

## 23. Hidrólisis ácida y enzimática del glucógeno

**Emilia Martínez Galisteo, Carmen Alicia Padilla Peña,  
Concepción García Alfonso, José Antonio Bárcena Ruiz,  
Jesús Diez Dapena.**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

### RESUMEN

El glucógeno posee una estructura ramificada con cadenas lineales de restos consecutivos de glucosa, unidos por enlaces  $\alpha(1-4)$ , y por enlaces  $\alpha(1-6)$  en los puntos de ramificación. El resultado es una estructura en abanico con un extremo reductor y muchos no reductores. La hidrólisis de estos enlaces glucosídicos puede ser catalizada por ácidos minerales o enzimas. En la hidrólisis ácida los enlaces se rompen al azar, con formación intermedia de todos los posibles oligosacáridos y la conversión final de éstos en glucosa. La hidrólisis de los enlaces glucosídicos del glucógeno puede ser también llevada a cabo por la enzima  $\alpha$ -amilasa, que cataliza la hidrólisis específica de los enlaces  $\alpha(1-4)$  (no son afectados los enlaces  $\alpha(1-6)$ ). Los productos finales de la hidrólisis enzimática del glucógeno son glucosa, maltosa e isomaltosa.

*Título corto:* Hidrólisis del glucógeno.

*Palabras clave:* ácido clorhídrico,  $\alpha$ -amilasa, glucógeno, hidrólisis.

*Abreviaturas empleadas.* DNS: ácido 3'-5'-dinitrosalicílico.

### 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El glucógeno es la forma de almacenamiento de la glucosa en los tejidos animales. Se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo representando hasta un 10% y un 1-2% de su peso húmedo, respectivamente.

El glucógeno posee una estructura ramificada con cadenas lineales de restos consecutivos de glucosa, unidos por enlaces  $\alpha(1-4)$ , y por enlaces  $\alpha(1-6)$  en los puntos de ramificación. La hidrólisis de estos enlaces glucosídicos puede ser catalizada por ácidos minerales. Éstos rompen enlaces al azar, con formación intermedia de todos los posibles oligosacáridos y la conversión final de éstos en glucosa.

La naturaleza polisacárida del glucógeno se pone de manifiesto demostrando el aumento de grupos reductores durante la hidrólisis, que se detectan mediante el reactivo 3'-5'-dinitrosalicílico (3'-5'-DNS). Este reactivo en presencia de azúcares reductores se reduce a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico (producto coloreado que absorbe a 540 nm).

Existen numerosas enzimas que catalizan hidrólisis más específicas, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de la saliva humana. Esta enzima cataliza la hidrólisis rápida, al azar, de los enlaces internos  $\alpha(1-4)$ . No hidrolizan, en cambio, los enlaces  $\alpha(1-6)$  ni la maltosa. Los productos finales de la degradación del glucógeno por la  $\alpha$ -amilasa son glucosa, maltosa e isomaltosa. Esta hidrólisis se sigue igual que la ácida, es decir, mediante la reducción de 3'-5'-dinitrosalicílico a 3-amino-5-dinitrosalicílico (producto coloreado que absorbe a 540 nm).

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

### **2.1. Equipamiento**

Colorímetro.  
Baño con agua hirviendo.  
Agitador de tubos.

### **2.2. Material**

Tubos de ensayo de vidrio (1,5 x 16,0 cm) y gradilla.  
Pipetas automáticas (0,1 y 1,0 mL).  
Pipetas de vidrio (10 mL).  
Propipeta.  
Cronómetro.  
Rotulador de vidrio.

### **2.3. Reactivos**

Solución de ácido clorhídrico.  
Solución de hidróxido sódico.  
Reactivo 3'-5'-dinitrosalicílico (3'-5'-DNS).  
Solución de glucógeno comercial.  
Solución de  $\alpha$ -amilasa de saliva humana.  
Agua destilada.  
Solución amortiguadora de fosfato sódico

## **3. PROTOCOLO A REALIZAR**

### **3.1. Hidrólisis ácida del glucógeno**

**3.1.1.** Se preparan 8 tubos de ensayo de vidrio y se marcan del 1 al 8. Se añaden a cada uno de ellos el glucógeno (excepto al primero que lleva agua) y la solución de HCl según se detalla en la Tabla 1:

