



Stres Parametresi Olarak Tükürük Alfa Amilaz Enzimi: Laboratuvar Yöntemlerinin Kurulumu ve Karşılaştırılması

Salivary Alpha Amylase Enzyme as a Stress Parameter: Establishment and Comparison of Laboratory Methods

Özlem BARUTÇU¹, Sedat YILDIZ²

¹Hasan Kalyoncu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

²İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

ÖZ

Amaç: Tükürük alfa (α) amilaz enzimi sempatik sinir sistemi aktivitesini ölçmek için kullanılan bir biyo-belirteçdir. Bu çalışmanın amacı tükürük α -amilaz enzimi aktivitesini ölçebilmek için mevcut olan üç yöntemi laboratuvarında kurmak ve bu yöntemleri kullanılabilirliği açısından birbirleriyle karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: α -amilaz enzim aktivitesi; nişasta-iyodin, 2-chloro-4-nitrophenyl maltotriose (CNPG3) ve dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemleri olmak üzere üç yöntem ile hazır kitlerde ölçülebilmektedir. Bu bağlamda bu yöntemlerin manuel olarak çalışabilmesi için laboratuvarında standart eğrileri oluşturuldu ve avantaj ve dezavantajları ortaya konuldu. Bu yöntemlerin kullanılabilirliği test edildi.

Bulgular: Nişasta-iyodin ve CNPG3 metodları başarılı bir şekilde kuruldu, fakat DNS metodu için başarılı bir standart eğri oluşturulmasına rağmen numuneler okunamadığından ve birçok yönden dezavantajları olması sebebi ile bu test çalışmalar için uygun bulunmadı. Nişasta iyodin ve CNPG3 testleri için test hassasiyetleri ve bunların çalışma aralıkları uygun bulunmuş olup, nişasta-iyodin testinde 4.000 kat, CNPG3 testinde ise 5 kat seyreltme gerekmiştir. Kurulan iki test arasında zayıf fakat istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki gözlenmiştir (Lineer regresyon için $R^2=0,048$; $p<0,05$, kuadratik regresyon için $R^2=0,106$; $p<0,01$).

Sonuç: CNPG3 ve nişasta-iyodin metodlarının uygulanabilir, uygun maliyetli, kolay ve zaman açısından kısa sürmesi nedeniyle çalışmalarda kullanılabilir oldukları belirlenmiştir. Nişasta-iyodin metodu daha ucuz bir yöntemdir fakat CNPG3 metodu da daha az aşamadan oluşan pratik bir testtir. Bu açıdan tükürük α -amilaz enzimi yöntemi üzerine kurulu çalışmalarda en etken yöntemin CNPG3 yöntemi olduğuna karar verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz enzimi, CNPG3, DNS, nişasta-iyodin, tükürük

ABSTRACT

Aim: Salivary alpha (α)-amylase enzyme is a biomarker used to measure sympathetic nervous system activity. This study aimed to establish three existing methods for measuring salivary α -amylase enzyme activity in the laboratory and to compare these methods in terms of their usability.

Materials and Methods: α -amylase enzyme activity can be measured in ready-made kits by three methods: Starch-Iodine, 2-chloro-4-nitrophenyl maltotriose (CNPG3) and dinitrosalicylic acid (DNS) methods. In this context, standard curves were created in the laboratory for manual study of these methods and their advantages and disadvantages were presented. The usability of these methods was tested.

Results: The starch-iodine and CNPG3 methods were successfully established. However, although a standard curve was successfully established for the DNS method, this assay was not suitable for the studies as the samples were not readable and had many disadvantages. The test sensitivities and working ranges were appropriate for the starch-iodine and CNPG3 tests, requiring 4,000-fold dilution for the starch-iodine test and 5-fold dilution for the CNPG3 test. A weak but statistically significant positive correlation was observed between the two tests ($R^2=0.048$ for linear regression; $p<0.05$, $R^2=0.106$ for quadratic regression; $p<0.01$).

