

Laboratorio de Enzimología
MC Carlos Montejo Dávila
**Práctica 3: Factores
que afectan la
actividad de una
enzima**



Propósitos



DEMOSTRAR LA
NATURALEZA QUÍMICA
DE LA MAYORÍA DE LAS
ENZIMAS.



INVESTIGAR LA
ESPECIFICIDAD POR EL
SUSTRATO DE UNA
ENZIMA.



ANALIZAR EL EFECTO DE
LA TEMPERATURA EN LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

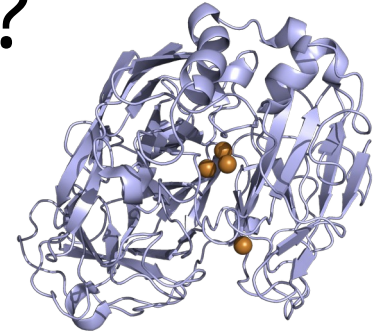


OBSERVAR EL EFECTO DE
LA DESNATURALIZACIÓN
EN LA REACCIÓN
CATALIZADA.

Introducción

- Las reacciones catalizadas por enzimas son sensibles a las condiciones del medio. Cualquier factor que afecte la probabilidad de choques efectivos, la energía de activación o la integridad de la enzima modificará la velocidad de reacción y la actividad observada.

¿Qué es la polifenol oxidasa?



Enzima presente en vegetales como la papa, manzana, plátano.

Se encuentra en los **plástidos** (cloroplastos y amiloplastos).

Pertenece al grupo de **metaloenzimas**.

Contiene 2 iones Cu^{2+} en su sitio activo → esenciales para su actividad.

💡 **Dato clave:** La feniltiourea inhibe la enzima porque se une al cobre.

Función biológica en la papa

- Actúa como **mecanismo de defensa**:

- Corte o daño → se rompen las células.
- PPO entra en contacto con compuestos fenólicos y oxígeno.
- Oxida el catecol → forma **o-quinonas**.
- Quinonas → polimerizan a **melaninas** (pigmentos pardos).

• Resultado: **Pardeamiento enzimático** que forma una **barrera protectora** contra patógenos e insectos.



Tipos de inhibición



Inhibición por Unión a Cofactor (Ej: Feniltiourea con el Cobre).



Inhibición por Desnaturalización (Ej: Calor, solventes o ácidos).



Inhibición por Degradación Enzimática (Ej: Proteasas).

Actividad 1: Extracción de Polifenol Oxidasa



Fuente: papa americana.



La polifenol oxidasa cataliza la oxidación de compuestos fenólicos como el catecol, produciendo quinonas que polimerizan formando pigmentos marrones.

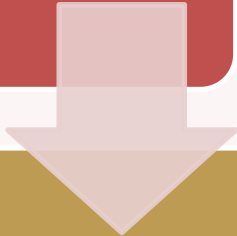


El extracto se prepara por licuado, filtrado y centrifugación, conservándolo en hielo.



Actividad 2: Detección de la actividad oxidasa

Reactivo: Catecol
0.01 M como
sustrato.

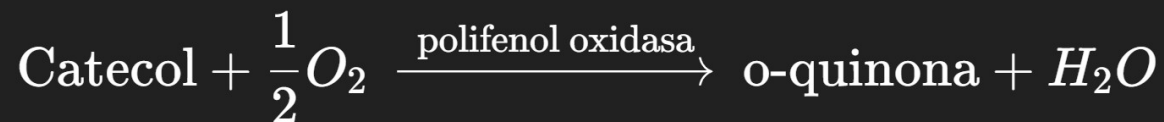


La enzima oxida el catecol a o-quinonas, que se polimerizan generando un color pardo.

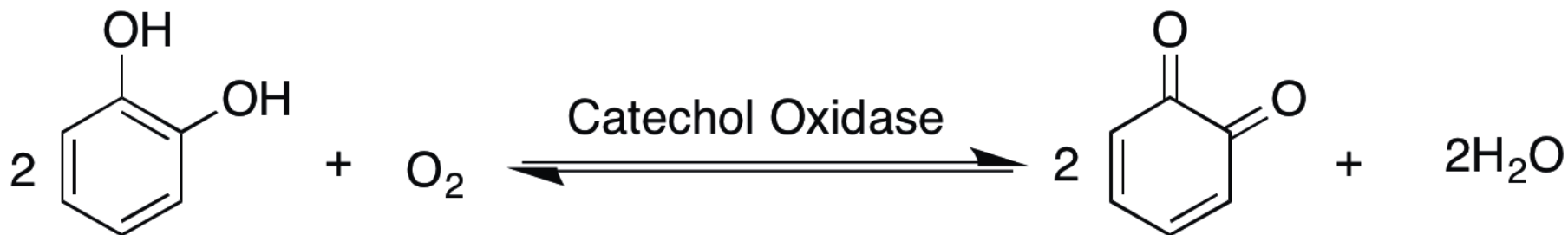
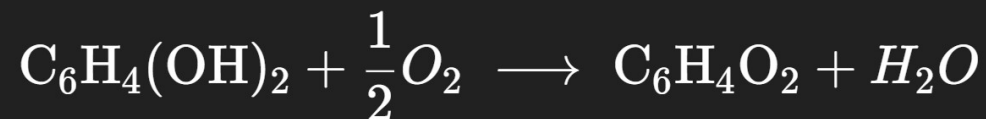


Control negativo: sin sustrato o sin enzima para comparar cambios de color.

