



Enzimi digestivi

...LAVORARE SOTTOTRACCIA...

Sintesi

A volte la quantità (troppa) e la qualità (poca) del cibo rende le persone sofferenti di problemi di digestione. Una delle possibilità che abbiamo per rendere meno fastidioso il problema è il ricorso all'utilizzo di enzimi digestivi (ampiamente disponibili in farmacia e sul WEB).

In questa serie di esperimenti utilizzeremo alcuni di questi enzimi e li testeremo su alimenti o substrati verificandone le condizioni ottimali di azione.

Enzimi che agiscono sui carboidrati:

Enzima	Substrato	Azione su	Prodotto	Test, misure
Amilasi	Amido	Legame glucosidico α (1->4)	Maltosio, maltotriosio, destrine	Lugol, Fehling, Benedict Det.spettrofotometriche
Maltasi	Maltosio, maltotriosio	Legame glucosidico α (1->4)	glucosio	Det. Spettrofotometriche, Barfoed
Saccarasi	Saccarosio	Legame glucosidico α (1->2)	Glucosio, fruttosio	Fehling, Benedict
Lattasi	Lattosio ONPG	Legame glucosidico β (1->4)	Glucosio, galattosio	Barfoed, det. spettrofotometriche

II

Enzimi che agiscono sulle proteine

Enzima	Substrato	Azione su	Prodotto	Test, misure
Tripsina	BAPNA	Legame peptidico (Lys-Arg)	Peptidi	Det. spettrofotometriche
Pepsina	Hb bovina	Legame peptidico (Leu-Phen, Tyr, Trp)	Peptidi	Det. Spettrofotometriche Ninidrina (semiquant.)

III

Enzimi che agiscono sui lipidi

Enzima	Substrato	Azione su	Prodotto	Test, misure
lipasi	Olio oliva	Legami estere	Acidi grassi liberi	Titolazioni

Nella maggioranza degli esperimenti viene impostata la procedura strumentale di analisi e vengono lasciate aperte possibilità di varianti per studiare l'effetto di parametri quali T, pH, concentrazione del substrato e dell'enzima.

I tempi per le analisi sono generalmente lunghi: nell'attesa si propone agli studenti di utilizzare il tablet fornito dalla scuola per condurre ricerche sui vari enzimi e sulle possibili varianti. In allegato viene fornita una scheda tipo.

Determinazione
dell'attività
dell'amilasi

Prima di iniziare gli studenti devono documentarsi sull'amilasi: tipologia di enzima, tratto dell'apparato digerente in cui agisce, condizioni ottimali di pH

Metodo 1

Determinazione degli zuccheri riducenti liberati con metodo titrometrico (metodo Shaffer-Somogyi)

Reagenti

Maltosio, soluzione
Reattivo di Shaffer-Somogyi (vd. nota preparazione)
 H_2SO_4 5N
 $Na_2S_2O_3$ 0,1 M
Amilasi pancreatica sol.
Amido soluzione 1%

Materiale

Bagno maria
Buretta 50 mL con sostegno
Becher da 50 mL

Preparazione reattivo di Schaffer-Somogyi

In un matraccio da 1 L con circa 800 mL di acqua distillata immettere nell'ordine:

7,5 g di $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
25 g di $KNa(C_4H_4O_6) \cdot 4H_2O$ (sale di LaRochelle)
25 g di Na_2CO_3 (o 20,25 g di $Na_2CO_3 \cdot H_2O$)
20 g di $NaHCO_3$
5 g di KI

Aggiungere 0,785g di KIO_3 sciolti in 20-30 mL di acqua distillata, lavare il becher più volte, portare infine tutto a volume.

Preparare una soluzione standard di maltosio (1g/L) e immettere in una serie di becher da 50 mL volumi di soluzione crescenti in serie: 0;0,5;1,1,5;2 mL . Aggiungere acqua distillata sino ad avere 5 mL di soluzione in tutti i becher.

