

INVERTASA DE LEVADURA

• INTRODUCCIÓN

En esta práctica vamos a ver la acción de la invertasa y calcularemos entre otras cosas la velocidad de la reacción que cataliza. La actividad enzimática se pone de manifiesto incubando el sustrato juntamente con la enzima y posteriormente paramos la reacción y medimos coloriméticamente la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico que es lo que nos va a determinar la velocidad de la reacción. Se basa en que la sacarosa no contiene átomo de carbono anomérico libre y por lo tanto no es un azúcar reductor.

La enzima invertasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa, frecuentemente a esta reacción se denomina inversión. La invertasa se puede conseguir de células de levadura que se rompen por auto lisis, centrifugando y tomando el sobrenadante.

• MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: levadura de panadería, espectrofotómetro, baño termostatzado y centrífuga de mesa.

Reactivos:

– Bicarbonato sódico 0,1M

- Tampón acetato sódico 0,025M, pH:4,5
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- Reactivo Biuret
- Disolución patrón de albúmina sérica bovina
- Disolución de glucosa 0,0025M– fructosa 0,0025M (azúcar invertido)
- Disolución de sacarosa 0,25M

3-MÉTODO EXPERIMENTAL: REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA

3.1.Obtención del extracto libre de células:

Disgregamos 25 g de levadura en un mortero. Lo colocamos en un erlenmeyer y añadimos 50 ml de NaHCO_3 0,1M. Agitamos y tapamos con algodón para meterlo en una estufa seca a 40 °C durante 24h. Así conseguimos que las células de levadura se lisen y posteriormente centrifugamos la mezcla a 4000 rpm durante 15 min.

Se recoge el sobrenadante (invertasa) y se guarda en un refrigerador. El volumen del sobrenadante fue de : 45 ml.

3.2.Preparación de la curva patrón de azúcar invertido.

Preparamos la siguiente serie de tubos de ensayo:

Tubo nº	Disolución de azúcar invertido (0,0025M)	Agua	Sacarosa 0,25M	Ac.3,5-dinitrosalicílico
0	----	2ml	----	2ml
1	0,1 ml	0,9 ml	1ml	2ml

2	0,2 ml	0,8 ml	1ml	2ml
3	0,4 ml	0,6 ml	1ml	2ml
4	0,6 ml	0,4 ml	1ml	2ml
5	0,8 ml	0,2 ml	1ml	2ml
6	1,0 ml	-----	1ml	2ml

El tubo nº 0 es el blanco y contiene sólo 2ml de agua (sin azúcar invertido) y con los 2 ml del ácido.

El color aparecerá al calentar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 4 min. Posteriormente diluimos hasta 10 ml con agua destilada y leemos la absorbancia a 450nm frente al tubo blanco. Con estos datos construimos la curva patrón.

Tubo nº	Absorbancia 540nm	Azúcar invertido (moles/ml)
1	0,036	0,025
2	0,089	0,050
3	0,185	0,100
4	0,273	0,150
5	0,392	0,200
6	0,495	0,250

3.3. Determinación de la dilución óptima para el ensayo enzimático.

Del sobrenadante se preparan distintas diluciones para saber cual es la concentración adecuada para realizar el ensayo. Se preparan las siguientes diluciones:

1:10, 1:50, 1:100, 1:150 , 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:500

De estas diluciones se toma 1 ml. Además se preparan dos tubos adicionales con 1ml de agua destilada y otro con 1ml de sobrenadante original. Añadimos a todos los tubos 1ml de tampón acetato 0,025 M pH 4,5 y dejamos 5 min a temperatura ambiente. Añadimos posteriormente de manera secuencial desde el tubo 0 1ml de sacarosa 0,25M, agitamos y dejamos a temperatura ambiente durante 15 min. Se añade 2 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico en el mismo orden en que se añadió la sacarosa. Metemos los tubos en agua hirviendo durante 4min de esta manera aparecerá el color. Enfriamos y diluimos hasta 10ml con agua destilada. Leemos la absorbancia de cada tubo a 540nm frente al tubo blanco (tubo nº 0). La absorbancia cercana a las 0,4 unidades será la dilución adecuada.

