



TRONCO COMÚN DIVISIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÓDULO: ENERGÍA Y CONSUMO DE SUSTANCIAS FUNDAMENTALES

PRÁCTICA No. 3

HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN POR AMILASA VEGETAL

OBJETIVO: Determinar la presencia de enzimas hidrolíticas durante la germinación por el método colorimétrico, tomado como factor el tiempo de actividad enzimática.

GENERALIDADES: Investigación bibliográfica por parte de los estudiantes sobre cinética enzimática de amilasa y factores que afectan la germinación.

MATERIAL POR EQUIPO:

- 11 Tubos de ensaye (16x150 mm)
- 1 Gradilla
- 5 Pipetas graduadas de 1 ml
- 2 Pipetas de 5 ó 10 ml
- 2 Vasos de precipitados de 250 ml
- 1 Mechero con manguera
- 1 Soporte universal con anillo de fierro
- 1 Embudo de tallo corto de plástico
- 1 Mortero de porcelana con pistilo
- Papel parafilm®

REACTIVOS:

- Solución de glucosa al 1%.
- Agua destilada.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en frasco ámbar.
- Solución yodo-yodurada: I₂-KI en una solución de HCl 0.05 N, en frasco ámbar.
- Solución de cloruro de calcio-cloruro de sodio: CaCl₂ 20 mM-NaCl 200 mM.
- Solución de almidón al 0.2%.
- Solución amortiguadora de acetatos pH = 5.

EQUIPO DE LABORATORIO POR GRUPO DE TRABAJO:

- 1 Balanza granataria
- 2 Espectrofotómetros
- 8 Celdas para espectrofotómetro

MATERIAL POR EQUIPO DE ALUMNOS:

- 10-15 Semillas de maíz (*Zea mays*) o frijol (*Phaseolus vulgaris*) con 7 a 8 días de germinación.
- 1 Plumón indelible.
- Jabón y franela.
- 3 Sobres de gasa.
- Masking tape.
- 5 Ligas.

NOTA: El germinado no debe ser comprado en el supermercado.

PARTE EXPERIMENTAL METODOLOGÍA

1. CURVA ESTÁNDAR DE ALMIDÓN:

- 1.1. Mezclar en un tubo de ensaye (16x150 mm) etiquetado como "C" (curva estándar) lo siguiente:
 - 2 ml de solución de almidón al 0.2% en solución amortiguadora de acetatos a pH = 5.0.
 - 2 ml de solución de CaCl₂ 20 mM-NaCl 200 Mm.
 - 1 ml de agua destilada.
- 1.2. Preparar una dilución 1:10 de la mezcla anterior, es decir:
 - Mezclar 1 ml de la mezcla del tubo "C" y adicionar 9 ml de agua destilada. Agitar cubriendo la boca del tubo con parafilm y etiquetar como **Mezcla "C" dil. 1:10, (dil. = dilución)**.
- 1.3. Para la elaboración de la curva estándar de almidón: Etiquetar 6 tubos de ensaye (16x150 mm) con números consecutivos (1-6). Adicionar los reactivos indicados en la Tabla 1, y posteriormente agitar.

NOTA: Es importante que el espectrofotómetro se haya calentado previamente por un tiempo de por lo menos 15 minutos.

Tubo	H ₂ O _{dest.} (ml)	Mezcla "C" dil. 1:10	Sol. yodo- yodurada (ml)	A (λ = 575 nm)
1	3.0	0	1.0	
2	2.8	0.2	1.0	
3	2.6	0.4	1.0	
4	2.4	0.6	1.0	
5	2.2	0.8	1.0	
6	2.0	1.0	1.0	

Tabla 1| Volúmenes de los diferentes reactivos para elaborar la curva estándar de almidón. (dest. = destilada; dil. = dilución; A = absorbancia; nm = nanómetros).

- 1.4. Calibra el espectrofotómetro con la solución blanco a una absorbancia de cero, con una longitud de onda de 575 nm.
- 1.5. Determina la absorbancia de los tubos 2 a 6.
- 1.6. Elabora una gráfica colocando en el eje de las "x" el valor del % de almidón, y en el eje de las "y" los valores de absorbancia que determinaste.
- 1.7. Esta curva te servirá para cuantificar el % de almidón en los tubos de la cinética de hidrólisis del almidón.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE PROTEÍNA:

- 2.1. Pesar de 10 a 12 semillas germinadas de maíz o frijol con 7 a 8 días de germinación, para la obtención de la amilasa.
- 2.2. Moler las semillas en un mortero usando 3 ml de agua destilada por cada gramo de tejido.
- 2.3. Filtrar la molienda con ayuda del embudo de plástico de tallo corto y de dos capas de gasa.
- 2.4. Mantener el filtrado en un tubo de ensaye (16x150 mm). Permitir que se sedimente y mantenerlo en un baño de hielo.
- 2.5. Diluye el filtrado 1:10 con la solución amortiguadora de acetatos, pH =5. Seguir manteniendo en frío.
- 2.6. Prepara la mezcla de reacción en dos tubos de ensaye (16x150 mm) de acuerdo a la Tabla 2.

