

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Wybrane metody oznaczania enzymów: amylazy

Enzym amylaza jest głównym białkiem śliny. Znanych są trzy rodzaje amylaz, które różnią się między sobą zarówno rodzajem katalizowanych wiązań, jak i miejscem działania na cząsteczkę substratu, a także końcowym produktem reakcji.

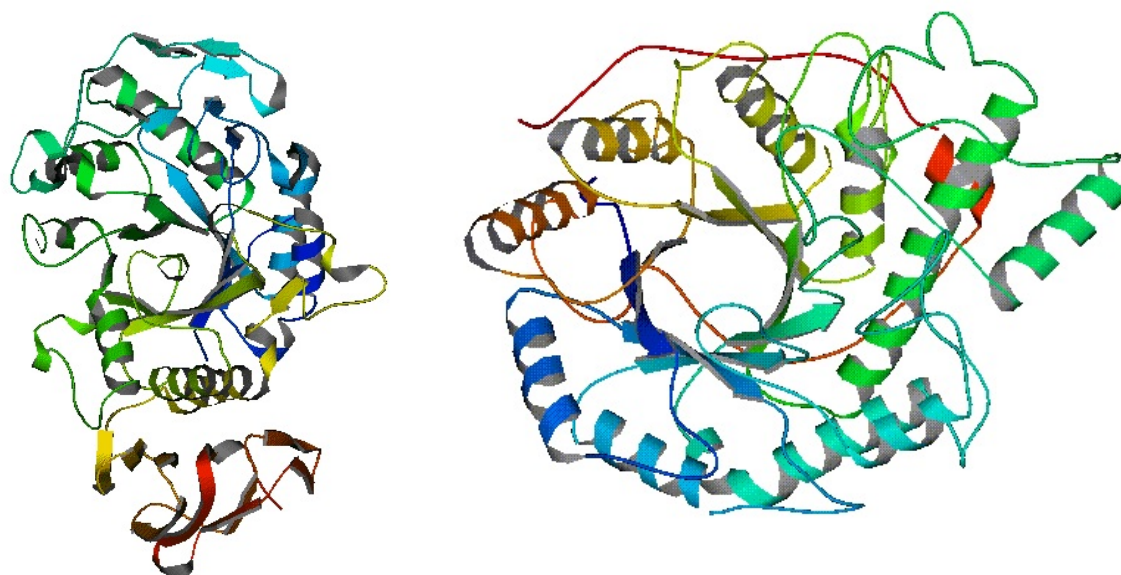
W drobnoustrojach i organizmach roślinnych występuje amylaza α i β , zaś w tkankach zwierzęcych i ludzkich: amylazy α i γ [5]. W ślinie występuje głównie α -amylaza, a także niewielkie ilości β -amylazy, która jest pochodzenia bakteryjnego. Wytwarzanie enzymu odbywa się w komórkach groniastych i przyległych przewodach surowiczych gron gruczołów ślinowych, w związku z czym

synteza amylazy odbywa się głównie w gruczołach przyuszcniczych, a w mniejszej ilości w gruczołach podżuchwowych. W śladowej ilości amylaza wytwarzana jest też w gruczołach podjęzykowych [5].

Amylazy zaliczane są do enzymów hydrolitycznie rozkładających skrobię, glikogen i pokrewne cukry. Wśród tych enzymów wyróżnia się 3 główne grupy tj.:

- α -amylazy, zwane również endoamylazami, których zadaniem jest rozszczepianie wiązań wewnątrz cząsteczek substratu. Mechanizm ten zachodzi w sposób przypadkowy. α -amylazy rozkładają amylopektynę, amylozę i glikogen do mniejszych cząsteczek, zwanych dekstrynami. Końcowymi produktami hydrolizy są małych cząsteczkowe dekstryny, które zazwyczaj zawierają jedno wiązanie $\alpha,1\rightarrow6$ -glikozydowe, maltoza i glukoza. W skład α -amylaz wchodzi wapń, który jest czynnikiem stabilizującym enzym, a także to właśnie wapń odpowiada za aktywną konformację enzymu.
- β -amylazy (agzoamylazy), które hydrolizują co drugie wiązanie od nieredukującego końca substratu. Beta-amylazy występują u roślin wyższych, nie stwierdzono ich obecności u zwierząt. Ich zadaniem jest uwalnianie cząsteczek maltozy z rozkładanych związków.
- glukoamylazy (egzoamylazy), hydrolizujące kolejne każde wiązanie od nieredukującego końca substratu (usuwiają kolejne reszty glukozy z substratu) . Są enzymami występującymi zarówno u roślin, zwierząt jak i bakterii [1].

