

XIV EDICIÓN DA OLIMPIADA ESPAÑOLA DE BIOLOXÍA-FASE GALEGA

DNI.....

(Bioquímica)

La β -galactosidasa es una enzima que media en la transformación de la pared celular de los frutos, durante la maduración. *In vivo*, sus substratos son diferentes tipos de galactanos, pero para su medida *in vitro* se suelen usar substratos artificiales. Uno de ellos es el *p*-nitrofenil- β -galactopiranosido. Cuando la β -galactosidasa actúa sobre este sustrato libera *p*-nitrofenol que se cuantifica mediante una reacción de color que se mide a 415 nm.

Se pretende medir la actividad β -galactosidasa de un fruto en maduración, para lo cual previamente, se ha realizado una recta de calibrado que ha generado los siguientes puntos:

nmoles de <i>p</i> -nitrofenol	Absorbancia a 415 nm
50	0.1
100	0.2
150	0.3
200	0.4

DATOS PARA
FACER A RECTA
DE CALIBRADO

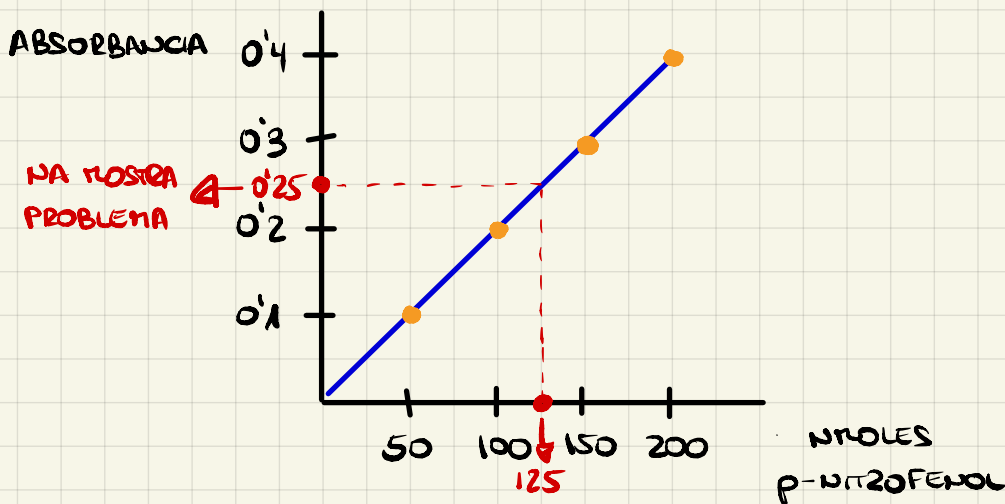
A continuación, 10 gramos de fruto se extraen con un tampón de extracción pH 4.6 obteniendo un volumen final de 12 ml. Para la medida de la actividad, 1 ml de la muestra se incubó con *p*-nitrofenil- β -galactopiranosido durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se midió la absorbancia a 415 nm, obteniéndose un valor de 0.25.

1. Elabora una recta de calibrado y calcula la cantidad de *p*-nitrofenol formada.
2. Calcula la cantidad de *p*-nitrofenol liberado por mililitro de muestra y por unidad de tiempo.
3. Calcula la actividad β -galactosidasa de la muestra, expresándola en **nkatal/gramo de peso**, sabiendo que el nkatal es la cantidad de enzima que produce un nmol de producto por segundo.

APARTADO	RESPUESTA
1	125 nmoles / mL = 0'125 μ moles / mL
2	8'3 μ moles / mL / s
3	0'167 nKATALES / g

→ VER EXPLICACIÓN NAS SEGUENTES FOLIAS.

1 RECTA DE CALBRADO → CORRESPONDENCIA
(COS DATOS DA TÁBOA) CANTIDADE DE
NITROFENOL E
ABSORBANCIA



CANTIDADE DE p-NITROFENOL NA NOSTRA PROBLEMA

$$= 125 \text{ nmoles / mL} = 0.125 \text{ } \mu\text{moles / mL} \text{ (*)}$$



NUNHA INCUBACION DE 15 min = 900 s

2

UNIDADE DE ACTIVIDADE ENCIÁTICA (U)

→ $\mu\text{moles / mL / min}$

$$\text{ACTIVIDADE} = 0.125 \text{ } \mu\text{moles / mL} : 15 \text{ min} =$$

$$\text{p-GALACTOSIDASE} = 0.0083 \text{ } \mu\text{moles / mL / min} =$$

$$= 8.3 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{moles / mL / min}$$

$1 \text{ nmol} = 10^{-9} \text{ moles}$
 $1 \text{ } \mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ moles}$

3

ACTIVIDADE β -GALACTOSIDASE EN μ KATALES /g

10 g PROTO

12 mL

 μ MOLES /s

$$125 \mu\text{MOLES /mL} \times 12 \text{ mL} = 1500 \mu\text{MOLES}$$

p-NITROFENOL

↓

EN 15 min
(= 900 s)

$$1500 \mu\text{MOLES} : 900 \text{ s} = 1'67 \mu\text{MOLES /s}$$

↓

EN 10 g DE PROTO

$$1'67 \mu\text{MOLES /s} : 10 \text{ g} = 0'167 \underbrace{\mu\text{MOLES /s/g}}_{\mu\text{KATALES /g}}$$

