



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Facultad de Ciencias  
Bioquímica y Biología Molecular

# BIOQUÍMICA

Grado en Nutrición Humana y Dietética

GUIÓN DE PRÁCTICAS 2023-2024

## RECOMENDACIONES ÚTILES

1. La bata de laboratorio es ante todo un elemento de protección. **ES OBLIGATORIA LA UTILIZACIÓN DE BATA**. En ningún caso se utilizará la ropa del laboratorio fuera de éste (en la cafetería, biblioteca, etc.).
2. **ES OBLIGATORIA LA UTILIZACIÓN DE GAFAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO**, por lo que cada persona debe tener las suyas.
3. La asistencia a las prácticas es **obligatoria**. La falta a alguna sesión de prácticas **no justificada por escrito** supondrá no obtener calificación de esa parte de la evaluación continua.
4. Las personas que tengan el pelo largo, deben llevarlo recogido mientras dure la sesión de prácticas.
5. No se debe trabajar con productos inflamables cerca de mecheros encendidos.
6. En el laboratorio no se podrán tomar bebidas ni comidas.
7. Tener cuidado con productos y disolventes tóxicos. Pipetear **SIEMPRE CON PROPIPETA**.
8. Es fundamental llevar al laboratorio, además de los correspondientes **guiones de prácticas**, una **libreta** para anotar los cálculos, resultados y las observaciones que se van obteniendo a lo largo de las prácticas. También es aconsejable que cada uno tenga su material básico para trabajar: un **marcador de vidrio**, una **espátula**, y unas **tijeras pequeñas**, de los cuales se debe responsabilizar.
9. Hay muchos productos que **NO SE DEBEN ECHAR POR EL FREGADERO** (como el etanol, azida, cromato potásico, fenol, ninhidrina, ácido sulfúrico...); en estos casos se proporcionarán bidones o recipientes donde se almacenarán para su posterior eliminación. **SE DEBE PREGUNTAR ANTES DE TIRAR CUALQUIER PRODUCTO**.
10. Antes de comenzar a realizar una práctica se debe **revisar** todo el material y reactivos necesarios para la misma, indicando cualquier anomalía.

**11.** Es muy importante que el alumno aprenda a trabajar en el laboratorio con orden y limpieza. Se debe **limpiar el material** antes de su uso, y a continuación **enjuagarlo con agua destilada**. Al terminar la sesión de prácticas se dejará todo en perfecto estado de limpieza y orden. Al final de cada sesión práctica **se revisará dicho estado**.

**12.** Como medida de seguridad controlar las **llaves del mechero** antes de abrir la espita del gas.

**13.** Si se necesita **calentar** el contenido de un tubo de ensayo directamente sobre el mechero se hará con el tubo algo inclinado, agitando y con la boca del tubo dirigida hacia un lugar donde no exista ninguna persona.

**14.** El material de uso común, así como los frascos de reactivos generales **se deben colocar en su sitio** inmediatamente después de usarlos.

**15.** **No se deben pipetear los reactivos directamente de las botellas** de uso común, para evitar contaminaciones. Se pondrá una pequeña cantidad en un vaso y de ahí se pipeteará.

**16.** Los reactivos que se hayan sacado del frasco (o botella) y no se hayan usado **no deben verterse de nuevo en el frasco**, puesto que todo el contenido puede contaminarse. Por tanto, las cantidades de reactivos que se saquen de los frascos no deben exceder de las necesarias para la realización de las experiencias.

**17.** Cuando se tenga que diluir un ácido, añadir siempre **el ácido sobre el agua**.

**18.** Las reacciones en las que haya producción de cualquier gas nocivo, o la utilización de productos que liberen vapores contaminantes o perjudiciales, se llevarán a cabo siempre **en la vitrina con el sistema de aspiración en funcionamiento**. La atmósfera del laboratorio ha de mantenerse lo más limpia posible.

## SÍMBOLOS DE PELIGROSIDAD



### **SUSTANCIAS INFLAMABLES**

Se utiliza para sustancias autoinflamables, gases fácilmente inflamables y sustancias que en contacto con el agua desprenden gases inflamables.



### **SUSTANCIAS TÓXICAS**

Productos que, inhalados, ingeridos o en contacto con la piel provocan lesiones e incluso la muerte.



### **SUSTANCIAS CORROSIVAS**

El contacto con estos productos destruye tejidos vivos y otros materiales.



### **SUSTANCIAS IRRITANTES O NOCIVAS**

Irritantes: Actúan sobre la piel, los ojos y las vías respiratorias.

Nocivas: La absorción de estos productos da lugar a lesiones de menor gravedad.



### **SUSTANCIAS COMBURENTES**

Productos que en contacto con otros particularmente con los inflamables, originan una reacción altamente exotérmica.



