

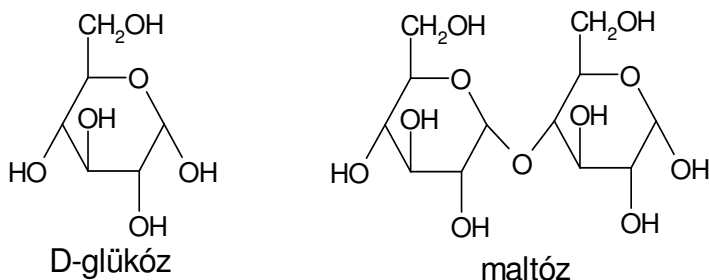
# **KEMÉNYÍTŐ IZOLÁLÁSA ÉS ENZIMATIKUS HIDROLÍZISÉNEK VIZSGÁLATA I-II.**

**Kémiai technológiai laboratóriumi gyakorlat**

## BURGONYAKEMÉNYÍTŐ KINYERÉSE, ENZIMATIKUS HIDROLÍZISE ÉS A HIDROLIZÁTUM SZESZES ERJESZTÉSE

### BEVEZETÉS

A keményítő a klorofilltartalmú növények asszimilációs termékéből, glükózból épül fel, és a növényi sejtekben a tartaléktápanyag szerepét tölti be. A keményítő  $\alpha$ -D-glükózmolekulák kondenzációja útján keletkezett poliszacharid, amelyben a glükózrészecskék 1,4-es kötással kapcsolódnak egymáshoz. Ugyanilyen kötással kapcsolódik egymáshoz két glükózrészecskék a maltózban, ami egyébként a keményítő részleges hidrolízisének egyik terméke.



A keményítő hidrolízisekor közbenső termékként a keményítőnél kisebb molekulatömegű poliszacharidok, ún. dextrinek keletkeznek, amelyek további hidrolízise még kisebb molekulatömegű dextrinekhez, majd oligoszacharidokhoz, maltózhoz, végül pedig D-glükózhoz vezet.

A keményítő nem egyetlen, jól definiált összetételű molekulából álló vegyületet jelent, hanem legnagyobbbrészt  $\alpha$ -1,4 kötással felépült poliszacharidok keverékét. A keményítő a növényi sejtekben különböző alakú és felépítésű, fehér, szilárd szemcsék formájában rakódik le. A szemcsenagyság néhány  $\mu\text{m}$ -tól 100-150  $\mu\text{m}$ -ig változik. Az azonos eredetű keményítőszemcsék mikroszkópi vizsgálattal jól felismerhetők és azonosíthatók, mert külső formájuk és felépítésük jellegzetes, a szemcsenagyság eloszlása is jellemző arra a növényre, amelyből származnak.

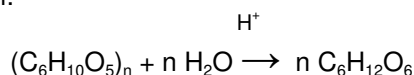
A természetes keményítőszemcsék két különböző típusú keményítőből épülnek fel. Az egyik az *amilóz*, a másik az *amilopektin*. Az amilóz a szemcsék belsejében, az amilopektin pedig főleg a szemcsék külső rétegében rakódik le. Mindkettő  $\alpha$ -D-glükózból épül fel. Az amilóz kizárólag 1,4- $\alpha$ -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  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  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. Jóddal jellegzetes sötétkék színeződést ad. Ez igen érzékeny, nagy hígításban is bekövetkező reakció, és a keményítő illetve a jód kimutatására is alkalmas.

Ha a keményítő vizes szuszpenzióját óvatosan melegítjük, a szemcsék előbb megduzzadnak, majd kolloidálisan oldódnak. Ha ezt az oldatot lehűtjük, sűrű géllé dermed, amelyet csiriznek neveznek. (Ezt ragasztószerként használják.) A csirizesedés burgonyakeményítő esetében 60–65 °C-on, búzakeményítő esetében 70–80 °C-on következik be. A gélképző képesség elsősorban az amilopektin jelenlétének tulajdonítható.

A keményítő már említett hidrolízise két úton hajtható végre. Híg ásványi savakkal melegítve teljesen glükózzá lehet hidrolizálni:



A hidrolízis enzimekkel is végrehajtható. Az enzimek az élő szervezetekben végbemenő kémiai

reakciók fehérje típusú katalizátorai (biokatalizátorok). Katalitikus tulajdonságuk a szerves katalizátorokéhoz hasonlóan a reakciósebesség növelésében nyilvánul meg, új reakcióút megnyitásával. Más fehérjékhez hasonlóan, az enzimek is egyszerűek (proteinek) vagy összetettek (proteidok) 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 enzimmolekulák 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 találhatók, amelyek közvetlenül közreműködnek a szubsztrát katalitikus átalakításában. Az összetett enzimeknél a koenzim is részt vesz a katalitikus hely felépítésében.

Az enzimek esetében többféle specifitásról beszélhetünk:

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

2.) *reakció-specifitás*: különböző enzimek más-más úton alakítják át ugyanazt az anyagot, pl. az  $\alpha$ -amiláz a keményítőlánc belsejében segíti elő a hidrolízist, így termékként dextrinek képződnek, ezzel szemben a  $\beta$ -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.

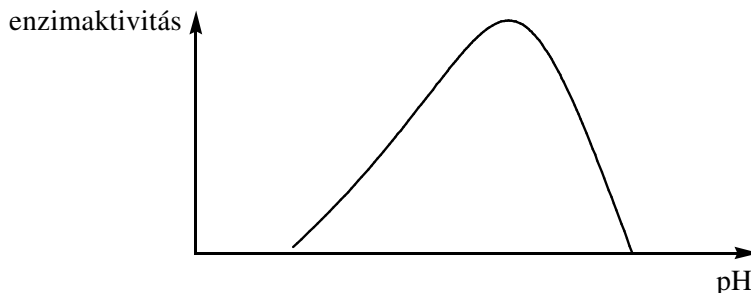
Az enzimek katalitikus hatásának számszerű jellemzésére szolgál az enzimaktivitás. Ez megadja, hogy adott idő alatt, adott mennyiségű enzim mennyi anyagot képes átalakítani szigorúan definiált körülmények (T, pH stb.) között.

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

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

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

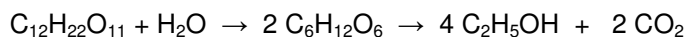
Az enzimaktivitás pH-függését a 3. ábrán láthatjuk. A gyakorlat során az amiloglükozidáz enzimaktivitásának pH-függésére is hasonló görbét kell kapnunk. A reakciósebesség pH-függését több tényező eredményezheti. Bármely disszociációra képes enzim- vagy szubsztrát-molekularész szerkezetét ugyanis befolyásolja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



3. ábra

A malátában (csírázó árpában) lévő  $\alpha$ - és  $\beta$ -amiláz enzimeket vizes extrakcióval is ki lehet nyerni. A kapott vizes extraktum a keményítő hidrolízisére felhasználható. A természetes keményítő enzim hidrolízise legfeljebb 70–80%-os kitermeléssel hajtható végre, mivel az amilopektinből maltóz mellett nehezen hidrolizáló, ún. határdextrinek vagy maradékdextrinek is keletkeznek. Ezek az amilopektinmolekula olyan részeiből maradnak vissza, melyekben 1,6-kötés van két glükózrész között, ezt a kötést pedig az amiláz egyáltalán nem, illetve csak nagyon lassan bontja.

Enzim hidrolízissel keményítóből főként a szeszes erjedés számára készítenek cukor-, elsősorban maltóz tartalmú cefréket. (Erre a célra nem szükséges izolált keményítőt használni, a szeszgyártásnál ugyanis a terméket desztillációval különítik el, a sörgyártásnál pedig a nyersanyag többi komponensei is a késztermékben maradnak.) A maltóz tartalmú cefre alkoholos erjesztése élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*) történik anaerob körülmények között.



A keményítő hidrolízisének menetét minőségileg jópróbával, mennyiségileg pedig a viszkozitás változásának vagy a redukálócukor-tartalom változásának mérésével lehet követni. A jópróbának az alapja, hogy a reakcióelegy jóddal mindaddig kék színeződést ad, amíg keményítő van jelen. A hidrolízis előrehaladását jelzi, ha a jódpóbánál 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.

#### 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 pl. az izocukor előállítás. 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. A felhasznált nyersanyag: kukorica. A gyártás során először a kukoricaszemekből eltávolítják a fehérjetartalmú csírárt, amelyet állati takarmányként hasznosítanak. A csírártlanított szemeket megőrlik, és a keményítőt elkülönítik, majd gondosan tisztítják. Ezután  $\alpha$ -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.