Conclusion: The CNPG3 and starch-iodine methods were feasible, cost-effective, accessible, and time-efficient. The starch-iodine method is a cheaper but the CNPG3 method is also a practical test with fewer steps. In this respect, it has been decided that the CNPG3 method is the most effective method in studies based on salivary α -amylase enzyme method.

Keywords: α -Amylase enzyme, CNPG3, DNS, starch-iodine, saliva

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Özlem BARUTÇU, Hasan Kalyoncu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

Tel.: +90 531 456 49 84 E-posta: ozlem.barutcu@hku.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6107-2599

Geliş tarihi/Received: 07.02.2024 Kabul tarihi/Accepted: 29.02.2024

©Telif Hakkı 2024 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2024 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.



GİRİŞ

Tükürük vücudumuzda kolaylıkla elde edilebilen bir sıvıdır ve önemi giderek artmaktadır¹⁻³. Tükürük alfa (α)-amilaz enzimi, tükürük bezleri tarafından üretilen, otonom sinir sisteminin aktivasyonuna bağlı olarak salınan ve nişastayı parçalayan bir enzimdir⁴. Aynı zamanda stres fizyolojisinin araştırılmasında da önemli bir parametredir^{5,6}. Tükürük α -amilaz enzim aktivitesini teorik olarak üç yöntemle ölçmek mümkündür. Nişasta-iyot yöntemi, nişastanın α -amilaz enzimi tarafından parçalanmasına dayanır. α -amilaz enziminin parçalamadığı nişasta iyot ile boyanır ve spektrofotometrede okunarak belirlenir⁷. Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ise indirgenen şeker miktarının belirlenmesi esasına dayanır⁸. Substrat yönteminde 2-kloro-4-nitrofenil maltotriosid (CNPG3) substrat görevi görür ve enzime bağlandığında sarı bir renk oluşturarak enzimin aktivitesini gösterir⁹⁻¹¹.

Farklı yöntemlerle α -amilaz ölçümü yapılabilirken, bu yöntemler çoğunlukla hazır kitlerle çalışılmaktadır ve bunları birbirleriyle karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada laboratuvarda α -amilaz enzim aktivitesini ölçen üç yöntem oluşturulmuş ve maliyet, zaman ve uygulanabilirlik açısından karşılaştırılmıştır.

Bu çalışma, bu testleri laboratuvarda kurmayı, en uygun testi belirlemeyi ve daha sonra stres fizyolojisini araştırmak için kullanmayı amaçlamıştır. Ayrıca bu konuda bilgi birikimi kazanılacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

DeneySEL Çalışmalar

Nişasta-İyot Yönteminin Oluşturulması

Nişasta-iyot yöntemi, α -amilaz enziminin glukozlar arasındaki bağlantısını tespit etmeyi amaçlar. Nişasta ve iyot parçalanır ve etkileşime girerek mavi-mor bir renk oluşturur. Bu, α -amilaz aktivitesinin ölçülmesini sağlar.

Nişasta, amiloz ve amilopektin adı verilen iki gruptan oluşur. Amiloz doğrusal bir moleküldür. Glikoz molekülleri birbiri ardına sıralanarak bir sarmal oluşturur ve çift sarmal meydana getirir. İki amiloz molekülü bir çift sarmal içinde birbirine sarılır ve mavi-mor bir renk oluşturabilir. İyot molekülleri bu sarmallara girebilir ve mavi-mor bir renk oluşturabilir. Amilopektin bir çalı gibi merkezden dallanan bir şekle sahiptir⁷. Çalışma için en uygun olan standart nişasta-iyot çözeltisinin hazır sıvı %1'lik çözelti olduğuna karar verilmiş ve çalışmalarda hazır çözelti kullanılmıştır.

Nişasta-İyot Yönteminde Standart Eğri Oluşturma Protokolü

Standart eğrinin oluşturulmasında α -amilaz birkaç kez

seyreltilmiştir. En uygun konsantrasyonun 1. Standart: 30 U/mL, 2. Standart: 3 U/mL, 3. Standart: 1,5 U/mL, 4. Standart: 0,6 U/mL, 5. Standart: 0,3 U/mL, 6. Standart: 0,15 U/mL ve 7. Standart: 0,06 U/mL olduğuna karar verilmiştir. Numuneleri okumak için numuneler belirli bir aralığa kadar seyreltilmiştir. Bu deneyin prosedürlerinin sonunda numuneler okunmadığında, yeniden seyreltilerek testte yeniden çalıştırılmıştır. Bu amaçla seyreltme için tampon çözelti (PBS) kullanılmıştır.

