



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Biokémia labor

Gyakorlat:

Szénhidrátok és szénhidrátbontó enzimek vizsgálata

Mérésvezetők:

Böttger Éva
Nagy Kinga
Nyíri Kinga
Dr. Örsi Ferenc

2014/2015 II. félév

Tartalom

1. Elméleti bevezetés	3
1.1. A szénhidrátok definíciója.....	3
1.2. A szénhidrátok előfordulása.....	3
1.3. A szénhidrátok funkciói	3
1.4. A szénhidrátok gyűrűképzési reakciója.....	3
1.5. A szénhidrátok csoportosítása	4
1.5.1. Monoszacharidok:	5
1.5.2. Oligoszacharidok:.....	6
1.5.3. Poliszacharidok:	7
1.6. A szénhidrátbontó enzimek (O-glikozidázok).....	10
1.6.1. A szénhidrátbontó enzimek definíciója	10
1.6.2. A szénhidrátbontó enzimek csoportosítása.....	10
1.6.3. Az enzimek aktivitása	10
1.6.4. A gyakorlaton vizsgált enzim.....	11
2. Gyakorlati rész	12
2.1. Ismeretlen cukorminta azonosítása (egyéni feladat)	12
2.1.1. Oldási próba hideg és meleg vízzel	12
2.1.2. Molisch-reakció (α -naftol próba).....	12
2.1.3. Fehling-reakció.....	13
2.1.4. Rezorcin-sósav reakció.....	13
2.1.5. Poliszacharidok kimutatása	13
2.1.6. Rétegekromatográfiás elválasztás	14
2.1.7. Beadandó.....	14
2.2. Szénhidrátbontó enzim: az α -amiláz aktivitásának meghatározása	15
Beadandó.....	16
3. Felkészülést segítő kérdések.....	17
4. Mellékletek.....	18

1. Elméleti bevezetés

1.1. A szénhidrátok definíciója

A *szénhidrátok* olyan, többnyire természetes eredetű polihidroxi-oxovegyületek és ezek kondenzált származékai, melyek nagy részben öt- vagy hattagú gyűrűs tautomer formában fordulnak elő.

1.2. A szénhidrátok előfordulása

A szénhidrátok a Földön a legszélesebb körben és a legnagyobb mennyiségben jelenlévő szerves vegyületek. A szénhidrátokban hasznosul elsődlegesen a napfény sugárzó energiája azáltal, hogy szén-dioxidból és vízből a zöld növényekben a fény hatására szénhidrát keletkezik. A növényekben a szénhidrátok mennyisége az összes szárazanyagnak mintegy 50-80 %-a, az állati szervezetben ennél jóval kisebb mennyiségben található meg.

1.3. A szénhidrátok funkciói

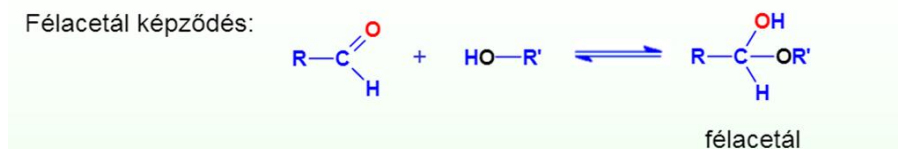
A szénhidrátok a legtöbb élő szervezet energiaellátásában központi szerepet töltenek be, ezenkívül a szénhidrát lehet tartalék anyag (például keményítő), vázanyag (pl. cellulóz, kitin), vagy speciális biológiai funkciót betöltő vegyület, mint pl. antigén, receptor stb.

1.4. A szénhidrátok gyűrűképzési reakciója

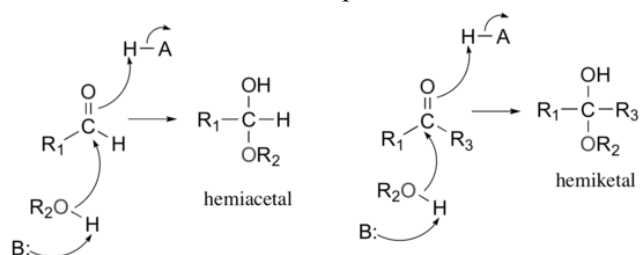
Az alkoholok aldehidekkel illetve ketonokkal végbemenő reverzibilis reakciójának terméke félacetál (hemiacetál), illetve félketál (hemiketál). A szénhidrátok esetében ez a reakció a vegyületen belül megtalálható két funkciós csoport között játszódik le és gyűrű képződést eredményez. A reakció visszafordítható, az oldatban egyensúlyban a gyűrűs és nyíltlancú forma is előfordul. A reakció során képződött hidroxilcsoportot nevezük glikozidos hidroxilcsoportnak. Amennyiben ez a hidroxilcsoport további reakcióba lép akkor a termék esetében a gyűrű felnyílása már nem lehetséges (vö. a bomlás reakció mechanizmusa).

Leggyakrabban öt- (furanóz) illetve hattagú (piranóz) gyűrűk képződnek, ugyanis ezekben viszonylag kisebb a gyűrűfeszültség (a gyűrűképződés nem okoz nagy torzulást az eredeti kötési szögekben).

