

I.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME PARTICIPANTE ÎN ANABOLISMUL ȘI CATABOLISMUL GLUCIDELOR

I.3.1. ENZIME IMPLICATE ÎN SCINDAREA POLIGLUCIDELOR ȘI OLIGOGLUCIDELOR

I.3.1.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII AMILAZELOR

Amilazele catalizează hidroliza legăturilor α -1,4-glicozidice din α -glucanii de tipul amidonului și glicogenului sau în produșii lor de scindare. După acțiunea acestor enzime asupra substratului se deosebesc trei tipuri de amilaze:

1) **α -Amilaza** (1,4- α -D-glucan-glucanohidrolaza, E.C. 3.2.1.1) hidrolizează legăturile α -1,4-glicozidice din interiorul lanțurilor poliglucidice ale moleculei de amidon sau glicogen, cu formarea de poliglucide cu mase moleculare mai mici, numite dextrine și o cantitate determinată de maltoză. Această enzimă este prezentă în toate organismele vii: animale, plante, ciuperci și bacterii.

2) **β -Amilaza** (1,4- α -D-glucan-maltohidrolaza, E.C. 3.2.1.2) este o exoenzimă întrucât hidrolizează legăturile α -1,4-glicozidice în amidon și poliglucidele asemănătoare eliberând succesiv resturile de β -maltoză de la capătul nereducător al lanțului poliglucidic. Neavând abilitatea de a trece peste legăturile α -1,6-glicozidice existente în glicogen și amilopectină, β -amilaza realizează o hidroliză incompletă a acestor poliglucide ramificate cu formarea de dextrine-limită. A fost evidențiată în unele plante superioare (orz, soia, grâu, porumb, cartofi etc.) și diferite bacterii.

3) **γ -Amilaza** sau **glucoamilaza** (1,4- α -D-glucan-glucohidrolaza, E.C. 3.2.1.3) hidrolizează legăturile α -1,4-glicozidice scindând succesiv resturile de glucoză de la capătul nereducător al moleculei de amidon, glicogen, dextrine etc. Este larg răspândită în țesuturile animale și la microorganisme.

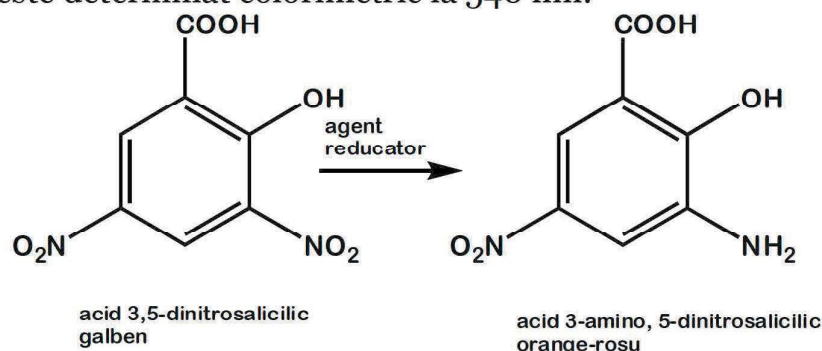
Metodele de determinare a activității amilazelor se bazează fie pe dozarea maltozei și glucozei formate din amidon, fie pe estimarea cantității de amidon rămas nescindat, prin folosirea reacției lui cu iodul.

1.3.1.1.3. Determinarea activității α -amilazei și β -amilazei în plante

(metoda Noelting-Bernfeld, modificată parțial de Vlad Artenie)

În plante se întâlnesc α - și β -amilaze a căror activitate crește apreciabil în timpul germinației semințelor conținând o mare cantitate de amidon. Creșterea activității amilazice în timpul germinației semințelor de graminee se explică în cazul α -amilazei prin sinteza **de novo** a enzimei, iar pentru β -amilază este specifică activarea zimogenului ei sub influența stimulatoarelor naturali de creștere din clasa giberelinelor și auxinelor.

Principiul metodei. α -Amilaza sau β -amilaza hidrolizează amidonul cu formare de maltoză liberă. Aceasta reduce în mediul alcalin acidul 3,5-dinitrosalicilic la acid 3-amino-5-nitrosalicilic de culoare oranj - roșu care este determinat colorimetric la 540 nm:



În paralel cu proba de analizat se efectuează un martor pentru substanțele reducătoare ce le-ar putea conține eventual extractul sau preparatul amilazic.

Reactivi. 1) *Soluție tampon acid citric-citrat trisodic 0,1M cu pH 5,6.* Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 2,8789 g acid citric ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) în circa 100 ml apă distilată și apoi se introduc 12,9649 g citrat trisodic ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5\frac{1}{2}H_2O$) folosind 200-300 ml apă distilată. Înainte de completarea la semn se verifică pH-ul soluției și dacă este cazul se corectează cu soluție de NaOH 1N sau cu soluție de acid citric.

