



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

[Q*] Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

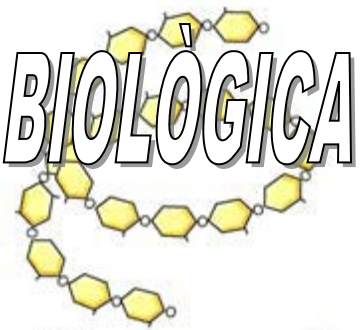
GRAU DE CIÈNCIES GASTRONÒMIQUES



PRÀCTIQUES DE QUÍMICA BIOLÒGICA

|

BIOQUÍMICA



CURS 2017-18

PROFESSORA RESPONSABLE:

MARÍA JESÚS GARCÍA MURRIA

ALUMNE/A:

Nota: Per a elaborar aquest quadernet s'ha agafat com a referència el quadernet de pràctiques de Bioquímica del Grau de Tecnologia d'Aliments que està en castellà i s'ha adaptat per als alumnes de Ciències Gastronòmiques i traduït al valencià.

NORMES DE PROTECCIÓ I PREVENCIÓ

És obligatori portar sempre **bata** dins del laboratori.

Al laboratori està prohibit fumar, menjar o beure.

Si s'utilitzen pipetes de vidre o de plàstic cal utilitzar **sempre una pera de succió (o propipeta) i mai pipetejar amb la boca.**

No es pot pipetejar directament del flascó d'aigua destil·lada o de les dissolucions que es comparteixen amb altres grups: s'ha de pipetejar de la dissolució transvasada prèviament a un vas de precipitats.

Cal netejar el material després d'usar-lo. **Una vegada acabada la pràctica es deixarà el lloc de treball arreplegat i net.**

MATERIAL BÀSIC DE LABORATORI

PROVETES: s'utilitzen per al mesurament de volums.

MATRASSOS ERLLENMEYER: s'utilitzen per a la preparació de dissolucions que s'hagen d'agitar. No serveixen per a mesurar volums.

VASOS DE PRECIPITATS: s'utilitzen per a dissoldre substàncies, com a contenidors de líquids i mai per a mesurar volums.

FLASCONS LLAVADORS: s'emprenen per a esbaldir, afegir aigua, llavar, etc. Funcionen per pressió manual. Generalment contenen aigua destil·lada, ja que aquesta és l'única que s'utilitza en el laboratori de Bioquímica.

PINCES: s'utilitzen per a introduir i traure tubs d'assaig de banys a elevada temperatura.

PIPETES MANUALES: s'emprenen per a mesurar i transferir xicotets volums de dissolucions amb exactitud. El volum es determina per diverses graduacions d'enrasament, i existeixen amb grandàries des de 0,1 ml fins a 10 ml. Poden ser de vidre, reutilitzables, o de plàstic. La pipeta s'ompli amb l'ajuda d'una propipeta. **No es pipetejarà mai amb la boca.**

PERA DE SUCCIÓ: és un dispositiu mecànic d'aspiració que es connecta a la part superior de la pipeta per a evitar la ingestió accidental de substàncies tòxiques.

PIPETES AUTOMÀTIQUES: són dispositius mecànics d'alta precisió que permeten mesurar i transferir volums molt xicotets, de l'ordre de microlitres, de solucions amb elevada exactitud. Són un instrument fonamental en el laboratori de Bioquímica. Per això, el seu maneig es descriu amb més detall en un apartat especial.

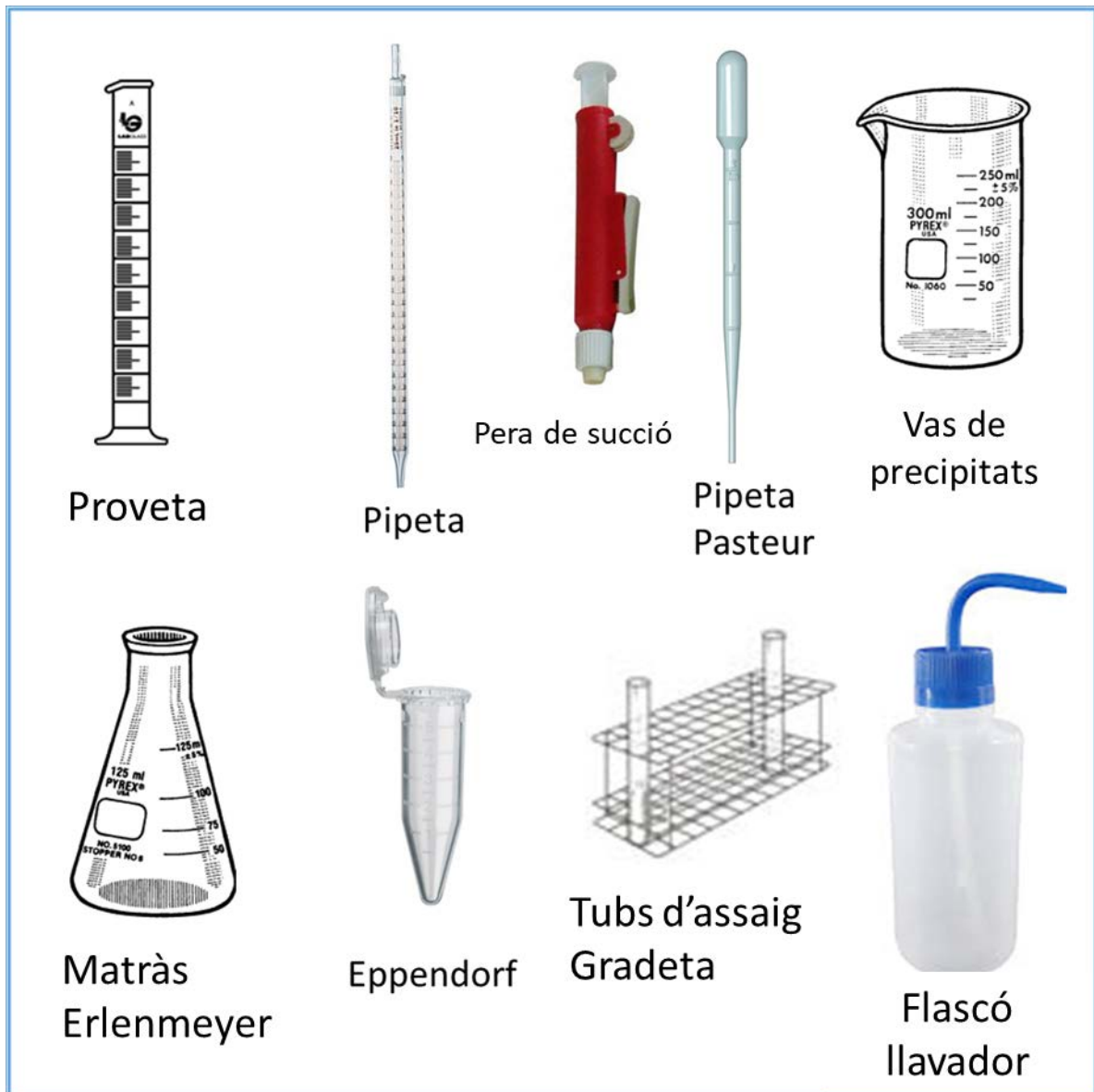
PUNTES DE PIPETES AUTOMÀTIQUES: són els contenidors, d'un sol ús, del volum que es mesura amb les pipetes. Existeixen de grandàries i volums distints, codificades per colors: blanc (0,1-10 µl), groc (2-20 i 20-200 µl) i blau (200-1000 µl).

TUBS D'ASSAIG: són contenidors de vidre o de plàstic, segons l'aplicació, en els quals habitualment es realitzen les reaccions bioquímiques que s'estudien en el laboratori.

TUBS EPPENDORF: són xicotets vials cònics, proveïts de tapa, que s'utilitzen normalment per a centrifugar a gran velocitat xicotets volums o per a emmagatzemar quantitats xicotetes de solucions, com a màxim 1,5 ml o 2 ml segons el tipus.

GRADETA: són estructures metàl·liques o de plàstic que permeten la disposició vertical d'uns quants tubs d'assaig, de manera que es poden manipular amb comoditat durant l'experiment.

CENTRÍFUGUES: Aparells que serveixen per a sedimentar partícules en suspensió sotmetent-les a elevades forces centrífugues pel gir a ràpida velocitat d'un suport.



Material bàsic del laboratori de Bioquímica

I. MANEIG I ATENCIÓ DE LES MICROPIPETES AUTOMÀTIQUES

Les pipetes automàtiques són dispositius que es caracteritzen per no tenir depòsit i s'utilitzen principalment per a mesurar o **transvasar petits volums de líquid d'un recipient a un altre amb gran exactitud**.

Les micropipetes automàtiques funcionen per desplaçament d'aire mitjançant un èmbol de recorregut determinat, que en tornar al punt d'origen arrossega per succió un determinat volum de líquid.

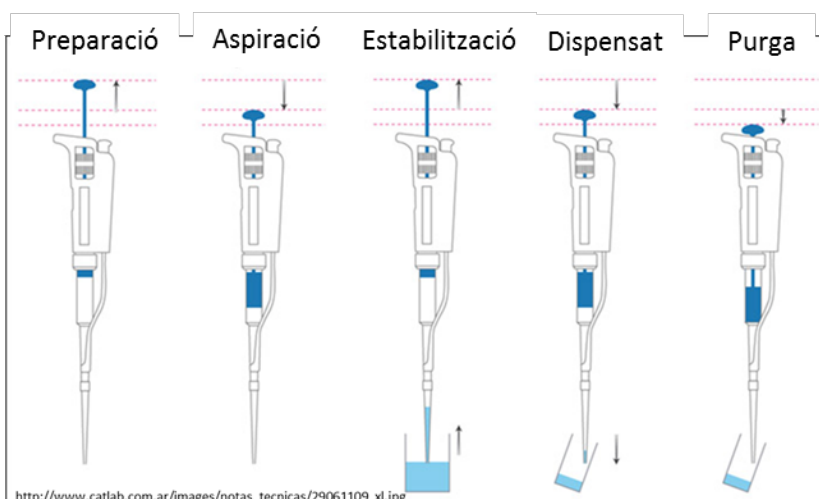
*Les pipetes són **regulables**. Es disposa de diversos tipus de pipetes regulables, segons el rang de volums que poden comprendre: 0,5-10 µl, 2 a 20 µl, 10-100 µl, 20 a 200 µl i 200 a 1000 µl.*

El **volum de líquid es regula per una roda calibrada**, segons el rang d'utilització. La dissolució és presa en una punta d'un sol ús de polipropilè que s'ajusta en l'extrem de la pipeta. Segons el seu volum, les puntes són de color blanc (0,1- 10 µl) groc (2 a 200 µl) o blaves (més de 200 µl). Aquestes puntes es poden **expulsar mecànicament** de la pipeta, una vegada utilitzades, sense haver de tocar-les amb els dits, i així evitar el contacte amb substàncies nocives.

Les pipetes automàtiques són **instruments de gran precisió**. És important que s'utilitzin acuradament per a mantenir el seu funcionament i exactitud.

Instruccions:

- **Ajusteu el volum** girant la roda fins que en l'escala aparega el volum desitjat.
- **Col·loqueu una punta** de plàstic (adequada) en la punta de la pipeta fent una lleu pressió per a aconseguir un bon ajust.
- Amb el dit polze, **estrenyeu l'èmbol fins al primer límit**, introduïu en la solució a



pipetejar i per a carregar la solució torneu amb suavitat l'èmbol al seu origen. *Un brusc retorn de l'èmbol afavoreix l'entrada de bombolles d'aire i a més pot arrossegar líquid a l'interior de la pipeta i per tant espatllar el mecanisme.*

- El **segon límit** només s'empra **per a expulsar** la totalitat del líquid. *Si es carrega la pipeta estrenyent fins a l'últim límit, es pren més volum del mesurat i es produeix un error per excés.*
- **No es pot invertir ni inclinar excessivament la pipeta quan estiga carregada amb líquid.**
- No colpegeu ni deixeu caure la pipeta.

Expulseu les puntes utilitzades en els contenidors disposats a aquest efecte en totes les taules.**PLANIFICACIÓ DE LES PRÀCTIQUES**

Dia 1.

