

**CEU**

*Universidad  
San Pablo*

**PRÁCTICAS DE  
BIOQUÍMICA GENERAL**

**CUADERNO DE PROCEDIMIENTOS**

**GRADO EN MEDICINA  
1<sup>er</sup> CURSO**

**Facultad de Medicina  
Universidad San Pablo-CEU**



**INDICE**

□ <b>NORMAS GENERALES</b> .....	4
□ <b>RELACIÓN DE MATERIAL POR TAQUILLA</b> .....	6
□ <b>PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN</b>	
- Evaluación de la capacidad amortiguadora del tampón .....	8
- Conceptos generales .....	10
□ <b>PROTEÍNAS</b>	
- Propiedades de solubilidad de proteínas .....	12
□ <b>ENZIMAS</b>	
- Estudio cinético de la actividad sacarásica de levadura .....	14



## **NORMAS GENERALES**

En el laboratorio **SERÁ OBLIGATORIO EL USO DE BATA**; además, cada alumno deberá llevar a las prácticas, gafas de seguridad, rotulador de vidrio y calculadora.

**NO SE PERMITE LA ENTRADA NI USO EN EL LABORATORIO DE DISPOSITIVOS ELECTRÓNICOS. LOS MÓVILES DEBERÁN DEJARSE FUERA DEL LUGAR DE TRABAJO. TAMPOCO ESTÁ PERMITIDA LA ENTRADA DE COMIDA Y BEBIDA.**

La asistencia a todas las sesiones de prácticas es **imprescindible** para obtener la calificación de apto en las mismas.

**El alumno se responsabilizará del material que recibe**, debiendo entregar el mismo, completo y limpio, al final del turno de prácticas.

Al final de cada jornada de prácticas, los alumnos **deberán recoger** todo el material utilizado, dejando el puesto de trabajo **despejado y limpio**, y las colecciones de reactivos completas y **ordenadas**.

Asimismo, al final de cada jornada, los alumnos se encargarán de limpiar el material y zonas de laboratorio de uso común: balanzas, fotocolorímetros, fregaderos... etc, debiendo ser el pH-metro objeto de un cuidado especial, dejándolo desconectado de la red y con el electrodo limpio introducido en agua destilada.

Los alumnos se someterán a aquellas pruebas que el profesor encargado juzgue necesarias para determinar el aprovechamiento de las prácticas.

Cualquier anomalía o emergencia que surja en el transcurso de la jornada de prácticas deberá ser comunicada de inmediato al profesor encargado de las mismas.



**RELACIÓN DE MATERIAL POR TAQUILLA**

Vasos de precipitados:	1 de 500 mL 2 de 250 mL 2 de 100 mL 2 de 50 mL 1 de 25 mL
Erlenmeyer:	2 de 250 mL 1 de 100 mL 1 de 50 mL
Probetas:	1 de 100 mL 1 de 25 mL 1 de 5 mL
Embudos:	1 de $\phi = 8-10$ cm 1 de $\phi = 3-4$ cm
Pipetas:	2 de 10 mL 2 de 5 mL 1 de 2 mL 2 de 1 mL 1 de 0,1-0,2 mL
Tubos:	2 tubos de boca esmerilada B-29 con tapón 2 tubos de centrifuga de mesa grandes ( $\phi :3$ cm) 8 tubos de centrifuga de mesa pequeños ( $\phi :1$ cm) 1 tubo de colorímetro 2 gradillas con tubos de ensayo
	1 vidrio de reloj.
	1 placa de gotas.
	1 frasco lavador para agua destilada.
	1 propipeta.



## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN.

### Evaluación de la capacidad amortiguadora de un tampón

Llamamos tampones o amortiguadores a disoluciones caracterizadas porque su pH permanece invariable a la dilución y por admitir cantidades moderadas de ácido o álcali sin que varíe apreciablemente su pH.

Podemos definir la capacidad tampón o amortiguadora de un sistema como la cantidad de ácido o base que puede neutralizar sufriendo un desplazamiento del pH en una unidad. Esta capacidad es máxima cuando el cociente sal/ácido es cercano a la unidad.

