

Índex

	<u>Pàgina</u>
Consideracions generals	1
Calendari d'activitats	3
<u>Pràctica 1.</u> Isocitrat-deshidrogenasa de llevat de forner: un enzim al·lostèric	4
<u>Pràctica 2.</u> Biosíntesi de glicogen en <i>Escherichia coli</i>	8
<u>Pràctica 3.</u> Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill	12
<u>Pràctica 4.</u> Producció d'amilases per fermentació en el fong <i>Aspergillus niger</i>	18
Lectures recomanades.....	22

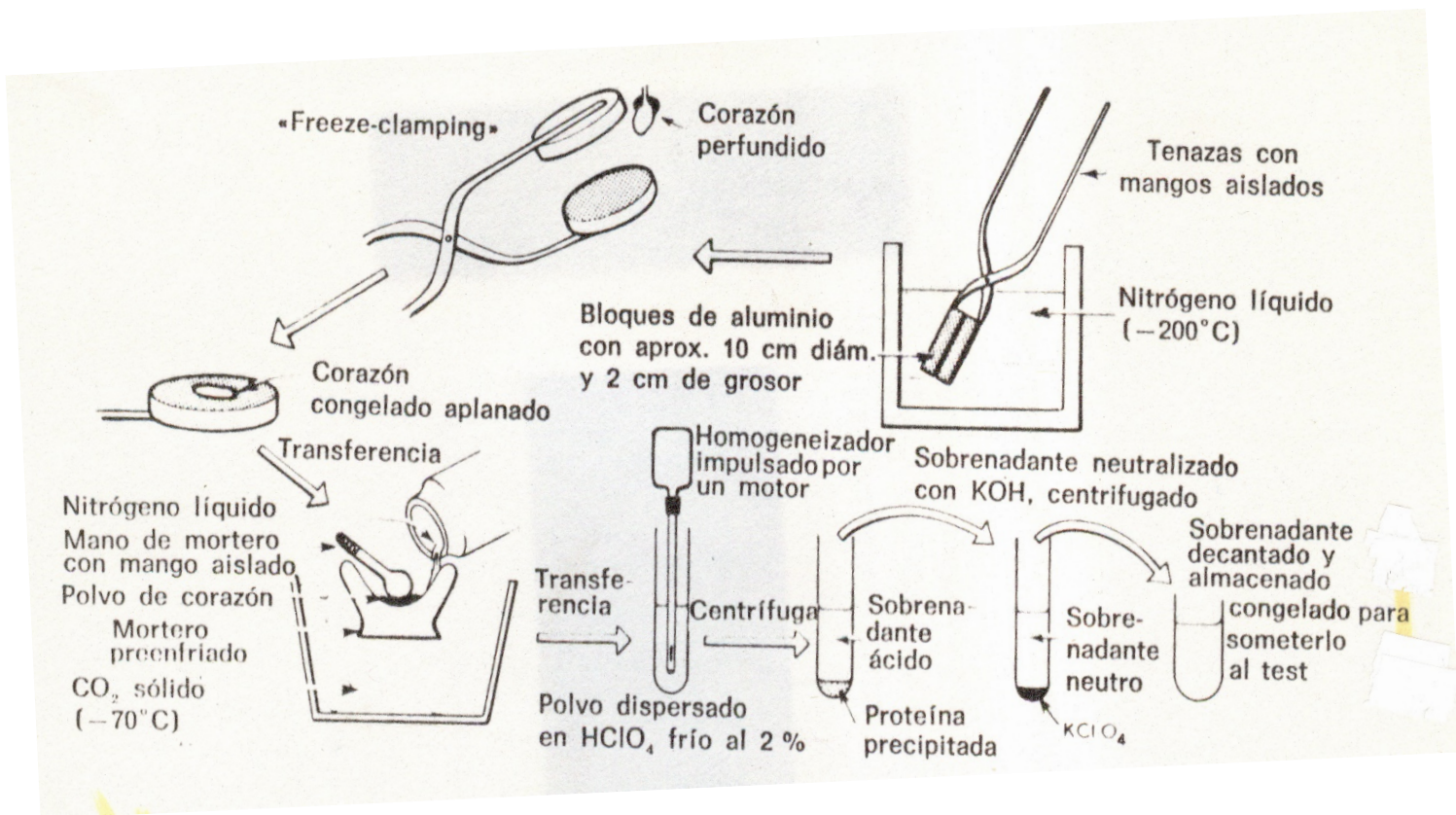
Consideracions generals

Abans de començar les discussions sobre la regulació i el control metabòlic, és convenient aclarir, distingir, aquests dos termes. *Regulació* és homeòstasi, el manteniment de condicions constants enfront de perturbacions externes; un sistema biològic està regulat quan manté constants unes condicions (la temperatura o la concentració), malgrat les fluctuacions ambientals. *Control* metabòlic és la capacitat de canviar l'estat del metabolisme en resposta a un senyal extern. Així doncs, respecte al metabolisme de la glucosa es pot dir que les hormones insulina i glucagó, controlant els fluxos de les rutes metabòliques de diversos teixits corporals, regulen la concentració de glucosa en la sang dels vertebrats.

En el metabolisme existeixen diversos mecanismes de regulació i control que operen a diferents escales de temps:

1. A llarg termini, hores o dies en eucariotes i uns pocs minuts en procariotes, es canvien les quantitats d'enzim i així es modifica la síntesi o la degradació enzimàtica.
2. A mitjà termini, minuts o uns pocs segons, les activitats enzimàtiques són alterades per modificació covalent.
3. A curt termini, segons o menys, les activitats dels enzims s'alteren en resposta als canvis de les concentracions de metabòlits (els efectors al·lostèrics) que s'uneixen reversiblement als enzims.

Actualment, disposem de metodologies que ens permeten estudiar el metabolisme en sistemes amb qualsevol nivell d'organització, des dels enzims aïllats fins a l'organisme pluricel·lular complet, passant pels teixits i els òrgans aïllats, els fragments de teixits, les cèl·lules aïllades, les cèl·lules permeabilitzades, els sistemes lliures de cèl·lules o els orgànuls aïllats. El coneixement de les concentracions dels metabòlits intermediaris és essencial per a saber de quina manera aquestes canvien en circumstàncies que afecten la velocitat de la ruta metabòlica en què participen. Amb la tècnica del pinçament (*freeze-clamping*) de teixits, totes les reaccions metabòliques són aturades simultàniament i, per consegüent, les concentracions dels intermediaris metabòlics es mantenen, són les mateixes que en el teixit en condicions funcionalment fisiològiques. El teixit és congelat en nitrogen líquid a -190 °C comprimit entre unes plaques d'alumini refredades prèviament (vegeu l'esquema); d'aquesta manera el teixit passa de 37 °C a 0 °C en 90 ms i a -160 °C en tan sols 0,5 s.



Les anàlisis enzimàtiques són de gran valor per a estudiar la regulació i el control metabòlics. Aquestes anàlisis permeten mesures precises i específiques dels metabòlits en mesclades biològiques complexes, sense la necessitat de purificacions i separacions tedioses i laborioses.

Els experiments que es recullen en aquest manual de laboratori ens permetran acostar-nos a diversos mecanismes que operen, en organismes diferents, regulant i controlant el metabolisme: els efectes al·lostèrics sobre l'activitat enzimàtica (isocitrat-deshidrogenasa del llevat *Saccharomyces cerevisiae*); l'aplicació de les anàlisis enzimàtiques a la quantificació de metabòlits en estat estacionari (glucosa, lactat i piruvat en teixits de rata); els canvis en la direcció i la velocitat relativa de diverses rutes metabòliques en funció de les condicions de creixement (biosíntesi de glicogen en el bacteri *Escherichia coli*) i la producció d'enzims d'interès industrial (amilases excretades pel fong *Aspergillus niger*).

Aquestes pràctiques s'han concebut per a grups de 16 estudiants que treballen en parella durant 4 sessions d'aproximadament 4 hores. L'elaboració, la presentació i la interpretació dels resultats de cada pràctica les realitzarà individualment cada alumne omplint els fulls que li seran entregats juntament amb aquest manual de laboratori.

Calendari d'activitats (dimarts-divendres)

1a sessió. Isocitrat-deshidrogenasa de llevat de forner

- Preparació de l'extracte enzimàtic a partir del llevat de forner premsat.
- Cinètiques en absència i en presència de l'AMP.

2a sessió. Biosíntesi de glicogen en *Escherichia coli*

- Recollida de les cèl·lules (quantitat equivalent a 1 unitat d'A₄₅₀) d'*E. coli* dels cultius sintètics que contenen glucosa o acetat com a font de carboni, en condicions d'estrès (poc nitrogen) o no.
- Obtenció del glicogen i quantificació de la glucosa component mitjançant la reacció colorimètrica amb l'antrona.

3a sessió. Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill

- Homogeneïtzació manual en Potter de vidre de la mostra de teixit hepàtic de conill, desproteïnitzaçió i neutralització de les mostres.
- Determinació de la concentració de glucosa en la mostra de sang desproteïnitzada, mesurant, per reacció acoblada, l'augment de la A₃₄₀ com a conseqüència de l'augment de [NADPH].
- Determinació de la concentració de piruvat en la mostra de fetge desproteïnitzat, mesurant la disminució de la A₃₄₀ deguda a la disminució de [NADH].
- Determinació de la concentració de L-lactat en la mostra de fetge desproteïnitzat, mesurant l'augment de la A₃₄₀ deguda a l'augment de [NADH].
- Càlcul de l'estat redox del citosol a partir de les quantificacions de piruvat i L-lactat.

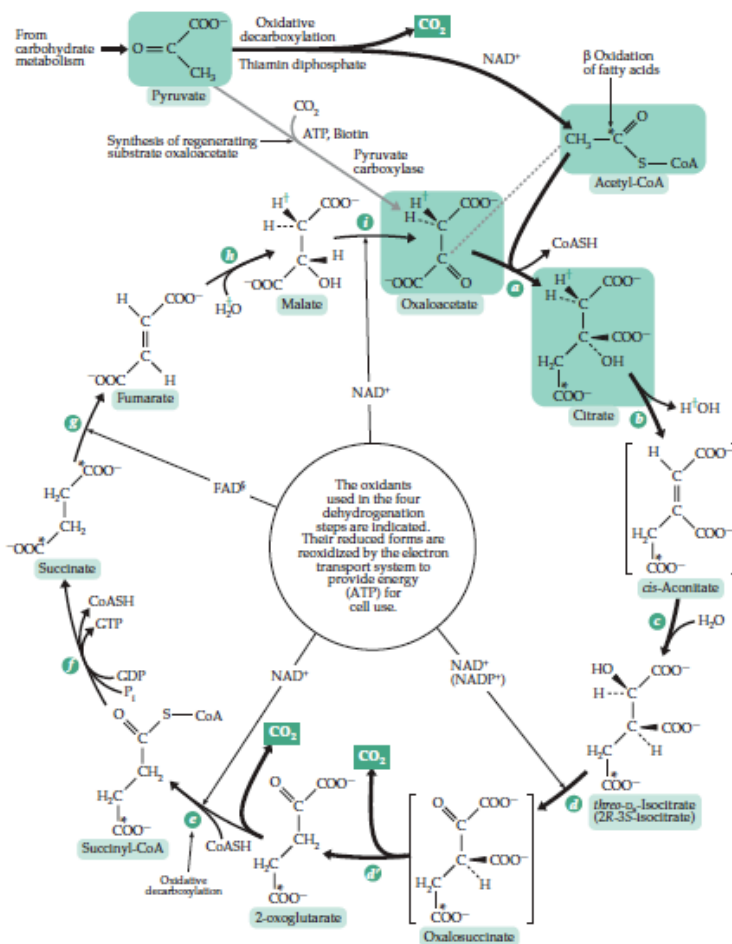
4a sessió. Producció d'amilases per fermentació en el fong *Aspergillus niger*

- Mesura de l'activitat amilasa produïda per les espores cultivades en medi amb glucosa o midó al llarg de 72 h.
- Determinació de l'alíquota de major activitat i representació de l'activitat amilasa relativa en funció del temps de cultiu de les espores.
- Assajos en medis de diferents pH per tal de determinar-ne el valor òptim emprant la mostra que presenta major activitat amilasa.

