

## L'activitat de la catalasa als llevats

### Objectius

- Comprovar l'acció de la catalasa del llevat sobre l'aigua oxigenada.
- Diferenciar enzim i substrat en una reacció enzimàtica.
- Estudiar la influència d'algun factor en l'acció de la catalasa sobre el peròxid d'hidrogen

### Introducció

Durant la respiració cel·lular, les cèl·lules oxiden la matèria orgànica per obtenir energia. Un dels metabòlits que es formen és peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un agent oxidant molt potent que pot afectar a moltes molècules i ocasionar la mort cel·lular. La catalasa és l'enzim encarregat de desactivar la molècula de peròxid i descompondre-la en aigua i oxigen. Aquest enzim es troba en els teixits dels éssers vius (per exemple, patata, fetge o microorganismes com els llevats).



Es proposa l'estudi del despreniment d'oxigen a partir d'una solució d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en presència de llevats, mitjançant la mesura de l'increment de pressió dins del recipient on es produeix la reacció, amb sensors de pressió i el programa Multilab, que permet una mesura contínua dels valors que pren la variable al llarg del temps.

### Plantejament de la hipòtesi

A partir de la lectura de la introducció i del següent llistat de material disponible per a l'experiència, després de l'observació del muntatge que us proposem, caldria plantejar la hipòtesi de treball que s'haurà de contrastar en discutir les conclusions.

### Material i Equipament

<b>Elements de l'equip Multilog</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– 3 sensors de pressió</li> <li>– 1 recol·lector de dades</li> </ul> <b>Material de laboratori</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Balança digital</li> <li>– 3 erlenmeyers de 100 ml</li> <li>– 3 taps de goma ajustats als erlenmeyers</li> <li>– 3 tubs de plàstic per a la connexió amb els sensors</li> <li>– 2 xeringues de 5 ml</li> <li>– 5 agulles gruixudes (mida 18G) de xeringa</li> <li>– 3 claus de tres vies</li> <li>– 2 taps de rosca que encaixin amb l'agulla hipodèrmica</li> </ul>	<b>Reactius i mostra</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Solució d'<math>\text{H}_2\text{O}_2</math> al 3%</li> <li>– Solució d'<math>\text{H}_2\text{O}_2</math> a l'1,5%</li> <li>– Llevats secs</li> <li>– Aigua destil·lada</li> </ul> <b>Ordinador</b>
---	--

## Procediment

Comproveu que el vostre muntatge correspon al descrit a l'esquema i poseu nom a tots els components.

### Muntatge de l'experiència



erlenmeyer 1  
Solució patró

erlenmeyer 2  
Mostra 1

erlenmeyer 3  
Mostra 2

### Execució de l'experiència


#### Preparació de les mostres

1. Peseu 1 g de llevat sec a la mostra 1, afegiu-hi 50 ml d'aigua i remeneu bé fins a obtenir una solució homogènia.
2. Marqueu els erlenmeyers amb els números 1 (solució patró), 2 (mostra 1) i 3 (mostra 2).
3. A l'erlenmeyer 1 poseu-hi 40 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  i 5 ml d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .
4. A l'erlenmeyer 2 i al 3, poseu-hi 20 ml d'aigua i 20 ml de solució de llevat. Remeneu molt bé.
5. Ompliu una xeringa amb 5 ml de solució d' $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % i l'altra amb 5 ml de solució d' $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1,5 %.
6. Tapeu hermèticament els recipients: el número 1 amb el tap de goma i una agulla connectada al sensor corresponent; el número 2 i el 3 han de portar una agulla connectada al sensor i una agulla addicional. Per tal d'evitar pèrdues de gas, resultaria convenient segellar els taps (amb cinta aïllant o plastilina).
7. A l'agulla addicional de l'erlenmeyer 2, s'hi posa la xeringa amb 5 ml d' $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%.
8. A l'agulla addicional de l'erlenmeyer 3, s'hi posa la xeringa amb 5 ml d' $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1,5%.


9. Un cop injectada l'aigua oxigenada, traieu la xeringa i taponeu el forat de l'agulla amb un tap adient o amb plastilina.

