev za vsako koncentracijo.

11. Koraki 6 – 10 se ponovijo za ostale štiri koncentracije vodikovega peroksida pri 0 % etanolu.

12. Koraki 6 – 11 se ponovijo z zamenjavo 30 % in nato 60 % etanola namesto destilirane vode. Jetrni suspenziji v vodni kopeli namesto destilirane vode dodamo 4 mL etanola (sprva 30 % in v kasnejših poskusih 60 %).

13. Shranjene so tri datoteke v Logger Pro, ki vsebujejo vsaka 25 grafov hitrosti reakcije za tri različne koncentracije etanola.

3.6 Varnost in skrb za okolje

Za zaščito so bila uporabljena standardna laboratorijska oblačila, vključno z belim laboratorijskim plaščem, rokavicami iz lateksa in očali. Epruveta se lahko pod pritiskom zlomi zaradi intenzivnosti reakcije, zato se nosi zaščitna očala; rokavice pa zaradi ravnanja s strupenimi snovmi, ki lahko poškodujejo kožo (tako etanol kot vodikov peroksid). Nosi se tudi maska, saj sta obe raztopini hlapni.

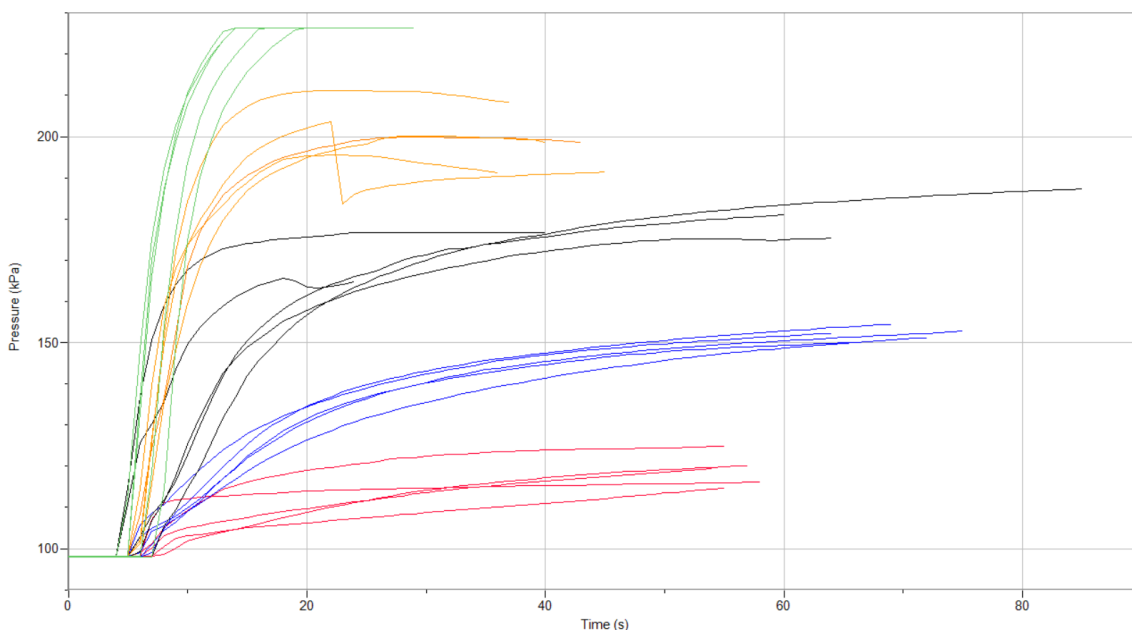
Raztopino etanola in katalaze lahko odlijemo v odtok, vendar je treba peroksid razredčiti, saj ga lahko vlijemo v umivalnik samo, če je njegova koncentracija nižja od 3 %. Peroksid v epruvetah, kjer je prišlo do reakcije, se je spremenil v vodo, zato ga ni treba redčiti.