Dobór odpowiedniej metody oznaczanie aktywności amylolitycznej zależy od rodzaju badanego enzymu, gdyż inaczej oznacza się α -amylazy, a inaczej β -amylazy. Do oznaczenia aktywności α -amylazy można użyć metod, które opierają się na pomiarze zaniku zabarwienia z jodem, lub zmniejszenia lepkości, a także metod opierających się na pomiarze uwolnionych grup redukcyjnych. β -amylazy, glukoamylazy, a także mieszaniny różnych enzymów amylolitycznych najlepiej oznaczać przez pomiar uwolnionych grup redukcyjnych [1].



Zdjęcie: (od lewej) α -amylaza, <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1aqm.html>, oraz β -amylaza, <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bya.html>

Ekstrakcja α -amylazy (wg Farid M.A.F. i wsp., 2011)

W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano zdolność bakterii *Aspergillus* sp. i *Trichoderma* sp. do produkcji amylazy w trakcie fermentacji.

Ekstrakcja enzymu:

Na koniec procesu fermentacji, biomasę potraktowano 0,02 M buforem fosforanowym, pH = 6 (10 ml / g substancji stałej) i dokładnie wymieszano na wytrząsarce obrotowej przez 30 minut. Całą zawartość przesączono i wirowano przy 4000 obrotach/min w 4°C przez 10 minut. Otrzymany klarowny nadsącz przechowywano w temperaturze 4°C - stanowił on źródło enzymu [2].

Oznaczanie aktywności enzymatycznej:

W przeprowadzonym doświadczeniu Farid M.A.F i wsp. (2011) oznaczali aktywność amylazy wg procedury zaproponowanej przez Jamieson i wsp. (1969) z wykorzystaniem rozpuszczalnej skrobi jako substratu. Mieszaninę reakcyjną zawierającą: 250ul 1% substratu (w/v) w 0,02 M buforze fosforanowym (pH =6) z dodatkiem 250ul odpowiednio rozcieńczonego roztworu enzymu, inkubowano przez 5 minut w temperaturze 55 ° C. Reakcję zatrzymano dodając 500ul kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (1mg/ml), a następnie przez ogrzewanie w łaźni z wrzącą wodą przez 5 minut. Po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej, do próbki dodano 10 ml wody destylowanej. Absorbancję każdego roztworu zawierającego brunatny produkt redukcji mierzono przy $\lambda=470\text{nm}$. Jedną jednostkę aktywności enzymatycznej zdefiniowano jako Ilość białka, która wytwarza 1 umol cukrów redukujących (maltozę) na minutę w warunkach doświadczenia [2].

Ekstrakcja α -amylazy z przewodu pokarmowego dorosłych tropikalnych świerszczy bananowych (*Grylloides sigillatus*) (Kouadio E.J.P. i wsp., 2012)

Surowy ekstrakt enzymu otrzymano według procedury opisanej przez Kouadio i wsp. (2010). Dorosłe świerszcze przemyto wodą destylowaną, a następnie usunięto (odcięto) ich przewód pokarmowy. Następnie, próbkę z przewodem pokarmowym świerszczy (10 g) poddano homogenizacji w 20 ml buforu fosforanowego (100mM, pH=6,6) z dodatkiem 0,9% roztworu NaCl. Homogenat poddano sonikacji przez 10 minut, a następnie wirowaniu przy 6000 rpm przez 20 minut w temperaturze 4°C. Powstały po wirowaniu supernatant zawiera ekstrakt enzymu, w związku z czym należy go przechowywać w temperaturze 4°C [4].

