

## **Actividad enzimática de la amilasa**

Agustín Garrido

agugarrido@hotmail.com

### **Introducción:**

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima proteica que se encuentra en la saliva humana y cataliza la degradación del almidón, que es un polisacárido de reserva vegetal. El almidón está formado por dos tipos de moléculas: la amilosa y la amilopectina, ambos polisacáridos de glucosa. La amilosa se conforma por cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ - C1-C4, mientras que la amilopectina tiene, además de estos últimos enlaces, uniones C1 con C6, formando cadenas ramificadas. La  $\alpha$ -amilasa rompe uniones C1-C4, tanto en la amilasa como en la amilopectina, dejando dextrinas lineales y ramificadas (oligosacáridos) como productos.

Para medir la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, se utilizará un test colorimétrico que detecta el almidón. Para ello se contará con una solución de iodo/ioduro de potasio ( $I_2/IK$ ), ya que el almidón en presencia de esta solución adquiere una coloración azulada característica. Esto tiene una explicación física: el iodo se coloca en el interior de la hélice que forma la amilosa (en las regiones hidrofóbicas), formando un complejo de color azul. Cuando la  $\alpha$ -amilasa actúa, degrada la amilosa, se desintegra la hélice y por tanto en presencia de  $I_2/IK$  ya no dará una coloración azul.

Por lo tanto, en este TP mediremos la desaparición de sustrato (evidenciada por el test colorimétrico) para determinar la actividad de la enzima. Además, analizaremos cómo afectan las distintas condiciones en que actúa la enzima (pH, temperatura, concentración de NaCl), así como los efectos que pueden causar diferentes pretratamientos (proteínasa, calor).

La dilución óptima nos indicará cuánto debemos diluir la saliva para que se logre el efecto acromático dentro del rango propuesto (2-8 minutos).

### **Metodología:**

Se partió de una muestra de saliva de un integrante del grupo y se la recogió en un vaso de precipitado que se colocó en un recipiente con hielo para reducir la energía cinética (para disminuir el contacto de las moléculas, reduciendo las interacciones químicas que se pudieran producir) de compuestos presentes en la saliva que puedan afectar el funcionamiento de la proteína.

A partir de la muestra, se tomó una alícuota para impregnar un papel indicador de pH sobre un papel blanco. El pH obtenido fue entre 7-8. Desde aquí, el trabajo se dividió en dos partes: una para determinar la dilución óptima y el tiempo de referencia y la otra, modificando una de las condiciones experimentales.

#### *Parte 1:*

Se tomó 1 ml de saliva de la muestra del vaso de precipitados y se lo diluyó con 9 ml de agua destilada en un tubo de ensayo, obteniendo una dilución 1/10. Luego se mezcló por inversión, evitando que la solución adquiriera energía cinética y se produzca la desnaturalización de la enzima de nuestro interés; y se lo colocó en hielo, por la misma razón antes expuesta.

Se preparó una gradilla con 15 tubos, conteniendo cada uno una solución (de coloración amarilla) de 5 ml de agua de la canilla y una gota de  $I_2/IK$  0,01M, que se mezcló por agitación para obtener una solución homogénea. Luego, se nos entregó una solución de almidón 1% p/v a baño térmico a 37° C (para que conforme una solución homogénea). Se extrajeron 6 gotas con pipeta Pasteur de la solución de almidón y se la volcó en un tubo 0 de la gradilla, mezclándolo por inversión y obteniendo un color azul característico del complejo Iodo-almidón.

Prontamente, se colocó en el tubo con almidón 1 ml de la dilución 1/10 de la saliva (que contiene a  $\alpha$ amilasa) y en ese instante se comenzó a cronometrar. A los 30 segundos, se retiraron 6 gotas de esta solución a 37° C donde debía ocurrir la reacción y se las agregó al tubo 1 de la gradilla. Este procedimiento se debería haber repetido cada 30 segundos para los siguientes tubos hasta que la muestra adquiriera un color parduzco, sin embargo, ya en el tubo 1, al mezclarlo por inversión con un tapón de goma, se obtuvo una coloración parda. Como el efecto acromático explicado en la introducción se había dado antes de los 2 minutos, era evidente que la dilución 1/10 no era la óptima. Por eso, se decidió una nueva dilución 1/50. Para obtener esta dilución, se tomó 1 ml de la 1/10 de saliva y se la colocó en un tubo de ensayos con 4 ml de agua destilada, mezclándolo por inversión. Se repitió el procedimiento anterior de la medición de la reacción enzimática y de esta manera se determinó el tiempo de referencia para la dilución 1/50, que será la dilución óptima.