4. ANALIZA PODATKOV IN REZULTATI

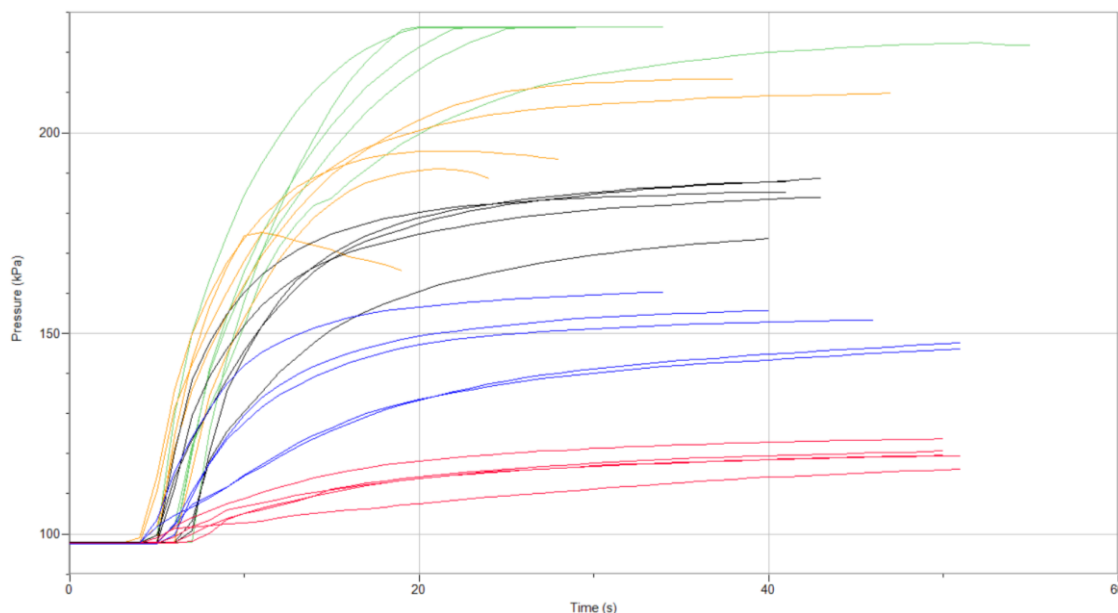
4.1 Neobdelani podatki

V vseh kontrolnih meritvah brez substrata je bila hitrost reakcije, kot pričakovano, nična. Če bi reakcija kljub temu potekla, bi bila možna kontaminacija s peroksidom.

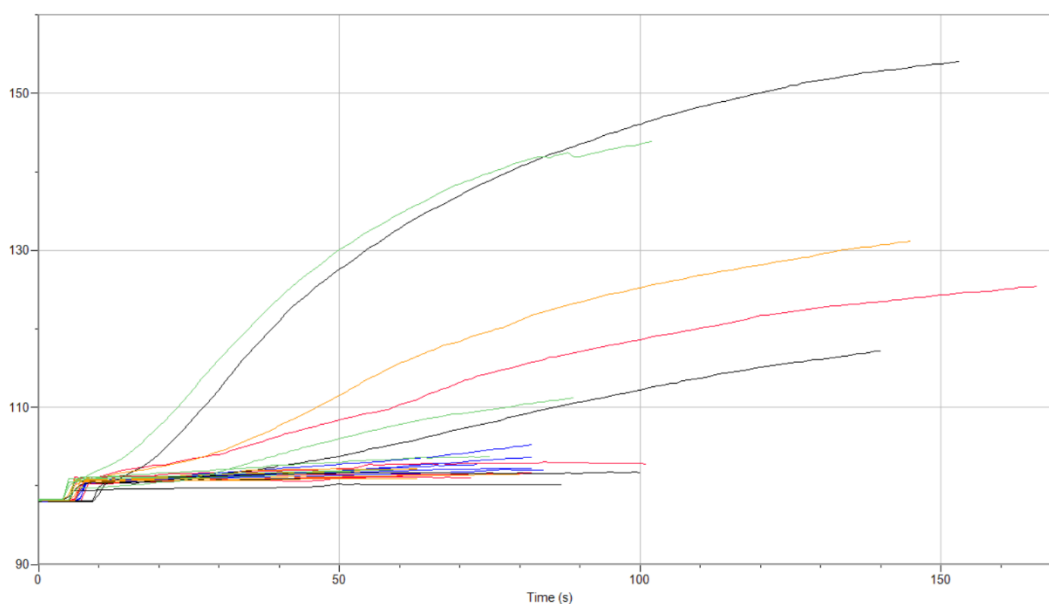
Podatki pridobljeni v eksperimentalnih meritvah (v prisotnosti substrata) so prikazani v treh grafih s 25 krivuljami, vsak graf pri petih različnih koncentracijah substrata, ki so barvno usklajene za boljšo preglednost.



