



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΔΕΙΦΟΡΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

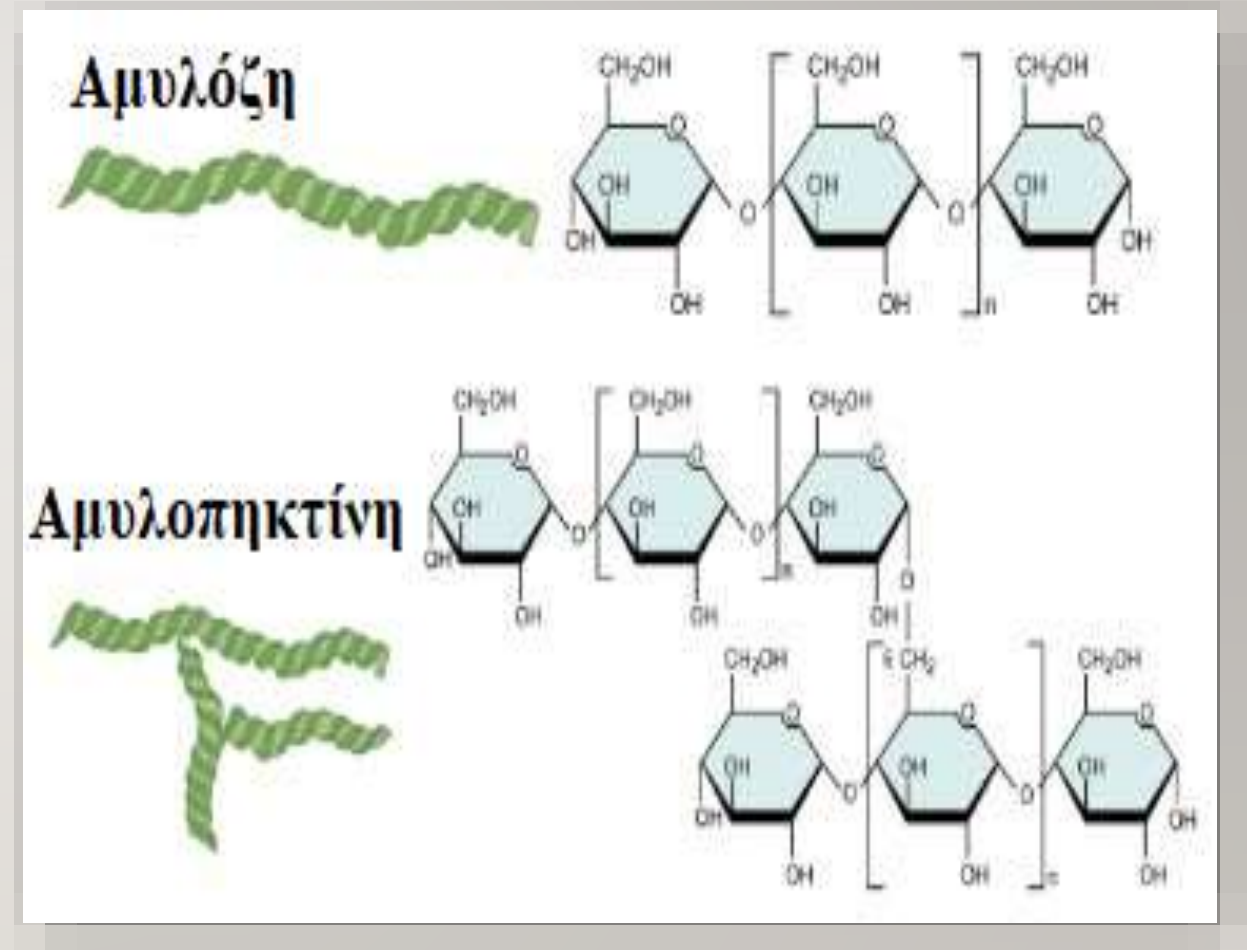
10^η Εργαστηριακή Άσκηση: Πολυσακχαρίτες - Προσδιορισμός
ενεργότητας α-αμυλάσης

Γαλάνη Αγγελική, Χημικός PhD, Ε.ΔΙ.Π. - Διονυσοπούλου Εύα Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π.