Isocitrat-deshidrogenasa de llevat: un enzim al·lostèric

L'activitat enzimàtica isocitrat-deshidrogenasa (ICDH) (Threo-D₅-isocitrat: NAD⁺ oxidoreductasa (descarboxilant), EC 1.1.1.41) està àmpliament distribuïda en la natura. L'enzim és un component del cicle de l'àcid cítric, també anomenat cicle de Krebs i cicle dels àcids tricarbòxics, i s'ha estudiat en bacteris, protozoos, fongs i llevats, plantes, insectes i mamífers. L'enzim catalitza la descarboxilació oxidativa del 2R-3S-isocitrat, la tercera etapa del cicle de l'àcid cítric (vegeu la figura). Alguns organismes sols tenen la ICDH dependent del NADP⁺ o del NAD⁺, mentre que d'altres en tenen totes dues en compartiments cel·lulars diferents. En els teixits dels mamífers, la situació és molt complexa, per exemple en el cor de bou, a més de la forma mitocondrial dependent del NAD⁺, hi ha dos isoenzims dependents de NADP⁺ localitzats respectivament als mitocondris i al citosol, els quals estan sota un control genètic independent. Altres tipus de cèl·lules de mamífers contenen només l'una o l'altra d'aquestes dues formes isoenzimàtiques. Aquestes ICDH dependents de NADP⁺ tenen una M_r inferior a 96 000 i són mono- o dimèriques. En canvi, la ICDH dependent de NAD⁺ de mamífers es localitza exclusivament als mitocondris, té una M_r de 340 000, és multimèrica i està considerada un enzim regulable per efectors al·lostèrics.

La ICDH dependent de NAD⁺, en *Saccharomyces cerevisiae*, funciona com un octàmer format per dues subunitats (IDH1 i IDH2) i respon a l'estat energètic de la cèl·lula com a conseqüència de la unió i l'activació per l'AMP i el NAD⁺. Atès que les cèl·lules de llevat que no tenen ICDH-NAD⁺, no poden créixer en acetat, malgrat posseir l'activitat ICDH-NADP⁺ en matriu mitocondrial, es considera que en el cicle de l'àcid cítric actua un *metaboló*.



Els experiments proposats tenen com a objectiu l'estudi cinètic de l'activitat isocitrat-deshidrogenasa dependent de NAD⁺ present en un extracte de llevat de forner en absència i en presència d'un efector al·lostèric, l'AMP.

1. Material, productes i solucions

Material

- Molí de perles (Bead Beaters, Biospec products)
- Perles de vidre de 425-600 µm, aproximadament 200 g, rentades amb àcid nítric (o mescla cròmica) i aigua
- Balança
- Centrifugadora Sorvall i rotor petit (codi núm. 5)

- Tubs de centrifugadora de 30 mL de polipropilè amb tap de rosca (4)
- Vòrtex
- Espectrofotòmetre o colorímetre (A340)
- Cubetes colorimètriques de Sarsted de plàstic de 3,0 mL
- Mussolina per a filtrar
- Embut de vidre (1)
- Vas de precipitats de vidre de 250 mL (1)
- Vareta de vidre (1)
- Proveta de vidre de 100 mL (1)
- Pipetes automàtiques (P200 i P1000)
- Pipetes de vidre de 2 mL (8)
- Pipetes Pasteur de plàstic
- Suport amb tubs de vidre d'assaig de 6 mL (9 per parella)

Productes

- Llevat de forner fresc (uns 50 g per sessió)
- Gel per a mantenir la temperatura a 0 °C
- Bicarbonat sòdic
- Tris
- D,L-Isocitrat sal trisòdica (Sigma Ultra I-6768)
- NAD⁺ (Roche 127973, Mr 663,4)
- MgCl₂·6 H₂O (Merck 1.05833.0250)
- AMP sal sòdica (Sigma A-1752)

Solucions

- Bicarbonat sòdic 0,1 M
- *MgCl₂ 0,1 M
- Tampó Tris-HCl 30 mM pH 7,4
- *D,L-Isocitrat 3 mM en el tampó Tris
- NAD⁺ 3 mM en el tampó Tris (preparada el dia d'usar-la)
- *AMP 45 mM en el tampó Tris

Les solucions assenyalades amb *, juntament amb l'extracte enzimàtic, s'han de conservar a -20 °C. La resta, a 4 °C.

2. Disseny de l'experiment

Es prepararà un únic extracte enzimàtic per a tots els grups. Cada parella, usant les dades disponibles, determinarà quina és la dilució de l'extracte que convé usar en les mesures de l'activitat de l'isocitrat-deshidrogenasa. Les cinètiques enzimàtiques seran realitzades en absència i en presència de l'AMP.

3. Procediment experimental

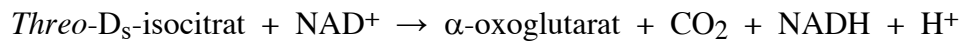
3.1. Preparació de l'extracte enzimàtic

Es ressuspenen 40 g de llevat en 80 mL de bicarbonat sòdic 0,1 M. La mescla es transvasa al molí de perles. S'hi afegeixen les perles de vidre (3 g de perles per g de llevat) fins a omplir almenys 2/3 de la capacitat del recipient (uns 180 g en total). Es recobreix de gel per mantenir en fred la preparació. S'homogeneïtza durant tres períodes d'1 min amb un interval d'almenys 1 min entre aquests. Es filtra sobre mussolina. Es renta amb el bicarbonat fins a recollir un volum total d'extracte enzimàtic cru d'aproximadament 100 mL. Se centrifuga, en tubs de rosca de polipropilè, a 34 000 x g (17 000 rpm en rotor JA14) durant 1 h a 4 °C. El sobrenadant constitueix l'extracte enzimàtic que diluïrem amb tampó abans de l'assaig.

3.2. Determinació de la quantitat òptima d'extracte enzimàtic

3.2.1. Fonament

En presència d'un excés de NAD^+ i de preparat enzimàtic amb activitat isocitrat-deshidrogenasa, l'aparició de NADH com a conseqüència de la reducció de NAD^+ és proporcional a la quantitat d'isocitrat que s'oxida. L'augment de $[\text{NADH}]$ és detectat per l'augment que experimenta l'absorbància de la mescla de reacció a 340 nm.



Atès que treballem amb un extracte cru de llevat, en el medi de reacció, juntament amb l'isocitrat-deshidrogenasa hi ha presents altres activitats deshidrogenases que consumeixen el NAD^+ . És recomanable incubar la mescla de reacció almenys 15 min abans d'afegir-hi l'isocitrat.

3.2.2. Procediment

L'objectiu d'aquest apartat és determinar la zona de linealitat en la representació de la velocitat inicial enfront de la concentració d'enzim.

Es preparen sis tubs d'hemòlisi en què s'afegeixen els components que s'indiquen en la taula. Les dilucions del preparat enzimàtic es realitzen amb el tampó Tris.

	Tubs (mL)					
	C1	E1	C2	E2	C3	E3
Tampó Tris	1,2	0,2	1,2	0,2	1,2	0,2
NAD^+ 3 mM	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgCl_2 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Extracte dil 1/2	0,2	0,2	-	-	-	-
Extracte dil 1/4	-	-	0,2	0,2	-	-
Extracte dil 1/10	-	-	-	-	0,2	0,2

La mescla de reacció es manté a temperatura ambient almenys durant 15 min.

Les mescles de control (C) s'usen per a ajustar a zero, en el colorímetre, el valor de la A_{340} , tot just abans de començar les mesures d'activitat presents en cadascun dels corresponents tubs (E). **La reacció comença** quan als tubs (E) s'hi afegeix 1 mL del **substrat D,L-isocitrat** 3 mM. Mescleu bé. Transvaseu a la cubeta. Useu la **mateixa cubeta** durant tot l'experiment.

Preneu nota dels valors de la A_{340} durant els cinc primers minuts de la reacció amb intervals de mig minut. Calculeu les velocitats inicials obtingudes amb cadascuna de les tres dilucions de l'extracte enzimàtic. Feu la representació gràfica que us permeti conèixer la dilució òptima d'extracte que s'ha d'utilitzar en els experiments posteriors.

3.3. Cinètica de l'isocitrat-deshidrogenasa

Com que treballem amb un sistema bisubstrat, hem de mantenir constant la concentració d'un dels dos substrats. En aquest cas mantenim constant, i a concentració saturant, la del NAD^+ . La concentració de l'isocitrat es variarà entre 0,05 mM i 0,8 mM. Com a preparat enzimàtic, s'utilitzaran 0,2 mL de l'extracte convenientment diluït amb el tampó Tris, de manera que la seua activitat es trobe en una zona dins de la linealitat, obtinguda segons l'apartat anterior.

La composició dels tubs s'indica en la taula següent:

	Tubs (mL)								
	control	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampó Tris	1,2	1,15	1,1	1,05	1	0,95	0,8	0,6	0,4
NAD⁺ 3 mM	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgCl₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
E diluït 1/4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

La mescla de reacció s'incuba a temperatura ambient almenys durant 15 min.

Ajusteu a zero el valor de la A_{340} amb aigua i, immediatament després, ajusteu a zero amb el tub de control, tot just abans de mesurar les activitats de cada tub.

La reacció començarà després d'afegir a cada tub les quantitats (mL) de la solució d'isocitrat 3 mM que s'indiquen a continuació.

0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,4	0,6	0,8
------	-----	------	-----	------	-----	-----	-----

Mescleu bé. Transvaseu a la cubeta. Preneu nota dels valors de la A_{340} durant els quatre primers minuts de la reacció amb intervals de mig minut. Sobre una mateixa gràfica representeu les velocitats inicials obtingudes per a cadascuna de les concentracions del substrat d'isocitrat. Estimeu el valor de $S_{0,5}$ i $V_{m\grave{a}x}$.

3.4. Efecte al·lostèric de l'AMP

Prepareu 9 tubs com s'indica en la taula.

	Tubs (mL)								
	control	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampó Tris	1,1	1,05	1,0	0,95	0,9	0,85	0,7	0,5	0,3
NAD⁺ 3 mM	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgCl₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
E diluït 1/4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
AMP 45 mM	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

La reacció començarà després d'afegir a cada tub les quantitats (mL) de la dissolució d'isocitrat 3 mM que s'indiquen a continuació.

0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,4	0,6	0,8
------	-----	------	-----	------	-----	-----	-----

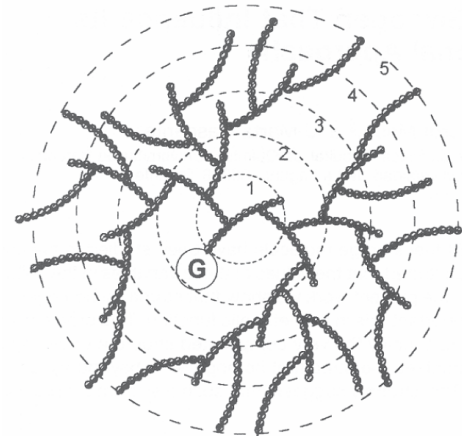
Preneu nota dels valors de la A_{340} durant els quatre primers minuts de la reacció amb intervals de mig minut. Sobre la mateixa gràfica construïda amb els resultats de l'apartat 3.3, representeu-hi les velocitats inicials obtingudes per a cadascuna de les concentracions del substrat isocitrat.