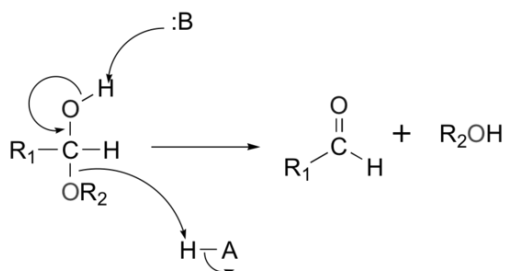
Félacetál képződés:



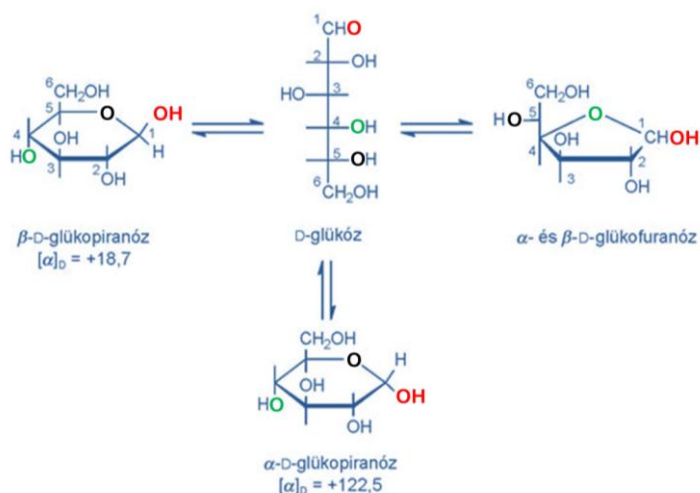
A félacetal illetve félketal képződésének mechanizmusa



A félacetal bomlásának mechanizmusa



Gyűrűképződés glükóz esetén



1.5. A szénhidrátok csoportosítása

✚ Egyszerű cukrok (monoszacharidok vagy monószok)

Az egyszerű cukrok 120-200 g/mol körüli molekulatömegű, kisebb alegységekre nem hidrolizálható, vízben oldódó, optikailag aktív anyagok.

✚ Oligoszacharidok

Az oligoszacharidok 2-10 egyszerű cukor egységből felépülő, hidrolizálható, vízben oldódó, optikailag aktív vegyületek.

✚ Poliszacharidok

A poliszacharidok nagy molekulatömegű, egyszerű cukrokra hidrolizálható, vízben legfeljebb kolloid oldatot képző, nem édes ízű vegyületek.

1.5.1. Monoszacharidok:

Xilóz

A xilóz monoszacharid, (aldopentóz) a Fehling oldatot redukálja, optikailag aktív, egyensúlyi állapotban moláris forgatóképessége $+18,8^\circ$. Édes ízű, édesítőképessége a glükózéhoz hasonló. A vércukorszintet nem befolyásolja. A hemicellulózok építőköveként előfordul fában, szalmában, a barackmag héjában. Mivel az elfásodott növényi képletek egyik jellemző poliszacharidjának, a xilánnak alkotórésze, ezért facukornak is nevezik. Hemicellulóz hidrolízisével állítják elő.

Glükóz (dextróz)

Monoszacharid, aldohexóz, redukáló, optikailag aktív. Oldata jobbra forgat, (moláris forgatóképessége $+52,7^\circ$) ezért a glükózt dextróznak is nevezik. Édes ízű, de édesítőképessége nem éri el a répacukorét. A glükóz a legfontosabb egyszerű cukrok egyike. Szabad állapotban édes gyümölcsökben, egyéb növényi részekben és a mézben fordul elő. A vérnek is állandó komponense (0,1 %). Szőlőcukornak azért nevezik, mert a szőlő is tartalmazza, a must bepárlásával kristályosan is kinyerhető belőle.

Sokkal nagyobb mennyiségű D-glükóz található azonban kötött állapotban. Egyetlen építőköve a két legelterjedtebb növényi poliszacharidnak, a keményítőnek és a cellulóznak. Az emberi és az állati szervezetben fontos szerepet betöltő szénhidrát, a glikogén szintén D-glükózból polimerizálódik. D-glükózt tartalmaz a szacharóz, a maltóz és a tejcukor is.

A glükózt nagyüzemi méretekben keményítőtől savas vagy enzimes hidrolízissel, ritkábban cellulózból enzimes hidrolízissel állítják elő.

A tiszta szőlőcukrot felhasználják a gyógyászatban, cukorkaáruk, gyümölcskonzervek és szörpök édesítésére. A D-glükóz élettani szempontból is nagyon fontos, mert számos anyagcsere folyamatban részt vesz. Az ember glükózszükséglete 110-130 g naponként. A szervezet glükózháztartását a máj szabályozza, a glükóz főleg a májban raktározódik, glikogén formájában. Alacsony vércukorszint esetén a tartalék szénhidrátból glükóz szabadul fel. Diabetes mellitus (cukorbetegség) esetén a glükózt a szervezet nem tudja megfelelő módon hasznosítani, ezért az élelmiszerekben más édesítő adalékkal kell helyettesíteni.

Fruktóz (levulóz, gyümölcscukor)

Monoszacharid, ketohexóz, redukáló, optikailag aktív. Mindkét izomer balra forgató, ($-92,3^\circ$), innen származik a levulóz elnevezés (latinul: laevus - bal). Gyümölcscukornak is nevezik, mert a növényvilágban, különösen a gyümölcsökben nagyon elterjedt, de megtalálható csaknem minden növényi részben. Nagy mennyiségű fruktóz van a mézben is. A fruktóz a legédesebb cukorféleség. A fruktóz kötött formában több oligoszacharid, (szacharóz, raffinóz, gencianóz, melecitóz, sztachióz) építőköve.

A fruktózt korlátozott mértékben ugyan, de a cukorbeteg is fogyaszthatják, mert

lassan szívódik fel.

Fontos élelmiszeripari édesítőszer az ún. izoszörp, melyet a kukoricakeményítő hidrolízisével, majd a keletkező D-glükóz izomerizációjával állítanak elő. Az izomerizáció során a glükóz fele alakul át fruktózzá.

1.5.2. Oligoszacharidok:

Szacharóz (nádcukor, répacukor)

Diszacharid, nem redukáló, optikailag aktív, egy glükóz és egy fruktóz egységből épül fel. Édes ízű vegyület, édesítőképessége kiváló. Híg ásványi savakkal hidrolizálható, ekkor D-glükóz és D-fruktóz 1:1 arányú elegye keletkezik, melyet invert cukornak nevezünk. Nevét onnan kapta, hogy a hidrolízis során a pozitív forgatóképesség negatívvá változik, tehát megfordul az előjel.

