



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOQUÍMICA II

LABORATORIO

PRACTICA 1

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UN POLISACARIDO VEGETAL (ALMIDON)

PROF. VERONICA SOUZA ARROYO

ALUMNO:

ESPINOSA NEIRA ROBERTO

GRUPO

BC05

18 – JUN – 2002

INTRODUCCIÓN

Almidón.

Es un hidrato de carbono complejo ($C_6H_{10}O_5$), inodoro e insípido, en forma de grano o polvo. El almidón es el principal carbohidrato de reserva en la mayoría de las plantas. En las hojas el almidón se acumula en los cloroplastos, donde es un producto directo de la fotosíntesis. En los órganos de almacenamiento, se acumula en los amiloplastos, en los cuales se forma después de la translocación de sacarosa u otro carbohidrato provenientes de las hojas.

En los vegetales, el almidón se encuentra en uno o más granos amiláceos en un plastidio. La cantidad de almidón en diversos tejidos depende de muchos factores genéticos y ambientales. El almidón se acumula a la luz del día cuando la fotosíntesis excede las tasas combinadas de respiración y translocación, después parte de él desaparece por la noche.

Se presentan dos tipos de almidón en la mayoría de los granos amiláceos: *amilosa* y *amilopectina*, ambos compuestos por unidades de d-glucosa unidas por enlaces α -1, 4. Las uniones α -1, 4 hacen que las cadenas de almidón se enrollen en forma de hélices. La amilopectina consta de moléculas muy ramificadas, cuyas ramas se localizan entre el C-6 de una glucosa de la cadena principal y el C-1 de la primera glucosa en la cadena que forma la rama (enlaces α -1, 6). Las amilosas son más pequeñas y contienen de cientos a miles de unidades de glucosa, número que depende de la especie y las condiciones ambientales.

La formación de almidón ocurre sobre todo por un proceso que implica la donación repetida de unidades de glucosa provenientes de un azúcar nucleotídico similar al UDPG y que se denomina *difosfoglucosa de adenosina*, ADPG.

Hidrólisis del almidón.

La hidrólisis implica la ruptura de un enlace mediante la adición en medio del mismo de los elementos del agua. Los polisacáridos de la dieta se metabolizan mediante hidrólisis a monosacáridos.

La mayoría de los pasos de la degradación de almidón a glucosa pueden ser catalizados por tres enzimas distintas, si bien hay otras más que se necesitan para completar el proceso. Las tres primeras enzimas son una α -amilasa, β -amilasa y almidón fosforilasa. Al parecer solo la α -amilasa puede atacar gránulos de almidón intactos, por lo que cuando participan la α -amilasa y la almidón fosforilasa, es probable que actúen sobre los primeros productos liberados por la α -amilasa. La α -amilasa ataca de manera aleatoria enlaces 1,4 en las moléculas de amilosa y amilopectina, al principio creando huecos al azar en los granos de almidón y liberando productos que aun son grandes. En cadenas de amilosa no ramificadas, el ataque repetido por la α -amilasa produce maltosa, un disacárido que contiene dos unidades de glucosa. Sin embargo, la α -amilasa no puede atacar los enlaces 1,6 localizados en los puntos de ramificación de la amilopectina, por lo que la digestión de amilopectina cesa cuando aun quedan *dextrinas* ramificadas con cadenas de longitud corta. Muchas α -amilasas son activadas por Ca^{+} , lo cual es una de las razones por las que el calcio es un elemento esencial.

