

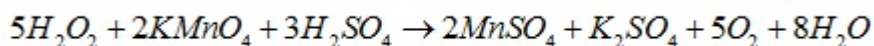
## Лабораторная работа №7

### Определение активности каталазы титриметрическим методом анализа

*Цель работы:* определить активность каталазы с помощью титриметрического метода анализа.

*Каталаза* (гидроген-пероксид-оксидоредуктаза, код по систематическому каталогу EC1.11.1.6) – фермент, обнаруженный в клетках практически всех аэробных организмов. Наряду с разложением перекиси водорода и тем самым защитой клетки от её токсического воздействия, фермент катализирует целый ряд метаболически значимых реакций.

*Принцип метода:* Каталаза, содержащаяся в растительном или животном материале, способна разлагать перекись водорода. При добавлении серной кислоты реакция разложения перекиси прекращается.



*Реактивы:* 0,1 н раствор  $KMnO_4$ , 10%  $H_2SO_4$ ,  $Na_2CO_3$ , 0,1 н раствор  $H_2O_2$ , растительный или животный материал, содержащий каталазу (морковь, картофель, сырая куриная или говяжья печень).

*Оборудование и посуда:* электроплита, ступка и пестик, шпатель, мерная колба на 100 мл, водяная баня, бумажный фильтр, воронка и стакан, 2 плоскодонные колбы на 100 мл, круглодонная колба на 50 мл, бюретка на 25 мл, пипетка на 5 мл, 2 измерительных цилиндра на 25 мл.

#### *Ход работы:*

1. Сырой материал массой 2 г измельчите в ступке, постепенно добавляя 2-3 мл воды и на кончике шпателя карбонат натрия.
2. Растертую массу перенесите в колбу на 100 мл и залейте водой до метки. Оставьте на инкубацию в течение 30 минут.
3. Отфильтруйте полученный экстракт через бумажный фильтр.
4. Контрольную вытяжку фермента объемом 20 мл нагрейте в течение 10 минут на кипящей водяной бане.
5. Опытную пробу вытяжки фермента объемом 20 мл перелейте в стаканчик.

6. Добавьте в обе пробы по 25 мл 0,1н раствора перекиси водорода.
7. Инкубируйте пробы при комнатной температуре в течение 30 минут.
8. По окончании инкубации добавьте в обе пробы по 5 мл 10% серной кислоты.
9. Оттитруйте опытную и контрольную пробу 0,1н раствором перманганата калия до образования устойчивого, примерно в течение 1 минуты, розового окрашивания раствора.
10. Рассчитайте количество каталазы в мг, содержащееся в 1 г исследуемого материала, и количество каталазы способное разложить перекись водорода за 1 минуту, согласно формулам:

$$m_{КАТ} = \frac{m_{H_2O_2} \times V_K}{V_E \times m_M} \quad (1)$$

где  $m_{КАТ}$  - масса каталазы, способной разложить пероксид водорода, мг;  
 $V_E$  - объем экстракта, необходимый для приготовления пробы (контрольной или опытной), мл;

$m_M$  - масса сырого материала, необходимого для приготовления экстракта, г;

$V_K$  - объем мерной колбы, используемой для приготовления экстракта, мл;

$$m_{H_2O_2} = (V_1 - V_2) \times 1,7 \text{ , мл} \quad (2)$$

где  $V_1$  - объем титранта, пошедшего на титрование опытной пробы, мл;  
 $V_2$  - объем титранта, пошедшего на титрование контрольной пробы, мг;  
 1,7 – количество мг пероксида водорода соответствующее 1 мл 0,1н раствору перманганата калия.

Количество каталазы, способной разложить перекись водорода за 1 мин, равно:

$$m_{КАТ}^{1min} = m_{КАТ} / 30, \quad (3)$$

Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то в 1 г исследуемого материала присутствует:

$$n_{КАТ} = m_{КАТ}^{1min} / 0,034, \quad (4)$$

*Пример расчета:*

Рассчитаем количество каталазы, содержащейся в 1 г моркови, если

$$V_1 = 0,4 \text{ мл},$$

$$V_2 = 3,5 \text{ мл},$$

$$m_{H_2O_2} = (V_1 - V_2) \times 1,7 = (3,5 - 0,4) \times 1,7 = 5,27 \text{ мг},$$

$$m_{КАТ} = \frac{m_{H_2O_2} \times V_K}{V_E \times m_M} = \frac{5,27 \times 100}{20 \times 2} = 13,175 \text{ мг},$$

за 1 мин:

$$m_{КАТ}^{1min} = m_{КАТ} / 30 = 13,175 / 30 = 0,439 \text{ мг},$$

$$n_{КАТ} = m_{КАТ}^{1min} / 0,034 = 0,439 / 0,034 = 12,9E$$

11. Сделайте выводы по проделанной работе.

Контрольные вопросы:

- К какому классу относится фермент каталаза? Какие типы реакций катализирует?
- Из каких источников можно выделить фермент каталазу?