



## Vid vilket pH fungerar amylas?

### Inledning

**Teori:** Enzymerna lipaser, amylaser och proteaser tillverkas, förvaras och distribueras av bukspottkörteln. Enzymerna finns tillgängliga i ett inaktivt stadium sk. proenzymer. Proenzymer töms ut i tolvfingertarmen efter signaler från magen och aktiveras vid ett visst pH. Amylas spjälkar polysackarider. Vid olika sjukdomar i bukspottkörteln kan den egna produktionen av enzymer helt eller delvis upphöra, vilket kan ge upphov till fettdiarré och risk för vitaminbrist. På apoteket kan man då köpa ett läkemedel Combizym som innehåller matsmältningsenzymerna.

**Syfte:** Du ska testa vid vilket pH (2 eller 8) bukspott-amylas är aktivt och vilka bindningar det kan spjälka. Du ska använda tre olika polysackarider

- Stärkelse med 1,4- $\alpha$ -glykosidisk bindning,
- Cellulosa med 1,4- $\beta$ -glykosidisk bindning och
- Gummi arabikum, som består av polygalaktos med 1,3 bindningar

**Reagenset DNSA** = dinitrosalicylsyra påvisar med röd färg om det finns monosackarider. Om ingen nedbrytning har skett är färgen gul. Absorbansen läses vid 540 nm eller med ögat.

### Material

Buffertar: pH 2 av 0,5 mol/dm<sup>3</sup> trietanolamin·HCl alternativt TRIS buffert  
pH 8 av sulfatbuffert (hälften 0,5 mol/dm<sup>3</sup> natriumsulfat och hälften 0,5 mol/dm<sup>3</sup> natriumvätesulfat).  
1% löslig stärkelse  
1% gummi arabikum  
Cellulosa av bomull eller filterpapper  
Amylaslösning av 50-70 mg amylas (porcine pancreas) i 100 cm<sup>3</sup> vatten  
DNSA-reagens: Nygjord lösning av 1% 3,5-dinitrosalicylsyra, 30% Na,K-tartrat och 0,40 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

### Riskbedömning

Denna riskbedömning är inte komplett. Den gäller de kemikalier under förutsättning att beskrivna koncentrationer och mängder används som samt metoden. T.ex. Saltsyra är frätande. Använd skyddsglasögon.

*En fullständig riskbedömning ges av undervisande läraren.*

## Utförande

Gör i ordning 8 provrör enligt schemat nedanför

**Tillsätt amylos sist och ställ provrören i tempererat vatten på 30 °C i 30 minuter.**

Prov nr	Vatten	Buffert	Ämne	Enzym
1. Blank:	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup> pH 8		-
2.	-	2 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	-
3.	-	1 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	1 cm <sup>3</sup>
4.	-	1 cm <sup>3</sup> pH 2	1 cm <sup>3</sup> stärkelse	1 cm <sup>3</sup>
5.	1 cm <sup>3</sup>	2 cm <sup>3</sup> pH 8	Lite bomull	-
6.	1 cm <sup>3</sup>	1 cm <sup>3</sup> pH 8	Lite bomull	1 cm <sup>3</sup>
7		2 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> gummi arabikum	
8		1 cm <sup>3</sup> pH 8	1 cm <sup>3</sup> gummi arabikum	1 cm <sup>3</sup>

Efter 30 minuter tillsätt 8 droppar DNSA-reagens och provrören ställs i kokande vattenbad i ca 10 minuter. Späd med 4cm<sup>3</sup> vatten och läs av resultatet vid 540 nm eller se skillnader.

Skriv rapport! *Gärna en bild!*

## Övrigt

Eventuellt skrivs några frågeställningar för att eleven ska lättare kunna dra generella slutsatser.

## Till läraren

Underlag för riskbedömning	DNSA Dinitrosalicylsyra:Fara, Frätande, Skadligt, H302 Skadligt vid förtäring., H318 Orsakar allvarliga ögonskador., H319 Orsakar allvarlig ögonirritation., H335 Kan orsaka irritation i luftvägarna. P260, P261, P264, P270, P271, P280, P301+P312, P304+P340, P310, P312, P321, P330, P337+P313 p362+P364 TRIS buffert: ej märkespliktig NaOH, Natriumhydroxid:, 0,40 mol/dm <sup>3</sup> : Frätande, Fara, H290, H314 och P280, P303+P361+P353, P304+P340+ P310, P305+P351+P338 Kaliumtartrat: ej märkespiktigt
Teori	Kolhydratbestämning med dinitrosalicylsyreagens är beskrivet av P.Bernfelt, Methods in enzymology, vol 1,1955 s.149. Försöket ger röd färg (positivt för aktivt amylas) endast för provrör 3, dvs. stärkelse i pH 8
Tips	<b>Extra uppgift:</b> Man kan utöka försöket genom att ta alla kolhydrater i både pH 8 och pH 2. Eller utöka försöket genom att testa vid flera pH-värden för stärkelselösningen. pH 4 ättiksyrabuffert pH 6 bärnstensyrabuffert pH 10 natriumbikarbonatbuffert pH 12 dinatriumfosfatbuffert Man erhåller då ett maximum för pH 6 eller 8. Men amylas har även en låg aktivitet vid pH 2 och kan ge svagt röd färg med DNSA-reagenset.