1 Título práctica de laboratorio:

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA

2 OBJETIVOS

Generales:

- Determinar la actividad catalítica de la amilasa salival e identificar algunos factores que afectan la actividad de la enzima.

Específicos:

- Comprobar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la amilasa salival.
- Verificar la especificidad de la actividad enzimática de la amilasa sobre un sustrato.
- Determinar el efecto inhibitorio del AgCl en la actividad enzimática de la amilasa.
- Comprender el papel de la amilasa salival en los procesos fisiológicos.

3 REFERENTES CONCEPTUALES

Como referentes conceptuales los estudiantes deberán consultar los siguientes tópicos:

- Actividad enzimática.
- Clasificación de las reacciones enzimáticas.
- Factores que afectan la actividad de las enzimas (Temperatura, pH, inhibidores).
- ¿Qué son y que función tienen los cofactores y las coenzimas?
- Función de las amilasas, sitios de acción en el cuerpo humano.
- Activadores e inhibidores de las amilasas.

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos	Reactivos
2. Beaker de 250 mL.	1 Cubeta con hielo.
1. Beaker de 50 mL.	Cloruro de sodio 0,9%
1. Probeta de 50 mL.	Reactivo de Benedict.
20. Tubo de ensayo refractario.	Reactivo de Lugol.
1. Gradilla para tubos de ensayo.	Almidón 0,05 % (en NaCl 0,9%).
3. Pipeta graduada de 10 mL.	Sacarosa 2%.
1. Plancha de calentamiento.	Cloruro de plata 1%.
1. Pipeteador.	Buffer fosfato 0,5 M pH: 6,8.
1. Espátula.	Buffer citrato 0,5 M pH: 3,5.
1. Balanza digital.	Buffer Bicarbonato 0,5 M pH: 9.
1. Termómetro.	

Materiales que debe traer el estudiante

- 1 Marcador indeleble
- Papel de cocina
- 1. Cronómetro
- 2. Vasos desechables
- 1. Sobre de levadura para panadería

5 PROCEDIMIENTO

1. Obtención de la amilasa salival

Antes de recolectar la saliva que contiene la enzima amilasa, enjuagar la boca dos veces con solución salina 0,9%. Tome una pequeña cantidad de solución salina al 0,9% y realice movimientos de masticación para estimular la salivación, recolecte la saliva producida en un vaso desechable. Tenga en cuenta que debe recolectar entre 20 y 30ml de saliva. Mantenga la saliva en un baño de agua con hielo para utilizarla en los siguientes experimentos.

2. Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática

- Tome tres tubos de ensayo, enumérelos del 1 al 3 y vierta en cada uno 1 mL de buffer fosfato pH 6,8 y 2 mL de saliva (amilasa). Hervir el tubo 1 durante 5 min. en baño maría.
- Añadir en todos los tubos de ensayo 4 mL de disolución de almidón.
- Colocar los tubos de ensayo 1 y 2 en el baño María a 37ºC, durante 20 mín. e incubar el tubo de ensayo 3 en hielo durante 20 min.
- Al transcurrir este tiempo, vierta la mitad del contenido de cada tubo a tubos nuevos marcándolos con el número correspondiente.
- A uno de los tubos de ensayo se le añade 0,5 mL del reactivo de Lugol y se incuba la reacción a temperatura ambiente durante 2 min. Al otro tubo se le añade 1 mL de reactivo de Benedict y se calienta la mezcla en baño maría en agua hirviendo durante 3-5 min.
- Observe los resultados del experimento, regístrelos en la tabla, analice y saque conclusiones.

Tubo No.	Reactivo de Lugol	Reactivo de Benedict
1		
2		
3		

3. Influencia del pH sobre la actividad de las enzimas

- Tome tres tubos de ensayo, enumérelos del 1 al 3, en el tubo 1 vierta 1 mL de buffer fosfato pH 6,8, en el segundo tubo 1mL buffer citrato pH 3,5 y en el tercer tubo 1mL de buffer bicarbonato pH 9,0.
- Añada en cada tubo 2 mL de saliva (amilasa) y 4 mL de disolución de almidón, se mezcla y se incuba durante 20 min en baño María a 37°C.
- Al transcurrir este tiempo, la mitad de la reacción se transfiere a otro y se realizan las pruebas de Lugol y Benedict.
- Observe los resultados del experimento, regístrelos en la tabla, analice y saque conclusiones.

Tubo No.	Reactivo de Lugol	Reactivo de Benedict
1		
2		
3		

4. Especificidad de las enzimas

- **Activación de la enzima sacarasa:** Pese 5 g levadura y viértala en 25 mL de agua de la llave, disuélvala completamente y afore con agua de la llave hasta 50 mL.
- Marque 4 tubos de ensayo del 1-4. Vierta en los tubos 1 y 2, 4 mL de disolución de almidón, en tubos ensayo 3 y 4, 4mLde disolución de sacarosa.
- En los tubos de ensayo 1 y 3 se añaden de 2 mL de saliva (amilasa) y en los tubos de ensayo 2 y 4, de 0.5 ml de la solución de levadura que contiene la enzima sacarasa.
- Mezclar el contenido de los tubos de ensayo e incubar durante 20 min en baño María a 37°C. Posteriormente, adicione 2-3 gotas del reactivo de Lugol en los tubos de ensayo 1 y 2 permitiendo que la reacción se lleve a temperatura ambiente; a los tubos de ensayo 3 y 4 agregue 1 mL de reactivo de Benedict y caliente la mezcla en baño maría como se indicó en el primer experimento. Observe los resultados y regístrelos en la tabla, analice y saque conclusiones.

Tubo No.	Reactivo de Lugol	Reactivo de Benedict
1		
2		
3		
4		

5. Inhibición de la actividad enzimática

- En un tubo de ensayo colocar 500 µL de AgCl y adicionar 2 mL de amilasa salival; en otro tubo de ensayo colocar 2 mL de la enzima, incube a temperatura ambiente durante 20 min.
- Adicionar a cada tubo 2 mL del Buffer fosfato pH: 6,8, y 4 mL de disolución de almidón, mezclar e incubar durante 20 min en baño María a 37°C.
- Trasvasar la mitad del contenido de cada uno de los tubos a tubos limpios y secos. Realizar los ensayos de Lugol y Benedict como se indicó en los pasos anteriores.

6 PREGUNTAS DE PROFUNDIZACIÓN

1. Investigar las características de la sacarasa de levadura: condiciones óptimas de actividad, activadores, inhibidores, código enzimático.
2. ¿Qué función e influencia tiene el ión Cl en la actividad de la amilasa?
3. ¿Para qué se determina amilasa en sangre y orina, que diagnóstico se establece?
4. ¿Cómo es el mecanismo de acción y que tipo de inhibición realiza el Ibuprofeno, cuando actúa como antiinflamatorio?

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Baynes J. Bioquímica Médica. 3a Ed. Editorial Elsevier. España; 2011.
2. Koolman J, Klaus-Heinrich Röhm K-H. Bioquímica Humana. 4 Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 2012.
3. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 6a Ed. Editorial Manual Moderno. México; 2007.
4. López J, Fernandez A. Fisiología del Deporte. 3a Ed. Editorial Médica Panamericana.Buenos Aires; 2006.
5. Pratt Ch. Bioquímica. 2 Ed. Editorial. Manual Moderno. México: 2008.