### **SUSTANCIAS EXPLOSIVAS**

Productos que son más sensibles a los golpes que el dinitrobenceno o que pueden explotar bajo el efecto de una llama o fricción.

# Sesión 1:

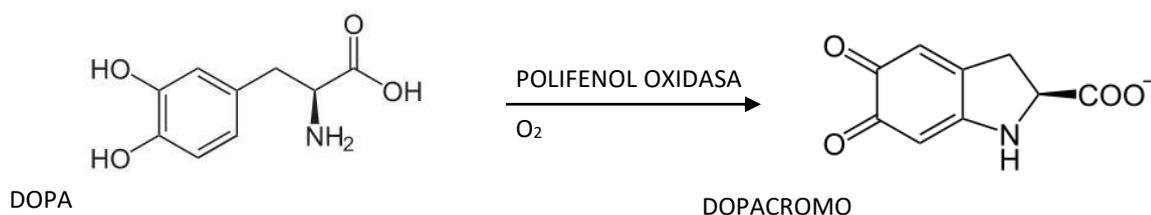
## ESTUDIO CINÉTICO DE LA POLIFENOL OXIDASA

### 1. FUNDAMENTO.

Los textos de prácticas de Bioquímica son una fuente excelente de experimentos de Enzimología. La mayoría permiten al estudiante obtener extractos de una enzima, ensayar su presencia en la disolución y estudiar la cinética enzimática. Pocos experimentos ofrecen la oportunidad al estudiante de aplicar todas estas técnicas al estudio de una enzima. En este caso se ha escogido la enzima polifenol oxidasa o tirosinasa, estudiando su extracción, actividad y cinética. Se ha elegido esta enzima por diversas razones: 1) Puede ser rápidamente extraída de varias fuentes vegetales, tales como champiñón, plátanos y patatas; 2) se dispone de un ensayo espectrofotométrico sencillo; 3) el cofactor metálico permite estudios de inhibición; 4) es importante en la química de la alimentación, pigmentación y medicina clínica.

La enzima polifenol oxidasa se presenta tanto en células vegetales como animales. Su actividad en presencia de oxígeno es la responsable del ennegrecimiento de las plantas cortadas o dañadas. La tirosinasa en células de mamífero parece que tiene un papel específico en el metabolismo de la tirosina.

Cataliza la conversión de Dopa a dopacromo, según la reacción:



En condiciones experimentales, la reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten.

Esta secuencia de reacciones está localizada en los melanocitos, cuyo producto final es la producción de melaninas, sustancias que dan color a la piel, pelo y ojos. La irradiación de la piel por rayos UV del sol activa la tirosinasa, causando de esta forma la producción de melaninas.

La tirosinasa de vegetales y animales contiene cobre, que puede ser complejoado por varios quelantes, inactivando a la enzima. Pueden utilizarse como inhibidores la feniltiourea, dietilditiocarbamato, azida, cianuro o cisteína.

En este experimento, el extracto de polifenol oxidasa se prepara a partir de patata. Aunque son posibles diversos métodos de ensayo, el más conveniente implica la oxidación, catalizada enzimáticamente, de 3,4-dihidroxifenilalanina (Dopa) a 2,3-dihidroindol-5,6-quinona. Se puede observar la velocidad inicial de formación de la quinona por el cambio en la absorbancia a 475 nm.

Los apartados a) y b) de la parte experimental describen la preparación de la enzima y el procedimiento de ensayo general. Los detalles necesarios se os dan en estos dos apartados. Pueden aplicarse a las partes c) y d) donde se estudia un efecto de la concentración de la enzima y el efecto de la inhibición.

## **2. MATERIAL.**

- \* Probeta de 50 mL
- \* 1 vaso de 50 mL y otro de 100 mL
- \* Cuchillo
- \* Mortero
- \* Embudo y trípode
- \* Tubos de ensayo y una gradilla
- \* Espectrofotómetro o colorímetro
- \* Pipetas:
  - 1 → 0.5mL, 3 → 1mL, 2 → 5mL
- \* Hielo y recipiente para mantenerlo

## **3. DISOLUCIONES o REACTIVOS.**

- \* Patatas
- \* Tampón fosfato sódico 20 mM, de pH 7.0.
- \* DL-β-3,4 dihidroxifenilalanina (Dopa) 2 mg/mL disuelta en tampón anterior (preparada en el día).
- \* Inhibidor: azida sódica 50 mM.

## **4. DESARROLLO.**

### **a) Extracción:**

Se pela una patata y se corta en pequeños trozos. Con rapidez se pesan unos 10g de patata, se trituran al máximo en el mortero y después se mezclan con 50 mL de

tampón. Se homogeneiza la mezcla durante un minuto y se filtra el homogeneizado a través de un filtro de papel. El extracto se preparará inmediatamente antes de su uso y se almacenará en un baño de hielo durante la realización del experimento.