Az élesztő nem tudja közvetlenül erjeszteni a szacharózt, csak akkor, ha invertáz enzimje előbb hidrolizálja.

A szacharóz a növényvilágban nagyon elterjedt. Régebben kizárólag a trópusokon honos cukornád présnedvéből állították elő, később a mérsékelt égövben áttértek cukorrépából való gyártásra.

Laktóz (tejcukor)

Diszacharid, redukáló, optikailag aktív, egy glükóz és egy galaktóz egységből épül fel. A laktóz az emlősök tejében fordul elő. A laktóz lúgokkal szemben nagyon érzékeny, viszont savakkal és hővel szemben a többi cukornál jóval ellenállóbb.

A laktózt a tejsavbaktériumok tejsavvá, továbbá különböző aroma és zamatanyagokká erjesztik. A sütőélesztő nem képes lebontani, speciális laktózélesztők azonban erjesztik és szén-dioxidot termelnek belőle. A laktóznak fontos szerepe van az erjedéssel készülő tejtermékek (joghurt, kefir, sajtok...) gyártásában.

A lakosság jelentős hányada érzékeny a tejcukorral szemben (laktóz intolerancia), szervezetükből hiányzik a laktóz lebontásához szükséges β -galaktozidáz enzim, ezért anyagcsere zavarak jelentkeznek náluk. A laktózt a bélrendszerben élő baktériumok bontják le (mivel rendelkeznek β -galaktozidázzal) és az eközben keletkező gázok okoznak puffadást ill. emésztőrendszeri panaszokat a laktózzérzékeny betegeknél. Hasonló problémát jelentenek a nem redukáló oligoszacharidok is.

Maltóz (malátacukor)

Diszacharid, redukáló, a keményítő részleges savas, enzimikus hidrolízisével állítható elő. Édes ízű vegyület. Két α -D-glükóz egységből épül fel, α -1,4 kötéssel.

Cellobióz

Diszacharid, redukáló. A növényi sejtfalak egyik fő alkotórészének, a cellulóznak celluláz enzimmel való hidrolízise útján keletkezik. Két β -D-glükóz egységből épül fel, β -1,4-kötéssel.

Raffinóz

Triszacharid, nem redukáló, optikailag aktív, glükóz, fruktóz és galaktóz egységekből épül fel. Nem édes, fehér, kristályos anyag, vízben a szacharóznál jobban oldódik.

A raffinóz a növényvilágban nagyon elterjedt, megtalálható egyebek között a cukorrépában is. A cukorgyártás során a melaszban dúsul fel, a nyerscukor tisztításakor (raffinálás) a kristályosítási anyalúgba kerül, innen származik a neve.

1.5.3. Poliszacharidok:

A poliszacharidok olyan összetett szénhidrátok, amelyekben nagyszámú monoszacharid egység elágazás nélküli vagy elágazó láncban kapcsolódik egymáshoz. Ezek a nagy molekulájú vegyületek már nem hasonlítanak az egyszerű cukrokhoz. Vízben legnagyobb részük nem, vagy csak részlegesen oldódik, édes ízük nincs, a Fehling oldatot gyakorlatilag nem redukálják. Élesztővel közvetlenül nem erjeszthetők.

A poliszacharidok savas vagy enzimes hidrolízissel egyszerű cukrokká bonthatók.

A **glükánok** közül különösen fontosak a keményítő, a dextrinek, a glikogén, a dexrán és a cellulóz.

A **keményítő** a növényi asszimiláció eredményeként képződik, és egyes növényi részekben (magvak, gyökerek, gumók) tartalék tápanyagként halmozódik fel. Különösen sok keményítő van a gabonamagvakban (60-70%) és a burgonyában (18-24%).

A keményítő nem egységes anyag, kétféle szerkezetű molekula keveréke. Mindkettőben glükózok kapcsolódnak maltózszerűen egymáshoz α -1-4 ill. α -1-6 glikozidos kötésekkel.

Az egyik elágazás nélküli láncot képez, ezt **amilóznak** (csak α -1-4 kötések), a másik elágazó molekulákat alkot, amelyet **amilopektinnek** (α -1-4 és α -1-6-os kötések) nevezünk.

Az **amilóz** móltömege a 10-40 ezer daltonos tartományba esik. Ebből kiszámítható, hogy a kapcsolódó glükóz molekulák száma, vagyis az óriásmolekula polimerizációs foka mintegy 100-2500 között van. Az amilóz glükózmaradékai α -hélix struktúrát alkotnak, amelyet hidrogénkötések stabilizálnak.

Az amilóz forró vízben nem csirizedik, hanem feloldódik. Az oldat kihűlése után az amilóz kiválik. Az amilóz jóddal oldattal kék színreakciót ad.

Az **amilopektin** relatív móltömeg tartománya 10^7 – $20 \cdot 10^7$ Da. A glükóz monomerek polimerizációs foka 10^4 - 10^5 . Az amilopektin láncmolekulái elágaznak, és az elágazás többszörös, vagyis az oldalláncokon újabb elágazások találhatóak. Az elágazások átlagosan 18-30 glükóz egységenként találhatóak, de a belső láncrészekben minden nyolcadik-kilencedik glükózon lehet ilyen elágazást találni. Jóddal ibolya színreakciót ad.

A keményítőszemcsék hideg vízben oldhatatlanok, de kissé duzzadnak. Ez a duzzadás reverzibilis, miközben a nedvességtartalom 30% körülre nő. A vizes keményítő szuszpenziót melegítve a duzzadás fokozódik, és irreverzibilissé válik. Ezt a folyamatot csirizedésnek nevezzük, amely általában 60°C körül jelentkezik, de keményítő-fajtánként kisebb-nagyobb eltérések tapasztalhatók. A csirizedés során a keményítőszemcsék 10-40-szeresre duzzadnak, majd fölrepednek, és a kioldható anyagok oldatba kerülnek. A hőmérséklet további emelésének hatására a keményítőszemcsék szerkezete szétesik és belőlük nagy viszkozitású sűrű kolloid oldat vagy gél képződik. A keményítő híg savval vagy enzimes kezeléssel hidrolizálva dextrinekké, maltózzá és végül glükózzá bomlik le. Így állítják elő a keményítőszörpöt és a burgonyacukrot.

