

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	FLA-23 v.00
		Página	1 de 1

**LABORATORIO DE BIOQUIMICA MICROBIANA II
PRACTICA N° 1**

1. Título: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2. Objetivos

- Comprobar la presencia de la catalasa en los tejidos animales y vegetales.
- Observar la acción enzimática de la catalasa.
- Evidenciar el efecto del pH y de la temperatura en las actividades enzimáticas.

3. Marco Teórico

Consulta:

1. Que son las enzimas, como están constituidas, cuales son las clases de enzimas (ejemplos).
2. ¿Qué tipo de reacción cataliza la catalasa?
3. ¿Qué importancia microbiológica tiene la prueba de la catalasa?
4. ¿Para qué se emplea?

4. Materiales, Equipos e Insumos

- 10 tubos de ensayo
- 2 gradillas
- 2 pinzas de madera
- 2 vasos de precipitados de 100mL
- 1 vaso de precipitado de 500mL
- 2 pipetas graduadas de 10mL
- 1 probeta de 25mL
- 1 vidrio de reloj grande
- 1 mortero y pistilo
- Soporte, aro, malla y mechero
- 2 serológicos
- Termómetro -10-300°C

5. Reactivos

- Cinta indicador de pH
- Peróxido de Hidrogeno
- Hidróxido de Sodio
- Ácido Clorhídrico
- Agua destilada
- Hígado*
- Corazón de pollo*
- Hongos comestibles*
- Hojas de espinaca*
- Papa*

- Azúcar*
- Sal*
- Hielo*

(*)proporcionado por el estudiante

6. Procedimiento

- Fragmentar en pequeños trozos la muestra
- Macerar la muestra
- Rotular 7 tubos de ensayo y colocar en cada tubo la muestra preparada. Adicione a cada tubo 3mL de Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Anote las observaciones antes y después de la adición del peróxido. (Mantenga un blanco de referencia)

Efecto del pH

Rotular 3 tubos de ensayo y adicionar en cada tubo la muestra preparada. Adicione al primero 1ml de agua, al segundo 1ml de HCl 1 M y al tercero 1ml de NaOH 1 M, tome lectura del pH con el papel indicador y seguidamente adicione 2 ml de peróxido a los tres tubos. Anote las observaciones antes y después de la adición del peróxido. (Realícelo con una muestra vegetal y una animal).

Efecto de la temperatura

Rotular 4 tubos de ensayo y adicionar en cada tubo la muestra preparada. Coloque el primer tubo en un baño de hielo sal, al segundo a temperatura ambiente, al tercero a una temperatura de 50°C y al cuarto a ebullición. Seguidamente adicione 2 ml de peróxido a los cuatro tubos. Anote las observaciones antes y después de la adición del peróxido. (Realícelo con una muestra vegetal y una animal).

RESULTADOS

5. Muestre todos los cálculos que se requieren para preparar cada una de las soluciones anteriores.
6. ¿Cuáles serían las posibles fuentes de error al preparar las anteriores soluciones?

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.

- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.
- (Bata de laboratorio, Guantes, cofia, tapabocas, zapatos cerrado bajo, pantalón largo)

8. Bibliografía

1. Murray et. al. Bioquímica de Harper. McGraw-Hill. Última edición
2. Horton RH, et al., Principles of Biochemistry. 2006. Fourth ed. Pearson/Prentice and Hall.
3. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 2008 Quinta Ed.
4. Buxbaum Engelbert. Fundamentals of Protein Structure and Function. (2007). Springer
5. Science Business Media, LLC.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. (2003). Fifth Ed. Freeman.
7. Mathews, Van Holde, Ahern. Bioquímica. 2002. Pearson Addison Wesley.

9. Anexos

1. Anote los resultados en tablas
2. ¿Qué ocurre al añadir el peróxido en los diferentes ensayos?
3. ¿Por qué se forman las burbujas?
4. ¿Cómo se relaciona la temperatura y la actividad enzimática?
5. ¿Qué sucede con las enzimas cuando se someten a temperaturas extremas (muy fría o muy calientes)?
6. ¿Cómo afecta el pH la actividad enzimática?
7. ¿Qué efecto podría tener una fiebre alta prolongada sobre el funcionamiento de las enzimas?
8. ¿Puede mencionar otras enzimas que actúan en nuestro cuerpo?

LABORATORIO DE BIOQUIMICA MICROBIANA II

PRACTICA N° 2

1. Título: EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE LIPIDOS

2. Objetivos

- Extraer y caracterizar la lecitina y el colesterol de yema de huevo.
- Determinar cualitativamente la presencia de colina, fosfatos y glicerol en un hidrolizado de lecitina.