- A) Obtenció de l'extracte d'invertasa de llevat (Pràctica 1).
- B) Purificació de la invertasa (Pràctica 1).
 - Primera etapa: Precipitació per efecte salí.
 - Segona etapa: Precipitació amb dissolvent orgànic.
- C) Realització de la recta patró de sacarosa hidrolitzada (Pràctica 2).

Dia 2.

- A) Purificació de la invertasa (Pràctica 1) i obtenció de la fracció purificada (Pràctica 1).
 - i. Segona etapa: Finalitzar la precipitació amb dissolvent orgànic.
 - ii. Tercera etapa: Cromatografia d'exclusió molecular.
- B) Determinació de l'activitat enzimàtica de l'extracte i la fracció purificada (Pràctica 2).
- C) Preparació de la pinya sobre les plaques de gelatina i d'agar (Pràctica 6).

Dia 3.

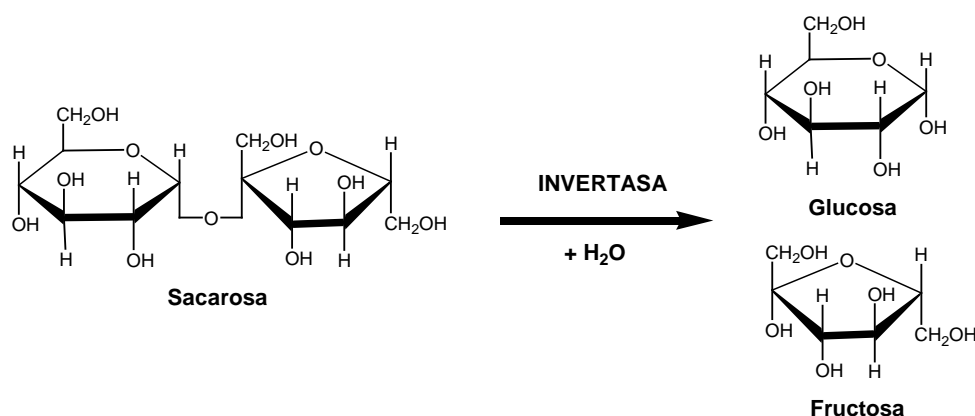
- A) Determinació de la concentració de proteïnes (Pràctica 3).
- B) Avaluació del procés de purificació i resum de resultats (Pràctica 4).
- C) "Observació" de l'activitat de les proteases.
- D) Determinació de la presència de midó en els aliments (Pràctica 5).

AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE L'ENZIM INVERTASA DE *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓ

L'estudi de l'activitat invertasa presenta un gran interès tant des d'un punt de vista acadèmic com d'investigació aplicada. La invertasa és un dels enzims més coneguts. Va ser el primer enzim la cinètica del qual es va estudiar en profunditat (estudis clàssics de Michaelis-Menten) i que va ser utilitzat industrialment.

En 1860 Berthelot va aïllar l'enzim **invertasa** o **sacarasa** a partir del rent del pa, *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest enzim catalitza la hidròlisi de la sacarosa, concretament de l'enllaç glicosídic que hi ha entre el carboni 1 de la glucosa i el carboni 2 de la fructosa. La hidròlisi de la sacarosa en glucosa i fructosa provoca la inversió del poder rotatori de la llum polaritzada de la solució, per la qual cosa, sovint, l'enzim es coneix com a **invertasa**. La denominació bioquímica d'aquest enzim és **β -D-fructofuranòsid-fructohidrolasa (o β -D-fructofuranosidasa)** i el seu codi EC 3.2.1.26.



La invertasa s'empra en la indústria farmacèutica i alimentària, especialment en l'obtenció de productes com ara xocolates, bombons, mel sintètica, melmelada i confitures en general, així com en l'obtenció d'edulcorants artificials i en la indústria cervesera. El sucre invertit té major poder edulcorant, major caràcter humectant, major solubilitat i, per tant, menor tendència a cristal·litzar i endurir que la sacarosa.

La invertasa de rent es presenta en dues formes. La major part és **una forma altament glicosilada** que està associada a les parets cel·lulars i en l'espai periplàsmic de les cèl·lules de rent, on exerceix la seua activitat catalítica en presència del seu substrat, la sacarosa. Una petita proporció d'enzim no glicosilat es troba en el citosol de les cèl·lules, el qual constitueix la proteïna nativa que posteriorment serà glicosilada i exportada a la paret cel·lular. La glicosilació de l'enzim li proporciona una extraordinària resistència a les condicions de l'ambient on ha d'actuar.

Objectius:

- 1r: Aïllar i purificar l'enzim **invertasa** de *Saccharomyces cerevisiae* mitjançant l'*aplicació de mètodes de precipitació diferencial per efecte salí i dissolvent orgànic i cromatografia d'exclusió molecular*.
- 2n: Determinar l'activitat **enzimàtica** de cada una de les fraccions obtingudes en la purificació.
- 3r Determinar la quantitat **de proteïnes** de cada fracció.
- 4t Expressar l'activitat enzimàtica en forma d'activitat **enzimàtica total** i activitat **específica**.
- 5è Valorar **el procés de purificació** mitjançant el càlcul del **factor de purificació** i del **rendiment** total.

PRÀCTICA 1. AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA INVERTASA

Els enzims s'aïllen i purifiquen mitjançant processos fisicoquímics de fraccionament. L'objectiu és la separació de la proteïna enzimàtica d'interès del nostre estudi d'altres proteïnes o substàncies biològiques presents en el medi. Un procés de purificació consta de diverses etapes. En cada una d'aquestes etapes s'apliquen un o més mètodes fisicoquímics sobre la preparació enzimàtica per a eliminar les substàncies que no interessin. El resultat final és una fracció de la preparació enzimàtica considerablement enriquida en l'enzim objecte del nostre estudi.

En el nostre cas, el material biològic del qual partim per a l'obtenció de l'enzim invertasa és el llevat del pa, *Saccharomyces cerevisiae*. El primer pas del procés consisteix en l'alliberament de l'enzim mitjançant la ruptura i disgregació de les cèl·lules que la contenen. Aquest extracte és el que denominarem **EXTRACTE INICIAL**. Una part d'aquesta preparació enzimàtica serà reservada per als assajos analítics. La resta de la preparació serà sotmesa a un procés de purificació en què s'utilitzaran diversos mètodes habituals en el laboratori de Bioquímica.

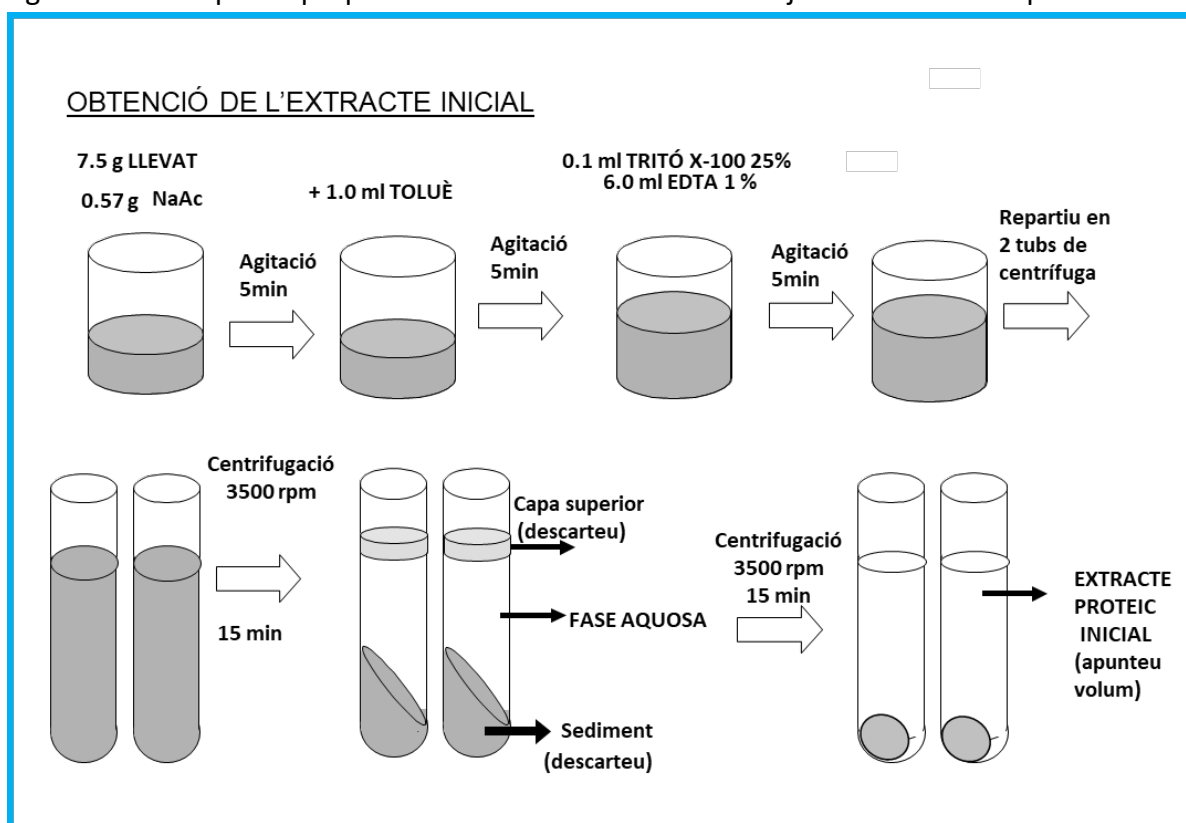
1.1. OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE INICIAL

El primer pas per a l'obtenció de la invertasa de llevat és la ruptura de les cèl·lules mitjançant un procediment autolític, en presència d'un dissolvent orgànic, d'un detergent suau i d'un quelant d'ions. L'autòlisi de les cèl·lules s'aconsegueix per l'addició d'acetat sòdic en pols, a causa de la **pressió osmòtica** a què se sotmeten les cèl·lules. L'addició d'un dissolvent orgànic, toluè en el nostre cas, provoca la dissolució dels lípids de membrana, la qual cosa sumada a l'efecte del detergent, el Tritó X-100, **disgrega** quasi completament les **membranes cel·lulars**. L'acció conjunta d'aquests agents provoca la ruptura de les cèl·lules de rent i l'alliberament al medi de tots els components cel·lulars, inclosa la invertasa citoplasmàtica i l'associada a les parets cel·lulars. Les cèl·lules contenen metal·loproteases en orgànuls concrets, però quan es trenquen les cèl·lules tot el contingut cel·lular entra en contacte. Aquestes proteases degraden proteïnes, com la invertasa. Com la majoria de les proteases utilitzen ions divalents com a cofactors essencials per a la reacció de proteòlisi, afegirem a l'extracte etilendiaminotetracetat (**EDTA**) que és un quelant d'ions que segresta ions metàl·lics, principalment divalents, per a **inhibir a les metal·loproteases**. Finalment, la separació de la dissolució aquosa que conté la invertasa del material biològic no desitjable (cèl·lules no

trencades, parets cel·lulars, nuclis i altres orgànuls, fragments grans de membranes, etc.) i de la fase orgànica amb lípids dissolts es realitza per centrifugació.

Procediment

1. Peseu **7.5 g de rent** en un vas de precipitats xicotet i afegiu **0,57 g d'acetat sòdic**. Agiteu la mescla amb una vareta de vidre durant 5 minuts fins a obtenir una pasta homogènia.
2. Afegiu **1.0 ml de toluè** i agiteu amb la vareta durant altres 5 min.
3. Afegiu **0.1 ml de Tritó X-100 al 25 %** i **6,0 ml d'EDTA a l'1 %**. Agiteu amb la vareta durant altres 5 min.
4. Repartiu el líquid obtingut en dos tubs de centrífuga de polipropilè (tubs de plàstic opac), a parts iguals. Retoleu els tubs. Centrifugueu a 3500 rpm 15 min.
5. Extraieu acuradament la **fase aquosa** que conté la invertasa, situada entre l'abundant sediment i la fase orgànica superior (que conté els lípids dissolts) utilitzant una pipeta Pasteur.
6. Centrifugueu novament la fase aquosa a 3.500 rpm, 15 min. Extraieu acuradament el sobrenadant que conté la invertasa dels dos tubs de centrífuga, mesureu el volum en una proveta de 10 ml i anoteu el volum. Aquest és **l'EXTRACTE INICIAL**. (Els passos 5 i 6 han de realitzar-se amb precaució per a no arrossegar ni el sediment ni la capa superior).
7. Separeu 4,0 ml d'EXTRACTE i col·loqueu-los en un vas de precipitats xicotet. Aquesta preparació és la que se sotmetrà a la resta d'etapes de purificació. Col·loqueu la resta **d'EXTRACTE** en un microtub Eppendorf convenientment retolat i conserveu-lo a 4 °C en frigorífic. Amb aquesta preparació es realitzaran tots els assajos analítics corresponents.