Slika 4: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve brez etanola; v programu Logger Pro



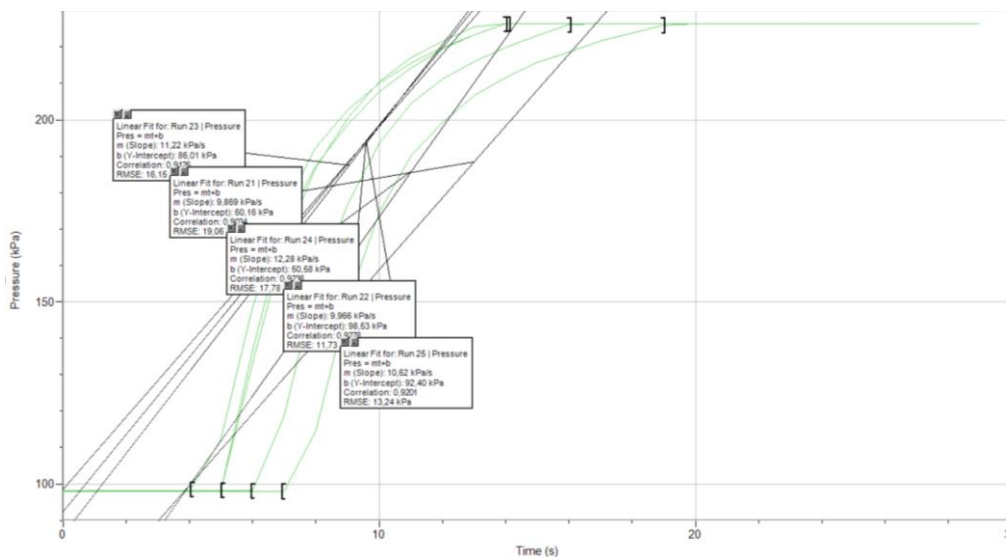
Slika 5: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve s 30 % etanolom; v programu Logger Pro



Slika 6: Sprememba tlaka (kPa) v času (s) za meritve s 60 % etanolom; v programu Logger Pro

4.2 Obdelava podatkov

Za pridobitev podatkov o reakcijski hitrosti za vsako meritev, je bil izračunan naklon (gradient) vsake krivulje, s tem da je bila posplošena na linearno regresijo v programu Logger Pro. Regresija je narejena le v začetnem delu reakcije, ko se substrat pretvarja v produkt, torej od samega začetka spremembe tlaka pa do maksimuma. Pri različnih koncentracijah substrata je bilo tako definicijsko območje funkcije linearne regresije različno, a se je le tako dalo pravilno določiti naklone (vedno je bilo med 10 in 20 sekund). Pri istih koncentracijah pa je bil časovni parameter enak za vse ponovitve.



Slika 7: Primer uporabljene linearne regresije v Logger Pro na nizu podatkov (0 % etanol pri 5 % peroksidu)

Podatki o naklonih, torej hitrosti reakcije, so tabelirani spodaj. Za statistično mero je bila uporabljena aritmetična sredina in standardna deviacija, v Microsoft Excelu.

Table 4: Hitrost reakcije v kPa/s za različne koncentracije substrata pri 0 % etanolu (kontrola)

Koncentracija H ₂ O ₂ (%)	Hitrost reakcije (kPa/s) ± 0,01 kPa/s						Aritmetična sredina	SD ³
	Ponovitev 1	P2	P3	P4	P5			
1,00	1,13	1,95	0,96	0,61	0,87	1,10	0,455	
2,00	2,51	2,65	2,94	2,25	2,01	2,47	0,319	
3,00	5,34	6,01	4,99	5,32	6,91	5,72	0,682	
4,00	8,46	6,99	8,20	8,33	9,72	8,34	0,866	
5,00	9,87	9,97	11,22	12,28	10,62	10,79	0,890	