Los tampones se preparan a partir de un ácido débil y exceso de su base conjugada o de una base débil y exceso de su ácido conjugado, en proporción regida por la ley de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]}$$

Los fluidos intra y extracelulares de los organismos vivos contienen pares conjugados ácido-base que actúan como tampones al pH normal de dichos fluidos. En la experimentación "in vitro" de los fenómenos biológicos, deben mantenerse en lo posible las mismas condiciones que en el organismo vivo, y de ahí la importancia de la utilización de tampones en la mayoría de los trabajos bioquímicos.

La elección del tampón concreto para una experiencia viene determinada por los límites de pH buscados y la capacidad de tamponamiento. Entre los tampones más comunes podemos citar el acético-acetato, fosfato mono y dibásico, cítrico-citrato, tris (hidroximetilaminometano), carbonato-bicarbonato...

## TÉCNICA DE TRABAJO

### 1. Preparación del tampón.

- Calcular las cantidades de fosfato mono y dibásico (sódico o potásico) sólidos necesarias para preparar 250 mL de alguna de las siguientes soluciones tampón:

- |                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. Fosfato 0,05M, pH:6,6 | 6. Fosfato 0,10M, pH:7,0  |
| 2. Fosfato 0,05M, pH:7,0 | 7. Fosfato 0,10M, pH:7,4  |
| 3. Fosfato 0,05M, pH:7,4 | 8. Fosfato 0,20M, pH:6,6  |
| 4. Fosfato 0,10M, pH:6,6 | 9. Fosfato 0,20M, pH:7,0  |
| 5. Fosfato 0,10M, pH:6,8 | 10. Fosfato 0,20M, pH:7,4 |

- Los valores aparentes de pK' del ácido fosfórico son:  
1,96; 6,80; 12,00

- Pesar cuidadosamente las cantidades calculadas de sales y transferirlas a un vaso de precipitados. Disolver en unos 150 mL de agua destilada. Cuando estén totalmente solubilizadas, transvasar a un matraz aforado de 250 mL. Lavar los residuos que hubieran podido quedar en el vaso con un poco de agua destilada y transvasar también el líquido de lavado al matraz. Completar el volumen con agua destilada hasta la marca de aforo. Agitar y pasar la solución a un frasco etiquetado.
- Tomar una alícuota del tampón preparado y determinar su pH exacto en pH-metro.

## 2. Apreciación de la capacidad amortiguadora.

- Preparar una solución aproximadamente 0,1M de hidróxido sódico, a partir de hidróxido sódico comercial (sólido). ¡¡**Precaución!!**
- Preparar una solución aproximadamente 0,1M de ácido clorhídrico, a partir de HCl comercial (**precaución**, ácido muy concentrado).
- A una alícuota de 25 mL del tampón se añaden 2 gotas de fenolftaleína y, desde una bureta, una solución 0,1M de hidróxido sódico gota a gota hasta observar el viraje del indicador (de incoloro a rosa a  $\text{pH} \approx 9$ ). Anotar el volumen de NaOH utilizado. Repetir la experimentación sustituyendo el tampón por el mismo volumen de agua destilada y evaluar la capacidad de tamponamiento por comparación del gasto de hidróxido sódico en ambos casos.
- A otra alícuota de 25 mL del tampón se añaden 4-5 gotas de naranja de metilo y, desde una bureta, una solución 0,1M de ácido clorhídrico gota a gota hasta observar el viraje del indicador (de amarillo anaranjado a rosa, a pH aproximadamente 4). Anotar el volumen de HCl utilizado. Repetir la experimentación sustituyendo el tampón por agua destilada (el mismo volumen) y evaluar la capacidad de tamponamiento por comparación del gasto de ácido clorhídrico en ambos casos.

### Reactivos necesarios

- |  |        |
|--|--------|
| <input type="checkbox"/> Fosfato monopotásico sólido .....   | RG-28  |
| <input type="checkbox"/> Fosfato monosódico sólido .....     | RG-29  |
| <input type="checkbox"/> Fosfato dipotásico sólido .....     | RG-30  |
| <input type="checkbox"/> Fosfato disódico sólido .....       | RG-31  |
| <input type="checkbox"/> Hidróxido sódico (lentejas) .....   | RG-32  |
| <input type="checkbox"/> Ácido clorhídrico concentrado ..... | RG-s/n |
| <input type="checkbox"/> Fenolftaleína .....                 | JR-13  |
| <input type="checkbox"/> Naranja de metilo .....             | JR-40  |

## CONCEPTOS GENERALES

### 1. Disoluciones.

Las disoluciones desempeñan un importante papel en muchos procesos químicos y de la vida ordinaria. Los fluidos del cuerpo de todos los animales son disoluciones acuosas de numerosas sustancias. Por todo ello es importante conocer el concepto de disolución.