La reacción global se puede escribir así:



En fórmula desarrollada sería:



Actividad 3: Naturaleza proteica de la polifenol oxidasa



Proteasa: degrada proteínas, inactivando la enzima si es proteica.



Ácido tricloroacético: precipita proteínas, reduciendo la actividad.



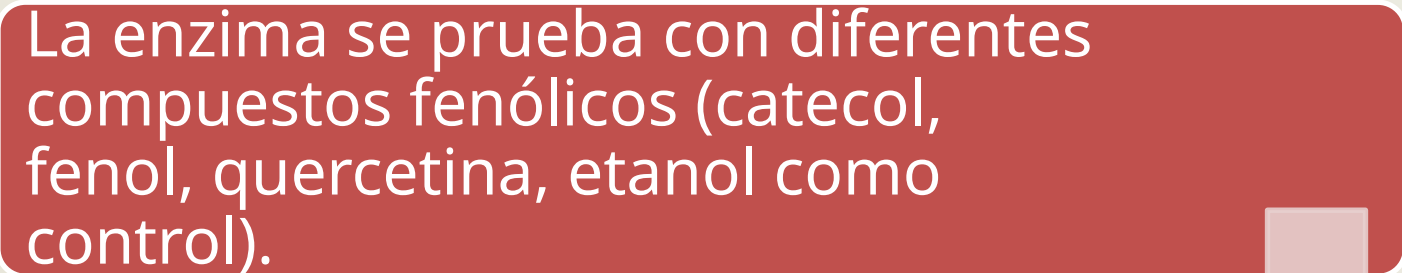
Feniltiourea: se une al cobre presente en el sitio activo, inhibiendo la enzima.



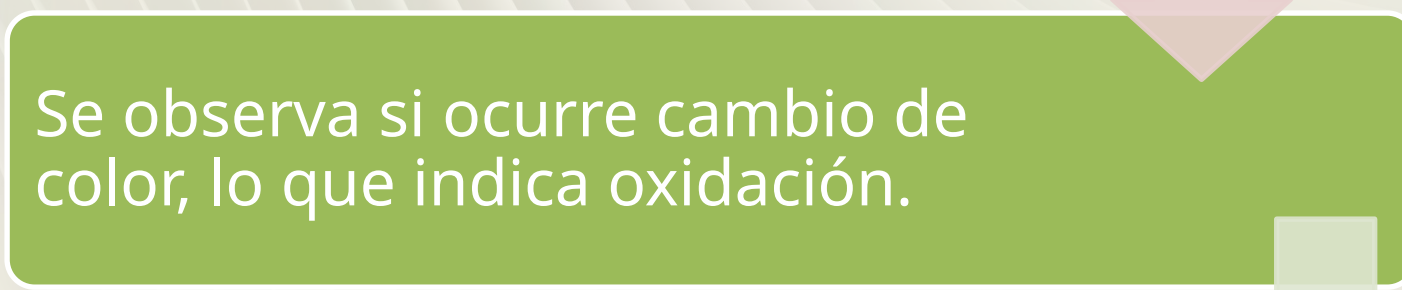
Catecol usado como sustrato para evidenciar actividad residual.

Actividad 4: Especificidad por el sustrato

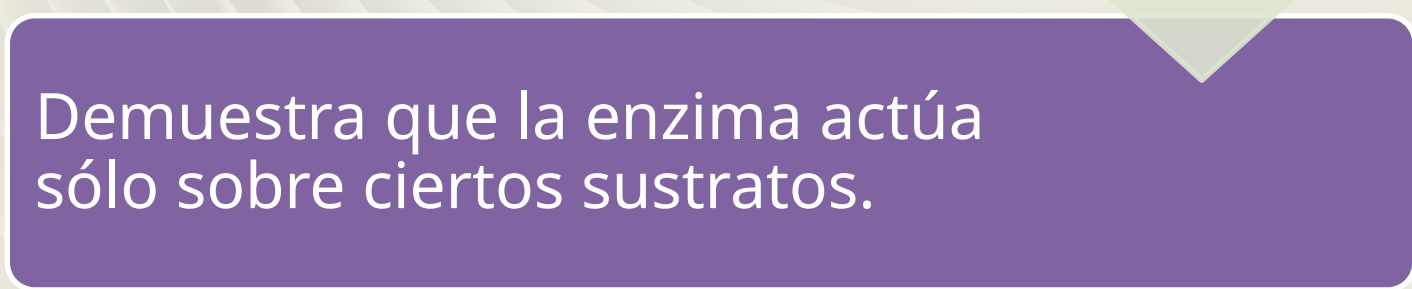
La enzima se prueba con diferentes compuestos fenólicos (catecol, fenol, quercetina, etanol como control).



Se observa si ocurre cambio de color, lo que indica oxidación.



Demuestra que la enzima actúa sólo sobre ciertos sustratos.



Actividad 5: Efecto de desnaturalización



Tratamientos: 0°C, 37°C, 70°C, isopropanol, acetona.



El calor y solventes orgánicos pueden desnaturalizar proteínas, alterando su estructura y función.



Se añade catecol para evaluar actividad después del tratamiento.