Nişasta-İyot Testi Protokolü

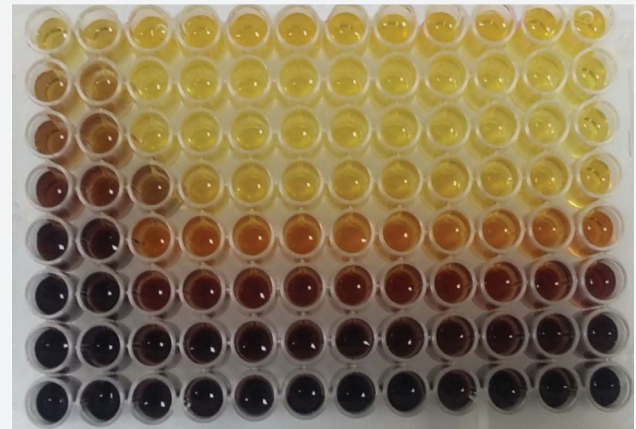
Tükürük örneklerinde α -amilaz aktivasyonunu belirlemek için nişasta-iyot yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Her bir kuyucuğa 40 μ L nişasta çözeltisi pipetlenmiştir.
- Tüm kuyucuklara 40 μ L tükürük (α -amilaz) eklendi (5-10 saniye boyunca hafifçe çalkalandı).
- Fırında (50 santigrat derece) 30 dakika inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara -20 μ L HCl çözeltisi eklendi.
- Tüm kuyucuklara 100 μ L iyot çözeltisi eklendi.
- Plaka okuyuculu bir spektrofotometrede 580 nm'de okundu (Şekil 1)¹².

CNPG3 Yönteminin Kurulumu

CNPG3 yönteminin birincil amacı, enzime bir substrat olarak bağlanarak işlev görmesidir. Enzim substratına bağlanır ve sarı bir renk oluşturur. Böylece α -amilaz aktivitesi ölçülebilir^{11,13}.

CNPG3 kromojeni ticari olarak temin edilebilen bir substrattır¹⁴. PBS içinde doğrudan çözünür ve açık sarı bir renk oluşturur.



Şekil 1. Nişasta-iyot yöntemi, farklı α -amilaz konsantrasyonlarının neden olduğu renk değişikliklerini göstermektedir. Nişasta-iyot testinde renk sarıdan koyu kahverengiye değişir. Enzimin aktivitesi bu rengin bir spektrofotometrede (580 nm) okunmasıyla ölçülür

Testin uygulanması için standart bir eğri oluşturulmuştur. Bu standart eğriyi oluşturmak için α -amilaz enzimi farklı oranlarda seyreltilmiştir.

CNPG3 Yönteminde Standart Eğri Oluşturma Protokolü

Standart eğrinin oluşturulmasında birkaç seyreltme yapılmış ve en uygun seyreltmelerin 1. Standart: 30 U/mL, 2. Standart: 15 U/mL, 3. Standart: 7,5 U/mL, 4. Standart: 6 U/mL, 5. Standart: 3,75 U/mL ve 6. Standart: 3 U/mL olduğuna karar verilmiştir. Numunelerin okunabilmesi için numuneler belirli bir aralıkta seyreltilmiştir. Tüm numuneler okunmadığında, numuneler farklı oranlarda yeniden seyreltilmiş ve okunmuştur. Seyreltmeler PBS ile yapılmıştır.

CNPG3 Testinin Protokolü

Tükürük örneklerinde α -amilaz aktivasyonunu belirlemek için CNPG3 yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Her bir kuyucuğa 175 μ L PBS çözeltisi pipetlenmiştir.
- Tüm kuyucuklara 5 μ L tükürük (α -amilaz) eklendi (5-10 saniye boyunca hafifçe çalkalandı).
- 1 saat boyunca inkübe edildi (37 santigrat derecede).
- Tüm kuyucuklara 20 μ L CNPG3 çözeltisi eklendi.
- Plaka okuyuculu bir spektrofotometrede 405 nm'de okundu (Şekil 2)¹⁴⁻¹⁶.