**b) Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad. Determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ :**

Disponed cuatro tubos de ensayo en una gradilla a los que se les añade tampón y Dopa con arreglo al siguiente esquema (las cantidades están en mL):

|         |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| Nº tubo | 1   | 2   | 3   | 4   |
| Tampón  | 2.4 | 1.9 | 0.9 | 0   |
| Dopa    | 0.5 | 1   | 2   | 2.9 |

El blanco en el espectrofotómetro se ajusta con **3 mL de tampón fosfato**.

A continuación, se añade al primer tubo 0.1 mL de extracto, se agita y se vierte rápidamente el contenido en la cubeta del espectrofotómetro o colorímetro, leyéndose el cambio de absorbancia a **475 nm** por un periodo de unos 2 minutos, cada 15 segundos. Se repite este proceso consecutivamente con todos los tubos. El volumen final del medio de reacción es siempre de 3 mL.

**c) Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad:**

Antes de dar por válido un ensayo debe demostrarse que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima puesta en el ensayo, por eso se realiza este apartado.

El procedimiento a seguir es el descrito en el apartado b), añadiendo en último término el extracto, **justo en el momento de medir**. El blanco para ajustar el espectrofotómetro es **tampón fosfato**, como el apartado anterior, y la longitud de onda, la misma de antes.

La mezcla de reacción final debe contener lo siguiente (en mL):

|          |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|
| Nº tubo  | 1   | 2   | 3   |
| Tampón   | 0.9 | 0.8 | 0.6 |
| Dopa     | 2   | 2   | 2   |
| Extracto | 0.1 | 0.2 | 0.4 |

**d) Estudios de inhibición:**

Puede investigarse la evidencia de que un ión metálico está implicado en la reacción enzimática mediante la observación del efecto de agentes quelantes sobre la actividad enzimática. Agentes quelantes del cobre, como los mencionados antes, son potentes inhibidores de la actividad tirosinasa o polifenol oxidasa. Para esta práctica se empleará la azida.

Para investigar este efecto, se prepara una serie de tubos mediante el procedimiento habitual:

|                   |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|
| Nº tubo           | 1   | 2   | 3   |
| Tampón            | 0.9 | 0.5 | 0.1 |
| Dopa              | 2   | 2   | 2   |
| Inhibidor (azida) | 0   | 0.4 | 0.8 |
| Extracto          | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

**5. CUESTIONES.**

1. Calculad las velocidades iniciales de reacción de cada ensayo representando los valores de absorbancia (ordenadas) frente al tiempo (abscisas).
2. Calculad los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  mediante la representación de Lineweaver-Burk. Para poder realizar la gráfica, completad previamente la siguiente tabla:

| Nº tubo | $v_0$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | [Dopa] (mg/mL) | $1/v_0$ (min) | $1/[S]$ ( $\text{mg/mL}^{-1}$ ) |
|---------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------------------------|
| 1       |                             |                |               |                                 |
| 2       |                             |                |               |                                 |
| 3       |                             |                |               |                                 |
| 4       |                             |                |               |                                 |

3. Realizad la representación de la actividad enzimática (ordenadas) en función de la cantidad de enzima (abscisas). Completad previamente la siguiente tabla:

| Nº tubo | $v_0$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | Volumen enzima (mL) |
|---------|-----------------------------|---------------------|
| 1       |                             |                     |
| 2       |                             |                     |
| 3       |                             |                     |

4. ¿Qué conclusiones podéis deducir a partir de la representación de la actividad enzimática frente al volumen de extracto?
5. ¿Qué reacción cataliza la polifenol oxidasa? ¿Cuál es el sustrato de la reacción?
6. ¿Por qué la azida actúa como inhibidor de la polifenol oxidasa?
7. Calculad los porcentajes de inhibición en presencia de diferentes concentraciones de azida, completando la tabla siguiente:

| Nº tubo | $v_0$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | [inhibidor] (mM) | % inhibición |
|---------|-----------------------------|------------------|--------------|
| 1       |                             |                  |              |
| 2       |                             |                  |              |
| 3       |                             |                  |              |

# Sesión 2:

## a) AISLAMIENTO DE DNA DE ARCHAEAS HALOFÍLICAS. ELECTROFORESIS DE AGAROSA.

### 1. FUNDAMENTO.

Los ácidos nucleicos, debido a su carácter macromolecular, resultan bastante difíciles de separar de las proteínas y polisacáridos por métodos suaves, y los tratamientos drásticos alteran profundamente su estructura y sus características. Las células procedentes de archaeas halofílicas necesitan concentraciones salinas elevadas para mantener su integridad celular; este hecho se ha utilizado para aislar su DNA ya que pueden ser fácilmente lisadas si se tratan con agua. Las células son resuspendidas en agua, y el lisado se extrae con fenol. El fenol y el agua son inmiscibles, las proteínas se extraen en la fase fenólica y se separan de los ácidos nucleicos que se quedan en la fase acuosa. Adicionando dos volúmenes de etanol a la fase acuosa, los ácidos nucleicos de alto peso molecular precipitan como un material fibroso blanco. Si la precipitación se produce como un material gelatinoso incoloro indica que todavía hay proteína unida a los ácidos nucleicos.