Aggiungere 5 ml di soluzione di reattivo di S.S e riscaldare per 15 minuti in un bagnomaria bollente, riportando poi tutto a 35-40°C.

Immettere 1 mL di H_2SO_4 5N a ciascun becher, agitare per permettere l'ossidazione del rame precedentemente ridotto e titolare il tutto con $Na_2S_2O_3$.

Costruzione retta di taratura

Determinazione
dell'attività
dell'amilasi

**Determinazione attività
enzima**

Si costruisce un grafico riportando il volume di titolante (tolto il valore del bianco) sull'asse delle y e la quantità di maltosio (mg) sull'asse delle x.

0,5 mL di soluzione di amido all'1% e 0,5 mL di soluzione di enzima vengono incubati per 3 minuti esatti , al termine si immette la provetta in un bagno termico bollente per bloccare la reazione. si porta a volume sino a 5 mL con acqua distillata e si aggiungono 5 ml di soluzione di S.S.

Si riscalda in bagno maria bollente per 15 minuti e si raffredda. Si aggiunge 1 mL di H₂SO₄, si agita e si titola con tiosolfato di sodio come fatto in precedenza.

La concentrazione di maltosio liberata è calcolata sulla retta di taratura.

Una unità di attività enzimatica è la quantità di enzima che libera 1 μmol di maltosio-equivalenti in 1 minuto.

L'attività dell'enzima può essere provata anche in condizioni diverse:

- Tempo di incubazione
- Concentrazione dell'enzima
- Concentrazione del substrato
- Condizioni pH
- Presenza di inibitori (es. acido acetilsalicilico, creatinina)

Le reazioni che avvengono sono le seguenti:

a. Zucchero riducente + Cu⁺² → forma ossidata zucchero riducente + Cu⁺¹

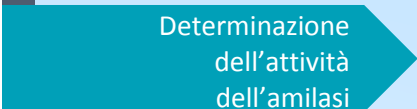
b. IO₃⁻ + 6H⁺ + 5I⁻ → 3H₂O + 3 I₂

c. 2Cu⁺¹ + I₂ → 2Cu⁺² + 2I⁻

d. I₂ + 2 S₂O₃²⁻ → 2I⁻ + S₄O₆²⁻

Lo iodio in eccesso in c) viene titolato con il tiosolfato. Si esegue una seconda titolazione con il bianco (assenza di zucchero riducente). Dalla differenza tra i due volumi si arriva alla quantità

di I₂ utilizzata per la riossidazione di Cu²⁺ che dà la quantità di zucchero riducente presente nel campione.



Determinazione
dell'attività
dell'amilasi

Materiale

Metodo 2

Determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti con ADNS

Questo metodo può essere utilizzato per misurare la quantità di zuccheri riducenti prodotti in seguito all'azione di diversi enzimi (glucosio, galattosio, maltosio..) previa costruzione di una retta di taratura.

Fonte: Protocolli Sigma Aldrich¹

Sodio fosfato monobasico NaH_2PO_4
Cloruro di sodio NaCl
Idrossido di sodio NaOH
Tartrato di sodio e potassio tetraidrato
Acido 3,5-dinitrosalicilico
D-(+)-maltosio monoidrato

Strumentazione

Serie di matracci da 50 mL
Bilancia analitica
Micropipette
Bagno termico
Spettrofotometro
Cuvette cammino ottico 1 cm

Preparazione soluzioni

Soluzione tampone 20mM Sodio fosfato monobasico e 6,7 mM Sodio cloruro. 2,4 mg/mL di sodio fosfato monobasico vengono mescolati con 0,30 mg/mL di sodio cloruro , si porta a pH 6,9 con NaOH 1M/ HCl 1M

Soluzione di amido 1%. Preparare una soluzione di amido solubile 10 mg/mL in soluzione tampone , sciogliendo a caldo in poca acqua l'amido e portando, una volta fredda, la soluzione a volume

Soluzione 2 M NaOH

Soluzione 5,3M tartrato di sodio e potassio. Preparare una soluzione 1,496 mg/mL di tartrato di sodio potassio tetraidrato in 2M NaOH

¹ <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>

Determinazione
dell'attività
dell'amilasi

Preparazione campione e
analisi

Soluzione 96 mM di acido 3,5-dinitrosalicilico. 21,9 mg/mL di ADNS con acqua distillata, scaldare senza arrivare all'ebollizione mescolando.