Estimeu els valors de $S_{0,5}$ i $V_{m\grave{a}x}$ i compareu-los amb els de la cinètica obtinguda en absència de l'AMP.

Interpreteu i discuteu els vostres resultats i compareu-los amb els de la bibliografia.

Biosíntesi de glicogen en *Escherichia coli*

Pel que fa a l'alimentació, l'aeració i la temperatura, la major part dels organismes procariotes viuen en condicions ambientals que estan lluny de les òptimes que es donen al laboratori. Per exemple, el bacteri *E. coli* es troba freqüentment sotmès a estrès nutricional en l'hàbitat natural, per la qual cosa ha desenvolupat un sistema d'emmagatzemament metabòlic. Quan la font de nitrogen, fòsfor i/o sofre és escassa, la velocitat de divisió bacteriana, així com la síntesi d'àcids nucleics i de proteïnes, disminueix. Per consegüent, la càrrega energètica cel·lular augmenta. En presència d'una font de carboni, aquest canvi en l'estat energètic provoca una síntesi neta de glicogen i una activació de la gluconeogènesi. El glicogen és un polímer de residus de glucosa units per enllaços glicosídics α -1,4 amb ramificacions α -1,6 cada 10 residus aproximadament (vegeu la figura), que constitueix una reserva de combustible metabòlic en forma d'hidrats de carboni. La microscòpia electrònica permet observar la localització subcel·lular dels grànuls de glicogen en el bacteri (vegeu la imatge). En *E. coli*, l'enzim glicogen-sintasa catalitza la transferència de residus de glucosa des de l'ADP-glucosa fins a un acceptor adequat de glican maltodextrina amb establiment de l'enllaç α -1,4. L'adenilació de la glucosa és catalitzada per l'ADP-glucosa-pirofosforilasa. A diferència dels mamífers, és aquest enzim, i no la sintasa, el regulador de la biosíntesi del glicogen en bacteris, ja que l'ADP-glucosa sols serveix per a la síntesi d'aquest polímer. L'AMP, l'ADP i el P_i inactiven l'ADP-glucosa-pirofosforilasa, mentre que aquesta és activada per alguns intermediaris glicolítics.



L'objectiu dels experiments proposats és quantificar la formació de glicogen en cèl·lules d'E. coli cultivades en medis pobres o rics en nitrogen que contenen glucosa o acetat com a font de carboni, per tal de comparar la direcció i la velocitat relativa de les diverses rutes implicades en el procés de glicogenogènesi (la glicòlisi, el cicle de l'àcid cítric, la gluconeogènesi i el cicle del glioxilat), en diverses condicions de creixement (estrès o no) dels bacteris.

1. Material, productes i solucions

Material

- Soca d'*E. coli* DH5 α (β -galactosidasa⁻; requereix tiamina)
- Gas per al manteniment de condicions d'esterilitat
- Autoclau per esterilitzar a 120 °C durant 20 min
- Filtres de 0,22 μ m i la xeringa corresponent, per a esterilitzar-hi solucions
- Puntes de pipeta grogues i blaves esterilitzades en autoclau
- Tubs Corning de 15 mL (4 per parella)
- Erlenmeyer de 500 mL amb 50 mL de medi LB estèril (2)
- Agitador orbital a 37 °C (per a 2 erlenmeyers de 500 mL i 8 erlenmeyers de 100 mL)
- Vòrtexs

- Trompa d'aigua per a fer el buit (2)
- Centrifugadora de taula i microcentrifugadora
- *Thermoblock* i 2 banys d'aigua amb 2 gradetes cadascun
- Colorímetres (A₄₅₀ i A₆₂₀)
- Cubetes colorimètriques Sarsted de plàstic d'1,5 mL
- Pipetes automàtiques (P20, P200 i P1000) i pipetes Pasteur de vidre amb pera de goma
- Suport amb tubs d'Eppendorf
- Suport amb tubs d'hemòlisi de boca estreta (12 tubs per parella)

Productes

- Gel per a manteniment de les mostres a 0 °C
- Extracte de llevat
- Triptona bacteriològica
- Agar bacteriològic
- NaCl
- HPO₄K₂
- H₂PO₄K
- Na₂SO₄
- MgCl₂·6 H₂O
- FeCl₃·6 H₂O
- MnCl₂·4 H₂O
- CaCl₂·2 H₂O
- CuCl₂·2 H₂O
- CoCl₂·6 H₂O
- Na₂MoO₄·2 H₂O
- Bòrax (tetraborat sòdic) (Merck 106306)
- Tiamina (vitamina B₁) (Sigma T-4625)
- NH₄Cl
- Glucosa (Panreac 121341)
- Acetat de sodi (Panreac 141633)
- KOH (Scharlau Po 266)
- Etanol 96 % refredat a -20 °C
- H₂SO₄ 95 % (Panreac)
- Antrona (Sigma A-1631)

Solucions

- Fosfat potàssic 0,5 M pH 7,0 (100 mL)
- CuCl₂·2 H₂O a 20 mg/mL
- CoCl₂·6 H₂O a 16 mg/mL
- Na₂MoO₄·2 H₂O a 10 mg/mL
- Bòrax a 5 mg/mL
- Acetat de sodi al 20% esterilitzat en autoclau
- NH₄Cl al 18 % esterilitzada en autoclau
- Glucosa al 20% esterilitzada per filtració
- Tiamina 1 M esterilitzada per filtració
- NaCl al 0,85 % en aigua
- KOH al 50 % en aigua

- Glucosa a 1 mg/mL en aigua
- Antrona al 0,2 % en H₂SO₄ 95 % (recentment preparada, en flascó protegit de la llum; 0,3 g/150 mL)

- **Medis de cultiu:**

LB: 10 g de bactotripton, 5 g d'extracte de llevat i 10 g de NaCl, per a 1 L. Comproveu que el pH és neutre. S'esterilitza en autoclau.

Medi salí: 1 litre de tampó fosfat potàssic 0,05 M pH 7,0 ha de contenir les sals següents: 100 mg de Na₂SO₄; 20 mg de MgCl₂·6 H₂O; 3,5 mg de FeCl₃·6 H₂O; 2 mg de MnCl₂·4 H₂O; 1 mg de CaCl₂·2 H₂O; 0,2 mg de CuCl₂·2 H₂O; 0,16 mg de CoCl₂·6 H₂O; 0,1 mg de Na₂MoO₄·2 H₂O i 0,05 mg de bòrax. Aquest medi també ha de contenir tiamina a una concentració final d'1 mM. El **prepararem** de la manera següent:

A 100 mL de solució tampó potàssic 0,5 M pH 7 hi afegirem: 100 mg de Na₂SO₄; 20 mg de MgCl₂·6 H₂O; 3,5 mg de FeCl₃·6 H₂O; 2 mg de MnCl₂·4 H₂O; 1 mg de CaCl₂·2 H₂O; 10 µL de la solució de CuCl₂·2 H₂O; 10 µL de la solució de CoCl₂·6 H₂O; 10 µL de la solució de Na₂MoO₄·2 H₂O i 5 µL de la solució de bòrax. S'hi afegeix aigua fins a completar un volum final d'1 L. Es distribueixen en els erlenmeyers de 100 mL les quantitats que s'indiquen més avall per a la preparació dels diversos medis sintètics. La resta de medi es reparteix en dos flascons. S'esterilitza en autoclau.

Medis sintètics. El medi salí s'ha de complementar amb la font de carboni i la quantitat de nitrogen que pertoque. A tots els medis sintètics s'hi han d'afegir **20 µL de tiamina** 1 M estèril per cada 20 mL de medi. S'han de preparar en condicions d'esterilitat (vora la flama) de la manera següent:

Medi I (ric en glucosa i pobre en nitrogen). A 19,8 mL de medi salí estèril, afegiu-hi 20 µL de NH₄Cl al 18 % i 0,2 mL de glucosa al 20 %.

Medi II (ric en glucosa i nitrogen). A 17,8 mL de medi salí estèril afegiu-hi 2 mL de NH₄Cl al 18 % i 0,2 mL de glucosa al 20 %.

Medi III (acetat com a font de carboni i pobre en nitrogen). A 19,2 mL de medi salí estèril, afegiu-hi 20 µL de NH₄Cl al 18 % i 0,8 mL d'acetat sòdic 20 %.

- Aigua estèril (4 tubs de Corning de 50 mL)

1. Disseny de l'experiment

El professor prepararà el precultiu de la soca d'*E. coli*. Els estudiants inocularan els bacteris en els medis sintètics, que cultivaran a 37 °C durant 48 h. Cada estudiant recollirà quantitats idèntiques (1 unitat de A₄₅₀) de les cèl·lules cultivades en els medis sintètics i obtindrà i hidrolitzarà el glicogen que els bacteris han sintetitzat. Es calcularan els valors de la mitjana obtinguts de la quantificació de glicogen sintetitzat en les diverses condicions de cultiu.

2. Procediment experimental

2.1. Preparació dels cultius

Una colònia de la soca DH5α s'inocula, per duplicat, en 50 mL de medi LB en un erlenmeyer de 500 mL i s'incuba en agitació a 37 °C durant dos dies fins a la saturació (OD₆₀₀ 3-4). Es prenen 12 mL d'aquest precultiu i se centrifuga a 3 000 rpm durant 10 min. Eliminat el sobrenadant, les cèl·lules sedimentades es ressuspenen en 10 mL de medi salí estèril, per tal de rentar-les i eliminar les restes de glucosa i de nitrogen que conté el medi LB. El sediment obtingut, després de centrifugar en les mateixes condicions, es ressuspenen en 7 mL de medi salí. S'inoculen per duplicat alíquotes (de 0,2 mL en els I i II; i de 0,5 mL en el III) en 20 mL dels medis sintètics, i s'incuben a 37 °C en agitació a unes 200 rpm durant 48 hores aproximadament.

2.2. Estimació de la biomassa de cèl·lules

La velocitat de creixement del bacteri depèn, entre altres factors, de la composició del medi de cultiu. Per tal de comparar la quantitat de glicogen sintetitzat en les diverses condicions de cultiu, cal prendre una quantitat similar de cèl·lules de cadascun dels cultius. Així, preneu nota del valor de A_{450} de cadascun dels cultius (d'una dilució 1/5 amb aigua dels cultius I i II, i d'una dilució 1/2 del III). Calculeu el volum de medi que heu d'agafar per a tenir la quantitat de cèl·lules que correspon a **1 unitat de A_{450}** .

2.3. Determinació de la quantitat de glicogen sintetitzat

2.3.1. Obtenció del glicogen

Preneu les cèl·lules equivalents a 1 unitat de A_{450} de cadascun dels cultius (I a III) i centrifugueu-les a 3 000 rpm durant 5 min.

Ressuspeneu el sediment cel·lular en 1 mL de NaCl 0,85 % (sèrum fisiològic) i centrifugueu en les condicions anteriors.

Ressuspeneu el sediment en 0,25 mL de KOH 50 % i incubeu la suspensió a 100 °C durant 45 min en el *Thermoblock*. Refredeu les mostres amb aigua de l'aixeta.

Afegeu-hi 0,75 mL d'etanol 96 % fred i manteniu-ho a 0 °C en gel durant almenys 10 min.

Centrifugueu a 12 000 rpm durant 12 min. Elimineu-ne el sobrenadant amb molta precaució amb l'ajut d'una pipeta Pasteur connectada al buit que fa una trompa d'aigua. Noteu que el glicogen sedimentat és difícilment visible. S'asseca a l'aire durant uns minuts i es ressuspèn, per agitació en vòrtex, en 0,5 mL d'aigua destil·lada. Es transvasa a un tub estret de vidre.