Oczyszczanie enzymu:

Enzym oczyszczano wg metody opisanej przez Kouadio i wsp. (2010). Wszystkie etapy oczyszczania przeprowadzono w komorze chłodniczej.

Surowy ekstrakt enzymu (15 ml) nasycono 80% siarczanem amonu, w temperaturze 4°C i pozostawiono na 24 godziny (z delikatnym mieszaniem). Następnie, zawiesinę wirowano przez 30 minut przy 6000 x g. Wytrącone po wirowaniu białko rozpuszczono w 1 ml 20 mM buforu fosforanowego (pH 6,6), a następnie naniesiono na kolumnę chromatograficzną (Sephacryl S -100

HR) o wymiarach 1,6 x 65 cm. Kolumnę zrównoważono (equilibrowano) 100 mM buforem fosforanowym o pH= 6,6. Przepływ kolumny wynosił 20 ml / godzinę (zbierano 1ml frakcje). Zebrane frakcje - zawierające aktywną amylazę połączono w jedną próbkę, po czym frakcję amylazy naniesiono na kolumnę DEAE-Sepharose CL-6B (o wymiarach 2,2 x 7,3 cm). Kolumnę wcześniej zrównoważono buforem fosforanowym (jak wyżej).

Niezwiązane białka usunięto przez przemywanie żelu 60 ml buforu równoważącego. Związane białka wmywano stosując stopniowy gradient NaCl: od 0,2M do 1 M w 60 ml porcjach buforu do równoważenia. Szybkość przepływu w kolumnie wynosiła 103 ml / h (zbierano 2 ml frakcje). Niezwiązaną amylazę spółowano, a następnie nasycano do końcowego stężenia 1,7 M za pomocą soli sodowej tiosiarczanu. Następnie, próbkę naniesiono na kolumnę Phenyl-Sepharose 6 (o wymiarach 1,4 x 5 cm), uprzednio zrównoważoną 20 mM buforem fosforanowym o pH=6,6 (zawierającym 1,7 M roztworu tiosiarczanu sodu). Kolumnę przemyto buforem do równoważenia, a dalej eluowano z niej białka wykorzystując odwrotny stopień gradientu stężenia tiosiarczanu sodu (z 1,7M do 0 M), w tym samym buforze fosforanowym przy szybkości przepływu 69 ml / h. Eluowane białka zbierano w 1 ml frakcje, które połączono, a dalej dializowano przez noc wobec 20mM buforu fosforanowego o pH=6.6. Otrzymaną frakcję uznano za oczyszczony enzym. Związane amylazy eluowano z DEAE-Sepharose CL-6B, również nasyconym do końcowego stężenia 1,7 M roztworem tiosiarczanu sodu, próbki naniesiono na kolumnę Phenyl-Sepharose, jak to opisano powyżej.

Frakcje aktywne połączono i dializowano przez noc wobec 20 mM buforu fosforanowego o pH=6,6. Otrzymane frakcje uznano jako oczyszczony enzym [4].

Podobnie jak inne enzymy, tak i amylazy mają powiązanie z wieloma jednostkami chorobowymi, w związku z czym są enzymami ciągle poddawanych badaniom. I tak, badania przeprowadzone przez Natur U.M. i wsp. (2005) wykazały, że wzrost stężenie α -amylazy w ślinie wiąże się ze stresem psychospołecznym, co wskazuje na aktywację alfa-amylazy w ślinie zależną od stresu. Ponieważ alfa-amylaza nie wydaje się być ściśle związana z innymi biologicznymi markerami stresowymi, takimi jak m.in. katecholamina czy kortyzol, α -amylaza śliny może być użyteczna jako dodatkowy parametr do pomiaru stresu [7].

Oznaczanie aktywności α -amylazy w ślinie

Do cylindra miarowego z korkiem należy zebrać 2 ml śliny, po czym rozcieńczyć ją wodą do objętości 20 ml. Całość próbki dokładnie wymieszać w celu ujednoczenia stężenia w całej objętości, po czym próbkę odstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie, do zwykłej próbki odmierzyć po: 5 ml 0.5% roztworu skrobi, 2 ml 1% roztworu NaCl oraz 2 ml buforu fosforanowego. Próbkę wymieszać i również inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez co najmniej 5 minut.

