

Biologické oxidace

Praktické cvičení z lékařské biochemie

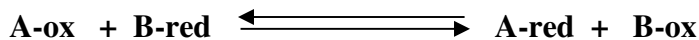
Všeobecné lékařství

Jan Pláteník, Martin Vejražka, Tomáš Navrátil,
Jiří Kraml



2025/2026

Oxidace znamená ztrátu elektronů (případně celých vodíků – dehydrogenace, nebo příjem kyslíku, oxidační číslo stoupá), naopak **redukce** znamená příjem elektronů (případně celých vodíků – hydrogenace, nebo ztrátu kyslíku, oxidační číslo klesá). Protože elektrony ani atomy vodíků se za běžných podmínek nevyskytují volně, oba procesy jsou zpravidla spřaženy a vytvářejí oxidoredukční (redoxní) reakci:



Jestliže se jedna látka oxiduje, jiná se zároveň redukuje. Mluvíme o **redoxních párech** (A-ox/A-red, B-red/B-ox dle uvedené rovnice), obdobě konjugovaných párů acidobazických dějů (kde ovšem jde o přenos protonů).

Tendence redoxních párů předávat si elektrony je dána tím, jak jednotlivé látky elektrony přitahují, jinými slovy rozdílem jejich **redoxních potenciálů**. Přenos elektronů probíhá vždy jen ve směru od nižšího (numericky negativnějšího) redoxního potenciálu směrem k pozitivnějšímu.

Pokud nějaké dva redoxní páry od sebe fyzicky oddělíme a umožníme jim redoxní reakci (výměnu elektronů) pouze kovovým vodičem, tedy spojíme je do **galvanického** nebo **redoxního článku**, jejich rozdíl redoxních potenciálů se manifestuje jako elektrické napětí, které je možné přímo změřit, případně lze samozřejmě takový článek využít jako chemický zdroj elektrické energie.

Enzymaticky katalyzované redoxní reakce jsou v metabolismu živých organismů neobyčejně časté. Jednotlivé oxidoredukční děje plní řadu funkcí, ale minimálně v případě živočišných organismů oxidoredukce především představují **základní zdroj energie**. Podstatou našeho katabolismu je štěpení a oxidace látek přijatých potravou (cukry, tuky, bílkoviny) na jednodušší produkty. Ty mají menší obsah energie než výchozí reagující látky, získaná energie se uvolňuje jako teplo, ale část je transformována na jiné, lépe využitelné formy energie, jako jsou iontové gradienty na membránách nebo chemické vazby. Četné oxidace jsou spojeny s tvorbou **makroergních fosfátových anhydridů (ATP, ADP)**, zvláště důležitých při konzervaci a přenosu buněčné energie.

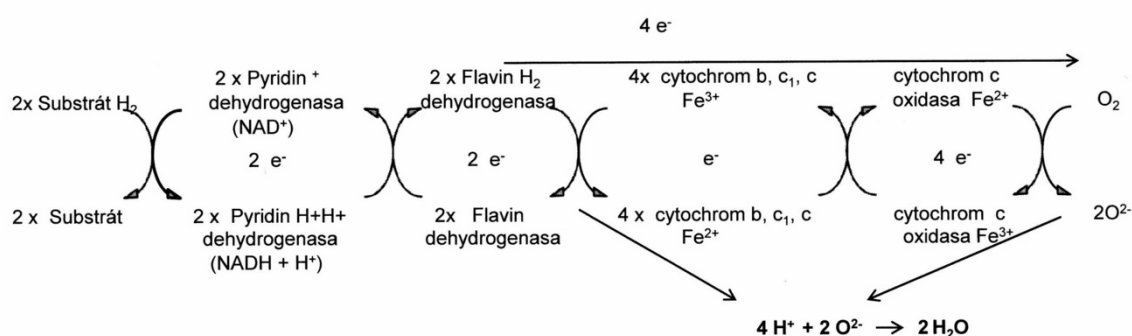
Biologické oxidoredukce mohou probíhat **anaerobně**, např. v glykolýze, nebo **aerobně**, např. při oxidaci substrátů citrátového (Krebsova) cyklu nebo β -oxidaci mastných kyselin v mitochondriích. Aerobní průběh znamená **využití kyslíku jako terminálního akceptoru elektronů**. Kyslík je prvek s druhou nejvyšší elektronegativitou vůbec (po fluoru), takže přenos elektronů z organických látek na kyslík je z hlediska rozdílů redoxních potenciálů velmi preferován a poskytuje ohromné množství energie. Zároveň ale se v elektronové struktuře běžné molekuly kyslíku skrývá kinetická bariéra (tzv. spinová restrikce), která za běžných podmínek činí kyslík mnohem méně reaktivní, než by mohl být. Znamená to, že přenos elektronů na kyslík vyžaduje vhodné katalyzátory, a lze ho tedy i kontrolovat. Kombinace obou uvedených faktorů – vysoký výtěžek energie a zároveň možnost kontroly – je základním důvodem, proč je aerobní metabolismus tak výhodný a pro komplexní organismy, jako jsme my, vlastně představuje jedinou známou možnost.

