

ENZIMTECHNOLÓGIA

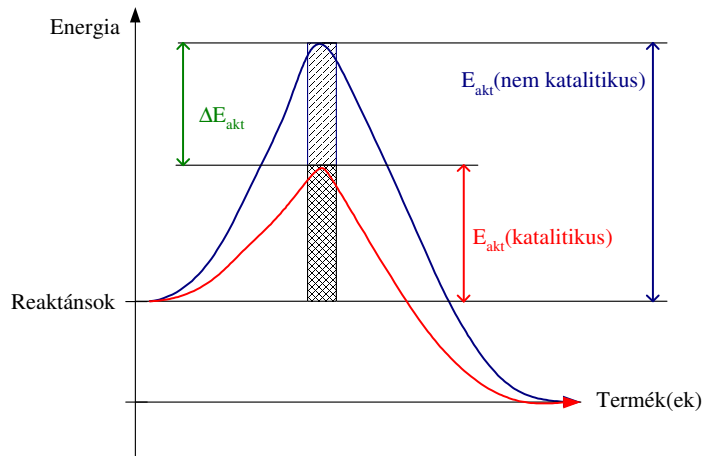
Környezettechnológiai laboratóriumi gyakorlat

ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémia Tanszék

Bevezetés

Az enzimek

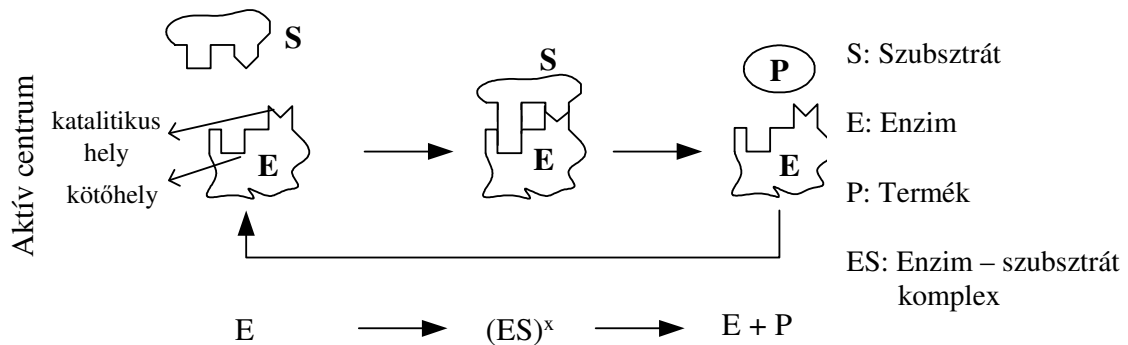
Az enzimek az élő szervezetekben végbemenő kémiai reakciók fehérje típusú katalizátorai (biokatalizátorok). Katalitikus tulajdonságuk a szervetlen katalizátorokéhoz hasonlóan a reakciósebesség növelésében nyilvánul meg, új reakcióút megnyitásával (1. ábra). A kémiai reakciók egyensúlyi állapotát az enzimek nem befolyásolják, csupán az egyensúly kialakulását gyorsítják meg más katalizátorokhoz hasonlóan.



1. ábra

Más fehérjékhez hasonlóan, az enzimek is egyszerűek (proteinek) vagy összetettek (proteidek) lehetnek. A proteinek csak polipeptidlánc alkotja. A proteidek közé tartozó enzimek fehérjerészből (apoenzim) és nem fehérjetermészetű részből (koenzim) épülnek fel. Az apoenzim és a koenzim együttesét holoenzimnek nevezzük. Az apoenzim nem képes funkcióját ellátni a koenzim nélkül.

Az enzim molekulák azon részét, amely közvetlenül részt vesz a katalízisben aktív centrumnak nevezzük. Az aktív centrumot a kötőhely és a katalitikus hely együttese alkotja. A kötőhelyen történik a szubsztrátmolekula (azon molekula, amelynek átalakulását az enzim katalizálja) megkötése másodrendű kötések kialakításával, a kötőhelyet képező aminosav-oldalláncok segítségével. A kötőhely közelében lévő katalitikus helyen olyan aminosav-oldalláncok találhatóak, amelyek közvetlenül közreműködnek a szubsztrát katalitikus átalakításában. Az összetett enzimeknél a koenzim is részt vesz a katalitikus hely felépítésében.