2.3.2. Quantificació del glicogen

El contingut de glucosa present en la mostra de glicogen es mesura per reacció amb l'antrona. El medi àcid, on està dissolta l'antrona, produeix el trencament dels enllaços glicosídics i l'alliberament de la glucosa. El mètode de quantificació es basa en la formació d'un producte acolorit per la reacció de condensació dels fenols, com l'antrona, amb els furfurals com el 5-hidroximetilfurfural, producte de la deshidratació de la glucosa en presència d'àcids minerals forts. Els tubs que contenen glucosa prenen coloració verda que absorbeix a 620 nm, mentre que els que no en contenen, es mantenen grocs.

La quantitat de glucosa present en les mostres es determina interpolant els valors de A_{620} , obtinguts després de la reacció, en una recta de calibratge preparada a partir de quantitats conegudes de glucosa.

Prepareu la recta de calibratge a partir de la solució patró de glucosa 1 mg/mL, tenint en compte que els límits de precisió de la reacció de l'antrona estan entre 1 i 30 µg de glucosa. (No oblideu preparar-ne un control). Utilitzeu els tubs de vidre que siguin més estrets.

Als tubs preparats amb quantitats conegudes de glucosa i als quatre que contenen la mostra de glicogen, s'hi afegeix 1 mL del reactiu* (antrona al 0,2 % en H_2SO_4 al 95 %; 125 mL per sessió). Agiteu en vòrtex.

Incubeu a 100 °C durant 10 min. Refredeu amb aigua de l'aixeta.

Preneu nota dels valors d'absorbància a 620 nm de tots els tubs després d'haver ajustar el valor de A_{620} en el colorímetre a zero amb el control.

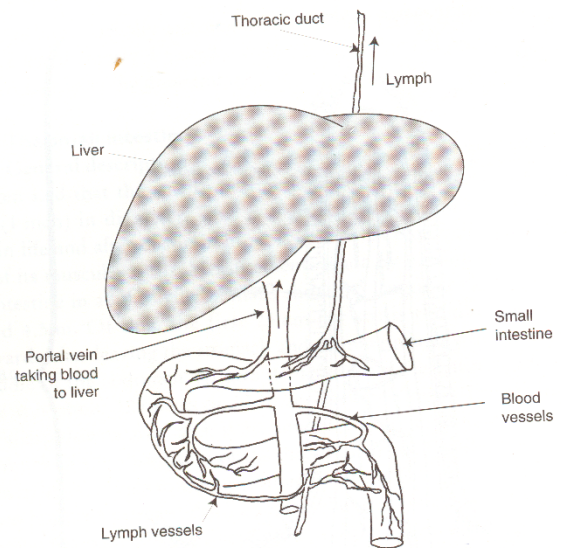
La quantitat de glicogen sintetitzat en cadascuna de les condicions de cultiu expresseu-la en µg per biomassa de cèl·lules ($A_{450}=1$). Pel que fa a la transformació dels valors de glucosa en glicogen, tingueu en compte que 1,80 mg de glucosa = 1,62 mg de glicogen.

Compareu els vostres resultats amb els de la bibliografia i interpreteu-los pel que fa a les rutes metabòliques participants en el procés de glicogenogènesi.

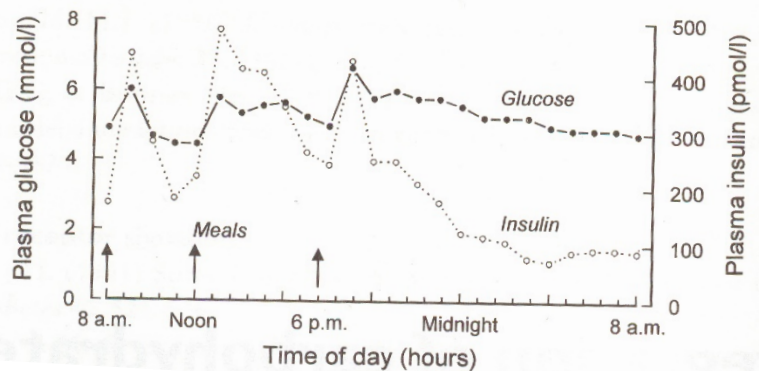
*Advertiment. El reactiu emprat per a la quantificació de la glucosa està dissolt en un àcid molt fort. Heu de manipular-lo amb les màximes precaucions.

Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill

Les propietats cinètiques de les rutes metabòliques de cada teixit reflecteixen les funcions metabòliques del teixit. El fetge rep la sang a través de dos vasos principals: l'artèria hepàtica hi subministra el 20% de la sang, mentre que la major part, el 80%, hi arriba per la vena porta, la qual transporta la sang que ha passat pel complex sistema de vasos sanguinis que envolten el tracte gastrointestinal (vegeu la figura). Les venes pancreàtiques que transporten les hormones insulina i glucagó conflueixen en la vena porta just abans que aquesta entre al fetge. Aquesta situació dins del sistema circulatori és la que confereix al fetge el paper especial en el metabolisme. Així, el fetge és el primer òrgan que capta els nutrients (sucres i aminoàcids) que entren al cos des de l'intestí després de menjar.



Funcions principals del fetge són l'emmagatzemament i l'alliberament posterior de la glucosa. La glucosa sempre està present en la sang en una concentració relativament constant; les molècules de glucosa són contínuament eliminades de la sang i reemplaçades per d'altres. L'entrada de glucosa a la sang es realitza per tres camins principals: l'absorció des de l'intestí, la degradació del glicogen hepàtic i la gluconeogènesi hepàtica. El fetge és capaç de respondre ràpidament als canvis de concentració de glucosa en la sang portal. Com més alta és la hiperglucèmia, més ràpidament el fetge capta la glucosa en excés, en humans, per sobre de 5 mM. I a la inversa, com més elevada és la hipoglucèmia, més ràpidament el fetge allibera glucosa. En l'eliminació de l'excés de la glucosa sanguínia, hi intervien el transportador hepàtic GLUT2 i l'activitat glucocinasa, la qual té una importància cabdal. L'alliberament a la sang de la glucosa hepàtica depèn de l'activitat glucosa-6-fosfatasa.



En definitiva, les propietats del transportador hepàtic de glucosa i dels enzims que la metabolitzen, així com la relació anatómica del fetge amb el pàncrees i l'intestí prim, confereixen al fetge una funció molt important pel que fa a la quantitat de glucosa que pot captar després de menjar quan la glucosa és subministrada contínuament, i la que allibera quan és requerida per qualsevol part del cos.

L'objectiu dels experiments proposats és determinar la concentració en estat estacionari de glucosa en sang, un metabòlit la concentració del qual està regulada per l'estat d'alimentació de l'animal. D'altra banda, la mesura de les concentracions tissulars dels metabòlits piruvat i L-lactat ens pot informar de l'estat redox del citosol. Per a mantenir una velocitat satisfactòria de glicòlisi en el citosol i una velocitat adequada de la cadena respiratòria mitocondrial, la relació $[NAD^+]/[NADH]$ és alta al citosol però baixa al mitocondri. Aquesta relació citosòlica es pot calcular a partir de l'equació de la constant d'equilibri de la reacció d'interconversió dels metabòlits piruvat i L-lactat catalitzada per la L-lactat-deshidrogenasa, atès que aquesta reacció està en equilibri, si coneixem el valor de la seua constant d'equilibri i de la concentració in vivo dels metabòlits implicats.

1. Material, productes i solucions

Material

- Sang i fetge de conills alimentats *ad libitum*
- Homogeneïtzadors Potter de vidre (8) (Vidra Foc.780/1)
- Centrifugadora de taula
- Balances
- Tubs de plàstic d'1,6x10 cm amb tap per a centrifugar
- Vòrtexs (4)
- Colorímetres (almenys, 4)
- Cubetes de plàstic d'1,5 mL amb suport (capseta poliuretà)
- Pipetes de vidre de 5 mL
- Varetes de vidre (8)
- Pipetes Pasteur de plàstic (8) i pipetes automàtiques P20, P200 i P1000
- Parafilm
- Paper de filtre
- Tubs Corning de 50 mL per a preparar les mescles de reacció per a tots els grups de la sessió

Productes

- Gel per al manteniment de les mostres a 0 °C
- Solució indicadora de pH 4-10 (Merck 1.09175)
- Àcid perclòric (Panreac 132175)
- KOH (Scharlau P0 266)
- Sulfat d'amoni
- Hidròxid d'hidrazini (Merck 804604)
- Tris
- Fosfat monosòdic i/o fosfat disòdic
- NAD⁺ (Boehringer-Mannheim 127965 o 127973)
- NADH sal disòdica (Boehringer-Mannheim 128015)
- NADP⁺ sal disòdica (Boehringer-Mannheim 128040)
- ATP (Boehringer-Mannheim 127523)
- MgCl₂·6H₂O (Merck 1.05833)
- Patrons: Glucosa monohidrat (Merck 4074.0500)
 - L-làctic (Sigma L-6402)
 - Pirúvic (Sigma P-8574)
- Enzims: Hexocinasa diluïda 1/10 amb (NH₄)₂SO₄ 3,2 M (Boehringer-Mannheim 1426362)
 - Glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (Boehringer-Mannheim 127671)
 - L-lactat-deshidrogenasa (Boehringer-Mannheim 106984)

Solucions*

- Àcid perclòric al 6 % (en nevera a 4 °C)
- KOH 20 % (p/v) (en nevera a 4 °C)
- Sulfat amònic 3,2 M (a -20 °C)
- Tampons: - Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 i Tris-HCl 0,1 M pH 8,0
 - Fosfat sòdic 0,1 M pH 7,0
 - Tris-hidrazini 0,1 M pH 8,5 (0,5 v de tampó Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 + 0,1 v d'hidròxid d'hidrazini + HCl 1 M fins a un pH 8,5 + aigua q.s.p.1 v)
- NAD⁺ a l'1 %
- NADH al 0,5 %

- NADP⁺ a l'1 %
- ATP 10 mM
- MgCl₂ 0,1 M
- Solucions patró: Glucosa 5 mM;
Pirúvic 1 mM
L-làctic 5 mM

*Les solucions dels cofactors enzimàtics i dels patrons s'han de conservar congelades a -20 °C. Els tampons es mantenen en nevera a 4 °C.

2. Disseny de l'experiment

En cada grup de pràctiques es determinarà, a la sang* i al fetge* de tres conills, les concentracions dels metabòlits següents: glucosa, piruvat i L-lactat. Cada parella treballarà almenys amb la sang i el fetge d'una de les rates. Es calcularan els valors de la mitjana de les rates i es discutiran els resultats globals obtinguts. Els estudiants treballaran amb les mostres de sang desproteïnitades i neutralitzades prèviament, i amb les de teixit hepàtic triturat, que ells mateixos hauran d'homogeneïtzar, desproteïnitzar i neutralitzar.

**Agraïm l'amable col·laboració prestada per Inma Noguera, veterinària titular del SCSIE de la UV, i el tècnic Juan Ramón Diosdado, del nostre departament, en l'obtenció de les mostres biològiques.*

3. Procediment experimental

3.1. Preparació de les mostres a partir de la sang i del fetge

Els conills provenen d'una colònia de l'estabulari instal·lat a la Facultat de Farmàcia. Les que s'utilitzaran en aquests experiments són mascles de la raça New Zealand d'uns cinc mesos d'edat i uns 4 kg de pes.

Els tubs de recollida de la sang han de contenir una gota d'heparina (Heparina Appliquen A-3004, 164 UI/mg) preparada dissolent 30,5 mg en 1 mL d'aigua destil·lada); les xeringues i l'agulla s'han d'heparinitzar. Les pinces de *freeze-clamping* del teixit s'introdueixen, uns moments abans d'usar-les, en nitrogen líquid perquè estiguen ben fredes. Aquesta tècnica de pinçament permet l'aturada instantània del metabolisme i, per consegüent, la determinació del nivell intracel·lular de metabòlits en l'estat estacionari.