A **rezisztens keményítőt** Englyst és munkatársai fedezték fel 1982-ben az étkezési rostok között; a vizsgálat során ez a keményítő-rész ellenállt az α -amilázos és pullulanázos emésztésnek. Kutatásokkal támasztották alá, hogy a rezisztens keményítő hidrolízis nélkül éri el a vastagbelet, ahol a bélflóra mikroorganizmusai fermentálni képesek. A rezisztens keményítőket (RS) négy fő csoportra oszthatjuk. RS1: Az emésztő enzimek számára fizikailag hozzáférhetetlen; a sejtfalakon belül, részlegesen örölt gabonákban, egyéb magvakban, hüvelyesekben található. Szemcseméretének és/vagy szerkezetének köszönhetően rezisztens. RS2: A nyers élelmiszerekben gyakoriak: nyers burgonya, zöld banán, illetve ide tartozik a magas amilóz tartalmú kukorica. A magas amilóz-tartalom esetén a nagyszámú hélix molekula, burgonya esetén a foszfát csoportok jelenléte felelős a rezisztencia kialakulásáért. RS3: Retrogradált, szemcsés szerkezetű keményítő. A gélesedés után a hűtés hatására újrakristályosodott amilóz alkotja. Megtalálható például a hűtött főtt burgonyában, illetve néhány pelyhesített, magas amilóz tartalmú kukoricatermékben is. RS4: Kémiai módosítással (kereszt-kötésekkel, észteresítéssel, stb.) létrehozott keményítők sorolhatóak ebbe a csoportba. Hidroxipropil, citromsavanhidrid, acetát és foszfátkeményítőket állítanak elő leggyakrabban, de nem minden módosított keményítő használható élelmiszeripari célra.

A **dextrinek** kémiai szerkezete hasonló a keményítőhöz. A keményítő hidrolízise során képződő, bizonytalan összetételű polimer termékeket nevezzük dextrineknek, amelyek csoportjait a jóddal mutatott reakciótermékeik alapján osztályozhatjuk. A polimerizáció csökkenésével kék (amilodextrin), vörös (eritrodextrin), barna, színtelen (akrodextrin) reakciótermékeket nyerünk. Enzimes lebontás (α - és β -amiláz) során határdextrinek is keletkeznek.

A keményítő hidrolízis előrehaladását az ún. DE (dextróz ekvivalens) számmal jelöljük, ami a hidrolízis során szabaddá váló glükóz mennyiségét adja meg.

Az élelmiszeripari gyakorlatban széleskörűen alkalmazunk dextrineket adalékanyagként, vízkötőként és ragasztóanyagként.

A **glikogén** az állati szervezetek tartalék szénhidrátja. Főleg a májban, és kisebb mennyiségben az izmokban található. A májban tartalék tápanyagként raktározódik el, a jól táplált állatoknak ezért nagyobb a mája. Az állat leölése után, a glikogén erjedéssel tejsavra bomlik.

A glikogén is α -D-glükóz molekulák összekapcsolódása révén keletkezett láncmolekulákból áll. A glükóz részek kapcsolódási módja ugyanolyan, mint az amilopektinben, csak az α -1-6 kötések gyakorisága nagyobb. A főlánc minden harmadik-nyolcadik glükóz egysége után található elágazás és ennek hossza csak 8-13 glükóz egység lehet. Az elágazási pontoknál lehetnek kettes vagy hármás elágazások. Molekulatömege 2-10 millió Da között van.

Jóddal vörös-vörösbarna, néha ibolyaszínű színreakciót ad. Vízen nehezen, de a keményítőnél sokkal jobban oldódik, már szobahőmérsékleten 18%-os kolloidoldat készíthető belőle. A Fehling-oldatot kissé redukálja. Híg savval dextrinre, maltózra és glükózra hidrolizál, enzimes úton maltózra és glükózra bontható.

A **dextrán**ban a glükóz egységek főként α -1-6 kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, előfordul azonban α -1-4 és α -1-3 kötés is. A molekulában számos elágazás van, átlagos molekulatömege 50 000-200 000 dalton. A dextránt a *Leuconostoc mesenteroides* és a *L. dextranicum* nevű baktérium termeli extracellulárisan, szacharóz táptalajon. Vízen jól oldódik. Elsősorban a gyógyászatban használják vérpótló anyagként. Az élelmiszeriparban fagyaltok, italok, édességek és sütőipari termékek adalékanyaga (sűrítő és stabilizátor) lehet.

A **cellulóz** a Földön legnagyobb mennyiségben képződő szerves vegyület. A magasabb rendű növények sejtfa főként cellulózból áll. A fa több mint 50%, a levelek 10-20%, a gyapot több mint 90% cellulózt tartalmaz.

Kémiai összetétel szempontjából a cellulóz nagyon hasonló a keményítőhöz. A cellulóz poliglükóz láncában az axiális helyzetű, β -1-4 típusú kötések lineáris, merev, H-hidakkal stabilizált láncot hoznak létre. Relatív molekulatömegük 160-1800 kDa között változik, ennek megfelelően polimerizációs fokuk 1000-14000 lehet. A cellulóz jóddal színreakciót nem ad.

A **pektin** a növényvilágban nagyon elterjedt poliszacharid. Egymással α -1-4 kötéssel kapcsolódó D-galakturonsav egységekből épül fel. A poligalakturonsav karboxilcsoportjainak egy része metanollal van észterezve. Molekulatömege általában 25 000-100 000, fajonként változik. Széles körben felhasználják az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban, ipari méretekben a citrusfélék és az alma héjából állítják elő.