Aerobní oxidace různých látek v organismu se často prezentuje jako „spalování živin“ a v principu je to správně – základními konečnými produkty aerobních oxidací v organismu jsou **oxid uhličitý** a **voda**, stejně jako při přímém hoření. Na rozdíl od jednoduchého spalování ale oxidace v organismu probíhají rozděleny do mnoha kroků, což mimo jiné právě umožňuje

významnou část získané energie zachytit v ušlechtilější podobě ‚makroergních‘ sloučenin.

Hlavním zdrojem energie v podobě ATP je pro nás mitochondriální mašinerie **oxidační fosforylace**. Je to terminální fáze katabolismu živin. Předchozí procesy vedly k úplné oxidaci uhlíkatých skeletů na oxid uhličitý se zachycením elektronů do redukovaných redoxních kofaktorů, především $\text{NADH} + \text{H}^+$, případně FADH_2 . V konečné fázi katabolismu tyto redukované kofaktory odevzdávají elektrony **respiračním komplexům dýchacího řetězce** ve vnitřní mitochondriální membráně, které je předávají dál až na kyslík. Přímo s kyslíkem ovšem pracuje pouze poslední komplex IV (cytochrom-oxidáza), který odnímá elektrony redukovanému cytochromu c a postupně redukuje kyslík až na vodu.

Schematicky lze přenos elektronů v dýchacím řetězci znázornit takto:



Elektrony v dýchacím řetězci proudí **spontánně**, dle rozdílů redoxních potenciálů jednotlivých redoxně aktivních skupin. Z důvodů strukturních rozdílů mezi redoxními přenašeči jsou v některých fázích elektrony doprovázeny protony (tj. přenášejí se celé vodíkové atomy), zatímco v jiných částech dýchacího řetězce putují pouze samotné elektrony. Střídání těchto dvou strukturních typů a jejich uspořádání ve vnitřní membráně jsou základním důvodem, proč respirační komplexy dýchacího řetězce zároveň s přenosem elektronů **pumpují protony** zevnitř mitochondrie do mezimembránového prostoru. Tím na vnitřní mitochondriální membráně vzniká **protonový gradient**, a snaha protonů se vracet přes ATP syntasus pohání **syntézu ATP**.

V našem praktickém cvičení si nejprve sestavíme klasický Daniellův galvanický článek, který umožňuje zviditelnit a změřit hybnou sílu všech redoxních reakcí, tedy redoxní potenciál. Ve druhé úloze si ověříme, že se interakce mezi kovy a jejich ionty skutečně řídí umístěním v elektrochemické řadě, v níž jsou jednotlivé redoxní páry seřazeny dle svých standardních redoxních potenciálů.

Třetí úloha představuje jednoduchý model redoxní reakce ve zkumavce, totiž oxidoredukci glukosy vzdušným kyslíkem za katalýzy methylenovou modří, která bude fungovat jako dočasný akceptor elektronů. Z respiračních mitochondriálních enzymů bude ukázáno alespoň enzymové působení cytochromoxidasy přítomné spolu s cytochromem c v homogenátu hovězího srdce.

Vedle dehydrogenas a cytochromů katalyzují redoxní reakce také např. peroxidasa a katalasa. Oba tyto enzymy rozkládají peroxid vodíku. Ukážeme si působení peroxidasy extrahované z brambor, dále katalasy v krvi a rovněž neenzymovou katalýzu krevním barvivem, která připomíná účinek peroxidasy (tzv. pseudoperoxidasová reakce, významná jako průkaz krve v moči).

Úloha 1: Elektrochemický článek

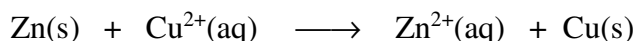
Princip:

Pro vysvětlení elektrochemického potenciálu nejprve uvažujme zcela jednoduchý systém sestávající z kovové, např. zinkové tyčinky umístěné do roztoku nějakého elektrolytu, např. NaCl. Ačkoliv zinek není nijak významně rozpustný v roztoku NaCl, přece jen nějaké atomy kovu vstoupí do roztoku jako kationty Zn^{2+} , zanechávající své původní elektrony v kovové tyčince.