Sang. La sang arterial, uns 12 mL, es recull per degoteig de la cànula aplicada a l'artèria auricular de l'orella del conill, en el tub que conté l'heparina.

Desproteïnitació i neutralització:

A cada 1 mL de sang s'hi afegeix 2 mL de perclòric al 6 % i s'agita enèrgicament amb el vòrtex. Se centrifuga a 3 500- 4 000 rpm durant 15 min a temperatura ambient. El sobrenadant se separa per decantació, es recull en un tub pesat prèviament i es pesa. S'hi afegeixen 2 gotes de la solució indicadora de pH. Mantinent el tub en l'agitador, s'hi afegeix gota a gota KOH 20 % fins que el sobrenadant siga neutre (entre 0,5 i 1 mL). Es pesa. Es calcula la diferència de pes, la qual cosa equival al factor de dilució (volum neutre / volum àcid) de la mostra perquè s'ha de tenir en compte en els càlculs posteriors. El perclorat potàssic format sedimenta després de centrifugar durant 10 min a 3 500-4 000 rpm. El sobrenadant obtingut per decantació s'aliquota i es conserva a -20 °C fins que es fan les determinacions de les concentracions de metabòlits.

Fetge. Immediatament després d'extraure la sang, el conill s'anestesia amb pentobarbital (50 mg/kg) i després d'augmentar la dosi d'anestèsia i comprovar que és mort, s'extrau el fetge i immediatament es fragmenta i col·loca a les pinces, que tot seguit s'introdueixen en N₂ líquid. El fetge congelat es tritura en un morter de porcellana en presència de N₂ líquid, fins a convertir-lo en una pols fina. Es pesen quantitats de 0,5 g de teixit triturat de cadascun dels fragments i, en tubs Corning de 15 mL, es conserven a -20 °C fins que es fan les determinacions.

Homogeneïtzació. A 0,5 g de fetge triturat i congelat en un tub de plàstic, una vegada s'ha temperat a 0 °C, s'hi afegeixen 2 mL de perclòric al 6 %. S'agita enèrgicament al vòrtex. Es transvasa a l'homogeneïtzador i s'homogeneïtza manualment amb molta precaució durant uns 5 min fins a obtenir una suspensió homogènia. Es transvasa en un tub de plàstic i, sense el tap, es centrifuga a 3500- 4000 rpm durant 15 min a temperatura ambient. En un tub pesat prèviament (P0) es transvasa el sobrenadant, es pesa (P1) i s'hi afegeixen 2 gotes de solució indicadora de pH. Després de l'agitació al vòrtex, s'hi afegeix gota a gota KOH 20 %, amb l'ajuda d'una microxeringa, fins que siga neutre (coloració groguenca-verda). Es pesa (P2). Es calcula el factor de dilució. Es centrifuga, sense el tap, a 3500 - 4000 rpm durant 10 min i es decanta el sobrenadant. Aquest es manté a 0 °C en gel fins que es fan les determinacions de la concentració dels metabòlits.

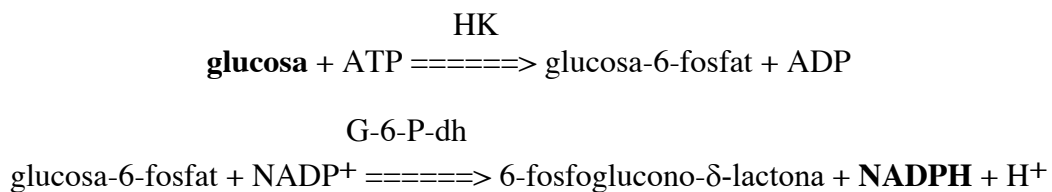
3.2. Determinació de la concentració de metabòlits

Tal com ja s'ha indicat prèviament en l'apartat de disseny experimental, cada parella farà les determinacions dels metabòlits (glucosa en la mostra de sang i de piruvat i L-lactat en fetge) de la sang i d'un fragment d'un dels 3 conills, a més de fer-ne el blanc. Tres de les parelles analitzaran també una mostra que correspondrà als patrons que ens serviran de control de qualitat de l'experiment.

3.2.1. Quantificació de glucosa

3.2.1.1. Fonament

En presència d'un excés d'ATP, de NADP⁺, d'hexocinasa (HK) i de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (G-6-P-dh), la quantitat de NADPH formada és proporcional a la de glucosa present. L'augment de [NADPH] és detectat per l'augment que experimenta l'absorbància a 340 nm.



3.2.1.2. Procediment

3.2.1.2.1. Quantificació de la glucosa

Es prepara la quantitat necessària de medi de reacció per a tots els grups de la sessió mesclant:

Tris 0,1 M pH 8,0:	1 v	(20 mL)
MgCl ₂ 0,1 M:	0,1 v	(2 mL)
NADP ⁺ 1 %:	0,1 v	(2 mL dels 25 mg en 2,5 mL)
ATP 10 mM:	0,1 v	(2 mL)
Enzim G-6-P-dh:	0,005 v	(0,1 mL)

Aquest medi de reacció es pot conservar a -20 °C.

Preneu tres cubetes i afegiu a cadascuna el que s'indica en la taula per al blanc i la mostra. **Tres de les parelles** prepararan, per tal de controlar la qualitat de l'experiment, la cubeta de més amb el **patró** glucosa 5 mM.

	Blanc	Sang	Patró
Medi reacció (µL)	500	500	500
Aigua (µL)	500	475	475
Mostra (µL)	--	25	25

Agiteu per inversió tapant la boca de la cubeta amb parafilm. Preneu nota dels valors de la A340 aproximadament als 5 i 10 min (A₁ i A₂, respectivament), fins que s'estabilitze.

Afegiu-hi 5 µL d'**hexocinasa diluïda 1/10** en sulfat amònic 3,2 M. Mescleu-ho bé.

Preneu els valors de la A340 al cap de 3 min, 10 min i 17 min d'afegir l'enzim.

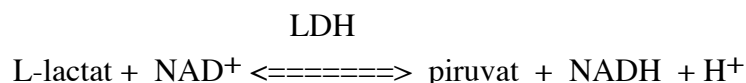
Advertiment: No oblideu usar el blanc com a cubeta de referència o, segons el colorímetre utilitzat, per a ajustar a zero el valor de l'absorbància. És possible que s'hi formen petites bombolletes de gas. Feu-hi uns colpets just abans de realitzar les lectures per tal d'evitar que el gas hi interferisca. Si d'una lectura a una altra traieu la cubeta del colorímetre, fixeu-vos de col·locar-la sempre en la mateixa posició.

Useu la diferència en absorbància ΔA₃₄₀ per als càlculs. Heu de tenir en compte que el coeficient d'extinció molar (ε) del NADPH és 6 220 L·mol⁻¹·cm⁻¹. Expresseu la quantitat de glucosa present en la sang en mM.

3.2.2. Quantificació de L-lactat

3.2.2.1. Fonament

En presència d'un excés de NAD⁺ i de L-lactat-deshidrogenasa (LDH), l'aparició de NADH com a conseqüència de la reducció de NAD⁺ és proporcional a la quantitat de L-lactat. L'augment de [NADH] és detectada per l'augment que experimenta la A340.



3.2.2.2. Procediment

3.2.2.2.1. Quantificació de L-lactat

Es prepara la quantitat necessària de medi de reacció per a tots els grups de la sessió mesclant:

Tampó Tris-hidrazini 0,1 M pH 8,5: 9 v (30 mL)

NAD⁺ 1 %: 1 v (3,3 mL dels 40 mg en 4 mL)

Preneu tres cubetes i afegiu a cadascuna el que s'indica en la taula per al blanc i la mostra. **Tres de les parelles** prepararan, per tal de controlar la qualitat de l'experiment, la cubeta amb 25 µL del **patró** L-lactat 5 mM.

	Blanc	Fetge	Patró
Medi reacció (µL)	500	500	500
Aigua (µL)	500	450	475
Mostra (µL)	--	50	25

Agiteu per inversió tapant la boca de la cubeta amb parafilm. Preneu nota dels valors de la A340 al cap de 5 (A₁) i 10 min (A₂), fins que s'estabilitze.

Afegiu-hi 10 µL de l'enzim L-lactat-deshidrogenasa. Mescleu-ho bé.

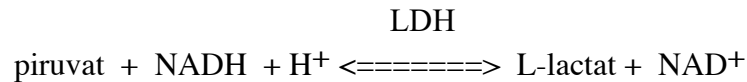
Preneu nota dels valors de A_{340} al cap de 20, 40, 60, 80 i 90 min.

Useu la diferència ΔA_{340} per als càlculs. Heu de tenir en compte que el coeficient d'extinció molar (ϵ) del NADH és $6\,220\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Expresses la quantitat de L-lactat present al fetge en $\mu\text{mol/g}$ de teixit i també en mM.

3.2.3. Quantificació de piruvat

3.2.3.1. Fonament

En presència d'un excés de NADH i de L-lactat-deshidrogenasa (LDH), l'aparició de NAD^+ com a conseqüència de l'oxidació de NADH és proporcional a la quantitat de piruvat. La disminució de $[\text{NADH}]$ és detectada per la disminució que experimenta la A_{340} .



3.2.3.2. Procediment

3.2.3.2.1 Quantificació de piruvat

Es prepara la quantitat necessària de medi de reacció per a tots els grups de la sessió mesclant:

Tampó fosfat 0,1 M pH 7,0:	1 v	(30 mL)
NADH 0,5 %:	0,05 v	(1,5 mL)

Preneu tres cubetes i afegiu a cadascuna el que s'indica en la taula per al blanc i la mostra. **Tres de les parelles** prepararan, per tal de controlar la qualitat de l'experiment, la cubeta amb el **patró** de piruvat 1 mM.

	Blanc	Fetge	Patró
Medi reacció (μL)	-	400	400
Aigua (μL)	1000	400	590
Mostra (μL)	--	200	10

Agiteu per inversió tapant la boca de la cubeta amb parafilm. Preneu nota dels valors de A_{340} al cap de 5 (A_1) i 10 min (A_2), fins que s'estabilitze.

Afegiu-hi $5\ \mu\text{L}$ de l'enzim L-lactat-deshidrogenasa (LDH). Mescleu-ho bé.

Preneu nota dels valors de A_{340} al cap de 10, 30, 40 i 60 min.

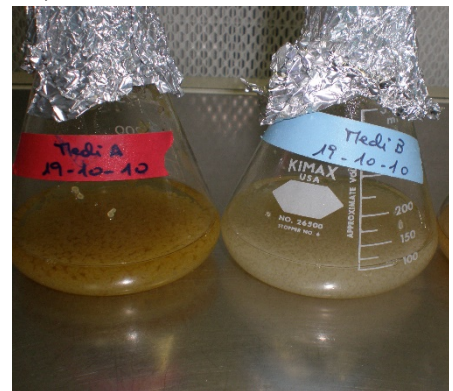
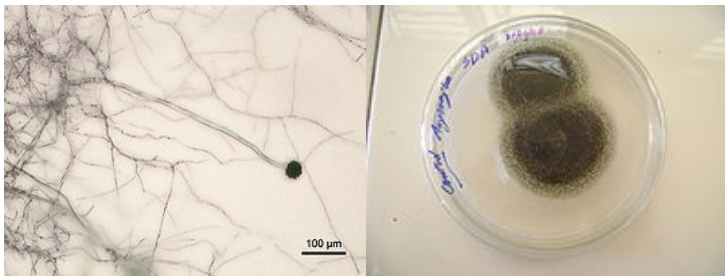
Useu la diferència en absorbància ΔA_{340} per als càlculs. Heu de tenir en compte que el coeficient d'extinció molar (ϵ) del NADH és $6\,220\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Expresses la quantitat de piruvat present al fetge en $\mu\text{mol/g}$ de teixit i també en mM.