2. ábra

Az enzimek esetében többféle specifitásról beszélhetünk:

1.) *szubsztrátspecifitás*: pl. a glükózizomeráz csak a glükóz-fruktóz átalakulást katalizálja, más aldóz-ketóz átalakulást nem;

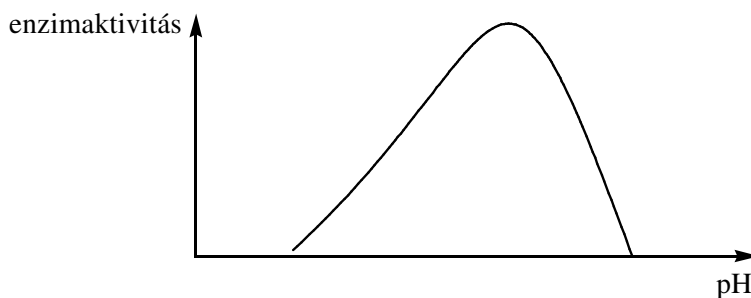
2.) *reakcióspezifitás*: különböző enzimek más-más úton alakítják át ugyanazt az anyagot, pl. az α -amiláz a keményítőlánc belsejében segíti elő a hidrolízist, így termékként dextrinek képződnek, ezzel szemben a β -amiláz hatására a keményítőmolekulák végeiről maltóz egységek hasadnak le;

3.) *sztereospecifitás*: királis vegyületek esetében csak meghatározott konfigurációjú molekulák átalakítása történik meg, vagy meghatározott konfigurációjú termék képződhet csak.

Az enzimek katalitikus hatásának számszerű jellemzésére szolgál az enzimaktivitás. Ez megadja, hogy adott idő alatt, adott mennyiségű enzim mennyi anyagot képes átalakítani szigorúan definiált körülmények (T, pH stb.) között.

Az enzimes katalízist számos tényező befolyásolja. A szubsztrát mennyisége, a hőmérséklet, pH stb. mind hatással vannak a reakció-sebességre (enzimaktivításra). Egy-egy tényező hatása a többi állandó értéken tartása mellett vizsgálható.

Az enzimaktivitás pH-függését a 3. ábrán láthatjuk. A gyakorlat során az amiloglükozidáz enzimaktivitásának pH-függésére is hasonló görbét kell kapnunk. A reakciósebesség pH-függését több tényező eredményezheti. Bármely disszociációra képes enzim- vagy szubsztrát-molekularész szerkezetét ugyanis befolyásolja a pH.



3. ábra

Az enzimek ipari alkalmazása

Biotechnológiai eljárásokról beszélhetünk, ha biológiai rendszereket alkalmaznak ipari folyamatok során. Ez jelentheti mikroorganizmusok felhasználását (mikrobiológiai technológia) vagy enzimkészítmények alkalmazását (enzimtechnológia).

A biológiai rendszerek felhasználásának előnyei:

1.) bonyolult kémiai reakciókat tudnak végrehajtani a szintetikus megoldásnál egyszerűbben;

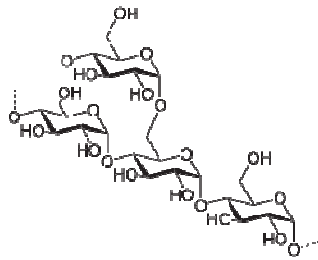
2.) enyhébb reakciókörülmények között mehet végbe a reakció.

Az előzőek az enzimek nagymértékű specifitásának és aktivitásának köszönhetőek.

Sok esetben használják fel immobilizált alakban a biológiai rendszereket, ilyenkor a sejteket vagy enzimeket szilárd hordozóhoz rögzítik, így töltenek meg velük egy oszlopot, amelyen átengedik a szubsztrát oldatát. Az immobilizáció révén megoldható a biológiai rendszerek újrahasznosítása, továbbá a folyamatos üzemmód is biztosított. Ezek a tényezők a termelés gazdaságosságát növelik.

Ismert enzimtechnológiai eljárás az izocukor előállítása. Az izocukor glükóz-fruktóz elegy tömény vizes oldata, amelyet az élelmiszeriparban édesítőszerként használnak. Előnyös tulajdonsága, hogy nehezen kristályosodik, illetve erős nedvszívó képessége miatt megakadályozza a készítmény vízvesztését. Magyarországon nagy mennyiségben gyártanak izocukrot Szabadegyházán. Az izocukrot keményítőtől állítják elő α -amiláz, amiloglükozidáz és glükóz-izomeráz enzimek segítségével.