2) *Soluție tampon pentru extracția β -amilazei.* Se prepară prin dizolvarea a 50 mM (6,06 g) **Trizma base** [Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethane: $C_4H_{11}NO_3$ M = 121,1] și 1 mM (0,37 g) ctilendiamnotetraacetat disodic (disodium EDTA) în 500 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se corectează pH-ul la 8,0 (în cazul semințelor de graminee) sau la 6,2 (în cazul altor specii de plante) cu soluție de HCl 1 N și se completează volumul balonului la semn cu apă bidistilată. Se păstrează la +4°C.

3) *Soluție de amidon 2%.* Suspensia obținută prin amestecarea a 2 g de amidon cu 20 ml apă distilată se adaugă la 80 ml apă distilată la fierbere și se continuă încălzirea până la clarificarea soluției. Soluția obținută se fierbe încă 1 – 2 minute pentru sterilizare, se răcește și se completează cu apă bidistilată la 100 ml într-un balon cotat.

4) *Soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic 1%*. Se amestecă 1 g de acid 3,5-dinitrosalicilic cu 5-10 ml apă distilată. La amestecul obținut se adaugă lent și agitându-se continuu 20 ml soluție de NaOH 2N. După dizolvarea completă a reactivului, la temperatura camerei, volumul soluției se aduce la 50 ml cu apă distilată și se adaugă 30 g de tartrat dublu de sodiu și potasiu (sare Seignette). Se agită până la dizolvarea tartratului dublu de sodiu și potasiu, se completează volumul soluției la 100 ml cu apă distilată și se filtrează. Soluția de acid 3,5-dinitrosalicilic se conservă în flacoane brune, ermetic închise pentru reducerea efectelor CO₂ asupra alcalinității ceea ce ar putea vicia rezultatele.

5) *Soluție etalon de maltoză 200 mg%*. Într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă 200 mg maltoză în circa 50 ml apă distilată, apoi se completează la semn cu același solvent.

6) *Cisteina*.

Modul de lucru. A) *EXTRACȚIA α-AMILAZEI*. O cantitate de 0,100 – 0,500 g de material biologic bine omogenizat (făină de semințe de cereale, leguminoase sau de alte plante, semințe aflate în germinație, plantule, rădăcinițe, tulpinițe, frunze etc.) se extrage cu 5 ml de apă bidistilată, răcită la +4°C. Extracția enzimei se face o perioadă de 60 minute, prin agitare cu intermitență (după 10 minute de repaus se agită un minut), la temperatura camerei sau cel mai bine pe o baie de apă cu gheață. Reziduul insolubil se va separa prin centrifugare la 4000 rot/min timp de 15 minute. Pentru inactivarea eventualelor molecule de β-amilază, extractul amilazic se va termostata timp de 15 minute la 70°C, în prezența ionului de calciu. Înainte de termostatare, la 5 ml extract amilazic se adaugă 40 mg acetat de calciu [Ca(CH₃COO)₂·H₂O] care are rolul de a proteja activitatea α-amilazei în timpul tratamentului termic. După termostatare, extractul enzimatic se va răci imediat într-o baie cu apă rece de la robinet. Se vor inactiva în acest mod doar moleculele de β-amilază, moleculele de α-amilază rămânând complet active.

B) *EXTRACȚIA β-AMILAZEI*. Extracția β-amilazei se poate efectua utilizând în acest scop *soluția tampon de extracție* (reactiv 5) cu și fără adaos de cisteină. Adăugarea cisteinei este necesară pentru a extrage β-amilază *insolubilă* existentă în semințele negerminate. Enzima extrasă numai cu *soluția tampon de extracție* este definită ca **β-amilază solubilă** iar enzima extrasă cu soluție tampon plus cisteină reprezintă **β-amilaza totală**.

Înainte de începerea extracției, se dizolvă 100 mM (1,75 g) de cisteină în 100 ml *soluție tampon de extracție* (reactiv 5) și se recorectează pH-ul la valoarea inițială. Soluția tampon de extracție cu cisteină este stabilă 24 de ore la +4°C. Extracția β-amilazei se efectuează în raportul 0,5 g material biologic la 5 ml soluție tampon (reactiv 5) sau 5 ml soluție tampon plus cisteină, timp de 1 oră, la temperatura de +4°C. Extractul enzimatic se va separa prin centrifugare timp de 15 minute la 4000 rot/min. Deoarece în extract poate fi prezentă și α-amilaza, este necesară

inactivarea acesteia, care se realizează prin aducerea pH-ului extractului enzimatic la valoarea de 3,6 cu ajutorul unei soluții de acid acetic 1N. Adăugarea acidului acetic se va face sub continuă agitare iar pH-ul se va măsura la pH-metru. După corectarea pH-ului, volumul amestecului se aduce la 6 ml cu apă bidistilată. Amestecul va fi apoi centrifugat 15 minute la 4000 rot/min pentru eliminarea α -amilazei denaturate ce va sedimenta sub formă de precipitat la fundul eprubetei. Supernatantul va fi folosit drept sursă de β -amilază.

