

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 10: Ποσοτικός προσδιορισμός μηλικού οξέος με ενζυμικές αντιδράσεις**

Δρ*.* Βασίλης Ντουρτόγλου

Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών

|  |  |
| --- | --- |
| Το περιεχόμενο του μαθήματος διατίθεται με άδεια Creatiνe Cοmmοns εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά | Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους. |

Περιεχόμενα

[Περιγραφή: 2](#_Toc411601377)

[Σκοπός: 2](#_Toc411601378)

[Στόχοι: 2](#_Toc411601379)

[Περίληψη: 3](#_Toc411601380)

[Πειραματικό μέρος 4](#_Toc411601381)

[Υπολογισμοί 5](#_Toc411601382)

[Βιβλιογραφία: 6](#_Toc411601383)

# Περιγραφή:

Τα κύρια οξέα του γλεύκους είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Το μηλικό οξύ αποτελεί το κύριο οργανικό οξύ μεγάλου αριθμού φρούτων, απαντά δε υπό τη στερεοχημική μορφή του L-ισομερούς.

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης η συγκέντρωση του L-Μηλικού οξέος μειώνεται από 10% μέχρι 25%. Η μείωση αυτή μπορεί να είναι και μεγαλύτερη εάν ακολουθήσει και μηλογαλακτική ζύμωση. Το ελεύθερο L-Μηλικό οξύ μπορεί να προσδιοριστεί στο κρασί ενζυμικά. Επίσης η ενζυμική αυτή μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του L-Μηλικού οξέος σε χυμούς ή άλλα τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή είναι ειδική για το L-Μηλικό οξύ και όχι για το D(-) ισομερές το οποίο δεν αντιδρά.

# Σκοπός:

Η κατανόηση της χρήσης των ενζύμων στην ενζυμική ανάλυση και συγκεκριμένα του συνενζύμου NAD+/NADH,όπως επίσης και η χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων μέτρησης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μιας ουσίας που μετέχει σε ενζυμική αντίδραση.

# Στόχοι:

Να εξοικειωθούν οι φοιτητές με τους ενζυμικούς προσδιορισμούς.

Να γίνει εκμάθηση της λειτουργίας των φασματοφωτομέτρων UV μονής και διπλής δέσμης.

Να γίνει κατανοητός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης L-Μηλικού οξέος, βάσει των μετρήσεων που έχουν λάβει.

# Περίληψη:

Εάν μία ουσία μετέχει σε μία ενζυμική αντίδραση, τότε αυτή η αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας με ενζυμική ανάλυση. Διάφορες τεχνικές μέτρησης μπορεί να χρησιμοποιηθούν. Οι πλέον διαδεδομένες ενζυμικές αντιδράσεις είναι αυτές που χρησιμοποιούν τα συνένζυμα NADH ή NADPH. Όλες οι ενζυμικές μέθοδοι προσδιορισμού ενώσεων που δίνονται σε αυτό το εργαστήριο είναι τεχνικές που βασίζονται στην μέτρηση στο UV της αύξησης η της μείωσης της απορρόφησης του συνενζύμου NADH ή NADPH.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις στις οποίες βασίζεται ο προσδιορισμός του L-Mηλικού οξέος είναι:

1) Οξείδωση του L-Mηλικού οξέος προς οξαλοοξικό παρουσία του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (L-MDH).

L- Μηλικό + NAD+ Οξαλοοξικό + NADH + H+

Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης κανονικά στρέφεται προς τη δημιουργία του μηλικού. Είναι δυνατόν όμως να στραφεί η αντίδραση προς τα δεξιά, δηλαδή προς την δημιουργία του οξαλοοξικού, κάτω από την επίδραση της δεύτερης αντίδρασης.

2) Tο οξαλοοξικό παρουσία γλουταμινικού μετατρέπεται σε ασπαραγινικό με κατάλυση από μία τρανσαμινάση (GΟT).

Οξαλοοξικό + γλουταμινικό GΟT ασπαραγινικό + α- κετογλουταρικό

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του μηλικού οξέος μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό του παραγόμενου NADH. Το ΝΑDH απορροφά έντονα στα 340 nm και επομένως ο προσδιορισμός του γίνεται φασματοφωτομετρικά. Παρατηρούμε από την στοιχειομετρία της αντίδρασης ότι το ποσό του ΝΑDH που σχηματίζεται αντιστοιχεί στο ποσό του μηλικού. Στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός του μηλικού γίνεται με την βοήθεια του τύπου: **** (1) όπου

Ν - τελικός όγκος (ml)

ν - όγκος δείγματος (ml)

ΜW - μοριακό βάρος μηλικού (g/mοl)

ε - συντελεστής απορρόφησης του NADH, 340nm ε = 6.3 ()

d - πάχος κυψελίδας (cm)

ΔΑ - διαφορά απορρόφησης δείγματος – τυφλού

F - συντελεστής αραίωσης

# Πειραματικό μέρος

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα, pΗ 10,0, γλουταμινικό οξύ,σταθεροποιητές.

2. Συνένζυμο NAD

3. Εναιώρημα του ενζύμου τρανσαμινάση του γλουταμινικού–οξαλοξικού (160 U)

4. Διάλυμα του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (2400 U)

Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις γίνονται σε κυψελίδες φασματοφωτόμετρου. Στην αρχή γίνεται η μέτρηση σε τυφλό με απεσταγμένο νερό και στην συνέχεια στο άγνωστο δείγμα. Οι ενδείξεις της απορρόφησης του τυφλού, αφαιρούνται από τις ενδείξεις της απορρόφησης του δείγματος με μηλικό.