La α -amilasa **hidroliza** al almidón en α -maltosa; la enzima actúa primero solo sobre los extremos no reductores. La α -maltosa cambia con rapidez, por mutarrotación, para formar las mezclas naturales de isómeros α y β . La hidrólisis de amilosa por la α -amilasa es casi completa, pero la degradación de amilopectina es incompleta porque no son atacados los enlaces de los puntos de ramificación. La actividad de ambas amilasas implica la incorporación de una molécula de H_2O por cada enlace roto, por lo que son enzimas hidrolasas. Las reacciones hidrolíticas no son reversibles, de modo que no se pueden detectar síntesis de almidón por amilasas. Las amilasas están diseminadas en diversos tejidos pero son mas activas en las semillas que están germinando, ricas en almidón. Es probable que la α -amilasa tenga más importancia que la β -amilasa para la hidrólisis de almidón. Gran parte de la α -amilasa se localiza dentro de los cloroplastos, muchas veces unida a los granos de almidón que atacara. Actúa tanto en el día como por la noche aunque, por supuesto, durante la luz de día hay producción neta de almidón por la fotosíntesis.

La amilopectina solo es degradada parcialmente por la acción del almidón fosforilasa. La reacción procede de manera consecutiva a partir del extremo no reductor de cada cadena principal o cadena ramificada hasta a unos residuos de glucosa de las uniones α -1,6 de las ramificaciones, por lo que de nuevo que dan dextrinas. La amilosa, que tiene pocas ramificaciones, se degrada casi por completo, por eliminación repetida de unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena. La almidón fosforilasa esta ampliamente distribuida en la planta y a veces resulta difícil determinar que enzima digiere la mayor parte del almidón en las células de interés.

OBJETIVO

Comprobar que las amilasas producidas por semillas de maíz hidrolizan al almidón, dando como producto final unidades de maltosa siendo este uno de los mecanismos que la semilla utiliza para obtener energía

necesaria para germinar.

El alumno estudiara las diferencias en la actividad amilolítica, dependiendo de los estadios de germinación en las semillas y de sus requerimientos energéticos.

Se aplicara el método de Nelson–Simogy para la determinación de reductores totales.

Determinaremos la actividad enzimática de las semillas de maíz, dependiendo de su tiempo de germinación.

MATERIAL

1 mortero

1 bisturí

1 baño de agua hirviendo

6 tubos de centrifuga

5 pipetas graduadas de 10 ml

1 embudo de filtración de 5 cm de diámetro

1 caja de Petri de 9 cm

1 tripié con tela de asbesto

1 mechero

25 tubos de ensayo de 15X150

1 centrifuga

1 espectrofotómetro

1 gasa

30 semillas de maíz

METODOLOGÍA

- La preparación de las semillas de maíz, se llevara a cabo cinco días anteriores a la práctica. Se desinfectaran 10 semillas de maíz en cloro (hipoclorito de sodio) durante 20 minutos y las enjuagaremos muchas veces con agua hervida; posteriormente las semillas las pondremos a germinar en un frasco limpio, en el frasco se pondrá una capa de algodón, las semillas, y se humedecerá el algodón. Después el mismo procedimiento de germinación se aplicara a otras cuantas semillas limpias pero tres días antes de la práctica.
- Para empezar la practica se ponen a remojar en agua 2 semillas de maíz de ningún día de germinación; después se seleccionaron un par de semillas de 5, de 3 y 0 días de germinación, entonces se les quita el embrión y el escuto, para que solo nos quede el endospermo almidonoso. Una vez limpios los maíces prepararemos un extracto enzimático de los respectivos días de germinación; lo anterior se hará macerando el endospermo de 2 semillas de 5 días de germinación, en un mortero de

con 5 ml de succinato con pH 5. Se hizo el mismo procedimiento con las semillas de 3 y 0 días de germinación, los productos obtenidos de los macerados se colocaran en tubos de centrifuga, lavando el mortero con el amortiguador en cada uno de los tres casos para centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. Después de centrifugar se separara el sobrenadante de cada tubo; para ser colocadas en los tubos numerados del 7 al 12, según la relación del formato siguiente.

tubo #	días de germinacion	ml extracto diluido
7	0	0.25
8	0	0.25
9	3	0.25
10	3	0.25
11	5	0.25
12	5	0.25

- El ultimo paso de la practica será la determinación de los reductores totales, que se llevara a cabo con las diluciones de los extractos enzimáticos de la semilla de diferentes tiempos de germinación; aquí se realizan las reacciones con los diferentes reactivos (I y II) y la determinación de azucres reductores totales que obtuvimos con la hidrólisis enzimática del almidón; también realizaremos la curva patrón. Estas reacciones fueron de acuerdo a la tabla.