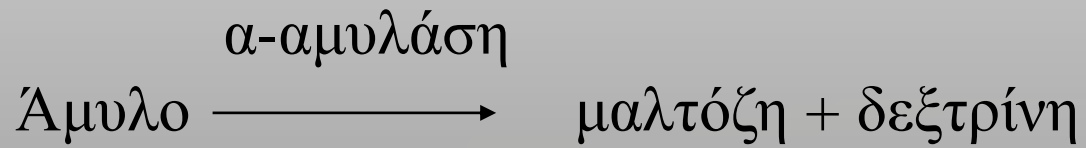
ΕΙΣΑΓΩΓΗ



- Οι οργανισμοί αποθηκεύουν υδατάνθρακες με τη μορφή πολυσακχαριτών.
- Το άμυλο (starch), είναι ο πιο συνηθισμένος αποταμιευτικός πολυσακχαρίτης στα φυτά. Υπάρχει σε δύο μορφές, την α-αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Στη φύση οι περισσότερες μορφές αμύλου είναι 10% έως 30% α-αμυλόζη και 70% έως 90% αμυλοπηκτίνη.



Προσδιορισμός ενεργότητας α-αμυλάσης



Θα βρούμε την ενεργότητα της α-αμυλάσης προσδιορίζοντας τα $\mu\text{mole} / \text{min}$ μαλτόζης = EA

μg μαλτόζης που ελευθερώνεται
(άγνωστη συγκέντρωση)

Ποσοτικός Προσδιορισμός Μαλτόζης με χρήση
αντιδραστηρίου DNSA

- ✓ Ενζυμική δραστηριότητα U, δείχνει τα μmol υποστρώματος (substrate), τα οποία μετατρέπονται σε προϊόν (product) στη μονάδα του χρόνου.

$$1 \text{ U} \rightarrow 1 \mu\text{mole} / \text{min}$$

- ✓ Ενζυμική δραστηριότητα ($\mu\text{mole}/\text{min}$) = $\frac{\mu\text{g προϊόντος} \times 1000}{M_r_{\text{προϊόντος}} \times \text{χρόνος επώασης}}$

Βήματα για τον προσδιορισμό ενεργότητας του ενζύμου

- ✓ Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για το προϊόν (μαλτόζη)
 - Παρασκευή πρότυπων (γνωστής συγκέντρωσης), διαλυμάτων μαλτόζης
 - Μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων στο βέλτιστο μήκος κύματος απορρόφησης προϊόντος(μαλτόζης) στην περιοχή του ορατού
- ✓ Υπολογισμός της εξίσωσης της ευθείας της πρότυπης καμπύλης ($Abs=aConc \pm b$)
- ✓ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προϊόντος στο μείγμα αντίδρασης.
 - Αντικατάσταση της Απορρόφησης του προϊόντος μείγματος αντίδρασης στην εξίσωση $Abs=aConc \pm b$
- ✓ Υπολογισμός ενεργότητας ενζύμου



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΣΚΕΥΗ-ΟΡΓΑΝΑ

- Υπερκάθαρο νερό ($\geq 18 \text{M}\Omega \times \text{cm}$ σε 25°C), διάλυμα $20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, διάλυμα $6,7 \text{ mM NaCl}$, διάλυμα αμύλου $1,0\% \text{ w/v}$, διάλυμα $\text{NaOH } 2\text{M}$, διάλυμα $5,3 \text{ M}$ τετραένυδρου τρυγικού νατρίου του καλίου, διάλυμα $96 \text{ mM } 3,5\text{-}$ δινιτρο-σαλικυλικού οξέος, διάλυμα DNSA , πρότυπο διάλυμα μαλτόζης $0,2\% \text{ (w/v)}$, διάλυμα α-αμυλάσης.

- Φαρμακευτικές γυάλινες φιάλες καραμελέ (amber bottle) 50 mL , αυτόματες πιπέτες $1000 \mu\text{L}$ και $200 \mu\text{L}$, σιφώνι μετρήσεως 10 mL , πουάρ, πιπέτες παστέρ, φιαλίδια 15 mL με πώμα.

- Ηλεκτρονικός ζυγός 4 δεκαδικών τουλάχιστον ή αναλυτικός ζυγός, πεχάμετρο, υδατόλουτρο, θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

- 1. Ρυθμιστικό διάλυμα pH = 6,9 :** Παρασκευάζεται διάλυμα που να περιέχει 2,4 mg/mL NaH_2PO_4 και 0,39 mg/mL NaCl σε υπερκάθαρο νερό. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6,9 με διάλυμα 1 M NaOH ή 1 M HCl ανάλογα.
- 2. Διάλυμα αμύλου 1,0 % (w/v):** Διαλύονται 0,25 g από το άμυλο σε 20 mL buffer pH=6,9. Σκεπάζεται το ποτήρι (προς αποφυγή εξάτμισης), και ακολουθεί θέρμανση και ανάδευση για 15 min σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα διατηρώντας τη θερμοκρασία λίγο κάτω από το σημείο βρασμού. Στη συνέχεια αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει σε $T_{\delta\omega\mu}$ με ανάδευση. Τέλος συμπληρώνεται ο όγκος με προσθήκη 5 mL υπερκάθολου νερού, συνεχίζοντας την ανάδευση.
- 3. Διάλυμα NaOH 2M:** 80 mg / mL σε υπερκάθαρο νερό (για 1M NaOH 40 mg/mL σε υπερκάθαρο νερό).