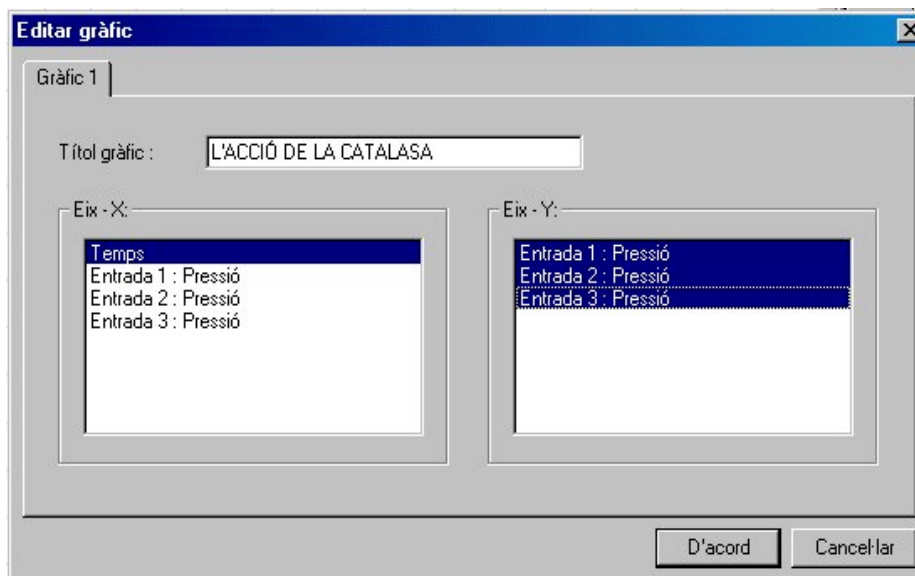
### Configuració del sistema (paràmetres de la captació de dades)

Abans de poder recollir les dades, cal seguir els passos següents:


- Connecteu la font d'alimentació a la consola i assegureu-vos que la connexió amb el PC també estigui en ordre.
- Incorporeu els tres sensors de pressió en ordre rigorós: el primer sensor connectat al sòcol I/O-1, el segon al IO-2 i el tercer i últim a l'entrada I/O-3.
- Polseu el botó **on**  de la consola i espereu que surti la pantalla del menú amb les icones:



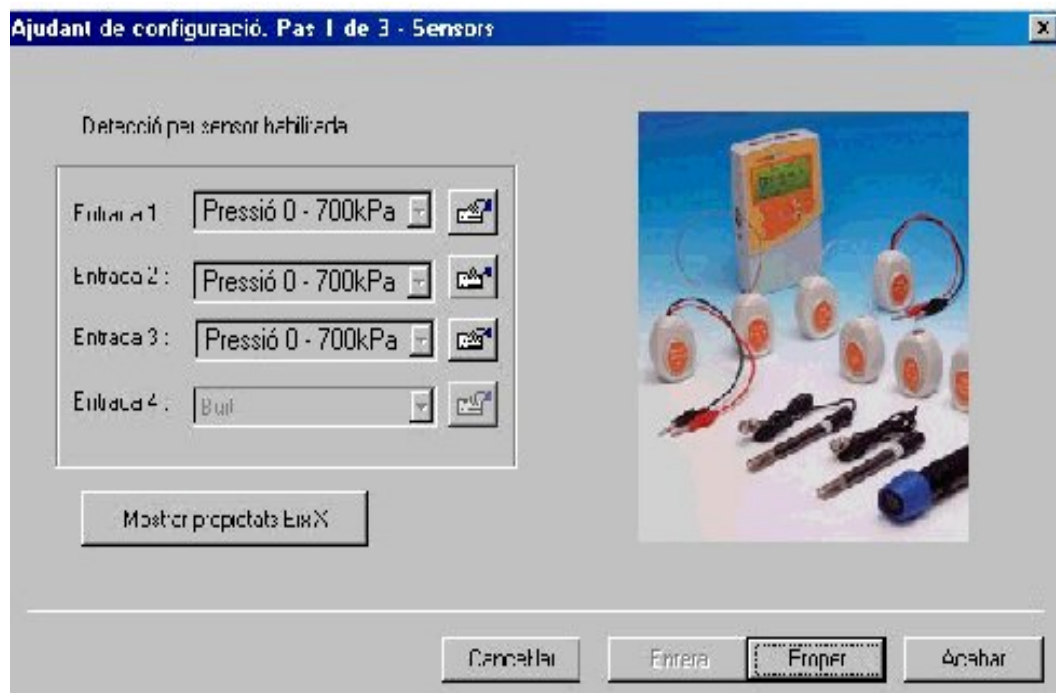
- Obriu el programa **Multilab** a l'ordinador.
- En obrir el programa aquest crearà automàticament un arxiu nou.
- Aneu al menú *Gràfic/Editar gràfic* o seleccioneu a la barra inferior el botó **Editar gràfic** . S'obrirà la pantalla



Poseu títol al gràfic i comproveu que teniu les variables ben definides: a l'eix X el temps, i a l'eix de les Y les 3 pressions: P1, P2 i P3. Sortiu clicant **D'acord**.

- Seleccioneu la icona  o bé aneu a la barra de menú i obriu *Configurar ajuda / Temps a continu*.

