

31. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería

Manuel Tena Aldave, Jesús V. Jorrín Novo

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

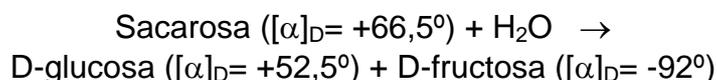
En la presente práctica se llevará a cabo la extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería, utilizando como material de partida un preparado liofilizado de levadura comercializado por la casa Sigma. La velocidad de reacción se determinará analizando la cantidad de azúcares reductores formados (D-glucosa + D-fructosa, expresadas como equivalentes de glucosa) producida por unidad de tiempo y la actividad enzimática se expresará como actividad específica (p.e. $\mu\text{kat mg}^{-1}$ de proteína). A tal fin, la cantidad de azúcares reductores se determinará colorimétricamente por el método del ácido dinitrosalicílico, y la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático se analizará por el método de Bradford. Eventualmente se considerará un protocolo de purificación parcial de la actividad extraída, mediante precipitación con sulfato amónico.

Palabras clave: azúcar invertido, β -D-fructofuranosidasa; *Saccharomyces cerevisiae*.

Abreviaturas empleadas: BSA, seroalbúmina bovina; DNS, ácido 3,5-dinitrosalicílico.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La invertasa (β -D-fructofuranosidasa, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, EC 3.2.1.26), cataliza la hidrólisis de restos terminales no reductores β -D-fructofuranosídicos de fructofuranósidos. Entre los sustratos sobre los que actúa el más significado es, sin duda, la sacarosa, de ahí que el enzima se designe con el nombre de sacarasa. La denominación trivial de invertasa, con la que también se conoce, hace referencia al hecho de que los productos de la reacción son conocidos desde antiguo como “azúcar invertido” ya que mientras la sacarosa es dextrorrotatoria, la mezcla equimolecular de glucosa y fructosa que resulta de su hidrólisis es levorrotatoria, por lo que en el proceso se origina un cambio de signo (de positivo a negativo) del valor de rotación óptica.

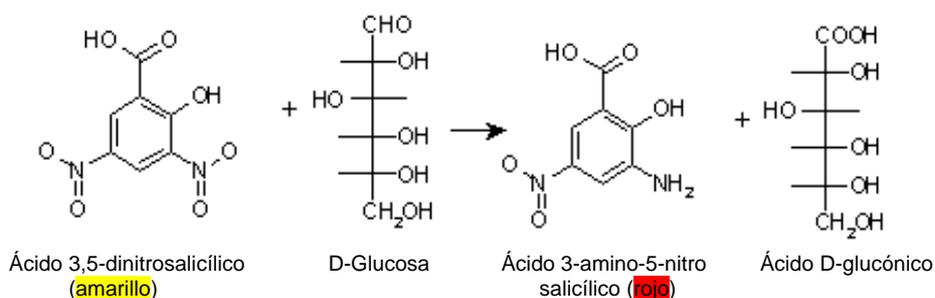


La invertasa es un enzima ampliamente distribuido, estando presente tanto en microorganismos como en animales y vegetales, jugando un papel

importante en el catabolismo de fructanos y más específicamente en el de la sacarosa, en especial en aquellos organismos en los que dichos azúcares son utilizados como fuente de carbono y energía.

El estudio de la actividad invertasa presenta un gran interés tanto desde un punto de vista académico como de investigación aplicada, siendo uno de los enzimas más conocidos. A modo de ejemplo podemos referir que la invertasa fue el primer enzima cuya cinética se estudió en profundidad (estudios clásicos de Michaelis-Menten) y que fue utilizado industrialmente.

Para la determinación de la actividad invertasa se utilizará un ensayo indirecto en el que los productos de reacción serán detectados espectrofotométricamente tras su conversión en derivados coloreados. En concreto, la extensión de la hidrólisis enzimática de sacarosa (azúcar no reductor) en glucosa más fructosa (azúcares reductores) se valorará mediante uno de los diversos métodos existentes para la estimación de azúcares reductores. Nos referimos exactamente al método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.