DNS Yöntemini Ayarlama

DNS yöntemi α -amilaz aktivitesini ölçmek için kullanılır¹⁷ ve indirgen şeker miktarının ölçülmesine dayanır. DNS yöntemi,



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda α -amilaz kullanımının neden olduğu renk değişikliklerini gösteren CNPG3 yöntemi. CNPG3 testinde, CNPG3 ilavesiyle açık sarı bir renk oluşur ve α -amilaz aktivitesi spektrofotometrede (405 nm) okunarak belirlenir

bir numunedeki indirgen şekerlerin konsantrasyonunu tahmin etmek için kullanılır. İndirgeyici şekerler, çoğu reaktif indirgeyebilen serbest karbonil grubu içerir. Tüm monosakkaritler ve bazı disakkaritler indirgeyici şekerlerdir⁸. 3,5-DNS indirgen şekerlerle reaksiyona girdiğinde turuncu renkli 3-amino-5 nitrosalisilik asit oluşur.

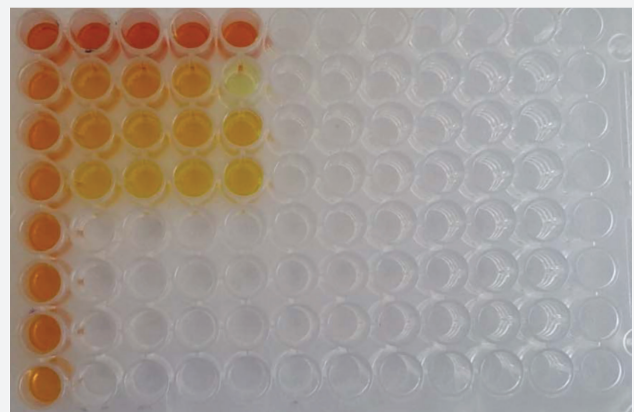
DNS Yönteminde Standart Eğri Oluşturma Protokolü

Standart eğri oluşturulurken birkaç seyreltme yapılmış ve en uygun seyreltmelerin 1. Standart: 30 U/mL, 2. Standart: 3 U/mL, 3. Standart: 0,3 U/mL ve 4. Standart: 0,03 U/mL olduğuna karar verilmiştir. Test için uygun standart eğri oluşturulmuş ancak numuneler seyreltilmesine rağmen standart eğri aralığında renk yoğunluğu elde edilememiştir. DNS testinde bir de kaynatma adımı vardır. Birkaç numune için kolay gibi görünse de çok sayıda numunenin okunması gerektiğinde pratik değildir. Kaynama kapalı tüplerde gerçekleşse de tüplerin içine su girebilir.

DNS Testi Protokolü

Tükürük örneklerinde α -amilaz aktivasyonunu belirlemek için DNS yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Her tüpe 0,9 mL substrat ve 0,1 mL enzim eklendi.
- 37 derecede 5 dakika inkübe edildi.
- 1 mL DNS ilave edildi.
- 10 dakika kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı.
- Plaka okuyuculu spektrofotometrede 540 nm'de okundu (Şekil 3)^{18,19}.



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda α -amilaz kullanımının neden olduğu renk değişimlerinin DNS yöntemiyle gösterilmesi. DNS deneyinde, DNS ilavesiyle sarı renk oluşur ve spektrofotometrede (540 nm) okunarak α -amilaz aktivitesi belirlenir

İstatistiksel Analiz

Veri analizi için MINITAB (ABD) istatistik programı kullanılmıştır. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. Standart eğrileri oluşturmak için 4 parametrelili bir lojistik eğri kullanılmıştır (Gen 5, BioTek Synergy, ABD). Nişasta-iyot testi ile CNPG3 testi arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile gösterilmiştir.