Tubo	Solución de almidón al 2% en solución amortiguadora de acetatos, pH = 5	Solución de CaCl ₂ 20 mM- NaCl 200 mM
A y B	4.0 ml	4.0 ml

Tabla 2| Preparación de los tubos A y B.

El resto de la práctica se realizará entre dos equipos: un equipo trabajará el ensayo A y el otro equipo trabajará el ensayo B.

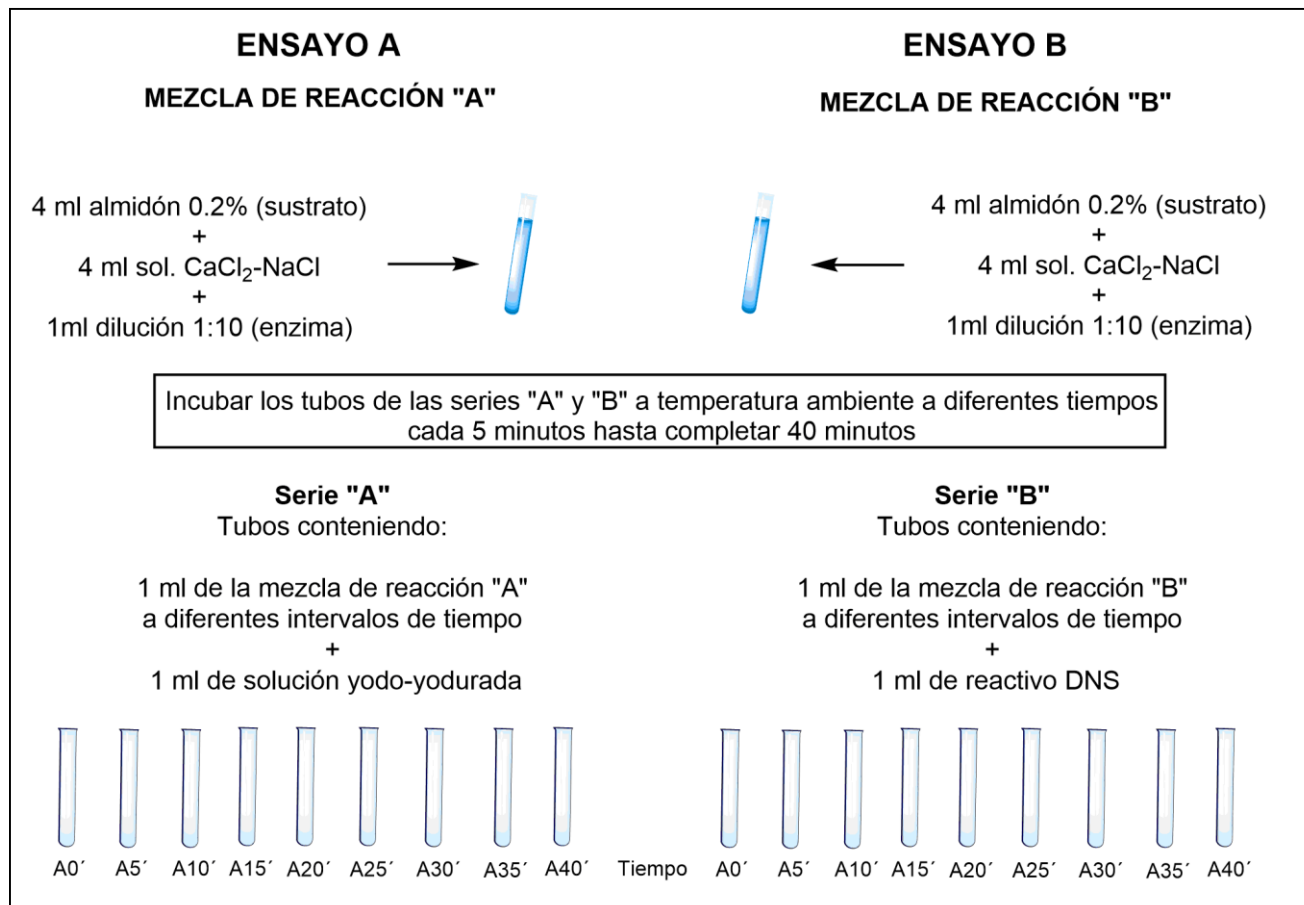


Figura 1. Ensayo A y Ensayo B.