Reattivo colorante . Per preparare 40 mL di soluzione; aggiungere a 12 mL di acqua distillata calda 8,0 mL di soluzione calda 5,3 mM di tartrato di sodio e potassio e 20 mL di 96 mM ADNS. La soluzione si può mantenere sino a 6 mesi al riparo dalla luce.

Soluzione standard di maltosio 0,2 %.

Soluzione di α -Amilasi. Immediatamente prima dell'uso preparare una soluzione contenente 0,75-1,5 unità/mL di enzima.

Immettere in diverse provette le seguenti quantità di reagenti (mL)

Reagente	Camp.1	Camp.2	Camp.3	Blank
Amido	1,00	1,00	1,00	1,00
α-amilasi	0,50	0,70	1,00	-
Incubare per 3 min. a 20°C				
ADNS	1,00	1,00	1,00	1,00
Bagno termico all'ebollizione 15 min esatti				
α-amilasi	0,50	0,30		1,00
Raffreddare in bagno di ghiaccio a T ambiente				
H₂O	9,00	9,00	9,00	9,00

Dopo aver mescolato i vari campioni, azzerare lo spettrofotometro a 540 nm e leggere le A_{540} dei vari campioni, compreso il bianco.

Costruzione retta taratura

Si costruisce una retta di taratura partendo dalla soluzione di maltosio preparata in precedenza, seguendo le indicazioni della tabella seguente.

Determinazione
dell'attività
dell'amilasi

**Determinazione attività
amilasica**

**Progettazione eventuali
varianti**

In una serie di provette immettere le seguenti quantità di reagenti :

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Bla
0,2% Malt	0,05	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	2,00	-
H ₂ O	1,95	1,80	1,60	1,40	1,20	1,00	-	2,00
ADNS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Immettere in bagno bollente per 15 minuti- raffreddare								
H ₂ O	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00

Azzerare lo spettrofotometro a 540 nm, leggere le A₅₄₀ per tutti gli standard, compreso il blank.

Calcolare la ΔA_{540} per ogni standard vs il blank standard:

$$\Delta A_{540} = A_{540 \text{ stand}} - A_{540 \text{ blank}}$$

Preparare una curva di calibrazione ΔA_{540} vs mg maltosio usando il metodo della regressione lineare

Determinare la ΔA_{540} di ogni soluzione campione vs blank soluzione

Determinare i mg di maltosio rilasciati usando la curva di calibrazione

$$\text{Unità/mL enzima} = \frac{\text{mg maltosio rilasciato}}{\text{mL enzima}} \text{ df}$$

In cui:

df = fattore di diluizione

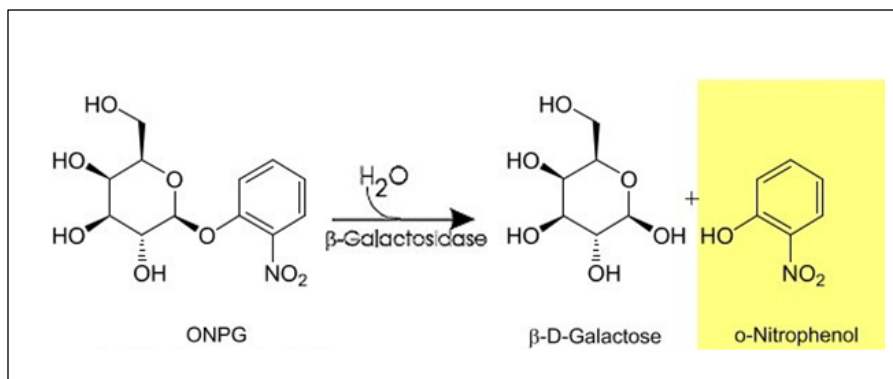
mL enzima: mL aggiunti (0,50/0,70,1,00)

Si può pensare di variare T di incubazione, concentrazione del substrato, condizioni di pH...