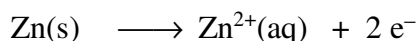
V rovnovážném stavu se tak na ponořeném povrchu kovové tyčinky utvoří elektrická dvojvrstva oproti okolnímu roztoku nabitá negativně. Tyčinka (elektroda) získala **elektrodový potenciál**, kterému můžeme též říkat **redoxní potenciál**, neboť ho vytvořilo rozpouštění kovu, které zahrnovalo jeho oxidaci (ztrátu elektronů, $\text{Zn} \rightarrow \text{Zn}^{2+} + 2\text{e}^-$).

Nyní uvažujme, že do nádoby s NaCl a Zn elektrodou bychom přidali tyčinku z jiného kovu, např. z mědi. Mohla by se také rozpouštět a tvořit ionty Cu^{2+} , ale bude tak činit mnohem méně než zinková tyčinka, neboť ve srovnání se zinkem má měď vyšší redoxní potenciál (tj. více přitahuje elektrony). Znamená to, že zinková elektroda bude ve srovnání s měděnou tyčinkou negativně nabitá. Když obě tyčinky vodivě propojíme kovovým drátem, elektrony zinku mohou proudit k mědi, která je přitahuje více – vytvořili jsme **galvanický článek**.

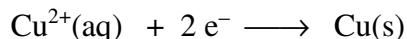
Mnohem více elektrické energie lze získat, pokud se takový galvanický článek sestaví ze dvou částí, jedna obsahuje elektrodu Zn v roztoku Zn^{2+} , zatímco druhá se skládá z Cu elektrody v roztoku Cu^{2+} . Pokud jsou obě poloviny spojeny solným můstkem (umožňuje přesun iontů, ale nikoliv promíchání obou roztoků), a elektrody se propojí vodivým drátem, redoxní reakce mezi zinkem a mědí



se rozběhne naplno, ovšem oxidace a redukce jsou fyzicky odděleny. Na Zn elektrodě (anodě) probíhá oxidace



zatímco na měděné tyčince (kathodě) se odehrává redukce



Elektrony musí v tomto uspořádání proudit drátem spojujícím obě elektrody. Připojíme-li voltmetr, rozdíl redoxních potenciálů mezi redoxními páry Zn/Zn^{2+} a Cu/Cu^{2+} můžeme přímo změřit. Elektrické akumulátory či baterie používají nejrůznější komponenty a uspořádání, ale všechny jsou vlastně založeny na tomto principu.

Reagencie a pomůcky:

1. Analogový voltmetr HD-075 1 V
2. Měděný drát a pozinkovaný ocelový drát (každý asi 15 cm dlouhý)

3. 1 mol/l CuSO_4 

4. 1 mol/l ZnSO_4



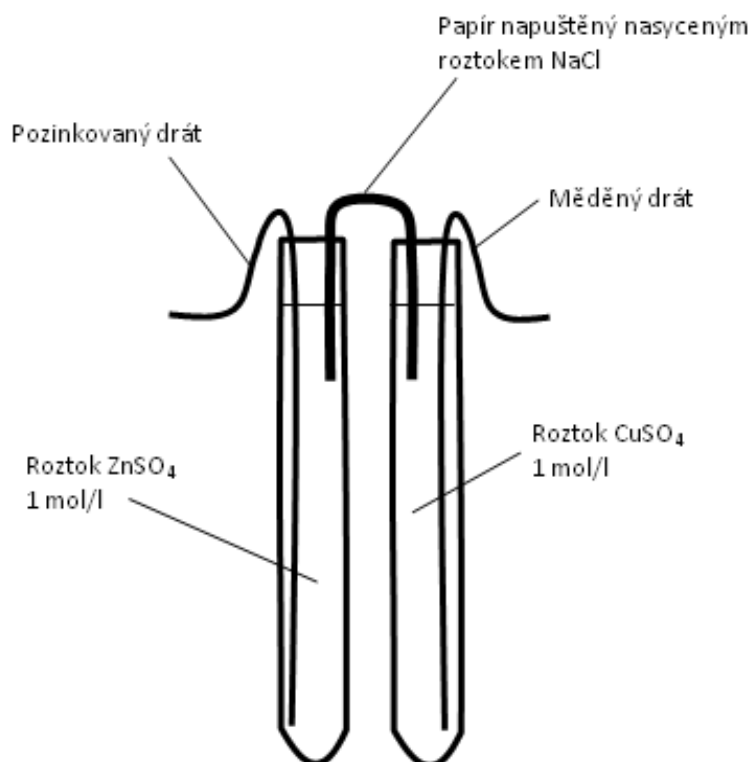
5. Nasycený vodný roztok NaCl

6. Vodiče s banánky a krokosvorky, zpevněný papír pro vytvoření můstku

7. Smirkový papír

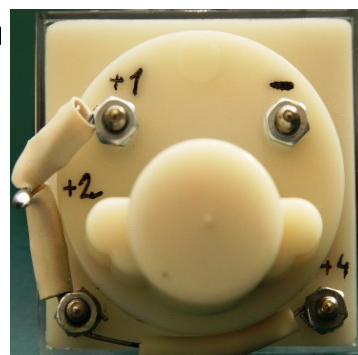
Pracovní postup:

1. Sestavte tzv. Daniellův elektrochemický článek.



- Do stojánku na zkumavky vložte do sousedních pozic dvě zkumavky, jednu téměř naplněnou roztokem síranu měďnatého (1 mol/l), druhou roztokem síranu zinečnatého (1 mol/l).
- Elektrolyty v obou zkumavkách vodivě spojte solným můstkem: z pevného a dobře savého papíru (např. odstřížek papírového ručníku) sviňte tyčinku a dokonale ji zvlhčete nasyceným roztokem chloridu sodného. Jeden konec vložte do roztoku síranu měďnatého, druhý do roztoku síranu zinečnatého.
- Do zkumavky se síranem měďnatým vložte měděnou elektrodu, do zkumavky se síranem zinečnatým zinkovou elektrodu (pozinkovaný ocelový drát). Elektrody se nesmí dotýkat solného můstku. Elektrody musí být dokonale čisté; v případě potřeby je možné je očistit smirkovým papírem nebo zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (pozor, nesmí se poškodit vrstva zinku na zinkové elektrodě).

2. Pomocí vodičů s krokosvorkami připojte voltmetr. Měděnou elektrodu připojte k pozici „+1“, zinkovou k pozici „-“



Čelní pohled (vlevo) a zadní pohled (vpravo) na analogový voltmetr HD-075 1 V. Konektory na zadní straně přístroje jsou určeny k připojení krokosvorek pro jednotlivé měřicí rozsahy – potenciálově negativnější ke konektoru „-“; potenciálově pozitivnější ke konektorům „+1 V“, „+2 V“, „+3 V“ a „+4 V“.

3. Odečtete napětí článku. S pomocí tabulky standardních redoxních potenciálů u následující úlohy vypočtete, jaké napětí by článek měl při 100% účinnosti.
4. Vyjměte elektrody, opláchněte je destilovanou vodou a dobře osušte. Pak je vložte do elektrolytů obráceně, tj. měděná elektroda bude ponořena v roztoku síranu zinečnatého, zinková v roztoku síranu měďnatého. Změřte napětí takto uspořádaného článku. Pozorujte, zda v tomto uspořádání dojde k nějakým změnám na elektrodách. Sledujte, zda se napětí na článku mění v čase.

Úloha 2: Elektrochemická řada kovů

Princip:

Uspořádání jako v předchozím experimentu, tedy propojení dvou redoxních párů do elektrochemického článku umožňuje měřit rozdíl redoxních potenciálů pro jakékoliv kombinace redoxních párů. Pokud se měří za určitých standardizovaných podmínek (mj. aktivita rozpuštěných kovových iontů 1 mol/l) a proti vždy stejné referenční elektrodě, lze pro každý redoxní pár zjistit hodnotu jeho standardního redoxního potenciálu. Za referenční systém, jehož hodnota standardního redoxního potenciálu se bere jako nula, byla zvolena vodíková elektroda (platinový plíšek ponořený do roztoku s aktivitou H^+ 1 mol/l, nad nímž je prostor vyplněn plynem H_2 o tlaku 101,325 kPa).

Redoxní páry lze seřadit do tabulky dle hodnot svých standardních redoxních potenciálů. Získáme tzv. elektrochemickou řadu, která nám umožňuje předpovědět, které redoxní reakce budou probíhat. Platí, že čím je standardní redoxní potenciál zápornější, tím snadněji daný redoxní pár odevzdává elektrony (sám se oxiduje) a má výraznější redukční vlastnosti. Naopak kladný redoxní potenciál znamená větší schopnost přijímat elektrony, tedy

se sám redukovat a vystupovat jako oxidační činidlo. Kterýkoliv pár v elektrochemické řadě je schopen oxidovat látky nacházející se na něm a naopak bude redukovat látky, které jsou v řadě pod ním.