- 4. Διάλυμα 5,3 M τετραένυδρο τρυγικό νάτριο του καλίου σε 2 M NaOH:**
Διαλύονται 0,8 g NaOH σε 10 mL υπερκάθαρου νερού. Θερμαίνεται το διάλυμα σε θερμοκρασία μεταξύ 50 και 70 °C. Προσθέτονται 12,0 g τετραένυδρου τρυγικού νατρίου του καλίου (MW=282,22 g/mol), σε 8 mL θερμού διαλύματος 2 M NaOH. Συνεχίζεται η θέρμανση σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα. ΔΕΝ θερμαίνουμε έως βρασμού.
- 5. Διάλυμα 96 mM 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (MW=228,12 g/mol):**
Διάλυση 438 mg του οξέος σε 20 mL υπερκάθαρου νερού. Θερμαίνεται το διάλυμα σε θερμοκρασία μεταξύ 50 – 70 °C, έως τη διάλυση. ΠΡΟΣΟΧΗ όχι βρασμός.

-
- 6. Διάλυμα DNSA 40 mL :** Θερμαίνονται 12 mL υπερκάθαρου νερού στους 60 °C και αργά προστίθενται 8 mL διαλύματος 5,3 M τετραένυδρου τρυγικού νατρίου του καλίου. Στη συνέχεια προστίθενται 20 mL διαλύματος 3,5-δινιτροσαλυκιλικού οξέος 96 mM. Ακολουθεί ανάδευση έως την πλήρη διάλυση. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί σε σκοτεινή φιάλη σε $T_{\delta\omega\mu}$ για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών.
 - 7. Διάλυμα 10 mL 0,2 % (w/v) μαλτόζης:** 0,02 g μαλτόζης σε 10 mL υπερκάθαρου νερού.
 - 8. Διάλυμα ενζύμου α-αμυλάση:** Λίγο πριν τη χρήση παρασκευάζεται διάλυμα α-αμυλάσης 1unit/mL σε υπερκάθαρο νερό.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Ρυθμίζεται υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 100 °C.

A. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ

1) Προσθέτονται σε κατάλληλου όγκου (15 mL), φιαλίδια με πόμα τα ακόλουθα:

Αντιδραστήριο	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Τυφλό
Υπόστρωμα Διάλυμα αμύλου (mL)	1.00	1.00	1.00	1.00

- 2) Αφήνονται σε $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3-4 min. Στη συνέχεια προστίθενται τα ακόλουθα:

Αντιδραστήριο	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Τυφλό
Διάλυμα Ενζύμου α-Αμυλάση (mL)	0.50	0.70	1.00	-

- 3) Ανάδευση και επώαση ακριβώς 3 min σε $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια για να σταματήσει η αντίδραση προστίθεται 1 mL DNSA όπως φαίνεται στον Πίνακα που ακολουθεί:

Αντιδραστήριο	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Τυφλό
Αντιδραστήριο DNSA (mL)	1.00	1.00	1.00	1.00

- 4) Τοποθετούνται τα φιαλίδια σε υδατόλουτρο στους $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min. (Σκεπάζονται τα φιαλίδια αλλά όχι αεροστεγώς).

- 5) Αφαιρούνται από το υδατόλουτρο τα φιαλίδια και συμπληρώνεται ως τα 2 mL ο όγκος με ένζυμο α-αμυλάση όπως φαίνεται στον Πίνακα που ακολουθεί:

Αντιδραστήριο	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Τυφλό
Διάλυμα Ενζύμου α-Αμυλάση (mL)	0.50	0.30	-	1.00

- 6) Αφήνονται τα φιαλίδια να κρυώσουν σε $T_{\delta\omega\mu}$ και προστίθεται σε όλα 9 mL υπερκάθαρου νερού κατά τον ακόλουθο Πίνακα:

	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Τυφλό
Υπερκάθαρο νερό (mL)	9.00	9.00	9.00	9.00

Ακολουθεί ανάδευση.

- 7) Μετριέται η Απορρόφηση των δειγμάτων στα 540 nm.