NOTA: En condicions normals, han d'obtenir-se 4,5 ml d'extracte. En cas de no haver obtingut el volum suficient, completeu amb H₂O fins a 4,5 ml en la proveta de 10 ml, mescleu bé i anoteu aquest volum com a volum total de la Fracció I; a continuació, separeu 0,5 ml per als assajos i seguïu el procés de purificació amb els 4,0 ml restants.

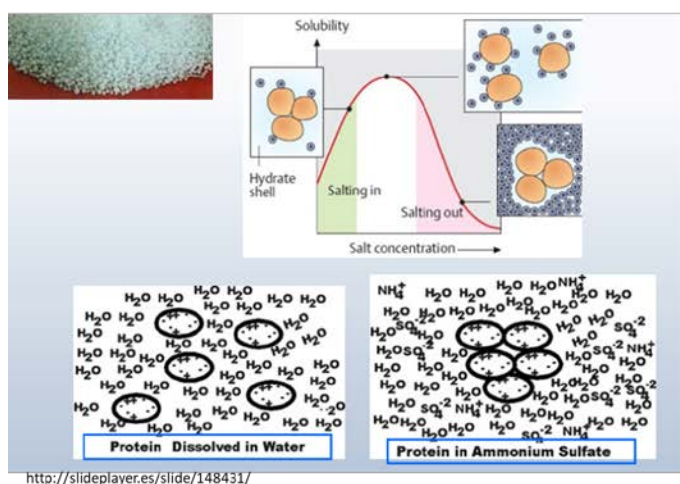
1.2. PURIFICACIÓ DE LA INVERTASA

PRIMERA ETAPA: PRECIPITACIÓ PER EFECTE SALÍ

El primer pas en la purificació de la invertasa consisteix en una **precipitació diferencial per efecte salí**. La sal utilitzada en aquest cas és el **sulfat amònic**. Com la invertasa presenta un elevat grau de glicosilació la seua solubilitat en aigua és molt elevada, per la qual cosa es manté en solució fins i tot en presència de concentracions molt elevades de sal, mentre que moltes de les proteïnes presents en la preparació precipiten.

PURIFICACIÓ DE LA INVERTASA: 1a etapa **PRECIPITACIÓ PER EFECTE SALÍ**

El primer pas en la purificació de la invertasa consisteix en una **precipitació diferencial per efecte salí**. La sal utilitzada en aquest cas és el **sulfat amònic**.



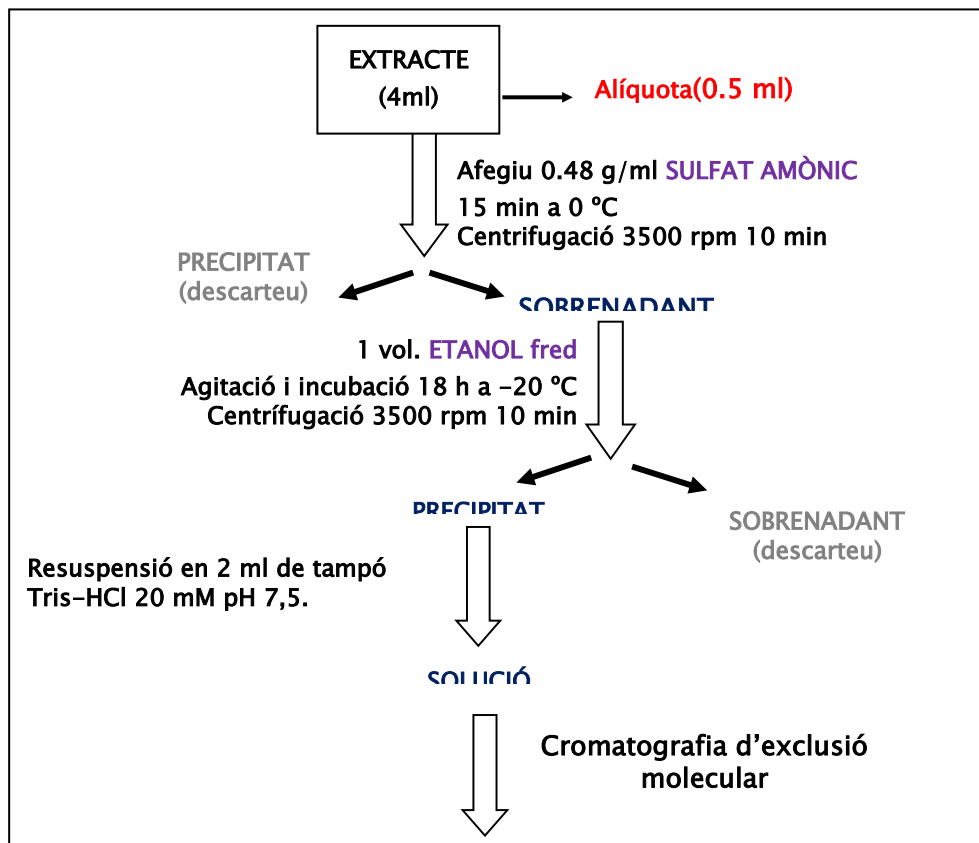
La precipitació salina de les proteïnes és una tècnica on s'aconsegueix la precipitació d'una fracció de proteïnes **mitjançant l'augment de la força iònica del medi**.

Quan augmenta la concentració de sals, **disminueix la interacció proteïna-H₂O** perquè lleva la capa de solvatació, predominant la interacció proteïna-proteïna i generant la precipitació d'aquestes. La concentració salina a la qual es produeix la precipitació **no és igual per a totes les proteïnes**, la qual cosa permet usar aquesta propietat per a la separació i purificació de proteïnes particulars a partir de mesclades complexes.

L'addició gradual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permet el fraccionament d'una mescla de proteïnes, **les quals són precipitades però no desnaturalitzades**.

Per a això, afegirem sulfat amònic a la mostra enzimàtica fins a aconseguir una concentració equivalent al **75 % de saturació** seguint el protocol següent:

1. Afegiu **1,92 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$** als 4,0 ml de la preparació enzimàtica (0,48 g/ml). L'addició ha de realitzar-se en un vas de precipitats xicotet, **a poc a poc** i agitant amb una vareta de vidre fins a la dissolució completa de cada quantitat afegida.
2. Passeu la solució en un tub de centrífuga i deixeu-lo a 0 °C, en un bany **de gel**, durant almenys 15 minuts.
3. Centrifugueu a 3500 rpm durant 10 minuts.
4. Recupereu el sobrenadant, el qual contindrà la invertasa en solució, i transferiu-lo al vas de precipitats xicotet. Utilitzeu per a això la pipeta Pasteur i eviteu **remoure el sediment**, el qual conté les proteïnes que han precipitat en aquestes condicions. Mesureu el volum obtingut.



1.3. SEGONA ETAPA: PRECIPITACIÓ AMB DISSOLVENT ORGÀNIC

El següent mètode a aplicar en el procés de purificació consisteix en una precipitació per addició d'un dissolvent orgànic miscible amb l'aigua. Per a això s'utilitza etanol. L'efecte de l'addició d'etanol a una dissolució de proteïnes és la **disminució de la solubilitat** d'aquestes a causa de la disminució de la constant dielèctrica del medi i a la dessolvatació de les proteïnes. La disminució de la constant dielèctrica del medi permet que les **forces atractives** entre els residus d'aminoàcids superficials de les proteïnes amb càrregues oposades **augmenten** i afavoreix així les interaccions entre les molècules proteïques i la **formació d'agregats** que precipiten per les seues majors dimensions i neutralització de les càrregues elèctriques. D'altra banda, l'etanol competeix amb les proteïnes per les molècules d'aigua del medi, i **disminueix la seua capa d'hidratació** i redueix considerablement la seua solubilitat. Depenent de les seues característiques fisicoquímiques, cada proteïna precipitarà a una determinada concentració del solvent orgànic. En aquest procés de purificació, la precipitació es realitza per l'addició **al medi aquós d'1 volum d'etanol 96% fred (-20 °C)**. En aquestes condicions, contràriament a l'etapa de purificació anterior, es provoca la **precipitació de la invertasa**.

El procediment és el següent:

1. Introduïu el vas de precipitats amb la fracció enzimàtica en un bany **de gel**.
2. Afegiu **1 volum d'etanol prèviament refredat a -20 °C, gota a gota**, lentament i agitant per a mesclar bé. Una vegada finalitzada l'addició passeu el contingut del got a un tub de centrifuga.
3. Tanqueu el tub amb parafilm i retoleu-lo degudament.
4. Deixeu a -18 °C (en congelador) tota la nit perquè es produïska la precipitació completa de les proteïnes.

**(EN AQUEST PUNT CONTINUA LA PURIFICACIÓ DE LA INVERTASA.
SEGON DIA DE PRÀCTIQUES)**

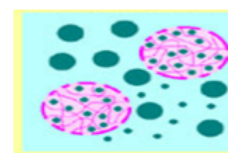
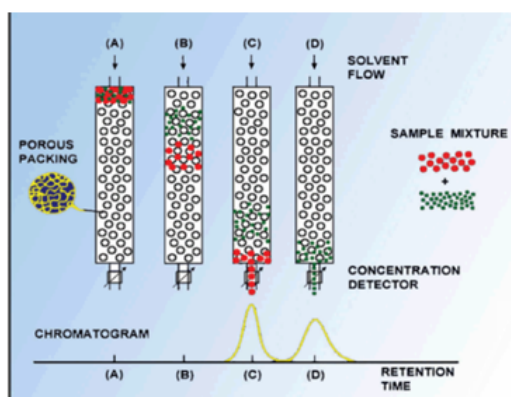
L'endemà, recupereu el tub i eixugueu-lo bé per fora.

5. Centrifugueu els tubs a 3500 rpm durant 10 minuts (sense parafilm).
6. Decanteu perfectament el sobrenadant, és important que no queden restes d'etanol en el tub d'assaig. Si és necessari, utilitzeu una pipeta Pasteur.
7. Resuspeneu completament el precipitat, en el qual es troba la invertasa, amb **2,0 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 7,5**.

1.4. TERCERA ETAPA: CROMATOGRAFIA D'EXCLUSIÓ MOLECULAR

La següent etapa del procés de purificació consisteix en una cromatografia de filtració en gel o d'exclusió molecular, l'objectiu és **eliminar de la preparació enzimàtica les substàncies no proteïques de baix pes molecular**, com les restes de sulfat amònic i etanol arrossegats en les anteriors etapes i **canviar l'enzim a un tampó on siga estable**. Per a això s'utilitzen unes columnes, denominades **PD-10 preempaquetades**, el farciment de les quals consisteix en un gel de **Sephadex G-25**, polímer de **dextrà**, el límit d'exclusió del qual és de, aproximadament, 5000 Daltons. Això

significa que les substàncies amb pes molecular inferior a 5000 seran eluïdes després de les que tenen un pes molecular superior, com la **invertasa**.



Les partícules grans no poden entrar en el gel i són excloses, per tant tindran **menys volum que travessar i eixiran abans**

Les molècules xicotetes sí poden entrar en el gel i per tant recorreran més volum i eixiran més tard.