La concentración del DNA obtenido puede determinarse usando la absorbancia (o densidad óptica) a 260 nm. Una solución, en agua, de DNA de 1 mg/mL produce una  $A_{260}$  de 20.

Cuando se prepara DNA éste debe ser de alto peso molecular y no debe estar roto en pequeños fragmentos. Se puede comprobar, para cada muestra de DNA obtenida, si es de alto peso molecular realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

Por otro lado, transcurrida la electroforesis, el DNA se visualizará mediante luz ultravioleta gracias al reactivo Red Safe que se une específicamente al DNA de doble cadena y emite fluorescencia a 537 nm.

### 2. MATERIAL.

- \* Baño termostático a 65 °C
- \* Tubos eppendorf
- \* Microcentrífuga
- \* "Pescador" de DNA
- \* Cubeta y fuente de electroforesis
- \* Transiluminador
- \* Micropipetas

### 3. DISOLUCIONES.

- \* Células de *Haloferax mediterranei* en su medio de cultivo
- \* Agua ultrapura
- \* Fenol (produce quemaduras)
- \* Etanol absoluto
- \* Agarosa en tampón TAE (Tris - Acetato- EDTA)
- \* Red Safe
- \* Tampón 6x de carga

### 4. DESARROLLO.

Para evitar la contaminación con nucleasas es necesario realizar la extracción **con guantes**. Todo el material que se va a utilizar debe estar autoclavado (esterilizado). Los tratamientos hay que realizarlos con sumo cuidado para evitar el que el DNA se fragmente lo menos posible y obtenerlo de alto peso molecular.

#### 4.1 Extracción:

Células (aproximadamente 1.5 mL de cultivo) procedentes de un cultivo reciente de archaeas halofílicas (*Haloferax mediterranei*) se cosechan primeramente para eliminar todo el medio de cultivo, centrifugando a 13000 rpm durante 3 minutos. Una vez tenemos el precipitado de células "seco", se lisan adicionando 600 µL de agua ultrapura a ese precipitado. Después se añaden 600 µL de fenol (saturado con tampón Tris), se mezcla **por inversión** y la mezcla se incuba a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente, las fases se separan por centrifugación (13000 rpm, 5 minutos) a temperatura ambiente. Se transfiere con una pipeta Pasteur la fase acuosa (superior) a un tubo eppendorf limpio, se añade 1 mL de etanol absoluto con otra pipeta Pasteur graduada y se agita suavemente para mezclar. **El precipitado de DNA debería ser visible en esta etapa**. Este precipitado es "pescado" o centrifugado. Se disuelve de nuevo en 50 µL de agua ultrapura, que se añaden a un tubo eppendorf limpio, y se incuba a 37 °C durante un tiempo.

## 4.2. Electroforesis en un gel de agarosa:

**421. Preparación del gel de agarosa:** Se pesan 0.32 g en un erlenmeyer de 200 mL, se añaden 40 mL de tampón 1xTAE. Se calienta en el microondas hasta que la agarosa esté disuelta. Cuando la agarosa se haya enfriado, sin llegar a solidificar, se añaden 2  $\mu$ L de Red Safe y se coloca en el molde del sistema, se sitúa el peine para fabricar las calles y se deja solidificar.

**422. Realización de la electroforesis:** Se rellena el tanque de electroforesis con tampón 1xTAE; se coloca el gel en el tanque y el gel debe estar cubierto con tampón al menos 1 cm. Para preparar las muestras de DNA a cargar en el gel se pipetea 15  $\mu$ L de DNA y 3  $\mu$ L de tampón de carga 6x. Se cargan las muestras en las calles del gel; en una de las calles se pueden poner marcadores de peso molecular conocido. Se realiza la electroforesis aplicando 100 V. Las muestras corren desde el electrodo negativo (cátodo) al positivo (ánodo). Transcurrida la electroforesis, el DNA puede visualizarse mediante luz ultravioleta en el transiluminador, **CON LAS GAFAS DE PROTECCIÓN.**

## 5. CUESTIONES.

1. ¿Cuándo se considera que el DNA obtenido es de alto peso molecular, **cuálitativamente**?
2. ¿Qué característica se observa para considerar si estaba fragmentado?
3. ¿Cómo se calcularía la concentración del DNA obtenido, de forma **cuálitativa**?
4. ¿Y cómo se calcularía la concentración del DNA obtenido, de forma **cuantitativa**?
5. ¿En qué etapa del aislamiento de los ácidos nucleicos es visible el DNA? ¿a qué es debido?
6. ¿Por qué vemos fluorescencia en el DNA cuando lo observamos con el transiluminador?
7. El método descrito para aislar el DNA de *Haloferax mediterranei*, ¿se podría emplear para aislar los ácidos nucleicos de cualquier microorganismo? Razona tu respuesta.