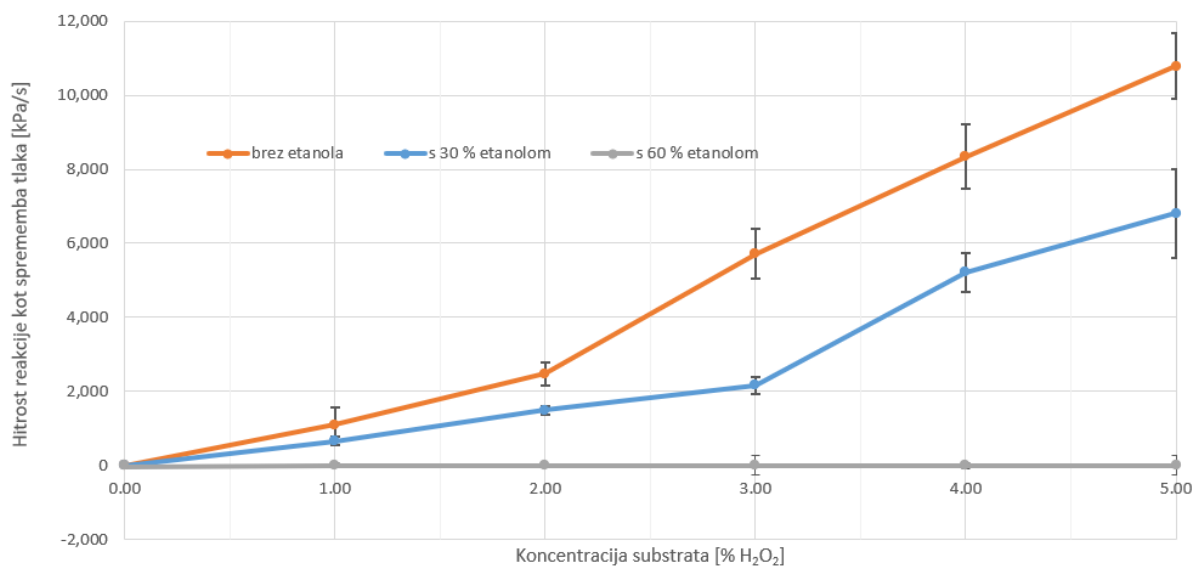
Table 5: Hitrost reakcije v kPa/s za različne koncentracije substrata pri 30 % etanolu

Koncentracija H ₂ O ₂ (%)	Hitrost reakcije (kPa/s) ± 0,01 kPa/s						Aritmetična sredina	SD
	Ponovitev 1	P2	P3	P4	P5			
1,00	0,75	0,73	0,73	0,43	0,63	0,65	0,120	
2,00	1,47	1,38	1,57	1,67	1,38	1,49	0,112	
3,00	2,46	2,16	1,83	2,35	2,01	2,16	0,226	
4,00	4,41	5,32	5,25	6,02	5,05	5,21	0,515	
5,00	8,82	5,29	6,21	6,38	7,32	6,80	1,20	

Table 6: Hitrost reakcije v kPa/s za različne koncentracije substrata pri 60 % etanolu

Koncentracija H ₂ O ₂ (%)	Hitrost reakcije (kPa/s) ± 0,01 kPa/s						Aritmetična sredina	SD
	Ponovitev 1	P2	P3	P4	P5			
1,00	0,20	0,08	0,03	0,05	0,02	0,07	0,066	
2,00	0,07	0,07	0,05	0,05	0,06	0,06	0,009	
3,00	0,72	0,11	0,04	0,01	0,03	0,18	0,272	
4,00	0,24	0,04	0,02	0,01	0,05	0,07	0,084	
5,00	0,73	0,15	0,06	0,02	0,03	0,20	0,271	

4.3 Grafični prikaz



Slika 8: Graf hitrosti razpada vodikovega peroksida v kPa/s pri različnih koncentracijah substrata (1 - 5 %), v prisotnosti (30, 60 %) in odsotnosti (0 %) etanola

³ SD – standardna deviacija podatkov

Podatki iz tabel 4 – 6 so prikazani na grafu, narejenim v Excelu. Kot interval napake na grafu (»error bar«) je bila uporabljena standardna deviacija.