Tubo (nº)	Agua (mL)	Glucógeno (mL)	HCl (2 M)	Tiempo de incubación a100°C	NaOH (1,2 M)	3'5'DNS (mL)
1	0,4	----	0,6	0 min	1,0	1,0
2	----	0,4	0,6	0 min	1,0	1,0
3	----	0,4	0,6	2 min	1,0	1,0
4	----	0,4	0,6	4 min	1,0	1,0
5	----	0,4	0,6	6 min	1,0	1,0
6	----	0,4	0,6	8 min	1,0	1,0
7	----	0,4	0,6	10 min	1,0	1,0
8	----	0,4	0,6	12 min	1,0	1,0

Añadir el reactivo 3'5'DNS una vez finalizados los 12 min de incubación.

- 3.1.2. Se colocan los tubos 3 a 8 en un baño de agua hirviendo para que transcurra la reacción. Los tubos 1 y 2 no se meten en el baño. A los tiempos indicados en la Tabla 1, se saca cada tubo y se le añade el NaOH, que neutraliza la acción del HCl, y por tanto se detiene la hidrólisis. Se agita fuertemente.
- 3.1.3. Se dejan reposar los tubos en una gradilla a temperatura ambiente hasta que concluye la última incubación.
- 3.1.4. Se añade el reactivo 3'5'DNS a todos los tubos y se introducen de nuevo en el baño hirviendo durante 5 minutos. En estas condiciones, el 3'5'DNS reacciona con los grupos reductores y se convierte en 3-amino-5-dinitrosalicílico.
- 3.1.5. Pasado este tiempo, se enfrían con agua del grifo.
- 3.1.6. Después de enfriados, se completan hasta 10 mL con agua destilada.
- 3.1.7. Se mide la absorbancia a 540 nm, ajustando a 0 con el tubo nº 1, que se emplea como blanco.

### 3.2. Hidrólisis enzimática del glucógeno

- 3.2.1. Se preparan 8 tubos de ensayo de vidrio y se marcan del 1 al 8. Se añade a cada uno de ellos el glucógeno (excepto al primero que lleva agua), la  $\alpha$ -amilasa y el reactivo DNS a los tiempos indicados en la Tabla 2. El DNS se utiliza para detener la reacción enzimática. La reacción de hidrólisis del glucógeno se realiza a temperatura ambiente, manteniendo los reactivos que se utilizan a la misma temperatura.

Tubo (nº)	Agua (mL)	Glucógeno (mL)	$\alpha$ -amilasa (mL)	Tiempo de incubación	3'5' DNS (mL)
1	0,4	----	0,5	0 min	1,0
2	----	0,4	0,5	0 min	1,0
3	----	0,4	0,5	1 min	1,0
4	----	0,4	0,5	2 min	1,0
5	----	0,4	0,5	3 min	1,0
6	----	0,4	0,5	4 min	1,0
7	----	0,4	0,5	5 min	1,0
8	----	0,4	0,5	6 min	1,0

- 3.2.2. Cuando todos los tubos contengan 3'5'-DNS, se llevan a un baño de agua hirviendo y se dejan en él 5 minutos. En estas condiciones, el DNS reacciona con los grupos reductores y se convierte en 3-amino-5-dinitrosalicílico.

- 3.2.3.** Pasado este tiempo, se enfrían los tubos bajo el grifo
- 3.2.4. Una vez** enfriados, se completan los tubos hasta un volumen final de 10 mL con agua destilada. Mezclar bien.
- 3.2.5.** Se mide la absorbancia a 540 nm ajustando a 0 con el tubo nº 1, que se emplea como blanco.