BULGULAR

Nişasta-iyot Standart Eğrisi

Nişasta-iyot deneyi ile elde edilen α -amilaz standart eğrileri 5 testte çalıştırılmış ve ortalama standart eğri değerleri elde edilmiştir (Şekil 4).

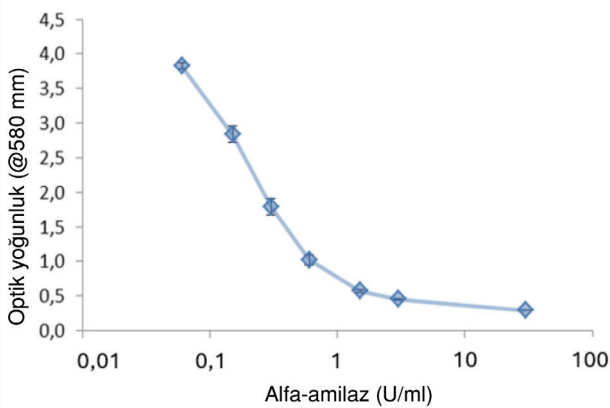
Meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. α -amilaz konsantrasyonlarındaki (ünite/mL) değişikliklerin neden olduğu renk değişiklikleri 580 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve yukarıdaki standart eğri grafiği elde edilmiştir. Değerler 5 testte elde edilen ortalama ve standart hata değerleri olarak sunulmuştur. Standart eğri 0,06 U/mL ile 1,5 U/mL arasında doğrusaldır.

CNPG3 Standart Eğrisi

CNPG3 testi ile elde edilen α -amilaz standart eğrileri 13 testte çalıştırılmış ve ortalama standart eğri değerleri elde edilmiştir (Şekil 5).

DNS Test Standart Eğrisi

Yoğunluktaki değişiklikleri gösteren standart eğri. Standart eğri, 3-30 U/mL arasındaki konsantrasyon farkının optik yoğunlukta yaklaşık 0,300 birim. Değişim meydana gelmiştir (Şekil 6).



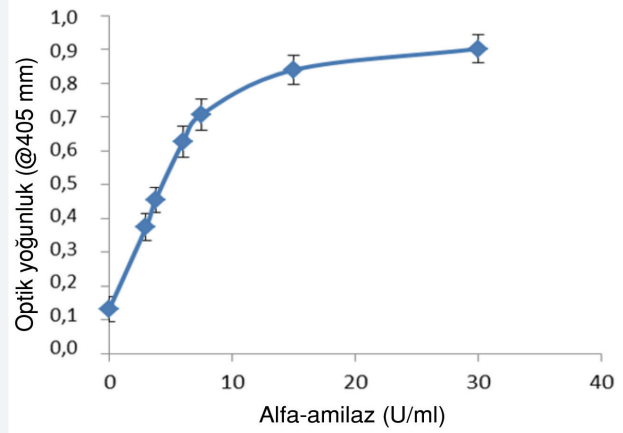
Şekil 4. Nişasta-iyot yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında optik yoğunluk

TARTIŞMA

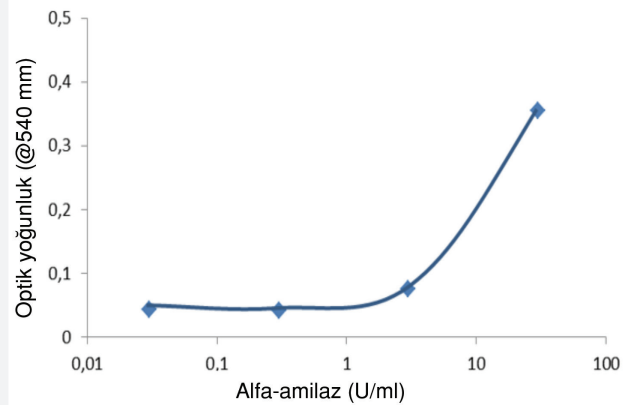
Bu çalışmada, tükürük α -amilaz aktivitesi ölçüm yöntemleri araştırılmış ve tükürük α -amilaz aktivitesi ölçüm yöntemleri ilk kez karşılaştırılmıştır. α -amilaz enzim aktivitesini ölçmek için kullanılan nişasta-iyot karşılaştırmalı tükürük yöntemi, CNPG3 yöntemi ve DNS yöntemi tartışılmıştır.

