

***1.3.1.1.2. Determinarea activității α -amilazei în salivă
(micrometoda Metais și Bieth, adaptată de Vlad Artenie)***

Principiul metodei. α -Amilaza hidrolizează în timp de 30 minute la 37°C, amidonul în soluție tampon de fosfați, cu pH 7,0. La sfârșitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă $\lambda=580$ nm, după colorația violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. 1) *Soluție de NaCl (ser fiziologic).* Se dizolvă 0,9 g clorură de sodiu (NaCl) în 100 ml apă bidistilată.

2) *Soluție tampon de fosfați M/15 cu pH=7,0.* Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) și 0,4130 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluției la 7,0 cu ajutorul unui pH-metru și se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C.

3) *Soluție tampon de fosfați 30 %.* Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluție tampon de fosfați M/15 (reactiv 2) cu 70 ml apă bidistilată.

4) *Soluție stoc de amidon 1% în soluție tampon de fosfați M/15 cu pH=7,0.* Se măsoară 80 ml soluție tampon de fosfați M/15, cu pH=7,0 (reactiv 2) într-un flacon conic de 150-200 ml și se aduce la fierbere. Într-un pahar Berzelius de 50-100 ml se suspendă 1 g de amidon în 10 ml soluție tampon fosfați M/15 (reactiv 2). Suspensia de amidon se trece cantitativ în cei 80 ml soluție tampon de fosfați M/15 în fierbere. Paharul Berzelius se spală de 2-3 ori cu câte 5-10 ml de soluție tampon de fosfați M/15 în care s-a turnat suspensia de amidon. Lichidele de spălare se adaugă la soluția de amidon. Pentru distrugerea microorganismelor, soluția de amidon se fierbe încă 3-5 minute până devine clară. După răcire soluția de amidon se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Flaconul conic în care s-a preparat soluția de amidon, se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluție tampon de fosfați M/15 cu pH=7,0 (reactiv 2) care se adaugă în balonul cotat. Soluția de amidon preparată astfel este stabilă maximum 10 zile dacă se păstrează la +4°C.

5) *Soluție de iod N/3000.* Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,33 ml soluție de iod 0,1 N (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7*) cu apă distilată la 100 ml.

6) *Soluție de acid clorhidric 1N.* Se diluează 9 ml de acid clorhidric (HCl) concentrat ($d=1,19$) cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

7) *Soluție de acid clorhidric 0,1 N.* Se diluează 10 ml soluție de acid clorhidric 1N cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

Modul de lucru. În mod normal determinarea activității α -amilazei se face în salivă diluată cu ser fiziologic.

A) **OBȚINEREA SALIVEI DILUATE.** Gura se spală de 4 – 5 ori cu apa pentru îndepărtarea resturilor alimentare. După 5 – 10 minute saliva se prelevează în eprubete Eppendorf curate și uscate, conice. Lichidul adunat se centrifughează 15 minute la 3000 - 4000 rot./min. Supernatantul se transvazează în alte eprubete Eppendorf.

Pentru determinarea activității α -amilazei saliva separată prin centrifugare se diluează cu ser fiziologic după schema următoare:

1) Se pipetează 0,1 ml salivă în 14,9 ml ser fiziologic sau 0,05 ml salivă + 7,45 ml ser fiziologic. Se realizează o diluție de 150 ori. Să denumim acest preparat salivă diluată (I).

2) Se amestecă 0,1 ml salivă diluată (I) cu 2,4 ml ser fiziologic. Gradul de diluție crește la $150 + 25 = 175$ ori (salivă diluată II). Mai departe se va lucra cu soluția de saliva diluată II.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII α -AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluție de amidon 0,3 % amestecând 3 (6) ml soluție stoc de amidon (reactiv 4) cu 7 (14) ml soluție tampon de fosfați 30 % (reactiv 3), în funcție de numărul probelor de analizat.

Pentru efectuarea determinării activității α -amilazei se procedează conform indicațiilor din tabelul următor.

Specificație	Eprubetele	
	Proba	Martor
Soluție de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostat, la 37°C		
Salivă diluată (ml)	0,10	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluție de acid clorhidric 0,1N (ml)	1,00	1,00
Salivă diluată (ml)	-	0,10
Apă distilată (ml)	1,40	1,40
Soluție de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare și citirea extincției martorului (E_1) și probei (E_2) la $\lambda=580$ nm, față de soluția de iod N/3000		

Calculul rezultatelor. Activitatea α -amilazei se exprimă în unități Wohlgemuth într-un mililitru (U.W./ml) și reprezintă numărul de mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute la 37°C de enzima din 1 ml de salivă.

Extincția E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferența E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat de α -amilaza din 0,10 ml salivă diluată. Cantitatea de amidon hidrolizat, exprimată în mg, sub acțiunea α -amilazei în timp de 30 minute va fi:

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1,5$$

Pentru a obține numărul de mg de amidon hidrolizat la 37°C, timp de 30 minute, de către enzima din 1 ml salivă (U.W./ml) se utilizează formula următoare:

$$UW/ml = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 1,5 \times \frac{2,5}{0,1} \times \frac{15}{0,1} \times \frac{1}{0,1}$$

OBSERVAȚII. 1. Dacă extincția E_2 este foarte apropiată de extincția E_1 , diferența dintre E_1 și E_2 fiind mai mică de 0,100 unități de extincție, atunci se va lucra cu saliva diluată I. La calculul final se va ține cont de diluția făcută.

2. Dacă extincția E_2 este mai mică decât jumătatea extincției E_1 ($E_2 = E_1/2$) se diluează saliva cu ser fiziologic până la 200 de ori, adăugând 0,1 ml salivă diluată II la 2,4 ml ser fiziologic. Se obține saliva diluată III. La calculul final se va ține cont de diluția făcută.

3. Pentru determinarea activității α -amilazei se recomandă folosirea de salivă proaspătă.