## **b) ESTIMACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BIURET**

### **1. FUNDAMENTO.**

#### **NOTAS SOBRE ESPECTROFOTOMETRÍA:**

Muchos experimentos bioquímicos incluyen la medición de un compuesto o grupo de compuestos que forman parte de una mezcla y, por tanto, la medida de la absorción de la luz por una sustancia en solución es un método importante en el análisis bioquímico. Quizás la técnica más usada para determinar la concentración de dichos compuestos es la colorimetría. El fundamento de la técnica consiste en que, si se pasa luz blanca a través de una solución coloreada, algunas longitudes de onda se absorben con preferencia sobre otras.

La cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia en solución, o dicho de otra forma, la intensidad de color es proporcional a la concentración del compuesto. La absorción varía con la longitud de onda de la luz, debiendo efectuarse la medida usando luz de longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ), que es característica de cada sustancia. Las sustancias coloreadas tienen un  $\lambda_{\max}$  en la región visible del espectro. Otras sustancias absorben luz de otras regiones del espectro (por ejemplo, las proteínas absorben luz ultravioleta) y no son detectadas por el ojo humano.

Para conocer la concentración de una sustancia coloreada en solución se utiliza un aparato, el espectrofotómetro, que mide la cantidad de luz que atraviesa una solución.

#### **Ley de Lambert-Beer:**

La fracción de luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada es proporcional al espesor de la capa absorbente (paso óptico) y a la concentración de sustancia absorbente. Estos dos parámetros están combinados en la ley de Lambert-Beer:

$$\log I_0/I = \epsilon c l = A$$

$I_0$ : intensidad de la luz incidente.

$I$ : intensidad de la luz transmitida.

c: concentración de la sustancia absorbente (en moles/L ó mg/mL).

l: paso óptico de la muestra que absorbe luz (en cm).

$\epsilon$ : coeficiente de absorción molar (en litros/mol x cm) ó coeficiente de absorción (mL/mg x cm).

La expresión  $\log I_0/I$  se denomina absorbancia y se designa por A. Es una medida de la cantidad de luz absorbida por la solución. El porcentaje de transmitancia ( $\%T = I/I_0 \times 100$ ) es una medida la cantidad de luz que atraviesa la solución.

El coeficiente de absorción molar es una constante física que representa la absorbancia de una sustancia cuando el espesor de la capa absorbente es 1 cm y la concentración de la sustancia absorbente es 1 mol/L. El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente y la longitud de onda de la radiación.

### **El espectrofotómetro:**

El espectrofotómetro es un aparato que mide la cantidad de luz que pasa a través de una solución. Está compuesto por las siguientes partes:

**FUENTE DE ENERGIA:** lámpara que emite un haz luminoso que contiene un rango de longitudes de onda.

**MONOCROMADOR:** se llama también selector de longitud de onda. Consiste en una red de difracción que separa las diferentes radiaciones procedentes de la fuente y selecciona la longitud de onda requerida.

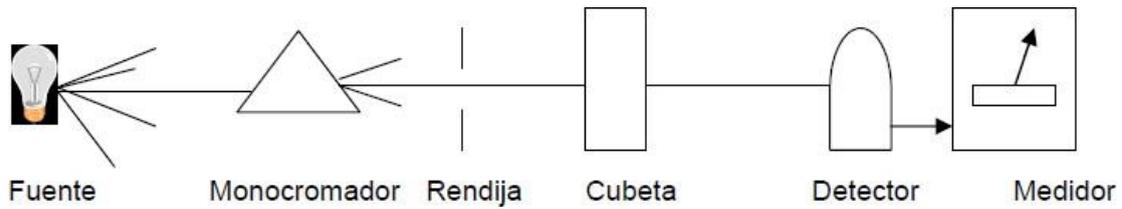
**RENDIJA:** es un dispositivo que sirve para seleccionar un haz fino de radiación que será el que incida sobre la muestra, evitando que la atravesase la luz difusa.

**COMPARTIMENTO DE MUESTRA:** en él se coloca la solución problema, que va a absorber un haz fino de luz monocromática.

**DETECTOR:** es un sistema que transforma la energía luminosa que atraviesa la muestra en energía eléctrica. Posee además un amplificador de la señal eléctrica recibida que posibilita su medición posterior.

