

TRABAJOS DE COLABORACION

LABORATORIOS LANDERLAN, S. A. E.

DEPARTAMENTO DE CONTROL

DIRECTOR: D. CARRIAZO

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA EN UNA α -AMILASA DE ORIGEN BACTERIANO (B-SUBTILIS)

por

D. CARRIAZO y A. RUIZ-PERMUY

Ars Pharm. IX, 227, (1968)

La Farmacopea Española, así como otros libros oficiales de uso generalizado, como la Farmacopea Inglesa y el Nuevo Formulario, describen determinaciones del poder amilolítico que, en realidad, son ensayos límites y no una verdadera valoración de la actividad presente, que puede ser de interés en algún caso. A esta valoración hemos dedicado nuestro trabajo, exponiendo un método que estimamos rápido y de suficiente exactitud para las necesidades habituales de un Laboratorio de Control en la Industria Farmacéutica.

“La propiedad característica de las enzimas es su poder de catalizar reacciones químicas definidas. Exceptuando un pequeño grupo de enzimas, que pueden ser determinadas directamente por espectroscopia u otras observaciones, la presencia de enzimas se determina por el desarrollo de las reacciones específicas que catalizan, y la cantidad presente de las mismas se estima por la velocidad de la reacción. Esta medida de la velocidad de reacción es la parte más esencial de la investigación enzimática” (1).

Tres caminos se ofrecen para medir la velocidad de la reacción de la α -amilasa:

- a) Determinando el aumento del poder reductor que se produce en la mezcla reaccionante.
- b) Midiendo el descenso de viscosidad de la misma.

- c) Valorando un cambio producido en o por el sustrato.

En razón de rapidez y comodidad, hemos elegido el último caso. El sustrato de almidón es sabido forma un complejo con el yodo, cuyo color azul puede medirse a una longitud de onda de 660 m μ . Según la cantidad de almidón que queda al interrumpir la reacción enzimática, así será la intensidad del color formado.

Como problema usamos la α -amilasa R-61 de Wallerstein, que viene diluida a una actividad de 19.900 WBALL (unidades Wallerstein de amilasa bacterial por gramo). Esta unidad se define como la cantidad de enzima que digiere 1 mlg. de almidón por minuto, a 37,5° C.

La casa Wallerstein indica el uso del comparador Hellige y un disco número 620-S5, para realizar las lecturas de color. Utilizando un espectrofotómetro se mejora la sensibilidad del método, y por otra parte, su uso es más normal, hoy día, en todos los laboratorios.

Equipo:

- 1) Espectrofotómetro visible.
- 2) Baño termostato a 37,5° \pm 0,2.
- 3) Pipetas, tubos y matraces.

Reactivos:

- 1.—Solución Stock de yodo: Contiene 1,1 gr. de I₂ y 2,2 gr. de IK en 50 ml.

Guardar en cristal topacio, en la oscuridad. Su estabilidad es de un mes.

2.—*Solución diluida de yodo*: Disolver 5 gr. de IK en agua destilada, añadir 0,5 ml. de reactivo 1 y diluir a 500 ml. Preparar en el día.

3.—*Tampón acético acetato sódico*:

- Disolver 27,2 gr. de acetato sódico $3H_2O$, en 50 ml. de agua.
- Diluir 2,4 ml. de ácido acético glacial a 10 ml. con agua.
- Mezclar 50 ml. de (a) con 4,75 ml. de (b). pH = 6.

4.—*Substrato tamponado de almidón*: Preparar una pasta con 1 gr. de almidón soluble Merck, previamente desecado y agua fría. Añadir unos 25 ml. de agua hirviendo. Con agitación constante calentar hasta que hierva uno o dos minutos, o quede claro. Enfriar a la temperatura ambiente, manteniendo la agitación y transferir a un matraz de 50 ml. Añadir 0,25 ml. de ácido acético-acetato sódico tampón y diluir a 50 ml. El pH debe quedar entre 5,6 y 5,7.

5.—*Tampón acetato cálcico-ácido acético*:

- Disolver 17,618 gr. de acetato cálcico. H_2O en aproximadamente 80 ml. de agua destilada.
- Acido acético diluido como 3 (b).
- Añadir 2 ml. de (b) a (a) y diluir a 100 ml. en un matraz aforado. El pH de esta solución quedará entre 5,6 y 5,7.

Nota: El almidón se prepara desecando 2 gr. a 103.104° durante tres horas primero y después, hasta peso constante.

Caso de disponer de $(CH_3-COO)_2$ Ca, anhidro pesar en (5) 15,8 gr.