V tomto experimentu vyzkoušíte několik kombinací kovu a rozpustné soli (tedy oxidované formy) jiného kovu. Případná redoxní reakce bude viditelná jako depozice kovu z roztoku na povrchu drátu. Bude probíhat jen v některých případech.

Reagencie a pomůcky:

1. Petriho misky
2. Měděný drát (asi 5 cm)
3. Pozinkovaný ocelový drát (asi 5 cm)
4. Stříbrný drát (asi 5 cm)

5. 2 mol/l AgNO_3



6. 1 mol/l CuSO_4



7. 1 mol/l ZnSO_4



Standardní redoxní potenciály	
Redoxní pár	E° (V)
Na/Na^+	– 3.02
Al/Al^{3+}	– 1.66
Zn/Zn^{2+}	– 0.76
Fe/Fe^{2+}	– 0.44
Sn/Sn^{2+}	– 0.14
Pb/Pb^{2+}	– 0.13
H_2/H^+	0.00
Cu/Cu^{2+}	+ 0.34
$2\text{Hg}/\text{Hg}_2^{2+}$	+ 0.80
Ag/Ag^+	+ 0.81
Pt/Pt^{2+}	+ 1.20
Au/Au^{3+}	+ 1.42

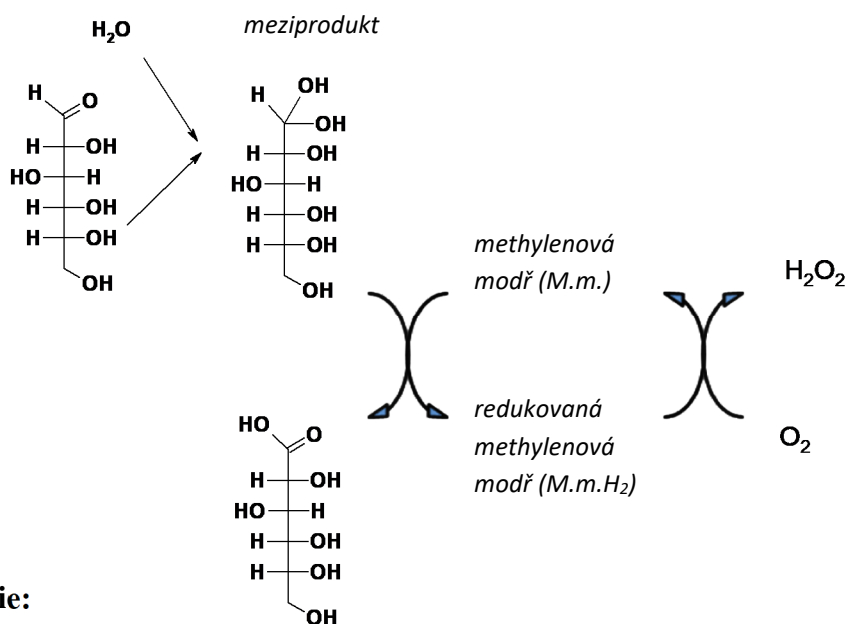
Pracovní postup:

Sledujte, jaké děje probíhají na povrchu pozinkovaného, měděného nebo stříbrného drátu po ponoření do roztoků kovových iontů (Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ag^+). Použijte vždy asi 5 cm dlouhý kus drátu. Jeho konec očistěte ponořením do zředěné kyseliny chlorovodíkové a pak jej ponořte asi na 30 s do misky s roztokem vybraného kovového kationtu. Po celou dobu s drátem intenzivně míchejte. Pozorujte, zda na ponořeném konci drátu probíhají nějaké změny. Postupně takto ponořte drát z každého kovu do roztoků všech kovových iontů.

Úloha 3: Oxidace glukosy vzdušným kyslíkem

Princip:

Tento pokus je modelem oxidoredukčního systému, kde akceptorem vodíku je autooxidabilní barvivo methylenová modř, donorem redukčních ekvivalentů je glukosa, která se oxidaže. Methylenová modř je ve stavu oxidovaném modrá, redukcí přechází v bezbarvou ‚leukoformu‘. Reakcí se vzdušným kyslíkem (protřepáním) opět zmodrá.