Az ipar legelterjedtebb keményítőforrásai a burgonya, kukorica, búza, rozs, árpa és a rizs. Minden keményítőgyártás alapja az, hogy a sejteket fel kell szakítani, és a bennük levő keményítőszemcséket mechanikai úton el kell különíteni. A keményítőt főképp a textilipar és a mosodaipar, az élelmiszeripar, a kozmetikai ipar és a gyógyszeripar használja fel.

A keményítőből gyártott fontosabb termékek: oldható keményítő, dextrin, burgonyaszörp (keményítőszörp), burgonyacukor (keményítőcukor), izocukor és D-glükóz, etanol.

### GYAKORLATI MUNKA

A gyakorlatot 5 főből álló csoport végzi el 2 x 6 óra alatt. A gyakorlat során burgonyából keményítőt nyerünk ki, malátából pedig extrakcióval malátakivonatot készítünk. A keményítőt a malátakivonattal elcukrosítjuk, a cukrosított cefrét szeszes erjesztésnek vetjük alá, majd a keletkezett etil-alkoholt desztillációval kinyerjük, mennyiségét meghatározzuk. Elvégezzük a malátakivonattal történt cukrosítás során kapott redukálócukor meghatározását Bertrand-szerint, valamint a malátakivonat enzimaktivitásának vizsgálatát az enzimkoncentráció és a hőmérséklet függvényében. Megvizsgáljuk továbbá az amiloglükozidáz enzimaktivitását a pH függvényében.

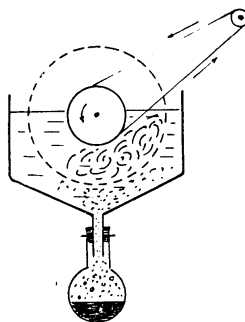
A gyakorlat ennek megfelelően a következő részfeladatokból áll:

1. Keményítő kinyerése burgonyából
2. A kinyert, ill. a cukrosításhoz felhasznált keményítő nedvességtartalmának meghatározása
3. Malátakivonat készítése
4. Burgonyakeményítő cukrosítása malátakivonattal
5. A cukrosított cefre szeszes erjesztése

6. A malátakivonat vizsgálata
7. A malátakivonat szárazanyagtartalmának meghatározása
8. A keményítő cukrosításának nyomon követése a redukálócukor-tartalom meghatározásával Bertrand szerint
9. Alkohol kinyerése az erjesztett cebréből
10. Amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH értékeken; hidrolízis során kapott D-glükóz mennyiségének meghatározása jodometriás titrálással.
11. A vízdoldható keményítő nedvességtartalmának meghatározása
12. Kalibrációs görbe felvétele: ismert koncentrációjú D-glükóz-oldatokkal végzett 3,5-dinitroszalicilsavas oxidációt követő abszorbancia meghatározása 600 nm-en.
13. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH-értékeken; a hidrolizátumok és a vízdoldható keményítő D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometriásan

### 1. feladat: Keményítő kinyerése burgonyából

1 kg lemért burgonyát folyó csapvízben gondosan megmosunk, lehámozzuk, majd péppé reszelünk. A reszelékből forgó mosódobban kimossuk a keményítőszemcséket (1. ábra).



1. ábra

Ehhez először a mosódobot kell előkészíteni. A dob víztartálya alatti csőcsomagra gumidugóval gömblombikot csatlakoztatunk. A szitaszövettel borított dobot leszereljük a tengelyről, és kiemeljük a tartályból. A tartályt csapvízzel töltjük meg, pereme alatt kb. 5 cm-ig. A dobot ezután a tartály peremére támasztva úgy helyezük el, hogy töltőnyílása felül legyen. Levesszük a töltőnyílás fedelét, a burgonyapépet gondosan a dob belsejébe öntjük, majd visszatesszük, és rögzítjük a fedelet. A dobot visszasereljük a tengelyre, és a szárnyas csavarral rögzítjük. Ezután a motort bekapcsolva forgatjuk a dobot.

A burgonyapépből kimosott keményítőszemcsék a lombikban gyűlnek össze. A kimosást addig folytatjuk, amíg a keményítő a szedőben teljesen leülepedik (kb. 1 óra), majd a motort leállítjuk, és a tartályból a vízfelesleget vízsugárszivattyúval eltávolítjuk. A keményítőt tartalmazó lombikot leszereljük, dekantáljuk és a tiszta keményítőt nagyméretű Büchner-tölcséren leszűrjük, majd a szűrőről levéve táramérleggel előzőleg lemért Petri-csészére tesszük, és a következő gyakorlatig levegőn állni hagyva szárítjuk (a szennyeződés elkerülésére a Petri-csészét célszerű szűrőpapírral lefedni). A készülék dobjából a kimosott rostanyagokat a hulladékgyűjtőbe helyezzük, a dobot pedig megtisztítva helyezzük vissza a készülékbe.

*Megjegyzés:* A keményítőt homokszemek, valamint a mosódob szitáján átmosódott rostanyagok szennyezhetik. A homokszennyezés kiküszöbölése céljából kell a burgonyát a reszelés előtt gondosan lemosni. A szennyező rostanyagok nagy részét viszont ülepítéssel lehet eltávolítani. Ezért, ha a keményítő láthatóan sok rostanyagot tartalmaz, célszerű még a nuccsolás előtt csapvízzel felkeverni és újra ülepitni. A víz óvatos dekantálása után a rostanyagok zömét a leülepedett keményítő felületéről le lehet kaparni.

## 2. feladat: A kinyert, ill. a cukrosításhoz felhasznált keményítő nedvességtartalmának meghatározása

Ismert tömegű (előzőleg lemért) csiszolatos bemérőedénybe analitikai mérlegen bemérünk 3 x 1 g keményítőt, majd 105 °C-on 3 órán át szárítjuk, exsikkátorban lehűtjük és visszamérjük. A kapott adatokból kiszámítjuk az átlagos tömegszázalékos nedvességtartalmat.

## 3. feladat: Malátakivonat készítése

A kivonat nagy amiláztartalmú, világos sörmaláta vizes extrakciójával készül. A malátaőrleményből 15 g-ot táramérlegen bemérünk. Az 50 °C-on temperált reaktorba 60 cm<sup>3</sup> vizet töltünk, majd hozzáadjuk a malátaőrleményt, és elindítjuk a mágneses kevertetést. Az extrakciót 30 percig folytatjuk, majd a keverést leállítjuk, és a reaktor tartalmát főzőpohárba töltjük. A keveréket centrifugacsövekbe szétosztjuk, majd 5 percig, 5000 1/perc-es fordulatszámra centrifugáljuk. A centrifugába **csak kettő, négy vagy hat csövet szabad betenni**, egymással átellenes helyzetben! Két átellenes cső tömegének – tartalmával együtt – azonosnak kell lenni, és ezt betöltéskor **táramérlegen kötelező ellenőrizni!**

A centrifugált vizes kivonat lebegő kolloidális szennyezéseket és mikroorganizmusokat is tartalmazhat, ezért szűrővel tisztítjuk. Gondosan kimosott és bőséges desztillált vízzel frissen öblített szívópalackból és Büchner-tölcsérből állítjuk össze a szűrőkészüléket.

A tölcsérbe megfelelő nagyságúra vágott Seitz-szűrőlapot teszünk, majd azt vízzel nedvesítjük, és a peremét üvegbottal lenyomkodjuk, hogy jól szoruljon a Büchner-tölcsér falához. Ezután vízszugár-szivattyú segítségével leszűrjük a kivonatot.

A centrifugacsövekben leülepedett maradékot 60 cm<sup>3</sup> csapvízzel a reaktorba visszaöblítjük, és 50 °C-on újabb 30 percig folytatjuk az extrakciót. Az így kapott kivonatot az előbbi adaggal azonos módon centrifugáljuk, szűrjük, majd újabb 60 cm<sup>3</sup> vízzel harmadszor is extraháljuk. Ebben az esetben az extrakciót 60 °C-on kezdjük, és a termosztát hőmérsékletét 30 perc alatt fokozatosan 70 °C-ig emeljük. A harmadik kivonatot is centrifugáljuk, és egyesítjük az első kettővel. Az így kapott kivonat teljesen átlátszó, és olyan kevés mikroorganizmust tartalmaz, hogy az a továbbiakban nem okoz zavart. (Ha Seitz-baktériumszűrőn át vegezzük a szűrést, teljes csíramentességet lehet elérni. Ez nagyon tömör, kis pórusú szűrőlap, ezért a szűrés ezzel természetesen lassúbb, mint a szokásos szűrőpapírral.)

