Biotech Academy

# Forsøgsvejledning – Stivelse og Effekten af amylase

# Enzymer og brødbagning

## Formål

Formålet med dette forsøg er:

1) At nedbryde stivelse vha. industriel amylase. Nedbrydningen ses via et farveskift fra blå/violet til gullig.
2) At se indflydelsen af pH og temperatur på nedbrydningshastigheden.
3) At beregne og sammenligne enzymaktiviteten målt som mg stivelse nedbrudt pr. minut.
4) At se effekten af hhv. enzymkoncentration og substratkoncentration på nedbrydningshastigheden.

**Kort baggrund:**

Ved tilsætning af jod-jodkalium opløsning til stivelseopløsningen farves denne blå/violet, hvilket skyldes binding af jod til stivelsesmolekylerne. Ved nedbrydning af stivelse frigives jodatomerne, og opløsningen får et gulligt skær. I dette forsøg bruges tidspunktet for farveskiftet som et udtryk for amylaseaktiviteten. I visse tilfælde beregnes enzymaktiviteten målt som mg stivelse nedbrudt pr. min.

## Materialer

- 0,5 % gelatiniseret (forklistret) stivelsesopløsning (Der laves en stor fælles opløsning ved at opløse hhv. 5 gram stivelse i 1 liter kogende vand. Ved forsøgets start skal opløsningen have stuetemperatur.)
- 1 % gelanitiseret (forklistret) stivelsesopløsning (Der laves en stor fælles opløsning ved at opløse hhv. 5 gram stivelse i 0,5 liter kogende vand. Ved forsøgets start skal opløsningen have stuetemperatur.)
- Amylase fra Danisco
- Saltsyre (0.1 M)
- Jod-jodkalium opløsning (Der laves en stor fælles opløsning ved at blande 1 del Lugol's iodopløsning med 4 dele vand)
- Is
- 7 reagensglas
- Stativ
- Bægerglas
- Termometer



Biotech Academy
Danmarks Tekniske Universitet,
Søltofts plads, Bygn. 227/041
2800 Kgs. Lyngby

www.biotechacademy.dk

biotech@bio.dtu.dk

- Engangspipetter
- 10 ml måleglas
- Sprittusch
- Spatler eller andet til omrøring
- Evt. stopur

## Fremgangsmåde

1. 7 reagensglas nummereres.
2. Til temperaturforsøget forberedes et bægerglas med is - temperaturen skal være omkring 0ºC, og et bægerglas med varmt vand - temperaturen skal være omkring 50ºC. Husk at måle og notere temperaturerne i både biologilokalet, bægerglasset med is og bægerglasset med varmt vand! I kan notere det i skemaet under Resultater.
3. Vha. et 10 ml måleglas tilsættes 5 ml 0,5 % gelatiniseret stivelsesopløsning til glas nr. 1-6. Til glas nr. 7 tilsættes 5 ml 1 % gelatiniseret stivelsesopløsning.

I er nødt til at rengøre måleglasset, før I kan bruge det til at tilsætte stivelsesopløsning til glas nr. 7. Evt. kan hele holdet deles om et separat måleglas til 1 % stivelsesopløsningen.