Reagencie:

1. Glukosa 2,5 g/l
2. Methylenová modř 0,5 g/l

3. Hydroxid sodný 80 g/l



Pracovní postup:

- a.* 1 ml roztoku glukosy smíchejte ve zkumavce s 50 µl roztoku methylenové modři, přidejte 3 kapky roztoku NaOH a zahřejte ve vroucí vodní lázni. Modrý roztok methylenové modři (M.m.) je hydrogenován na bezbarvou leukoformu (M.m.H₂).
- b.* Souběžně zpracujte kontrolní vzorek. Místo glukosy napipetujte 1 ml deionizované vody.
- c.* Zkumavky ochlaďte a protřepejte na vzduchu (oxidace).
- d.* Porovnejte průběh reakce v obou zkumavkách a vysvětlíte rozdíl.

Úloha 4: Cytochromoxidasa

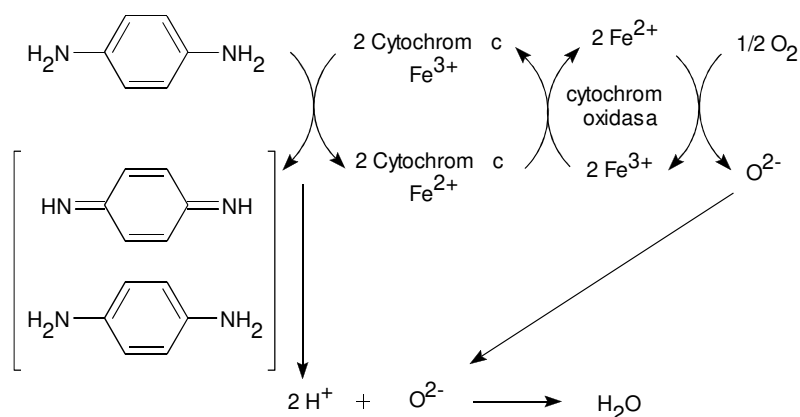
Princip:

Cytochrom *c*-oxidasa (EC 1.9.3.1) oxiduje redukovaný cytochrom *c* a je posledním stupněm řetězového oxidačního pochodu ve vnitřní mitochondriální membráně. Reaguje přímo s molekulou kyslíku O_2 , přenáší na ni postupně 4 elektrony ze čtyř molekul redukovaného cytochromu *c* a redukované kyslíkové atomy vázané na aktivní centra enzymu (hem a_3 a Cu_B) reagují s H^+ ionty poskytovanými z mitochondriální matrix za vzniku 2 molekul H_2O .

Cytochromoxidasa (komplex IV respiračního řetězce) je enzymový komplex vázaný ve vnitřní mitochondriální membráně a sestávající ze 13 podjednotek, jejichž syntéza je řízena jak jadernou, tak mitochondriální DNA (3 podjednotky). Obsahuje 2 centra obsahující 3 ionty mědi (Cu_A/Cu_A a Cu_B) a dvě prostetické skupiny hemového typu *a* ($a + a_3$) s koordinačně vázaným železem. Oba hemy jsou strukturou totožné, rozdílné chemické a spektrální vlastnosti jim propůjčuje jejich okolí v aktivním centru enzymu. Celý komplex IV funguje současně jako jedna ze tří protonových pump v respiračním řetězci vnitřní mitochondriální membrány (spolu s komplexem I a III) a redukce O_2 na H_2O je tedy provázena vypuzením 4 protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru.

Enzym je významně inhibován kyanidem a oxidem uhelnatým, které reagují s hemem a_3 a Cu_B a brání jejich redoxnímu cyklování a tedy i přenosu elektronů z dýchacího řetězce na kyslík. Zastavení dýchacího řetězce zabrání i mitochondriální produkci ATP s dramatickými důsledky pro všechny aerobní tkáně.

V našem modelovém pokusu slouží 1,4-fenylendiamin jako donor elektronů pro redukci cytochromu *c*, který je vlastním substrátem cytochromoxidasu. Cytochrom *c* je obsažen v enzymovém extraktu z hovězího srdce spolu s cytochromoxidasou, která je velmi specifická a může přijímat elektrony pouze od redukovaného cytochromu *c*. Látka 1,4-fenylendiamin nám vlastně nahrazuje proximální části dýchacího řetězce, navíc oxidovaná forma 1,4-fenylendiaminu dává s další molekulou hnědočervené barvivo. Bude též ukázána inhibice cytochromoxidasu kyanidem.