Una disolución es una mezcla homogénea de las moléculas, átomos o iones de dos o más sustancias diferentes. La composición es igual en cualquier parte de una disolución. Por otra parte si se filtra esa disolución, las moléculas de soluto pasarán a través del poro del papel de filtro junto con las moléculas de agua, en el caso de las disoluciones acuosas.

Los principales componentes de una disolución son:

el **disolvente**, que generalmente es el componente que no cambia de estado al realizarse la disolución. Suele considerarse como disolvente, el componente que está en mayor proporción en una disolución.

el **soluto**, que suele estar en menor proporción en la disolución, y en el caso de un sólido que se disuelve en agua, por ejemplo, es el componente que cambia de estado al formarse la disolución (el sólido pasa a líquido).

Las disoluciones pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas.

### 2. Unidades de concentración.

Muchas veces se habla de disoluciones “concentradas” o “diluidas”, según si contienen una cantidad grande o pequeña, respectivamente, de sustancia disuelta. En muchas ocasiones es necesario conocer de una manera cuantitativa la concentración de las disoluciones, es decir, el peso o volumen de soluto que existe en una cierta cantidad (peso o volumen) de disolvente o de disolución. Hay numerosas formas de expresar la concentración, pudiendo agruparse en dos tipos principales:

**2.a. PESO-PESO**, dentro de las que encontramos,

**2.a.I.) Porcentaje en peso**, o gramos de cada uno de los solutos que hay en 100 gramos de disolución.

**2.a.II.) Fracción molar de un componente**, o número de moles de dicho componente, dividido por el número total de moles de todos los componentes de la disolución. Para ello necesitamos conocer previamente el número de moles de un componente n:

$$n = \frac{\text{número de gramos del componente}}{\text{Peso molecular}}$$

## 2.b. PESO-VOLUMEN o MASA-VOLUMEN

**2.b.1.) Molaridad**, o número de moles de soluto que hay en un litro de disolución

$$M = \frac{g / PM}{L} = \frac{n^{\circ} \text{ moles}}{L}$$

**2.b.1.) Normalidad**, o número de equivalentes-gramo de soluto que hay en un litro de disolución. La normalidad es siempre un múltiplo entero sencillo de la molaridad, puesto que en un mol de sustancia debe haber un número entero y sencillo de equivalentes-gramo.

$$\text{Eq-g} = \frac{g / PM}{\text{Valencia}} \qquad N = \frac{n^{\circ} \text{ Eq-g}}{L}$$

## 3. Disolución saturada.

Una disolución está saturada cuando ya no puede disolverse más cantidad de soluto en ella. Sin embargo, una solución saturada no tiene que ser necesariamente una solución concentrada. Si el soluto es muy poco soluble en el disolvente, podríamos tener una disolución saturada pero bastante diluida.

Se llama solubilidad, a la cantidad de soluto, expresada normalmente en gramos, que se disuelve en una cierta cantidad de disolvente (suelen tomarse 100 g), para obtener una disolución saturada. La solubilidad dependerá de diversos factores como la presión, la temperatura, etc..., y sobre todo la naturaleza del soluto y del disolvente.

## **PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS.**

La solubilidad de proteínas depende no sólo de la variedad de grupos residuales de los aminoácidos que las componen y de la manera en que se pliega la cadena peptídica, sino también de las propiedades del sistema solvente en que se encuentran. Los principales factores que afectan a la solubilidad de una proteína están relacionados con sus estructuras secundaria y terciaria y son: pH, temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio.

Llevaremos a cabo el estudio de la influencia de estos cuatro factores sobre la solubilidad de seroalbúmina, así como los fenómenos de precipitación por formación de sales con reactivos ácidos y sales de metales pesados.

### **TÉCNICA DE TRABAJO**

- Se preparan 14 tubos de ensayo conteniendo cada uno de ellos 1 mL de solución de albúmina a pH comprendido entre 4,5 y 5,5. Se realizarán en ellos los siguientes tratamientos:

Tubo 1. Llevar a pH=2 y calentar unos minutos en baño de agua a ebullición.

Tubo 2. Calentar unos minutos en baño de agua a ebullición.