A keményítő nem egyetlen, jól definiált összetételű molekulából álló vegyületet jelent, hanem α -D-glükózmolekulák kondenzációja útján keletkezett poliszaharidok keverékét, amelyekben a glükózegységek 1,4 ill. 1,6 kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. (4. ábra)



4. ábra

A keményítő a növényi sejtekben különböző alakú és felépítésű, fehér, szilárd szemcsék formájában rakódik le. A természetes keményítőszemcsék két különböző típusú keményítőtől épülnek fel. Az egyik az *amilóz*, a másik az *amilopektin*. Az amilóz a szemcsék belsejében, az amilopektin pedig főleg a szemcsék külső rétegében rakódik le. Mindkettő α -D-glükózból épül fel. Az amilóz kizárólag 1,4- α -glükozidkötésekkel, molekulái szabályos spirális alakúak (1 spirálmenet 6 glükózegységet foglal magában). Ezzel szemben az amilopektinmolekulák elágazó oldalláncokat is hordoznak, melyek úgy jönnek létre, hogy az óriásmolekulát felépítő glükózegységek némelyikén a 6-os szénatomhoz is kapcsolódik egy glükózmolekula acetáلكötéssel. Az amilopektin kevés foszfort is tartalmaz foszforsavészter-csoportok formájában. Az amilóz kémiai összetételére jó közelítéssel felírható a $(C_6H_{10}O_5)_n$ összegképlet. Az n polimerizációfok értéke amilóz esetében 1000 körül van. Ha eltekintünk a foszforsavészter-csoportoktól, a fenti képlet az amilopektinre is érvényes, és itt n értéke kb. 5000. A természetes (még nem hidrolizált) keményítő hideg vízben nem oldódik, ha azonban a keményítőt savval kezelik (hidrolizálják) az óriásmolekulák kisebb egységekre (dextrinre) bomlanak, ezáltal nő a keményítő vízben való oldhatósága. Mivel a sav nem specifikusan hasítja a glikozidos kötések, a hidrolízis során nem csak különböző méretű dextrinek, hanem glükózmolekulák is keletkeznek.

A poliszaharid molekulák túl nagyok a felszívódáshoz, ezért a keményítő 1,4-glikozidos kötéseit az emésztés során, de a növényi és mikrobiális sejtekben a tartaléktápanyagként való felhasználáskor is az amiláz enzimek hasítják. Ez a folyamat jelentős a csírázó gabona magvakban, ahol ezért a csírázás során amiláz enzimek is termelődnek. Az α -amiláz endo-hidroláz, a lánc belső részében a glikozidos kötések véletlenszerűen hasítja, a β -amiláz exo-hidroláz, a nem redukáló láncvégről maltóz egységeket hasít le.

Az amiloglükozidáz enzim egy exoenzim, a keményítő nem redukáló láncvégeiről glükóz egységeket hasít le. A glükóz izomeráz enzim a glükóz fruktózzá való átalakulását katalizálja.

Az izocukor előállításánál használt nyersanyag a kukorica. A szemekből eltávolítják a fehérjetartalmú csírást, amelyet állati takarmányként hasznosítanak. A csíráatlanított szemeket megőrlik, és a keményítőt elkülönítik, majd gondosan tisztítják.

Ezután α -amiláz enzimet adnak hozzá, és 85-94 °C-on, 5-6 pH-n előhidrolizálják a keményítőt. Ezt az enzimet hevítéssel inaktíválják, és a lehűtött oldathoz amiloglükozidáz-készítményt adnak, amely glükózig viszi tovább a hidrolízist. Az így kapott glükóz-oldatot immobilizált glükóz-izomeráz enzimmel feltöltött oszlopokon engedik át, aminek hatására egyensúlyi reakció során a glükóz egy része fruktózzá izomerizálódik. A kapott oldatot tisztítják és töményre (kb. 64 m/m %-osra) bepárolják.

Gyakorlati munka

A gyakorlat célja:

Az ipari izocukor-előállítás folyamatainak vizsgálata az α -amiláz és amiloglükozidáz enzimek katalizáló hatásának tanulmányozásával (enzimaktivitás pH-, és hőmérséklet-függésének mérése).

Egy adott enzim aktivitásának meghatározását két módon végezhetjük el, megmérhetjük:

- a) adott idő alatt, adott hőmérsékleten és pH-n az enzim mennyi szubsztrátot képes átalakítani
- b) adott idő alatt, adott hőmérsékleten és pH-n az enzim mennyi terméket képes előállítani.

A gyakorlat két feladatcsoportból áll:

A)

Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 40 és 60 °C-on.

