

1. Título práctica de laboratorio:

ACTIVIDAD ENZIMATICA

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Reconocer la función de las enzimas, modos de inhibición y condiciones óptimas en su actividad como catalizadores biológicos.

Específicos:

- Determinar la actividad de la catalasa y la diastasa sobre sus sustratos: homogenizado de hígado y cebada germinada respectivamente.
- Identificar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la catalasa.
- Identificar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la diastasa.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Palabras clave Catalizador, pH, Sustrato, Temperatura, Catalasa, Diastasa, Desnaturalización, Velocidad de reacción.

Las enzimas son proteínas, cuya función es participar en las reacciones químicas catalizándolas. Las enzimas se requieren en bajas cantidades y se recuperan intactas, es decir, actúan durante la reacción y se liberan sin hacer parte de los productos. No participan en reacciones que sean energéticamente desfavorables, tampoco modifican el equilibrio químico, solamente aceleran su consecución, disminuyendo la energía de activación que se requiere para la reacción¹. Estos catalizadores pueden ser aislados de las células con el fin de estudiar sus características y propiedades in vitro. Las enzimas pueden mostrar respuestas diferentes cuando en el medio se presentan cambios en la concentración del sustrato, en la temperatura y en el pH².

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima es directamente proporcional a la concentración del sustrato hasta adquirir una velocidad máxima, lo que significa que dicha velocidad de reacción, será independiente de la cantidad de sustrato. La razón por la cual sucede esto se debe a que se presenta saturación del sitio activo de la enzima con el sustrato, en palabras sencillas, la totalidad de la enzima para dicha reacción se encuentra “ocupada”². Cambios bruscos en los factores que inciden sobre la actividad enzimática (T° , [], pH) y la hagan salir de su rango

de acción puede dar como resultado la desnaturalización de la enzima, que consiste en la pérdida de su estructura terciaria y por ende en su función, afectando de esta manera la velocidad de la reacción².

La mayoría de las enzimas son bastante sensibles al mínimo cambio de pH en el medio. Variaciones de este nivel por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar de manera drástica su actividad, igualmente pueden provocar la desnaturalización de este tipo de proteínas. Como mecanismos evolutivos y de adaptación, los seres vivos han desarrollado sistemas algo complejos, denominados amortiguadores fisiológicos, con el fin de mantener estable el pH intracelular³.

La catalasa (figura 1) es una enzima que está presente en gran diversidad de tipos celulares en el organismo humano, aunque su actividad cambia dependiendo del tejido, siendo más abundante en hígado y riñones. A nivel celular se encuentra en las mitocondrias y en los peroxisomas, excepto en los eritrocitos que se encuentra en el citosol. Su función, como molécula del sistema antioxidante, consiste en proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) producido en distintas reacciones metabólicas redox en las células, convirtiéndolo en agua y oxígeno³, según la siguiente ecuación:

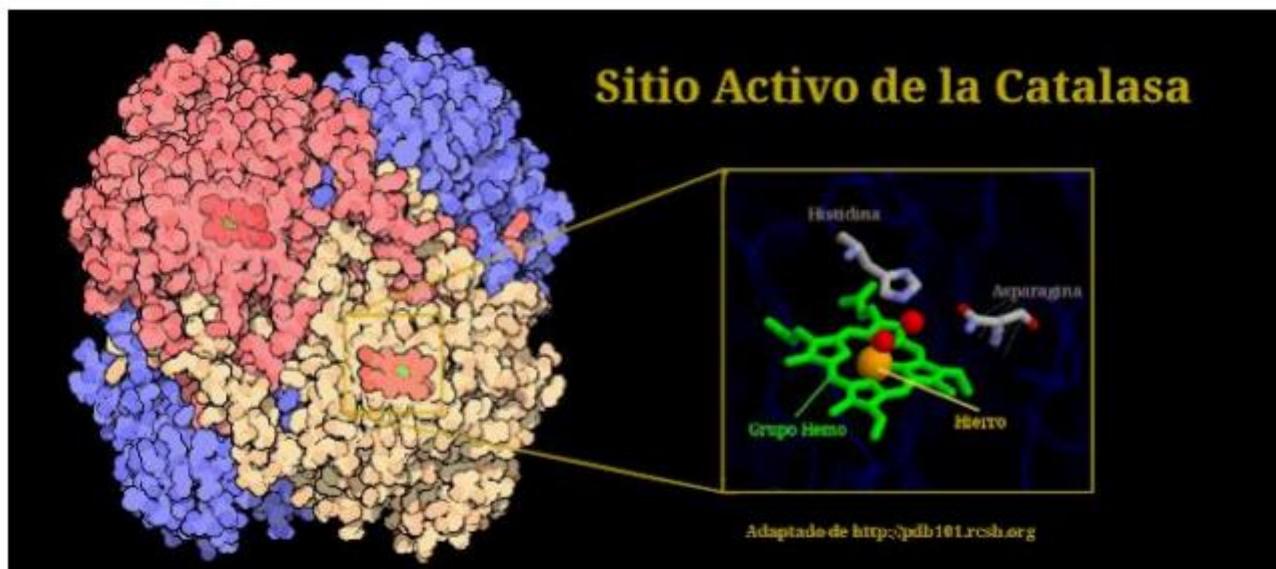
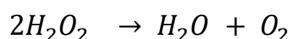


Figura 1. Estructura de la catalasa. Tomado de: <https://temas-selectos-de-ciencias.blogspot.com/p/enzimas.html> (10/mayo/21)

La diastasa es una enzima de origen vegetal, es un tipo de amilasa cuya composición está conformada por α -amilasa (figura 2) y β -amilasa (figura 3), que se produce en algunas semillas durante su germinación (figura 4). Su función es catalizar la hidrólisis (enzimas hidrolíticas) del almidón en dextrinas (las dextrinas son oligosacáridos), e inmediatamente después, en sacarosa o

glucosa, necesarias para la producción de energía, requerida en los procesos germinativos³.

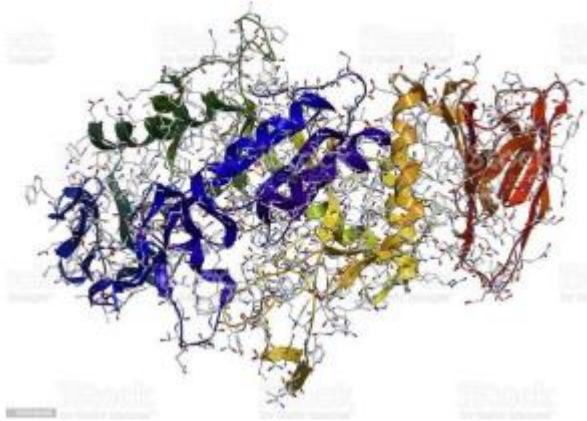


Figura 2. Estructura de la α -amilasa. Tomado de: <https://www.istockphoto.com/es/foto/enzima-alfaamilasa-3d-estructura-molecular> gm160308096-22907458. (10/mayo/21)

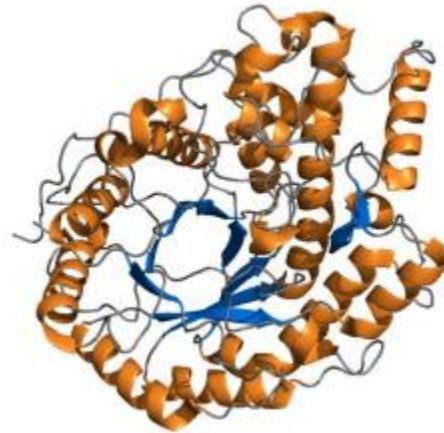


Figura 3. Estructura de la β -amilasa. Tomado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Amilasa#/media/Archivo:2_xfr_b_amylase.png. (10/mayo/21)