RESULTADOS

- Anotaremos las lecturas espectrofotométricas de cada tubo en la tabla siguiente.

TUBO	DENSIDAD OPTICA (nm)			MEDIA
		MUESTRA	DUPLICADO	
1	0	0.	0	
2	0.086	0.090	0.088	
3	0.377	0.212	0.2945	
4	0.297	0.292	0.2945	
5	0.339	0.259	0.299	
6	0.464	0.505	0.4845	

- Determinaremos la concentración de maltosa en los tubos 1 al 6 correspondientes a la curva patrón, de acuerdo con la ecuación:

$$(Volumen\ inicial)(Concentración\ inicial) = (Volumen\ final)(Concentración\ final)$$

$$(Tubo\ x)(500\ \text{đg/ml}) = (Patrón\ maltosa + Agua)(X)$$

Se anota la concentración en la columna X de la tabla siguiente y en la columna Y se anotan las lecturas espectrofotométricas obtenidas en los tubos 1 a 6.

Tabla 1. VALORES PARA CURVA PATRON			
TUBO #	X	Y	Densidad
		[Maltosa	

		$\delta g/mL]$	óptica (520 nm)
1	0	0	
2	125	0.088	
3	333.33	0.2945	
4	750	0.2945	
5	2000	0.299	
6	0	0.4845	

Se trazara la grafica con los datos de las columnas **X** y **Y**. Debido a que los datos se presentan como una recta, se ajustan de ser necesario.

- En el siguiente cuadro anotaremos los resultados obtenidos de las lecturas de densidad óptica de los tubos problema (7–12).

DIAS	TUBOS PROBLEMA	DENSIDAD OPTICA (nm)			MUESTRA DUPLICADO	MEDIA
0	7	1.229	0.833	1.031		
0	8	0.990	1.218	1.104		
3	9	1.252	0.989	1.120		
3	10	0.844	1.106	0.975		
5	11	1.071	1.200	1.1355		
5	12	1.114	1.164	1.139		

Tomando en consideración los datos de la curva patrón donde **Y** ha sido corregida **Y'** y recordando nuevamente que $y=0.0873x-0.0621$; se calcula la concentración de maltosa de los diferentes días de germinación.

Los datos se registran en la siguiente tabla.

TUBO #	DIAS	[MALTOSA δg]
7	0	0.0279
8	0	0.0342
9	3	0.0356
10	3	0.0230
11	5	0.0370
12	5	0.0373

En la siguiente grafica se encuentra la concentración de maltosa por los días de germinación de las semillas.

DISCUSIÓN

En esta práctica se intento tener el mejor rendimiento respecto a los resultados. Creemos que nuestros resultados hubieran estado más precisos si la extracción del almidón no hubiera presentado algunas dificultades para obtener el endospermo. Esto lo pensamos ya que en las semillas de 0 y 3 días el endospermo presentaba partes más duras, que hacían más difícil la extracción total.

Otra cuestión a destacar, es la parte en que hacemos la segunda incubación (reactivo 1), pues por un descuido el agua hirvió y se derramo un poco, provocando que a algún tubo le entrase agua y alterara una absorbancia; esto se nota pues el mismo número de tubo pero del duplicado da una lectura más coherente.

Por tanto con nuestros resultados y el texto consultado se demuestra que la actividad enzimática en la semilla es mayor si el tiempo de germinación es mayor.