W statywie przygotować 10 próbek, do których odmierzyć po 0.5 ml odczynnika Lugola i 0.5 ml 1M HCl. Po co najmniej 5 minutach inkubowania cylindra oraz próbki w temperaturze 37°C, do próbki dodać pipetą 1 ml roztworu śliny. Całość zamieszać (w celu ujednoczenia stężenia enzymu w całej objętości) i zanotować czas rozpoczęcia kontaktu enzymu z substratem skrobiowym. Etap ten prowadzić w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. W krótkich odstępach czasu tj: od 0.5 min. do 1 min. do 10 próbek zawierających płyn Lugola należy wprowadzać pipetą po 2-3 krople próbki hydrolizatu z próbki- cały czas obserwować przebieg reakcji barwnej z jodem (hydrolizat dodawać do kolejnych próbek tylko do momentu, aż nie zaobserwuje się już zmiany barwy roztworu jodu). Brak zmiany barwy w próbce z roztworem jodu będzie świadczyć o osiągnięciu punktu achromowego [6].

Aktywność amylazy w ślinie w jednostkach/ ml

W powyższym doświadczeniu za jednostkę aktywności amylazy przyjmujemy się taką ilość enzymu, która hydrolizuje 25 mg skrobi w czasie 10 minut i w temp. 37°C (pH=6.6) w obecności jonów chlorkowych, do produktów nie dających barwy z jodem, np.: jeśli w doświadczeniu pobrano 1 ml 10x rozcieńczonej śliny, a punkt achromowy osiągnięto po upływie 5 minut, to aktywność amylazy należy obliczyć w następujący sposób: $10/5 \times 10 = 20$ jednostek/ml [6].

Oznaczanie aktywności α -amylazy metodą Heinkela [1].

W metodzie tej oznaczeniu poddaje się ilość rozłożonego substratu (skrobi) na podstawie stopnia zmniejszenia się zabarwienia z jodem. Otrzymane wyniki podaje się w jednostkach Wohlgemutha. Jednostka Wohlgemutha oznacza taką aktywność amylazy w 1 ml badanego roztworu (surowicy, moczu), która w ciągu 30 minut i w temperaturze 37°C, rozkłada 1 mg skrobi do produktów nie dających zabarwienia z jodem. Cały proces zachodzi w obecności jonów chlorkowych [1].

Substrat skrobiowy: 0,5 g skrobi, 1 g NaCl, 2 g cytrynianu sodu należy zawiesić w 10 ml zimnej wody, całość wlać do 90 ml wrzącej wody- próbkę mieszać aż do momentu całkowitego rozpuszczenia, a na koniec dodać 1 g benzoesu sodu- konserwacja próbki.

Wykonanie:

1. 2.4 ml substratu skrobiowego należy umieścić w probówce i ogrzać do temperatury 37°C przez 10 minut w łaźni wodnej.
2. Po inkubacji dodać 0,1 ml surowicy lub moczu, próbkę ponownie ogrzewać w 37°C przez 30 minut. Następnie, dodać 2,5 ml 20% kwasu sulfosalicylowego, a po kilku minutach próbkę przesączyć.
3. Równolegle wykonać próbę kontrolną, biorąc w tym celu 2,4 ml substratu, 0,1 ml surowicy (lub moczu) oraz 2,5 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego (w kontroli pomija się etap inkubacji przed dodaniem kwasu)- całość przesączyć.
4. Następnie, do 0,5 ml przesączonej próby badanej i próby kontrolnej należy dodać 9,5 ml rozcieńczonego roztworu jodu (rozcieńczenie 150-krotne). W próbkach oznaczyć wartość absorbancji przy długości równej $\lambda=560$ nm wobec wody.
5. Wartość absorbancji próby badanej odjąć od wartości próby kontrolnej, a z krzywej kalibracyjnej odczytać wynik w jednostkach Wohlgemutha [1].