C) **DETERMINAREA ACTIVITĂȚII AMILAZELOR TOTALE, α -AMILAZEI SAU β -AMILAZEI.** În eprubete curate și uscate de 20 ml se vor efectua proba și martorul, conform indicațiilor din tabelul de mai jos.

Reactiv	PROBĂ	MARTOR
Soluție tampon acid citric - citrat 0,1M cu pH=5,6 (ml)	5	5
Soluție de amidon 2% (ml)	2	-
Apă distilată (ml)	-	2
AGITARE		
	TERMOSTATARE 5 MINUTE Incubare timp de 10 minute la 40°C (numai proba !)	-
Extract enzimatic (ml)	0,1 – 2	-
	AGITARE ȘI TERMOSTATARE 15 MINUTE LA 40°C (numai proba !)	-
	RĂCIRE 5 min. LA JET DE APĂ (numai proba !)	
Extract enzimatic (ml)	-	0,1 - 2

De notat că martorul se va efectua de așa manieră încât să fie gata simultan cu proba pentru a evita producerea reacției pe baza amidonului și enzimei existente în extractul enzimatic. Atât în probă cât și în martor se dozează cantitatea de maltoză eliberată sub acțiunea amilazelor totale, α -amilazei sau β -amilazei asupra amidonului.

D) **DOZAREA MALTOZEI.** Se vor folosi eprubete **curate și uscate** de 20 ml, termorezistente. De reținut că alcalinitatea reactivului de culoare denaturează enzima întrerupând reacția enzimatică.

Reactiv	PROBĂ	MARTOR	CONTROL
Soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic (ml)	1	1	1
Incubat probă (ml)	0,5 - 2	-	-
Amestec de reacție martor (ml)	-	0,5 - 2	-
Apă distilată (ml)	-	-	0,5 - 2

Toate eprubetele se vor introduce în baie de apă la fierbere și se mențin exact 5 minute din momentul în care apa reîncepe să fiarbă. Se vor răci eprubetele la jet de apă. Apoi volumul lor se completează la 10 ml cu apă distilată. Se agită energic după care se citește la spectrofotometru la $\lambda=540$ nm față de control.

Pentru aflarea cantității de maltoză atât în probă cât și în martor se folosește o curbă etalon construită cu o soluție standard de maltoză.

E) CONSTRUIREA CURBEI ETALON PENTRU MALTOZĂ. Se realizează o serie de eșantioane etalon cu cantități de maltoză variind între 0,2 - 1,8 mg care sunt tratate pentru obținerea reacției de culoare conform tabelului următor.

Eprubeta	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantitatea de maltoză (mg)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Soluție etalon de maltoză (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Apă distilată (ml)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1
Soluție de acid 3,5 – dinitrosalicilic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Eprubetele se introduc într-o baie de apă la fierbere și se mențin exact 5 minute din momentul în care apa reîncepe să fiarbă. După aceasta eprubetele se răcesc în apă de robinet (**ATENȚIE LA DIFERENȚELE DE TEMPERATURĂ!!!**). Se completează volumul probelor la 10 ml cu apă distilată. Se agită conținutul eprubetelor și se citesc valorile extincțiilor probelor la spectrofotometru la $\lambda=540$ nm față de controlul (C) reactivilor. Curba etalon se va trasa trecând pe abscisă cantitatea de maltoză (mg) în probele etalon, iar pe ordonată valorile extincțiilor corespunzătoare.

Calculul rezultatelor. Extincțiile probei și martorului se extrapolează pe curba etalon, aflându-se cantitatea de maltoză rezultată prin acțiunea α -amilazei sau β -amilazei asupra amidonului, respectiv cantitatea de maltoză existentă în extractul enzimatic. Din cantitatea de maltoză din proba de cercetat se scade conținutul de maltoză al extractului enzimatic.

Activitatea amilazelor totale sau α -amilazei sau β -amilazei se exprimă în unități amilazice, adică μ M maltoză formați sub acțiunea enzimei dintr-un gram de material vegetal analizat în timp de 1 minut:

$$\text{micromoli maltoza} / \text{g} / \text{min} = \frac{(a_{\text{cer}} - a_m) \times (7 + v) \times V}{n \times v \times p \times 0,360 \times 15}, \text{ în care:}$$

a_{cer} - cantitatea de maltoză (mg) corespunzătoare extincției probei de cercetat;

a_m - cantitatea de maltoză (mg) corespunzătoare martorului;

v – volumul (ml) de extract enzimatic folosit la determinarea activității enzimei;

V - volumul total (ml) al extractului enzimatic;

n - volumul (ml) de incubat luat pentru dozarea maltozei;

p - greutatea materialului vegetal (g) din care s-a extras enzima;

0,360 - greutatea unui micromol de maltoză exprimată în miligrame;

15 – timpul de incubare.

OBSERVAȚII: 1. Activitatea amilazică a extractului enzimatic netratat termic poate fi considerată ca activitatea amilazelor totale (α -amilazei și β -amilazei solubile)

2. Diferența dintre activitatea amilazică a extractului enzimatic, netratat și tratat termic la 70°C poate fi apreciată ca activitatea β -amilazei solubile.