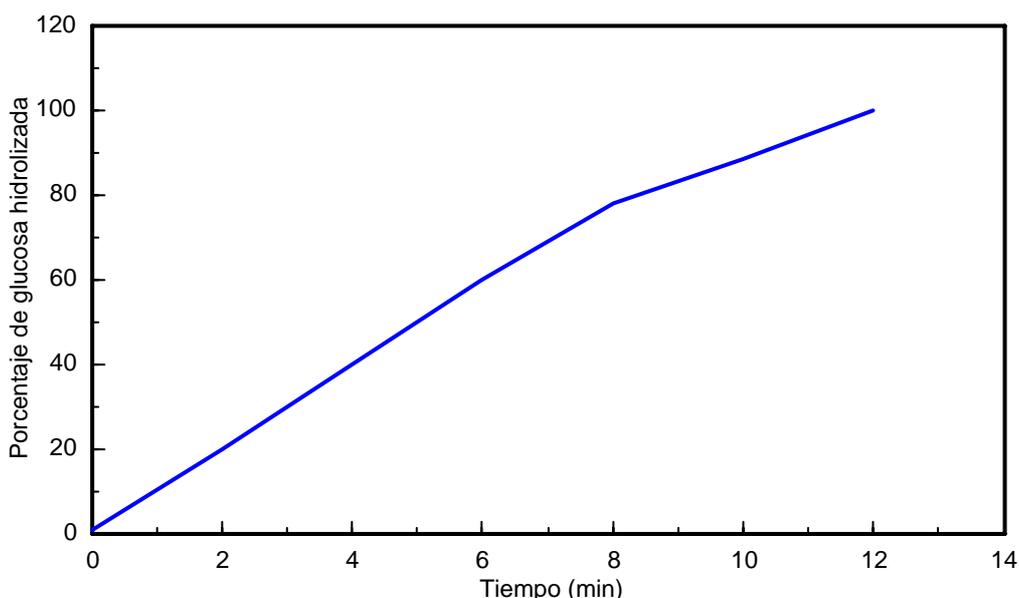
### 3. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados de absorbancia a 540 nm van incrementándose desde el tubo 1 al 8, tanto en la hidrólisis ácida (Tabla 3; Figura 1) como enzimática (Tabla 4; Figura 2) pues a mayor tiempo transcurrido habrá mayor hidrólisis de glucógeno y por tanto mayor número de grupos reductores que reaccionan con el DNS y se convierten en 3-amino-5-dinitrosalicílico, compuesto anaranjado que tiene su máximo de absorbancia a 540 nm.

En ambos casos, se muestran tanto los valores de absorbancia obtenidos como los porcentajes de hidrólisis respecto al tiempo, considerando el 100 % de hidrólisis la del tubo 8. La representación se hace con los porcentajes de hidrólisis de glucógeno y el tiempo transcurrido.

#### 3.1. Hidrólisis ácida

Tabla 3. Resultados de hidrólisis ácida								
Tubo (nº)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo (min)	0	0	2	4	6	8	10	12
A540 (nm)	0	0,01	0,260	0,520	0,780	1,01	1,150	1,30
%	0	0,77	20	40	60	77,7	88,5	100



**Figura 1.** Representación gráfica de los resultados obtenidos y detallados en la Tabla 3

### 3.2. Hidrólisis enzimática

Tubo (nº)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo (min)	0	0	1	2	3	4	5	6
A540 (nm)	0	0,01	0,13	0,24	0,35	0,46	0,54	0,60
%	0	1,67	22	40	58	77	90	100

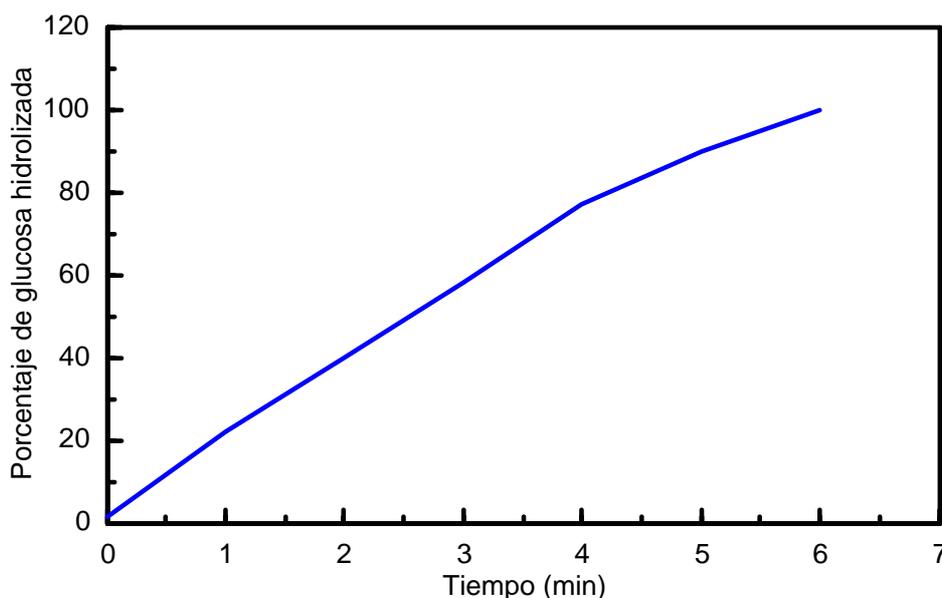


Figura 2. Representación gráfica de los resultados obtenidos y detallados en la Tabla 4