3. Marco Teórico

Consulta:

1. ¿Qué Son los lípidos?
2. ¿Cuál es la clasificación general?
3. ¿Explique detalladamente las funciones principales de los lípidos?
4. ¿Cuáles es la estructura del colesterol?
5. ¿Cuál es la importancia de esta estructura para la membrana celular?
6. ¿Qué es la lecitina?

4. Materiales, Equipos e Insumos

- 10 tubos de ensayo
- 2 gradillas
- 2 pinzas de madera
- 2 vasos de precipitados de 100mL
- 1 vaso de precipitado de 500mL
- 2 pipetas graduadas de 10mL
- 1 probeta de 25mL
- 1 vidrio de reloj grande
- 1 mortero y pistilo
- 1 Embudo
- Soporte, aro, malla y mechero
- 2 serológicos
- Termómetro -10-300°C

5. Reactivos

- Papel filtro
- Mezcla etanol:éter 2:1
- Mezcla Cloroformo:éter 2:1
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido Molibdico
- Ácido Ascórbico
- Anhidrido acético
- Agua de bromo
- Agua destilada
- Cinta indicador de pH
- Huevo *

(*)proporcionado por el estudiante

6. Procedimiento

- Pesar media yema de huevo cocido.
- Adicionar 20 mL de una mezcla de etanol:éter 2:1. Macere en un mortero, deje en reposo 10 minutos con agitación ocasional.
- Filtrar la solución. El filtrado recogerlo en un vaso de precipitado de 100 mL y el residuo guardarlo para una segunda extracción.
- Evapore el filtrado en baño de María usando una manta de calentamiento.
- Pesar los lípidos totales.
- Posteriormente, disolver los lípidos totales en 5 mL de éter, adicionar a esta solución 15 mL de acetona. El precipitado obtenido es el contenido de lecitina en la yema. Aglomere el precipitado de Lecitina. Decante y filtre de nuevo.
- Pese el precipitado de Lecitina y el sobrenadante (Triglicéridos + colesterol), evapore, pesar y guardar para el análisis de colesterol.

A. IDENTIFICACIÓN DE COLESTEROL

Reactivo de Liberman Burchard

Tome 2 mL del sobrenadante del paso 1 en un tubo de ensayo y añada 10 gotas de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, la aparición de una coloración verde es indicadora de la presencia de colesterol.

Reacción de Salkowski

Mida 1 mL del sobrenadante del paso 1 en un tubo de ensayo, incline el tubo y deslice por su pared interna un volumen igual de ácido sulfúrico concentrado, cuidando que los líquidos no se mezclen. Observe la formación de un anillo coloreado en la interfase.

****Después de pesado el precipitado de lecitina, disuélvalo nuevamente con 10 mL de una mezcla de etanol-éter 2:1 y realice las siguientes pruebas:***

Identificación de fosfatos

Tome 1 mL del filtrado y adicione 1 mL de ácido molibdíco, agite, deje 3 minutos en reposo. Adicione 1 mL de solución de ácido ascórbico observe la formación de un color azul.

Detección de colina

Tome 1 mL de filtrado y caliente suavemente en un mechero o en un baño de agua hirviendo. La trimetilamina liberada se caracteriza por un olor a pescado.

Identificación de glicerol

Tome 2 mL de filtrado + 2 mL de agua de bromo. Calentar en vitrina para expulsar el exceso de bromo. Tomar 0,4 mL de esta solución + 0,1 mL de solución de naftol al 5% en etanol, agitar. Adicionar 40 gotas de ácido sulfúrico. Calentar 2 minutos en baño maría, enfriar. Observar la aparición de coloración verde.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.
- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.
- (Bata de laboratorio, Guantes, cofia, tapabocas, zapatos cerrado bajo, pantalón largo)

8. Bibliografía

1. Murray et. al. Bioquímica de Harper. McGraw-Hill. Última edición
2. Horton RH, et al., Principles of Biochemistry. 2006. Fourth ed. Pearson/Prentice and Hall.
3. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 2008 Quinta Ed.
4. Buxbaum Engelbert. Fundamentals of Protein Structure and Function. (2007). Springer
5. Science Business Media, LLC.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. (2003). Fifth Ed. Freeman.
7. Mathews, Van Holde, Ahern. Bioquímica. 2002. Pearson Addison Wesly.

9. Anexos

1. ¿Es saponificable el colesterol? Argumente su respuesta
2. ¿Cuáles son las funciones del colesterol en los humanos?
3. ¿En qué órgano y a partir de que compuestos se sintetiza el colesterol en los humanos?