Wykreślenie krzywej kalibracyjnej do doświadczenia:

Do 0,1 ml roztworów wzorcowych skrobi zawierających kolejno po: 2,4,6,8 oraz 10 mg/ml dodać po 0,15 ml 0,9% roztworu NaCl, 0,25 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego oraz 9,5 ml roztworu jodu (rozcieńczonego 150-krotnie). Dla wszystkich próbek zmierzyć absorbancję i wyznaczyć krzywą kalibracyjną, odkładając na osi odciętych jednostki Wohlgemutha [1].

Oznaczanie aktywności amylaz - metoda Sandstedta, Kneena i Blisha (SKB,1939)

Oznaczenie aktywności amylaz powyższą metodą opiera się na pomiarze ilości rozłożonej skrobi, co określa się na podstawie zmiany intensywności zabarwienia w mieszaninie reakcyjnej, w skład której wchodzi jod. W doświadczeniu muszą być spełnione następujące warunki: należy określić czas

działania enzymu w optymalnym pH oraz temperaturze. Stosowana w doświadczeniu skrobia ziemniaczana (będąca substratem reakcji) barwi się z jodem na niebiesko (ze względu na znaczną - ok. 20% zawartość amylozy). Po przerwaniu reakcji enzymatycznej i wprowadzeniu jodu w próbie materiałowej (bez enzymu) należy oznaczyć pochłanianie barwnego kompleksu powstałego z całą ilością skrobi wprowadzonej do reakcji, natomiast w próbie z udziałem enzymu - oznacza się absorbancję kompleksu skrobi nie rozłożonej i dekstryn. Ilość rozłożonej skrobi określa się z różnicy pomiarów tych dwóch prób [3].

Wykonanie oznaczenia:

Wyciąg enzymu z trzustyki wieprzowej (w kolbie miarowej na 10 ml) należy uzupełnić do kreski 0,9% roztworem NaCl i dokładnie wymieszać. Do 3 czystych probówek pobrać po 1 ml 1% zbuforowanej skrobi (tj. 1% skrobia w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH=7.0). Probki następnie wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37°C, po czym do dwóch probówek dodać po 1 ml roztworu enzymu z kolby na 10 ml (próby pełne -oznaczone jako „P”), a do trzeciej 1 ml wody destylowanej (próba odczynnikowa - oznaczona jako „O”).

Po dokładnym wymieszaniu, próbki inkubować przez 15 minut w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji należy przerwać reakcję enzymatyczną poprzez dodanie do probówek po 5 ml 0,5M kwasu solnego (HCl). Następnie, przygotować 3 czyste probówki z 5ml roztworu jodu w jodku potasu (tj.: 0,006% roztwór), dodać do nich po 0,25 ml z poszczególnych mieszanin reakcyjnych (z 2 prób oznaczonych jako „P” oraz 1 próby „O”). Przygotowane próbki dokładnie wymieszać, po czym zmierzyć absorbancję dla prób pełnych i próby odczynnikowej przy długości fali równej $\lambda = 670 \text{ nm}$ (w fotometrze nastawionym na „0” wobec wody destylowanej) [3].

Oznaczanie aktywności amylaz

Zasada metody opiera się na utlenianiu kwasem 3,5-dinitrosalicylowym grup redukujących uwolnionych podczas hydrolizy skrobi przez amylazy. Powstałe w wyniku reakcji barwne połączenia mierzone są kolorymetrycznie przy długości $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Jako materiał badawczy można wykorzystać surowy preparat enzymatyczny z kielków żyta, który zawiera mieszaninę α -amylazy, β -amylazy i glukoamylazy.

a) Otrzymywanie surowego preparatu enzymatycznego :w tym celu należy zhomogenizować 10 g kielków z 40 ml 0,2M buforu octanowego o pH=5,6. Probkę ekstrahować przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 20 minut, po czym odwirować (20 000 x g przez 15 minut). Ekstrakcję należy powtórzyć ponownie (2 razy) , wykorzystując po 20 ml buforu octanowego. Otrzymane po ekstrakcji supernatanty połączyć i dodać $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 80% nasycenia. Tak przygotowaną próbkę odstawić na 16-godzinną inkubację, a następnie odwirować. Otrzymany po wirowaniu osad rozpuścić w 60 ml buforu octanowego (pH=5.0): w tym celu do próbki dodawać bufor porcjami (po 20 ml), za każdym razem próbkę mieszać 15 minut, a na koniec odwirować (20 000 x g, 15 minut). Otrzymane supernatanty po 3 wirowaniach połączyć w jedną próbkę i dializować 24 godziny wobec buforu

octanowego o pH=5.0. W trakcie dializy należy zmieniać kilkakrotnie bufor w celu usunięcia z roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Powyższą procedurę przeprowadzać w temperaturze od 0°C do 4°C [1].