#### *Parte 2:*

A cada grupo se le asignó un tratamiento distinto para analizar la actividad de la enzima alterando las condiciones anteriores (modificando una sola variable). Nuestro grupo recibió una solución NaCl 0,1 M para analizar los efectos de la presencia de NaCl sobre la  $\alpha$ amilasa.

Para realizar esta parte, se trabajó con una dilución de saliva al doble de la dilución óptima (es decir, 1/100 de saliva).

Se pipetearon 0,5 ml de la dilución 1/50 de saliva para mezclarlos por inversión con 0,5 ml de NaCl.

Se repitió el procedimiento realizado en la parte 1 y se encontró el tiempo en el que se logró el efecto acromático para la saliva diluida con NaCl. No obstante, este tiempo no se puede comparar con la dilución 1/50

de la saliva puesto que se trata de diluciones de saliva distintas. Por lo tanto, se elaboró una medición control (con el mismo procedimiento anterior pero partiendo de una dilución 1/100 de saliva en agua destilada sin NaCl). Para la medición control se realizaron 17 tubos.

## Resultados:

### *Parte 1*

-pH salival: entre 7 y 8

-Tiempo de referencia: desapareció el color azul a los 5' 30'' de agregar la enzima a la dilución de 1/50 y se obtuvo un color pardo. Como este tiempo de referencia se obtuvo en el rango propuesto por el TP de entre 2 y 8 minutos, podemos afirmar que la dilución 1/50 es la óptima.

### *Parte 2*

Dilución 1/100 NaCl con saliva: se observó una desaparición del color azul en el tubo 13 a los 6' 30'' de agregar la solución al tubo de almidón a 37° C. En el tubo control, luego de 17 tubos (pasados 8' 30''), no se apreciaron cambios (el color azul no desapareció), es decir, no hubo efecto acromático.

Esto quiere decir que en presencia de NaCl la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa aumenta ya que necesita un tiempo menor al del control para lograr el efecto acromático. Se podría suponer que  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  o ambos pueden afectar la acción enzimática de  $\alpha$ -amilasa.

## Discusión:

Para empezar, se ha de aclarar que las diluciones óptimas para salivas de diferentes personas son distintas porque las características y concentraciones de los compuestos varían de una persona a otra. Esto mismo ocurre con el pH salival y el tiempo de referencia.

El rango de 2 a 8 minutos para el efecto acromático elegido se debe a que los tiempos sean manejables en el trabajo práctico. Si se buscara un tiempo de referencia muy pequeño, los cambios no hubiesen sido apreciados.

Por los experimentos que realizamos en el TP, no se puede conocer la forma en que el NaCl aumenta la actividad de la enzima, sin embargo, una vez finalizado el TP, nos informaron que recientes descubrimientos dieron a conocer que la  $\alpha$ -amilasa contiene en los restos aminoacídicos de su sitio

activo  $\text{Cl}^-$ , y por ello, al agregar  $\text{NaCl}$ , los aniones cloruro se unen al sitio activo aumentando la actividad enzimática. Es decir, el cloro actúa como cofactor de la enzima.

La *proteínasa K* es una proteasa, es decir, tiene una actividad específica la cual consiste en degradar proteínas. La misma actúa rompiendo los enlaces débiles del polipéptido, hasta que adquiere su estructura primaria y, por lo tanto, pierda su funcionalidad.

La *proteínasa K* (100  $\mu\text{l}$ , disuelta en una solución acuosa con buffer) se incubó con la dilución de saliva (1 ml) durante 1h. a 50 grados Celsius (todo este proceso es el pre-tratamiento de la dilución). Luego de este lapso de tiempo se agrega la saliva tratada con *proteínasa K* a los 10 ml de almidón y se repite el procedimiento para la determinación de la actividad enzimática realizado en la Parte 1.

Al ser la  $\alpha$ -amilasa una proteína, uno esperaría que la *proteínasa K* haga perder su funcionalidad. Sin embargo, esto no ocurrió, puesto que luego de un determinado período de tiempo se observó el efecto acromático, es decir, la  $\alpha$ -amilasa estaba actuando. Esto se puede explicar de diversas maneras. Por ejemplo, nunca averiguamos la concentración de la enzima en la saliva, por lo tanto, tal vez era muy superior a la de la *proteínasa K* y por eso no llegó a cumplir su función. De la misma manera, hay que tener en cuenta el período de incubación. Tal vez no fue suficiente para que la *proteínasa K* degrade a la  $\alpha$ -amilasa.