Reagencie:

1. Enzymový extrakt z hovězího srdce

2. Kyanid draselný 10 g/l



3. 1,4-fenylendiamin (1,4-diaminobenzen) 1 g/l



Pracovní postup:

a. Reakční směs připravte podle tohoto schématu:

Pozn. * ve zkumavce 4 vzorek naředěný deionizovanou vodou povařte 5 min. ve vroucí vodní lázni a ochlaďte. Až po ochlazení přidejte 1,4-fenylendiamin

	1	2	3	4
Enzymový extrakt (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8*
Deionizovaná voda (ml)	2,0	1,8	1,6	1,8*
KCN (jed!) (ml)	-	-	0,2	-
1,4-fenylendiamin (ml)	-	0,2	0,2	0,2

b. Vložte do suchého bloku temperovaného na 37°C a za 10-20 minut zhodnoťte zabarvení.

Vyhodnocení:

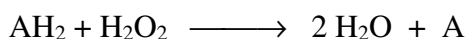
Výsledek ve zkumavce č. 2 popište a srovnajte s výsledky ve zkumavce 1,3 a 4. Vysvětlete výsledky.

Úloha 5: Peroxidas a katalasa

Princip:

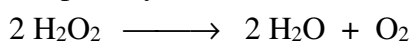
Peroxid vodíku, H_2O_2 je celkem běžný produkt normálního buněčného metabolismu. Vzniká enzymatickými i neenzymatickými pochody (jako jedna z tzv. reaktivních forem kyslíku) a v nějaké míře organismu slouží jako oxidační činidlo a signální molekula, zároveň je ale třeba ho stále odstraňovat enzymy a substráty antioxidační ochrany. Používají či detoxikují ho enzymy zvané peroxidasy a katalasy. Patří do skupiny hemových enzymů (hemoproteinů). Průběh reakce je u obou enzymů rozdílný.

Peroxidasy katalyzují redukci peroxidu vodíku na vodu za současné oxidace jiného substrátu:



Tyto enzymy jsou obsaženy v rostlinných i živočišných organismech. Některé z našich peroxidas považujeme za antioxidační enzymy, jako např. *glutathionperoxidasa* v našich buňkách odstraňuje peroxid vodíku za současné oxidace tripeptidu glutathionu. U jiných peroxidas lze spíše říci, že používají peroxid vodíku k získání oxidované formy jiné látky, např. *thyreoperoxidasa* ve štítné žláze s pomocí peroxidu vodíku oxiduje jodidový anion I^- na jodonium I^+ , potřebný pro jodaci thyreoglobulinu.

Katalasa na rozdíl od peroxidas rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík bez potřeby dalšího substrátu:



Enzym má i peroxidasovou aktivitu. Vyskytuje se ve větším nebo menším množství ve všech tkáních (v buněčných organelách zvaných peroxisomy) a v tekutinách organismu. Vysoká aktivita je též v erythrocytech. Tento enzym je součástí antioxidační ochrany organismu, jeho význam tkví v rozkladu škodlivého H_2O_2 .

Reagencie:

1. Extrakt z brambor obsahující peroxidasu
2. Moč s krví
3. Krev zředěná vodou 1 : 50

4. 3,3'-dimethylbenzidin (tolidin)



5. Koncentrovaná kyselina octová



6. Peroxid vodíku 3 g/l

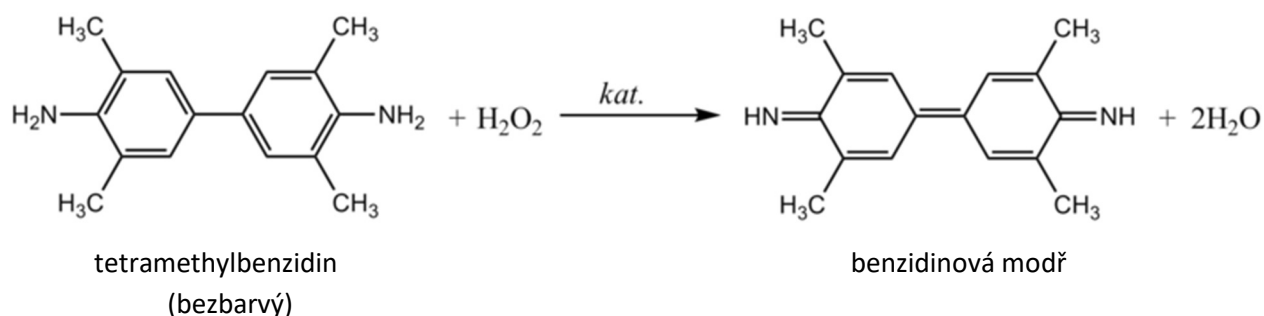
7. KCN 10 g/l



5.1 Důkaz peroxidasy benzidinovou reakcí

Princip:

Peroxidasy mohou být vzhledem ke svému druhému substrátu poměrně málo specifické, lze tedy zvolit takový substrát, který oxidací získává barevnost. V tomto cvičení bude prokazována aktivita rostlinné peroxidasy z brambor kvalitativně oxidací derivátu benzidinu (3,3'-dimethylbenzidin, tolidin), který se působením peroxidasy a peroxidu vodíku oxiduje na barevný produkt.