A megszárt kivonatot 150 cm<sup>3</sup> térfogatra egészítjük ki. (Azért nem kapunk 3 x 60 cm<sup>3</sup> oldatot, mert a víz egy része a malátát duzzasztotta). A kivonatot ezután lezárt üvegben, a csoport adataival ellátva a hűtőszekrény kb. 4 °C-os részében tároljuk, és onnan csak a további vizsgálatokhoz szükséges bemérések idejére vesszük ki, a kivonatot ugyanis jó tápoldat mikroorganizmusok számára.

## 4. feladat: Burgonyakeményítő cukrosítása malátakivonattal

A keményítőt két lépésben cukrosítjuk. Először 70 °C-on, pH = 5,5–6,0 között az α-amiláz hatását kihasználva dextrinekig, majd 60 °C-on, pH = 5,0–5,5 között az α- és a β-amiláz együttes hatását kihasználva maltózig hidrolizáljuk. A cukrosítás menetét a hidrolizátum redukálócukor-tartalmának meghatározásával követjük.

Először elkészítjük a szükséges **pufferoldatot**. Ehhez bemérünk 1,28 g (3,5 mmol) kristályos Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O-t, és feloldjuk 200 cm<sup>3</sup> vízben. Az oldathoz ezután kis részletekben annyi 1%-os H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-at adunk, hogy a pH 5,5 legyen, majd egy **mérőlombikban** feltöltjük 500 cm<sup>3</sup>-re. Az oldat pH-ját műszerrel ellenőrizzük. Az elkészült oldatot névvel és a szükséges adatokkal megjelölve félretesszük, mert a következő gyakorlaton is szükségünk lesz rá!

A 70 °C-on temperált reaktorba öntünk 200 cm<sup>3</sup> 5,5-es pH-jú foszfátpufferoldatot és 200 cm<sup>3</sup> csapvizet. **Üvegbottal történő kevertetés közben** hozzáadagolunk 30g (dörzsmozsárban előzetesen szétporított) burgonyakeményítőt. Ha a reaktor tartalmának hőmérséklete elérte a 70 °C-ot, megkezdjük a hidrolízist. A reaktorba 40 cm<sup>3</sup> malátakivonatot öntünk, és a kevertetést 1 órán át folytatjuk. A malátakivonat hozzáadásától számítva 15 perc ill. 60 perc elteltével kémcsőbe kb. 5-5 cm<sup>3</sup> mintát veszünk, és gázlágon felforraljuk, hogy az enzimeket inaktiváljuk. Ha a minta lehűlt a kémcsövet felcímkézzük és a hűtőszekrénybe tesszük: a következő gyakorlaton ezekből a mintákból 1-1 cm<sup>3</sup>-t kiveszünk, és meghatározzuk redukálócukor-tartalmukat.

60 perc elteltével a reaktor tartalmát egy főzőpohárba töltjük, majd 90–95 °C-ra melegítjük és 5 percig ezen a hőmérsékleten tartjuk. Ezáltal megszakítjuk az enzimek működését. Ezt követően a hidrolizátumot 20–30 °C-ra hűtjük le, megmérjük és feljegyezzük a térfogatát.

Ezek után a hidrolizátumhoz kis részletekben annyi 1%-os foszforsavat adunk, hogy pH-ja 5,0–5,5-es (lehetőleg 5,1-es) legyen, majd visszaöntjük az előzetesen 60 °C-ra beállított reaktorba. Amikor a reaktor tartalmának hőmérséklete elérte a 60 °C-ot, keverés közben újabb 40 cm<sup>3</sup> malátakivonatot öntünk a hidrolizátumhoz, és a cukrosítást 60 °C-on egy órán át folytatjuk. 15 perc ill. 60 perc elteltével 5-5 cm<sup>3</sup> mintát veszünk ki az előzőekhez hasonlóan. Ezek redukálócukor-tartalmát is meghatározzuk majd a következő gyakorlaton. Addig a mintákat lezárva, névvel ellátva a hűtőszekrény kb. 4 °C-os részében tároljuk. Kiveszünk 5 cm<sup>3</sup>-t a malátakivonatból is, hogy a következő héten meghatározhassuk annak redukálócukor tartalmát.

A második 60 perc elteltével a cukrosított cefrét szobahőfokra hűtjük, és ismételten megmérjük a térfogatát. Ebben az esetben a cefrét nem szabad 60 °C fölé melegíteni, mert az enzimeknek az erjesztés folyamán is aktívnak kell még lenniük.

### 5. feladat: A cukrosított cefre szeszes erjesztése

A cukrosítás során kapott, szobahőmérsékletre lehűtött cefréhez cseppenként annyi 0,5 M (1 N) kénsavat adagolunk, hogy pH-ja 4,5–5,0 között (lehetőleg 4,8-es) legyen. A cefrét ezután egy gondosan kimosott és frissen öblített folyadéküvegbe töltjük, majd oltóélesztőt adunk hozzá. Az oltóélesztőt úgy készítjük, hogy 5 g szárított sütőélesztőt 50 cm<sup>3</sup> csapvízzel csomómentesre szuszpendálunk. A beoltott cefrét tartalmazó folyadéküvegre buborékoltatócsövet (ún. kotyogót) szerelünk, majd névvel ellátva 25 °C-os biológiai termosztátba tesszük, és a következő gyakorlatig erjedni hagyjuk.

*Megjegyzés:* Az erjedő cefrét **zárt edényben tartani nem szabad**, viszont a kotyogóval meg kell akadályozni, hogy a cefre feletti légtérbe oxigén jusson. A kotyogó megvédi az erjedő cefrét attól is, hogy a levegőből idegen mikroorganizmusok kerüljenek bele.

### 6. feladat: A malátakivonat vizsgálata

A malátakivonat enzimaktivitásának vizsgálatához először elkészítjük az 1%-os vízdíszítő keményítő oldatot a következő módon: 250 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer lombikba táramérlegesen bemérünk 1 g vízdíszítő keményítőt, hozzáadunk 40 cm<sup>3</sup> forró vizet és 50 cm<sup>3</sup> pH=5,5-ös foszfát puffer-oldatot, és a kapott a szuszpenziót felmelegítjük, hogy a keményítő feloldódjon. Miután az oldat lehűlt egy 100 cm<sup>3</sup>-es mérőhengerbe öntjük, és pH=5,5-ös foszfát puffer-oldattal 100 cm<sup>3</sup>-re egészítjük ki. Ezután előkészítünk kilenc megszámozott, tiszta kémcsövet és az alábbi táblázat szerint bemérünk a kémcsövekbe vízdíszítő keményítő oldatot, pH=5,5-ös foszfát puffer-oldatot, csapvizet. Ezután adagoljuk hozzá a különböző mennyiségű malátakivonatot. A kémcsövekbe egyenként üvegbotot teszünk, tartalmukat jól felkeverjük, majd 50 °C-os termosztátba helyezük őket. A hőfok pontos betartása nagyon fontos, mert **76 °C-on tönkremegy az amiláz**.

kémcső	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1%-os vízdíszítő keményítő oldat térfogata (cm <sup>3</sup> )	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
pH=5,5 puffer térfogata (cm <sup>3</sup> )	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
csapvíz térfogata (cm <sup>3</sup> )	6,0	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5
malátakivonat térfogata (cm <sup>3</sup> )	0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5

Egy óra elteltével a kémcsöveket kiemeljük a vízfürdőből, a falukat szárazra töröljük, s a kémcsöveket gázlángba tartva tartalmukat óvatosan felforraljuk, hogy az enzimeket inaktíváljuk. Az egyes kémcsövek tartalmát jódpróbával ellenőrizzük: kilenc kémcsőbe egy-egy csepp Lugol oldatot (10%-os vizes KI-oldatban oldott 5% I<sub>2</sub>) adunk, felhígítjuk 3 cm<sup>3</sup> vízzel, majd a termosztált mintákból 1-1 cm<sup>3</sup>-t pipettázunk a jódtartalmú kémcsövekhez. Megállapítjuk és feljegyezzük a minták színreakcióját, majd kézi spektrofotométerrel megmérjük az oldatok abszorbanciáját 600 ill. 650 nm-en.

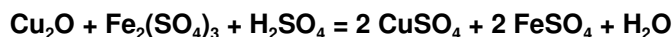
Tapasztalatainkat táblázatban foglaljuk össze! Ebben tüntessük fel azt, hogy az egyes mintákhoz mennyi malátakivonatot adtunk, és mi volt a megfigyelésünk (jódpróba színe).