Studio sull'attività dell'enzima lattasi

Prima di iniziare gli studenti devono documentarsi sulla lattasi : tipologia di enzima, tratto dell'apparato digerente in cui agisce, condizioni ottimali di pH

Il metodo proposto ² fa uso di un substrato specifico (ONPG : orto-nitro-fenil-galattopiranoside) che, rispetto al latte, presenta il vantaggio di non essere opaco e che è comunque un substrato sul quale la lattasi agisce in modo identico rispetto al lattosio. La lattasi infatti dissocia ONPG liberando galattosio e ONP (orto-nitrofenolo). L'ONP assorbe in maniera specifica a 420 nm.



In questa serie di esperienze non si ha come obiettivo la determinazione dell'attività dell'enzima, ma lo studio dell'effetto che la variazione di parametri quali la concentrazione, il pH e la T hanno sull'efficacia dell'azione dell'enzima. Si misura la quantità di ONP liberato durante la reazione.

Materiale

Soluzione lattasi
5mM soluzione di ONPG
Soluzioni tampone a diversi pH (2,4,6,7,8,10,12)
 Na_2CO_3 1 M

Strumentazione

Pipette 1 mL
Pipette 10 mL
Bagno termico
Spettrofotometro
Cuvette
Provette

²

<http://www.westminster.edu/about/community/sim/documents/stheactivityoflactase.pdf>

Studio sull'attività
dell'enzima lattasi

**Effetto della
concentrazione
dell'enzima**

Preparare il blank per azzerare lo spettrofotometro:

in una provetta immettere 4,5 mL di soluzione tampone a pH = 7, 0,5 mL di ONPG e 1 mL di soluzione di Na_2CO_3 1M.

Preparare una serie di 8 provette immettendo in ognuna 0,5 mL di ONPG e proseguendo secondo lo schema riportato qui sotto

	1	2	3	4	5	6	7	8
reagenti								
Tamp.pH 7	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0
Lattasi	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
2 minuti incubazione a 37°C								
Na_2CO_3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
La reazione si blocca								

Riempire la cuvetta per $\frac{3}{4}$ con il contenuto delle varie provette e passare alla lettura dell' A_{420} . Si riporta in grafico.

**Effetto della
concentrazione del
substrato**

Si procede in modo analogo a quanto visto in precedenza, modificando in questo modo la distribuzione dei vari reagenti nelle provette:

	1	2	3	4	5	6	7	8
reagenti								
Tamp.pH 7	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5
ONPG	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Lattasi	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2 minuti incubazione a 37°C								
Na_2CO_3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
La reazione si blocca								

Si usa lo stesso blank per l'azzeramento dello strumento e si procede alla lettura dell'assorbanza dei singoli campioni e si riporta in grafico.

Studio sull'attività
dell'enzima lattasi

**Effetto del pH
sull'azione dell'enzima**

Si prepara un blank come nei casi precedenti. La serie di provette viene invece così preparata:

provetta	4,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	2 min Incubazione 37°C	1 mL
1	Tamp. pH 2	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃
2	Tamp.pH 4	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃
3	Tamp.pH 6	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃
4	Tamp.pH 8	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃
5	Tamp.pH 10	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃
6	Tamp.pH 12	ONPG	Lattasi		Na ₂ CO ₃

Lo strumento viene azzerato a 420 nm con il blank e si procede poi alla lettura dell'A₄₂₀. Si riporta in grafico.