4.4 Statistični test

S T-testom je bilo ugotovljeno ali so rezultati statistično pomembni. T-test je statistični test, ki na podlagi povprečja meritev in standardnega odklona ugotovi, ali je razlika med dvema nizoma podatkov statistično pomembna ali zgolj naključna. p-vrednost je bila izračunana v Microsoft Excelu in rezultati so se šteli za pomembne, če je bila manjša od 0,05, kar pomeni, da obstaja 95-odstotna gotovost, da rezultati niso naključni (Biology For Life, 2009). Najprej je bila postavljena ničelna hipoteza T-testa (*ni bistvene razlike v hitrosti reakcije med dvema pogojema z različno koncentracijo bodisi etanola ali vodikovega peroksida*), nato pa alternativna hipoteza T-testa (*obstaja pomembna razlika v hitrosti reakcije med dvema meritvama odvisne spremenljivke*). Alternativna hipoteza je bila podprta, če je bila p-vrednost nižja od 0,05.

Najprej so bile testirane zaporedne koncentracije substrata pri vsakem izmed krivulj grafa, saj bi nezanesljivi rezultati pokazali, da ni dejanskega trenda, ki ga prikazuje graf. 60 % etanol je bil za statistični test izpuščen, saj je iz rezultatov razvidno, da gotovo ni razlike med različnimi koncentracijami vodikovega peroksida. Te ugotovitve temeljijo na standardni deviaciji in prekrivanju intervalov napake na grafu.

Table 7: Tabela p-vrednosti med zaporednimi koncentracijami vodikovega peroksida pri 0% etanolu

Vrednosti primerjane pri 0 % etanolu	p-vrednost	So rezultati statistično pomembni?
1 % in 2 % vodikov peroksid	0,001647	Da
2 % in 3 % vodikov peroksid	0,001126	Da
3 % in 4 % vodikov peroksid	0,00162	Da
4 % in 5 % vodikov peroksid	0,00602	Da

Table 8: Tabela p-vrednosti med zaporednimi koncentracijami vodikovega peroksida pri 30% etanolu

Vrednosti primerjane pri 30 % etanolu	p-vrednost	So rezultati statistično pomembni?
1 % in 2 % vodikov peroksid	0,000645	Da
2 % in 3 % vodikov peroksid	0,002402	Da
3 % in 4 % vodikov peroksid	0,000257	Da
4 % in 5 % vodikov peroksid	0,064906	Ne

Drugi del testa je bil opravljen med istimi koncentracijami pri različnih pogojih etanola (60 % zopet izpuščen, ker je že iz standardnih deviacij razlika očitna), da se vidi ali je razlika med povprečji meritev zanesljiva in statistično pomembna.

Table 9: Tabela p-vrednosti med 0 % etanolom in 30 % etanolom pri enakih koncentracijah vodikovega peroksida

Primerjava vrednosti med različnimi koncentracijami etanola	p-vrednost	So rezultati statistično pomembni?
1 % v 0 % etanolu in 1 % v 30 % etanolu	0,041317	Da
2 % v 0 % etanolu in 2 % v 30 % etanolu	0,001821	Da
3 % v 0 % etanolu in 3 % v 30 % etanolu	0,000351	Da
4 % v 0 % etanolu in 4 % v 30 % etanolu	0,001723	Da
5 % v 0 % etanolu in 5 % v 30 % etanolu	0,004587	Da

5. ZAKLJUČEK IN RAZPRAVA

5.1 Sklepi

Rezultati v tabelah 4 in 5 ter na sliki 4 jasno kažejo, da povečana koncentracija substrata dejansko poveča hitrost reakcije. Tudi na podlagi T-testa v tabelah 7 in 8 lahko vidimo, da so ti rezultati statistično pomembni. Edini statistično nerelavanten rezultat, je med 4 % in 5 % substratom pri 30 % etanolu na T-testu, kar pomeni, da se pri višjih koncentracijah hitrost ni več povečala. To bi lahko bil razlog za dvom v rezultat, vendar pa gre to z roko v roki s teorijo nekompetitivne inhibicije, saj se hitrost reakcije pri višjih koncentracijah substrata začne zmanjševati, in je tako statistično nepomembna razlika v resnici pokazatelj, da se je hitrost ustalila pri nižji finalni vrednosti kot v 0 % etanolu, kar pa skozi »plateau« sugestira nekompetitivno inhibicijo. Drugi dokaz za to je še viden v intervalih napak na sliki 4; ker se v višjih koncentracijah substrata pri etanolnem pogoju zaporedne vrednosti standardnih deviacij prekrivajo, to pomeni, da rezultatov ni mogoče razlikovati med seboj ali pa so približno enaki, kar dejansko opisuje delovanje »plateau«-ja. Vsi drugi intervali napak v eksperimentu pa se ne prekrivajo, kar je poleg T-testa še dodaten pokazatelj, da je razlika med nadaljnji hitrostmi reakcije pomembna.