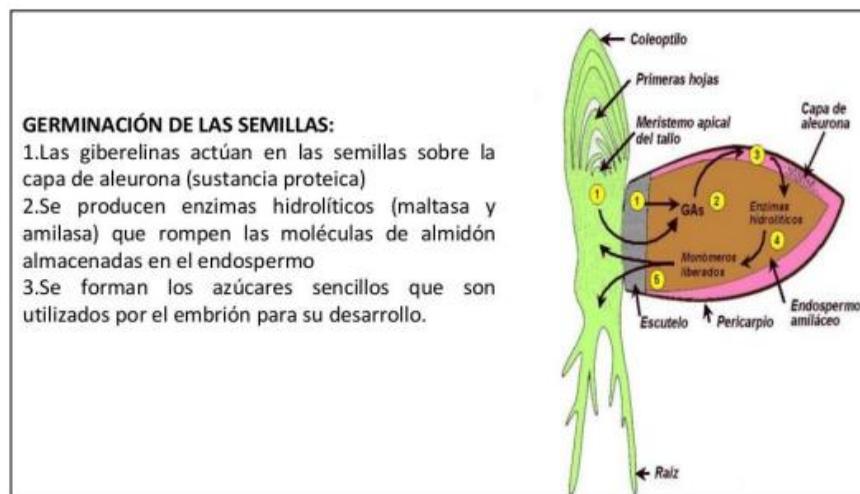


Figura 4. Proceso de Germinación de las Semillas. Tomado de: <https://es.slideshare.net/enalto/relacin-en-las-plantas-eat>. (10/mayo/21)

4. CONSULTA PREVIA

- a. ¿Qué es una enzima alostérica? ¿Cómo funciona?
- b. ¿Qué es la catalasa, donde se produce en la célula, que beneficios ofrece al organismo?
- c. ¿Qué es la diastasa, donde se produce, que beneficios tiene?
- d. ¿Qué diferencia hay entre un cofactor y una coenzima? ¿Qué funciones tienen?
- e. ¿Qué es el grupo prostético? ¿Cuál es su función?
- f. ¿Qué diferencia hay entre la inhibición competitiva y la no competitiva?
- g. Realice el flujograma respectivo al procedimiento de la práctica.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Parte A

Materiales y equipos	Reactivos
1. Gradilla 3. Vidrios de reloj 10. Tubos de ensayo 1. Vaso precipitado 250mL 1. Vaso precipitado 100mL 1. Pinza para tubo de ensayo Gasa Baño serológico Mufla Incubadora Refrigerador	100 mL. Peróxido de hidrogeno 3M Agua destilada 100 mL. Hidróxido de sodio 3M 100 mL. Ácido clorhídrico 3M Papel indicador de pH

Parte B

Materiales y equipos	Reactivos
1. Mortero con pistilo 1. Gradilla 2. Vidrios de reloj 4. Tubos de ensayo 1. Vaso precipitado 250mL 1. Vaso precipitado 100mL Termómetro Gasa Centrifuga Mechero Licuadora	60 mL. Sol. de almidón 0.5% 60 mL. Sol. Almidón 1.0% Lugol Agua destilada

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas, tapabocas...etc.)
- Toallas absorbentes.
- Bisturí
- Marcador sharpie
- 40 mL. Licuado de hígado de res
- 150g Cebada germinada
- Trozos de gasa

6. PROCEDIMIENTO

La práctica de enzimas se divide en dos partes (A y B), las cuales se realizan según las necesidades del programa al cual está dirigida y criterio del docente a cargo. De esta manera los objetivos están planteados para ser cumplidos de acuerdo con dichas necesidades y según indicaciones del docente.

PARTE A

Reconocimiento de la Actividad de la Catalasa

- Preparar el homogenizado de hígado (que contiene la enzima catalasa), en casa. Para ello, corte pedazos pequeños de hígado de res colóquelos en la licuadora, agregue poca agua y licue.
- Filtre el licuado utilizando un trozo de gasa.
- Deposite el licuado filtrado en un frasco plástico con capacidad para 100 ml.
- En el laboratorio, usando un gotero, coloque 3 gotas del homogeneizado de hígado sobre el vidrio de reloj y añada tres gotas de peróxido de hidrógeno (figura 5).
- Consigne sus resultados y observaciones. Tome fotos.