Az α -amiláz enzim aktivitását a vízoldható keményítő (szubsztrát) koncentrációjának csökkenésével jellemezzük. A keményítő jóddal sötétkék színreakciót ad. A glükóz egységekből felépülő keményítő hidrogénhidakkal stabilizált helikális, azaz spirálalakú amilózlánca ugyanis csőszerű szerkezetet alkot, ami a jódmolekulákat zárvány formájában, adszorpciós komplexként képes megkötni, ez okozza, hogy a keményítő kék elszíneződést ad, ha jód-oldatot cseppentünk hozzá. A kék szín intenzitása 600 nm hullámhosszon, spektrofotometriásan meghatározható. A keményítőnek az α -amiláz enzimmel való hidrolízisének előrehaladását a kialakult komplex színének változása jelzi. Az oldat jóddal mindaddig kék elszíneződést ad, amíg keményítő van jelen. A hidrolízis előrehaladtával, a kék szín ibolyára, majd barnára változik, mert ezeket a színeket már a nagyobb, illetve közepes molekulásúlyú dextrinek adják. Ha a barna szín is eltűnik, az azt jelenti, hogy legfeljebb kisebb molekulásúlyú dextrinek vannak jelen az oldatban.

A hidrolízis előrehaladásával csökkenő mennyiségű keményítő-jód komplex 600 nm mért abszorbanciája egyenes arányos a keményítő koncentrációjával (Lambert-Beer törvény):

$$A = -\lg(I/I_0) = \epsilon c l$$

ahol A az abszorbancia, I_0 a beeső fény intenzitása, I az anyagon áthaladt fény intenzitása, ϵ a moláris abszorpciós együttható, l az anyagon áthaladó fényút hossza, c a koncentráció.

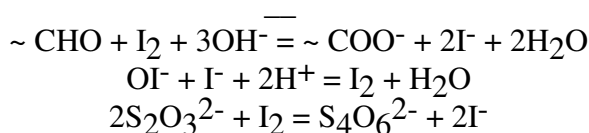
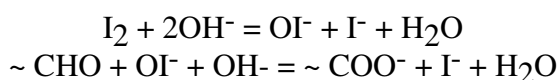
Az α -amiláz enzim aktivitásának meghatározásához a hidrolízis idő elteltével megmérjük a különböző enzimkoncentrációjú oldatok abszorbanciáját, majd a kapott értékeket ábrázoljuk az enzimkoncentráció függvényében. A kapott görbével a hidrolizátum keményítőtartalmának változását tudjuk jellemezni az enzimkoncentráció függvényében.

B) Az amiloglükozidáz enzimaktivitásának vizsgálata a pH-függvényében.

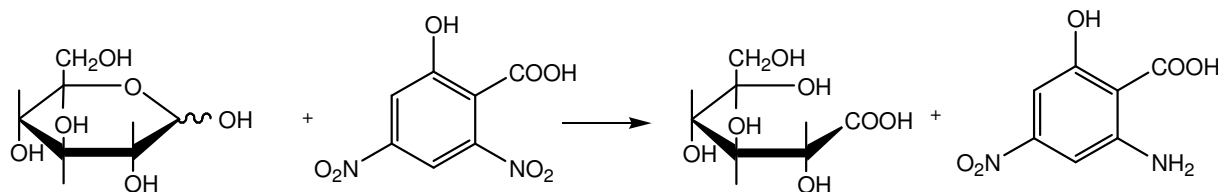
A keményítőnek amiloglükozidáz enzimmel történő hidrolízise során D-glükóz keletkezik, melynek mennyiségét két különböző módszerrel mérjük meg: jodometriás titrálással és spektrofotometriásan.

A **jodometriás meghatározás** során lúgos oldatban a jódból hipojodit keletkezik, ami az enzim hidrolízis során keletkező D-glükóz formilcsoportját karboxilcsoporttá oxidálja. Az oxidációt jódfelesleggel végezzük, amit az oldat savanyítása után tioszulfát-oldattal mérünk vissza; majd a feleslegben adott és a fogyott jód különbségét véve megkapjuk az oxidációhoz szükséges jód mennyiségét. Ebből kiszámíthatjuk a hidrolízis során keletkezett D-glükóz mennyiségét. (A jodometriás titrálás végpontjának jelzésére az amiloglükozidáz által érintetlenül hagyott keményítőtartalom szolgál.)

Reakcióegyenletek



A **spektrofotometriás meghatározás** során az enzim hidrolízissel keletkezett D-glükózt 3,5-dinitroszalicilsavval oxidáljuk, ami a redoxireakcióban 3-amino-5-nitroszalicilsavvá redukálódik, eközben az oldat színe sárgáról barnára változik. A kapott oldat 600 nm-en mért abszorbanciája egyenesen arányos a keletkező 3-amino-5-nitroszalicilsav koncentrációjával.



A reakció során egyéb mellékreakciók is bekövetkeznek, de a mért abszorbanciából - kalibrációs görbe felvétele után- visszakövetkeztethetünk a D-glükóz koncentrációjára.

A gyakorlatot 5 főből álló csoport végzi el 6 óra alatt.