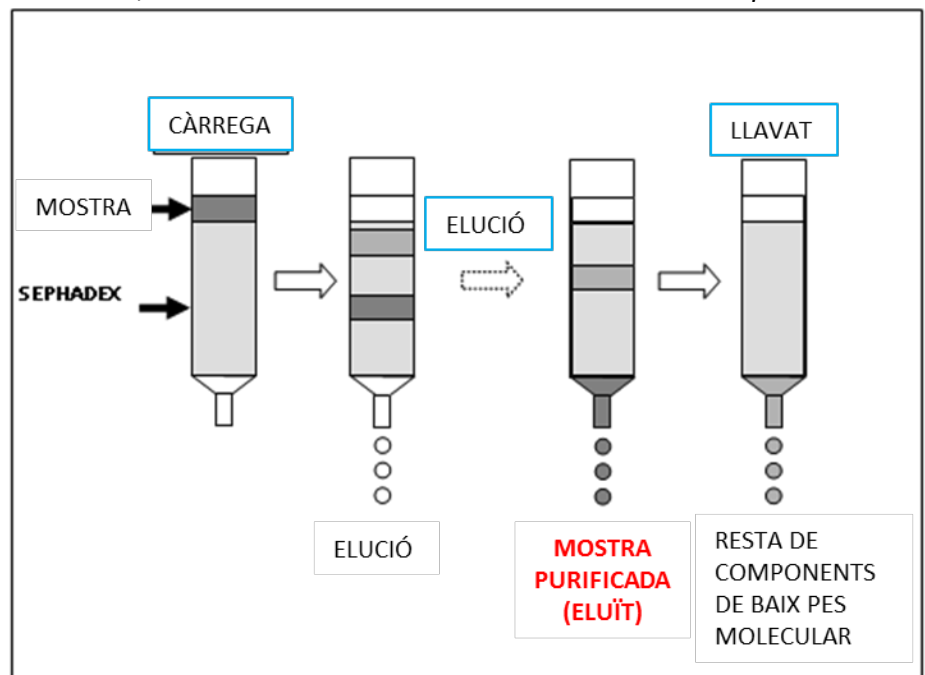
És molt important **no permetre que el gel de la columna s'asseque**, ja que açò pot provocar la ruptura de l'homogeneïtat del gel, una cromatografia ineficaç i que la columna quede inservible.

Cada addició de líquid distint (tampó de llavat, mostra, tampó d'elució i aigua de llavat final) es realitza de seguida haja penetrat el líquid anterior en el gel, és a dir quan siga visible la superfície de la placa porosa superior de la columna.

El procediment de la cromatografia d'exclusió molecular és el següent:

1. Retireu els taps superior i inferior de la columna PD-10 i col·loqueu-la en la boca d'una proveta de 50 ml, fent falca amb una punta blava per a subjectar-la. Deixeu que el líquid que conté gotege fins **que haja penetrat completament en el gel de filtració**.
2. Equilibreu la columna afegint **20 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 7,5** i deixeu gotejar fins que en la proveta s'arreglen almenys 20 ml. *Tanqueu la columna i deixeu tampó en la part superior, si no heu de procedir a la cromatografia immediatament. Una vegada preparada la mostra enzimàtica, es torna a obrir la columna i es deixa penetrar completament el tampó.*

3. **Introduïu els ~2,0 ml del sediment ben resuspès** obtingut en l'etapa anterior en la columna, deixeu que penetren completament en la columna. Descarteu l'eluit, el qual és tampó que estava embevent la fase estacionària i no conté invertasa.

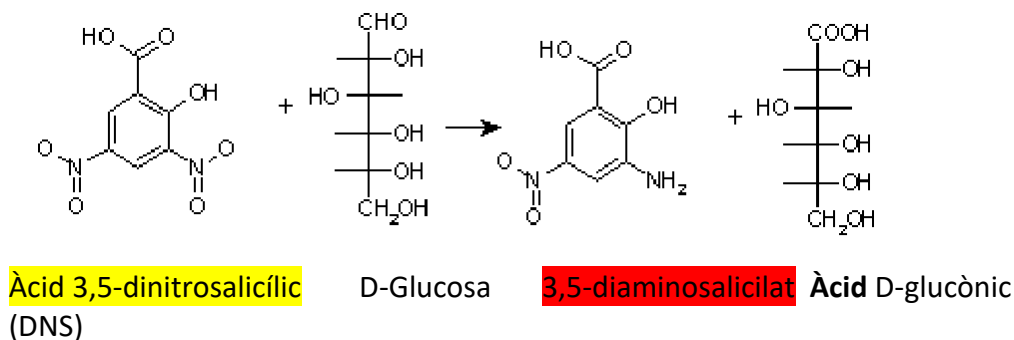
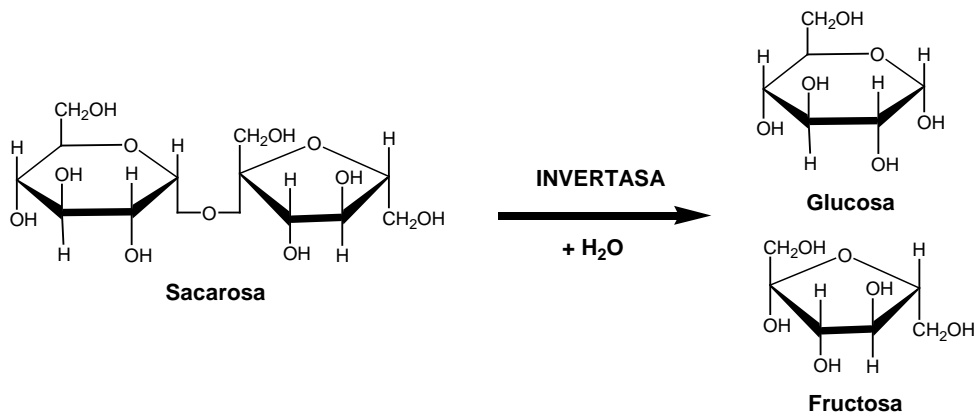


4. **Afegiu 3,5 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 7,5** i immediatament **comenceu a arregar l'eluit** en un tub de vidre fins que el tampó haja penetrat completament en la columna. Aquest eluit conté la **invertasa** i correspon a la **FRACCIÓ PURIFICADA** del procés de purificació. Les altres substàncies de baix pes molecular travessen la columna més lentament.
5. Torneu a col·locar la columna sobre la proveta de 50 ml i afegiu H₂O per a llavar-la fins que totes les restes hagen sigut eliminades. Tapeu la columna i deixeu prou quantitat de H₂O en la part superior.

NOTA: No oblideu mai que les preparacions d'invertasa (extracte i fracció purificada) són un material preciós que en cap cas s'han de rebutjar abans de la finalització de les pràctiques. Conserveu sempre a 4 °C.

PRÀCTICA 2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

La determinació de l'activitat de l'enzim **invertasa** està basada en la mesura de la quantitat de sucres reductors alliberats al medi durant un determinat període de temps. Per a això, la preparació enzimàtica **d'invertasa** s'incuba en presència del seu substrat, la **sacarosa**, en condicions adequades de pH i temperatura, durant un temps exactament determinat. En aquesta incubació, l'enzim hidrolitza la **sacarosa** alliberant al medi quantitats equimoleculares de **glucosa** i de **fructosa**. La sacarosa no té propietats reductores, però sí els seus productes, glucosa i fructosa, la quantitat dels quals es valora mitjançant una reacció química basada en les seues propietats reductores. Per a això, s'afeg una quantitat determinada d'una dissolució de **3,5-dinitrosalicilat (DNS)**. Aquest reactiu és reduït a **3,5-diaminosalicilat (DNS)**, el qual presenta un màxim d'absorció de llum a **530 nm**, longitud d'ona a la qual el DNS pràcticament no absorbeix. Açò permet determinar espectrofotomètricament la quantitat de DNS en el tub d'assaig i relacionar-la directament amb les quantitats de glucosa i fructosa alliberades per l'acció de l'enzim, equivalents a la quantitat de sacarosa que ha sigut hidrolitzada en el període d'incubació.



Per a relacionar directament el valor d'absorbència obtingut per a cada tub d'assaig amb la quantitat de sacarosa hidrolitzada, és necessari elaborar, prèviament, una **RECTA PATRÓ** utilitzant quantitats conegudes d'una mescla equimolecular de **glucosa** i **fructosa** (equivalent a una dissolució de la mateixa concentració de **sacarosa hidrolitzada**). Després de la seua reacció amb el DNS, en les mateixes condicions en què es realitzaran els assajos d'activitat enzimàtica de la invertasa, el valor d'absorbència determinat espectrofotomètricament és directament proporcional a la quantitat de sacarosa hidrolitzada present en el tub d'assaig, la qual cosa simplifica considerablement els càlculs a realitzar.

Una vegada elaborada aquesta recta patró, els valors d'absorbància obtinguts en els assajos d'activitat de l'enzim s'interpolen en aquesta recta (gràfica i/o matemàticament), cosa que permet conèixer la quantitat de sacarosa hidrolitzada per l'enzim durant el temps en què aquesta ha actuat sobre el seu substrat.

1. RECTA PATRÓ DE SACAROSA HIDROLITZADA (DIA 1)

Reactius

- Patró de glucosa i fructosa 2,5 mM de cadascú (equivalent a una dissolució de **sacarosa hidrolitzada 2,5 mM**).
- Tampó acetat/acètic 0,05 M pH 5**. És el tampó que s'utilitzarà en els assajos enzimàtics i, per tant, ha de ser també afegit per a l'obtenció de la recta patró.
- Dissolució alcalina de **3,5-dinitrosalicilat (DNS)**. Aquest reactiu es prepara dissolent, d'una banda, 2,5 g d'àcid 3,5-dinitrosalicílic en 50 ml de NaOH 2N prèviament calfats a 85 °C; i d'altra banda, 75 g de tartrat sodicopotàssic en 125 ml de H₂O, calfats també a 85 °C. Finalment es mesclen ambdues dissolucions en calent, es deixa refredar i es completa el volum fins a 250 ml amb H₂O. La seua preparació en un medi fortament alcalí (**NaOH 2N**) **servirà també per a detenir la reacció enzimàtica** tal com s'indicarà en el següent apartat.

Procediment: *En tubs d'assaig de vidre*

		tub 1	tub 2	tub 3	tub 4	tub 5	tub 6
Patró sacarosa hidrolitzada 2,5 mM	ml	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tampó acetat/acètic 0,05 M pH 5,0	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	ml	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Mesclar bé							
DNS	ml	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Una vegada afegit el reactiu DNS, es mescla de nou i es procedeix a la reacció **química de reducció**. Per a això és necessari calfar els tubs d'assaig a **100 °C** durant un temps aproximat de **10 minuts**.

