Akceptuję
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

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.

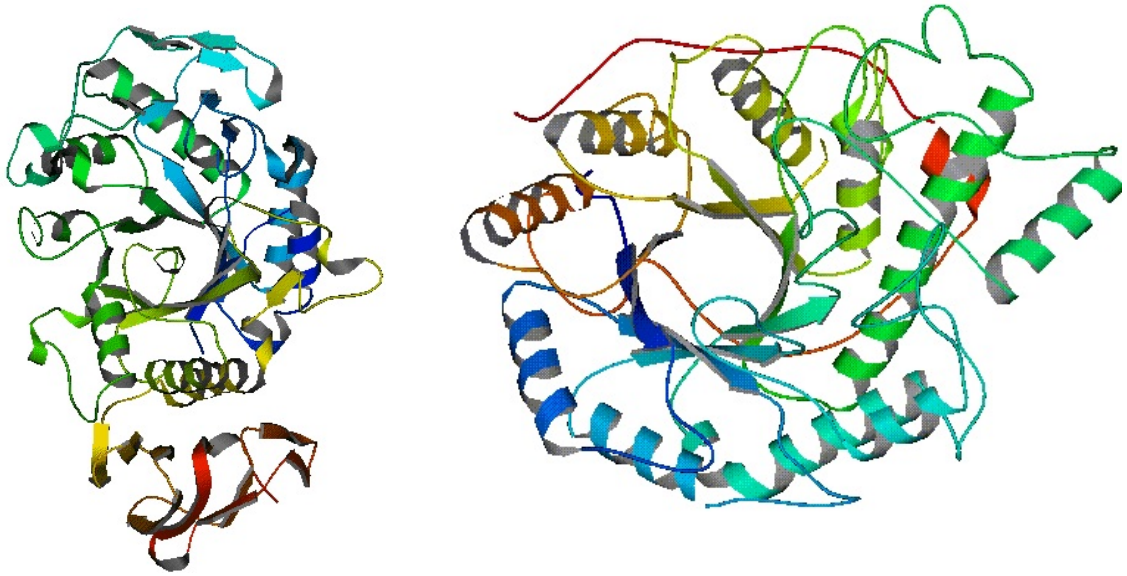
W drobnoustrojach i organizmach roślinnych występuje amylaza α i β, zaś w tkankach zwierzęcych i ludzkich: amylazy α i γ [5]. W ślinie występuje głównie α−amylaza, a także niewielkie ilości β−amylazy, która jest pochodzenia bakteryjnego. Wytwarzanie enzymu odbywa się w komórkach groniastych i przyległych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

synteza amylazy odbywa się głównie w gruczołach przyuszniczych, 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 mneijszych cząsteczek, zwanych dekstrynami. Końcowymi produktami hydrolizy są małocząsteczkowe dekstryny, które zazwyczaj zawierają jedno wiązanie α,1→6-glikozydowe, maltoza i glukoza. W skłąd 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 (usuwają kolejne reszty glukozy z substratu) . Są enzymami występującymi zarówno u roślin, zwierząt jak i bakterii [1].