Tubo 0	1ml de agua destilada	0
Tubo 1	1ml de sobrenadante original	xxxx
Tubo 2	1ml de dilución 1:10	3,080
Tubo 3	1ml de dilución 1:50	2,388
Tubo 4	1ml de dilución 1:100	1,064
Tubo 5	1ml de dilución 1:150	0,752
Tubo 5	1ml de dilución 1:200	0,502
Tubo 6	1ml de dilución 1:250	0,323
Tubo 7	1ml de dilución 1:300	0,539
Tubo 8	1ml de dilución 1:350	0,282

Tubo 9	1ml de dilución 1:400	0,160
Tubo 10	1ml de dilución 1:400	xxxxx

Según estos resultados nuestra dilución óptima y con la que trabajaremos a partir de ahora es 1:250 ya que es el valor más próximo a 400.

3.4. Variación de la concentración del sustrato.

Para esto preparamos los siguientes tubos:

Tubo n°	Sacarosa 0,25M (ml)	H2O (ml)	Absorbancia 540nm
1	–	2,00	0
2	0,05	1,95	0,005
3	0,10	1,90	0,040
4	0,20	1,80	0,124
5	0,40	1,60	0,273
6	0,80	1,20	0,454
7	1,00	1	0,531
8	1,30	0,70	0,631
9	1,60	0,40	0,692
10	2,00	–	0,789

A cada tubo se añade 1ml de tampón acetato y 1ml de la dilución enzimática óptima, mezclamos bien y dejamos reposar durante 15 min a temperatura ambiente. A los 15 min se para la reacción añadiendo 2ml de ácido 3,5–dinitrosalicílico (también en orden comenzando por el uno como con la dilución enzimática que contiene invertasa). El color aparece al hervir los tubos durante 4min. Enfriamos y diluimos hasta 10ml con agua destilada. Medimos la absorbancia a 540 nm como blanco el tubo 1. Los resultados aparecen en la tabla superior *en cursiva*.

Yendo a la curva patrón de azúcar invertido con la absorbancia que nos ha dado calculamos la concentración de sacarosa. Con estos resultados hallamos la velocidad de la reacción y realizamos las gráficas.

3.5. Determinación de la concentración proteica por el método de Biuret.

Primero se construye una curva patrón de proteína utilizando una dilución de albúmina de concentración conocida (10mg/ml) y se mide la absorbancia a 550nm frente al tubo n° 0 (blanco). Para ello antes se debe de añadir a cada tubo 4ml de reactivo de Biuret, mezclar agitándolo y dejar durante 30 min a temperatura ambiente. Nota: este ensayo se hace por duplicado.

Tubo n°	Disolución de albúmina (ml)	H2O (ml)	Absorbancia 550 nm (media)
0 (blanco)	----	1,0	0
1	0,1	0,9	0,056
2	0,2	0,8	0,107
3	0,3	0,7	0,159
4	0,4	0,6	0,206
5	0,5	0,5	0,255

6	0,6	0,4	0,308
7	0,7	0,3	0,358
8	0,8	0,2	0,400
9	0,9	0,1	0,443
10	1,0	-----	0,463

Así conocemos la concentración de la protenina. Y para conocer la cantidad de proteína por ml, realizamos esta serie de tubos (y procedemos de igual manera que anteriormente (4ml de biuret, agitar, 30 min.... midiendo la absorbancia a la misma longitud de onda).

Tubo nº	
A	1ml del extracto
B	1ml de una dilución 1:2, del extracto
C	1ml de una dilución 1:5 del extracto
D	1ml de una dilución 1:10, del extracto

Así de la curva patrón de proteína se calcula la concentración de proteína de la disolución enzimática adecuada.