Izjema je odstopanje od trenda konstantnega naraščanja, ki je opazno pri 60 % etanolu, kjer je reakcijska hitrost praktično nična skozi celoten potek. To nakaže, da ima glavni trend encimskega delovanja izjemo, in sicer popolno inhibicijo, ko nasičenost inhibitorja oslabi encim do take mere, da sploh ne more delovati. To je bilo pričakovano, saj je bila koncentracija etanola veliko previsoka, zato so bila vsa alosterična mesta encimov zasedena in so preprečevala katalizo. Hipoteza 1 je torej podprta, vendar le za koncentracije etanola pod ali enake 30 %, saj je naslednja testirana višja koncentracija pokazala popolno inhibicijo brez trenda. To so splošne ugotovitve o encimih v prisotnosti inhibitorja in se skladajo z ugotovitvami študije Robinson, 2015, ki je preučevala lastnosti encimov in njihove kinetike pri različnih pogojih.

Tudi hipotezo 2 je mogoče podpreti, saj je jasno, da je etanol vplival na aktivnost katalaze z znižanjem reakcijske hitrosti pri razgradnji vodikovega peroksida; hitrost pri vsaki koncentraciji substrata s 30 % etanola je bila bistveno nižja od hitrosti v vzorcih brez etanola. Hitrost v 60 % stanju je bila tudi nižja od vrednosti v tako 0 % etanolu kot 30 % etanolu, kar kaže, da naraščajoča količina etanola dodatno upočasni reakcijo, razvidno iz tabel 4, 5 in 6. Enak trend je bil nakazan že s preliminarnimi testi, ki so bili opravljeni z večjim razponom koncentracij etanola in torej kaže še bolj splošen trend. Ugotovitve podpirajo teorijo iz študij, ki so jih opravili Temple in Ough, 1975 ter Delaune in Asayouri, 2021. Temple in Ough sta raziskovala vinske koncentracije etanola kot možni inhibitor katalaze, rezultati tega poskusa pa še dodatno potrjujejo, da koncentracije etanola dejansko zmanjšajo aktivnost katalaze. Temple in Ough sta tudi dokazala, da je spremembo v reakciji dejansko povzročil etanol, ne pa druge snovi v grozdju, kot so na primer tanini (Temple in Ough, 1975), ta raziskovalna naloga pa je tako ali tako uporabljala čisti etanol.

Hipotezo 3 je mogoče podpreti, vendar le s sklepanjem. Rezultati iz slike 4 ter tabel 5 in 6 kažejo, da se reakcijska hitrost nenehno povečuje in ne doseže enakega največjega tlaka kot reakcija brez etanola v tabeli 4. To sovпада s teorijo iz študije Robinson, 2015, ki kaže, da nekompetitivni inhibitorji nepovratno spremenijo encim, kar pomeni, da bo etanol zmanjšal možnost, da substrat doseže encim, ki ne bi imel zasedenega alosteričnega mesta. V tem eksperimentu, reakcije v obeh pogojih z etanolom (30 % in 60 %) sledijo enaki obliki krivulje kot graf aktivnosti katalaze brez etanola, kar je tudi v skladu s teorijo iz Robinson, 2015. Predlagano pa je, da bi morali grafi v višjih koncentracijah doseči ustaljenost (»plateau«), kar je le delno vidno. Zaradi popolne inhibicije v pogojih s 60 % etanolom je to neopazno, pri 30 % etanolu pa na to le namigujejo intervali napak in p-vrednosti T-testa. Za dodaten dokaz tej trditvi, bi morali izvesti poskus tudi na višjih koncentracijah substrata, kjer bi mogel biti prisoten trend nespremenjene hitrosti, ki se ne bi razlikovala od te pri 5 % substratu. V ta namen bi bila potrebna boljše oprema, ki je dovolj močna da preseže tlak, ki bi ga ustvaril tako koncentriran peroksid. Torej lahko le predvidevamo, da je etanol nekompetitiven, ne moremo pa glede na dane rezultate, vsaj ne posredno. Indirekten dokaz pa je lahko to, da gotovo ni kompetitiven, saj bi se mogla hitrost pri višjih koncentracijah substrata vztrajno eksponentno večati, kar pa se ni.

