

OBSERVAȚIE. Pentru exactitatea rezultatelor se recomandă ca v să fie apropiat de jumătatea valorii lui V . Dacă v este mai mic de 3 ml soluție de tiosulfat de sodiu se va lua un volum mai mic de extract enzimatic sau acesta se va dilua în mod corespunzător.

I.3.4.2.3. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei (metoda Sinha)

Principiul metodei. Catalaza este lăsată să acționeze asupra apei oxigenate o perioadă fixă de timp, după care enzima este inactivată prin adăugarea unui amestec de bicromat de potasiu-acid acetic. Cantitatea de apă oxigenată, rămasă nedescompusă după stoparea acțiunii catalazei, reduce în mediul acid bicromatul de potasiu la acetat cromic, care poate fi determinat spectrofotometric la 570 nm. Deoarece bicromatul de potasiu nu absoarbe la această lungime de undă, prezența lui în mediul de reacție nu interferează cu determinarea spectrofotometrică a acetatului cromic.

Făcând diferența între cantitatea inițială și cea finală de apă oxigenată în mediul de reacție, se află cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază.

Reactivi. 1) *Soluție de bicromat de potasiu 5 %.* Se dizolvă 5 g de bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

2) *Soluție bicromat de potasiu-acid acetic glacial.* Se amestecă 20 ml soluție de bicromat de potasiu 5 % cu 60 ml acid acetic glacial.

3) *Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7,0.* Se dizolvă 0,2654 g KH_2PO_4 și 0,5312 g K_2HPO_4 în 300 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 500 ml. Se corectează pH-ul la 7,0 și se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

4) *Soluție substrat de apă oxigenată 0,16 M în soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7.* Se diluează 1,8133 ml apă oxigenată concentrată (30 %) cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M la 100 ml într-un balon cotat.

5) *Soluție etalon de apă oxigenată 0,08 M în soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7.* Într-un balon cotat de 100 ml se pipetează 0,907 ml de apă oxigenată concentrată (30 %) și se completează la semn cu soluție tampon de fosfați de potasiu (Reactiv 3).

6) *Soluție de fosfat disodic 0,1 M* (vezi Reactiv 1, *Lucrarea I.3.8.2.2*).

Modul de lucru. A) **EXTRACȚIA CATALAZEI.** O cantitate de 0,1 – 1 g de țesut animal sau vegetal se omogenizează cu sticlă pisată sau nisip de curăț și 5 ml de soluție de fosfat disodic 0,1 M. După 30 minute de extracție, omogenatul se centrifughează la 4000 rot./min., timp de 15 minute. Supernatantul separat servește ca sursă de catalază.

B) **DETERMINAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI.** În trei eprubete termorezistente – două probe și un martor - se pipetează reactivii indicați în tabelul următor:

Specificație	Probă	Martor
Preparat catalazic (supernatant) , ml	0,1	-
Soluție tampon fosfați de potasiu, ml	0,4	0,4
Soluție substrat de apă oxigenată, ml	0,5	0,5

După exact (!!) 60 secunde de la pipetarea soluției substrat de apă oxigenată se stopează reacția în una din probe și după 120 secunde în cealaltă probă, prin adăugarea a câte 2 ml de soluție bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2). În martor se pipetează 2 ml soluție de bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2) și 0,1 ml preparat catalazic.

Toate eprubetele se introduc în baie de apă la fierbere, timp de 10 minute. Apoi eprubetele se răcesc sub jet de apă și se citesc extincțiile lor la 570 nm, față de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Activitatea catalazei se exprimă în unități enzimatic (UE). O unitate de catalază reprezintă cantitatea de enzimă care descompune un micromol de apă oxigenată (0,034 mg) în timp de un minut la temperatura de 20°C și pH=7. Pentru aflarea micromolilor de apă oxigenată, se construiește o curbă etalon cu ajutorul soluției etalon de apă oxigenată (80 micromoli/ml), realizând diluții conform tabelului.

Micromoli H ₂ O ₂ / ml	Soluție etalon de H ₂ O ₂ (ml)	Soluție tampon fosfați de potasiu (ml)
8	0,1	0,9
16	0,2	0,8
24	0,3	0,7
32	0,4	0,6
40	0,5	0,5
48	0,6	0,4
56	0,7	0,3
64	0,8	0,2
72	0,9	0,1
80	1,0	0

În fiecare etalon se măsoară câte 2 ml soluție bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2) și eprubetele se mențin în baie de apă la fierbere timp de 10 minute. Apoi se răcesc sub jet de apă și se citesc extincțiile la 570 nm, față de apă distilată.

După aflarea micromolilor de apă oxigenată corespunzători probelor și martorului, se calculează activitatea catalazei în micromoli de apă oxigenată descompusă într-un minut de enzima dintr-un gram de țesut analizat sau dintr-un ml de sânge (în acest caz se va lucra cu sânge hemolizat diluat, conform indicațiilor de la *Lucrarea I.3.8.2.1*) sau dintr-un ml de lichid de cultură.

Dacă 1 UE reprezintă 1 micromol de apă oxigenată, atunci diferența dintre numărul micromolilor de apă oxigenată din martor ($n_1 = 80$ micromoli de apă oxigenată corespunzători la 0,5 ml soluție de apă oxigenată 0,16 M) și numărul de micromoli de apă oxigenată rămași nedescompuși în probă (n_2) după inactivarea catalazei cu soluție de bicromat de potasiu-acid acetic, ne va da X UE.

Valoarea n_2 se poate afla din curba etalon sau din raportul extincțiilor martorului și probei: $E_M / E_P = 80 / n_2$, de unde $n_2 = E_P \cdot 80 / E_M$.

Numărul X de UE, adică numărul micromolilor de apă oxigenată descompuși în timp de un minut de catalaza dintr-un gram de țesut animal sau vegetal se calculează cu formula:

$$X = \frac{(n_1 - n_2) \cdot 5}{t \cdot 0,1 \cdot p} = \frac{(80 - n_2)}{t \cdot p} \times 50, \text{ unde:}$$

t – timpul de incubație, în minute;

p – greutatea materialului biologic, luat pentru analiză, în g.

Activitatea specifică a catalazei se calculează prin raportarea numărului de micromoli de apă oxigenată/minut la numărul mg de proteină existent în extractul enzimatic sau serul sanguin sau lichidul de cultură.