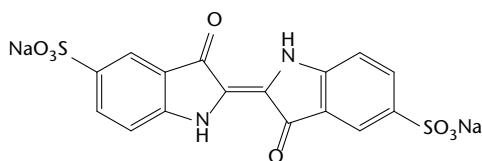




Nedbrydning af indigocarmin vha. peberrodsperoxidase

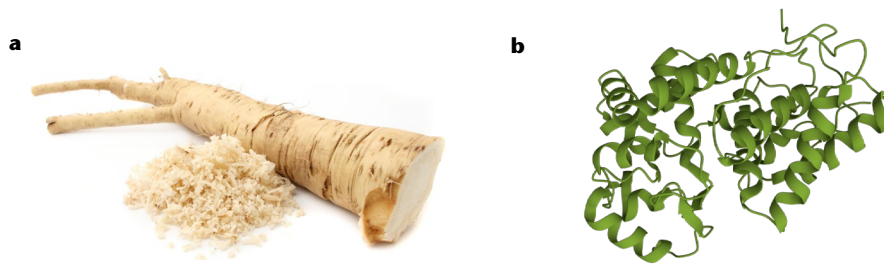
Indigocarmin er et blå farvestof som anvendes til fødevarer, medicinske formål og tekstilfarvning af fx polyester, se figur 1. Da indigocarmin er skadeligt for miljøet, er der brug for bæredygtige metoder til at fjerne det fra spildevandet fra farvestofindustrien.



Figur 1. Stregformel for indigocarmin.

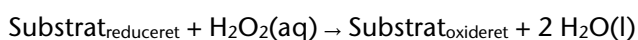
Hertil kan anvendes enzymer som nedbryder

indigocarmin til mindre dele, som mikroorganismer kan udnytte til carbon- og energikilde.



Figur 2. a. Peberrod (Shutterstock.com/Ledo). b. 3D-struktur for peberrodsperoxidase, HRP (PDB ID. 1H57).

I forsøget ekstraheres enzymet peberrodsperoxidase (HRP) ud fra peberrod, se figur 2. HRP katalyserer omdannelsen af et substrat sammen med hydrogenperoxid, H_2O_2 :



Der skal arbejdes innovativt med at opstille eget forsøgsdesign til at undersøge de optimale betingelser for nedbrydning af indigocarmin vha. HRP.

Materialer

- Stamopløsning af indigocarmin (50 mg/L)¹
- Startopløsning af indigocarmin (12 mg/L)²
- Vægt (0,001 g) og vejebåd
- 5 stk. målekolber (50 mL)
- 2 stk. målekolber (1 L)
- 1 stk. fuld pipette (10 mL)
- Spektrofotometer og kuvetter

¹ Afvej 0,050 g indigocarmin i en vejebåd, opløs det i lidt demineraliseret vand og overfør det til en 1 L målekolbe. Fyld op med demineraliseret vand til stregen.

² Overfør 240 mL af stamopløsningen af indigocarmin på 50 mg/L til en 1 L målekolbe. Fyld op med demineraliseret vand til stregen.



- Engangspipetter
- Revet peberrod (40 g)
- Puffer med pH på fx 4, 5, 6 og 7
- Hydrogenperoxid (3 %), H_2O_2 (aq)
- Rysteinkubator, vandbad med rystefunktion og magnetomrører (antal afhænger af forsøgsdesign).
- Blender
- Tragt og filtrérpapir
- 2 stk. bægerglas (100 mL)
- Koniske kolber (250 mL) (antal afhænger af forsøgsdesign).
- Stanniol

Risici og sikkerhed

Undersøg H- og P-sætninger for de anvendte kemikalier.

Fremgangsmåde

Del 1 Fremstilling af standardkurve

1. Fremstil fem fortyndinger af stamopløsningen af indigocarmin på 50 mg/L med koncentrationer på hhv. 2, 4, 6, 8 og 10 mg/L i 50 mL målekolber, se tabel 1.
2. Absorbansen af de fem standardopløsninger måles ved 620 nm i et spektrofotometer som kobles til LoggerPro. Notér data i tabel 1.

Koncentration (mg/L)	Volumen af stamopløsning (mL)	Absorbans
2	2	
4	4	
6	6	
8	8	
10	10	

Tabel 1.

Del 2 Fremstilling af enzymet HRP

1. Blend 40 g revet peberrod sammen med 100 mL demineraliseret vand. Filtrér blandingen ned i et 100 mL bægerglas. Gentag filtreringen så der fås en klar opløsning.

**Del 3 Opstilling og afprøvning af forsøgsdesign**

1. Opstil et forsøgsdesign med fx to eller tre koniske kolber pr. gruppe. Inddrag variabelkontrol med hensyn til enzymkoncentration, koncentration af H_2O_2 , pH og temperatur. Opstil hypotese for hvert delforsøg.
2. Startopløsningen på 12 mg/L har pH 6,8. Et eksempel på en forsøgsblanding i en 250 mL konisk kolbe kan se således ud: 50 mL startopløsning, 2 mL enzymopløsning, 2 mL 3 % H_2O_2 , 1 mL puffer eller vand. Blandingen inkuberes ved en bestemt temperatur med stanniol som låg og med omrøring.
3. Bestem absorbansen af startopløsningen efter 10, 20 og 30 min og herefter hver halve eller hele time resten af skoledagen hvis det er muligt, og igen nogle gange med en times mellemrum næste skoledag. Notér absorbansen og tidspunktet i tabel 2.³

Delforsøg	Tidspunkt	Antal timer	Absorbans	Koncentration (mg/L)

Tabel 2.

³ Ved 20 °C forventes en stor affarvning efter ca. 24 timer ved forsøget med den optimale pH.



Efterbehandling

1. Plot absorbansen som funktion af koncentrationen og lav lineær regression af punkterne.
2. Beregn koncentrationen af indigocarmin vha. absorbansen for opløsningen og forskriften for den lineære funktion.
3. Afbild for hvert delforsøg koncentrationen af indigocarmin mod tiden i timer.
4. Beregn initialhastigheder, v_0 , for alle delforsøg ved at anvende lineær regression på de første ca. fem målepunkter.
5. Vurdér initialhastighederne i forhold til de variable størrelser. Hvordan passer de med jeres hypoteser?
6. Angiv mulige fejlkilder i forsøget.
7. Angiv enzymklassen for HRP.
8. Nedbrydningsproduktet af indigocarmin har en svag gullig farve. Angiv farven på det lys, som nedbrydningsproduktet absorberer.
9. Det er muligt at fremstille HRP i en gensplejset gærsvamp kaldet *Pichia pastoris*. Diskutér fordele og ulemper ved at fremstille HRP ud fra peberrod og i *Pichia pastoris*.

Konklusion

Lav en konklusion hvor der tages stilling til om eksperimentets formål er opfyldt.