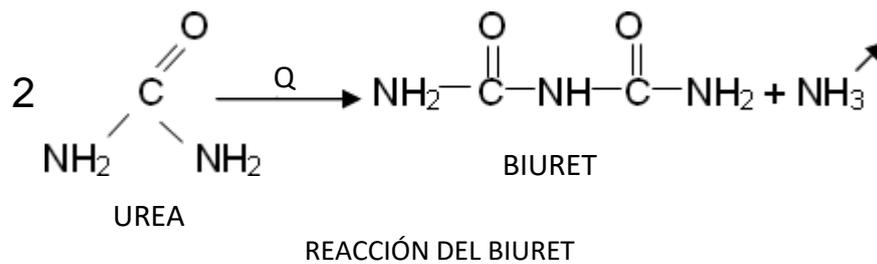
**MEDIDOR:** traslada la energía eléctrica producida en el paso anterior hasta un monitor donde se analiza la lectura digital obtenida.

A continuación se representa un esquema de un espectrofotómetro básico:



**MÉTODO DE BIURET.-** Las proteínas y los péptidos, debido a los enlaces peptídicos, dan un complejo de coordinación entre los iones cobre y los grupos CO y NH del enlace peptídico cuando se encuentran en disolución alcalina. Este complejo, de color violeta, da un máximo de absorción a 545 nm.

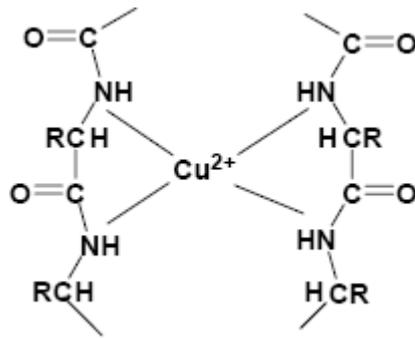
El nombre de la reacción procede del compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con eliminación de amoníaco:



Si una solución fuertemente alcalina de sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>) se añade a una solución de proteína se forma un complejo entre el ion cúprico y los enlaces peptídicos, con aparición de una coloración violeta-púrpura, que presenta un máximo de absorción a 545 nm.

Las características más importantes de la reacción son:

- Se aplica, a partir de los tetrapéptidos, a todos los péptidos y proteínas.
- Su rango de determinación es de 1 a 6 mg/mL.
- No depende de la composición de aminoácidos.
- Algunos compuestos (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Tris, etc.) dan la reacción.



Violeta-púrpura  
Complejo proteína - Cu (II)

## 2. MATERIAL.

- \* 1 pipeta de 2 mL, 1 de 5 mL, 1 de 0.5 mL y 2 de 1 mL
- \* 1 vaso de 50 mL
- \* Tubos de ensayo grandes, y 1 gradilla
- \* Baño de agua a 37 °C
- \* Colorímetro o espectrofotómetro

## 3. DISOLUCIONES o REACTIVOS.

- \* Solución estándar de albúmina de suero bovino de 2.5 mg/mL.
- \* Solución problema de proteína.
- \* Reactivo de Biuret (**ya preparado**): Contiene  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , tartrato sódico-potásico y NaOH.

## 4. DESARROLLO.

Preparad nueve tubos de la forma siguiente:

| Nº tubo                              | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6  | 7   | 8  | 9   |
|--------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|
| volumen (mL) de agua destilada       | 2  | 1,6 | 1,2 | 0,8 | 0,4 | 0  | 1,5 | 1  | 0,5 |
| volumen (mL) de albúmina (2,5 mg/mL) | 0  | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2  | --  | -- | --  |
| volumen (mL) de disolución problema  | -- | --  | --  | --  | --  | -- | 0,5 | 1  | 1,5 |

Se añaden 5 mL de reactivo de Biuret a cada tubo y se agita bien dejando reposar durante 10 minutos a 37 °C. Al cabo de ese tiempo se dejan enfriar y se leen las absorbancias a **545 nm** frente al **tubo nº 1 que hace de blanco**. (El blanco en todas las determinaciones colorimétricas se hace con todos los reactivos que intervienen en la reacción, en las mismas proporciones, sustituyendo el volumen de la proteína con agua destilada).

## **6. CUESTIONES.**

- 1.** Construid la recta de calibrado, representando las absorbancias (en ordenadas) frente a la concentración de la solución patrón de albúmina (en abscisas).
- 2.** Calculad la concentración de proteína en los tubos problema: tubos 7, 8 y 9
- 3.** ¿Deberían ser iguales?
- 4.** ¿Por qué es necesario teñir la proteína para determinar la concentración?
- 5.** Teniendo en cuenta la Ley de Lambert-Beer, ¿qué representa la pendiente de la recta de calibrado?
- 6.** Escribid la ecuación de la recta de calibrado obtenida.
- 7.** ¿Cuál es la concentración de proteína problema original?