1.6. A szénhidrátbontó enzimek (O-glikozidázok)

1.6.1. A szénhidrátbontó enzimek definíciója

Az O-glikozidázok vagy karbohidrázok O-glikozid szerkezetű szubsztrátumokat hidrolizálnak, az egyszerű cukrokból felépített összetett szénhidrátokat bontják a glikozidos kötéseknél.

1.6.2. A szénhidrátbontó enzimek csoportosítása

Oligoszacharázok

Oligoszacharidokat bontanak. A szubsztrátumban lévő glikozidos kötés téralkatától függően α vagy β görög betűvel is megjelöljük őket, mert specifikusak erre a tulajdonságra. A monoszacharidok nem cukorral képzett, megfelelő térállású más glikozidjait is hidrolizálják.

Poliszacharázok

Az összetett szénhidrátokat, a poliszacharidokat bontják. Egyes poliszacharázok nevében is találkozunk görög betűkkel, ezeknek azonban nincs köze a szubsztrátumok téralkatához.

1.6.3. Az enzimek aktivitása

Az enzimek működése számszerűen jellemezhető az átalakított anyagmennyiség, az ehhez szükséges idő és az enzim mennyiségének ismeretében.

Az enzimreakciók sebességét leggyakrabban az aktivitás értékkel jellemezzük. Egy enzim aktivitása alatt értjük az enzim által időegység alatt átalakított szubsztrát mennyiségét (μmol , nmol). Az enzim tisztaságának jellemzésére használjuk a specifikus aktivitást, ami egységnyi fehérje mennyiségre vonatkoztatott aktivitást jelenti.

$$\text{aktivitás} = \frac{\text{átalakított szubsztrát mennyisége}}{\text{idő}}$$

$$\text{specifikus aktivitás} = \frac{\text{átalakított szubsztrát mennyisége}}{\text{fehérjemennyiség} \cdot \text{idő}}$$

Homogén enzimek aktivitását a moláris aktivitás értékkel jellemezhetjük. Az átalakított szubsztrát és az enzim koncentrációját mólokban, az időt percben kifejezve az enzim átalakítási sebességére jellemző értéket kapunk. SI rendszerben az enzimaktivitást katalitikus egységekkel (katal) jellemezhetjük. A katal az az enzimmennyiség, amely 1 mol szubsztrát 1 másodperc alatti átalakításához szükséges.

$$1 \text{ katal} = 1 \text{ mol/sec}$$

A katal a legtöbb enzim esetén túl nagy egység, ezért a μkatal , nkatal értékek használatosak.

1.6.4. A gyakorlaton vizsgált enzim

α -amiláz (EC 3.2.1.1.)

Az amiláz elágazás nélküli molekulaláncát egymástól távol eső glikozidos kötéseknel, egy időben több helyen támadja meg. Az α -amiláz a szubsztárumait (amilóz, amilopektin, glikogén) teljes egészében elcukrosítja, tehát egyedül képes ezeknek a poliszacharidoknak a bontására, szemben a β -amilázzal, amely hidrolízistermékeinek nagy része lebontatlan határdextrin.

Az α -amiláz elsősorban állati szervekben és mikroorganizmusokban található (pankreász, vér, nyál, tojás illetve a *Bacillus* és *Aspergillus* fajok). A növényvilágban főként a csírázó magvakban (maláta) és burgonyában fordul elő.

Savérzékeny enzim. Erősebben savas pH-n (3,0-3,3) néhány perc alatt irreverzibilisen elveszti aktivitását. pH optimuma 5,0-7,0 között van, eredetétől függően. Magasabb hőmérsékleten, még 65-70 °C-on is jelentős ideig megtartja aktivitását. Aktiváló hatást a haloidionok, elsősorban kloridionok fejtenek ki az állati eredetű amilázokra.

2. Gyakorlati rész

2.1. Ismeretlen cukorminta azonosítása (egyéni feladat)

A hallgatók egy mintaszámmal ellátott kémcsőben ismeretlen szénhidrát mintát (lehet mono-, oligo- illetve poliszacharid is) kapnak, mely azonosítása az alábbi próbák elvégzésével lehetséges.

Védőszemüveg használata kötelező!

Szénhidrátok kimutatását szolgáló reakciók alapja

A hexózok és a pentózok jellegzetes reakciója, hogy savak hatására furánszármazékokat képeznek, amelyek fenollokkal jellegzetes színreakciót adnak. A reakciót tömény savas közegben végezve a poliszacharidok is reagálnak, mert sav hatására monoszacharidokká hidrolizálnak.

A monoszacharidok oxocsoportjuk révén redukáló tulajdonságúak, lúgos közegben az ezüst-, réz (II)-, és bizmutvegyületeket redukálják.

Rendelkezésre álló módszerek:

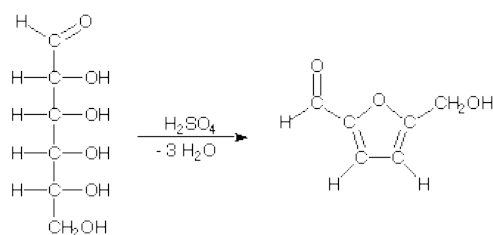
2.1.1. Oldási próba hideg és meleg vízzel

Hideg vízben oldhatók a mono- és az oligoszacharidok. Melegítés hatására egyes poliszacharidok feloldódnak (keményítő, pektin), mások viszont nem (cellulóz).

2.1.2. Molisch-reakció (α -naftol próba)

A szénhidrátok kimutatására gyakran alkalmazzuk a Molisch-reakciót, melyet minden szénhidrát ad.