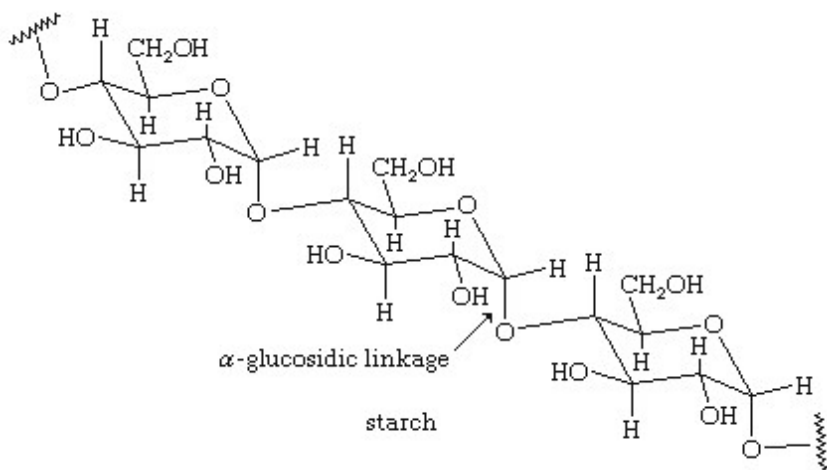
CONCLUSIÓN

En esta práctica se esperaba y se observó la actividad enzimática de la amilasa sobre el almidón. Observamos que al tener más tiempo de germinación una semilla, mayor es la actividad enzimática de la amilasa. En los granos de cero días se manifestó una actividad de la enzima muy baja, después existe un incremento en su actividad al usar de semillas de tres días y por supuesto que la mayor actividad se registro en las semillas de 5 días. Todas estas reacciones nos dejan una producción de maltosa, por acción de la hidrólisis enzimática de la amilasa sobre el almidón; esto nos sugiere que si la enzima trabaja mucho, sería porque había mucho almidón para hidrolizar y poder producir maltosa.

En resumen y conclusión, la actividad enzimática es directamente proporcional a la producción de maltosa, todo esto con respecto a los días de germinación que tengan las semillas (entre mas días de germinación tenga las semillas, mas almidón habrá, entonces, la actividad enzimática será mucho mayor.)

CUESTIONARIO

1.- CUAL ES LA ESTRUCTURA DEL ALMIDON?



3

2.- QUE ES UN AZUCAR REDUCTOR?

Cuando en una determinación cuantitativa de los monosacáridos se realiza frecuentemente, basándose en su observación en disoluciones alcalinas mediante Cu^{2+} , Ag^{+} o ferricianuros, se origina una mezcla de azúcares –ácidos. Los azúcares son capaces de reducir, a tales oxidantes se les denomina azúcares reductores.

Se puede definir también a un azúcar reductor como cualquier carbohidrato que tiene libre un grupo carbonilo y es susceptible de participar en otra oxidación.

3.- QUE TIPO DE ENLACES HIDROLIZAN LAS AMILASAS?

α-Amilasa, α(14) glucan 4-glucanohidrolasa

α-Amilasa, α(14) glucan maltodeshidrogenasa

4.- QUE AMILASAS SE ENCUENTRAN EN LOS ORGANISMOS ANIMALES?

α-D-glucopiranososa

α-Amilasa, α(14) glucan 4-glucanohidrolasa

BIBLIOGRAFÍA

SALISBURY, B. FRANK

Fisiología Vegetal, Ed. Iberoamericana, 1994.

MATHEWS, C. K. Y VAN HOLDE, K. E.

Bioquímica, McGraw Hill Interamericana, 2ª. Ed., España, 1998.

BRITÁNNICA CD 2000 DELUXE

Encyclopædia Britannica, Inc.

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E., HILL, R., LEHMAN, R.

Principios de Bioquímica, McGraw Hill, 1989.

MICROSOFT® EXCEL 2002 (10.2614.2625)