Producció d'amilases per fermentació en el fong Aspergillus niger*

El midó és el polímer de reserva d'hidrats de carboni dels vegetals i es troba a l'interior de les cèl·lules formant grànuls d'una grandària considerable. La major part de les espècies vegetals tenen capacitat per a sintetitzar midó, però aquest compost és especialment abundant en tubercles com la creïlla o en llavors com la dacsca. El midó conté dos tipus de polímer de glucosa: l'amilosa i l'amilopectina. El primer està format per llargues cadenes no ramificades d'unitats de D-glucosa connectades per enllaços α -1,4 amb una massa molecular relativa des d'uns pocs milers fins a 500 000. El segon és també d'una gran massa molecular (fins a 1 milió), però està molt ramificat i cada 24 a 30 residus hi ha un punt de ramificació amb enllaços α -1,6.

Les amilases són els enzims responsables de la degradació del midó. Hi ha diversos tipus d'amilases, entre altres aquestes: a) les α -amilases, que trenquen enllaços interns de les cadenes d'amilosa i amilopectina i produeixen polisacàrids i oligosacàrids de diferent llargària, i les β -amilases, que alliberen maltosa des de l'extrem no reductor; i b) les glucoamilases, que, tallant des de l'extrem no reductor, alliberen les unitats monomèriques de glucosa. En la natura, molts microorganismes són capaços de produir aquests enzims de gran interès comercial. Hi destaquen els fongs filamentosos, fonamentalment algunes espècies dels gèneres *Aspergillus* i *Trichoderma*.

Aspergillus niger és un dels fongs més comuns entre els *Aspergillus*, de la classe dels ascomicets, i és un contaminant habitual dels aliments. Els genomes de dues soques han estat seqüenciats. En la indústria s'usa especialment per a produir àcid cítric i àcid glucònic. Quan fermenta sucre produeix molts enzims d'interès industrial: amilases (producció de cerveses de baix contingut calòric, fabricació de xarops ensucrats, elevació de la massa de pa), glucoamilasa (sucos rics en fructosa), pectinasa (aclariment dels vins i les sidres) i α -galactosidasa (medicament per a disminuir la flatulència), entre altres.



*Micrografia amb un augment x100 Creixement en placa
Cultiu d'espores*

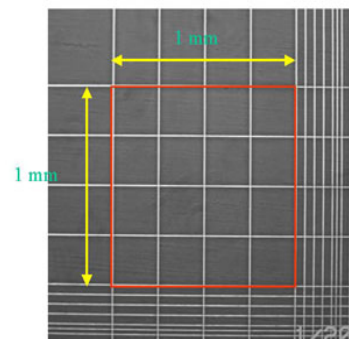
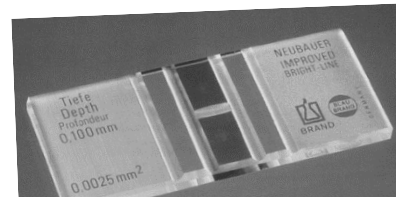
L'objectiu dels experiments proposats és determinar les condicions en què el fong Aspergillus niger és capaç de secretar amilases al medi de cultiu. S'hi estudiaran tant les condicions d'inducció de la producció dels enzims en presència de midó, com de repressió en presència de glucosa. Finalment, s'hi estudiarà l'efecte del pH sobre l'activitat amilasa per determinar el valor òptim d'aquest paràmetre.

* Agraïm la col·laboració de Lluïsa Ventura (Institut d'Agroquímica i Tecnologia d'Aliments) i de Daniel Ramón (Biópolis) en el disseny dels experiments i el subministrament de material.

1. Material, productes i solucions

Material

- Fong *Aspergillus niger* (soca CECT2775, correspon a ATCC10864, americana) en placa de medi complet d'*Aspergillus* (MCA) o en placa d'agar-creïlla-glucosa.
- Agitador orbital en cambra a 30 °C per a erlenmeyers de 250 mL
- Incubador/estufa a 50 °C
- Cambra Neubauer per al recompte d'espores
- Filtre tela de niló de porus de 42 µm estèril
- Embut de plàstic estèril
- Gas per a mantenir condicions estèrils
- *Thermoblock*
- Colorímetre
- Cubetes colorimètriques de Sarsted de plàstic d'1,5 mL
- Centrifugadora de taula i suports Corning de 50 mL
- Balança
- Vòrtex
- Erlenmeyers 250 mL amb 100 mL de medi estèril (8)
- Gradeta de tubs d'Eppendorf
- Tubos d'Eppendorf de 2 mL i d'1,5 mL
- Pipetes automàtiques (P20, P200 i P1000) i puntes



Productes

- Midó soluble (Merck 101252)
- Midó soluble Zulkowsky (Merck 101257)
- Lugol 0,013M (Scharlau LU00100500). Es pot preparar amb 0,1 % (0,004 M) I₂ i 0,2 % (0,012 M) IK i conservar a temperatura ambient protegit de la llum
- Glucosa (JT Baker 0115)
- Agar-creïlla-glucosa (Pronadisa 1022.00)
- Sals i elements traça
- Tartrat amònic (Scharlau AM04100500, Panreac 121146)
- Àcid cítric·1 H₂O (Panreac 141018)
- NaOH
- Tween 80 (Across Organic 278632500, Fluka 93780)
- Glicerol estèril per a emmagatzematge del fong (50 % final) a -80 °C

Solucions

- Medis de cultiu:
 - Placa amb medi complet per a *Aspergillus* (MCA):
 - 0,2 % peptona
 - 0,15 % casaminoàcids
 - 0,1 % extracte de llevat
 - 1 % D-glucosa
 - 2 % (v/v) solució de sals per a *Aspergillus**
 - 0,1 % (v/v) solució vitamines per a *Aspergillus***

Les plaques es preparen al 2 % d'agar bacteriològic ben plenes i es cultiven a 30 °C durant 3 o 4 dies.

* **Solució de sals 50x:** per a 1 litre, 26 g de KCl, 26 g MgSO₄·7H₂O, 76 g KH₂PO₄ i 50 mL de solució d'elements traça que es prepara 20x (per a 1 L, dissoldre en l'ordre que s'indica: 40 mg de tetraborat disòdic·10 H₂O, 400 mg de sulfat de coure(II)·5

H₂O, 800 mg de sulfat de ferro(II)·7 H₂O o clorur fèrric; 800 mg de sulfat de manganés(II)· 1 H₂O, 800 mg de molibdat disòdic· 2 H₂O i 8 mg de sulfat de zinc· 7 H₂O; aquesta solució no és estable, alguns components precipiten, s'ha de mesclar molt bé abans d'usar-la; es conserva a 4 °C). La solució de sals s'esterilitza en autoclau i es conserva a 4 °C.

Per a 100 mL de la **solució de vitamines es dissolen 50 mg de tiamina, 10 mg de biotina, 100 mg d'àcid nicotínic, 200 mg de pantotenat de calci, 50 mg de piridoxina, 100 mg de riboflavina; s'esterilitza per filtració i es conserva a 4 °C protegida de la llum.

- En lloc de les plaques MCA, el fong es pot inocular en plaques que contenen medi agar-creïlla-glucosa al 3,9 %.

- Medi mínim líquid per al creixement de les espores recollides de placa:

0,03 % tartrat amònic

0,1 % extracte de llevat

2 % solució de sals 50x

Aquest medi líquid es prepara, per a 1 L, dissolent 0,3 g de tartrat amònic en aigua, seguit d'1 g d'extracte de llevat i, finalment, afegint-hi 20 mL de la solució de sals 50x; el pH de 5,4 es du a 6,8 amb NaOH 5 M. Es distribueix 3x100 mL en matrassos de 250 mL (A) i 4x200 mL en matrassos de 500 mL (B) que contenen, respectivament, com a font de carboni 3 % glucosa o 3 % midó. S'esterilitza en autoclau 20 min a 120 °C i immediatament es deixa temperar en agitació a la cambra de 30 °C.

- Tampons de citrat sòdic 0,1 M de pH 2,5; 3,5; 4,0; 4,5 i 5,5.

Per a 100 mL es pesa 2,11 g d'àcid cítric i el pH d'1,93 es du amb NaOH 5 M al pH desitjat.- Midó soluble de Zulkowski a l'1 % en tampó citrat sòdic 0,1 M de diferents pH: 2,5; 3,5; 4,0; 4,5 i 5,5.

2. Disseny de l'experiment

El professor prepararà els cultius del fong i prendrà alíquotes del medi al llarg del temps del seu creixement a 30 °C. Les mostres sobrenadants es conservaran a -20 °C fins a la seua anàlisi. Cada parella mesurarà l'activitat amilasa dels medis de repressió (glucosa) i/o de desrepressió (midó). Posteriorment, es determinarà el pH òptim de l'activitat amilasa.

3. Procediment experimental

3.1. Recollida i comptatge d'espores

En condicions estèrils, les espores crescudes en placa de Petri que contenen el medi agar-creïlla-glucosa al 3,9 % o MCA, juntament amb els micelis, es recullen amb una espàtula, es col·loquen en un Corning de 50 mL i, finalment, se suspenen en uns 15 mL d'aigua milliQ estèril que conté 1/10000 (v/v) de Tween 80, un detergent que impedeix l'agregació de les espores. S'agita enèrgicament en vòrtex. Es filtra sobre tela de niló estèril de 42 µm de porus, es renta amb aigua-Tween i la suspensió d'espores recollida en Corning en aproximadament 25 mL, se centrifuga a 3 500 rpm durant 10 min. Les espores sedimentades es ressuspenen en aigua, s'agita enèrgicament en vòrtex, se centrifuga i finalment es ressuspenen en aproximadament 25 mL d'aigua estèril. Aquesta suspensió es pot mantenir a 4 °C fins a 1 mes. Per a més llarga conservació, es glicerina (v/v) dues alíquotes i es conserven a -80 °C.

Per determinar la concentració de les espores en la suspensió, es prepara una dilució 1/10 i 1/100 i se'n col·loquen 10 µL a la cambra de comptatge i es fa el comptatge al microscopi amb l'objectiu de 40X. Si hi ha 4 espores en un quadrat (4x4), es multiplica per 2,5, per 10⁵ i per la dilució (10²), resultarà que la suspensió conté de l'ordre de 10⁸ espores/mL. (NOTA: 4 espores és molt poc per a comptar; en aquest cas seria millor comptar la dilució 1/10, ja que se'n recomanen unes 30.)

3.2. Fermentacions

En cadascun dels matrassos, A i B, a partir d'una suspensió fresca d'espores, s'inocula, per duplicat, 10⁶ espores per mL de medi de cultiu. Es prenen 6 mL del medi A i 10 mL del B inoculats (temps 0), es centrifuga a 3 500 rpm 10 min i el sobrenadant es distribueix en alíquotes en un Eppendorf d'1,5 mL (300 µL de A i 400 µL de B), que es conserven a -20 °C fins a la mesura de l'activitat amilasa el dia de la sessió

pràctica. Els cultius es mantenen en agitació orbital a 200 rpm a 30 °C i se'n trauen mostres aproximadament a les 7 h, 24 h, 31 h, 48 h i 72 h des de la inoculació, se centrifuguen, s'aliquoten i es conserven congelades. Així, la cinètica de producció d'amilases es realitza a partir de les mesures d'activitat de les 6 mostres de cadascun dels cultius. Els tubs es retolen amb dos dígitos, que indicaran el cultiu (A o B) i el temps de cultiu.