**Effetto della
temperatura
sull'azione dell'enzima**

Si prepara un blank come nei casi precedenti e si procede alla preparazione della serie di provette nel modo seguente:

	1	2	3	4	5
reagenti					
Tamp.pH 7	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL
ONPG	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
T	0°C	23 °C	37°C	60°C	100°C
Si lascia ambientare per 5 minuti					
lattasi	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Incubazione per 2 min					
Si aggiunge a ogni provetta 1 mL di Na ₂ CO ₃ per bloccare la reazione					

Lo strumento viene azzerato a 420 nm con il blank e si procede alla lettura di A₄₂₀. Si riporta in grafico.

Studio sull'attività
dell'enzima
maltasi

Materiale

Maltasi soluzione enzimatica : 2-3 mg/mL
 Maltosio soluzione in tampone acido maleico/maleato, pH 6
 Soluzione TGO – Tris-GlucosioOssidasi (rilevatrice): 0,5 M Tris-HCl,
 soluzione 0,1% perossidasi, soluzione 1:4 Triton X-100, glucosio-
 ossidasi
 Soluzione standard glucosio 0,2 mg/mL

Strumentazione

Micropipette automatiche
 Provette e portaprovette
 Bilancia tecnica
 Matracci per la preparazione delle soluzioni
 Spettrofotometro
 Cuvette

Preparazione delle soluzioni

Soluzione tampone acido maleico/maleato: 50 mM. Per preparare 100 mL di tampone: sciogliere 0,58 g di acido maleico in 90 mL di acqua e aggiungere circa 7 mL di NaOH 1 M per arrivare a pH = 6. Portare infine a volume con acqua.

Soluzione substrato (Maltosio): preparare una soluzione che sia 50mM in tampone acido maleico/maleato

Soluzione TGO. Preparazione dei componenti:

soluzione Tris-HCl 0,5 M : per 100 mL Trizma base 60,5 g in 500 mL acqua distillata a cui si aggiunge HCl concentrato sino ad arrivare a un pH = 7.0, si porta a volume con acqua distillata

soluzione 0,1 % perossidasi

soluzione detergente: 1 parte Triton X-100 e 4 parti di etanolo 95%

Per ottenere 500 mL di soluzione TGO mescolare:

³ <http://www.ableweb.org/volumes/vol-31/v31reprint.php?ch=22>

Studio sull'attività
dell'enzima
maltasi

Studio attività enzima

Tempi di azione

5,0 mL di soluzione detergente, 2,5 mL di soluzione di perossidasi, 2,5 mL di o-dianisidina dicloridrato, 0,5 g di glucosio ossidasi la soluzione così preparata dura in frigorifero per 1 mese)

Soluzioni stock di glucosio: partendo dalla soluzione di 0,2 mg/mL ottenere soluzioni più diluite in modo da avere almeno 3 soluzioni : 50,100 e 200 µg/ml

Costruzione della retta di calibrazione per il glucosio rilasciato.

In una serie di provette vengono immessi volumi uguali di soluzioni di glucosio a concentrazione diversa (ad esempio 200 µL di glucosio a concentrazione 50,100 e 200 µg/mL). Si aggiungono a ogni provetta 2,00 mL di soluzione TGO.

Si prepara contemporaneamente un bianco con 200 µL di acqua e 2,00 mL di soluzione TGO.

Si pone in incubazione a 37°C per 20 minuti. Il glucosio subisce una reazione ad opera della glucosio ossidasi che dà origine a un prodotto che assorbe a 420 nm.

Dopo 20 minuti si raffreddano le provette , si azzerano con il bianco lo strumento e si procede alla lettura ad A_{420} . Si costruisce il grafico.

Azione della maltasi sul substrato

In un primo passaggio si pongono all'interno di una serie di provette uguali volumi di soluzione enzimatica e substrato 8 es. 100 µL). Si trasferiscono le provette in un bagno termico a 37 °C e si lasciano incubare per tempi diversi. Ogni provetta che viene prelevata viene segnata con una sigla , immessa in un bagno di ghiaccio per bloccare la reazione.