Potrjeno je torej, da je etanol zares inhibitor katalaze, čeprav mehanizem tega zaviranja reakcije ni zagotovo poznan. Vidno je tudi, da koncentracije nad 60 % v 10 mL reakcijski zmesi povzročijo popolno inhibicijo reakcije, kar ustreza celokupni 15 % koncentraciji etanola, kar se sklada s teorijo v uvodu. To je tudi približna koncentracija večine vin, zato se ugotovitve skladajo s študijo Temple in Ough, ki sta ugotovila, da katalazo inhibira že vinska koncentracija etanola.

5.2 Evalvacija metode in statistične zanesljivosti

- Merilna oprema: Temperatura je bila dobro nadzorovana tako z vodno kopeljo kot s termometrom (negotovost samo $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Tudi vsa ostala uporabljena oprema je bila čim bolj natančna kakor jo je možno pridobiti za biološki laboratorij; na primer uporaba avtomatske pipete namesto kapalk.
- Empirični podatki: Vsaka koncentracija je bila izmerjena petkrat, šestič pa še kot kontrolna (0 % raztopina), zaradi česar je bil poskus zelo kvantificiran in dal dovolj rezultatov za zanesljive meritve standardnega odklona in zagotovilo bolj zanesljivo povprečje.
- Meritev statistične zanesljivosti rezultatov: Za oceno zanesljivosti rezultatov sta bila uporabljena standardna deviacija (intervali napak na grafih) in T-test. Standardna odstopanja so bila razmeroma majhna, razen pri najvišjih koncentracijah, kjer se podatki običajno bolj svobodno porazdeljeni, intervali napak se tako prekrivajo le v primerih blizu »plateau«-ja encimske reakcije. Drugi T-testi so pokazali zanesljivost v vrednosti $p = 0,05$, kar je običajna p-vrednost v biologiji.
- Rezultati znanstvene skupnosti: Rezultati so skladni s prejšnjimi raziskavami na temo inhibitorjev katalaze in koncentracij etanola v vinu (omenjeni v 5.1 Sklepi).
- Nadzor pH: pH ni bil prilagojen ali nadzorovan s pufrom, saj bi ioni lahko motili reakcijo bolj kot bi pomagali ustvariti konstantne razmere (možno je, da bi ioni v pufru delovali kot inhibitorji). Merjenje pH je tako ali tako manjšega pomena, saj so vse snovi nevtralne, poleg tega pa je optimum katalaze pri približno $\text{pH} = 7$.
- Tlačni senzor: Zaradi zamude pri začetvi epruвет, je lahko začetna hitrost reakcije nižja od realne, saj je del plina mogoče ušel, vendar je to še vseeno najučinkovitejša metoda za merjenje encimske aktivnosti. Pri vsaki meritvi je bila epruveta v zaprta najkrajšem času, čeprav je lahko prišlo do zamude pri višjih koncentracijah, ko je reakcija bolj burna.

- Koncentracija katalaze: V vseh merjenjih je bila konstantna, vendar absolutne koncentracije za točno ta eksperiment ni mogoče določiti, saj se del govejih jeter morda ni v celoti pomešal z električnim mešalnikom, ali pa je delček jeter ostal na filtrirnem papirju ali v liju. Kljub temu pa je bila koncentracija v vseh primerih enaka, čeprav verjetno manjša od predvidenih 13 g/L.
- Merske napake: Naključne napake zaradi eksperimentatorja in sistematične napake zaradi merilne opreme so največje slabosti tega poskusa. Vse sistematske absolutne napake so podane pri vsakem materialu v sekciji 3.4 Materiali, seštete napake merjenja pa tudi v tabelah 4 – 6.
- Modeliranje grafov: Linearna regresija je bila uporabljena kot najpriročnejše orodje, ki ga ponuja Logger Pro, čeprav bi bila uporaba integralov ali regresije krivulje natančnejša.