Tubo 3. Llevar a pH=7 y calentar unos minutos en baño de agua a ebullición.

Tubo 4. Añadir, en baño de hielo, 1 mL de una mezcla de etanol-acetona 1:1 (V/V), agitar suavemente.

Tubo 5. Añadir 1 mL de mezcla de etanol-acetona 1:1 (V/V), agitar suavemente y calentar la mezcla hasta que comience su ebullición.

Tubo 6. Añadir, en baño de hielo, 0,5 mL de solución saturada de sulfato amónico.

Tubo 7. Añadir, en baño de hielo, 1 mL de solución saturada de sulfato amónico.

Tubo 8. Añadir, en baño de hielo, sulfato amónico sólido (perfectamente triturado en mortero) hasta saturación de la solución, teniendo en cuenta que una solución saturada de sulfato amónico contiene 680 gramos por litro. La adición debe realizarse lentamente, agitando la mezcla con suavidad.

Tubo 9. Añadir 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%.

Tubo 10. Añadir 1 mL de ácido nítrico al 20%.

Tubo 11. Añadir 1 mL de hidróxido sódico al 20%

Tubo 12. Añadir 1 mL de acetato de plomo 0,05M. Comprobar el pH de la solución.

Tubo 13. Añadir 1 mL de acetato de plomo 0,05M. Ajustar el pH de la solución a 7.

Tubo 14. Añadir 1 mL de acetato sódico 0,05M. Ajustar el pH de la solución a 7 o superior

Anotar en cada caso si hubo o no precipitación.

- Separar por centrifugación los precipitados obtenidos y proceder al estudio de la posibilidad de redisolución de cada uno de ellos en medio neutro, ácido o básico. Un esquema cómodo de trabajo puede ser:
- Añadir sobre el precipitado 1 mL de agua destilada. Suspender el precipitado con ayuda de una varilla de vidrio y agitar enérgicamente. Si se produce la total redisolución del precipitado, anotar reversibilidad en medio neutro y no proseguir con los pasos siguientes.
- Si no se produjo la redisolución en medio neutro, añadir 0,5 mL de ácido clorhídrico 2N a la suspensión y agitar de nuevo. Comprobar el pH del medio (añadir más HCl si el pH fuera superior a 2). Si se produjo la redisolución, anotar reversibilidad en medio ácido y no continuar.
- Si no hubo redisolución en medio ácido, añadir 1 mL de hidróxido sódico 2N, comprobar el pH (debe ser superior a 8), agitar enérgicamente y anotar el resultado obtenido.

## NOTAS

Cuando se realizan ajustes de pH, se utilizarán soluciones de HCl o NaOH a concentración comprendida entre 0,5 y 1N, procurando no diluir excesivamente la muestra.

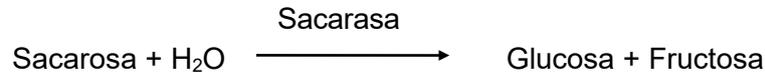
Los tubos en los que se realizan ensayos en baño de hielo, deben mantenerse en frío hasta dar por finalizada totalmente la experiencia (después del estudio de la redisolución).

## Reactivos necesarios

<input type="checkbox"/> Solución de albúmina .....	JR-1
<input type="checkbox"/> Etanol-acetona 1:1 .....	JR-2
<input type="checkbox"/> Solución saturada de sulfato amónico .....	JR-3
<input type="checkbox"/> Sulfato amónico cristalizado .....	JR-4
<input type="checkbox"/> Ácido tricloroacético 20% .....	JR-5
<input type="checkbox"/> Ácido nítrico 20% .....	JR-6
<input type="checkbox"/> Hidróxido sódico 20% .....	JR-7
<input type="checkbox"/> Acetato de plomo 0,05M .....	JR-8
<input type="checkbox"/> Acetato sódico 0,05M .....	JR-9
<input type="checkbox"/> Ácido clorhídrico 2N .....	JR-10
<input type="checkbox"/> Hidróxido sódico 2N .....	JR-11

## ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD SACARÁSICA DE LEVADURA

La sacarasa o invertasa cataliza la reacción de desdoblamiento hidrolítico de la sacarosa:

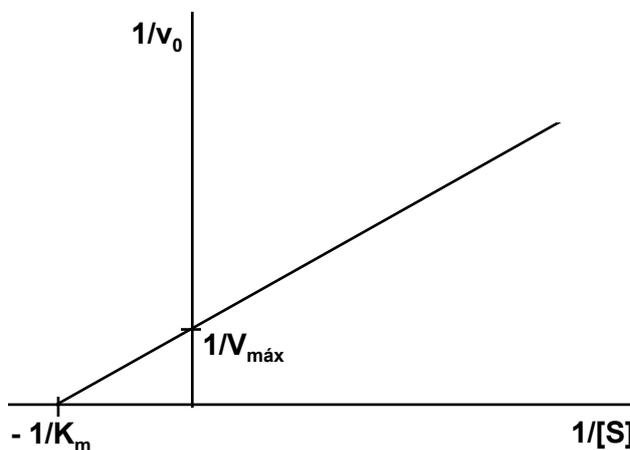


El curso de la reacción puede seguirse valorando los productos liberados al medio por la acción enzimática a través de alguna reacción coloreada propia de azúcares reductores como puede ser la reacción con ácido 3'5-dinitrosalicílico, ya que el sustrato (sacarosa) es azúcar no reductor, mientras que los productos de reacción (glucosa y fructosa) son azúcares reductores.

La ecuación de velocidad de una reacción enzimática es:  $v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$

El cálculo de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), puede realizarse gráficamente mediante la representación de inversas de velocidades iniciales de reacción frente a inversas de concentración de sustrato (representación de Lineweaver-Burk). La ecuación de velocidad se transforma en:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$



- para  $1/[S] = 0$   
 $1/v_0 = 1/V_{\text{máx}}$   
 (Corte en el eje de ordenadas)
- para  $1/v_0 = 0$   
 $1/[S] = 1/K_m$   
 (Corte en el eje de abscisas)

El cálculo de la  $K_m$  requerirá, por tanto, la medida de la velocidad de reacción a distintas concentraciones de sustrato utilizando en todos los casos la misma concentración de enzima (que tendrá que ser previamente determinada para cada extracto enzimático).

El cálculo de las velocidades iniciales de reacción se llevará a cabo estudiando la aparición de azúcares reductores (a través de la reacción coloreada con el reactivo del ácido 3'5-dinitrosalicílico) a distintos tiempos de reacción enzimática y extrapolando a tiempo cero.

Para correlacionar los datos de absorbancia, leídos tras la reacción coloreada, con las cantidades de azúcares reductores liberados al medio se construirá una curva de calibrado con concentraciones conocidas de glucosa, leyendo las absorbancias de dichas soluciones después de su reacción con el reactivo de 3'5-dinitrosalicílico (en idénticas condiciones que para el ensayo enzimático).

## TÉCNICA DE TRABAJO

### 1.- Obtención del EXTRACTO ENZIMÁTICO

La sacarasa se obtiene por lisis de levadura de panificación o de cerveza a temperatura moderada para romper las paredes celulares y liberar los enzimas contenidos en el interior de la célula.

- Se suspenden, en erlenmeyer, 25 gramos de levadura en 40 mL de bicarbonato sódico al 1%, agitando la mezcla hasta obtener una pasta fluida a la que se añaden 0,2 mL de tolueno. El recipiente se tapa con algodón y se incuba durante 20-24 horas a 37°C en baño de agua con agitación constante (proceso de autólisis).
- El homogenado obtenido se centrifuga durante 20 minutos en centrífuga de mesa, recogiendo el sobrenadante que constituye el Extracto enzimático concentrado.
- El extracto enzimático así obtenido debe ser límpido. Si no lo fuera, deberá filtrarse en filtro de pliegues hasta clarificarlo totalmente, o utilizarlo teniendo en cuenta que antes de tomar cualquier alícuota del extracto éste debe ser agitado para su completa homogeneización pero mediante una agitación suave, sin que se produzcan espumas.