En la presente Práctica aplicaremos el método DNS a una gama de soluciones patrón de glucosa, al objeto de obtener la correspondiente curva de calibrado que, posteriormente, se utilizará bien directamente, o mediante el coeficiente de extinción deducido de la misma, para determinar los equivalentes de glucosa formados en el medio de reacción de la invertasa y, a partir de ellos, la actividad enzimática. Además, para el análisis de proteínas de los extractos de invertasa, al objeto de determinar la actividad específica de éstos, se obtendrá asimismo una curva de calibrado de BSA mediante la aplicación del método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Los objetivos de la Práctica son los siguientes:

Construcción de una curva de calibrado y cálculo del coeficiente de extinción molar para la determinación de azúcares reductores (glucosa) por el método del DNS.

Construcción de una curva de calibrado y cálculo del coeficiente de extinción molar para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Preparación de un extracto de levadura de panadería a partir de un preparado liofilizado.

Ensayo de la actividad invertasa y determinación del contenido en proteína del extracto crudo de levadura de panadería.

Purificación de la actividad invertasa ácida extraída por precipitación selectiva con sulfato amónico Evaluación de la purificación: cálculo del rendimiento y del grado de purificación de las fracciones

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. De uso general

Agitador magnético
Balanza (sensibilidad de 1 mg)
Baños termostáticos (5)
Bloque seco o baño de agua hirviendo
Centrífuga preparativa
Espectrofotómetro/Colorímetro
Homogeneizador
pH metro

Acetato sódico
Ácido acético
Amonio sulfato (sólido)
Columna de Sephadex G-25 para desalado (Columna PD-10)
D-Glucosa
Nescofilm
Preparado liofilizado de invertasa de levadura
Reactivo de Bradford
Reactivo de DNS
 Ácido 2,3-dinitrosalicílico
 Tartrato sódico potásico
 Hidróxido sódico
Sacarosa
Seroalbúmina bovina

2.2. De uso específico por grupo

Botes de plástico para muestras biológicas
Cubetas de plástico para el espectrofotómetro (6)
Frasco lavador para agua desionizada
Gradilla con tubos de ensayo de 15x1,5 cm
Gradilla con tubos de ensayo de tapón de rosca 9,5x1 cm
Guantes de látex
Juego de pipetas automáticas (0,01; 0,1 y 1,0 ml)
Juego de pipetas de vidrio (0,1; 0,5; 1,0 y 5,0 ml)
Papel de filtro
Pipetas Pasteur de plástico
Probetas de 10, 100 y 250 ml

Rotulador de vidrio
 Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 ml
 Tijeras

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Curva de calibrado de glucosa utilizando el método del DNS

A partir de una solución stock de glucosa 40 mM y por dilución con agua destilada, preparar una gama de soluciones del azúcar de distinta concentración, tal y como se indica en la Tabla 1. Hacer las diluciones en tubos de ensayo. Una vez hechas las mezclas, agitar bien para homogeneizar la solución.

Tabla 1. Preparación de una gama de soluciones de glucosa de diferente concentración a partir de una solución stock 40 mM.

Tubo	Concentración (mM)	Agua destilada (ml)	Glucosa 40 mM (ml)
0	0	5,0	0,0
1	2	4,75	0,25
2	4	4,5	0,5
3	6	4,25	0,75
4	8	4,0	1,0
5	10	3,75	1,25
6	20	2,5	2,5
7	40	0,0	5,0

De cada tubo se toman 0,1 ml y se transfieren a un tubo de vidrio con tapón de rosca. Añadir 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente la mezcla en el bloque seco a 100 °C durante 10 minutos; enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm, utilizando como blanco la mezcla del tubo 0. En el caso de que la absorbancia de alguna muestra resultase excesiva, diluir convenientemente con agua destilada, mientras que si fuera demasiado pequeña, repetir el ensayo pero con una mayor cantidad de solución de glucosa (p. ej. 0,2 ó 0,3 ml). Para mayor fiabilidad de los resultados, trabajar por duplicado.

3.2. Curva de calibrado de BSA mediante el método de Bradford

A partir de una solución de BSA 20 µg ml⁻¹ en agua destilada y por dilución en agua, preparar una gama de soluciones de diferente concentración de BSA, según se indica en la Tabla 2. Hacer las diluciones en tubos de ensayo.

Tabla 2. Preparación de una gama de soluciones de BSA de diferente concentración a partir de una solución stock de 20 µg ml⁻¹.