Por último, cabe aclarar que se efectuó un control de reacción para no concluir erróneamente. Se colocó en un tubo una dilución de saliva pero son sólo el buffer, para asegurarnos que no haya agentes externos que afecten los resultados.

En el *pre-tratamiento de la enzima a una temperatura de 100 ° C* durante 10 minutos se trató previamente a la dilución óptima de saliva 1/50 durante 7 minutos en un baño de agua a 100° C, pero al medir la actividad enzimática, con el mismo procedimiento descrito en la parte 1, no se observó ningún cambio del color azul, (por lo que se puede decir que no se produjo el efecto acromático), durante 7 minutos ( que es el tiempo de referencia obtenido por el grupo 2 con pH salival entre 7 y 8). A partir de los resultados obtenidos se podría deducir que la  $\alpha$ -amilasa se desnaturaliza al ser expuesta a una temperatura tan elevada, ya que se produce un exceso de choques entre las moléculas presentes en la saliva como consecuencia del aumento de la energía cinética, produciendo la ruptura de las uniones débiles (como puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas), que afecta la estructura terciaria de la enzima y a su vez la conformación de su sitio activo, perdiendo la capacidad de romper las uniones C1-C4 de las glucosas. Y es por esto que el color azul no desaparece en los tubos de ensayo.

Con respecto a la *influencia del pH del medio en la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa*, podemos decir que a pH extremos (es decir, muy ácidos o muy básicos) la enzima no funciona, o al menos disminuye notablemente su actividad. Esto podemos concluir a partir de los experimentos realizados por otros grupos, que, manteniendo el resto de las condiciones iniciales, midieron la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en dos medios con pH extremos.

El grupo 4 había encontrado un tiempo de referencia de 6 minutos (aparición del efecto acromático) para su dilución óptima y un pH salival de entre 6 y 7. Sin embargo, a un pH 2 (más ácido), no encontró cambios (es decir, no hubo

efecto acromático) en 10 minutos de reacción. Algo parecido ocurrió con el grupo 12, que había encontrado un tiempo de referencia de 1' 30'' para un pH salival de entre 7 y 8, y cuando repitió el experimento en un medio con pH 12 (más básico) no hubo efecto acromático en 4 minutos de reacción.

Todas las enzimas tienen un pH óptimo, en donde tienen mayor actividad, y a medida que se alejan de ese pH (para ambos lados) disminuyen su actividad. Esto se debe a que algunos restos aminoacídicos de las enzimas (en el caso de que sean proteínas) tienen cargas y pueden ser los responsables tanto de mantener la estructura tridimensional de la proteína como de interaccionar con el sustrato. El pH del medio (es decir, la presencia de iones  $H^+$  u  $OH^-$ ) puede modificar las cargas de estos aminoácidos y de este modo incluso desnaturalizar a la enzima.

Debemos aclarar que aunque la enzima tenga actividad al pH salival de cada persona (siempre entre 6 y 8, según la tabla), esto no quiere decir que éste sea su pH óptimo. Para determinarlo experimentalmente, deberíamos haber medido la actividad enzimática a diferentes pH para realizar una curva, pero no podemos determinar el pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa a partir de los resultados de este TP.

En el tratamiento del *efecto de la temperatura*, se mide la actividad enzimática como se efectuó en la parte 1, pero incubando la reacción a temperaturas diferentes de 37° C: a 0° C, a temperatura ambiente y a 70° C.

A 0° C y a 70° C, no se presentaron cambios de color en los tubos de la gradilla, es decir que el color azul nunca desapareció. Por lo tanto, se podría decir que la  $\alpha$ -amilasa no actuó. En cambio, a temperatura ambiente sí se presentaron cambios, pero en un tiempo mayor al de referencia del grupo que lo realizó. Esto era de esperarse, ya que cada enzima tiene un rango de temperatura óptima y, en el caso de la  $\alpha$ -amilasa, al encontrarse ésta en el cuerpo humano (que siempre tiene una temperatura de 37° C), se supone que a temperatura ambiente no va a perder su actividad, pero sí disminuirla, ya que los choques intermoleculares van a ser menores.

Sin embargo, al disminuir demasiado la temperatura, los choques entre las moléculas disminuyen también, por lo que la actividad enzimática baja hasta el punto en el que no se puede ver en el experimento. Por el contrario, al aumentar la temperatura de incubación a 70° C, los choques entre las moléculas se van a acrecentar de tal forma que la enzima se va a desnaturalizar. Es por ello que se presume que no se observaron cambios en los tubos.