4. Glas nr. 4 og 5 anbringes i hhv. bægerglasset med is og bægerglasset med varmt vand. Først når temperaturen af de to stivelsesopløsninger har den rigtige temperatur, kan der tilsættes enzym. Det tager ca. 2 minutter.
5. Til alle reagensglas tilsættes ca. 2 dråber jod-jodkalium opløsning vha. engangspipetter. Husk at omrøre og iagttag blåfarvningen af stivelsesmolekylerne. Hold øje med om der sker noget i glas nr. 1. Bliver opløsningen ved med at være blå/violet?
6. Til glas nr. 2 tilsættes Z ml enzym. Omrør med spatel indtil I ser et farveskift. Noter i resultatskemaet præcis hvor lang tid, der går fra der tilsættes enzym, til at I ser farveskiftet. I kan evt. holde reagensglasset op mod et stykke hvidt papir. Husk at skylle spatlen inden I fortsætter!
7. Til glas nr. 3 tilsættes 2xZ ml enzym. Omrør med spatel, og noter igen tidspunktet for farveskiftet. Husk at skylle spatlen!
8. Til glas nr. 4 tilsættes Z ml enzym. Som før omrøres med spatel, og tidspunktet for farveskiftet noteres i resultatskemaet. Det samme gøres med glas nr. 5. Husk at skylle spatlen!
9. Til glas nr. 6 tilsættes 2 dråber 0,1 M saltsyre vha. en engangspipette. Herefter tilsættes Z ml enzym. Som før omrøres med spatel, og tidspunktet for farveskiftet noteres i resultatskemaet. Spatlen skylles.
10. Til glas nr. 7 tilsættes Z ml enzym. Omrør og hold øje med farveskiftet og noter tidspunktet i resultatskemaet.



Biotech Academy
Danmarks Tekniske Universitet,
Søltofts plads, Bygn. 227/041
2800 Kgs. Lyngby
www.biotechacademy.dk
biotech@bio.dtu.dk

## Resultater

I flg. skema noteres tidspunktet for farveskiftet, og enzymaktiviteten i reagensglassene beregnes (undtagen nr. 3 og 7). Mængden af stivelse i hvert reagensglas kan beregnes udfra koncentrationen af stivelsesopløsningen og det volumen stivelsesopløsning, som der blev tilsat hvert reagensglas.

| **Glas nr.** | **Stivelsesopl.** | **Tilsat enzym** | **pH** | **Temp.** | **Tid for farveskift** | **Enzymaktivitet** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 ml (0,5 %) | 0 ml | ca. 7 | ca. 20ºC | - | |
| 2 | 5 ml (0,5 %) | Z ml | ca. 7 | ca. 20ºC | | |
| 3 | 5 ml (0,5 %) | 2xZ ml | ca. 7 | ca. 20ºC | | - |
| 4 | 5 ml (0,5 %) | Z ml | ca. 7 | ca. 0ºC | | |
| 5 | 5 ml (0,5 %) | Z ml | ca. 7 | ca. 50ºC | | |
| 6 | 5 ml (0,5 %) | Z ml | ca. 2 | ca. 20ºC | | |
| 7 | 5 ml (1 %) | Z ml | ca. 7 | ca. 20ºC | | - |

I skemaet herunder noteres temperaturen i biologilokalet, bægerglasset med is og bægerglasset med varmt vand. Disse bør ligge omkring 20ºC, 0ºC og 50ºC.

| | Temp. (ºC) |
|---|---|
| Biologilokalet | |
| Bægerglas med is | |
| Bægerglas med varmt vand | |

**Til diskussion:**

1. Hvad er idéen med at have et reagensglas (glas nr. 1), hvor der ikke tilsættes enzym?
2. Hvordan påvirkes enzymaktiviteten af temperaturen?
3. Hvordan påvirkes enzymaktiviteten af pH?
4. Sammenlign glas nr. 2 og glas nr. 3.
5. Sammenlign glas nr. 2 og glas nr. 7.



Biotech Academy
Danmarks Tekniske Universitet,
Søltofts plads, Bygn. 227/041
2800 Kgs. Lyngby
www.biotechacademy.dk
biotech@bio.dtu.dk

**Forslag til udvidelse af forsøg:**

Evt. sammenligning af to amylaser - amylase fra Danisco og amylase i spyt.

Undersøge enzymaktiviteten ved en række temperaturer – f.eks. 0ºC, 10ºC, 20ºC, 30ºC, 40ºC og 50ºC.

Se hvordan viskositeten af en dejklump ændrer sig ved tilsætning af amylase.



Biotech Academy
Danmarks Tekniske Universitet,
Søltofts plads, Bygn. 227/041
2800 Kgs. Lyngby

www.biotechacademy.dk

biotech@bio.dtu.dk