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7
Agua (ml)	2,0	3,6	3,2	2,8	2,4	2,0	1,0	0,0
BSA (20 µg ml ⁻¹) (ml)	0,0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	3,0	2,0
Concentración (µg ml ⁻¹) de las soluciones patrón de BSA obtenidas	0	2	4	6	8	10	15	20

A 0,5 ml de la solución de BSA de diferentes concentraciones, preparadas según se ha indicado en la Tabla 2, añadir 0,5 ml del reactivo de Bradford (hacer la mezcla en la misma cubeta de medida del espectrofotómetro). Agitar la mezcla (por inversión de la cubeta, una vez se ha tapado con nescofilm) y transcurridos unos 10 minutos determinar la absorbancia a 595 nm frente al blanco (tubo 0).

3.3. Obtención de un extracto crudo de invertasa de levadura de panadería

Suspender 1 g de preparado liofilizado de levadura en 200 ml de tampón de extracción (tampón acetato 0,1 M, pH 5,0, en NaCl 0,5 M). Agitar la mezcla durante 15 min (puede ayudarse la extracción mediante sonicación de la suspensión u homogeneización de la misma), centrifugar y tomar el sobrenadante como extracto enzimático. El extracto enzimático, cuando no se esté utilizando, se guardará en frío (frigorífico).

3.4. Ensayo de la actividad invertasa del extracto crudo

Preparar en tubos de ensayo las mezclas de reacción (4 en total, 1 blanco de sustrato, 1 blanco de enzima y 2 problemas) que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de ensayo estándar para la determinación de la actividad invertasa.

Componentes	Blanco		Problema (x2)
	De sustrato	De enzima	
Sacarosa 0,2 M (ml)	0,0	1,0	1,0
Tampón acetato 0,1 M, pH 5,0 (ml)	2,0	2,0	2,0
Agua destilada (ml)	2,0	1,1	1,0
Extracto enzimático (µl)	100,0	0,0	100,0

Los tubos con los blancos y problemas se incubarán a 55 °C durante 15 minutos, para que la actividad invertasa presente en el extracto hidrolice la sacarosa. Pasado el periodo de incubación, detener la reacción sumergiendo los tubos en un baño de hielo picado. Tomar 0,1 ml de cada tubo y pasarlos a tubos de ensayo con tapón de rosca, analizándose el contenido de azúcares reductores por el método DNS (ver apartado 3.1). A partir de los valores de absorbancia de los ensayos problema, descontados el valor de los blancos, determinar la actividad invertasa del extracto. En el caso de que la absorbancia fuera muy pequeña, repetir el ensayo DNS con una mayor cantidad de muestra de incubación (por ejemplo 0,2 ó 0,3 ml). En el caso de que la absorbancia sea excesiva, repetir la experiencia diluyendo el extracto enzimático convenientemente (dilución 1:2 ó 1:3, etc.).

3.5. Precipitación con sulfato amónico

Dos alícuotas de 20 ml de extracto crudo se llevarán, respectivamente, al 40% y 80% de saturación con sulfato amónico. La sal se añadirá en forma finamente pulverizada y con agitación para favorecer su disolución. Una vez que se haya disuelto la sal, dejar en reposo y en frío durante 45 min. Pasado

este tiempo, separar por centrifugación el precipitado obtenido del sobrenadante, anotando el volumen de éste. Los pellas P₁ (40% saturación) y P₂ (80% saturación) se redisolverán en un volumen determinado (entre 5 y 10 ml) de tampón acetato 0,1 M (pH 5,0). Una vez completada la redisolución, medir los volúmenes obtenidos.

3.6. Desalado de las fracciones proteicas y análisis de las mismas

Alícuotas de 2,5 ml de cada una de las cuatro fracciones proteicas obtenidas de la precipitación con sulfato amónico (soluciones de P₁ y P₂, y los sobrenadantes de tales precipitaciones, respectivamente S₁ y S₂) se desalarán mediante cromatografía en columna de Sephadex G-25 (columna PD-10), que se realizará de acuerdo con las instrucciones siguientes:

1. Retirar la tapa superior de la columna y verter el exceso de líquido
2. Retirar el tapón inferior
3. Pasar por la columna 25 ml de tampón acetato 0,1 M (pH 4,5) para equilibrarla
4. Aplicar a la columna 2,5 ml de la muestra a desalar, e incorporar este volumen a la columna, desechando el eluyente
5. Una vez incorporada la muestra en la columna, eluir con 3,5 ml de tampón, recogiendo ese volumen de eluyente
6. Lavar la columna con 25 ml de tampón de elución
7. Añadir 2 ml de tampón y tapar los extremos superior e inferior de la columna

Las muestras ya desaladas se analizarán para actividad invertasa y contenido de proteína. Con estos valores se construirá una tabla de purificación, tal como se indica en la Tabla 2.