Nişasta-iyot Yöntemi ile α -amilaz Tayini

Nişasta-iyot testi başarıyla oluşturulmuş ve standart eğrinin dinamik aralığı 0,05-3 U/mL arasında ve hassasiyeti 0,05 U/mL olarak bulunmuştur. Ek olarak, testin optik yoğunluk



Şekil 5. Kromojen substrat yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında CNPG3 optik yanıtı. Yoğunluktaki değişiklikleri gösteren standart bir eğri. 405 nm'de yapılan ölçümler 13 standart eğrinin ortalaması olarak sunulmuştur (\pm SEM). Eğri 0-7,5 U/mL aralığında doğrusaldır



Şekil 6. DNS testindeki standart eğri, artan α -amilaz konsantrasyonları ile optik yoğunluktaki değişiklikleri göstermektedir. Standart eğride, 3-30 U/mL arasındaki konsantrasyon farkına yanıt olarak optik yoğunlukta yaklaşık 0,300 birimlik bir değişiklik olmuştur

aralığı yaklaşık 0 ila 4.000 arasındadır ve bu da dinamik bir değişim gösterir. Başka bir deyişle, α -amilaz aktivitesine duyarlı bir testtir. Bu haliyle test, tükürük örneklerinde yaklaşık 4.000x seyreltildiğinde α -amilazı tespit edebilir. Ancak bu seyreltme seviyesi iş yükünü nispeten artırmakta ve zaman kaybına neden olmaktadır. Öte yandan, inkübasyon süresinin çok kısa olması ve materyallerin kolay ve ucuz temin edilebilmesi nedeniyle tercih edilebilir bir yöntem gibi görünmektedir.

Ancak her tükürük örneği için ayrı seyreltme yapılması gerekliliği testin pratikte uygulanabilirliğini bir miktar olumsuz etkilemektedir. Nişasta-iyot testi ucuz, kurulumu ve uygulaması kolay ve malzemeleri kolayca temin edilebilen bir testtir. Ancak, çok sayıda seyreltme gerektirir ve iş yükünü nispeten artırır. Öte yandan, testin en önemli özelliği optik yoğunluk değerlerinin 0 ile 4.000 arasında değişmesidir. Dolayısıyla dinamik bir testtir ve bu da önemli bir tercih sebebidir.

CNPG3 Yöntemi ile α -amilaz Tayini

CNPG3 tahlili başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve standart eğrinin dinamik aralığı 0,100 U/mL hassasiyetle 3-15,75 U/mL arasında bulunmuştur. Ayrıca, tahlilin optik yoğunluk aralığı da yaklaşık 0,1 ila 0,8'lik bir dinamik aralık göstermektedir. Bu nedenle tahlil, tükürük örneklerindeki α -amilazı yaklaşık 5x seyreltmede tespit edebilir. Tek bir sulandırma işlemi iş yükünü ve zaman kaybını en aza indirir, ancak kullanılan büyük miktarda tükürük ve inkübasyon süresinin uzunluğu olumsuz bir etkiye sahiptir. CNPG3 tahlili, iş yükünü azaltan ancak nispeten pahalı olan, kurulumu ve uygulaması kolay bir yöntemdir.

DNS Yöntemi ile α -amilaz Tayini

DNS yöntemi biyokimyasal alanda üre ve şeker tayini için kullanılan bir yöntem olarak bilinmektedir. DNS materyali laboratuvar koşullarında hazırlandı ve standart eğri oluşturuldu. DNS standart eğrisinin dinamik aralığının 0,3-0,03 U/mL arasında olduğu ve hassasiyetinin 0,4 U/mL olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, testin optik yoğunluk aralığı yaklaşık 0,1 ile 0,4 arasında hafifçe değişmektedir. Bu nedenle tercih edilme olasılığı çok düşük olup, testin birçok aşamadan oluşması olumsuz bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Kaynatma gibi sorunlu bir adımın varlığı ve numunelerin standart eğrinin optik aralığında olmaması da temel eksiklikler olarak belirtilmektedir. Ayrıca, test amaçlandığı gibi çalışsa da, çok sayıda numunenin pratik olarak incelenmesi için uygun değildir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızda, laboratuvarında oluşturulan yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymada bazı kısıtlamalar olabilir.