### 2.- Reacción coloreada. Preparación de la CURVA DE CALIBRADO

- Preparar una serie de 11 tubos de ensayo, limpios y secos, en los que se añaden las siguientes cantidades de una solución de glucosa de 0,5 g/100mL en tampón acetato 5mM, pH 4.7: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 y 0,9 mL.
- Completar el volumen de todos los tubos hasta 1,5 mL con el tampón acetato anterior y, después de agitar.
- Añadir a cada tubo 1 mL de Reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (se prepara disolviendo en caliente 5 gramos de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 100 mL de NaOH 2N, y mezclando esta solución con 250 mL de solución 60% de tartrato sódico potásico. Finalmente se enrasa el conjunto a 500 mL con agua destilada).
- Agitar e introducir los tubos durante exactamente 5 minutos en baño de agua a ebullición para que se desarrolle la reacción coloreada.
- Enfriar los tubos en baño de agua/hielo, y transferir 0,5 mL de cada uno de ellos a un nuevo tubo conteniendo 4,5 mL de agua destilada. Agitar.

- Leer absorbancias a 540 nm frente al blanco (tubo número 1).
- Representar valores de absorbancia frente a cantidades de glucosa valorada, expresando dichas cantidades en  $\mu$ moles de azúcar reductor.

### 3.- ENSAYO ENZIMÁTICO. Determinación de condiciones de trabajo. (Concentración adecuada de enzima y tiempos de reacción).

Antes de comenzar el estudio de los parámetros cinéticos debe determinarse la concentración adecuada de enzima que dependerá de la actividad del extracto de sacarasa obtenido. Para cada ensayo de tanteo de concentración adecuada, se realizará un ensayo enzimático en condiciones estandarizadas variando el volumen de extracto enzimático utilizado (manteniendo el resto de las condiciones iguales). El esquema de trabajo para un volumen X de enzima sería:

- *Preparación del sustrato.* Preparar una serie de 8 tubos y añadir en cada uno de ellos 0,5 mL de tampón acetato 5mM, pH 4,7 y 0,5 mL de sacarosa 0,29M en tampón acetato 5mM, pH 4,7.
- *Preparación de la enzima diluida.* Diluir 5×X mL de extracto enzimático concentrado en 5 mL de tampón acetato 5mM, pH 4,7.
- Introducir los tubos en baño de agua a 25°C. Introducir asimismo en el baño la solución de enzima diluida. Mantener enzima y sustrato por separado en el baño unos 10 minutos para que todas las soluciones estén equilibradas a la temperatura de reacción enzimática antes de dar comienzo a la misma.
- Iniciar la reacción enzimática por adición de 0,5 mL de enzima diluida sobre cada uno de los tubos que contienen el sustrato, tomando en cada caso nota exacta del tiempo de adición. Desarrollar la reacción enzimática a 25°C durante el tiempo previsto en cada tubo (ver notas) y detener la reacción por adición de 1 mL de reactivo de 3,5-dinitrosalicílico e inmediata introducción del tubo en baño de agua/hielo.
- Desarrollar la reacción coloreada siguiendo el procedimiento empleado en la construcción de la curva de calibrado:
  - agitación.
  - incubación 5 minutos en baño de agua a ebullición.
  - enfriamiento en baño de agua/hielo.
  - agitación y dilución de 0,5 mL de la mezcla en 4,5 mL de agua destilada.
  - lectura de absorbancias a 540 nm.
- Representar para cada concentración de extracto la curva de acción enzimática: Absorbancia frente a tiempo de incubación.

Elegir, a partir de los datos obtenidos por todos los grupos de trabajo, las condiciones idóneas para los ensayos posteriores: concentración de extracto enzimático y tiempos de incubación.

Serán adecuadas para el trabajo las concentraciones de enzima que presenten un tramo lineal hasta tiempos relativamente altos; si varias concentraciones cumplen este requisito el trabajo resulta más fácil utilizando las que proporcionen valores de absorbancia más altos. Si ninguna de las concentraciones ensayadas resultara adecuada, deberán ensayarse otras nuevas elegidas a partir de los datos anteriormente obtenidos.

Se elegirán 2 tiempos distintos comprendidos dentro del tramo lineal.

#### **NOTAS**

Esta parte del trabajo puede ser realizada entre todos los grupos del laboratorio, repitiendo al menos dos veces cada una de las concentraciones ensayadas para cotejar los resultados.

Pueden ensayarse, en principio, los siguientes volúmenes de extracto enzimático concentrado:

X = 0,02 - 0,025 - 0,03 - 0,04 - 0,05 - 0,06 - 0,07 y 0,08 mL.

Los tiempos de incubación más adecuados para la reacción enzimática son:

30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 segundos.

En el tubo correspondiente al tiempo cero de reacción enzimática debe añadirse el reactivo de 3,5-dinitrosalicílico antes de la adición de la enzima para asegurar que no se produce en absoluto reacción enzimática.