A gyakorlat a következő részfeladatokból áll:

1. A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő nedvességének meghatározása
2. A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő szabad glükóz-tartalmának meghatározása
3. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata adott pH-n: a keletkezett D-glükóz meghatározása jodometriásan.
4. Kalibrációs görbe felvétele: ismert koncentrációjú D-glükóz-oldatokkal végzett 3,5-dinitroszalicilsavas oxidációt követő abszorbancia meghatározása 600 nm-en.
5. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH-értékeken

(pH=3,5 pH=4,5; pH=5,5; pH=6,5): a keletkezett D-glükóz meghatározása spektrofotometriásan.

6. pH=5,5 foszfát puffer-oldat elkészítése
7. Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 40 °C-on
8. Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 60 °C-on

1. A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő nedvességtartalmának meghatározása

Mivel az előhidrolizált keményítő vizet és kis mennyiségű glükózt is tartalmaz, az oldat tényleges keményítőtartalma nem egyezik meg az 1 vegyes %-os bemérési koncentrációval. Ezért szükséges az előhidrolizált keményítő víz-és szabadglükóz-tartalmának a meghatározása. A nedvességtartalom meghatározásához három, előre lemért csiszolatos bemérő edénybe mérjük be analitikai pontossággal egyenként 0,5 g vízdoldható keményítőt, majd helyezük az edényeket 105 °C-ra beállított szárítószekrénybe. Három óra elteltével helyezük át az edényeket exsikkátorba, majd kb. 15 perc elteltével mérjük le újból az edények tömegét.

2. A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő szabad glükóz-tartalmának meghatározása

A szabad glükóz-tartalom meghatározásához a felhasználásra kerülő előhidrolizált (vízdoldható) keményítőtől 1g/100 cm³ (1 vegyes %-os oldatot) koncentrációjú oldatot készítünk a következő módon. Egy 100 cm³-es főzőpohárba mérjük be analitikai mérlegen 0,5 g előhidrolizált (vízdoldható) keményítőt, majd oldjuk fel 50,0 cm³ (pipetta) desztillált vízben. Ezután mérjük ki háromszor 5 cm³ (pipetta) a vízdoldható keményítő oldatból három 100 cm³-es csiszoltdugós Erlenmeyer-lombikba.

A vízdoldható keményítő oldat szabad glükóz-tartalmának meghatározása jodometriásan történik az alábbiak szerint:

A jodometriás mérés menete:

A 100 cm³-es csiszoltdugós Erlenmeyer-lombikba bemért 5 cm³-es oldatokat desztillált vízzel 25 cm³-re hígítjuk (mérőhenger), majd hozzáadunk 4 cm³ 1 M NaOH-oldatot (mérőhenger) és bürettából 5 cm³ 0,05 M I₂-oldatot. Ezután 20 percig állni hagyjuk sötétben, majd 10 cm³ 0,5 M kénsavval savanyítjuk (mérőhenger) és 0,1 M tioszulfát-oldattal titrálunk.

A szabad glükóz-tartalom számítása:

A tioszulfát mérőoldat fogyásai alapján, a jód- és tioszulfátoldat faktorának figyelembevételével számítsuk ki a vízdoldható keményítőoldat glükóztartalmát mmol/dm³-ben.

3. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata adott pH-n

A felhasználásra kerülő előhidrolizált (vízoldható) keményítőből $1\text{g}/100\text{ cm}^3$ (1 vegyes %-os oldatot) koncentrációjú oldatot készítünk úgy, hogy analitikai mérleggel mérjük ki $0,5\text{ g}$ vízoldható keményítőt, és ezt szórjuk bele az előzőleg alaposan kimosott és kitörölt reaktoredénybe (a bemérőedényt ill. bemérőpapírt mérjük vissza!). Ezután a bemért vízoldható keményítőt oldjuk fel $50,0\text{ cm}^3$ (pipetta) adott pH-jú nátrium-acetát/ecetsav puffer oldatban.

A kívánt pH értékre beállított keményítő oldatot temperáljuk a reaktorban ($50\text{ }^\circ\text{C}$, 5 perc kevertetés). Majd kevertetés közben adjunk hozzá $0,5\text{ cm}^3$ (pipetta) amiloglükozidáz-oldatot. Az enzimoldat hozzáadásától számítva pontosan 5 perc múlva (stopper!) pipetázzunk a reaktor tartalmához 5 M nátrium-hidroxid-oldatot, hogy a pH eltolásával leállítsuk az enzim működését. A $\text{pH}=3,5$ és $\text{pH}=4,5$ értékre pufferelt oldatokhoz az 5 M NaOH -ból 2 cm^3 -t, a $\text{pH}=5,5$ és $\text{pH}=6,5$ értékre pufferelt oldatokhoz 1 cm^3 -t adjunk (pipetta). További fél percig kevertessük az oldatot, majd pipettával mérjük ki háromszor 5 cm^3 mintát három 100 cm^3 -es csiszolt dugós Erlenmeyer-lombikba az enzimaktivitás meghatározásához. (Ezután mossuk el alaposan a reaktort és a keverőt és töröljük szárazra.)