3.3. Mesura de l'activitat amilasa en condicions de repressió i/o desrepressió per catabòlit

Es prenen 14 tubs d'Eppendorf, 7 per a cadascun dels cultius A i B i es retolen com a control (C) i com els corresponents temps de cultiu (0, 7, 24, 31, 48 i 72). A cadascun dels tubs corresponents al **medi B** s'hi afegeixen els components següents:

- 150 µL d'aigua
- 100 µL de tampó citrat 0,1 M pH 4,0
- 0,5 mL de midó soluble Zulkowski 1 % en tampó citrat 0,1 M pH 4,0

Immediatament després d'afegir-hi la mostra (50 µL) de cada temps de cultiu (atenció: al tub de control, l'aigua hi substitueix la mostra), els 7 tubs s'agiten al vòrtex i s'incuben a 50 °C durant 10 min. Se'n trauen i es refreden en aigua. Es preparen 7 cubetes de colorímetre amb 950 µL d'aigua destil·lada (C i els 6 temps de cultiu). S'ajusta el colorímetre a 0 amb aigua destil·lada. Al tub Eppendorf que conté la mescla control (C) s'hi afegeix 100 µL de lugol, es mescla dues vegades al vòrtex i, immediatament, es transvasen 50 µL a la cubeta de colorímetre (retolada com a C) que conté els 950 µL d'aigua, es mescla bé amb la pipeta Pasteur de plàstic i es llig l'absorbància a 620 nm. Amb la resta de les mostres es procedeix, d'una en una, de la mateixa manera.

	Medi A		Medi B	
	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil
Control				
0 h				
7 h				
24 h				
31 h				
48 h				
72 h				

Quan s'ha acabat de mesurar les mostres B, es realitzen les mesures de les A seguint el mateix procediment descrit per al medi B.

Noteu que un valor més alt de A₆₂₀ indica major quantitat de midó en el medi de reacció i que, per tant, un valor més baix indica menor quantitat de midó a causa d'una major activitat amilasa en la mostra.

3.4. Efecte del pH sobre l'activitat amilasa produïda per *A. niger*

A partir de la mostra que haja donat la major activitat enzimàtica en l'apartat 3.3 (medi B), prepareu cinc mostres de reacció, cadascuna amb el tampó citrat d'un determinat pH, i els tubs de control corresponents, i procediu tal com heu fet en l'apartat anterior.

	Control		Mostra	
	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil
Tub 1, pH 2,5,				
Tub 2, pH 3,5				
Tub 3, pH 4,0				
Tub 4, pH 4,5				
Tub 5, pH 5,5				

Representeu l'activitat relativa d'amilasa enfront del pH. Determineu el pH òptim de l'activitat amilasa.

Lectures recomanades

Isocitrat-deshidrogenasa de llevat de forner: un enzim al·lostèric

CUPP, J.R. i MCLISTER-HENN, L. (1993): "Kinetic analysis of NAD⁺-Isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis." *Biochemistry* **32**, 9323-9328.

NICHOLS, B.J., RIGOLET, M. i DENTON, R.M. (1994): "Comparison of the effects of Ca²⁺, adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD⁺-isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart." *Biochem. J.* **303**, 461-465.

Biosíntesi del glicogen en Escherichia coli

GOTTSCHALK, G. (1986): *Bacterial metabolism*, 2a edició, Springer Verlag.

LODEIRO A.R., DI LORENZO O., PETRUCCELLI S., MOLINA-ORTIZ S. i SORGENTINI D. (1994): "An experiment on glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*.", *Biochem. Educ.* **22**, 213-215.

Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill

FRAYN, K.N. (2019) *Human metabolism. A regulatory perspective*, 4a. edició, Wiley Blackwell, ed.

Harcourt-Brown FM, Harcourt-Brown SF (2012): "Clinical value of blood glucose measurement in pet rabbits." *Vet. Rec.* **170**, 674.

WILLIAMSON, D.H., LUND P. i KREBS, H.A. (1967): "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver." *Biochem. J.* **103**, 514-527.

Producció d'amilases per fermentació en el fong Aspergillus niger

CURRIE, J.N. (1917): "The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*.", *J. Biol. Chem.*, **31**, 15-37.

MONGA, M., GOYAL, M., Kalra, K.L. i SONI, G. (2011): "Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger*. *Mycosphere*, **2** (2), 129-134.

SUGANUMA, T., FUJITA K. i KITAHARA, K. (2007): "Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of α -amylases from acid-producing koji". *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 353-362.

Qüestionari previ a les pràctiques presencials

Pràctiques de metabolisme i regulació. Grau en Biotecnologia. Curs 2021-22

(NOTA: Responen aquest qüestionari amb bolígraf i lliureu-lo el 1r dia d'assistència al laboratori). Les respostes les trobareu bàsicament al Manual de laboratori i en la bibliografia disponible).

Nom i cognoms _____ Grup _____

1. Pel que fa a l'interès biotecnològic del fong *Aspergillus niger*:

(a) Quins són els objectius dels experiments a realitzar en la sessió de laboratori?

(b) Fes un esquema detallat del protocol experimental que seguiràs amb les mostres corresponents a diferents temps per mesurar l'activitat amilasa produïda pel fong en condicions de **desrepressió**. Com expressaràs els resultats de les mesures d'activitat enzimàtica?

(c) Indica breument el fonament de l'assaig enzimàtic de l'activitat amilasa.

2. En relació amb la determinació de la concentració de metabòlits en l'estat estacionari en teixits de conill.

(a) Quins són els objectius dels experiments que cal realitzar en la sessió de laboratori?

(b) Quin és el fonament de la quantificació de glucosa? Indica les reaccions implicades.

(c) A quina concentració de glucosa en sang, expressada en mM, correspon un valor de ΔA_{340} de 0,35 obtingut a partir de l'assaig enzimàtic descrit en el Manual de laboratori, usant 25 μL de sang desproteïnitzada diluïda tres vegades? (Dades: coeficient d'extinció molar de l'NADPH: $6\,220\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$; cubeta de l'espectrofotòmetre: 1 cm).

(d) Quin és el valor de la constant d'equilibri de la reacció catalitzada per la lactat-deshidrogenasa, a pH 7,0, en la direcció de reducció del L-lactat? Indica la **referència bibliogràfica**. Escriu aquesta **reacció**. **Explica** per què necessites conèixer el valor d'aquesta constant d'equilibri a l'hora d'interpretar els resultats de l'experiment que realitzaràs.

(e) Quin és l'interès de la quantificació de patrons de concentració coneguda?

**Quadern de resultats del laboratori de metabolisme i regulació.
Curs 2021-22. Grau en Biotecnologia.**

Nom i cognoms _____

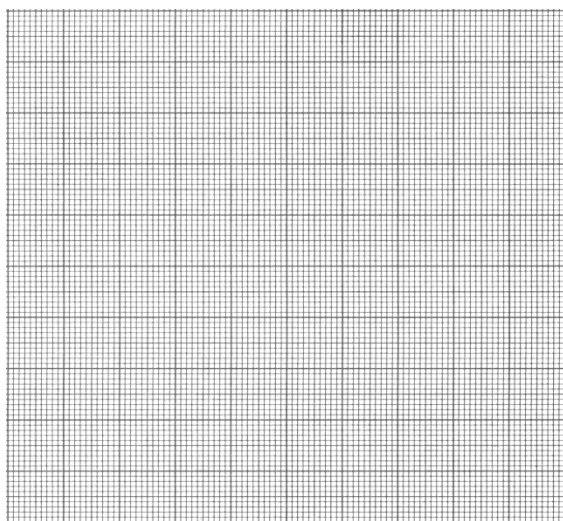
Grup _____ Professora _____

Producció d'amilases per fermentació en el fong Aspergillus niger

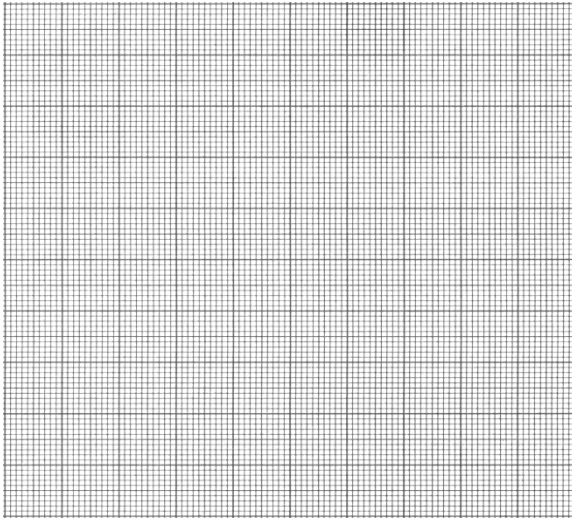
1. Mesura de l'activitat amilasa present en els diferents medis de cultiu (M: mostra; C: control).

	Medi B			Medi A			Activitat relativa (%)
	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil	M - C	A ₆₂₀	A ₆₂₀ x dil	M - C	
Control							
0 h							
7 h							
24 h							
31 h							
48 h							
72 h							

Representació gràfica dels valors d'A₆₂₀ de la mostra (M - C) enfront del temps dels cultius (A i B) del fong. Posa-hi el peu a la figura.



Representació gràfica de l'activitat amilasa, expressada en %, produïda pel fong al llarg del temps en el cas del cultiu B. Posa-hi el peu a la figura.

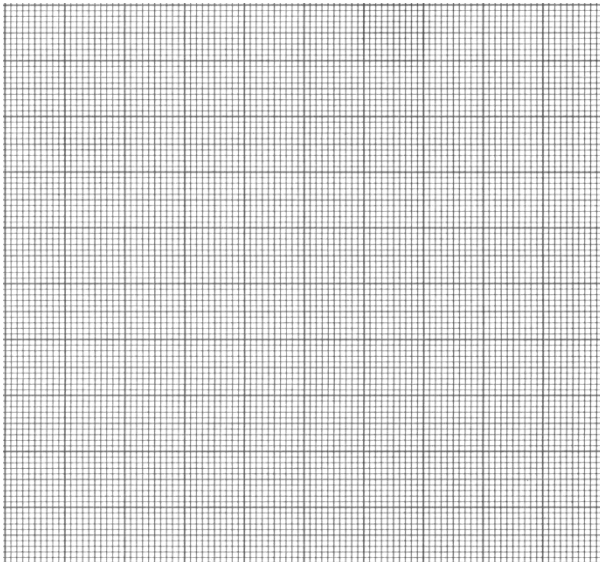


2. mostra més activa de la **sèrie B**.

Efecte del pH sobre l'activitat amilasa de la

	Control		Mostra		ΔA_{620} (M- C)	Activitat relativa (%)
	A_{620}	$A_{620} \times \text{dil}$	A_{620}	$A_{620} \times \text{dil}$		
Tub 1, pH 2,5						
Tub 2, pH 3,5						
Tub 3, pH 4,0						
Tub 4, pH 4,5						
Tub 5, pH 5,5						

Representa l'activitat relativa d'amilasa enfront del pH. Posa-hi el peu a la figura.



Indica el pH òptim de l'activitat amilasa mesurada: _____

3. Resultats globals de la determinació de la producció d'amilases pel fong *A. niger* cultivat en condicions de repressió (glucosa) i/o desrepressió (midó).

Estudiant	Medi A	Medi B
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
Mitjana		

Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill.