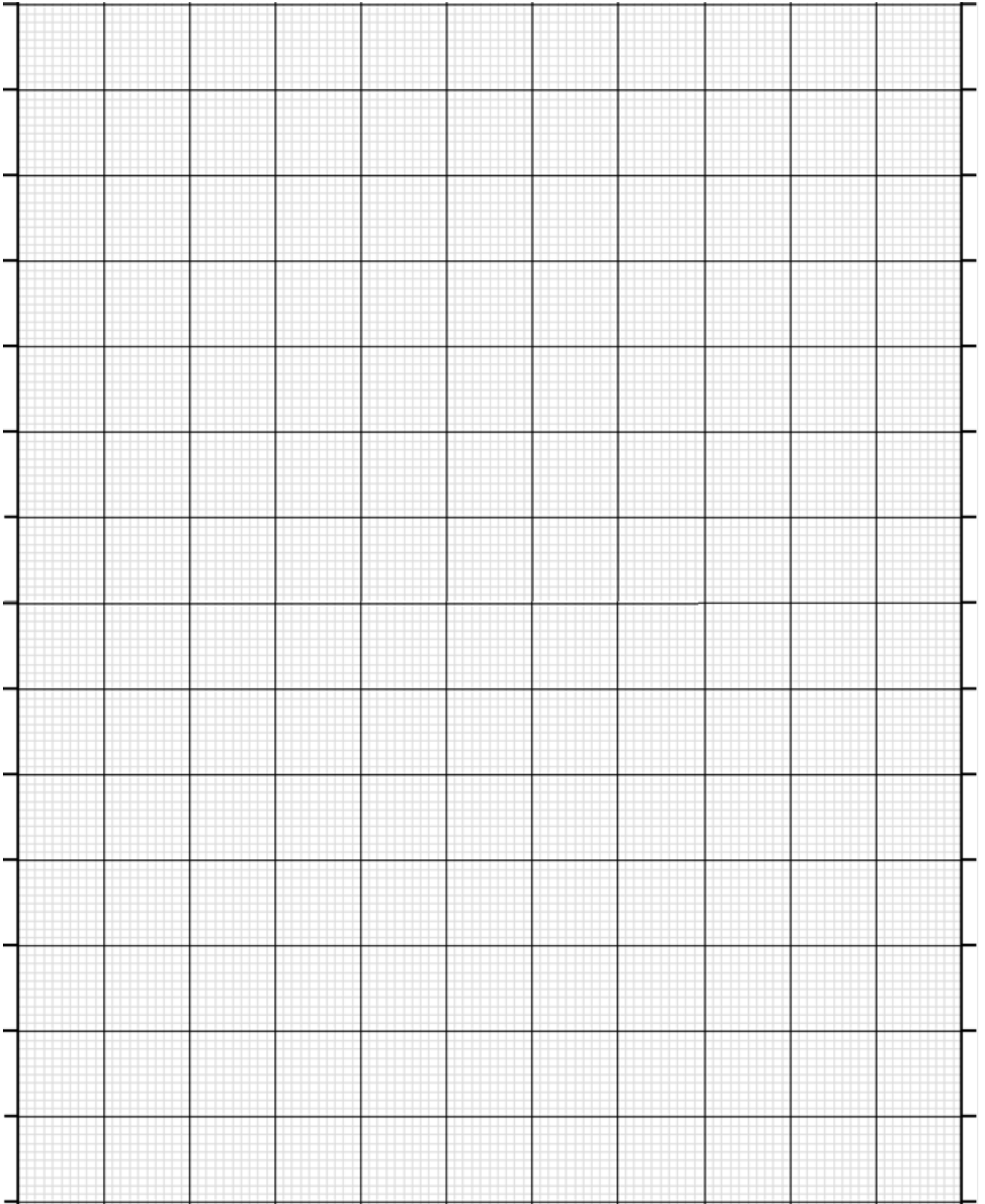
La lectura espectrofotomètrica es realitza a **530 nm** directament en aquests tubs. El tub 1 no té dissolució patró de sacarosa hidrolitzada, per la qual cosa constitueix el tub **de referència o blanc** per a l'assaig. Amb aquest s'ajusta la lectura de l'espectrofotòmetre a 0, i serà el primer punt de la recta patró. La resta dels tubs es lligen successivament i s'anota el valor d'absorbància obtingut.

Els tubs han d'estar **perfectament secs i nets** d'empremtes digitals i de marques de retolació que puguen interferir amb la lectura.

En paper mil·limetrat es representen gràficament els valors d' A_{530nm} respecte de la quantitat en micromols (μmol) de sacarosa hidrolitzada obtinguts. La quantitat de sacarosa hidrolitzada present en cada tub es calcula a partir de la concentració de la dissolució utilitzada com a patró i el volum afegit d'aquesta dissolució a cada tub. *(Aquests valors experimentals es poden sotmetre a una regressió lineal matemàtica pel mètode dels mínims quadrats).*

Resultats

RECTA PATRÓ		
Tub	A_{530}	Sacarosa hidrolitzada (μmol)
1		
2		
3		
4		
5		
6		



2.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE L'EXTRACTE I DE LA FRACCIÓ PURIFICADA (DIA 2).

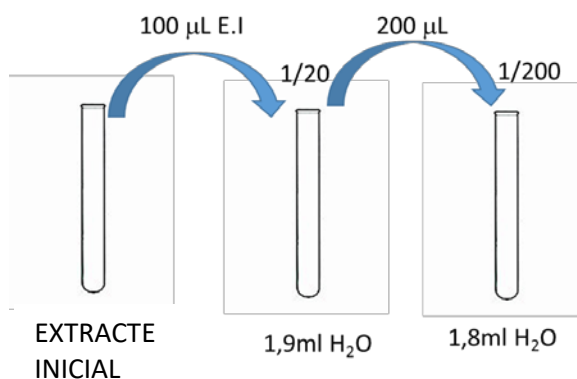
L'assaig de l'activitat enzimàtica de l'extracte i de la fracció purificada d'invertasa, obtingudes al llarg del procés de purificació, es realitza per duplicat, utilitzant dues quantitats diferents de cada una de les preparacions. Aquest assaig es realitza amb **dilucions** adequades de les fraccions d'invertasa. És necessari diluir aquestes fraccions d'enzim per a ajustar-se a les condicions experimentals de l'assaig. Un excés d'enzim en l'assaig consumiria prematurament la quantitat de substrat afegida, per la qual cosa l'activitat mesurada no seria lineal al llarg del període complet d'incubació. Al contrari, una quantitat massa petita d'enzim dificultaria la mesura de la seua activitat en registrar-se variacions d'absorbància massa petites. **Cada una de les fraccions requereix una dilució òptima per a ajustar-la a l'assaig d'activitat.** L'activitat de la invertasa pot variar apreciablement d'una preparació a una altra, per la qual cosa, encara que més avant s'indiquen unes dilucions orientatives, s'ha d'atendre als suggeriments del professor en cada cas per a realitzar la dilució més convenient.

Una valoració correcta de l'activitat enzimàtica depèn en gran manera de l'exactitud en el mesurament del temps durant el qual l'enzim actuarà sobre el seu substrat. En les condicions experimentals d'aquest assaig, es considera adequat un temps d'incubació **de 5,0 minuts**, per la qual cosa en cada tub d'assaig, la invertasa ha d'exercir la seua activitat catalítica **exactament** durant aquest temps. Per a això, els tubs es preparen afegint la fracció enzimàtica, el tampó i l'aigua per a ajustar els volums. A continuació, cronòmetre en mà, **s'inicia** l'addició de la dissolució de **sacarosa** (el substrat de la invertasa) al primer tub, i successivament, **a intervals precisos de 30 segons**, es va afegint als restants tubs. La reacció enzimàtica comença en el moment en què l'enzim es troba amb el seu substrat i **finalitza en el moment** de l'addició del **3,5-dinitrosalicilat (DNS)**, ja que les característiques alcalines d'aquesta dissolució inactiven l'enzim. **5,0 minuts després de l'addició de la sacarosa al primer tub, s'afeg a aquest el DNS**, i successivament, amb el mateix interval de **30 segons**, s'afeg als tubs restants. En el cas que, per diverses circumstàncies, el temps transcorregut entre l'addició de la sacarosa (inici de la reacció enzimàtica) i del DNS (final de la reacció) no siga de 5,0 minuts, s'ha d'anotar el temps exacte d'incubació a què s'ha sotmès cada un dels tubs.

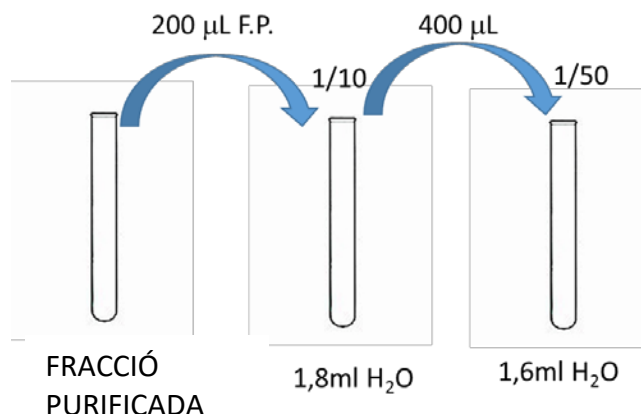
En l'assaig hem inclòs un tub que no conté cap preparació enzimàtica. Aquest tub (1) és el denominat blanc i serveix per a fer el zero en l'espectrofotòmetre.

Dilucions de les diferents fraccions enzimàtiques

EXTRACTE INICIAL: Prepareu, en primer lloc, una dilució **1/20** en H₂O a partir de l'alíquota original (recomanable prendre 0,1 ml i diluir fins a 2,0 ml). **Agiteu.** Prepareu, a continuació, una dilució **1/200** en H₂O; per a això, es realitza una dilució 1/10 de la ja diluïda 1/20 (recomanable prendre 0,2 ml de la dilució 1/10 i diluïu fins a 2,0 ml). Conserveu ambdues dilucions.



FRACCIÓ PURIFICADA: Prepareu una dilució **1/10** en H₂O a partir de l'alíquota original (agafeu 0,2 ml i diluïu fins a 2,0 ml). **Agiteu.** Prepareu a continuació una dilució **1/50**, per a la qual cosa es realitza una dilució 1/5 de la dilució 1/10 (0,4 ml de la dilució 1/10 i aigua fins a 2,0 ml).



Procediment

		BLANC	Extracte (1:200)		F. purificada (1:50)	
		Tub 1	Tub 2	Tub 3	Tub 4	Tub 5
Fracció	ml	0	0,25	0,5	0,25	0,5
Tampó acetat/ acètic 0,05 M pH 5,0	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H₂O	ml	0,5	0,25	0	0,25	0
Quan tots els tubs ho tinguem tot, afegiu la Sacarosa cada 30 s						
Sacarosa 0.3 M (cada 30 segons)	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubeu 5 min. Incubeu exactament 5 min cada tub, comptant des de l' addició de sacarosa (inici de la reacció enzimàtica) fins a l' addició del DNS (final de la reacció per increment de pH)						
DNS (cada 30 segons)	ml	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Finalitzada la incubació, igual que per a l'elaboració de la recta patró, es procedeix a la **reacció química del DNS** amb la glucosa i la fructosa alliberades al mig, calfant **tots els tubs a 100 °C durant 10 minuts**. Una vegada refredats els tubs, es procedeix a la lectura espectrofotomètrica a **530 nm** directament en aquests tubs.

El Tub 1 no té fracció enzimàtica, per la qual cosa constitueix el tub **de referència o blanc** per a l'assaig. Amb ell s'ajusta la lectura de l'espectrofotòmetre a 0. La resta dels tubs es lligen successivament i s'anota el valor d'absorbància obtingut.

Càlcul de l'activitat

L'activitat enzimàtica de cada una de les fraccions **d'invertasa** s'expressa en μmol de sacarosa hidrolitzada per minut i per ml de fracció ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$). La quantitat de sacarosa hidrolitzada per la invertasa durant el temps d'incubació de l'assaig (**μmol de sacarosa hidrolitzada**) s'obté per **interpolació** matemàtica dels valors d'absorbància obtinguts per a cada tub **en la recta patró prèviament** elaborada.

A partir del valor d'absorbància s'obté la quantitat (μmol) de sacarosa que ha sigut hidrolitzada en cada un dels tubs interpolant en la recta patró realitzada el dia anterior. A continuació, es calcula l'activitat tenint en compte el temps **d'incubació**, el volum **de fracció assajat** i la **dilució** que s'ha realitzat en la mostra de la manera següent:

$$\text{Activitat } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{\mu\text{mol}}{t \cdot V} \times D$$

t és el temps d'incubació en **minuts**

V el volum de l'extracte en ml

D el factor de dilució de la mostra (en aquest cas $D = 200$ per a l'extracte inicial i $D = 50$ per a la fracció purificada).

Com l'assaig ha sigut realitzat per duplicat amb cada fracció utilitzant dues quantitats diferents, el resultat definitiu d'activitat de cada una de les fraccions serà la **mitjana** de totes dues determinacions.

Resultats

ACTIVITAT DE LES MOSTRES							
TUB	Mostra	A ₅₃₀	Sacarosa hidrolitzada (μmol)	ml	FD (factor dilució)	Activitat mostra ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{ml}$)	Activitat mitjana ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{ml}$)
1							
2							
3							
4							
5							

PRÀCTICA 3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

La determinació de la quantitat de proteïnes de les fraccions d'invertasa es realitza pel mètode **descriu per Bradford** en 1976. Aquest mètode només requereix un reactiu i es basa en l'observació que el màxim d'absorbància d'una solució àcida de Blau de Coomasie G-250 canvia de **465 nm a 595 nm quan es produeix la unió a proteïnes**.

Igual que en l'assaig d'activitat enzimàtica, és necessari **elaborar una RECTA PATRÓ amb** quantitats conegudes de proteïnes per a relacionar directament l'absorbància mesurada a 595 nm amb la quantitat de proteïnes existent en el tub d'assaig en les condicions experimentals pròpies. El patró per a la determinació de proteïnes és l'**albúmina de sèrum boví (BSA)**. En aquest assaig, la recta patró de proteïnes es realitzarà conjuntament a la determinació. Els valors obtinguts amb els patrons de BSA es representaran gràficament.