Tabla 4. Purificación de la actividad invertasa de levadura.

Fracción	V _t (ml)	Actividad (nkat)	Proteína (mg)	Rendimiento (%)	Actividad específica (nkat/mg)	Purificación
Extracto crudo	V ₁	A ₁	P ₁	100	A ₁ / P ₁	1'0
P ₁	V ₂	A ₂	P ₂	100(A ₂ / A ₁)	A ₂ / P ₂	[A ₂ / P ₂]:[A ₁ / P ₁]
P ₂	V ₃	A ₃	P ₃	100(A ₃ / A ₁)	A ₃ / P ₃	[A ₃ / P ₃]:[A ₁ / P ₁]
S ₁	V ₄	A ₄	P ₄	100(A ₄ / A ₁)	A ₄ / P ₄	[A ₄ / P ₄]:[A ₁ / P ₁]
S ₂	V ₅	A ₅	P ₅	100(A ₅ / A ₁)	A ₅ / P ₅	[A ₅ / P ₅]:[A ₁ / P ₁]

4. RESULTADOS ESPERADOS

Las Figuras 1 y 2 muestran resultados representativos correspondientes a las curvas de calibrado de azúcares reductores y proteína, respectivamente.

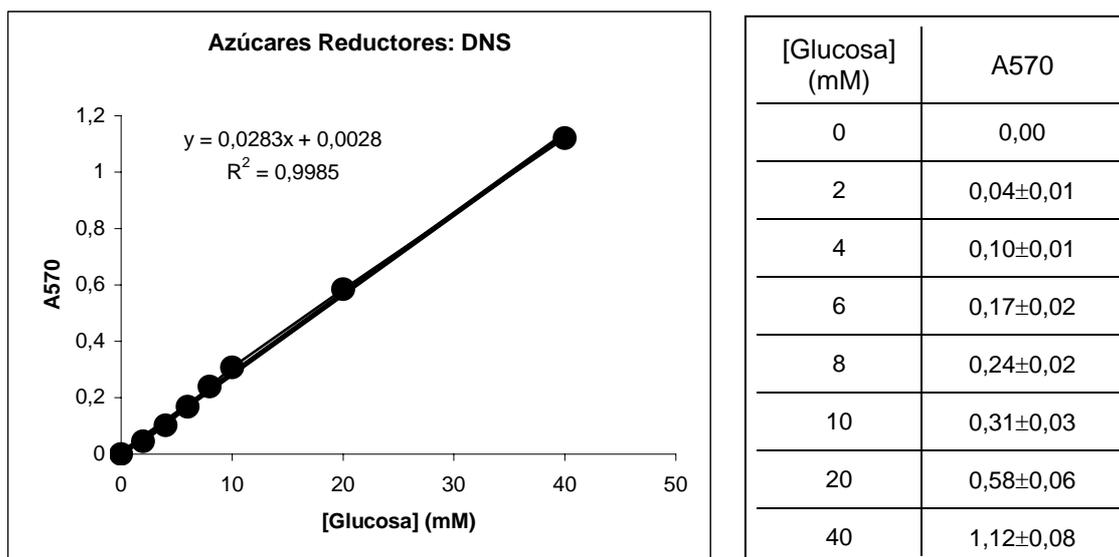


Figura 1. Curva patrón para el análisis de glucosa por el método de DNS. Muestras (0,1 ml) conteniendo las concentraciones de glucosa indicadas en la Tabla inserta recibieron 1 ml de reactivo de DNS y, tras calentamiento a 100 °C durante 10 min, se analizaron espectrofotométricamente a 570 nm. Los valores representados son medias \pm DE de muestras por duplicado de seis experiencias independientes.