LABORATORIO DE BIOQUIMICA MICROBIANA II PRACTICA N° 3

1. Título: PRODUCCIÓN DE PIRUVATO DURANTE LA FERMENTACIÓN

2. Objetivo

- Determinar la presencia de piruvato mediante la fermentación de levadura.
- Observar la producción de piruvato, mediante cambios de color.

3. Marco Teórico

La producción de piruvato durante la fermentación se realiza por una serie de reacciones enzimáticas que involucran algunos intermediarios. Este proceso se conoce como fermentación o glucólisis.

La reacción total podría considerarse como la transferencia de dos pares de átomos de hidrógeno de la glucosa al NAD^+ . Los metabolitos de piruvato y acetaldehído se encuentran normalmente en bajas concentraciones, por lo tanto para comprobar su existencia es necesario impedir su transformación.

La piruvato descarboxilasa no es activa en soluciones ligeramente alcalinas, de manera que el piruvato se acumula y su presencia se demuestra con la 2,4- dinitrofenilhidracina.

4. Materiales, Equipos e Insumos

- 10 tubos de ensayo
- 2 gradillas
- 2 pinzas de madera
- Balanza
- 2 vasos de precipitados de 100mL
- 1 vaso de precipitado de 500mL
- 2 pipetas graduadas de 10mL
- 1 probeta de 25mL
- Soporte, aro, malla y mechero
- Serológico
- Termómetro -10-300°C

5. Reactivos

- Solución de glucosa 10%
- Levadura*
- Fosfato de sodio dibásico 0,5 M
- Fosfato de potasio monobásico 0,5 M
- Ácido tricloroacético 10%
- 2,4-dinitrofenilhidracina saturado en HCl 2M
- NaOH 10%

***(*)proporcionado por el estudiante**

6. Procedimiento

- En dos tubos de ensayo A y B añada respectivamente 2.5 ml de solución de glucosa al 10%. Al tubo A agregue 2.5ml de suspensión de levadura al 10% P/V en solución de fosfato de sodio dibásico 0,5 M; al tubo B agregue 2.5ml de suspensión de levadura al 10% P/V en solución de fosfato de potasio monobásico 0,5M.
- Coloque en baño de maría a 37°C durante 1 hora, luego agregue a cada tubo 2 ml de A.T.A al 10%P/V, mezcle vigorosamente y centrifugue durante 10 minutos a 2500 rpm.
- A 1 ml del sobrenadante agregue 0.5ml de solución saturada de 2,4-dinitrofenilhidracina en HCl 2M. Mezcle fuertemente, tome 0,5 ml de esta mezcla y agregue 1 ml de NaOH al 10% y 0,5 ml de agua.
- La formación de un color rojo indica la presencia de piruvato.
- Repita esta prueba usando una solución de glucosa en vez del sobrenadante.

7. Nivel de Riesgo

Medio. No olvidar que la eficiencia y buenos resultados en la práctica de laboratorio, además de la seguridad del personal que ejecuta la práctica dependen del cumplimiento de ciertas normas, que aunque en su mayoría se derivan del sentido común, es necesario hacer nota para tenerlas presentes.

- No dejar botellas abiertas y sin marcar, limpiar cualquier derrame, disponer de los desechos químicos en las líneas de desecho apropiadas.
- Dejar el sitio de trabajo completamente limpio y ordenado, arrojando los desechos en los sitios designados para ello.
- (Bata de laboratorio, Guantes, cofia, tapabocas, zapatos cerrado bajo, pantalón largo)

8. Bibliografía

1. Murray et. al. Bioquímica de Harper. McGraw-Hill. Última edición
2. Horton RH, et al., Principles of Biochemistry. 2006. Fourth ed. Pearson/Prentice and Hall.
3. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 2008 Quinta Ed.
4. Buxbaum Engelbert. Fundamentals of Protein Structure and Function. (2007). Springer
5. Science Business Media, LLC.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. (2003). Fifth Ed. Freeman.
7. Mathews, Van Holde, Ahern. Bioquímica. 2002. Pearson Addison Wesley.

9. Anexos

1. ¿Cuál es la función del ácido tricloroacético?
2. ¿Qué conclusiones se podrían sacar de los resultados de las muestras A yB?
3. ¿Cuál es la reacción de la 2,4- dinitrofenilhidracina con el piruvato?
4. ¿Qué función cumple el NAD+ en la producción del piruvato.
5. Consulte la vía de la glucólisis y determine los pasos irreversibles de esta vía.