A szénhidráttartalmú oldat 1 cm³-éhez 1-2 csepp alkoholos α -naftol oldatot adunk, majd óvatosan tömény kénsavat rétegzünk alá. Az érintkezés helyén ibolyaszínű gyűrű jelenik meg.



kondenzáció α -naftollal \rightarrow lila gyűrű

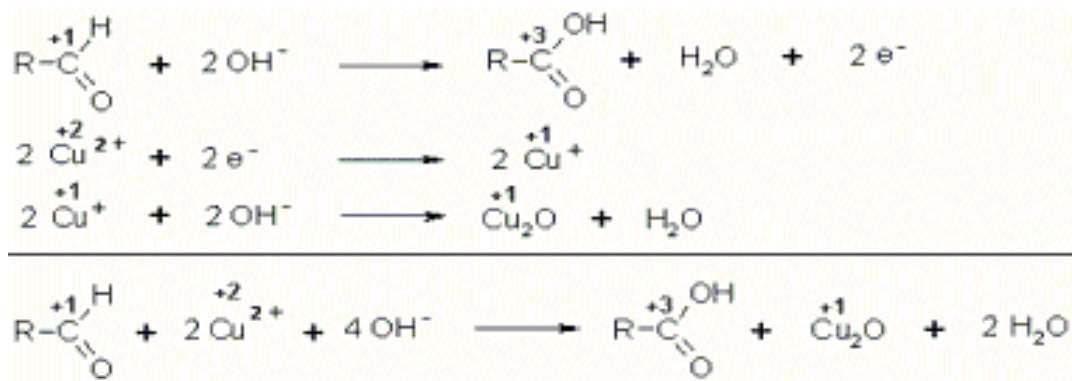
2.1.3. Fehling-reakció

Redukáló cukrok kimutatására használjuk. Szükséges oldatok:

-Fehling I. oldat: 35 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -et tartalmaz 500 cm^3 vízben.

-Fehling II. oldat: 175 g Seignette-sót (kálium-nátrium-tartarát) és 50 g NaOH-ot tartalmaz 500 cm^3 vízben.

Használat előtt a két oldat azonos térfogatait elegyítjük. A sötétkék oldatban a rézhidroxid kiválását a Seignette-só megakadályozza. Redukáló cukrok oldatát ezzel melegítve nemsokára sárgás, sárgászöld vagy sötétzöld színű réz(I)-oxid csapadék válik ki.



2.1.4. Rezorcín-sósav reakció

Segítségével megkülönböztethetők az aldózok és a ketózok.

A vizsgálandó oldathoz 1 cm^3 1 %-os alkoholos rezorcín oldatot 3 cm^3 tömény sósavat adunk, majd melegítjük. A ketózok oldata sötétpiros, az aldózoké legfeljebb enyhén rózsaszínű lehet. Ketózt tartalmazó poliszacharidok is adják e reakciót. Hosszabb hőkezelés esetén az aldózok is reagálnak.

2.1.5. Poliszacharidok kimutatása

Néhány poliszacharid jellegzetes színes komplexet képez jóddal. Az amilóz kék, az amilopektin ibolya, a dextrinek barnászöld, a glikogén barnászöld, a keményítő kékeslila színreakciót ad. A pektin (galakturonsav) oldatához tiszta etanol töltve géllépcsődés figyelhető meg.

2.1.6. Rétegekromatográfiás elválasztás

Jól alkalmazható módszer az egyes cukorminták azonosítására. A mintákat standardok mellett futtatjuk és kapott foltok helye és színe alapján állapítjuk meg az ismeretlen minták típusát.

A réteglapon lévő startvonalra mikrofecskendővel 1 cm-ként visszük fel a mintákat illetve a kiválasztott standardek (2-2 μ l) vigyázva, hogy ne karcoljuk össze a lapot. A mintákat rászárítjuk a réteglapra (1 perc 105°C). A futtatószeret (butanol-aceton-víz = 4:5:1 arányú elegye) a futtató kádba töltjük és alaposan összerázzuk, hogy a gőztér is telítődjön az eluenssel. Ezután a réteglapot a kádba helyezzük, majd a futtatást addig végezzük, amíg az eluensfront a lap tetejét 1 cm-re meg nem közelíti. A lapot kivesszük, levegőn megszáritjuk, majd difenilamin-anilin-foszforsav előhívóval (difenilamin és anilin 4 %-os alkoholos oldatát 1:1 arányban elegyítjük és annyi cc. H_3PO_4 -at adunk hozzá, hogy a keletkező csapadék feloldódjon) bepermetezzük. A réteglapot ezután pár percre 105 °C-os szárítószekrénybe helyezzük. A hő hatására az egyes cukrokra jellemző színes foltok jelennek meg a réteglapon.

2.1.7. Beadandó

- célkitűzés
- mintaszám
- mi volt a minta
- elvégzett reakciók (magyarázattal, vagyis: mi a reakció alapja)
- tapasztalatok, következtetések
- a rétegekromatográfiás vizsgálat körülményei (felvitt minta mennyisége, felvitel módja, futtatás és előhívás körülményei), eredménye (minták színe, megtett útja, eluens megtett útja, retenciós faktor számítása), az adott minta azonosítása a standard és a minta foltjának színe, alakja és a két R_f érték összehasonlításával.

2.2. Szénhidrátbontó enzim: az α -amiláz aktivitásának meghatározása

Az α -amiláz enzim aktivitását határozzuk meg, amely az emberi nyál alkotórésze. Mindenki a saját nyálának aktivitását méri meg. A nyálat egy mért tömegű 50 cm³-es főzőpohárba gyűjtjük, 5 perc időtartamig és a pohár ismételt lemérésével megállapítjuk a nyál tömegét és 1 cm³ 6-os pH-jú foszfát puffer hozzáadása után 10 g-ra egészítjük ki. Az így előkészített nyál-oldatot használjuk fel az amiláz aktivitás meghatározására.

A meghatározás elve:

Az amiláz tartalmú oldatból hígítási sort készítünk, majd mindegyikhez adott mennyiségű keményítő oldatot adunk. Termosztátban adott idejű inkubáció után jóreakcióval megállapítjuk, hogy melyik hígításnál bontotta már teljesen le az α -amiláz a keményítőt.