# Sesión 3:

## a) AISLAMIENTO DE CASEÍNA DE LA LECHE

### 1. FUNDAMENTO.

La caseína es la proteína principal encontrada en la leche. No es un compuesto simple sino una mezcla heterogénea de proteínas que contienen fósforo; es una fosfoproteína que existe en cuatro formas: alfa, beta, gamma y kappa caseína, cada una con diferente composición.

Como muchas otras proteínas derivadas de fuentes animales, por ej. carne (miosina) y huevos (albúmina) es una proteína adecuada nutricionalmente. Tales proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales requeridos para un crecimiento y desarrollo normal.

La mayoría de las proteínas muestran una solubilidad mínima en su punto isoeléctrico y este principio se usa para separar la caseína ajustando el pH de la leche a 4.8, su punto isoeléctrico. La caseína es también insoluble en alcohol, lo que permite extraer la grasa de las preparaciones.

### 2. MATERIAL.

- |   |                     |
|---|---------------------|
| * 2 vasos de precipitados de 250 mL                     | * Pipeta de 2 mL    |
| * 1 probeta de 100 mL, otra de 50 mL<br>y otra de 25 mL | * Embudo Buchner    |
| * Varilla de vidrio                                     | * Quitasatos        |
| * Baño termostático a 40° C                             | * Papel de aluminio |
| * Papel indicador                                       | * Gasa              |
| * Embudo y trípode                                      | * Placa calefactora |
|   | * Perlas de vidrio  |

### 3. DISOLUCIONES o REACTIVOS.

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| * Leche                 | * Etanol absoluto        |
| * Ácido acético glacial | * Carbonato cálcico      |
| * Etanol del 96%        | * Carbón activo en polvo |

#### **4. DESARROLLO.**

En un vaso de precipitados de 250 mL se ponen 100 mL de leche y se calientan a 40 °C aproximadamente. Se añade a continuación ácido acético glacial gota a gota, sin agitar, removiendo un poco el vaso para mezclar, pero lentamente. El pH final de la mezcla debe ser aproximadamente 4.8 y se debe verificar con papel indicador. Se produce un precipitado de caseína blanco y floculoso. Cuando ya ha terminado este proceso se enfría la suspensión a temperatura ambiente y se deja reposar 5 minutos antes de filtrarla a través de gasa (tres capas). Conservad aparte el suero de leche filtrado.

Se lava el precipitado con un poco de agua destilada y se suspende en 30 mL de etanol al 96 %. Se filtra la suspensión a través de papel de filtro sobre un embudo Buchner colocado sobre quitasatos, utilizando una bomba de vacío. Se lava el precipitado anterior con 25 mL de etanol absoluto y se seca manteniendo el vacío.

Se extrae con una espátula el polvo blanco formado y se coloca en un trozo de papel de aluminio para permitir la evaporación total del disolvente (si es posible, dejadlo unos minutos en la estufa).

#### **5. CUESTIONES**

Pesad la caseína obtenida y calculad el rendimiento obtenido en la extracción (mirad la cantidad teórica en el tetrabrick).

¿Por qué se utiliza preferentemente leche desnatada?

¿Qué principio de las proteínas se utiliza para aislar la caseína en la práctica?

## b) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILASA EN LA SALIVA

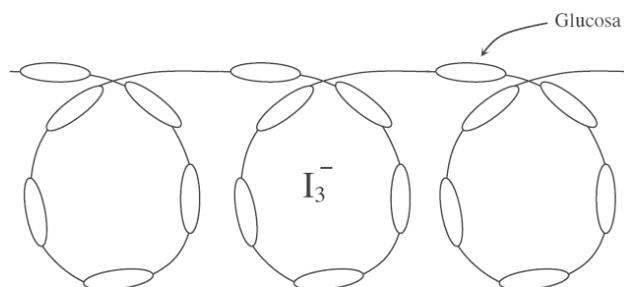
### 1. FUNDAMENTO

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en vegetales y constituye la principal fuente de nutrición glucídica para la humanidad. Los almidones están constituidos por una mezcla de dos componentes:

- **$\alpha$ -amilosa:** cadena lineal de unas 200 unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ .
- **Amilopectina:** cadena lineal de D-glucosas unidas por enlaces tipo  $\alpha(1-4)$  con numerosas ramificaciones  $\alpha(1-6)$ . El polímero contiene unas 1000 unidades de glucosa.

La proporción en que se mezclan la  $\alpha$ -amilosa y la amilopectina para formar el almidón depende de la especie vegetal en que aparece el almidón.

