

OBTENCIO , PURIFICACIO I DETERMINACIO DE L'ENZIM
ALFA - AMILASA

Carme Zaragoza i Josep Maria Fernández

Un enzim es una proteïna que amb la seva estructura , com a mínim terciària , catalitza , accelerant una determinada reacció que es desenvolupa en els organismes i en últim lloc en la cèl.lula.

L'alfa-amilasa es un enzim que trenca els enllacos glicosídics (1-4) de les cadenes de polisacàrids com el midó i el glicògen . Hom troba aquest enzim en les secrecions pancreàtiques i saliva.

MATERIALS I METODES

OBTENCIO DE L'ALFA-AMILASA

- 10 ml de saliva humana
- Sulfat amònic
- Fosfat monosòdic
- Acetona
- Centrífuga
- pH-metre

PURIFICACIO DE L'ENZIM

- Sephadex G-25
- Mescla de dicromat potàssic i blau dextrà
- Tampó fosfat
- Pipeta de 10 ml o Bureta de 25 ml
- Tubs capil.lars o pipetes Pasteur

DETERMINACIO DE L'ENZIM

- Reactiu de Biuret
- Midó soluble
- Bany Maria
- Reactiu Fheling A
- Reactiu Fheling B
- Reactiu de Benedict

Preparació de les dissolucions :

Dissolució BUFFERADA DE SULFAT AMONIC , 0,1 M. Es prepara amb 100 ml. de TAMPÓ aquosi aproximadament 50 - 70 g de sulfat amonic i es dissoluen en 120 - 130 ml d'aigua destil·lada . Després neutralitzarem amb hidròxid amonic fins a pH 7,0.

Solució TAMPÓ DE FOSFAT MONODIBÀSIC 0,1 M neutralitzada fins a pH 6,9

100 µg de dicromat potàssic i blau de tria , en 1 ml d'aigua destil·lada afegim un gotic de cada una , aproximadament són 50 - 100 µg

PROCEDIMENT :

- 1 Recollir uns 10 ml de saliva humana.
- 1 Centrifugar a 3.300 r.p.m. 15 minuts.
- 1 Recollir el sobrenadant i mesclar amb un volum igual d'acetona a tornac a centrifugar 15 minuts a 3.300 r.p.m.
- 1 Repetir el sobrenadant i mesclar amb igual volum de solució bufferada de sulfat amonic a pH 7,0 , doncs a aquest pH i concentració de sal PRECIPITA l'alfa-amilasa
- 1 Centrifugem 10 minuts a 3.300 r.p.m. per separar el precipitat de l'enzim.
- 1 Dissolvent el precipitat amb 1 ml de solució tampó fosfat a pH 6,9

-1 PURIFICACIO de l'enzim per separació en columna de Sephadex G-20 (segons protocol "Cromatografia de filtració en gel"). Nom s'ha aprofitat resultat utilitzant com a columna una bureta que té una capacitat de 10 ml.

Així obtenim uns 2-3 ml de solució de l'enzim en tampó fosfat a pH sense el sulfat amonic.

DETERMINACIO DE L'ENZIM ALFA - AMILASA

- 1 SECRET (per determinar que hi ha proteïna) es fa en :
SALIVA HUMANA ++++
PRECIPITAT DE LA MESCLA AMB SULFAT AMONIC
DISSOL AMB TAMPÓ FOSFAT ++
ELUIT DE LA COLUMNA DE SEPHADEX +

-) ACTIVITAT ENZIMÀTICA amb aquest enzim prencem les cadenes de midó i de glicogen, incubarem una dissolució de midó soluble amb para de l'enzim obtingut i mesurem si en el llarg del temps es formen glucosa i maltosa segons:

1 ml de solució de midó amb 0,5 ml d'enzim

1 ml de solució de midó amb 0,5 ml d'aigua (blanc)

Incubem 1 hora a 30°C

COMPROVEM la presència i per tant la formació dels glucids, glucosa i maltosa, pels mètodes de Benedict i de Felhing, que ens dona només en la incubació amb l'enzim i no pas en el blanc.

CONCLUSIONS:

Aquesta experiència pot desenvolupar-se tota sencera o be preponderarà d'algunes parts (purificació amb columna de cromatografia o el Biuret o l'activitat enzimàtica ...)

Si es fa tota sencera, pot ocupar part de les pràctiques de química, doncs inclou preparació de dissolucions tant de concentració com saturades, treball amb el pH-metre i també és possible treballar amb un colorímetre així com les separacions de substàncies i les reaccions implicades.



Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
**Direcció General d'Ordenació
i Innovació Educativa**

Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

(328(4))

Preparació del SEPHADEX G-25

(Pharmacia Iberica

Crtra. de Gràcia a Manresa, km 15

08190 S.CUGAT VALLES

Es prepara una dissolució 1:3 (pes-volum) en aigua, uns
30ml. si es per una bureta i uns 10 ml si es per una pipeta.

Un cop utilitzada es guarda en molta aigua, amb 4-5 gotes de
bactericida, p.e. azida sòdica al 0,2%, a la nevera.