In un secondo passaggio, si aggiungono alle provette 2 mL di soluzione di TGO, che è anche un potente inibitore della maltasi che agisce a T ben più elevate di quelle ottenibili in un bagno di ghiaccio.

Si immettono di nuovo le provette nel bagno termico a 37°C, questa volta per 20 minuti. Il glucosio rilasciato dall'azione dell'enzima, come abbiamo visto precedentemente, reagisce dando origine a un prodotto che assorbe a 420 nm.

Si legge A_{420} per i vari campioni e si costruisce il grafico.

Studio sull'attività
dell'enzima
maltasi

**Concentrazione
substrato**

Si possono preparare substrati che hanno diverse concentrazioni di maltosio: ad esempio 5,20,50,100,150 mM e procedere secondo i passaggi visti in precedenza

Variazioni pH

Si possono adoperare tamponi a pH diversi per preparare la soluzione di substrato: possono essere scelti tamponi a pH 4,5-6,0-7,5-9,0 e procedere secondo i passaggi visti in precedenza

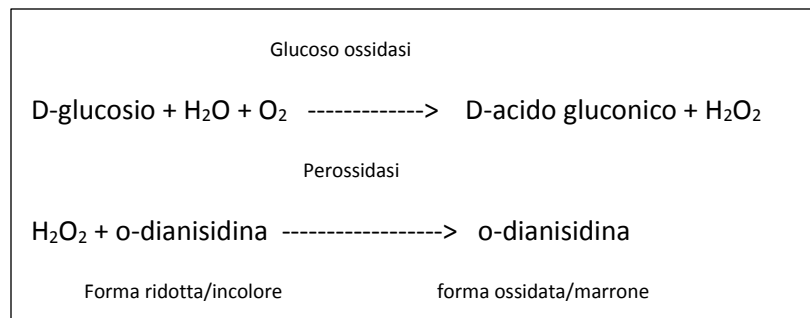
Variazioni T

Si possono incubare le soluzioni di enzima e substrato a T diverse da quelle suggerite nella procedura iniziale, scegliendo temperatura facilmente ottenibili in laboratorio. 4°C (bagno acqua e ghiaccio), 10°C (frigorifero), 20-23°C (temperatura ambiente), 60°C (bagno termico), 100°C (acqua all'ebollizione)

Presenza inibitori

Il solfato rameico è un inibitore facilmente reperibile in un laboratorio chimico. Si possono preparare soluzioni di solfato rameico pentaidrato allo 0% (rif), 0,2%,0,5%,2% in volumi pari al substrato (è inibitore competitivo) e procedere come visto in precedenza.

La reazione che forma il prodotto rilevabile per via spettrofotometrica:



Studio sull'attività
dell'enzima
tripsina

Materiale

p-nitroanilina soluzione 1 mM
soluzione BAPNA 2mM
soluzione enzimatica tripsina 0,1 mg/mL (in 20 mM CaCl₂)
soluzioni tampone 0,2 M pH da 1 a 10

Strumentazione

serie provette e portaprovette
bagno termico
spettrofotometro e cuvette

Costruzione di una retta di calibrazione

Preparare 6 provette immettendo in esse seguenti volumi di 1 mM p-NA (p-nitroanilide) e portando poi tutte le provette a un volume di 2 mL con acqua distillata: 2,0-1,6-1,2-0,8-0,4-0,0 mL. Misurare l' A_{430} per le diverse soluzioni, riportando poi i valori all'interno della seguente tabella:

V (mL)	2,0	1,6	1,2	0,8	0,4	0
Conc mM						
n° μ mol						
A						

Determinazione del pH ottimale per la tripsina

Preparare una serie di 11 provette, immettere in ciascuna di esse 1,0 mL della soluzione tampone a pH determinato (da 1 a 10) e 0,9 mL di soluzione 2 mM di BAPNA.

Nelle prime 10 immettere 0,1 mL di soluzione di tripsina, nella undicesima lo stesso volume di acqua.

Mescolare bene ed incubare a 37 °C per 15 minuti.

