



Práctica 2: Extracción de Enzimas de Diversas Fuentes

Métodos generales de
extracción y detección de
actividad enzimática

MC. Carlos Montejo Dávila

Objetivos

1

Aprender un método general para extraer enzimas de diferentes fuentes.

2

Desarrollar habilidades para detectar actividad enzimática con métodos sencillos y rutinarios.

Introducción

1

Las enzimas son biomoléculas presentes en todos los sistemas vivos.

2

Su extracción depende del estado de la muestra y condiciones ambientales.

3

Las muestras frescas tienen mayor probabilidad de mostrar actividad enzimática.

Material s y Equipos (Parte 1)



Piseta con agua,
centrífuga clínica,
balanza
granataria,
mortero y pistilo.



Tubos de
centrifuga,
pipetas Pasteur,
micropipeta de 1
mL, baño maría.



Gradillas, vasos de
precipitado,
marcador, cinta
masking tape.

Materiales y Equipos (Parte 2)



Reactivos: PBS 1x, Yodo-Lugol, DNS, Benedict, almidón al 2 %, sacarosa al 2 %, peróxido de hidrógeno al 6 %.



Muestras: hojas secas y frescas, papa, rábano, semillas germinadas, manzana, plátano, levadura Tradipan®.



Equipo de protección: bata, lentes de seguridad, guantes, toallas húmedas.

Actividad 1: Extracción de Enzimas



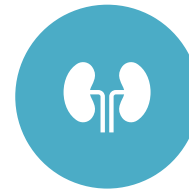
1. PESAR 5 G DE MUESTRA.



2. HOMOGENEIZAR CON 10 ML DE PBS EN MORTERO.



3. CENTRIFUGAR A 3,500 RPM POR 10 MIN.



4. TRANSFERIR EL SOBRENADANTE A TUBOS ROTULADOS.



5. MANTENER EN HIELO HASTA SU USO.

Actividad 2: Detección de Amilasa



1. MEZCLAR 2.5 ML DE EXTRACTO CON 2.5 ML DE ALMIDÓN AL 2%.



2. INCUBAR A 37 °C POR 10 MINUTOS.



3. AGREGAR YODO-LUGOL Y BENEDICT, OBSERVAR REACCIONES.



4. INCUBAR EN BAÑO MARÍA, COMPARAR INTENSIDADES DE COLOR.

Actividad 3: Detección de Invertasa



1. Mezclar 1 mL de extracto con 1 mL de sacarosa al 2%.



2. Incubar a 37 °C por 10 minutos.



3. Agregar 3 mL de DNS, calentar en baño maría.



4. Enfriar y medir absorbancia a 540 nm.

Actividad 4: Detección de Catalasa



1. COLOCAR 5 ML DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN TUBOS.



2. AGREGAR 1 ML DE EXTRACTO, AGITAR SUAVEMENTE.



3. OBSERVAR APARICIÓN DE BURBUJAS DE OXÍGENO.



4. COMPARAR INTENSIDAD DE REACCIÓN.

Variables y Resultados Esperados



VARIABLE
INDEPENDIENTE: TIPO
DE MUESTRA (FUENTE
BIOLÓGICA).



VARIABLE DEPENDIENTE:
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
OBSERVADA.



RESULTADOS
ESPERADOS: MAYOR
ACTIVIDAD EN
MUESTRAS FRESCAS.



DIFERENCIAS EN
INTENSIDAD DE COLOR
O FORMACIÓN DE
BURBUJAS SEGÚN LA
ENZIMA.

Normas Generales de Laboratorio



Usar bata de laboratorio y lentes de seguridad en todo momento.



Recoger el cabello largo para evitar contaminación o accidentes.



Utilizar calzado cerrado (prohibido sandalias o zapatos abiertos).



Usar guantes y cubrebocas cuando sea necesario.



Llevar una bitácora detallada de cada actividad realizada.