B. Standard Διαλύματα Μαλτόζης

1) Σε 8 φιαλίδια προσθέτονται τα αντιδραστήρια του ακόλουθου Πίνακα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (mL)	SD 1	SD 2	SD 3	SD 4	SD 5	SD 6	SD 7	BLANC
0,2 % w/v Μαλτόζη	0.05	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	2.00	-
Υπερκάθαρο νερό	1.95	1.80	1.60	1.40	1.20	1.00	-	2.00
DNSA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

- 2) Καλύπτονται τα φιαλίδια (όχι αεροστεγώς) και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 15 min.
- 3) Στη συνέχεια αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και ψύχονται σε πάγο έως ότου αποκτήσουν $T_{\delta\omega\mu.}$.
- 4) Ακολουθεί η προσθήκη σε όλα 9 mL υπερκάθαρου νερού. Αναδεύονται.
- 5) Μετριέται η απορρόφηση στα 540 nm μηδενίζοντας με το blanc.

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

	Απορρόφηση (540 nm)
SD1	
SD2	
SD3	
SD4	
SD5	
SD6	
SD7	

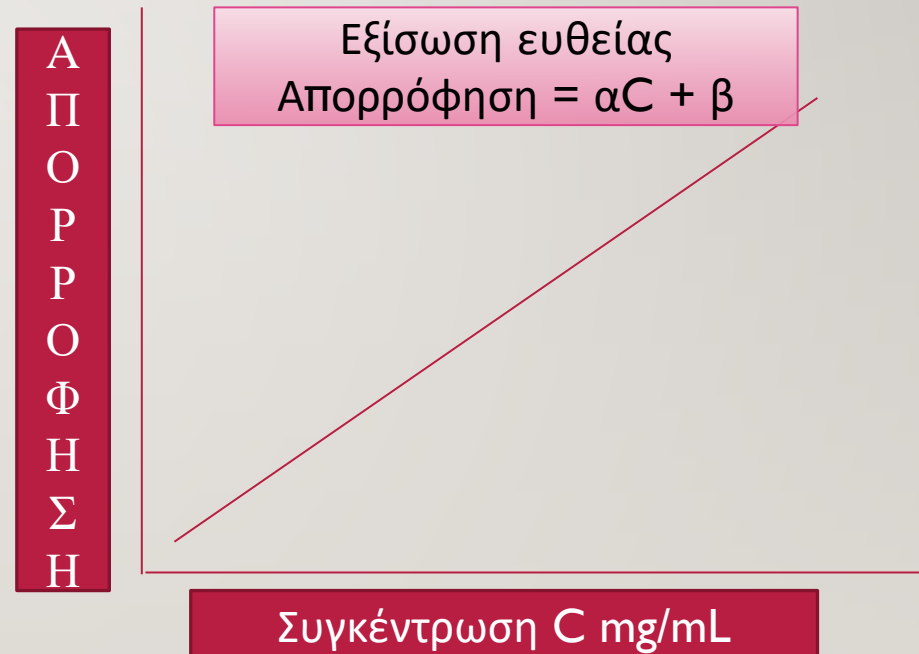
	Απορρόφηση (540 nm)
ΔΕΙΓΜΑ 1	
ΔΕΙΓΜΑ 2	
ΔΕΙΓΜΑ 3	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

	Συγκέντρωση SD Μαλτόζης σε mg/mL	Απορρόφηση (540 nm)
SD1		
SD2		
SD3		
SD4		
SD5		
SD6		
SD7		

	Μαλτόζη (mg/mL)	Abs 540 nm
ΔΕΙΓΜΑ 1		
ΔΕΙΓΜΑ 2		
ΔΕΙΓΜΑ 3		

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ



-
- Ενεργότητα Ενζύμου: $\text{Units}/(\text{mL ενζύμου}) = \frac{(\text{mg μαλτόζης που ελευθερώνεται}) \times (\text{συντελεστής αραίωσης})}{\text{mL ενζύμου}}$
 - ✓ συντελεστής αραίωσης και mL ενζύμου αφορούν τον Πίνακα από το στάδιο 5 της A διαδικασίας για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου
 - Ενεργότητα Ενζύμου: $\mu\text{mol} / \text{min} = \frac{(\text{mg μαλτόζης που ελευθερώνεται}) \times 1000}{\text{Mr μαλτόζης} \times t_{\text{επώασης}}}$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βιοχημεία 6^η ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1^η ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham, Εκδόσεις Utopia, 2019
- <https://acrobat.adobe.com/id/urn:aaid:sc:EU:c7b8c1b3-0ea9-4fa9-81bb-849ed87b495c>
- <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-a-amylase>
- https://www.google.com/search?sca_esv=85af15397c77c0f6&rlz=1C1AVFC_en_1092_1092&q=a-amylase+assay+protocol&tbm=vid&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwill-irysuEAxXScvEDHeVMBFIQ0pQJegQICxAB&biw=1920&bih=911&dpr=1#fpstate=ive&vld=cid:cca1e9e1,vid:9znHZ7VAXBU,st:0