3. ENSAYO A:

- 3.1. Prepara 10 tubos de ensayo (16x150 mm) agregando a cada uno 1 ml de la solución yodo-yodurada.
- 3.2. Agrega a un tubo 3 ml de agua destilada, éste servirá para calibrar el espectrofotómetro al 100% de transmitancia (100% T) o cero de absorbancia (A), a una longitud de onda de 575 nm.
- 3.3. El primer tubo será el tiempo 0 y se harán mediciones a intervalos de 5 minutos durante 40 minutos, como se indica en la Figura 1. Adiciona 1 ml del tubo de reacción que contiene la enzima diluida a cada uno de los tubos de la Serie "A" que contienen cada uno 1 ml de solución yodo-yodurada, **uno a la vez a intervalos de 5 minutos hasta completar 40 minutos.**
- 3.4. Agita.

Para determinar la absorbancia:

- 3.5. Agrega a cada tubo 2 ml de agua destilada y vuelve a agitar.
- 3.6. Adiciona la muestra en una celda para espectrofotómetro y lee la absorbancia a 575 nm.

3.7. Grafica la absorbancia (575 nm) contra el tiempo de reacción y correlaciona con el cambio de color de la Serie “B”.

4. ENSAYO B:

- 4.1. Prepara 10 tubos de ensaye (16x150 mm) agregando a cada uno 1 ml de la solución de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).
- 4.2. Adiciona 3 ml de agua destilada a un tubo, que servirá para calibrar el espectrofotómetro a 100% de transmitancia (100% T) o cero de absorbancia (A). A una longitud de onda de 575 nm.
- 4.3. El primer tubo será el tiempo 0 y se harán mediciones a intervalos de 5 minutos durante 40 minutos, como se indica en la Figura 1. Adiciona 1 ml del tubo de reacción que contiene la enzima diluida a cada uno de los tubos de la Serie “B” que contienen cada uno 1 ml de solución de DNS, **uno a la vez a intervalos de 5 minutos hasta completar 40 minutos.**
- 4.4. Calienta los tubos durante 10 minutos a baño María.
- 4.5. Agrega a cada tubo 8 ml de agua destilada y agita, incluyendo el tubo que se utilizará para la calibración.
- 4.6. Enfría los tubos en un vaso de precipitados de 250 ml con hielo.
- 4.7. Toma la lectura de cada uno de los tubos utilizando las celdas para espectrofotómetro. Lee a una absorbancia de 575 nm.
- 4.8. Grafica la absorbancia contra el tiempo de reacción.
- 4.9. Correlaciona los datos obtenidos con el cambio de color con la solución yododurada.

5. MÉTODO PARA ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON GLUCOSA QUE SERVIRÁ COMO PATRÓN PARA HACER EL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL, INCLUYENDO EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r):

Solución	1	2	3	4	5	6	7
Glucosa 1%	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Agua destilada	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Reactivo (DNS)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tabla 3| Reactivos a adicionar para elaborar la curva de calibración con glucosa.

- 5.1. Calienta los tubos durante 10 minutos a baño María.
- 5.2. Agrega a cada tubo 8 ml de agua destilada y agita, incluyendo el tubo que se utilizará para la calibración.
- 5.3. Enfría los tubos en un vaso de precipitados de 250 ml con hielo.

- 5.4. Toma la lectura de cada uno de los tubos utilizando las celdas para espectrofotómetro. Lee a una absorbancia de 620 nm.
- 5.5. Grafica la absorbancia –vs- concentración de glucosa.

6. CUESTIONARIO:

- 6.1. ¿A qué grupo pertenece la enzima amilasa vegetal?
- 6.2. ¿Qué diferencia bioquímica existe entre la glucosa y el almidón? ¿Cuál es la relación entre ellos?
- 6.3. ¿Por qué aparece la enzima en el germinado de maíz?
- 6.4. ¿Cuáles son las condiciones que alteran el funcionamiento de las enzimas?
- 6.5. ¿Cómo se distingue bioquímicamente la degradación del almidón por amilasa y por fosforilasa?
- 6.6. ¿Cuál es la utilidad del coeficiente de correlación en el análisis de regresión lineal para la elaboración de la curva de calibración?

7. BIBLIOGRAFÍA:

- 7.1. Kaufman P.B., Labavitch J., Anderson-Prouty A., y Ghosheh N.S. (1975). Laboratory Experiments in Plant Physiology Laboratory Manual. Macmillan Publishing Co., Inc. Nueva York. 261 pp.
- 7.2. Ross, C.W. (1974). Plant Physiology Laboratory Manual. Wadsworth Publishing Co., Inc. Belmont. 200 pp.
- 7.3. Buchanan B.B., Gruissem W.Y., Jones R.L. (2001). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville. 1400 pp.