SONUÇ

Nişasta-iyot ve CNPG3 kromojen testleri başarıyla geliştirilmiştir. DNS testinin standart eğrisi başarıyla oluşturuldu, ancak örnekler optik yoğunluk ile uyumlu değildi. Oluşturulan testlerin hassasiyetleri ve çalışma aralıkları uygundur; nişasta-iyot testi için 4.000 kat seyreltme ve CNPG3 testi için 5 kat seyreltme gerekmiştir. Her iki testin de ucuz, kolay uygulanabilir ve kısa süreli olduğu görülmüştür. Nişasta-iyot testi CNPG3 testinden 4-5 kat daha ucuz olmasına rağmen, CNPG3 testi daha az adımla daha pratik bir testtir.

Etik

Etik Kurul Onayı ve Hasta Onayı: Bu çalışma bir laboratuvar çalışması olduğu için etik kurul onayı ve hasta onayı gerekmemiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: Ö.B., Dizayn: Ö.B., Veri Toplama veya İşleme: Ö.B., S.Y., Analiz veya Yorumlama: Ö.B., S.Y., Literatür Arama: Ö.B., S.Y., Yazan: Ö.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2015/82 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr.* 2001;131:1621S-5S.
- Obayashi K. Salivary mental stress proteins. *Clin Chim Acta.* 2013;425:196-201.
- Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol.* 2005;55:333-42.
- Allwood MA, Handwerger K, Kivlighan KT, Granger DA, Stroud LR. Direct and moderating links of salivary alpha-amylase and cortisol stress-reactivity to youth behavioral and emotional adjustment. *Biol Psychol.* 2011;88:57-64.
- Skosnik PD, Chatterton RT Jr, Swisher T, Park S. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. *Int J Psychophysiol.* 2000;36:59-68.
- Booij SH, Bos EH, Bouwmans ME, van Faassen M, Kema IP, Oldehinkel AJ, et al. Cortisol and α -Amylase Secretion Patterns between and within Depressed and Non-Depressed Individuals. *PLoS One.* 2015;10:e0131002.
- Tester RF, Qi X, Karkalas J. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology.* 2006;130:39-54.
- Xiao Z, Storms R, Tsang A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem.* 2006;351:146-8.
- Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flowrate. *Psychophysiol.* 2006;43:645-52.
- Braithwaite EC, Ramchandani PG, Lane TA, Murphy SE. Symptoms of prenatal depression are associated with raised salivary alpha-amylase levels. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;60:163-72.

11. Lehoczki G, Szabó K, Takács I, Kandra L, Gyémánt G. Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31:1648-53.
12. Manonmani HK, Kunhi AAM. Interference of thiol-compounds with dextrinizing activity assay of α -amylase by starch-iodine colour reaction: Modification of the method to eliminate this interference. *World J Microbiol Biotechnol*. 1999;15:485-7.
13. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32:392-401.
14. Gordis EB, Granger DA, Susman EJ, Trickett PK. Salivary alpha amylase-cortisol asymmetry in maltreated youth. *Horm Behav*. 2008;53:96-103.
15. Engert V, Vogel S, Efanov SI, Duchesne A, Corbo V, Ali N, et al. Investigation into the cross-correlation of salivary cortisol and alpha-amylase responses to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36:1294-302.
16. Zagami F. 2-Chloro-4-nitrophenyl- β -D-maltotriose new substrate for α -amylase determination in biological fluids. *International Journal of Clinical Investigation*. 2002;1:39-43.
17. Visvanathan R, Jayathilake C, Liyanage R. A simple microplate-based method for the determination of α -amylase activity using the glucose assay kit (GOD method). *Food Chem*. 2016;211:853-9.
18. Bernfeld P. Amylases, alpha and beta. *Methods Enzymol*. 1955;1:149-58.
19. Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo JM. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour Technol*. 2002;83:105-9.