### 7. feladat: A malátakivonat szárazanyag-tartalmának meghatározása

Az általunk előállított malátakivonat jellemzésére meghatározzuk annak **szárazanyag-tartalmát**. Ismert tömegű (előzőleg lemért) csiszolatos bemérőedénybe 3 x 5 cm<sup>3</sup> mintát kimérünk, **analitikai mérleg**en lemérjük a tömegüket, majd 105 °C-os szárítószekrényben szárazra pároljuk őket (3 óra). Végül exsikkátorban lehűtjük a mintákat, és megmérjük a bepárlási maradék tömegét. A három párhuzamos mérésből kiszámítjuk az átlagos tömegszázalékos szárazanyag-tartalmat

### 8. feladat: A keményítő cukrosításának nyomon követése a redukálócukor-tartalom meghatározásával Bertrand szerint

Redukáló cukrok a réz(II)ionokat réz(I)ionokká redukálják. Lúgos közegben a réz(I)ionok Cu<sub>2</sub>O formájában kiválnak a vizes oldatból. A kivált Cu<sub>2</sub>O mennyisége nem egyenértékű, de tapasztalati összefüggésbe hozható az oldat redukálócukor-tartalmával. Ez a kvantitatív összefüggés az egyes redukáló cukrok esetében más és más. Mivel a redukciót lúgos közegben végezzük, a réz(II)ionokat komplex formájában kell oldatban tartani. A redukció során képződött réz-oxid csapadék mennyiségi meghatározásának elve a következő: a csapadékot kénsavban oldjuk, és közben a réz(I)ionokat vas(III)-szulfáttal oxidáljuk. A réz-oxiddal egyenértékű vas(II)ion keletkezik az alábbi egyenlet szerint:



A keletkezett vas(II)ionokat ismert módon, KMnO<sub>4</sub>-mérőoldattal határozzuk meg:



A meghatározásnál a következő oldatokat használjuk:

*Bertrand I.:* 40 g CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O / 1000 cm<sup>3</sup> víz

*Bertrand II.:* 200 g Seignette-só (K-Na-tartarát) és 150 g NaOH / 1000 cm<sup>3</sup> víz

(A Seignette-só komplexképző, mely a réz(II)ionokat komplex formájában oldatban tartja lúgos közegben is.)

*Bertrand III.:* 50 g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> és 200 g cc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 1000 cm<sup>3</sup> víz

250 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombikba 1 cm<sup>3</sup>-t bemérünk a vizsgálandó mintából (az elcukrosítás közben vett mintákat és a hidrolízishez felhasznált malátakivonatból vett mintát vizsgáljuk meg ezen a módon), majd felhígítjuk 20 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel. Mérőhengerben 20 cm<sup>3</sup> Bertrand I. és 20 cm<sup>3</sup> Bertrand II. oldatot elegyítünk. Sötétkék oldatot kapunk, amit hozzáöntünk a felhígított mintához. Ezután a lombikot azbeszt nélküli dróthálóra helyezzük, **forrkövet** teszünk bele, majd gázlánggal forrásba hozzuk, és pontosan 3 percig forrásban tartjuk. Forralás közben az oldatból vörös réz(I)-oxid csapadék válik ki. (**A forralás után a forró Erlenmeyer-lombikot törülközővel fogjuk meg!**)

Az oldatot lehűtjük, a kivált csapadékot G4-es zsugorított üvegszűrőn leszűrjük. Az Erlenmeyer-lombikot háromszor kiöblítjük desztillált vízzel (kb. 20-20 cm<sup>3</sup>), a mosóvizet minden egyes mosás után az üvegszűrőre öntjük, és vele azt átmoszuk. Ha a lombikban csapadék marad, azt nem szükséges okvetlenül a szűrőre vinni. Ezután a szívópalackban összegyűlt szűrletet a gyűjtőbe öntjük, a szívópalackot desztillált vízzel alaposan kimossuk, és a csapadékot tartalmazó szűrőt újra ráhelyezzük.

10 cm<sup>3</sup> Bertrand III. oldatot öntünk az Erlenmeyer-lombikba, kiöblítjük, majd a szűrőre öntjük. A szűrő felületét üvegbottal kapargatjuk, hogy elősegítsük a csapadék oldódását, majd leszívátjuk a folyadékot a szűrőről. A 10 cm<sup>3</sup>-es részletekkel történő mosást addig folytatjuk, amíg az üvegszűrőt csapadékmentesre nem mostuk (kb. 4x10 cm<sup>3</sup> oldattal szükséges mosni).

A szívópalackban összegyűlt szűrletet ezt követően **azonnal** megtitráljuk ismert faktorú 0,1 N KMnO<sub>4</sub>-mérőoldattal. (Ha az oldatot levegőn állni hagyjuk, a vas(II)ionok oxidálódnak és rossz eredményt kapunk, ezért ajánlatos egyszerre csak egy mintát vizsgálni.)

A bemért minta redukálócukor-tartalmát a titrálási eredmény alapján tapasztalati képlet segítségével tudjuk kiszámítani. Maltózt tartalmazó oldat esetén a minta maltóztartalmát mg-ban az



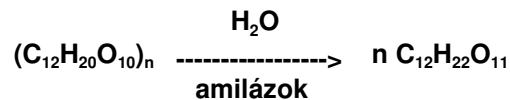
alábbi képlettel számíthatjuk ki:

$$m_{\text{maltóz}} / \text{mg} = 5,74V + 0,0065V^2$$

ahol  $V = 0,1 \text{ N KMnO}_4$ -fogyás  $\text{cm}^3$ -ben szorozva a faktorial.

A két lépésben végrehajtott cukrosítással kapcsolatos mérési eredményeket táblázatban foglaljuk össze, amely tartalmazza a minta redukálócukor-tartalmát, a hidrolizátum összes redukálócukor-tartalmát (figyelembe véve a mintavételekkel csökkentett térfogatokat), valamint a hidrolízis mértékét %-ban kifejezve.

A hidrolízis mértékének meghatározásához először kiszámítjuk a 100%-os hidrolízisnek megfelelő maltózmennyiséget, figyelembe véve, hogy 30 g keményítőt reagáltattunk. A számításhoz az alábbi egyenlet használható fel (elhanyagolva a keményítő amilopektintartalmát):



Vegyük figyelembe, hogy a cefréhez adott maláta kivonat is tartalmazott maltózt, ezért a hidrolízis mértékének kiszámításakor ne a hidrolizátum összes maltóztartalmával számoljunk, hanem abból vonjuk le az egyes cukrosítási lépésekben a maláta kivonattal (40 ill. 80  $\text{cm}^3$ ) beadagolt maltóz mennyiségét!

### 9. Alkohol kinyerése az erjesztett cefréből

Az erjedt cefrét tartalmazó folyadéküvegből a felülúszót egy gömblombikba dekantáljuk. A kiülepedett részt felkeverjük, majd centrifugacsövekbe osztjuk szét. Ezután az anyagot 5 percig centrifugáljuk 5000 1/perc-es fordulatszámra. A **centrifugálás** előzőekben említett **szabályait** ezúttal is **szigorúan tartuk be!** A centrifugacsövekből a felülúszót szintén a gömblombikba dekantáljuk.

A gömblombikot melegítőkosárból, pipából, hűtőből és szedőből álló desztillálóberendezéshez csatlakoztatjuk, **forrkövet** rakunk a lombikba, majd elkezdjük melegíteni a lombik tartalmát. A desztillációt addig folytatjuk, amíg a pára hőfoka 98–100 °C-ig emelkedik.

Ezután megmérjük és feljegyezzük a párlat térfogatát, majd a sűrűségét. A sűrűséget azonos térfogatú desztillátum és víz tömegének hányadosaként számítjuk. Először lemérjük a mérőlombik tömegét analitikai mérlegen, majd megtöltjük desztillált vízzel, és kb. 10 percre 25 °C-os termosztátba tesszük. Jelre állítás után ismét lemérjük a tömegét ( $m_{\text{viz},25^\circ\text{C}}$ ). Ugyanígy meghatározzuk a desztillátum tömegét is, ugyanazt a mérőlombikot használva ( $m_{\text{deszt},25^\circ\text{C}}$ ). A leíráshoz csatolt táblázat tartalmazza az  $m_{\text{deszt},25^\circ\text{C}} / m_{\text{viz},25^\circ\text{C}}$  fajsúlyú párlat tömeg%-os alkoholkoncentrációját. Számítsuk ki azt is, hogy 1 kg burgonyára vonatkoztatva mennyi etanolt kaptunk!