Misurare l' A_{430} adoperando l'undicesima provetta come blank. E' fondamentale condurre velocemente la misura, per uniformare il più possibile i tempi con cui l'enzima agisce sul substrato.

Studio sull'attività
dell'enzima
tripsina

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A										
$\mu\text{mol p-Na}$										
A										

Studio sull'attività
dell'enzima
pepsina

Materiale

Questo metodo è semiquantitativo.

Si cercherà di determinare il pH di azione ottimale per l'enzima.

Soluzione 0,2% emoglobina bovina denaturata
Soluzione di pepsina 1 mg/mL 8 in 10 mM NaCl)
Soluzioni tampone 0,2 m a diversi pH
Stop solution . 0,2 m Tris HCl a pH 8,5
Nindrina soluzione

Serie di 12 provette
Vetreria per preparare le soluzioni dei reagent
Bagno termico

Strumenti

Si prepara una serie di 10 provette secondo il seguente schema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
reagente										
Sol.tamp. pH diversi (mL)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
0,2% Hb (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Mescolare bene										
Pepsina µL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Incubare a 37 °C per 30 minuti										

Contemporaneamente preparare due provette di controllo

Provetta 11: 0,45 mL di H₂O + 0,05 mL pepsina

Provetta 12: 0,25 ml H₂O + 0,25 mL Hb 0,2%. Incubare con le altre provette.

Dopo i 30 minuti aggiungere velocemente 0,2 mL di Tris-HCl per bloccare la reazione. Riporre in bagno termico a 80°C per 5 minuti.

Togliere dal bagno termico e aggiungere 1,00 ml di soluzione di ninidrina. Riscaldare ancora in bagno termico a 80 °C le provette.

L'intensità della colorazione (blu) è segno della presenza di peptidi liberi (nelle provette in cui la pepsina non ha agito precipita l'Hb denaturata). Stimare l'intensità del colore e definire le condizioni ottimali di pH.

Studio sull'attività
dell'enzima
pepsina

Materiale

Strumenti

Metodo spettrofotometrico⁴

Si determina l'attività della pepsina in condizioni T= 37°C pH = 2. In una successiva fase si possono variare questi parametri.

Soluzione 2% emoglobina bovina (disciogliere 0,5 g di emoglobina in 20 mL di acqua e poi aggiungere 5 ml di HCl 300 mM per arrivare a pH = 2)

Soluzione di pepsina (1mg/mL in 10 mM NaCl), da diluire poi con 10mM NaOH per arrivare a una serie di concentrazioni diverse: 5,10,15,20,25,30 µg/mL

Acido tricloroacetico 5%

Micropipette	Microcentrifuga
Eppendorf 2 mL	Incubatore oscillante
	Spettrofotometro
	Bagno termico

Preparare il bagno termico a 37°C.

Pipettare 500 µL di Hb 2% in Eppendorf da 2 mL e sistemarle nell'incubatore oscillante a 37°C per 3.4 minuti. Tenere da parte una provetta per il bianco.

Aggiungere 100 µL di pepsina alle diverse concentrazioni nelle Eppendorf e incubare per 10 minuti esatti. Per stoppare la reazione immettere 1 mL di acido tricloroacetico. Aggiungere ora alla provetta per il bianco 100 µL di pepsina.

Centrifugare le Eppendorf a 6000 giri per 30 minuti per far precipitare l'emoglobina.

Azzerare lo spettrofotometro a A = 280 nm con il bianco e leggere A₂₈₀ per le varie soluzioni preparate, versando il contenuto delle Eppendorf nelle cuvette.

L'attività dell'enzima si calcola per le varie soluzioni con

$$\text{Unità/mg} = \frac{[A_{280} \text{ sol} - A_{280} \text{ blank}] \times 1000}{\Delta t \cdot X}$$

X = concentrazione della pepsina (mg/mL) nella soluzione finale (quella che va in cuvetta). Esiste una relazione lineare tra l'A e la concentrazione della pepsina (se non viene trovata, l'enzima è troppo concentrato e occorre diluirlo).