De la Figura 1 puede concluirse que se cumple la ley de Lambert-Beer en todo el rango (0-40 mM) de concentraciones de glucosa ensayado, pudiéndose deducir un coeficiente de extinción molar (ϵ_m) de $0,0283 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

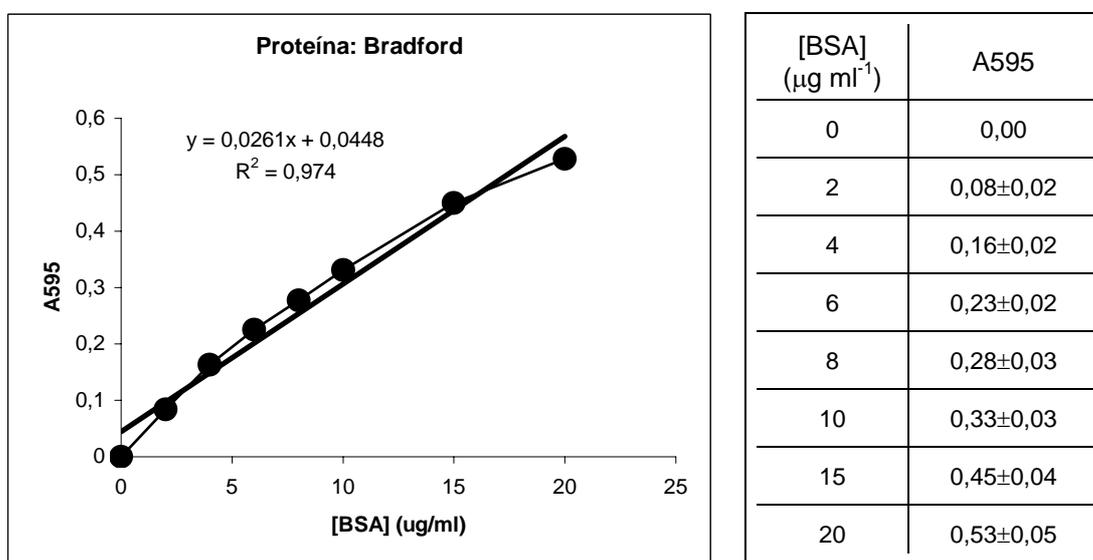


Figura 2. Curva patrón para el análisis de proteína por el método de Bradford. Muestras (0,5 ml) conteniendo las concentraciones de BSA indicadas en la Tabla inserta recibieron 0,5 ml de reactivo de Bradford y, tras mezcla y reposo durante 10 min, se analizaron espectrofotométricamente a 595 nm. Los valores representados son medias \pm DE de muestras por duplicado de nueve experiencias independientes.

De la Figura 2 puede concluirse que, de forma menos satisfactoria que en el caso anterior, se cumple la ley de Lambert-Beer en todo el rango (0-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) de concentraciones de BSA ensayado, pudiéndose deducir un coeficiente de extinción específico (ϵ_s) de $0,0261 \mu\text{g}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

Para el extracto crudo, el ensayo de actividad correspondiente a un experimento tipo originó lecturas de A570 de $0,81 \pm 0,08$ (frente al blanco de sustrato) y de $0,77 \pm 0,04$ (frente al blanco de enzima). Usando la media de ambos valores, la actividad del extracto puede cifrarse en $11267,4 \text{ nkat ml}^{-1}$. Para la determinación de proteína, $25 \mu\text{l}$ del extracto crudo anterior, tras su dilución a $0,5 \text{ ml}$ con agua desionizada, produjo en el ensayo de Bradford una lectura de A595 de $0,35 \pm 0,02$. De los datos anteriores se deduce una actividad específica del extracto de $5,42 \text{ kat Kg}^{-1}$ proteína.

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

La práctica tiene como finalidad la estimación de la actividad invertasa total y específica del extracto de levadura, expresándose tales valores de actividad en unidades apropiadas. En segundo lugar, pretende explorar la utilidad de la precipitación fraccionada con sulfato amónico como método de purificación preliminar de la invertasa extraída y sugerir, a partir de los resultados de fraccionamiento obtenidos (Tabla 4), posibles mejoras en el protocolo de fraccionamiento.

Como aspectos teóricos a ser desarrollados por los alumnos, como complemento de la práctica, se podrían apuntar los siguientes:

1. Poder reductor de los azúcares: Consideración de las características estructurales de los azúcares reductores y no reductores, ilustrando con ejemplos concretos de azúcares de uno y otro tipo.
2. Pruebas de azúcares reductores: considerar el fundamento de al menos dos adicionales a la del DNS utilizada en la práctica.
3. Fraccionamiento de proteínas por precipitación de proteínas con sulfato amónico: fundamento de la técnica.
4. Filtración molecular: descripción de la técnica y de sus posibles aplicaciones. Métodos alternativos de desalado a la filtración molecular.
5. Diferencias entre ensayos enzimáticos directos, indirectos y acoplados.