### 10. Amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata: vízdoldható keményítő enzim hidrolízise különböző pH értékeken, majd a keletkezett D-glükóz meghatározása jodometriásan

Az enzimaktivitás adott pH-n történő vizsgálatához készítsük el az 50  $\text{cm}^3$  1 egyes %-os, adott pH-jú keményítő-oldatot a következő módon: pipetázzunk be 50  $\text{cm}^3$  adott pH-jú puffer oldatot a reaktorba és kevertetés közben adjunk hozzá 0,5 g analitikai mérlegen előzőleg lemerített előhidrolizált (vízdoldható) keményítőt. Miután a szuszpenzió felvette a reaktor hőmérsékletét (5 perc), 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 pH=4,0 és 4,5 értékekre beállított oldatokhoz az 5 M NaOH-ból 2  $\text{cm}^3$ -t, a többihez 1  $\text{cm}^3$ -t adjunk (pipetta). További fél percig kevertessük az oldatot, majd hasas pipettával mérjük ki háromszor 5  $\text{cm}^3$  mintát három 100  $\text{cm}^3$ -es csiszold dugós Erlenmeyer-lombikba az enzimaktivitás jodometriás titrálással történő meghatározásához. (Ezután mossuk el, és töröljük ki alaposan a reaktort.)

Szabadglükóz-tartalom meghatározás

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 szabadglükóz-tartalmat az amiloglükozidáz enzimmel kezelt keményítő-oldathoz hasonlóan határozzuk meg. Készítsünk el egy főzőpohárban 50 cm<sup>3</sup> 1 vegyes %-os előhidrolizált keményítő-oldatot (0.5 g analitika mérlegen bemért előhidrolizált keményítő 50 cm<sup>3</sup> vízben feloldva), majd az oldatból háromszor 5 cm<sup>3</sup>-t pipetázunk három 100 cm<sup>3</sup>-es csiszolt dugós Erlenmeyer-lombika. Ezután az alább ismertetett módon, jodometriásan történik a minta szabad glükóz-tartalmának meghatározása.

Az enzimaktivitás meghatározása jodometriásan:

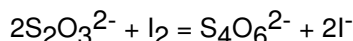
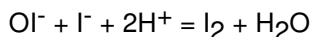
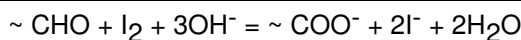
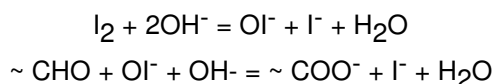
Az amiloglükozidáz enzimaktivitása megadható azzal a glükóz- koncentrációval, amely kialakul adott enzimmennyiség hatására, adott idő alatt (esetünkben 0,5 cm<sup>3</sup> enzimoldat hatására, 5 perc alatt).

A glükóztartalom meghatározása jodometriásan történik lúgos oldatban a jódból hipojodit keletkezik, ami a glükóz formilcsoportját karboxilcsoporttá oxidálja; az oldathoz adott jódot feleslegét savanyítás után tioszulfát-oldattal mérjük vissza; a tioszulfátos titrálás végpontjának jelzésére az amiloglükozidáz által érintetlenül hagyott keményítőtartalom szolgál.

A jodometriás mérés menete

A 100 cm<sup>3</sup>-es csiszolatos Erlenmeyer-lombikba pipetázott 5 cm<sup>3</sup>-es mintákat desztillált vízzel 25 cm<sup>3</sup>-re hígítjuk, majd hozzáadunk 4 cm<sup>3</sup> 1 M NaOH-oldatot és bürettából 5 cm<sup>3</sup> 0,05 M I<sub>2</sub>-oldatot. Ezután 20 percig állni hagyjuk sötétben, majd 10 cm<sup>3</sup> 0,5 M kénsavval savanyítjuk és 0,1 M tioszulfát-oldattal titráljuk.

Mérjük meg három párhuzamost vizsgálva 5-5 cm<sup>3</sup> kiindulási keményítőoldat glükóztartalmát is a fenti recept szerint.

ReakcióegyenletekAz enzimaktivitás számítása

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

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

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

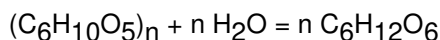
ahol **V<sub>össz</sub>** = 50 cm<sup>3</sup> + az enzimműködés leállítására a reaktor tartalmához adott 5 M NaOH térfogata + 0,5 cm<sup>3</sup> (enzimoldat).

A hígulás figyelembevételével kapott glükóz koncentrációk és a keményítőoldat glükóz-tartalmának különbségei adják az enzimaktivitás értékeket.

A hidrolízis mértékének kiszámítása

Számítsuk ki a bemérés alapján 1 vegyes százalékosnak tekintett keményítőoldat tényleges keményítőtartalmát a 100 cm<sup>3</sup>-enként bemért 1 g anyag víztartalmának, valamint a titrálás révén meghatározott glükóz-tartalmának levonásával.

Számítsuk ki, hogy a kapott keményítőmennyiség 100%-os hidrolízise esetén milyen glükózkoncentráció alakulna ki, az alábbi egyenlet figyelembevételével.



A keményítőmolekulák láncvégein lévő glükózegységeket elhanyagoljuk.

Adjuk meg, hogy a maximálisan lehetséges glükózkoncentráció hány százalékát képezik az enzimaktivásokat jellemző glükózkoncentrációk, tehát milyen mértékű volt a hidrolízis az enzim hatására az egyes pH értékeken.

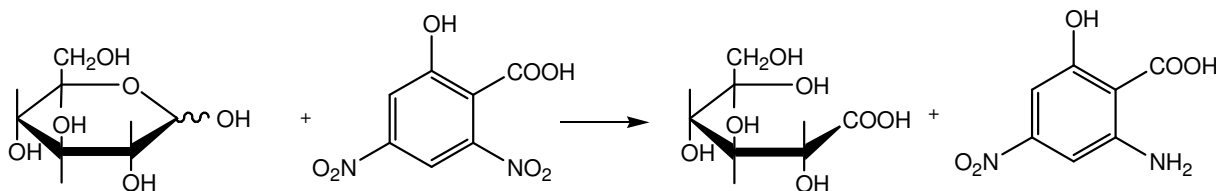
A pH-enzimaktivitás görbe és a hidrolízis végbemenetelének százalékos értékei alapján adjuk meg az amiloglükozidáz enzim működésének optimális pH-tartományát. Ábrázoljuk a hidrolízis mértékét a pH függvényében!

### 11. A vízdoldható keményítő nedvességtartalmának meghatározása

A nedvességtartalom meghatározásához három, előre lemért csiszolatos bemérő edénybe mérjük be analitikai pontossággal egyenként 0,5 g vízdoldható keményítőt, majd helyezük az edénykéket 105 °C-ra beállított szárítószekrénybe. Három óra elteltével helyezük át az edénykéket exsikkátorba, majd kb. 15 perc elteltével mérjük le újból az edények tömegét.

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

A spektrofotometriás meghatározáshoz a 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 kalibrációs görbe felvételéhez elkészítjük az 1g/dm<sup>3</sup>, 0,75g/dm<sup>3</sup>, 0,5g/dm<sup>3</sup> és 0,25 g/dm<sup>3</sup> koncentrációjú D-glükóz-oldatokat a következő módon: bemérünk 0,1 g D-glükózt (analitikai mérleg) és feloldjuk 30 cm<sup>3</sup> desztillált vízben (100 cm<sup>3</sup>-es főzőpohárban), majd az oldatot 100 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba mossuk át. Ezután az 1g/dm<sup>3</sup> törzsoldatból megfelelő hígítással 0,75g/dm<sup>3</sup>, 0,5g/dm<sup>3</sup> és 0,25 g/dm<sup>3</sup> koncentrációjú oldatokat készítünk (10 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikokban, pipetta).

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

### 13. Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata különböző pH-értékeken; a hidrolizátumok és a vízdoldható keményítő D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometriásan

Egy-egy kémcsőbe bemérünk 1 cm<sup>3</sup>-t az 1%-os vízdoldható keményítő oldatból, illetve 1 cm<sup>3</sup>-t a különböző pH értékeken végzett enzimatis hidrolízis során kapott oldatokból. Ezután 2-2 cm<sup>3</sup> vizet és 3-3 cm<sup>3</sup> 1%-os 3,5-dinitroszalicilsavas oldatot pipetázunk az oldatokhoz, a kémcsövek jól összerázzuk, majd parafilmmel lezárjuk és 90 °C-os vízfürdőbe helyezük 15 percre. Ezután a kémcsöveket lehűtjük, majd 1-1 cm<sup>3</sup> 40 %-os kálm-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.