⁴ <http://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf>

**Studio sull'attività
dell'enzima lipasi****Materiale**

Olio oliva extravergine
Gomma arabica soluzione 7%
Tampone fosfato 0,1 M pH=7
Sospensione lipasi (10 mg/mL)
Fenolftaleina, soluzione 1%

Strumenti

Becher 50 mL
Burette 10 mL
Bagno termico

Si prepara l'emulsione di olio di oliva: 25 mL di olio sono mescolati con 75 ml di soluzione di gomma arabica al 7% .

Viene preparata una soluzione mescolando 5 mL della emulsione di olio, 2 mL del tampone fosfato 0,1 M e 1 mL di sospensione enzimatica. Si incuba il tutto a 37°C per 30 minuti.

Immediatamente dopo si immettono 15 mL di soluzione etanolo/acetone (1:1 v/v) e gli acidi grassi liberi vengono titolati con NaOH 0,05 M, usando la fenolftaleina come indicatore.

Si risale alla quantità di acidi grassi liberi (utilizzando i parametri standard per la determinazione dell'acidità di un olio alimentare) e si arriva a determinare l'attività lipasica:
















1 unità di attività lipasica: quantità di enzima che libera 1 μ mol di acido grasso per minuto.

Per altri possibili esperimenti sulla lipasi vedere il seguente link:

<http://curiestemlab.altervista.org/wp-content/uploads/2017/03/la-lipasi-e-lidrolisi-dei-trigliceridi.pdf>

⁵ <http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n3/a09v31n3.pdf>

REAGENTI UTILIZZATI RISCHIO CHIMICO

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		H 302, 318,410	P273,280,305+351+338
Na_2CO_3		H319	P280, 305+351+338
KI		H372	P314
KIO_3		H 272, 318	P 221, 280, 305+351+338
H_2SO_4		H 314,290	P 280, 310+330+331, 305+351+338,309+310
NaOH		H 314	P 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Acido dinitrosalicilico		H 302	
Tris-HCl		H 315, 319, 335	P 280, 302+352, 305+351+338
Perossidasi		H 317,334	P 280, 260, 304+340, 342+311
o-dianisidina		H 302, 350	P 201, 308+313
Glucosio ossidasi		H 334	P 284, 261, 342+311
p-nitroanilina		H 301+311+331, 373,412	P 280, 301+310, 302+352, 304+340
tripsina		H 315, 319, 334, 335	P 280, 302+352, 304+341, 305+351+338
ninidrina		H 302, 315, 325, 335	P 280, 302+352, 304+340, 305+351+338
HCl		H314,331	P 305+351+338, 310, 410+403

ESEMPIO DI SCHEDA DI LAVORO

DATABASE: PDB, NCBI, BRENDA, KEGG...

Enzima:

Numero E.C.

Classe

Nome sistematico

Reazione catalizzata

Peso molecolare (Da)

Numero turnover

pH ottimale

T ottimale

Gene (cromosoma, NT seq, AA seq, numero esoni..)

Tessuti in cui il gene si esprime

Struttura (immagine)

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / SITOGRAFIA

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>

<http://www.westminster.edu/about/community/sim/documents/stheactivityoflactase.pdf>

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-invertase.html>

<https://pdfs.semanticscholar.org/b4c8/c6a955c9195e0c1cdeedo81401ed4f191a3b.pdf>
invertasi

<http://www.ableweb.org/volumes/vol-31/v31reprint.php?ch=22> maltasi

https://www.liverpool.ac.uk/~agmc1en/Medpracs/practical_3/practical_3.pdf tripsina
chimotripsina

<http://www.worthington-biochem.com/pm/assay.html> pepsina

<http://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf> pepsina e lipasi

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-pepsin.html>

<http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n3/a09v31n3.pdf> lipasi esterasi

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612017000100005

<http://old.iss.it/binary/publ/cont/9634.pdf> metodi ISS analisi alimenti