### 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos tanto en la hidrólisis ácida como enzimática deben corresponderse con un aumento de dicha hidrólisis a lo largo del tiempo. Este aumento debe ser proporcional, aunque ésta puede perderse en los últimos minutos si ya se ha conseguido hidrolizar prácticamente todo el glucógeno de la muestra. También se puede perder la proporcionalidad si no se añade el NaOH, en el caso de la hidrólisis ácida, o el DNS, en el de la hidrólisis enzimática, en los tiempos indicados pues no se pararía la hidrólisis de glucógeno de forma adecuada.

Existe una diferencia clara entre los valores de absorbancia a 540 nm obtenidos para la hidrólisis ácida y enzimática, siendo mucho mayores los primeros. Esto, lógicamente, es debido a que con la hidrólisis ácida se consiguen hidrolizar todos los enlaces del glucógeno mientras que con la  $\alpha$ -amilasa sólo los  $\alpha(1-4)$ .

A los alumnos al finalizar la parte práctica, se les entregará un folio donde tendrán que mostrar los resultados obtenidos en ambas hidrólisis y representar los porcentajes. Además, tendrán que contestar varias preguntas para evaluar su aprovechamiento y comprensión de la práctica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Clark JM (1966): "Bioquímica Experimental", 1ª ed. Editorial Acribia (Zaragoza, España), pp 42-45.
- Nelson DL, Cox MM (2001): "Principios de Bioquímica", 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 304-305.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003): "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp 577-580.

## ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Solución de HCl 2M

<b>Tabla 5. Solución HCl</b>	
HCl	167,02 mL
Agua destilada	Hasta 1 litro

El HCl contiene una pureza del 35% y una densidad igual a 1,18

Solución de NaOH 1,2 M

<b>Tabla 6. Solución NaOH</b>	
NaOH	48 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Solución amortiguadora: tampón fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,005 M pH 7,0

<b>Tabla 7. Tampón fosfato sódico pH 7,0</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,70 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,59 g
NaCl	0,30 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 7,0 si fuera necesario

Solución de glucógeno comercial (8 mg/mL)

<b>Tabla 8. Solución glucógeno comercial</b>	
Glucógeno	80 mg
Fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,005 M pH 7,0	Hasta 10 mL

Reactivo DNS: se elabora a partir de las siguientes soluciones tal y como se describe en la Tabla 12:

Solución de NaOH 2,0 M

<b>Tabla 9. Solución NaOH</b>	
NaOH	80 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

## Solución de 3'-5'-DNS

<b>Tabla 10. Solución de 3'-5'-DNS</b>	
Ácido dinitrosalicílico	10 g
NaOH 2,0 M	Hasta 200 mL

Calentar hasta la disolución total.

## Solución de tartrato sódico potásico:

<b>Tabla 11. Solución de tartrato NaK-4H<sub>2</sub>O</b>	
Tartrato NaK-4H <sub>2</sub> O	402,7 g
Agua destilada	Hasta 500 mL

Calentar hasta la disolución total.

## Reactivo 3'-5'-DNS

<b>Tabla 12. Reactivo DNS</b>	
Solución de 3'-5'-DNS	200 mL g
Solución tartrato NaK-4H <sub>2</sub> O	500 mL
Agua destilada	Hasta 1 litro

## Solución de $\alpha$ -amilasa

<b>Tabla 13. Solución de <math>\alpha</math>-amilasa</b>	
Saliva humana	0,25 mL
Solución de fosfato sódico pH 7,0	Hasta 20 mL

Cada individuo elaborará la solución de alfa amilasa con su propia saliva y la utilizará inmediatamente después de ser diluida. Debido a su variabilidad entre individuos, reajustar la dilución si fuera necesario