Tetramethylbenzidin. In *WikiSkripta* [online]. Praha : MEFANET, 2008- [cit. 2012-01-05].

Dostupné z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Tetramethylbenzidin&oldid=109016>>. ISSN 1804-6517.

Pracovní postup:

a. Rozpusťte několik krystalů tolidinu v cca 1 ml koncentrované kyseliny octové.

b. Reakční směsi připravte do 4 zkumavek takto:

Pozn. * ve zkumavce 2 extrakt z brambor povařte 5 min ve vroucí vodní lázni a ochlaďte.

	1	2	3	4
Extrakt z brambor	1,0 ml	-	-	1,0 ml
Extrakt z brambor povařený	-	1,0 ml*		
Deionizovaná H₂O	-	-	1,0 ml	100 µl
H₂O₂	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Tolidin v kyselině octové	100 µl	100 µl	100 µl	-

Vyhodnocení:

Porovnejte výsledek ve zkumavce č. 1 se zkumavkami č. 2, 3 a 4. Vysvětlete rozdíly.

5.2 Pseudoperoxidasová reakce

Princip:

Výše uvedenou barevnou reakci na peroxidasu dává také krevní barvivo, tedy i hemoglobin katalyzuje oxidaci derivátu benzidinu peroxidem vodíku na barevný produkt. V tomto případě ale nejde o skutečný enzym, ke katalýze redoxní reakce stačí železo v hemové skupině hemoglobinu. Nejde tedy o pravou peroxidasu a hovoříme o tzv. aktivitě **pseudoperoxidasové**. Rozdíl je patrný po povaření vzorku. Zatímco tepelná denaturace pravé peroxidasy zničí, pseudoperoxidasová aktivita hemoglobinu zůstává.

Tato katalytická aktivita hemoglobinu je základem testů na **přítomnost krve v moči**. Zkouška je totiž neobyčejně citlivá a detekuje i příměs krve pouhým okem neviditelnou. Využívá se jako důkaz krve i v kriminalistice.

Pracovní postup:

- Moč obsahující krev si rozdělte na 2 části.
- Jeden díl zahřejte na vroucí vodní lázni k varu.
- Obě moče přefiltrujte.
- Na každý filtrační papír dejte několik kapek roztoku toluidinu v koncentrované kyselině octové (viz předchozí pokus) a poté peroxid vodíku.

Vyhodnocení:

Srovnajte výsledek obou zkoušek s pokusem 5.1. V čem spočívá rozdíl obou pokusů a co tento rozdíl ukazuje?

5.3 Důkaz katalasy

Kvalitativní průkaz katalasy provedeme se zředěnou krví. Ředění vodou vedlo k osmotické lýze erytrocytů, bohatých na antioxidační enzymy včetně katalasy. Po přidání H_2O_2 je jedním z produktů jeho rozkladu katalasou plynný O_2 , jehož vývin spolu s přítomnými proteiny krve vede k tvorbě bohaté pěny. Katalasa je skutečný enzym, takže tepelná denaturace by měla jeho aktivitu ničit. Je též inhibován vazbou kyanidu na hemovou funkční skupinu.

Pracovní postup:

Reakční směs připravte podle tohoto schématu:

Pozn. * ve zkumavce 3 krev ředěnou 1 : 50 povařte 5 min ve vroucí vodní lázni a ochlad'te

	1	2	3
Ředěná krev 1 : 50	2 ml	2 ml	-
Povařená ředěná krev 1 : 50			2 ml*
KCN 10 g/l (jed)	-	0,5 ml	-
Deionizovaná H_2O	0,5 ml		0,5 ml
H_2O_2	1 ml	1 ml	1 ml

Vyhodnocení:

Porovnejte výsledek ve zkumavce č. 1 s výsledky ve zkumavkách č. 2 a 3, proveďte rozbor pokusu a vysvětlete.