1. Quantificació de metabòlits (Indica quina mostra de conill has emprat: _____).

1.1. Quantificació de la glucosa en sang.

Mostra	A ₁	A ₂	A ₃₄₀			ΔA ₃₄₀	[] mM
			3 min	10 min	17 min		

Càlculs

1.2. Quantificació de piruvat en fetge.

Mostra	A ₁	A ₂	A ₃₄₀				ΔA ₃₄₀	μmol/g	mM
			10 min	30 min	40 min	60 min			

Càlculs

1.3. Quantificació de L-lactat en fetge.

Mostra	A ₁	A ₂	A ₃₄₀				ΔA ₃₄₀	μmol/g	mM
			20min	40 min	60min	90 min			

Càlculs

Taula 1.1. Resum dels valors de la concentració de metabòlits de la mostra de conill.

Teixit	Metabòlit	Mostra conill:
Sang (mM)	Glucosa	
Fetge(mM)	Piruvat	
	L-lactat	

Taula 1.2. Valors de la mitjana obtinguts per a les mostres.

Teixit	Metabòlit	1.2	1.3	2.2	2.3	3.2	3.3	Mitjana
Sang (mM)	Glucosa							
Fetge (mM)	Piruvat							
	L-lactat							

Resultats de la quantificació dels patrons:

Glucosa 5 mM:

Piruvat 1 mM:

L-lactat 5 mM :

2. Estat redox del citosol de la cèl·lula hepàtica de conill.

Càlcul de la relació $[NAD^+]/[NADH]$ citosòlica de la mostra estudiada.

Taula 2. Valors de la mitjana de la relació $[NAD^+]/[NADH]$ citosòlica obtinguda per a les mostres de conill. Compareu aquests resultats amb els de la bibliografia.

Mostra conill	$[NAD^+]/[NADH]$	Mostra conill	$[NAD^+]/[NADH]$
Bibliografia		Valor mitjà	

Qüestionari de resultats del laboratori de metabolisme i regulació. Curs 2021-22.

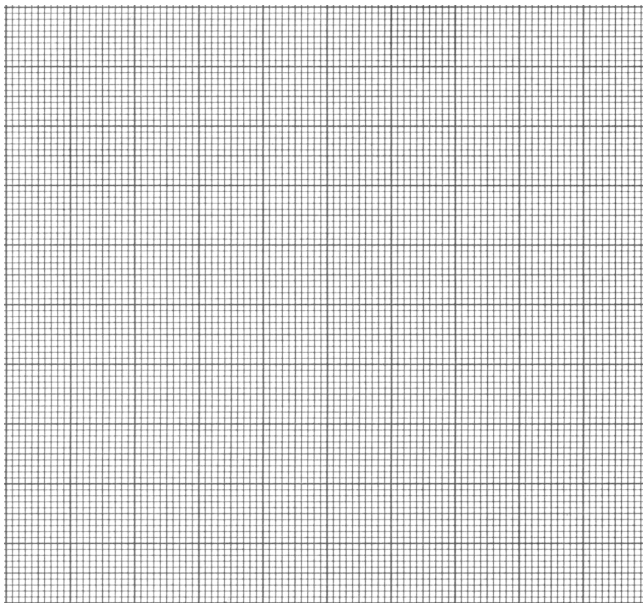
Nom i cognoms _____ Grup _____

Professora _____

(NOTA: Respon aquest qüestionari amb bolígraf i assenyal amb asterisc (*) els teus resultats individuals). A elaborar individualment i lliurar per a avaluació de cada estudiant.

1. Isocitrat-deshidrogenasa de llevat de forner

(a) Representa la velocitat inicial ($\Delta A_{340}/\text{min}$) davant de la concentració de substrat en absència i en presència d'AMP, i determina els valors de $S_{0,5}$ i V_{max} en cada cas.



$S_{0,5}$:

V_{max} :

$S_{0,5}$ (+AMP) :

V_{max} (+AMP) :

Figura 1. _____

(b) Completa la taula següent, que et permetria estudiar l'efecte de l'ADP sobre l'activitat isocitrat-deshidrogenasa seguint bàsicament el protocol que s'ha utilitzat en el cas de l'AMP. El medi de reacció és un tampó fosfat 10 mM pH 7,0 que ha de contenir NAD^+ a una concentració final 1 mM, MgCl_2 3,5 mM, ADP 2 mM i 0,1 mL d'extracte enzimàtic. Has d'assajar concentracions de D-isocitrat de 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,25, 0,35 i 0,5 mM en un volum final de mescla de reacció d'1 mL. (Nota: totes les dissolucions estan preparades en el tampó fosfat 10 mM pH 7,0).

	Tubs (mL)							
	control	1	2	3	4	5	6	7
Tampó fosfat								
NAD^+ 20 mM								
MgCl_2 35 mM								
ADP 50 mM								
Extracte enzimàtic	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
D-Isocitrat 5 mM	-							

2. Biosíntesi de glicogen en *Escherichia coli*

(a) Construeix la recta de calibratge que et permet determinar la quantitat de glicogen present en cadascun dels medis de cultiu d'*E. coli*. Indica el valor d' A_{620} obtingut de cadascun dels medis i completa la taula.

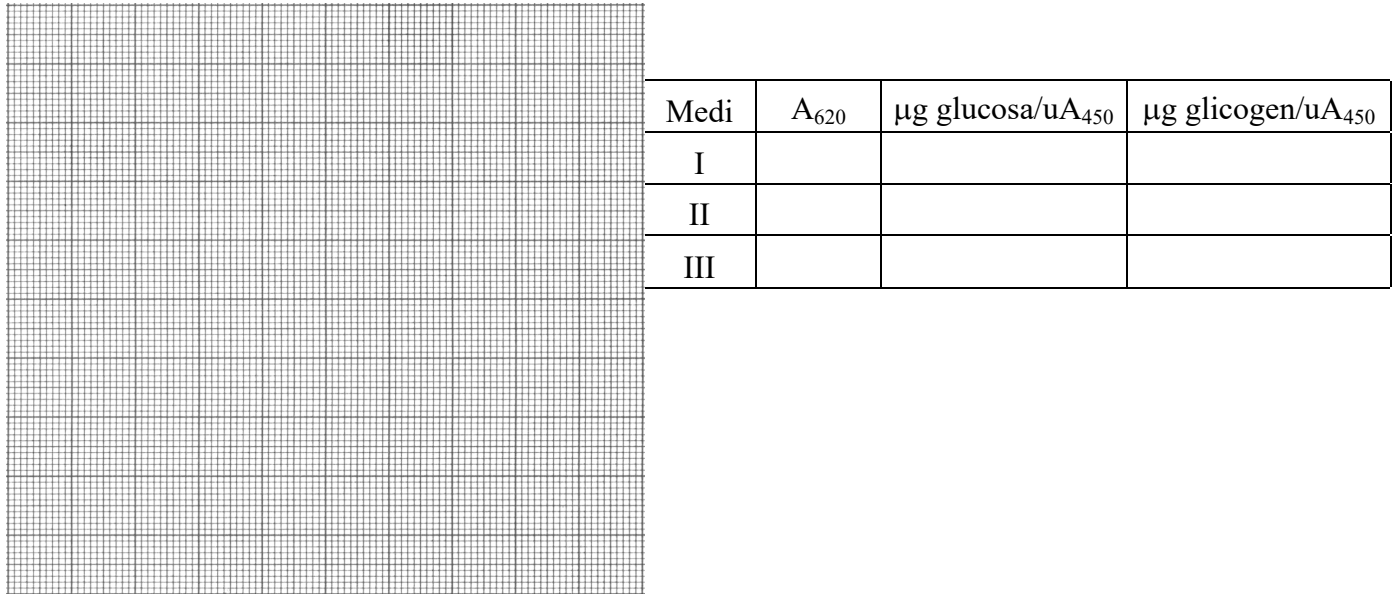


Figura 2. _____

(b) Interpreta els resultats **per als tres medis** de cultiu, i compara'ls amb els de Lodeiro AR *et al.* (1994).

3. Quantificació de metabòlits en estat estacionari en teixits de conill

(a) Quantificació de metabòlits (indica el nombre de la mostra de conill).

Teixit	Metabòlit	Conill
Sang (mM)	Glucosa	
Fetge (mM)	Piruvat	
Fetge (mM)	L-lactat	
Fetge	[L-lactat]/[Piruvat] [NAD ⁺]/[NADH]	

(b) Resultats de la quantificació dels patrons:

Glucosa 5 mM:

Piruvat 1 mM:

L-lactat 5 mM:

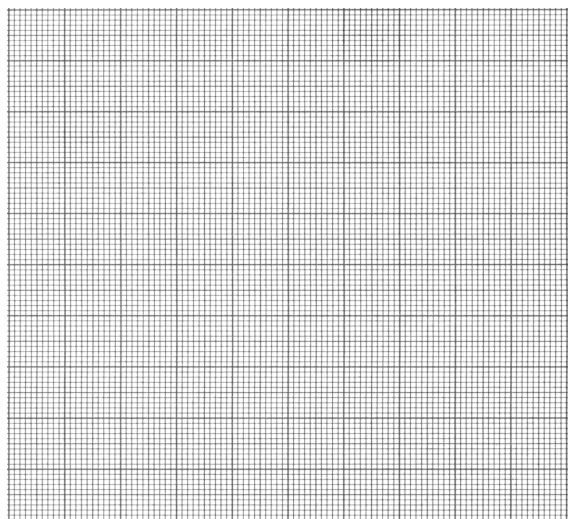
Quin és l'objectiu de la quantificació dels patrons? Quines conclusions traus dels valors obtinguts per als patrons? **Explica** les respostes.

(c) Comenta els teus resultats i compara'ls amb els del grup i els d'altres autors. Indica la **font bibliogràfica**.

4. Producció d'amilases per fermentació en el fong *Aspergillus niger*.

(a) Representa els valors d' A_{620} (M-C) davant del temps dels cultius A i B (**esquerra**), i l'activitat amilasa, expressada en %, produïda pel fong al llarg del temps en el cas del cultiu B (**dreta**).

(A)



(B)

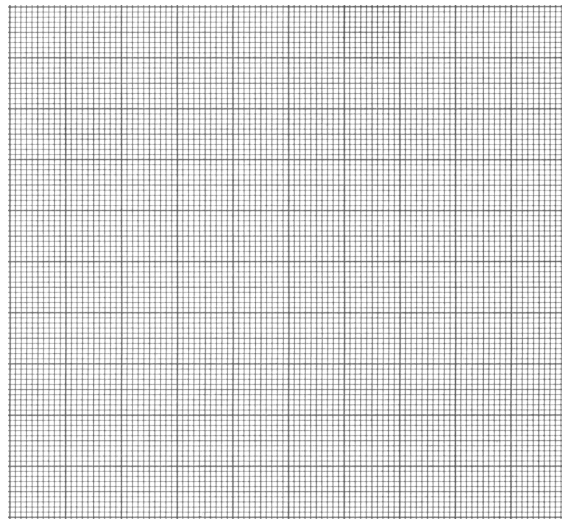
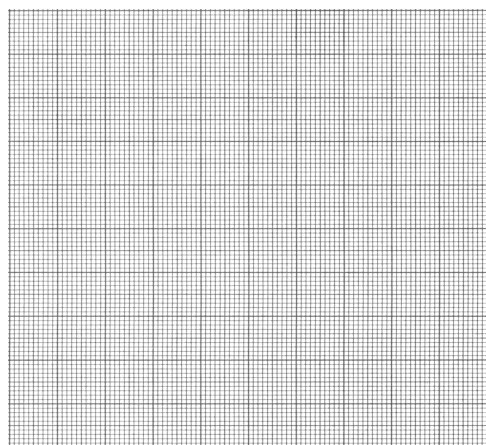


Figura 3. (A) _____

(B) _____

(b) Representa l'activitat relativa de l'amilasa de la mostra més activa de la sèrie B, expressada en %, davant del pH.



pH òptim : _____

Comenta els teus resultats de pH òptim i els del grup; compara'ls amb els de Minoda Y *et al.* (1968) i d'altres fonts bibliogràfiques.