S'obrirà la pantalla:



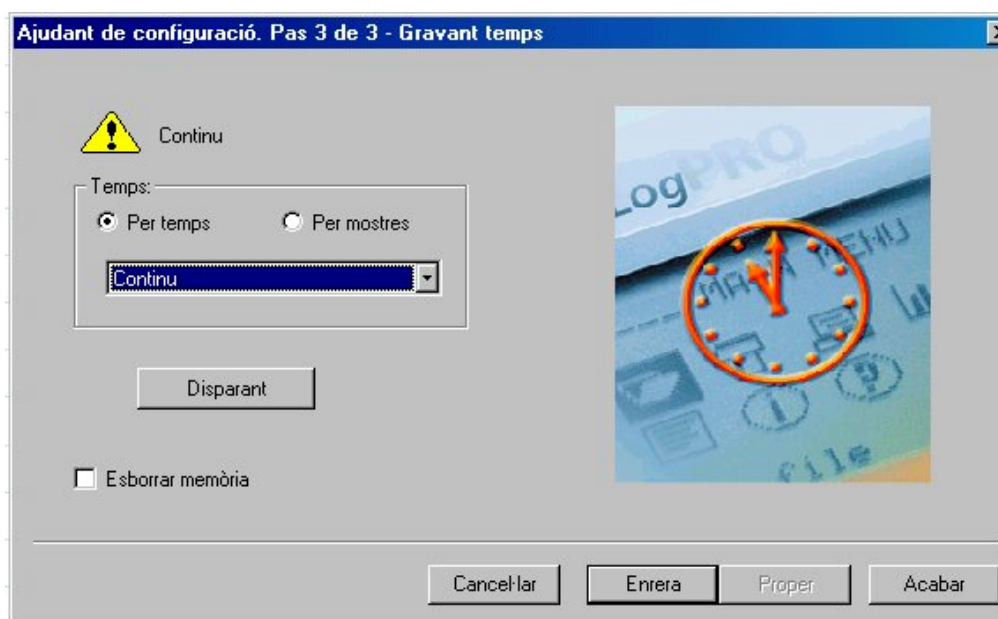
- Comproveu que a les tres entrades I/O detecta la connexió amb els corresponents sensors de pressió. Passeu a la següent pantalla clicant sobre **Proper**.
- Dins d'aquesta pantalla heu d'escollir la freqüència en què farà les lectures. Per aconseguir-ho cal clicar a la dreta de la finestra. Escolliu l'opció **cada 10 segons**.



Passeu a la pantalla següent clicant sobre **Proper**.

- En aquesta pantalla escollirem quant de temps durarà la captació de dades. En la nostra experiència el temps necessari per aconseguir enregistrar tot el procés està al voltant dels 20-30 minuts.

Donat que allò que ens interessa és allargar la captació fins que s'estabilitzi el gràfic, escollirem l'opció **Continu**.



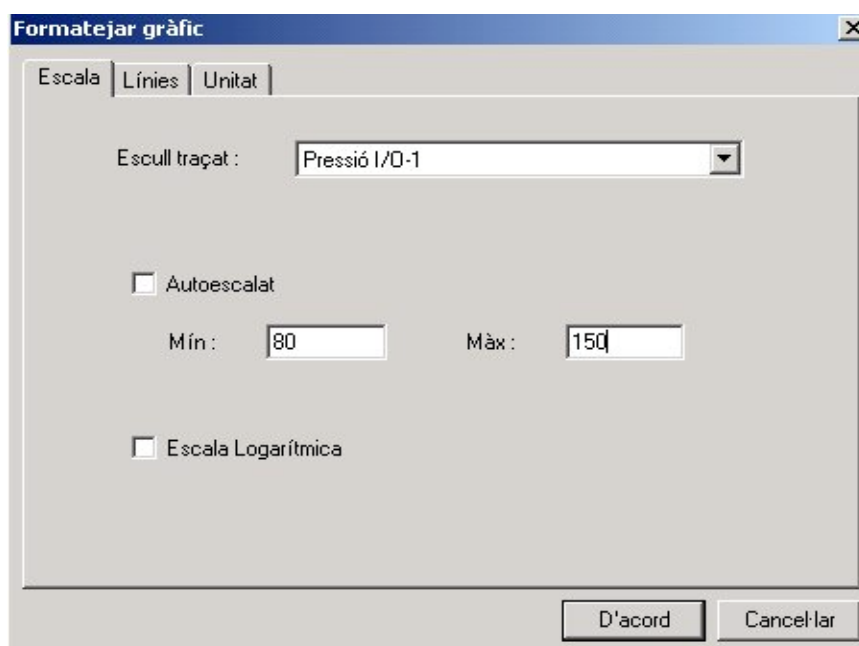
### Enregistrament de dades.


Abans de començar la lectura de dades, feu una predicció de l'evolució dels valors de pressió en cada solució en el decurs de l'experiment.