Figura 5. Homogenizado de Hígado. Tomado de: Aguilar Niño, J. Informe de laboratorio, Estudiante Bioquímica UAN.

Efecto de la Temperatura sobre la Actividad de la Catalasa

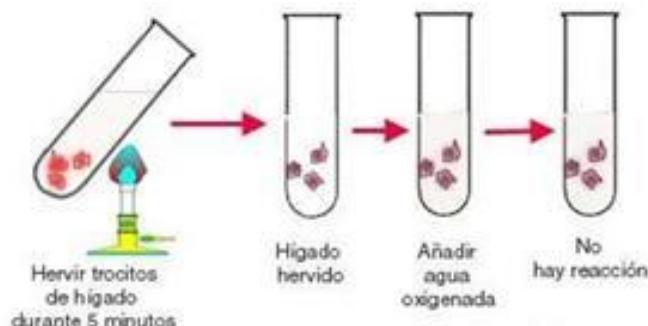


Figura 6. Homogenizado de Hígado sometido a Temperatura. Tomado de:
<http://cienciainituitiva.blogspot.com/2011/05/reconocimiento-de-catalasas-enzimas.html>

Efecto del pH sobre la Actividad de la Catalasa

- Rotule tres tubos de ensayo (1-3) (ver tabla 2).
- Añada 2 ml de homogeneizado de hígado a cada tubo.
- Añada 1 mL de HCl 3M (Tubo 1), 1 mL de NaOH 3M (Tubo 2) y 1 mL de agua destilada (Tubo 3), mezcle bien. Tome el valor de pH, colocando una gota de la mezcla con una pipeta pasteur sobre papel indicador de pH. Deje los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Añada 10 gotas de peróxido de hidrógeno a cada tubo.
- Revise la producción de burbujas en cada tubo, registre los datos en la tabla 3.
- Compare sus resultados en términos de tiempo de reacción vs pH. Tome fotos.

Disponga los residuos orgánicos de la práctica tal como le indique el profesor o el laboratorista, en el recipiente adecuado (bandeja). **NO arroje desecho alguno en el vertedero, sin autorización del docente.** Igualmente disponga de los desechos de reactivos en los respectivos galones.

Parte B

Reconocimiento de la Actividad de la Diastasa

- Proceso de germinación de la cebada: la germinación debe llevarse a cabo en un recipiente NO hermético, así: tome 150 gramos de cebada entera (4 puñados), deposítelos en un plato hondo y adicione agua de tal manera que queden cubiertas las semillas, luego tape el plato con un plástico oscuro (permitir la entrada de aire) por 36 horas, a temperatura ambiente. Para transportar la cebada germinada al laboratorio, hágalo en un frasco tapado apropiadamente para evitar derrames.
- En el laboratorio, antes de iniciar la práctica, ponga a calentar agua en un vaso de precipitado de 250 ml, regulando la T° (aprox-70°C) con un termómetro. Puede también usar una placa de calentamiento o baño serológico.
- Coloque una cantidad de cebada germinada en un mortero, agregue agua destilada hasta cubrirla y macere hasta obtener un extracto lechoso.
- Filtre con la ayuda de un pedazo de gasa en un vaso de precipitado de 100 ml. Con el sobrenadante proceda como se indica en la siguiente tabla (tome Fotos)

Determinación actividad diastasa	Tubo A	Tubo B
Sobrenadante de las semillas que contiene la enzima Diastasa	4mL	4mL
Calentar a 70° C por 5 minutos	Si	No
Añada solución de almidón 0,5% y 1%, según como lo indique el profesor	10 gotas	10 gotas
Dejar en reposo 10 minutos	Si	Si
Añadir Lugol	3 gotas	3 gotas
Analice los resultados		

Disponga los residuos orgánicos de la práctica tal como le indique el profesor o el laboratorista, en el recipiente adecuado (bandeja). NO arroje desecho alguno en el vertedero, sin autorización del docente. Igualmente disponga de los desechos de reactivos en los respectivos galones.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. BRITANNICA E. britannica.com. <https://www.britannica.com/science/enzyme>. Consultado en 2019-02-14.
2. BIOLOGY AL. alevelbiology.co.uk. <https://alevelbiology.co.uk/notes/factors-affecting-enzyme-activity>. Consultado en 2019-02-14.
3. Mañas JMG. Curso de Biomoléculas. <http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/enz1.htm#ph>. Consultado en 2019-02-14.