A meghatározás menete:

Szubsztrát oldat elkészítése: 100 cm³ hideg desztillált víz kb. negyedében 0,5 g keményítőt szuszpendálunk. A többi vizet forrásig melegítjük 1-2 szem forrkő hozzáadása után és a keményítősuszpenziót kis adagokban hozzáadva, mindig megvárva az oldat kitisztulását.

Aktivitás mérése:

- 8 db számozott kémcsőbe 1-1 cm³ desztillált vizet mérünk.
- Az első kémcsőbe 1 cm³ amiláz tartalmú oldatot adunk, összerázzuk és 1 cm³-t átviszünk a következő kémcsőbe. Ezt minden kémcsővel megismételjük, így olyan hígítási sort kapunk, ahol az előző kémcsőben kétszer töményebb az oldat, mint az utána következőben. A 8. kémcsőből az 1 ml-t a lefolyóba öntjük.
- Hozzáadunk minden kémcsőhöz 1 cm³ szubsztrát oldatot és összerázás után azonnal az 50 °C hőmérsékletű termosztátba helyezük 15 percre.
- A termosztátból kivett csöveket a reakció leállítására egy előre elkészített jeges-vizes vízfürdőbe helyezük és kb. 5 percig hűtjük.
- A kémcsöveket a számozásnak megfelelő sorrendbe állítva 0,1 cm³ 0,01M jóddoldatot adunk és összerázzuk. Ahol a folyadék színe kék, ott a keményítő csak részben hidrolizált. A színtelen vagy sárgás színűekben a keményítő hidrolizált, a vörös vagy barna szín dextriinek jelenlétére mutat. A keményítő hidrolízise abban a kémcsőben megfelelő, ahol a kék árnyalat eltűnik.

Enzimaktivitás számítása:

A számításhoz vegyük alapul, hogy az α -amiláz két glükóz egység közötti kötést bont. A következő egyszerűsítésekkel élünk:

1. a keményítőt egyetlen láncmolekulának feltételezve a kötések száma megegyezik a glükóz egységek számával
2. Teljes lebontáskor feltételezzük, hogy az összes kötés elbomlik.
A keményítő keletkezésekor víz távozik, az így a keményítő általános képlete: $(C_6H_{10}O_5)_n$, tehát a keményítőt alkotó glükózegység tömege
M (glükóz egység) = 162 g/mol.

Enzimaktivitás = átalakított szubsztrát mennyisége / idő

$$Enzimakt = \frac{m_{keményítő}}{M_{glükózegység} \cdot t_{inkubálás}} \quad \left[\frac{g}{g/mol} \cdot \frac{1}{s} = \frac{mol}{s} = katal \right]$$

Fajlagos aktivitás = enzim aktivitás / nyál mennyiség

$$Fajl. enzimakt. = \frac{Enzimakt}{nyál menny.} \quad \left[\frac{katal}{g} \right]$$

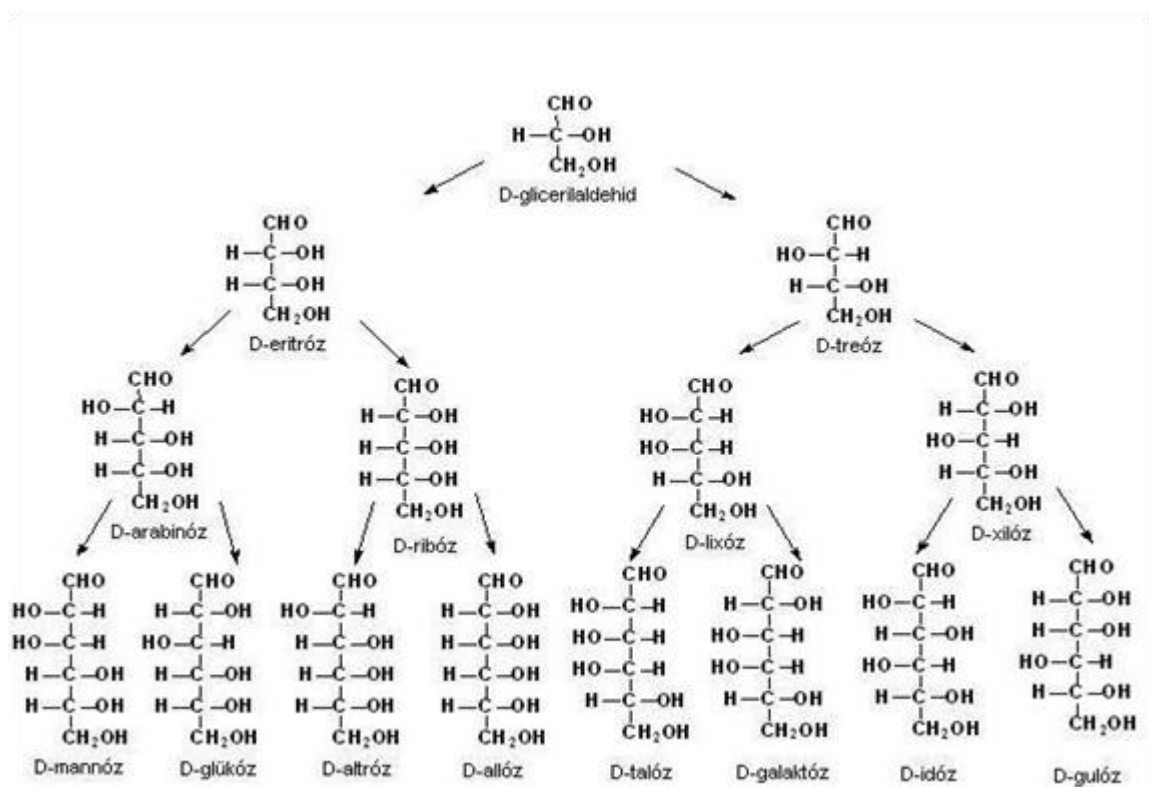
Beadandó

- Nyál bemérési tömege
- Részletes számítás
- Enzimaktivitás és fajlagos enzimaktivitás
(Az eredmények számértékét normálalakban adják meg.)