A kapott oldat glükóz-tartalmának meghatározása jodometriásan történik az alábbiak szerint:

A jodometriás mérés menete:

A reaktorból kimért 5 cm^3 -es mintákat desztillált vízzel 25 cm^3 -re hígítjuk (mérőhenger), majd hozzáadunk 4 cm^3 1 M NaOH -oldatot (mérőhenger) és bürettából 5 cm^3 $0,05\text{ M I}_2$ -oldatot. Ezután 20 percig állni hagyjuk sötétben, majd 10 cm^3 $0,5\text{ M}$ kénsavval savanyítjuk (mérőhenger) és $0,1\text{ M}$ tioszulfát-oldattal titráljuk.

Az enzimaktivitás számítása:

A tioszulfát mérőoldat fogyásai alapján, a jód- és tioszulfátoldat faktorának figyelembevételével számítsuk ki a reaktorból vett minták és az eredeti keményítőoldat glükóztartalmát mmol/dm^3 -ben.

Számítsuk ki, hogy milyen glükózkoncentráció alakult volna ki az egyes pH-értékeken, ha nem hígítottuk volna fel az eredetileg 50 cm^3 térfogatú mintaoldatot. Ehhez az alábbi képlet használható fel:

$$\frac{V_{\text{össz}}}{50\text{ cm}^3} \cdot c(\text{hígított oldat}) = c',$$

ahol $V_{\text{össz}} = 50\text{ cm}^3$ + az enzimműködés leállítására a reaktor tartalmához adott 5 M NaOH térfogata + $0,5\text{ cm}^3$ enzimoldat.

A hígulás figyelembevételével kapott glükózkoncentrációk és a keményítőoldat szabad glükóz-tartalmának különbségei adják az enzimaktivitás értékeket. Ábrázoljuk ezeket a pH függvényében!

4. Kalibrációs görbe felvétele: ismert koncentrációjú D-glükóz-oldatokkal végzett 3,5-dinitroszalicilsavas oxidációt követő abszorbancia meghatározása 600 nm -en.

Elkészítjük az $2,0\text{ g}/\text{dm}^3$, $1,5\text{ g}/\text{dm}^3$, $1,0\text{ g}/\text{dm}^3$ és $0,5\text{ g}/\text{dm}^3$ koncentrációjú D-glükóz-oldatokat a következő módon: bemérünk $0,2\text{ g}$ D-glükózt (analitikai mérleg) és feloldjuk 30 cm^3 (mérőhenger) desztillált vízben (100 cm^3 -es főzőpohárban), majd az oldatot 100 cm^3 -es

mérőlombikba mossuk át. Ezután az $2,0 \text{ g/dm}^3$ törzsoldatból megfelelő hígítással $1,5 \text{ g/dm}^3$, $1,0 \text{ g/dm}^3$ és $0,5 \text{ g/dm}^3$ koncentrációjú oldatokat készítünk (10 cm^3 -es mérőlombikokban, pipetta).

A kalibrációs görbe felvételéhez a D-glükóz-oldatokból bemérünk $3-3 \text{ cm}^3$ -t (pipetta), hozzáadunk $3-3 \text{ cm}^3$ 1% -os 3,5-dinitroszalicilsavas oldatot (pipetta), a kémcsöveket jól összerázzuk, parafilmmel lezárjuk és 90°C -os vízfürdőbe helyezzük 15 percre. Ezután a kémcsöveket lehűtjük, majd $1-1 \text{ cm}^3$ 40% -os kálum-nátrium-tartarát-oldatot (pipetta) adunk az oldatokhoz. Megmérjük az oldatok abszorbanciáját 600 nm -en, majd ábrázoljuk a mért abszorbancia értékeket a koncentráció függvényében.

5. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH-értékeken (pH=3,5; pH=4,5; pH=5,5; pH=6,5); a keletkezett D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometrián

Egy kémcsőbe bemérünk 1 cm^3 -t az 1% -os vízdoldható keményítő oldatból, valamint négy másik kémcsőbe bemérünk $1-1 \text{ cm}^3$ -t (pipetta) a különböző pH értékeken végzett enzimatis hidrolízis során kapott oldatokból. Ezután $2-2 \text{ cm}^3$ vizet és $3-3 \text{ cm}^3$ 1% -os 3,5-dinitroszalicilsavas oldatot pipettázunk az oldatokhoz, a kémcsöveket jól összerázzuk, majd parafilmmel lezárjuk és 90°C -os vízfürdőbe helyezzük 15 percre. Ezután a kémcsöveket lehűtjük, majd $1-1 \text{ cm}^3$ 40% -os kálum-nátrium-tartarát-oldatot (pipetta) adunk az oldatokhoz. Megmérjük az oldatok abszorbanciáját 600 nm -en. A kalibrációs görbe segítségével meghatározzuk az oldatok D-glükóz koncentrációját, majd a kapott koncentrációkat a pH függvényében ábrázoljuk.

6. pH=5,5 foszfát puffer-oldat elkészítése

Bemérünk $1,28 \text{ g}$ ($3,5 \text{ mmol}$) kristályos $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ -t, és feloldjuk 200 cm^3 desztillált vízben ($400-500 \text{ cm}^3$ -es főzőpohárban). Az oldathoz ezután kis részletekben annyi 1% -os H_3PO_4 -at adunk, hogy a pH $5,5$ legyen (az oldat pH-ját műszerrel ellenőrizzük), majd egy **500 cm^3 -es mérőlombikba** öntjük és jelre töltjük. Az elkészült oldatot névvel és a szükséges adatokkal megjelöljük.

7. Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 40°C -on

Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálatához a felhasználásra kerülő előhidrolizált (vízdoldható) keményítőtől 1 g/100 cm^3 (1 vegyes $\%$ -os oldatot) koncentrációjú oldatot készítünk a következő módon. Mérjük be $0,5 \text{ g}$ vízdoldható keményítőt egy 250 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba, szuszpendáljuk el 30 cm^3 desztillált vízben, majd öntsünk hozzá 70 cm^3 forró desztillált vizet. Ha szükséges forraljuk még az oldatot, hogy teljesen homogénné váljon. Miután az oldat lehűlt mérőhenger segítségével egészítsük ki a térfogatát 100 cm^3 -re.

Ezután 9 db kémcsövet sorszámmal látunk el és az α -amiláz oldatból hígítási sorozatot készítünk az alábbi táblázatban ismertett módon:

kémcső	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
0,5%-os vízdíszítő keményítő oldat (cm ³)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
pH=5,5 puffer-oldat (cm ³)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
csapvíz (cm ³)	6,0	5,9	5,8	5,7	5,6	5,5	5,4	5,3	5,2
α-amiláz-oldat (cm ³)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8

A kémcsövek tartalmát összerázzuk, majd fél óra hosszat 40 °C-os vízfürdőbe helyezzük. A reakcióidő elteltével a kémcsöveket Bunsen-égő lángjába tartjuk, tartalmukat óvatosan felforraljuk. (Magas hőmérsékleten az enzim elveszti aktivitását.) Ezután a kémcsövek tartalmát lehűtjük, és 1-1 csepp Lugol-oldatot (5g I₂ + 10g KI/100 cm³ víz) adunk az oldatokhoz. Feljegyezzük az oldatok színét, majd 600 nm hullámhosszon meghatározzuk az abszorbancia értékeket. (Ha szükséges, az oldatokat mérés előtt hígítjuk.)

Az észleléseket táblázatba jegyezzük fel, grafikusán ábrázoljuk az abszorbancia-enzimkoncentráció értékeket, és értékeljük a változásokat!

8. Az α-amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 60 °C-on

Az α-amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálatához a felhasználásra kerülő előhidrolizált (vízdíszítő) keményítőből 0,5 g/100 cm³ (1 vegyes %-os oldatot) koncentrációjú oldatot készítünk a következő módon. Mérjük be 0,5 g vízdíszítő keményítőt egy 250 cm³-es Erlenmeyer-lombikba, szuszpendáljuk el 30 cm³ desztillált vízben, majd öntsünk hozzá 70 cm³ forró desztillált vizet. Ha szükséges forraljuk még az oldatot, hogy teljesen homogén váljon. Miután az oldat lehűlt mérőhenger segítségével egészítsük ki a térfogatát 100 cm³-re.

