

Prácticas 5 y 6: Factores que afectan la velocidad de una reacción catalizada

Carlos Montejo Dávila
Curso de Bioquímica Experimental

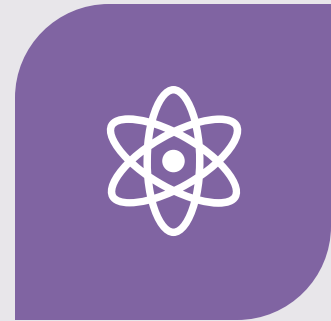
Práctica 5: Objetivos



- RELACIONAR LA TEMPERATURA CON LA VELOCIDAD CATALÍTICA.



- DETERMINAR LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE REACCIÓN.



- CALCULAR ENERGÍA DE ACTIVACIÓN Y PARÁMETROS CINÉTICOS.

Práctica 5: Enzima y reacción clave



- Enzima: Fosfatasa ácida del germinado de trigo.



- Sustrato: para-nitrofenil fosfato (pNPP).



- Reacción: $\text{pNPP} \rightarrow \text{para-nitrofenol (pNP)} + \text{fosfato}$.



- Indicador: pNP (amarillo en medio alcalino).



Práctica 5: Metodología



1. Extracción de fosfatasa del germen de trigo.



2. Preparación de baños a distintas temperaturas (0–100 °C).



3. Preparación de tubos con sustrato + enzima o blanco.



4. Incubación 5 min → detener con NaOH.



5. Medición de absorbancia a 405 nm.

Práctica 5:
Justificación
espectrofotométrica



- El producto pNP absorbe fuertemente a 405 nm.



- La intensidad del color amarillo es proporcional a la actividad enzimática.

Práctica 6: Objetivos



- Evaluar el efecto del pH en la actividad enzimática.



- Determinar el perfil de actividad en función del pH.



Práctica 6: Enzima y reacción clave



- Enzima: Glutamato deshidrogenasa.

- Sustrato: Urea (en kit de ureasa).

- Reacción: reducción/oxidación con consumo de NADH.

- Indicador: disminución de absorbancia del NADH.

Práctica 6:

Metodología

- 1. Preparación de buffers fosfato con distintos pH (5.8–9.0).
- 2. Mezcla de reactivos del kit.
- 3. Ajuste del espectrofotómetro a 340 nm.
- 4. Iniciar reacción con urea.
- 5. Registrar absorbancia cada 10 s por 3 min.



Práctica 6: Justificación espectrofotométrica

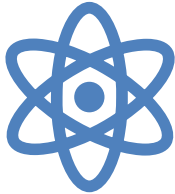


- EL NADH ABSORBE A 340 NM, MIENTRAS QUE EL NAD⁺ NO.



- LA DISMINUCIÓN DE ABSORBANCIA REFLEJA EL AVANCE DE LA REACCIÓN.

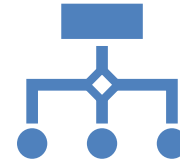
Comparación de prácticas



- Temperatura: afecta la velocidad de colisiones y estabilidad enzimática.



- pH: modifica el estado de ionización de residuos catalíticos.



- Ambos factores determinan condiciones óptimas de catálisis.