b) Oznaczanie aktywności enzymu: po 1 ml roztworu enzymu i roztworu skrobi (tj.: 0,5% roztwór skrobi w 0,01 M buforze octanowym o pH=5.0) inkubować w temperaturze 30°C przez 30 minut. Następnie należy zatrzymać reakcję enzymatyczną poprzez dodanie 2 ml odczynnika dinitrosalicylowego (tj.: 1 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, 20 ml 2M roztworu NaOH i 30 g winianu sodowo-potasowego uzupełnić wodą do objętości 100 ml). Przygotowaną mieszaninę inkubować w łaźni wodnej przez 5 minut w celu reakcji uwolnionych grup aldehydowych z odczynnikiem. Po ostudzeniu mieszaniny, dodać do niej 6 ml wody i zmierzyć absorbancję w spektrofotometrze przy długości fali równej $\lambda=530$ nm.

Równoległe do powyższego oznaczenia należy wykonać próbkę kontrolną: do 1 ml roztworu enzymu dodać 2 ml odczynnika dinitrosalicylowego (j.w.) oraz 1 ml 0,5% roztworu skrobi. Następnie postępować w sposób identyczny jak z próbką badaną (opis powyżej).

Z krzywej wzorcowej przygotowanej w granicach stężeń glukozy od 0,1 do 1,4mg odczytać ilość uwolnionych grup redukujących. Za jednostkę aktywności enzymu należy przyjąć taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 30°C uwalnia grupy redukujące w ilości równoważnej 1 μM glukozy [1].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s.562-564

[2]. **Farid M.A.F., , Shata H.M.A.H., 2011. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour.** IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, Vol. 9, No. 4, October 2011.

[3]. http://agrobiol.sggw.waw.pl/biochemia/media/skrypt%20biochemia/enzymy_amylolityczne_03_2011_pdf.pdf

[4]. Kouadio E.J.P., Konan H.K., Tetchi F.A., Kouakou D.B., Kouame L.P., 2012. Novel α -Amylases Amy A1 and Amy A2 from digestive tract of tropical house cricket *Gryllobates sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae): hydrolysis and transglycosylation reactions. <http://scihub.org/ABJNA/PDF/2012/5/ABJNA-3-5-198-207.pdf>

[5]. Kaczmarek U., Mysiak-Dębska M., 2005. Aktywność α -amylazy w ślinie u dzieci chorych na cukrzycę. Dent. Med. Probl. 2005, 42, 3, 449-456 ISSN 1644-387X . http://www.dmp.am.wroc.pl/artykuly/DMP_2005423449.pdf

[6]. Byczek A. Oznaczanie aktywności enzymów, Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu

https://www.polsl.pl/Wydzialy/RCh/RCh2/Documents/Biotechnologia/Biotechnologia_enzymatyczna/Biotechnologia%20enzymatyczna%20%20Oznaczenie%20aktywno%C5%9Bci%20enzym%C3%B3w.pdf

[7]. Nater U.M., La Marca R., Florin L., Moses A., Langhans W., Koller M.M., Ehlert U., 2005. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. [Psychoneuroendocrinology Volume 31, Issue 1](#), January 2006, Pages 49-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.010>,

<http://laboratoria.net/artukul/21207.html>

Informacje dnia: [Drżące nanorurki](#) [Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD](#) [zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA](#) [Testy na obecność HPV](#) [Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO](#) [Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku](#) [Drżące nanorurki](#) [Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD](#) [zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA](#) [Testy na obecność HPV](#) [Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO](#) [Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku](#)

Partnerzy