Ezután 9 db kémcsövet sorszámmal látunk el és az α-amiláz oldatból hígítási sorozatot készítünk az alábbi táblázatban ismertett módon:

kémcső	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1%-os vízdíszítő keményítő oldat (cm ³)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
pH=5,5 puffer-oldat (cm ³)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
csapvíz (cm ³)	6,0	5,9	5,8	5,7	5,6	5,5	5,4	5,3	5,2
α-amiláz-oldat (cm ³)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8

A kémcsövek tartalmát összerázzuk, majd fél óra hosszat 60 °C-os vízfürdőbe helyezzük. A reakcióidő elteltével a kémcsöveket Bunsen-égő lángjába tartjuk, tartalmukat óvatosan felforraljuk. (Magas hőmérsékleten az enzim elveszti aktivitását.) Ezután a kémcsövek tartalmát lehűtjük, és 1-1 csepp Lugol-oldatot (5g I₂ + 10g KI/100 cm³ víz) adunk az oldatokhoz. Feljegyezzük az oldatok színét, majd 600 nm hullámhosszon meghatározzuk az abszorbancia értékeket. (Ha szükséges, az oldatokat mérés előtt hígítjuk.)

Az észleléseket táblázatba jegyezzük fel, grafikusán ábrázoljuk az abszorbancia-enzimkoncentráció értékeket, és értékeljük a változásokat!

Jegyzőkönyv készítése

A gyakorlatról egy **jegyzőkönyvet** kell készíteni, az öt hallgatónak külön-külön az általa végzett feladatokból, kitöltve a megfelelő jegyzőkönyvi lapokat. Az elkészített jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

- az elvégzett munka tömör leírását;
- a mérési adatokat és számításokat;
- eredmények szöveges értékelését.

<i>Feladatcsoport</i>	<i>Szükséges jegyzőkönyv adatlapok</i>
A hallgató	1.- 5. lapok
B hallgató	6.-10. lapok
C hallgató	11.-13. lapok
D hallgató	14.-15. lapok
E hallgató	16.-17. lapok

FELADATOK BEOSZTÁSA

A hallgató
<u>Elvégzendő feladatok</u> - A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő nedvességének meghatározása (1.feladat) - Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata pH=3,5 és 4,5 puffer-oldatban (3.feladat)
B hallgató
<u>Elvégzendő feladatok</u> -A vízdoldható (előhidrolizált) keményítő szabad glükóz-tartalmának meghatározása (2.feladat) - Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata pH=5,5 és 6,5 puffer-oldatban (3.feladat)
C hallgató
<u>Elvégzendő feladatok</u> -Az abszorbancia-D-glükóz koncentráció kalibrációs görbe felvétele (4. feladat) - Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH-értékeken: a keletkezett D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometriásan (5.feladat)

D hallgató

Elvégzendő feladatok

- pH=5,5 foszfát puffer-oldat elkészítése (6.feladat)
- Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 40 °C-on (7.feladat)

E hallgató

Elvégzendő feladatok

- pH=5,5 foszfát puffer-oldat elkészítése (6.feladat)
- Az α -amiláz enzim katalizáló hatásának vizsgálata az enzim koncentrációjának függvényében 60 °C-on (7.feladat)

Zárthelyi

A gyakorlatok elején a hallgatók zárthelyit írnak. A feladatrészek beosztása független a zárthelyi kérdésektől, tehát minden feladatrészből fel kell készülni!!!

Ellenőrző kérdések

- Mit nevezünk biotechnológiai eljárásnak?
- Mi a biotechnológiai eljárás előnye?
- Mit nevezünk enzimnek?
- Mit nevezünk enzimaktivitásnak?
- Milyen módokon lehet egy enzim aktivitását meghatározni?
- Milyen módon befolyásolják a kémiai reakciókat az enzimek?
- Milyen átalakulást katalizál az α -amiláz enzim?
- Milyen átalakulást katalizál az amiloglükozidáz enzim?
- Milyen átalakulást katalizál a glükózizomeráz enzim?
- Mit nevezünk izocukornak?
- Mi a Lambert-Beer törvény?
- Mi a keményítő? Milyen szerkezeti részekből áll?
- Milyen monoszacharid nyerhető a keményítő hidrolízise során? Mi a képlete? Rajzolja le!
- Mi a pH?
- Mi a puffer-oldat? Mi a szerepe? Miből készíthetünk puffer-oldatot?
- Mi a Lugol-oldat?
- Egy mintán jódppróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe kék lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
- Egy mintán jódppróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe lila lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
- Egy mintán jódppróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe barna lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
- Egy mintán jódppróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe sárga lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
- Ismertesse, hogy milyen módszereket alkalmazunk a gyakorlaton a hidrolízis során kapott D-glükóz-koncentrációjának meghatározására?

-Ismertesse az amiloglükozidáz enzimaktivitásának nyomonkövetésére alkalmazott jodometriás titrálás menetét! Milyen végpontjelzést alkalmazunk?

-Hogyan határozza meg az alábbi adatok alapján a vizsgált keményítő nedvességtartalmát!

	Keményítő tömege szárítás előtt	Keményítő tömege szárítás után
1	1,0987g	0.8043g
2	1,1352g	0.8453g
3	1,0793g	0.8362g