El reactiu de treball de **Bradford** consta d'una dissolució concentrada que s'afegirà als tubs on prèviament haurem col·locat la mostra o el patró de proteïnes. A causa de la sensibilitat del mètode de Bradford, la determinació de proteïnes (igual que els assajos d'activitat) es realitzarà utilitzant dilucions **adequades** de les fraccions enzimàtiques, tal com s'indica en el procediment.

Dilució 1/20 per a l'extracte inicial (0,1 ml d'Extracte Inicial + 1,9 ml de H₂O) i dilució 1/2 per a la fracció purificada (1 ml de FracPurificada +1 ml de H₂O).

Reactius

- a) Reactiu **de treball de Bradford**: Blau Coomasie, àcid fosfòric i metanol.
- b) Dissolució **patró de BSA 0.025 mg/ml**.

<u>Procediment</u>		RECTA PATRÓ						EXTRACTE INICIAL (1:20)		FRACCIÓ PURIFICADA (1:2)	
N.Tub		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA (0.025 mg/ml)	ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8				
Fracció enzimàtica	ml							0,3	0,6	0,3	0,6
H ₂ O	ml	0,8	0,7	0,6	0,4	0,2	0	0,5	0,2	0,5	0,2
Reactiu Bradford	ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mescleu ben cada tub immediatament després de l'addició del reactiu. Incubeu 5 min a temperatura ambient. Passeu a cubeta d'espectrofotòmetre Determineu l' absorbància a 595 nm .											

Càlcul de la concentració de proteïnes

Resultats

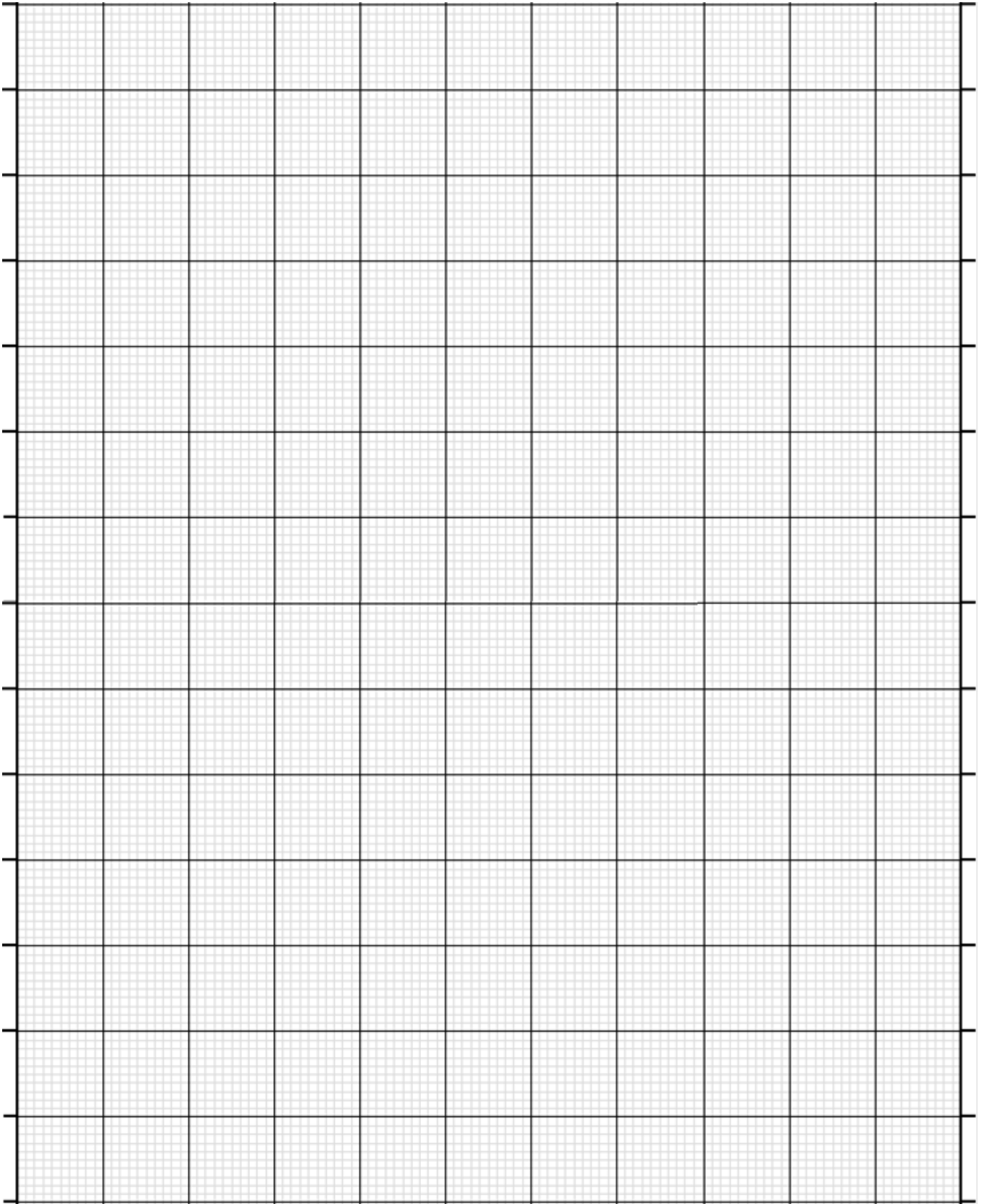
RECTA PATRÓ DE PROTEÏNES		
Tub	A ₅₉₅	Proteïnes (mg)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

La quantitat de proteïnes s'obté de la interpolació matemàtica dels valors d'absorbància obtinguts per a cada tub en la recta patró elaborada. A partir d'aquest valor, tenint en compte el volum de fracció assajat i la dilució que s'ha realitzat en la mostra, es calcula la concentració de proteïnes de la fracció enzimàtica originària. La concentració **de proteïnes de cada una de les fraccions d'invertasa s'expressa en mg de proteïna per ml de fracció (mg.ml⁻¹)**.

$$[\text{Proteïnes}] \text{ (mg. ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{mg proteïnes}}{\text{V (ml)}} \times \text{D}$$

El resultat final serà la mitjana dels valors obtinguts amb les diferents quantitats de cada fracció.

RESULTATS DE LA DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES DE LES MOSTRES							
Tub	Mostra	A ₅₉₅	Proteïnes (mg)	ml	FD (factor dilució)	[Proteïnes] (mg.ml ⁻¹)	[Proteïnes] mitjana (mg.ml ⁻¹)
7							
8							
9							
10							



PRÀCTICA 4. AVALUACIÓ DEL PROCÉS DE PURIFICACIÓ

En el procés de purificació realitzat sobre l'extracte **crú** d'invertasa (Extracte **inicial**) fins a obtenir la preparació purificada (Fracció **purificada**) s'han produït variacions en l'activitat de l'enzim i en la concentració de proteïnes de la mostra. En aquest procés s'han eliminat progressivament altres proteïnes presents en el medi així com substàncies interferents. Tant l'extracte inicial com la fracció purificada es caracteritzen per dos paràmetres: l'activitat **enzimàtica total** i l'activitat **específica**. Les relacions entre aquests paràmetres ens permeten valorar el procés de purificació al qual hem sotmès l'enzim i calcular el rendiment **de la purificació** i el **factor de purificació** corresponents al procés de purificació global.

1. CÀLCUL DE L'ACTIVITAT TOTAL

L'**activitat total** de cada una de les preparacions enzimàtiques s'obté a partir de l'activitat **enzimàtica** ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) i del volum **total de fracció** assajada (ml), per tant, s'expressa en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Ja que els assajos d'activitat s'han realitzat en condicions d'activitat màxima (a concentració saturant de substrat), l'activitat total de la invertasa en cada una de les fraccions **representa una mesura de la quantitat total d'enzim actiu present en la preparació**.

$$\text{Activitat total } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}) = \text{Activitat } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}) \times V_{\text{total}} \text{ (ml)}$$

La fracció purificada ha de presentar un valor d'activitat total inferior a la de l'extracte inicial, o en el millor dels casos, igual, perquè en cada etapa del procés de purificació es perd inevitablement una part d'enzim.

2. CÀLCUL DEL RENDIMENT DE LA PURIFICACIÓ

El rendiment **de la purificació** és la relació existent entre les activitats **enzimàtiques totals** de les dues fraccions que es comparen. S'expressa com a **valor percentual** segons l'expressió:

$$\text{Rendiment (\%)} = \frac{\text{Act. total } F_{\text{purificada}}}{\text{Act. total Ext.}} \times 100$$

Aquesta expressió **ens proporciona el rendiment del procés complet** de purificació al qual hem sotmès l'extracte d'invertasa, ja que relacionem l'última fracció obtinguda amb la primera.

En tot procés de purificació se sacrifica una part de l'activitat total, ja que els mètodes de precipitació o cromatogràfics utilitzats no sempre recuperen la totalitat de la proteïna enzimàtica que es pretén separar i, a més, necessàriament s'ha de reservar una certa quantitat per als assajos analítics. Si es pretén aconseguir una gran quantitat d'enzim, sense importar massa que aquesta s'obtinga en un estat molt pur, és convenient utilitzar mètodes que proporcionen un rendiment alt. Si, al contrari, es pretén aïllar l'enzim en un estat molt pur, forçosament el rendiment serà inferior. En definitiva, el mètode de purificació triat per a un

enzim concret ha d'arribar a un compromís entre el rendiment i el factor de purificació, i es decantarà cap a un o altre segons l'estudi que es pretenga realitzar amb la preparació enzimàtica.

3. CÀLCUL DE L'ACTIVITAT ESPECÍFICA

L'**activitat específica** de cada una de les preparacions enzimàtiques s'obté a partir de l'**activitat enzimàtica** ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) i la **concentració de proteïnes** ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) corresponent, s'expressa, per tant, en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Aquest paràmetre indica la relació entre l'activitat mesurada i la quantitat de proteïnes present en la mostra.

$$\text{Activitat específica } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}) = \frac{\text{Activitat } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1})}{[\text{Proteïnes}] (\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})}$$

Com més enriquida en **invertasa** siga la fracció enzimàtica major serà la seua **activitat específica**. Per tant, si el procés de purificació s'ha realitzat correctament, **la fracció purificada tindrà una activitat específica major que l'extracte inicial**. Si ocorre el contrari, serà evident que s'han comès errors experimentals en els assajos analítics, en el procés de purificació o bé s'ha produït una pèrdua d'activitat de l'enzim a causa d'una incorrecta manipulació de les mostres.

4. CÀLCUL DEL FACTOR DE PURIFICACIÓ

El **factor de purificació** és un paràmetre que indica **el nombre de vegades que una proteïna enzimàtica ha sigut purificada respecte a la preparació amb la qual es compara**. Es calcula a partir de les activitats específiques de les diferents fraccions segons l'expressió:

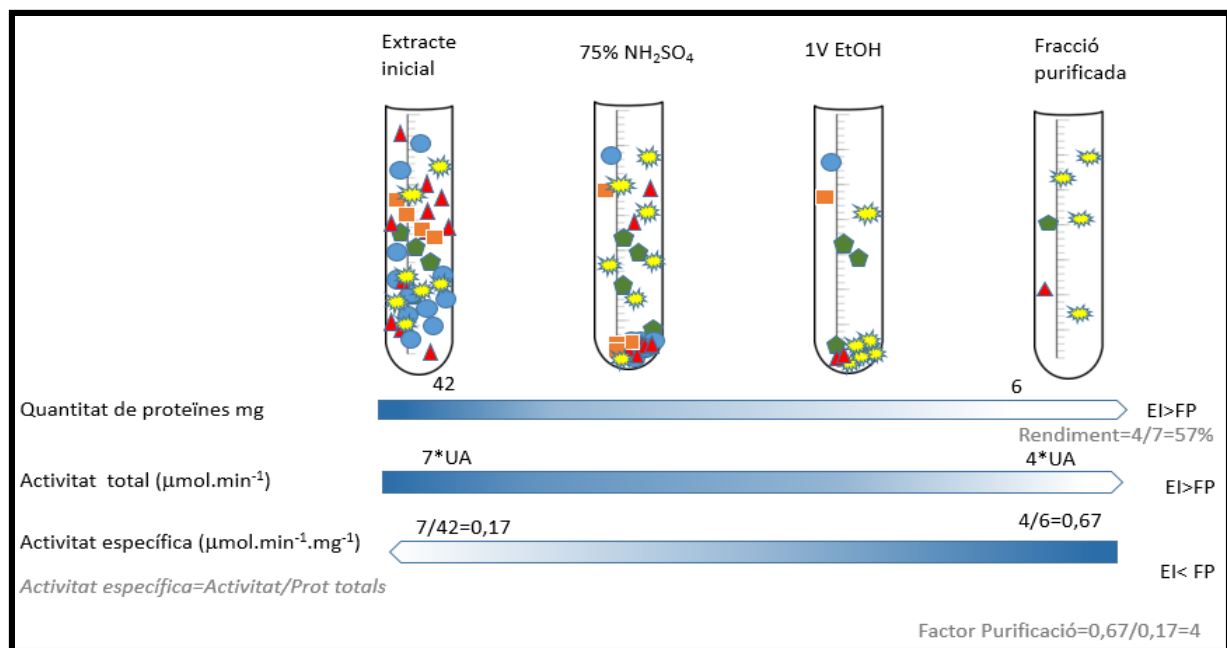
$$\text{Factor de Purificació} = \frac{\text{Act. específica } F_{\text{purificada}}}{\text{Act. específica Ext.}}$$

Com major siga el factor de purificació obtingut, més enriquida en l'enzim objecte del nostre estudi és la preparació enzimàtica i menys proteïnes indesitjables es troben presents.