Solución de enzima: Prepararla, diluyendo con agua destilada, de modo que 10 ml. de solución cuando se añaden a 20 ml. de substrato de almidón tamponado den un tiempo de dextrinización de unas 22 minutos. Añadir 2 ml. de tampón de acetato de

calcio-ácido acético por 100 ml. de dilución final. La dilución final, se prepara por adición de la cantidad apropiada de tampón de acetato cálcico, al matraz conteniendo 2/3 partes de su volumen de agua.

Para calcular la concentración que debe tener en esta solución se parte de la actividad estimada.

$$\text{gr. en 10 ml.} = \frac{400}{\text{actividad estimada} \times 20}$$

Así, si esta actividad es del orden de 16.000, tenemos

$$\begin{aligned} \text{gr. en 10 ml.} &= \frac{400}{16.000 \times 20} = 0,0125 \text{ gr.} \\ &= 1,25 \text{ mg. en 10 ml.} = 0,0125 \% \end{aligned}$$

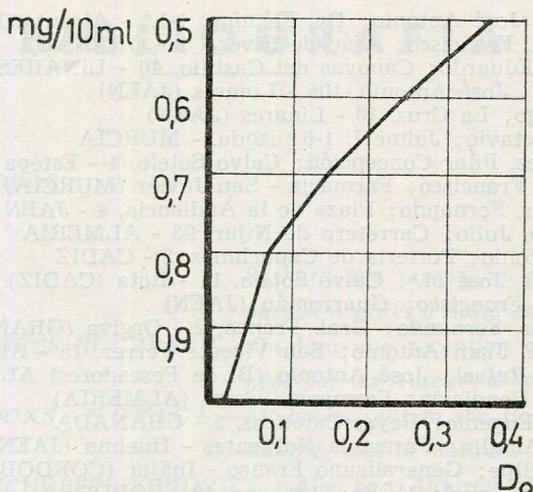
Método:

En un erlenmeyer de 50 ml. introducir 20 ml. del Reactivo 4 y poner en un baño a $37,5^\circ$, teniendo la precaución de cerrarlo a fin de evitar la evaporación. Tratar igualmente la solución de enzima. En dos tubos de ensayo grandes, colocar 20 ml. del Reactivo 2 y tratar de análoga manera.

Una vez homogeneizada la temperatura, pipetear 10 c. c. de la solución de enzima al substrato de almidón. Anotar como tiempo cero, el momento en que la solución de enzima comienza a tomar contacto con el substrato.

Mantener agitación constante y suave, mientras cae el líquido de la pipeta. Volver a tapar y agitar enérgicamente manteniendo el cierre.

Después de 20 minutos exactamente, tomar 1 ml. del matraz de incubación y añadir a un tubo de solución diluida de yodo. Mezclar, invirtiendo el tubo varias veces. Dejar estar 20 minutos en el baño y leer en el espectrofotómetro a $660 m\mu$. frente al Reactivo 2, llevando la lectura a una gráfica obtenida con un patrón de actividad conocida, y en la que se representan en un eje densidades ópticas y en otro miligramos (o unidades) utilizados en un ensayo múltiple con cantidades variables (ver figura).



Curva obtenida con un patrón de α -amilasa R-61 de 19.900 WBALL. Multiplicando los mg/10 ml. por 19,9, se obtienen los WBALL utilizados en cada ensayo

(R-18-68)

RESUMEN

De describe una técnica para determinar la actividad amilolítica, de una α -amilasa de origen bacteriano. Esta técnica puede aplicarse para determinar la actividad de otros fermentos amilolíticos, operando en las condiciones óptimas en las cuales desarrollan su actividad (pH, temperatura) y teniendo presente la concentración de la solución enzima, según su actividad.

SUMMARY

A technique is described for assaying amylolytic activity of an α -amylase of bacterial origin. This technique can be applied to assay the activity of other amylolytic enzymes, operating in the optimal conditions in which they develop their activity (pH, temperature) and taking into account the enzyme solution concentration according to activity.

BIBLIOGRAFIA

1. MALCOLM DIXON. Enzymes E. C. WEBB, 1960.
2. COLOWICK KAPLAN. Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 1957.
3. WEST and TODD. Textbook of Biochemistry. The Macmillan Co., New York, 1952.
4. FRUTON SIMMONDS. General Biochemistry, Jhon Wiley, New York, II Ed., 1958
5. Información técnica de Wallerstein Company, Boletín 706.
6. Farmacopea Oficial Española, II tomo. IX Ed., 1954, 788.
7. D. C. CARRAT, The Quantitative Analysis of Drugs, Chapman Hall Ltd., London III Ed., 1964, 503.
8. British Pharmacopea, 1963, 555.
9. The National Formulary, XII Ed., 1965, 287.