5.3 Nadaljnjo delo in izboljšave

Število ponovitev bi lahko povečali, da bi dodatno zagotovili zanesljivost (10 – 15 ponovitev), pa tudi preizkusili reakcijo na še večjih koncentracijah substrata in etanola (10%, 20%, 40% etanola), saj bi to lahko dalo večji razpon podatkov in splošni trend čez velik razpon koncentracij, vendar je to delo izjemno zamudno.

Dodan bi lahko bil pufer in njegov vpliv na reakcijo opazovan, vendar bi to lahko delo še otežilo, saj bi bilo treba vse druge prostornine optimizirati, da ne bi ustvarili previsokih tlakov v epruveh, saj bi lahko eksplodirala.

Za ogled različnih katalazinih aktivnosti in njihovo primerjavo bi lahko uporabili več virov katalaze (kvas, krompir, jetra) in tudi več koncentracij, da bi se pokazalo še kako vpliva koncentracija encima (in ne le substrata in inhibitorja) na kinetiko reakcije. Iz tega je mogoče tudi določiti vsebnost katalaze v različnih rastlinskih in živalskih tkivih.

Za izboljšanje homogenosti raztopine se lahko namesto mešanja uporabi segrevanje ali centrifuga, da je koncentracija v reakciji karseda točna, lahko pa se uporabi tudi čisto komercialno prodajano katalazo.

6. VIRI IN LITERATURA

Amit, Z. in Aragon, C. M. G. (1988). *Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary ethanol consumption: possible evidence for a biological marker system of ethanol intake*. *Psychopharmacology*, 95(4). Pridobljeno 7. marca 2022 s

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00172965>

Benoit, S. L. in Maier, R. J. (2016). *Helicobacter Catalase Devoid of Catalytic Activity Protects the Bacterium against Oxidative Stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(45), str. 23366–23373.

Pridobljeno 5. septembra 2021 s [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)35618-0/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)35618-0/fulltext)

Biology For Life (2009). *T-test*. Biology For Life. Pridobljeno 3. decembra 2021 s

<https://www.biologyforlife.com/t-test.html>

Delaune, K. P. in Khalid Alsayouri (2019). *Physiology, Noncompetitive Inhibitor*. StatPearls.

Pridobljeno 3. decembra 2021 s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545242/>

Handler, J. A. in Thurman, R. G. (1990). *Redox Interactions between Catalase and Alcohol Dehydrogenase Pathways of Ethanol Metabolism in the Perfused Rat Liver*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(3), str. 1510–1515. Pridobljeno 9. decembra 2021 s

[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)40046-X/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)40046-X/pdf)

Keilin, D. in Hartree, E. F. (1934). *Inhibitors of Catalase Reaction*. *Nature*, str. 933–934. Pridobljeno

21. maja 2021 s <https://www.nature.com/articles/134933b0.pdf>

Nicholls, P., Fita, I. in Loewen, P. C. (2000). *Enzymology and structure of catalases*. *ScienceDirect*, vol.51, str. 51-106. Pridobljeno 21. junija 2021 s

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0898883800510010>

Robinson, P. K. (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays Biochem*, vol.59, str. 1–41. Pridobljeno 21. maja 2021 s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/>

Singh, R., Singh A. in Sachan, S. (2019). *Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes?* *Enzymes in Food Biotechnology*, Academic Press, str. 827–843. Pridobljeno 5. septembra 2021 s

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000487>

Temple, D. in Ough, C. S. (1975). *Inhibition of catalase activity in wines*. *Am. J. Enol. Viticult.*, vol.26,

št. 2, str. 92–96. Pridobljeno 21. maja 2021 s <https://www.ajevonline.org/content/26/2/92>

Encyclopedia Britannica (2017). *Catalase - Function & Applications*. *Encyclopædia Britannica*.

Pridobljeno 8. decembra 2021 s <https://www.britannica.com/science/catalase>.

<https://www.britannica.com/science/catalase>

Viri slik

Slika 1: https://genderi.org/delovanje-enostavnih-katalizatorjev/28759_html_78f3272e.png

[pridobljeno 8. marca 2022]

Slika 2: Robinson, P. K. (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays Biochem*, vol.59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/figure/F11/> [pridobljeno 8. marca 2022]