## FELADATOK BEOSZTÁSA

**A hallgató**Elvégzendő feladatok

## I. gyakorlat:

- Burgonyakeményítő kinyerése (1.feladat)
- A cukrosításhoz felhasznált keményítő nedvességtartalmának meghatározása (2. feladat)

## II. gyakorlat:

- A keményítő cukrosításakor kapott oldatok redukálócukor-tartalmának meghatározása Bertrand szerint (8.feladat)

A II. gyakorlat végén beadandó: az előállított burgonyakeményítő

**B hallgató**Elvégzendő feladatok

## I. gyakorlat:

- Foszfátpuffer készítése, pH-mérő kalibrálása (4. feladat)
- Malátakivonat készítése (4. feladat)
- A cukrosított cefre erjesztése (5. feladat)

## II. gyakorlat:

- A vízdoldható keményítő nedvességének meghatározása (11. feladat)
- Kalibrációs görbe felvétele: ismert koncentrációjú D-glükóz-oldatokkal végzett 3,5-dinitroszalicilsavas oxidációt követő abszorbancia meghatározása 600 nm-en. (12. feladat)
- Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata pH=5,0, pH=5,5 és pH=6,0 értékeken; a hidrolizátumok D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometriásan. (13. feladat)

Az I. gyakorlat végén beadandó: az elkészített malátakivonat

**C hallgató**Elvégzendő feladatok

## I. gyakorlat

- A keményítő cukrosítása malátakivonattal (4. feladat)

## II. gyakorlat

- Amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata: vízdoldható keményítő enzimes hidrolízise pH=5,0, pH=5,5 és pH=6,0 értékeken, majd a keletkezett D-glükóz meghatározása jodometriásan. (10. feladat)

**D hallgató**Elvégzendő feladatok

## I. gyakorlat:

- A vízoldható keményítő nedvességének meghatározása (11. feladat)
- Kalibrációs görbe felvétele: ismert koncentrációjú D-glükóz-oldatokkal végzett 3,5-dinitroszalicilsavas oxidációt követő abszorbancia meghatározása 600 nm-en. (12. feladat)
- Az amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata pH=4,0 és pH=4,5 értékeken; a hidrolizátumok és a vízoldható keményítő D-glükóz koncentrációjának meghatározása spektrofotometriásan. (13. feladat)

## II. gyakorlat:

- Az előállított malátakivonat vizsgálata (6. feladat)
- A malátakivonat szárazanyagtartalmának meghatározása (7. feladat)

**E hallgató**Elvégzendő feladatok

## I. gyakorlat

- A vízoldható keményítő szabad glükóz-tartalmának meghatározása jodometriásan. (10. feladat)
- Amiloglükozidáz enzim katalizáló hatásának vizsgálata: vízoldható keményítő enzimes hidrolízise pH=4,0 és pH=4,5 értékeken, majd a keletkezett D-glükóz meghatározása jodometriásan. (10. feladat)

## II. gyakorlat

- A burgonyából kinyert keményítő tömegének és nedvességtartalmának meghatározása (2. feladat)
- Alkohol kinyerése az erjesztett cefréből (9. feladat)

Az II. gyakorlat végén beadandó: a kinyert alkohol

## JEGYZŐKÖNYV KÉSZÍTÉSE

A két gyakorlatról egy **jegyzőkönyvet** kell készíteni, az öt hallgatónak külön-külön az általa végzett feladatokból.

<i>Feladatcsoport</i>	<i>Szükséges jegyzőkönyv adatlapok</i>
A hallgató	1 – 3. lapok
B hallgató	4. -5. lapok
C hallgató	7-9 lapok
D hallgató	10-13 lapok
E hallgató	14-18 lapok

## ETHYL ALCOHOL

Specific gravity of aqueous solutions of ethyl alcohol at  $\frac{20}{25}^{\circ}\text{C}$  and at  $\frac{25}{20}^{\circ}\text{C}$ .

% Alcohol by weight	Specific gravity $\frac{20^{\circ}}{20^{\circ}}\text{C}$	Specific gravity $\frac{25^{\circ}}{25^{\circ}}\text{C}$	% Alcohol by weight	Specific gravity $\frac{20^{\circ}}{20^{\circ}}\text{C}$	Specific gravity $\frac{25^{\circ}}{25^{\circ}}\text{C}$
0	1.00000	1.00000	32	0.95207	0.94986
1	0.99813	0.99811	33	0.95028	0.94802
2	0.99629	0.99627	34	0.94847	0.94613
3	0.99451	0.99447	35	0.94662	0.94422
4	0.99279	0.99274	36	0.94473	0.94227
5	0.99113	0.99106	37	0.94281	0.94031
6	0.98955	0.98945	38	0.94086	0.93830
7	0.98802	0.98788	39	0.93886	0.93626
8	0.98653	0.98634	40	0.93684	0.93421
9	0.98505	0.98481	41	0.93479	0.93212
10	0.98361	0.98330	42	0.93272	0.93001
11	0.98221	0.98184	43	0.93052	0.92787
12	0.98084	0.98039	44	0.92849	0.92571
13	0.97948	0.97897	45	0.92636	0.92355
14	0.97816	0.97757	46	0.92421	0.92137
15	0.97687	0.97619	47	0.92204	0.91917
16	0.97560	0.97484	48	0.91985	0.91697
17	0.97431	0.97346	49	0.91756	0.91475
18	0.97301	0.97207	50	0.91546	0.91251
19	0.97169	0.97065	51	0.91322	0.91026
20	0.97036	0.96922	52	0.91097	0.90796
21	0.96901	0.96778	53	0.90872	0.90571
22	0.96763	0.96630	54	0.90645	0.90343
23	0.96624	0.96481	55	0.90418	0.90113
24	0.96483	0.96329	56	0.90191	0.89883
25	0.96339	0.96176	57	0.89962	0.89654
26	0.96190	0.96018	58	0.89733	0.89423
27	0.96037	0.95856	59	0.89502	0.89191
28	0.95880	0.95689	60	0.89271	0.88959
29	0.95717	0.95520	61	0.89040	0.88725
30	0.95551	0.95345	62	0.88807	0.88491
31	0.95381	0.95168	63	0.88574	0.88256

## ETHYL ALCOHOL (Continued)

% Alcohol by weight	Specific gravity $\frac{20^{\circ}}{20^{\circ}}\text{C}$	Specific gravity $\frac{25^{\circ}}{25^{\circ}}\text{C}$	% Alcohol by weight	Specific gravity $\frac{20^{\circ}}{20^{\circ}}\text{C}$	Specific Gravity $\frac{25^{\circ}}{25^{\circ}}\text{C}$
64	0.88339	0.88020	83	0.83747	0.83408
65	0.88104	0.87783	84	0.83496	0.83156
66	0.87869	0.87547	85	0.83242	0.82902
67	0.87632	0.87309	86	0.82987	0.82646
68	0.87396	0.87071	87	0.82729	0.82389
69	0.87158	0.86833	88	0.82469	0.82128
70	0.86920	0.86593	89	0.82207	0.81865
71	0.86680	0.86352	90	0.81942	0.81600
72	0.86440	0.86110	91	0.81674	0.81331
73	0.86200	0.85869	92	0.81401	0.81060
74	0.85958	0.85626	93	0.81127	0.80785
75	0.85716	0.85383	94	0.80848	0.80507
76	0.85473	0.85140	95	0.80567	0.80225
77	0.85230	0.84895	96	0.80280	0.79939
78	0.84985	0.84650	97	0.79988	0.79648
79	0.84740	0.84404	98	0.79688	0.79349
80	0.84494	0.84157	99	0.79383	0.79045
81	0.84245	0.83909	100	0.79074	0.78736
82	0.83997	0.83659			