La  $\alpha$ -amilosa se disuelve fácilmente en agua, adquiriendo una estructura secundaria característica, de forma helicoidal, en la que cada vuelta de hélice comprende seis unidades glucosa. Esta estructura secundaria, en la que los grupos hidroxilo quedan hacia afuera, permite que el yodo, al penetrar en el interior del helicoide, confiera a la disolución una coloración azul violácea intensa característica que permite la identificación positiva de trazas de almidón. Como esta coloración no es resultado de ninguna interacción covalente, el calentamiento origina la desestabilización del helicoide y la pérdida de color, que se recupera al enfriar lentamente la disolución.



*Estructura repetitiva de la amilosa.*

El almidón puede hidrolizarse por medios químicos o enzimáticos. La ebullición con ácidos o álcalis hidroliza aleatoriamente los enlaces glucosídicos entre unidades de

glucosa, dando polisacáridos de longitud intermedia denominados dextrinas, cada vez menores hasta la obtención de unidades de glucosa individuales.

Los compuestos que se obtienen en la hidrólisis del almidón y el color que producen con el yodo son los siguientes:

- **Almidón** (azul).
- **Amilodextrinas** (violeta).
- **Eritrodextrinas** (rojo).
- **Acrodextrinas** (incoloro\*).
- **Maltosa** (incoloro\*).
- **Glucosa** (incoloro\*).

*\* Tener en cuenta el ligero color amarillo propio del yodo.*

El almidón también puede hidrolizarse enzimáticamente. Uno de los enzimas que hidrolizan el almidón es la amilasa, que se halla presente en el jugo pancreático y la saliva. Este enzima ataca al azar los enlaces  $\alpha(1-4)$  del interior de la cadena. Así, rinde finalmente unidades de glucosa libre y maltosa. La amilasa no ataca los enlaces  $\alpha(1-6)$ , base de las ramificaciones de la amilopectina. Estos enlaces pueden ser hidrolizados por otro enzima desramificador. La  $\alpha$ -amilasa, una enzima de la saliva humana, cataliza la hidrólisis rápida y desordenada de los enlaces  $\alpha-1,4$  glicosídicos del glucógeno y almidón, siendo por lo tanto la primera enzima que se encuentra durante la ingestión de alimentos que degrada polisacáridos dando glucosa, maltosa e isomaltosa. En esta práctica se va a cuantificar la amilasa presente en la saliva humana.

## 2. MATERIAL

- Reactivos
  - Saliva o glucógeno
  - Solución de almidón al 1% (w/v)
  - Solución del cloruro sódico al 1% (w/v)
  - Solución diluida de yodo (Preparada disolviendo 1 g de yoduro potásico y unos 10 g de yodato sódico en un litro de agua).
  - Tampón fosfato 0.2 M a pH 6.6.

- Equipos
  - Baño de agua a 38°C
  - Micropipetas P1000 y P200

### **3. PROCEDIMIENTO**

#### **3.1. Obtención de la enzima**

Tras enjuagar la boca, se mastica un trozo de papel de filtro para estimular la salivación. Los líquidos segregados se van recogiendo en un erlenmeyer para recoger la suficiente cantidad de saliva para realizar la práctica. La saliva así obtenida se diluye 1:10 con agua destilada, obteniendo así la preparación de enzima base.

#### **3.2. Medio de reacción (SOLUCION A)**

Pipetear 5 mL de la solución al 1% de almidón en un tubo, añadir 2 mL de cloruro sódico al 1% y 2 mL de tampón fosfato pH 6.6, mezclar bien y situarlo en un baño a 38°C. (Esta disolución contiene el sustrato, tampón y el activador).

#### **3.3. Tubos de Iodo**

Preparar una serie de 10 tubos que contengan 2 mL de solución de yodo.

#### **3.4. Medida enzimática**

Añadir 1 mL de saliva diluida a la Solución A y volver a situar el tubo en el baño de agua a 38°C inmediatamente. Apuntar el tiempo cuando se ha producido la adición de la enzima. Al final de cada minuto, extraer 2 gotas de la mezcla de reacción y añadirla a uno de los tubos de la solución de yodo. Apuntar el tiempo cuando no ocurra un cambio de color al añadir las 2 gotas a la solución de yodo. Si el tiempo es menor de 5 min o mayor de 20 min, repetir el experimento usando una dilución diferente de saliva, el tiempo final debe estar sobre los 10 min.

Cuando el almidón está hidrolizado no produce ningún cambio de color a la solución de iodo (punto acromático). El tiempo necesario para alcanzar tal punto da idea de la actividad de la enzima. La inversa de dicho tiempo equivale a la velocidad de la reacción enzimática.

#### 4. CÁLCULOS:

Una unidad de amilasa se define como la cantidad de amilasa que puede catalizar la hidrólisis de 5 mL de solución de almidón al 1% en 10 min bajo las condiciones del experimento.

Unidades de amilasa = (factor de dilución) x 10 / T min

T = tiempo de reacción para la completa desaparición del almidón.