La lectura de absorbancias se hará para cada serie utilizando como blanco el ensayo a tiempo cero.

Excepto en los momentos de atemperado y de reacción, enzima y sustrato deben permanecer en baño de hielo o nevera.

#### **4.- Determinación de los PARÁMETROS CINÉTICOS de la sacarasa. Cálculo de la constante de Michaelis y velocidad máxima.**

Para la determinación de parámetros se efectuará el mismo ensayo enzimático a distintas concentraciones de sustrato (sacarosa) trabajando ahora con la misma concentración de enzima (la determinada anteriormente, Y mL de extracto enzimático concentrado por ensayo) y con dos tiempos de reacción (comprendidos dentro del tramo lineal observado) además del tiempo cero. El resto de las condiciones de experimentación es el mismo que en el apartado anterior.

- Preparar tres series de 9 tubos de ensayo destinados a las reacciones enzimáticas:
  - Serie 0: Reacciones enzimáticas a tiempo 0.
  - Serie 1: Reacciones enzimáticas a tiempo 1 (determinado anteriormente).
  - Serie 2: Reacciones enzimáticas a tiempo 2 (determinado anteriormente).
  
- A partir de la solución 0,29M de sacarosa, preparar un banco de diluciones de sustrato de forma que la concentración de sacarosa sea en cada caso 4/5 de la anterior. Todas las diluciones se harán en tampón acetato 5mM, pH 4,7 y se preparará como mínimo 1,5 mL de cada una de ellas, añadiendo 0,5 mL de cada una en los tubos correspondientes de cada una de las tres series (0, 1 y 2). Completar un total de 9 concentraciones distintas de sacarosa.

- Añadir en cada uno de los tubos 0,5 mL de tampón acetato 5mM a pH 4,7.
- Preparar la enzima diluida. Diluir 15×Y mL de extracto enzimático concentrado en 15 mL de tampón acetato 5mM a pH 4,7.
- Introducir los tubos que contienen el sustrato, y el recipiente que contiene la enzima diluida unos 10 minutos en baño de agua a 25°C. (Si no se va a efectuar la reacción en todas las series de forma simultánea, atemperar sólo el material que corresponda a las reacciones a realizar, manteniendo el resto en baño de hielo para evitar degradaciones de enzima y sustrato)
- En el momento de comenzar la reacción enzimática, añadir a cada tubo de sustrato, 0,5 mL de la enzima diluida, desarrollando la reacción a 25°C. Transcurrido el tiempo elegido se sacan los tubos, añadir 1 mL de reactivo de 3,5-dinitrosalicílico, introducir inmediatamente en baño de agua/hielo y desarrollar la reacción coloreada en las mismas condiciones de trabajo que para la obtención de la curva de calibrado:
  - agitación.
  - incubación 5 minutos en baño de agua a ebullición.
  - enfriamiento en baño de agua/hielo.
  - agitación y dilución de 0,5 mL de la mezcla en 4,5 mL de agua destilada.
  - lectura de absorbancias a 540 nm.

## NOTAS

Esta parte del trabajo se realizará independientemente por cada grupo del laboratorio.

Para cada concentración de sustrato se tomarán dos tiempos distintos, además del tiempo cero, para comprobar que se verifica la linealidad y poder llevar a cabo el cálculo correcto de la velocidad inicial. La serie de tiempo cero se efectuará, como en el apartado 3 añadiendo el reactivo de 3,5-dinitrosalicílico antes de la enzima diluida para asegurar que no existe en absoluto reacción enzimática. En la práctica, y suponiendo que no haya habido degradación de sustrato, puede utilizarse sólo un tiempo cero (el de mayor concentración de sustrato), reservando en frío (baño de hielo o nevera) el resto de los tubos de sustrato preparados para la serie cero por si fuera necesaria alguna comprobación.

## Reactivos necesarios

- Levadura comercial ..... Nevera
- Bicarbonato sódico 1% ..... RG-25
- Tolueno ..... RG-26
- Sacarosa 0,29 M ..... preparar por alumnos
- Glucosa 0,5% ..... preparar por alumnos
- DNS (Reactivo de 3'5-dinitrosalicílico) ..... JR-s/n
- Tampón acetato 5mM, pH:4,7 ..... JR-s/n