## ZÁRTHELYI

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

## Ellenőrző kérdések

1. Ismertesse, hogy milyen feladatokat kell elvégeznie a gyakorlaton!
2. Milyen módon történik a gyakorlat során a keményítő kinyerése?
3. Milyen szerkezeti részekből áll a keményítő?
4. Mi a csiriz?
5. Rajzolja le a keményítő kinyeréséhez használt eszközt!
6. Ismertesse, hogy milyen módon határozza meg a keményítő nedvességtartalmát a gyakorlaton!
7. Miért van szükség a keményítő nedvességtartalmának ismeretére?
8. Milyen lépésekből áll a malátakivonat elkészítése?
9. Miért nem  $3 \cdot 120 \text{ cm}^3$ , azaz  $360 \text{ cm}^3$  malátakivonatot kapunk, ha 3-szor  $120 \text{ cm}^3$  vízzel extraháljuk a malátát?
10. Milyen enzimek találhatók a malátakivonatban?
11. Mit nevezünk enzimnek?
12. Milyen módon befolyásolják a kémiai reakciókat az enzimek?
13. Melyek az optimális körülményei az  $\alpha$ -amiláz és a  $\beta$ -amiláz enzimmel történő hidrolízisnek?
14. Mi a maláta?
15. Milyen vizsgálatokat kell elvégeznie az előállított malátakivonat jellemzésére?
16. Hogyan hajtja végre a malátakivonat aktivitásának vizsgálatát?
17. Mire használjuk a centrifugát a gyakorlaton?
18. Milyen szabályokat kell betartani a centrifuga használata közben a gyakorlaton?
19. Hogyan hajtja végre a keményítő cukrosítását a gyakorlaton?
20. Milyen diszacharid nyerhető a keményítő részleges hidrolízisekor? Mi a képlete? Rajzolja le!
21. Milyen monoszacharid nyerhető a keményítő hidrolízise során? Mi a képlete? Rajzolja le!
22. Milyen enzimatis folyamatok dominálnak a cukrosítás első,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on illetve a második,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ -on végrehajtott lépésében?
23. Mi a pH?
24. Ismertesse az üvegelektrod működését!
25. Milyen hőmérsékleten és pH-n végezzük a cukrosítás lépéseit a gyakorlaton?
26. Miért fontos felforralni a cukrosítási reakcióelegyből vett mintákat?
27. Miért használunk kotyogót az erjesztendő cefrét tartalmazó edény lezárására?
28. Hogyan készítik elő erjesztéshez a cukrosított cefrét?
29. Milyen hőmérsékleten és pH-n hajtjuk végre a cukrosított cefre erjesztését a gyakorlaton?
30. Milyen módon követjük nyomon a cukrosítás folyamatát a gyakorlat során?
31. Mi az alapja a redukálócukor-tartalom Bertrand szerinti meghatározásának?
32. Milyen mérőoldattal titrálunk a Bertrand szerinti redukálócukor meghatározásnál?
33. Milyen végpontjelzést alkalmazunk a Bertrand szerinti redukálócukor meghatározásánál?
34. Miért fontos a kálium-permanganátos titrálást minél gyorsabban elvégezni az ehhez előkészített

mintával?

35. Mi a Lugol-oldat?
36. Egy mintán jódpróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe kék lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
37. Egy mintán jódpróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe lila lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
38. Egy mintán jódpróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe barna lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
39. Egy mintán jódpróbát végzünk Lugol-oldattal. A minta színe sárga lett. Milyen következtetést tudunk levonni a színváltozásból?
40. Ismertesse, hogy milyen módszert alkalmazunk a gyakorlat során szabad glükóz-tartalom meghatározására?
41. Ismertesse az amiloglükozidáz enzimaktivitásának nyomonkövetésére alkalmazott titrálás menetét! Milyen végpontjelzést alkalmazunk?
42. Ismertesse a az amiloglükozidáz enzimaktivitásának nyomonkövetésére alkalmazott titrálás egyenleteit!
43. Hogyan történik a gyakorlat során az előállított alkohol tartalmú párlat sűrűségének meghatározása?
44. Hogyan határozzuk meg az előállított alkohol-víz elegy alkoholkoncentrációját?
45. 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



## GERECS ÁRPÁD: BEVEZETÉS A KÉMIAI TECHNOLÓGIÁBA (RÉSZLETEK)

### SZESZGYÁRTÁS

Világviszonylatban az etil-alkohol (etanol, szesz) egy részét szintetikusan, más részét erjesztéssel állítják elő. Az erjesztéses szeszgyártás lényege az, hogy cukoroldatot anaerob körülmények között sörélesztővel erjesztenek, majd a keletkezett alkoholt desztillációval nyerik ki.

A körülményektől, a gazdasági adottságoktól és az alkohol felhasználásától függően mindkét gyártás gazdaságos lehet. Vegyipari célra világviszonylatban nagyjából szintetikus etanolt használnak, míg szesz italokat erjesztéssel állítanak elő. Vegyipari célra is gazdaságosan állítható elő erjesztéssel alkohol ott, ahol erre sok és olcsó nyersanyag áll rendelkezésre.

Erjesztéses szeszgyártás céljára olyan mezőgazdasági vagy mezőgazdasági ipari termékeket, melléktermékeket és hulladékokat használnak nyersanyagként, amelyek a sörélesztő számára erjeszthető cukrokat vagy sok keményítőt tartalmaznak. Az utóbbi esetben a keményítőt a tápoldat (cefre) készítése során enzimes hidrolízissel alakítják át erjeszthető cukrokká (leggyakrabban maltózzá).

Ipari szeszt elsősorban melaszból és étkezésre alkalmatlan, hibás burgonyából vagy nagy hozamú olcsó ipari burgonyából gyártanak. Pálinkafélék készítésére főként hulladék gyümölcsöt (gyümölcspálinkák), gabonát (whisky, vodka), esetleg burgonyát használnak.

Az *etil-alkohol* színtelen, kellemes illatú, égető ízű, gyúlékony folyadék, vízzel és a legtöbb szerves oldószerrel korlátlanul elegyedik. A vízmentes etanol forráspontja 1 atm nyomáson 78,4 °C, fagyáspontja -114,5 °C, sűrűsége 0,789 g/cm<sup>3</sup>. Az etanol gőze levegővel robbanóelegyet képez.

1 tonna burgonyából átlagosan 83 l, rozsból 298 l, kukoricából 318 l, árpából 299 l, melaszból 266 l, barackból 45 liter 95,5%-os szesz állítható elő.

**Szeszes erjedés.** Az élesztők cukrokat anaerob körülmények között úgy erjesztenek, hogy termékként etanol és szén-dioxid keletkezik. A szesz erjedést – mint bruttó reakciót – hexózok esetében a következő egyenlet írja le:



A fenti egyenlet értelmében 180 g hexózból 92 g etanolnak kellene keletkeznie. A valóságban ennél valamivel kevesebb alkoholt kapnak, mert az élesztő a cukor egy részét (az oxigén teljes kizárásakor 1–2%-át) a sejteket felépítő vegyületek szintézisére használja fel, és kevés melléktermék is keletkezik. Ezért az erjedés során keletkező etanol az elerjesztett cukorra számítva 94–96%-a a sztöchiometrikus mennyiségnek.

A szeszgyártásban és a sörgyártásban felhasznált *sörélesztő* (*Saccharomyces cerevisiae*), valamint a borászatban szerepet játszó *borélesztő* (*Saccharomyces ellipsoideus*) glükózt, fruktózt, maltózt és szacharózt képes erjeszteni, utóbbiakat azért, mert rendelkezik azokkal az enzimekkel, amelyek e diszacharidokat glükózzá, ill. glükózzá és fruktózzá hidrolizálják. (A maltóz hidrolízisét katalizáló enzimet *maltáznak*, a szacharóz hidrolízisét – inverzióját – katalizáló enzimet *invertáznak* nevezik.)

**Keményítő enzimes hidrolízise.** A keményítőt a szeszgyártásban enzimes módszerekkel cukrosítják. Erre a célra leginkább csíráztatott árpát, ún. *szeszmalátát* használnak. A malátában levő *amiláz* enzimek a keményítő nagy részét maltózzá hidrolizálják, ami a sörélesztő számára jól erjeszthető diszacharid.

Keményítő elcukrosítására penészeket, vagy azokból előállított enzimek készítményeket is használnak. Ezek is rendszerint amiláz enzimet tartalmaznak.

A maláta cukrosító enzimeit az α-amiláz és a β-amiláz. Mindkettő az α-glükozidkötést hidrolizáló enzimek csoportjába tartozik és a keményítőben levő 1,4-glükozidkötések hidrolízisét katalizálja, de a két enzim tulajdonságaiban és működésében bizonyos különbségeket is találunk.

Az α amiláz enzimet elfolyósító enzimnek vagy dextrinogén amiláznak is nevezik, mert hatására a keményítő gyorsan elfolyósodik, miközben elsősorban dextrinek keletkeznek. Az α-amiláz az amilózt és az amilopektint dextrinekig bontja le, a dextrinekét azonban csak lassan cukrosítja. Az enzim hőfokoptimuma kb. 70 °C, pH-optimuma 5,5–6 és 75–78 °C-ig aktív.