RESUM DEL PROCÉS DE PURIFICACIÓ

A fi d'obtenir una perspectiva global del procés de purificació a què hem sotmès l'extracte d'invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, hem de reunir totes les dades obtingudes fins al moment en el quadre següent:

	EXTRACTE INICIAL	FRACCIÓ PURIFICADA
Volum total de fracció (ml)		
Concentració de proteïnes (mg.ml ⁻¹)		
Quantitat total de proteïnes (mg)		
Activitat enzimàtica per ml (μmol.min ⁻¹ .ml ⁻¹)		
Activitat total de la fracció (μmol.min ⁻¹)		
Activitat específica (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
Rendiment del procés (%)		
Factor de purificació global		



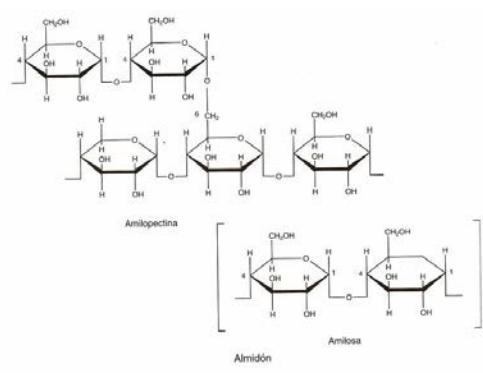
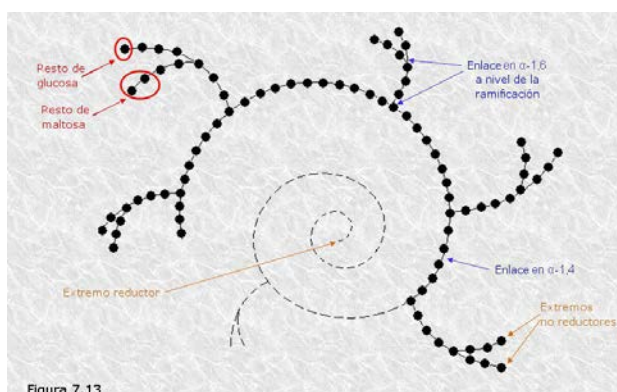
Exemple esquematitzat d'un procés de purificació

PRÀCTICA 5. DETERMINACIÓ DE LA PRESENCIA DE MIDÓ EN ELS ALIMENTS

INTRODUCCIÓ

El **midó** és un *homopolisacàrid*, constituït per la unió de grans quantitats de **monòmers de glucosa** que forma llargues cadenes. El midó està format per dos compostos de diferent estructura:

- **Amilosa**: Està formada per α -D-glucopiranoses unides per centenars o milers (normalment de 300 a 3000 unitats de glucosa) per enllaços α -(1 \rightarrow 4) en una cadena lineal. Aquesta cadena adopta una disposició helicoidal i té sis monòmers per cada volta d'hèlice. Constitueix el 25-30 % del midó.
- **Amilopectina**: També formada per α -D-glucopiranoses unides per enllaços α -(1 \rightarrow 4), encara que en aquest cas conforma una cadena altament ramificada amb enllaços α -(1 \rightarrow 6) en cada punt de ramificació, normalment cada dotze monòmers. El seu pes molecular és molt elevat, ja que cada molècula reuneix de 2.000 a 200.000 unitats de glucosa. Constitueix el 70-75 %



restant.

- El midó es presenta com un conjunt de grànuls o partícules. Les grandàries i les formes dels grans de midó varien d'un cereal a un altre. Aquests grànuls són relativament densos i insolubles en aigua freda, però poden contenir aigua en augmentar la temperatura, és a dir, els grànuls de midó pateixen el procés denominat gelatinització.

El midó és la substància de reserva més important en les plantes i es troba en arrels (iuca), tubercles (creïlla), fruites i llavors (cereals). Però no sols és una important reserva per a les plantes, també per als éssers humans té una alta importància energètica. En una dieta sana, la major part de l'energia l'aconseguim a partir del midó i els monòmers de glucosa en què s'hidrolitza.

El midó és un hidrat de carboni present en molts aliments d'origen vegetal, però que no hauria d'estar mai present en els aliments d'origen animal; no obstant això, el midó és molt utilitzat en la indústria **alimentària** com a additiu per a alguns aliments. Té múltiples funcions, entre les quals cal destacar:

1. Absorbent **d'aigua**. Protector contra la humitat de diversos productes en pols —com sucres— perquè els midons absorbeixen humitat sense atapeir-se.
2. Millora **la textura**. Espessidor, proporciona cos i textura a l'aliment preparat; per a sopes, aliments per a infants, salses, gelatines sintètiques.
3. **Aglutinant**, per al lligament de components. En la preparació de salsitxes i embotits.
4. **Emulsificant**, produeix una emulsió estable en la preparació de maioneses i salses semblants.
5. **Agent de farcit** i reducció de cost en l'elaboració de productes carnis.
6. Disminueix les minves de cocció.
7. Substitueix **els greixos** pel midó.
8. Agent **per a empolverar**, combinat amb sucre polvoritzat en gomes, caramels i gomes de mastegar.
9. **Estabilitzador**, per la seua elevada capacitat de retenció d'aigua és usat en productes com gelats.
10. En la mescla amb farines per a abaixar el contingut de proteïnes i la força del gluten en forns. En la fabricació de galetes per a augmentar la seua propietat d'estendre's i cruixir, a més d'ablanir la textura, augmentar el sabor i evitar que s'apegue.

En aquesta pràctica utilitzarem una tècnica molt senzilla que ens **permetrà detectar el midó** en distints tipus d'aliments. Quan el iode reacciona amb el midó pren un **color blau fosc o violeta**. Normalment, per a aquesta reacció s'utilitza un reactiu de laboratori que rep el nom de **lugol** (dissolució de iode, al 5 %, i iodur de potassi, al 10%, en aigua). La coloració produïda pel lugol es deu al fet que el iode s'introdueix entre les espirals de la molècula del midó. No és, per tant, una reacció química, sinó que es forma un compost d'inclusió que modifica les propietats físiques d'aquesta molècula, i provoca l'aparició de la coloració violeta. També podem portar a terme aquesta tècnica a partir dels productes farmacèutics iodats que s'utilitzen habitualment per a tractar les ferides. Tradicionalment s'ha utilitzat la tintura de iode. A Espanya, el producte més habitual es comercialitza amb el nom de *Betadine*.

Procediment:

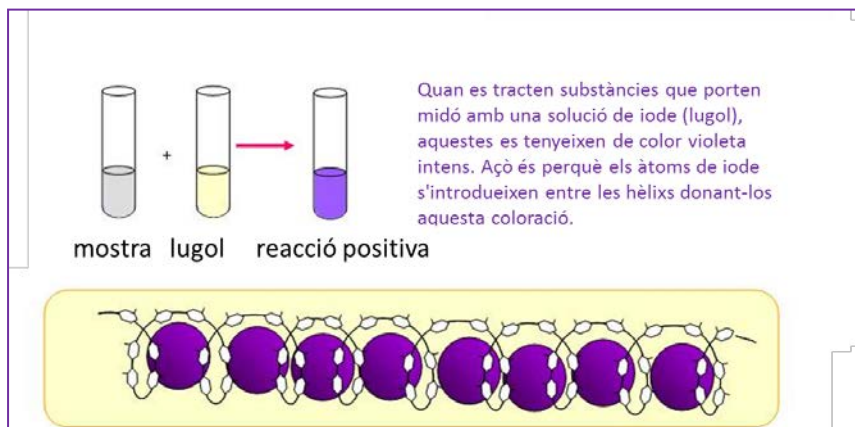
Aliments:

Peix blanc, pollastre, formatge, pernil dolç, mortadel·la, xòped, salsitxó, xoriç, salsitxes Frankfurt, iogurt, pa, creïlla, etc.

Reactius:

Lugol: Solució iode-iodurada: mescleu 1 gram de iode resublimat pur i 2 grams de iodur de potassi en aigua destil·lada fins a 200 ml. Guardeu en flascó protegit de la llum.

(PRECAUCIÓ: s'ha d'evitar el contacte amb els ulls, les orelles o altres mucoses).



En una placa Petri, posa petites quantitats d'aliments de la teua elecció i afegeix una gota de Lugol a cada mostra. Observa com a poc a poc apareix el color blau fosc característic de la reacció del iode amb el midó.

Si no es veu bé el resultat, pots coure la mostra en una petita quantitat d'aigua calenta, durant 4 o 5 minuts, i fer la prova sobre l'extracte que obtingues una vegada que s'haja refredat.

Alternativament es pot procedir de la manera següent:

1. Tritureu la mostra en un morter.
2. Introduïu 1 g de mostra finament triturada en un tub d'assaig.
3. Afegiu 4 ml d'aigua destil·lada.
4. Porteu a 100 °C durant 15 minuts i després deixeu refredar.
5. Preneu 1 ml del líquid inferior, amb una pipeta a través de la capa greix superior, i passeu-los a un tub d'assaig.
6. Afegiu 0,5 ml de dissolució de lugol; coloració blava (o blau-negra) indica assaig **positiu**.

PRÀCTICA 6. VISUALITZACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LES PROTEASES A PARTIR DE LA SEUA FONT NATURAL

INTRODUCCIÓ

Les proteases són enzims que catalitzen la hidròlisi dels enllaços peptídics de les proteïnes. Tenen un paper molt important en la indústria alimentària, n'hi ha de diversos tipus, alguns exemples:

- PAPAÏNA: S'obté de la purificació del làtex que prové de lleugeres incisions longitudinals que es practiquen en la superfície dels fruits ben desenvolupats, però encara no madurs de la papaia (*Carica papaya*).
- BROMELINA: S'obté per precipitació amb acetona del suc que resulta de la pressió de les tiges acabades de brollar de la Bromeliàcia, la pinya (*Ananas comosus, sativus*).
- FICINA: S'obté del làtex coagulat que prové de talls o incisions practicats en els brots de les tiges de la figuera (*Ficus sp.*).
- PROTEASES MICROBIANES: S'obtenen dels cultius de ceps seleccionats de fongs (*Aspergillus oryzae*) o bacteris (*Bacillus subtilis*).