Per iniciar la lectura, cliqueu el botó **Executar**



Cal aconseguir que coincideixin les escales dels tres gràfics i, per tant, un cop engegada la lectura, seleccioneu la icona **Gràfic** de la barra superior del menú, apartat **Propietats / Gràfic 1**. S'obrirà una pantalla com la de la pàgina següent: a *Escull traçat* seleccioneu **Pressió I/O-1**. A continuació traieu l'autoescalat i seleccioneu manualment l'interval de pressió (**80 kPa a 150 kPa**). Repetiu l'operació per als sensors I/O-2 i I/O-3 i tanqueu la pantalla, clicant **D'acord**.



10. Comproveu el nivell de pressió enregistrat al monitor de l'ordinador. Obriu els tres taps laterals dels recipients fins a obtenir la pressió atmosfèrica (aproximadament 1000 mb o 100 kPa) als tres erlenmeyers. Es tracta que l'aire entri a l'erlenmeyer i que la vàlvula de tres vies tingui el pas d'aire cap al sensor tancat.
11. Un cop equilibrades les pressions injecteu la solució d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ja preparada a la xeringa, a l'erlenmeyer 2 i 3 i torneu a posar els taps laterals. Gireu la clau de la vàlvula de tres vies per tal que l'erlenmeyer quedi connectat exclusivament al sensor.
12. Quan hagi passat suficient temps, i el gràfic s'hagi estabilitzat, atureu la lectura. Cliqueu **STOP** .



### Seguretat i residus

Cal aplicar els criteris habituals en el treball al laboratori:

- Els reactius utilitzats en aquesta experiència poden abocar-se per l'aigüera, convenientment diluïts
- Les restes de les mostres d'origen orgànic, cal llençar-les als contenidors on habitualment es llença la brossa orgànica **abans de rentar el material**.

## Resultats

### Observacions qualitatives

Cal anotar amb tot detall quin ha estat el muntatge, qualsevol canvi en els diferents tractaments, possibles problemes sorgits durant l'experiència, les operacions que hem anat realitzant i els fenòmens observats. És molt important que les observacions siguin anotades i intercanviades per tots els membres del grup de treball. Això enriqueix sens dubte les conclusions finals.

Les alteracions possibles en el contingut dels erlenmeyers durant el registre són observacions importants en aquest apartat, així com tots els aspectes de les operacions de preparació dels mateixos.

### **Adquisició i enregistrament de les dades**

Un cop acabat l'enregistrament cal imprimir els gràfics i les dades numèriques corresponents per tal d'interpretar els resultats amb posterioritat.

Durant l'experiència, és convenient anotar en quin moment s'observen variacions apreciables al gràfic i als valors de la taula, quan s'estabilitzen els gràfics i, per tant, els valors de la pressió, etc.

### **Conclusions**

---

#### **Anàlisi de les dades**

Ara ja teniu els resultats en forma de gràfics i de taules, i a més les observacions dutes a terme durant el propi experiment. Cal extreure les conclusions d'aquesta informació.

Observeu acuradament els gràfics i les taules, i no perdeu de vista les notes de treball:

- Existeix una diferència clara entre els tres gràfics (o entre les tres taules)?
- Què ha passat a l'erlenmeyer 1? Com es pot interpretar?
- Són idèntics els gràfics corresponents als erlenmeyers 2 i 3? En què es diferencien?
- Els valors de pressió als erlenmeyer 2 i 3 comencen a variar immediatament després d'injectar l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o varien al cap d'un temps? Per què?
- És continu l'augment de pressió? O bé hi ha una estabilització del gràfic al cap d'un cert temps? Com es podrien interpretar els resultats?
- Són consistents els resultats obtinguts amb la vostra hipòtesi? Podeu confirmar-la o heu de fer hipòtesis noves?

#### **Qüestionari**

1. Quines diferències de pressió es detecten als erlenmeyers 1, 2 i 3 al llarg de l'experiment?
2. Què ha passat a l'erlenmeyer 1? Com es pot interpretar?
3. Per què és necessària la solució patró?
4. Quins són els recipients que mostren variació de la pressió? Quin factor els diferencia del o dels que no presenten aquesta variació de pressió?
5. Per què és la mesura de pressió un indicador adequat del curs de la reacció?

6. Quin component del llevat és responsable de l'increment de pressió? Com es podria comprovar?
7. Creus que continuen vius els llevats o només és activa la catalasa? Com ho comprovaries?
8. Quin efecte té doblar la quantitat d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>?
9. Si dobléssim la quantitat de llevat, quins efectes tindria sobre els resultats?
10. Variant la temperatura de l'experiment, quins efectes es produirien? Quina seria la temperatura òptima?
11. Es podria utilitzar algun altre material orgànic, com ara fetge o patata: elaboreu una hipòtesi sobre els possibles resultats i/o problemes que es plantejarien.