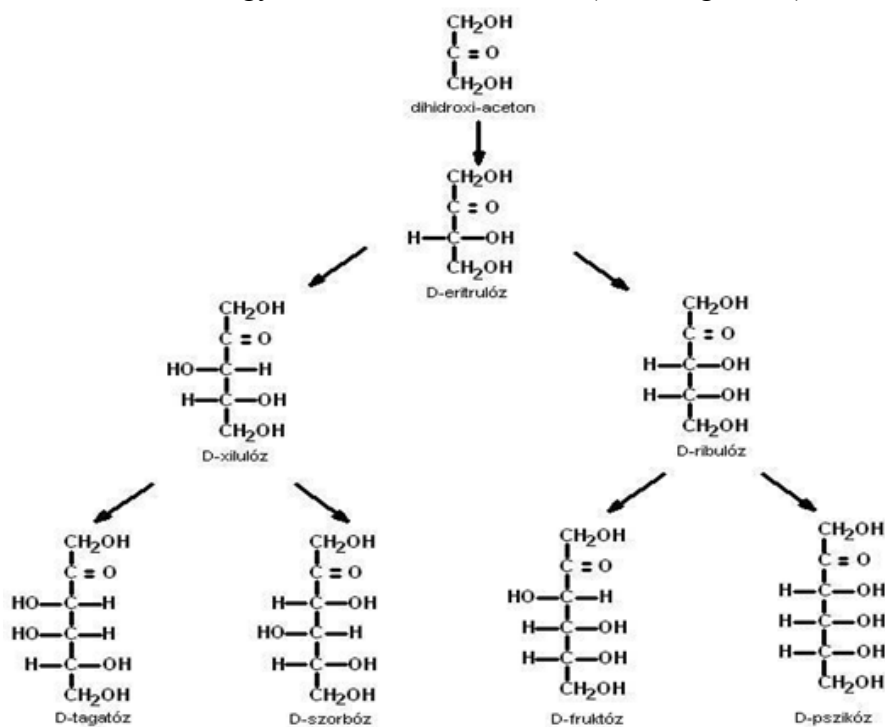
3. Felkészülést segítő kérdések

1. Milyen (a gyakorlaton is használt) módszerrel lehet egy ismeretlen anyagról eldönteni, hogy az szénhidrát-e vagy sem? Mi a reakció alapja? Hogyan kell végrehajtani a próbát?
2. Milyen (a gyakorlaton is használt) módszerrel lehet a vizsgált cukorról eldönteni, hogy az aldóz vagy ketóz? Mi a reakció alapja? Hogyan kell végrehajtani a próbát?
3. Milyen reakciókat ismer a poliszacharidok azonosítására?
4. Mi a Fehling reakció lényege és hogyan használható redukáló szénhidrátok mennyiségi analizésére?

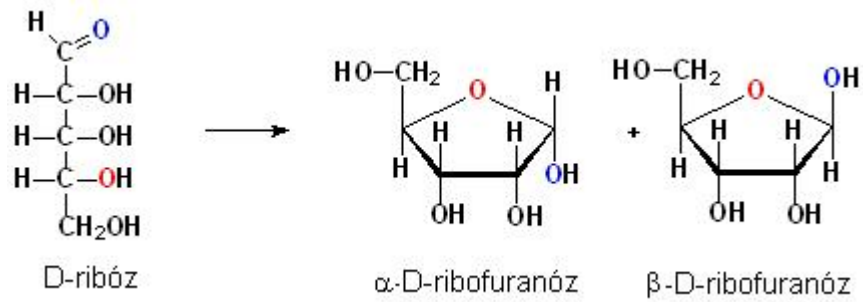
4. Mellékletek



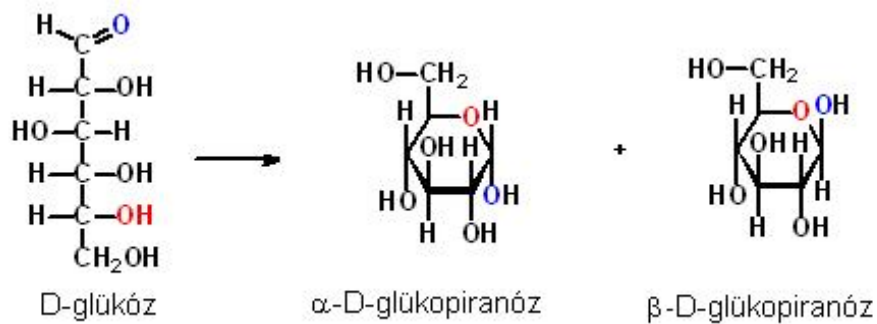
4/1. ábra: Egyszerű cukrok szerkezete (D-konfiguráció)



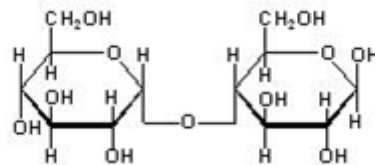
4/2. ábra: Egyszerű cukrok szerkezete (D-konfiguráció)



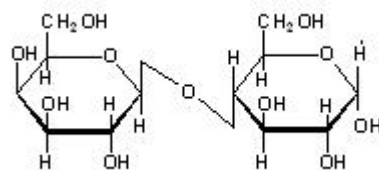
4/3. ábra: furanóz gyűrű



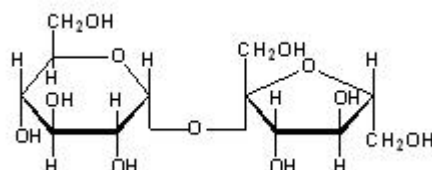
4/4. ábra: piranoz gyűrű



4/5. ábra: maltóz: O- α -D-glükopiranozil-(1-4)-D-glükopiranoz



4/6. ábra: laktóz: O- β -D-galaktopiranozil-(1-4)- α -D-glükopiranoz



4/7. ábra: szacharóz: O- α -D-glükopiranozil-(1-2)- β -D-fruktofuranozid