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS:

- a. Reconocimiento actividad de la catalasa: Dibuje lo observado en el vidrio de reloj. ¿Es activa la enzima? ¿Por qué se forman burbujas en las reacciones de la catalasa?

- b. Dibuje lo observado en la reacción de catalasa a diferente temperatura y pH

- c. Registre la información en cuanto a tiempo y cantidad (abundante, poco, nada) de formación de burbujas en cada tubo, en las tablas 1 y 2.

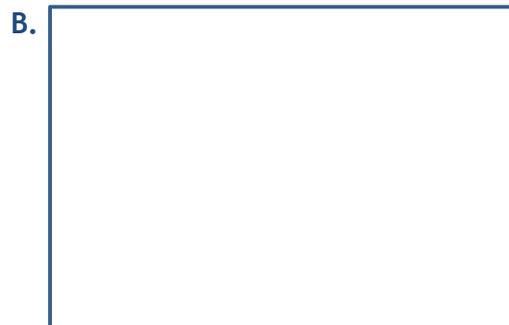
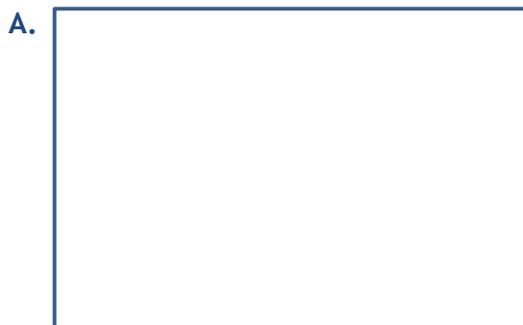
Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalasa

Tubo	Homogenizado de hígado	Temperatura	Tiempo	Adición H_2O_2	Tiempo formación de burbujas
1	2 mL	80 °C	15min	10 gotas	
2	2 mL	37 °C	15min	10 gotas	
3	2 mL	T° ambiente	15min	10 gotas	
4	2 mL	Refrigeración	15min	10 gotas	

Tabla 2. Efecto pH sobre la actividad de la catalasa.

Tubo	Homogenizado de hígado	Reactivo	Tiempo	Adición H_2O_2	Tiempo formación de burbujas
1	2 mL	1 mL HCL 3M	15min	10 gotas	
2	2 mL	1 ML NaOH 3M	15min	10 gotas	
3	2 mL	1 mL de agua destilada	15min	10 gotas	

Reconocimiento actividad diastasa: Teniendo en cuenta los resultados de la diastasa, dibuje lo observado en cada uno de los tubos A y B. ¿En cuál es activa la enzima? Explique.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

PARTE A: CATALASA

1. ¿Qué ocurrió al añadir el peróxido de hidrógeno a cada una de las muestras de hígado expuestas a diferentes pH y temperatura?
2. ¿A qué pH se ve la enzima afectada? ¿Cómo se relaciona el pH y la actividad enzimática?
3. ¿A qué temperatura se ve la enzima afectada? ¿Cómo se relaciona la temperatura y la actividad enzimática?

PARTE B: DIASTASA

1. ¿Qué ocurrió en cada tubo? Correlacione sus resultados con la concentración y cantidad de almidón utilizadas, compare los resultados con otros grupos de estudiantes (0,5% o 1% de solución de almidón, según el caso),
2. Explique el efecto de cambio de temperatura sobre la enzima.

CONCLUSIONES

Escriba 3 conclusiones de la práctica.

BIBLIOGRAFÍA

La discusión de resultados debe estar sustentada con la teoría, por eso deben tener referentes bibliográficos. Se sugiere citar de acuerdo con las normas Vancouver o APA.