A β-amiláz enzim a keményítőt fokozatosan hidrolizálja, hatására maltóz hasad le a molekulák

végéről, ezért a keményítő átlagos molekulásúlya fokozatosan csökken, és termékként maltóz keletkezik. A  $\beta$ -amiláz az egyenes szénláncú amilózt maradék nélkül elcukrosítja, az elágazó láncú amilopektint azonban csak a lánclágazásokig képes hidrolizálni. A lánclágazásokig lebontott amilopektint határdextrinnek vagy maradékdextrinnek nevezik. A határdextrinnek az  $\alpha$ -amiláz enzim kis sebességgel még tovább képes bontani, a hidrolízis azonban  $\alpha$ - és  $\beta$ -amiláz együttes hatására sem lehet teljes, mert az elágazásoknál levő 1,6-glükozidos kötéseket egyik enzim sem képes bontani. A  $\beta$ -amiláz hőre érzékenyebb, mint az  $\alpha$ -amiláz és 70 °C felett elveszti aktivitását. A  $\beta$ -amiláz hőfokoptimuma kb. 65 °C, pH-optimuma kb. 5,1.

A malátán kívül vannak más enzimek is, melyek keményítő cukrosítására alkalmasak. Pl. az „*amilo*”-eljárások szerint penészekkel vagy penészekből előállított készítményekkel cukrosítják a keményítőt. Egyik változatban amiláz enzimet termelő penészt (pl. *Mucor rouxii*, *Rhizopus japonicus*) szaporítanak el a cefrében levegő átbuborékolatása közben. A penészek által termelt amiláz a sejtekből a cefrébe diffundál, és hatására a keményítő elcukrosodik. A cukrosítás befejeztével a levegőztetést megszüntetik, és a cefrét élesztővel oltják be. (Az anaerob szeszes erjedés alatt a cefrében maradt penész már nem fejt ki további erjesztő tevékenységet.)

**Az erjesztéses szeszgyártás műveletei.** Első teendő a tápolytatás (az ún. cefrézés), ami különböző műveleteket kíván meg attól függően, hogy erjeszthető cukrokat használnak, vagy keményítőt tartalmazó nyersanyagból indulnak ki.

Erjeszthető cukrot tartalmazó nyersanyag, pl. melasz esetében az erjesztés számára megfelelő koncentrációjú és összetételű oldat elkészítése a feladat. A cukor koncentrációja a cefrében nem lehet több mint 14–18%, mert ennél töményebb cukoroldatot sörélesztővel nem lehet teljesen elerjeszteni. Szükség szerint szerves tápsókat, aktivátorokat (Fe- és Mg-sókat) és biosz-anyagokat tartalmazó növényi kivonatokat, pl. malátakivonatot is adnak a cefréhez.

Több műveletből áll a cefrézés akkor, ha keményítőt tartalmazó terményekből, burgonyából vagy gabonafélékből indulnak ki. A keményítőt nem izolálják, hanem megfelelő előkészítés után a terményeket egészében használják fel tápolytatás céljára. Ez a megoldás olcsóbb és az is előnye, hogy ilyen úton az élesztő számára hasznos ásványi sók, biosz-anyagok és aminosavak is bekerülnek a cefrébe. A burgonyát és a gabonaféléket a sejtek duzzasztása és felszakítása céljából előbb gőzölik, majd cukrosítják, és végül elkészítik az erjesztésre alkalmas koncentrációjú tápolytatást.

A cukrosítást cefréző kádakban vagy közvetlenül az erjesztő kádakban végzik. A kádakba vizet engednek, majd keverés és hűtés közben vezetik be a gőzölőből a feltárt nyersanyagot, és adagolják a megőrölt szeszmalátát. (Pl. 100 kg burgonyához 2–3 kg malátát adnak.) Közben a cefre hőmérsékletét 50–55 °C-on tartják, majd a cukrosítás utolsó szakaszában 60–65 °C-ra fűtik. A művelet számára gyengén savas közeg (5–5,5-es pH) a kedvező, ezért szükség esetén kénsavat vagy tejsavat is adnak a cefréhez.

A cukrosítás kb. 40–50 percet vesz igénybe, és eredményeként a keményítő 75–80%-a bomlik le maltózzá, 20–25%-a pedig dextrinrekké. Minthogy a cefrében levő cukrosító enzimek továbbra is aktívak maradnak, a dextrin az erjedés folyamán lassan tovább cukrosodnak. (A cefrét ezért nem szabad 70 °C fölé melegíteni.)

Cukrosítás után a cefrét a szeszes erjedés optimális feltételeinek biztosítása végett 28–30 °C-ra hűtik, kémhatását 4,5–5-ös pH-ra állítják be, és szükség esetén olyan mértékben hígítják, hogy a cukor koncentrációja ne legyen nagyobb 14–18%-nál.

Az erjesztést régebben nyitott fa- vagy betonkádakban végezték; újabban kovácsoltvasból, acélból, vörösrézről vagy alumíniumötvözetekből készült, több száz hl űrtartalmú, zárt erjesztő tankokat is alkalmaznak. Utóbbiak jobban kezelhetők és tisztíthatók, valamint módot nyújtanak a távozó szén-dioxid elvezetésére is. (Az erjedő cefréből a szén-dioxiddal együtt alkoholgőz is távozik. A zárt készülékből elvezetett gázokat aktív szeszes adszorberre vezetik át, és az alkoholt visszanyerik belőle.)

Az erjesztés gyakorlati kivitelezésére sokféle eljárás ismeretes; egyaránt alkalmaznak szakaszos és félfolyamatos.

*Szakaszos üzemű erjesztés* esetében a cefrének kb. 10%-át egy kisebb készülékbe különveszik, beoltják oltóélesztővel és előerjesztik. Amikor ez a különvett cefre főerjedésben van, a nagy fermentorban levő főcefréhez adják, és abban is megindítják az erjedést. Közben a hőmérsékletet hűtéssel állandóan 28–30 °C-on tartják, és a fejlődő szén-dioxidot elvezetik. Ilyen módon eljárva az erjesztés összesen kb. 72 órát vesz igénybe, amiből a főcefre főerjedése kb. 12 óra.

A *félfolyamatos erjesztés* legrégebbi módszere az erjedő cefre „átvágása”. Ennek lényege, hogy amikor a cefre főerjedésben van, egy részét (általában 20%-át) egy következő kádba szivattyúzzák át, és ezzel indítják meg az újabb adag cefre erjedését. Egyidejűleg az első kádat is friss cefrével töltik

fel, az erjesztést tovább folytatják, majd a leerjedt cefrét feldolgozásra vezetik el. Több (célszerűen három) kádat használva, a fenti elv alapján az első kádból a másodikba, a másodikból a harmadikba, a harmadikból az (időközben már ürített és friss cefrével újból töltött) első kádba „vágják át”. Ezzel a módszerrel időt és oltóélesztőt lehet megtakarítani (elmarad az előerjesztés).

A leerjedt cefrét desztillációval dolgozzák fel. Annak alkoholtartalma rendszerint 6–8%, ezenkívül egyéb erjedési termékeket, oldatlan rostanyagokat, elhalt és életképes élesztősejteket tartalmaz.

A desztillációt (“szeszfőzést”) rendszerint két lépésben hajtják végre. Az első desztilláció terméke a *nyerszesz*, ami etanol és víz mellett az erjedés illékony melléktermékeit is tartalmazza. Az első desztillálásnál visszamarad a *szeszmoslék*. A burgonyaszesz gyártásánál kapott moslékot takarmányozásra, a melaszmoslékot pl. hamuzsír vagy betain gyártására használják.

A nyerszesz újbóli desztillálásával (finomításával) állítják elő a *finomszeszt*. A finomítás során a melléktermékek az elő- és az utópárlatban ill. az ún. kozmaolajban dúsulnak fel. Az elő- és utópárlatból denaturált szeszt készítenek, a kozmaolajat pedig oldószerként értékesítik vagy észtereket állítanak elő belőle.

Vizes etil-alkohol desztillálása útján legfeljebb 95,5% alkoholtartalmú *azeotróp* állítható elő, ami a vízmentes alkoholnál alacsonyabb hőfokon, 78,1 °C-on forr. Ebből vízelvonó szerekkel vagy azeotróp desztillációval állítanak elő *abszolút alkoholt*.