Como aspectos prácticos complementarios, a considerar como puntos de estudio adicionales en el desarrollo de la práctica, se podrían indicar los siguientes:

1. Espectro de absorción en el visible de los productos de reacción de la glucosa con el reactivo DNS. Discusión de a qué longitudes de onda podría realizarse el ensayo DNS de azúcares reductores y si la utilizada en la práctica (570 nm) parece apropiada y por qué.
2. Como aditivos opcionales al reactivo DNS suelen emplearse sulfito sódico ($0,5 \text{ g l}^{-1}$) y fenol (hasta 2 g l^{-1}). El primero elimina el oxígeno disuelto, que se ha descrito que puede interferir con la oxidación de la glucosa por el DNS. El segundo se ha indicado que intensifica la intensidad del color desarrollado, incrementando la sensibilidad del método. En consecuencia, se podría comparar el reactivo DNS estándar con DNS+Sulfito o DNS+Fenol, en el primer caso frente a soluciones de glucosa aireadas y en el segundo caso frente a

soluciones diluidas, discutiéndose las posibles ventajas de los reactivos de DNS con las adiciones indicadas.

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chaplin MF (1986) Monosaccharides. En Chaplin MF, Kennedy JF (eds.): "Carbohydrate Analysis: A Practical Approach". IRL Press (Oxford, England) pp. 1-36. Descripción muy simple pero bastante completa de los principales métodos de análisis de monosacáridos.

ANEXO 1: SOLUCIONES EMPLEADAS

Reactivo de Bradford. Se utilizará un preparado comercial Sigma (Ref. B-6916).

Reactivo de DNS. Acido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; PM 228,1) al 0,1 % (p/v), tartrato sódico potásico [$NaK(COO)_2(CHOH)_2 \cdot 4H_2O$; PM 282,23] al 30 % (p/v) en NaOH (PM 40) 0,4 M. Disolver 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 300 g de tartrato sódico potásico en 200 ml de hidróxido sódico 2 M (16 g de NaOH en 200 ml de agua destilada) y diluir hasta 1000 ml con agua destilada. El reactivo debe guardarse en bote oscuro (color topacio), siendo estable durante varias semanas.

Solución de glucosa ($C_6H_{12}O_6$, PM 180) 40 mM en agua destilada. Disolver 1,8 g de glucosa en 250 ml de agua destilada. La solución, cuando no se esté utilizando, se guardará en frío (frigorífico).

Solución de BSA $20 \mu g ml^{-1}$. Disolver 10 mg en 500 ml de agua destilada y agitar la mezcla hasta que se haya disuelto toda la proteína.

Solución de sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$; PM 342,3) 0,2 M en agua destilada ($68,5 g l^{-1}$). La solución de sacarosa, cuando no se esté utilizando, se guardará en frío (frigorífico).

Tampón acetato 0,1 M, pH 5,0 (148 ml de A y 352 ml de B se diluyen a un volumen de 1000 ml). A: Solución de ácido acético 0,2 M (11,55 ml en 1000 ml). B: Solución de acetato sódico 0,2 M (16,4 de sal anhidra ó 27,2 g de sal trihidratada en 1000 ml). La solución del tampón, cuando no se esté utilizando, se guardará en frío (frigorífico).

Tampón acetato 0,1 M, pH 5,0; en NaCl 0,5 M. Mezclar 148 ml de A y 352 ml de B, añadir 29,2 g de NaCl (PM 58,44) y diluir a un volumen de 1000 ml. Las soluciones A y B son las descritas precedentemente. La solución del tampón, cuando no se esté utilizando, se guardará en frío (frigorífico).

ANEXO 2: Gramos de sulfato amónico a añadir a 1 l de solución a 0 °C

% Saturación	Molaridad Inicial	Molaridad Final										
		0,0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	3,9
0,0	0,0	0,0	54,0	111	170	234	302	375	453	539	632	707
10,3	0,4		0,0	55,4	114	176	243	314	391	475	566	639
20,5	0,8			0,0	57,1	118	183	252	328	409	499	570
30,8	1,2				0,0	59,1	122	190	264	343	430	499
41,1	1,6					0,0	61,4	127	199	276	360	428
51,3	2,0						0,0	63,9	133	208	290	355
61,6	2,4							0,0	66,7	139	218	381
71,9	2,8								0,0	69,8	146	207
82,2	3,2									0,0	73,2	132
92,4	3,6										0,0	56,1
100,0	3,9											0,0