Les proteases són molt utilitzades en la indústria. Tenen múltiples aplicacions, entre les quals cal destacar:

1. **Fabricació de gelatines:** Substitueix l'extracció amb calç de materials col·làgens (ossos i pells).
2. **Fabricació de pa:** addició de proteases fúngiques per a **hidrolitzar parcialment el gluten** (pastat més fàcil). *El gluten és una glucoproteïna que es troba en la llavor de molts cereals combinada amb midó. Representa un 80% de les proteïnes del blat i està composta de gliadina i glutenina. El gluten és responsable de l'elasticitat de la massa de farina, la qual cosa permet que junt amb la fermentació el pa obtinga volum, així com la consistència elàstica i esponjosa dels pans i les masses enforades. En l'enforat, el gluten és el responsable que els gasos de la fermentació es queden retinguts en l'interior de la massa i fa que aquesta pugui pujar. Després de la cocció, la coagulació del gluten és responsable que el panallet no es desunfle. En la cuina, s'utilitza per a donar consistència als aliments.*
3. **Indústria de detergents:** Per a eliminació de taques que contenen proteïnes insolubles. S'inclouen proteases bacterianes que actuen a elevats pH i temperatura.
4. **Indústries càrnies:** Per al reblaniment de la carn. La duresa de la carn és causada per la presència de fibres d'actomiosina i col·lagen del teixit connectiu. Per al reblaniment de la carn es recorre al tractament amb proteases, la carn (talls fins) se submergeix en una solució de papaïna o abans de sacrificar l'animal se li injecta una solució estèril de papaïna en la vena jugular.

5. **Indústria de la pell:** Per a eliminar pèls i fer el reblaniment previ a l'assaonament. El tractament tradicional suposava utilitzar excrements de gossos o coloms, que contenen proteases, o deixar créixer bacteris productors de proteases sobre les pells en cambres amb condicions controlades. L'alternativa suposa el tractament amb proteases bacterianes comercials.
6. **Producció de cervesa i alcohol:** Manteniment de les cerveses clares i brillants després del seu refredament.
7. Indústria del formatge.

Procediment:

Material:

Fulls de gelatina.
 Agar al 2% (p/v)
 Pinya en almívar
 Pinya natural
 Plaques de Petri

En plaques Petri que contenen gelatina i agar, comprovarem que la pinya és una font natural de proteases. Per a això es col·loca un trosset de pinya natural i un trosset de pinya en almívar sobre diferents plaques de gelatina i d'agar.

S'observa el que ocorre en les quatre plaques al cap de 24 h, mantenint les plaques a temperatura ambient.



Placa Agar



És un **polisacàrid** obtingut de la **paret cel·lular** de diverses espècies d'**algues**. És un polímer de galactosa. Dissolt en aigua calenta i refredat es torna gelatinós.

Placa Gelatina



La **gelatina** està composta de **proteïna** provinent del **col·lagen** procedent del teixit connectiu d'animals. La gelatina és líquida en aigua calenta i se solidifiquen en aigua freda.

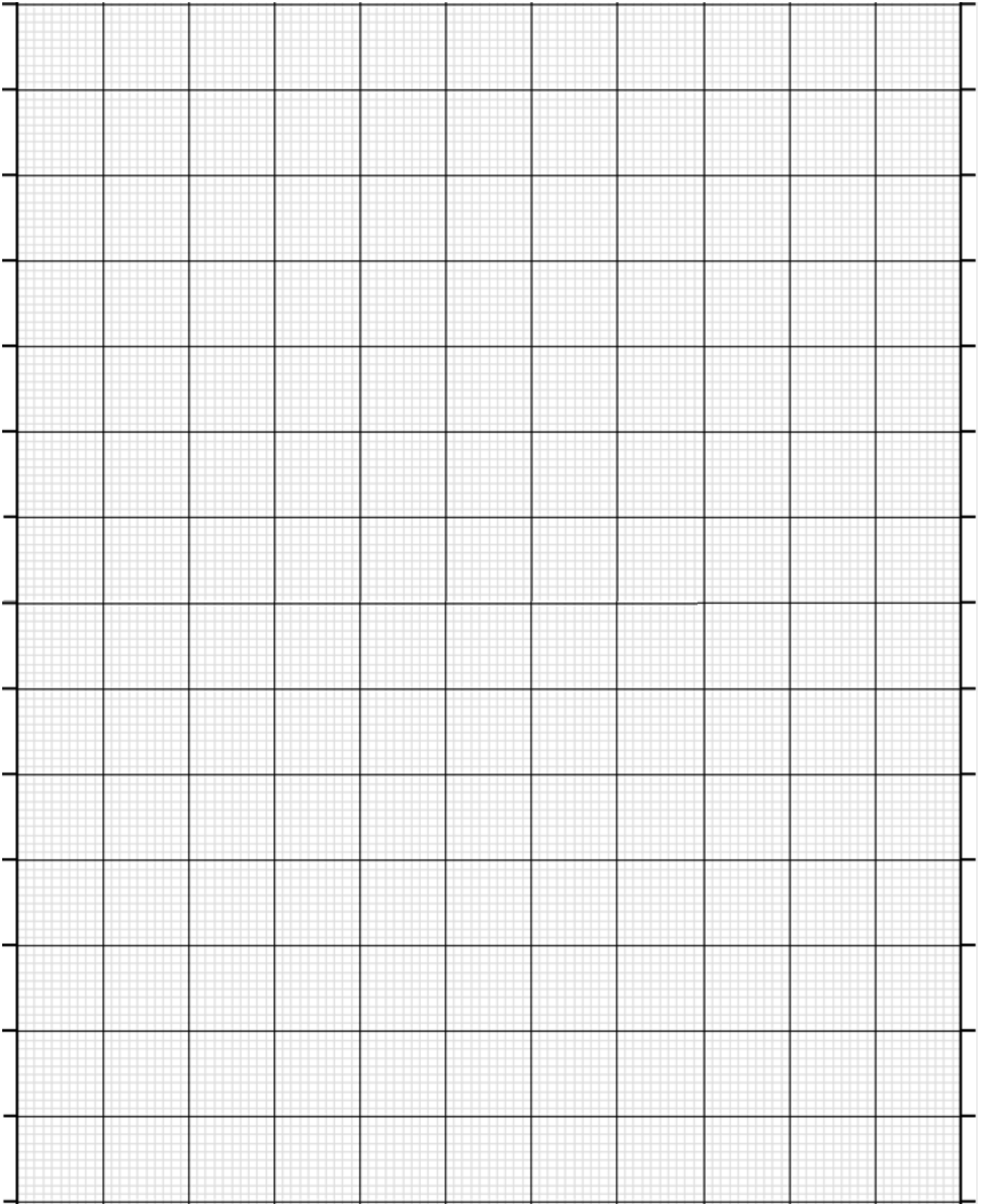
PRÀCTIQUES DE BIOQUÍMICA GRAU CIÈNCIES GASTRONÒMIQUES: MEMÒRIA DE RESULTATS

Cognoms, Nom	Grup

PRÀCTICA 2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

RECTA PATRÓ		
Tub	A ₅₃₀	Sacarosa hidrolitzada (μmol)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

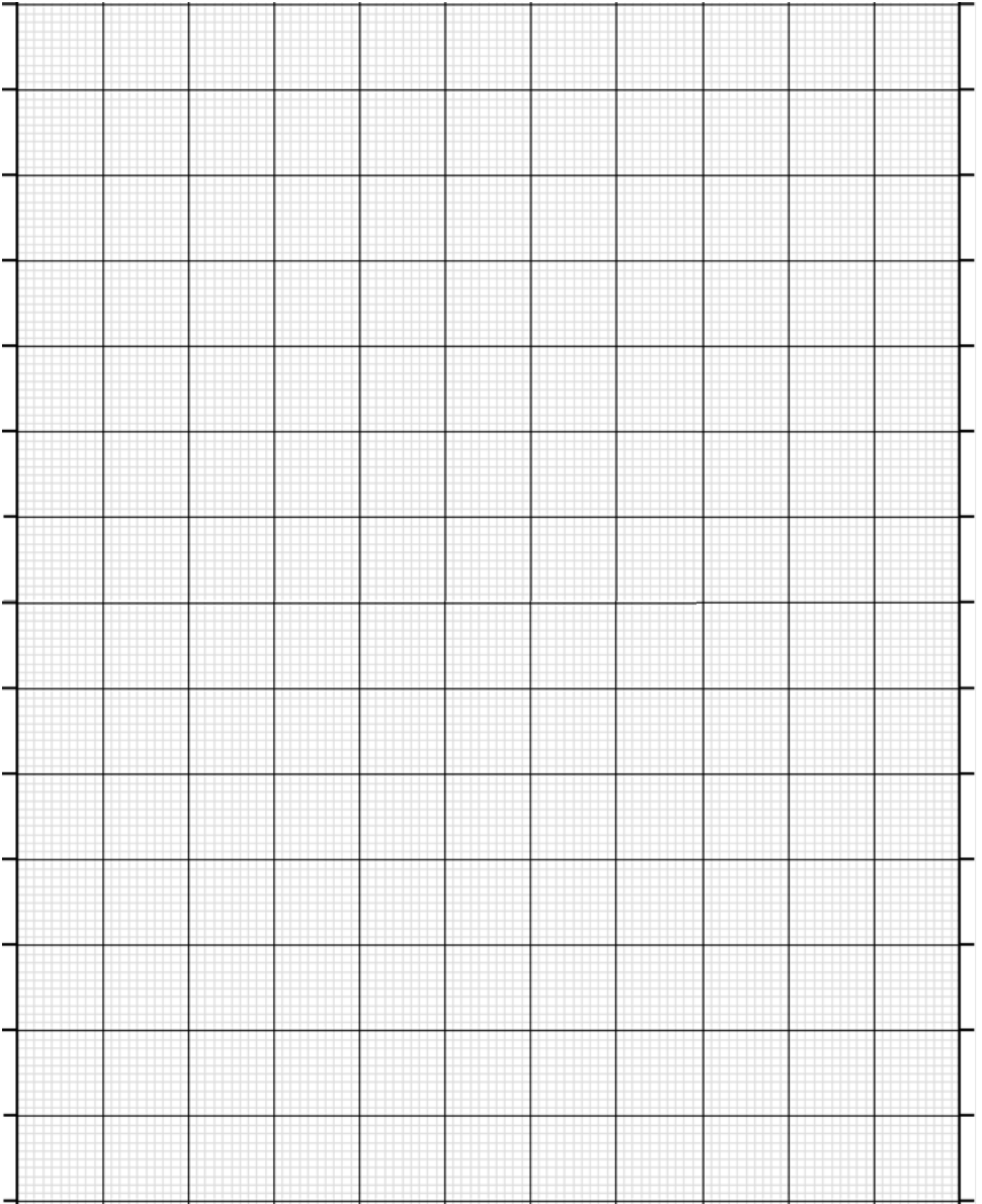
ACTIVITAT DE LES MOSTRES							
TUB	Mostra	A ₅₃₀	Sacarosa hidrolitzada (μmol)	ml	FD (factor dilució)	Activitat mostra (μmol / min x ml)	Activitat mitjana (μmol / min x ml)
1							
2							
3							
4							
5							



PRÀCTICA 3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

RECTA PATRÓ DE PROTEÏNES		
Tub	A ₅₉₅	Proteïnes (mg)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

RESULTATS DE LA DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES DE LES MOSTRES							
Tub	Mostra	A ₅₉₅	Proteïnes (mg)	ml	FD (factor dilució)	[Proteïnes] (mg.ml ⁻¹)	[Proteïnes] mitjana (mg.ml ⁻¹)
7							
8							
9							
10							



PRÀCTICA 4. AVALUACIÓ DEL PROCÉS DE PURIFICACIÓ

	EXTRACTE INICIAL	FRACCIÓ PURIFICADA
Volum total de fracció (ml)		
Concentració de proteïnes (mg.ml ⁻¹)		
Quantitat total de proteïnes (mg)		
Activitat enzimàtica per ml (μmol.min ⁻¹ .ml ⁻¹)		
Activitat total de la fracció (μmol.min ⁻¹)		
Activitat específica (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
Rendiment del procés (%)		
Factor de purificació global		

CONCLUSIONS:

PRÀCTICA 5. DETERMINACIÓ DE LA PRESÈNCIA DE MIDÓ EN ELS ALIMENTS

1. En quins aliments has detectat midó?
2. Explica per què es troba o no el midó en els aliments que has analitzat.

PRÀCTICA 6. VISUALITZACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LES PROTEASES A PARTIR DE LA SEUA FONT NATURAL

1. Explica els resultats observats en les plaques d'agar i de gelatina després del contacte amb la pinya natural i amb la pinya en almívar.