Dobór odpowiedniej metody oznaczanie aktywności amylolitycznej zalezy od rodzaju badanego enzymu, gdyż inaczej oznacza się α-amylazy, a inaczej β-amylazy. Do oznaczenia aktywności α-amylazy mozna uzyć metod, które opierają się na pomiarze zaniku zabarwienia z jodem, lub zmniejszenia lepkości, a także metod opierających się na pomiarze uwolnionych grup redukcyjnych. B-amylazy, glukoamylazy, a także mieszaniny różnych enzymów amylolitycznych najlepiej oznaczać przez pomiar uwolnionych grup redukujących [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 zdolnośc 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 pzreprowadzonym doświadczeniu Farid M.A.F i wsp. (2011) oznaczali aktywność amylazy wg procedury zaproponowanej przez Jamieson i wsp. (1969) z wykozystaniem 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 λ=470nm. 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 (*Gryllodes 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 usunieto (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 - zwierające 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 wymywano 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 spólowano, 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 poddawanymi 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 miaroego z korkiem należy zebrać 2 ml śliny, po czym rozcieńczyć ją wodą do objętości 20 ml. Całość próbki dokładnie wymieszać w celu ujednolicenia stężenia w całej objętości, po czym probówkę odstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie,do zwykłej probówki 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 probówwk, do których odmierzyć po 0.5 ml odczynnika Lugola i 0.5 ml 1M HCl. Po co najmniej 5 minutach inkubowania cylindra oraz probówki w temperaturze 37°C, do probówki dodać pipetą 1 ml roztworu śliny. Całość zamieszać (w celu ujednolicenia 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 probówek zawierających płyn Lugola należy wprowadzać pipetą po 2-3 krople próbki hydrolizatu z probówki- cały czas obserwować przebieg reakcji barwnej z jodem (hydrolizat dodawać do kolejnych probówek tylko do momentu, aż nie zaobserwuje się już zmiany barwy roztworu jodu). Brak zmiany barwy w próbce z roztworem jodu będzie świadczyć o osiągnięciu punky 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 x 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 benzoesanu 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, próbke ponownie ogrzewać w 37°C prze 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)- całośc przesączyć.
4. Następnie, do 0,5 ml pzresączy próby badanej i próby kontrolnej należy dodać 9,5 ml rozcieńczonego roztworu jodu (rozcieńczenie 150-krotne). W próbkach oznaczyć wartośc absorbancji przy długości równej λ=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 Wolhgemutha [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 trzustki wieprzowej (w kolbie miarowej na 10 ml) należy uzupełnić do kreski 0,9% roztworem NaCl i dokłądnie 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). Próbki następnie wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37°C, po czym do dwóch próbek 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 próbek po 5 ml 0,5M kwasy 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 λ= 670 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 barwnie połączenia mierzone są kolorymetrycznie przy długości λ=530 nm.

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

a)Otrzymywanie surowego preparatu enzymatycznego :w tym celu należy zhomogenizować 10 g kiełków z 40 ml 0,2M buforu octanowego o pH=5,6. Próbkę ekstrahować przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 20 minut, po czym odwirować (20 000 x g przez 15 minut). Ekstrakcję nalezy powtórzyć ponownie (2 razy) , wykorzystując po 20 ml buforu octanowego. Otrzymane po ekstrakci suoernatanty połączyć i dodać $(NH_4)_2SO_4$ do 80% naycenia. Tak przygotowaną próbke 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 nalezy zmieniać kilkakrotnie bufor w celu usunięcia z roztworu $(NH_4)_2SO_4$. 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 λ=530 nm.

Równolegle do ppowyższego 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 przyjąc taka ilość enzymu, która w ciagu 1 minuty w temperaturze 30°C uwalnia grupy redukujace w ilości równoważnej 1 µM glukozy [1].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Kłyszejko-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 Gryllodes 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

Biotechnologia enzymatyczna. https://www.polsl.pl/Wydzialy/RCh/RCh2/Documents/Biotechnologia/Biotechnologia_enzymatyczna/Biotechnologia%20enzymatyczna%20%20Oznaczanie%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,

https://laboratoria.net/artykul/21207.html
Informacje dnia: Najlepszy studencki projekt robotyczny zostanie sfinansowany Sieć, która odpowiada za chorobę Parkinsona Smartfon szkodzi rozwojowi dziecka Polscy naukowcy opisali najmniejsze znane genomy bakteryjne Jak naukę przetwarzać na biznes? Ciąża i urlopy dla rodziców a granty badawcze Najlepszy studencki projekt robotyczny zostanie sfinansowany Sieć, która odpowiada za chorobę Parkinsona Smartfon szkodzi rozwojowi dziecka Polscy naukowcy opisali najmniejsze znane genomy bakteryjne Jak naukę przetwarzać na biznes? Ciąża i urlopy dla rodziców a granty badawcze Najlepszy studencki projekt robotyczny zostanie sfinansowany Sieć, która odpowiada za chorobę Parkinsona Smartfon szkodzi rozwojowi dziecka Polscy naukowcy opisali najmniejsze znane genomy bakteryjne Jak naukę przetwarzać na biznes? Ciąża i urlopy dla rodziców a granty badawcze

Partnerzy