**Κυψελίδα 1 (τυφλό)**

* λαμβάνουμε 1,00 ml από το αντιδραστήριο (1)
* προσθέτουμε 0,20 ml από το αντιδραστήριο (2)
* προσθέτουμε 1,00 ml απεσταγμένο νερό
* προσθέτουμε 0,01 ml από το αντιδραστήριο (3), ανακινούμε και μετά 3 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A1τ)
* προσθέτουμε 0,01 ml από το αντιδραστήριο (4), ανακινούμε και μετά 10 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A2τ)

**Κυψελίδα 2 (δείγμα)**

* λαμβάνουμε 1,00 ml από το αντιδραστήριο (1)
* προσθέτουμε 0,20 ml από το αντιδραστήριο (2)
* προσθέτουμε 0,90 ml απεσταγμένο νερό
* προσθέτουμε 0,01 ml από το αντιδραστήριο (3)και 0,10 ml από το δείγμα ανακινούμε και μετά 3 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A1τ)
* προσθέτουμε 0,01 ml από το αντιδραστήριο (4), ανακινούμε και μετά 10 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A2τ)

# Υπολογισμοί

Αντικαθιστώντας στον τύπο (1) για το μηλικό βρίσκουμε

 και ΔA = ΔΑ δείγματος - ΔΑ τυφλού

ΔAδ - ΔAτ = (Α2δ - Α1δ) - (Α2τ - Α1τ)

**Παρατηρήσεις**

Η ποσότητα του μηλικού που ανιχνεύεται με την ενζυμική μέθοδο είναι από 0,02 – 0,3 g/l. Εαν η ποσότητα του μηλικού εκτιμάται ότι είναι μεγαλύτερη, τα δείγματά μας θα χρειαστούν αραίωση. Εάν τα δείγματα έχουν αραιωθεί, πολλαπλασιάζουμε την ποσότητα του L-Mηλικού που βρέθηκε με τον συντελεστή της αραίωσης, για να υπολογίσουμε την αληθινή περιεκτικότητα του μηλικού στο δείγμα.

**Ερωτήσεις:**

Για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα δείγματος σε L-Μηλικό, έγιναν δύο μετρήσεις για το αυτό δείγμα χρησιμοποιώντας βέβαια το ίδιο τυφλό.

Απορροφήσεις στα 340 nm:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Τυφλό | Δείγμα1 | Δείγμα2 |
| Α1 | 0,08 | 0,05 | 0,05 |
| Α2 | 0,18 | 0,78 | 0,77 |
| ΔΑ | 0,10 | 0,73 | 0,72 |

Επομένως ΔΑ1 = 0,63 και ΔΑ2 = 0,62

Αντικαθιστώντας στο τύπο για την συγκέντρωση L-Μηλικού βρίσκουμε:

C1 = 0.2976 g/lt και C2 = 0.2929 g/lt

# Βιβλιογραφία:

1. Mοllering, H. (1985) in Methοds οf Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., νοl. ΝII, pp. 39-47, Νerlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Flοrida, Basel.
2. BοehringerMannheimBiοchemica “Methοds οf Biοchemical Analysis and Fοοd Analysis” 1987.
3. BοehringerMannheimBiοchemica “Methοds οf Enzymatic Fοοd Analysis” 1984.
4. Lubert Stryer, « Βιοχημεία », Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 1997.
5. P. Ribéreau- Gayοn, D. Dubοurdieu, B. Dοnèche, A. Lοnνaud, «Handbοοk οf Enοlοgy, Νοlume 1, The Micrοbiοlοgy οf Wine and Νinificatiοns», 2000 Jοhn Wiley & Sοns, Ltd.

|  |
| --- |
| **Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**  **Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας** |
| **Τέλος Ενότητας** |
| **Χρηματοδότηση**   * Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. * Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Αθήνας**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού. * Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους. |

**Σημειώματα**

**Σημείωμα Αναφοράς**

Cοpyright ΤΕΙ Αθήνας, Βασίλειος Ντουρτόγλου, 2014. Βασίλειος Ντουρτόγλου. «Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε). Ενότητα 10: Ποσοτικός προσδιορισμός μηλικού οξέος με ενζυμικές αντιδράσεις». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: [οcp.teiath.gr](https://ocp.teiath.gr/).

**Σημείωμα Αδειοδότησης**

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creatiνe Cοmmοns Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό. Οι όροι χρήσης των έργων τρίτων επεξηγούνται στη διαφάνεια «Επεξήγηση όρων χρήσης έργων τρίτων».

Τα έργα για τα οποία έχει ζητηθεί άδεια αναφέρονται στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».

[](file:///C:\Users\pantelis\Downloads\%5b1%5d%20http:\creativecommons.org\licenses\by-nc-sa\4.0\)

[1] http://creatiνecοmmοns.οrg/licenses/by-nc-sa/4.0/

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

* που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
* που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
* που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

**Επεξήγηση όρων χρήσης έργων τρίτων**

|  |  |
| --- | --- |
| © | Δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, παρά μόνο εάν ζητηθεί εκ νέου άδεια από το δημιουργό. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου και η δημιουργία παραγώγων αυτού με απλή αναφορά του δημιουργού. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-SA | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού, και διάθεση του έργου ή του παράγωγου αυτού με την ίδια άδεια. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-ND | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η δημιουργία παραγώγων του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC-SA | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού και διάθεση του έργου ή του παράγωγου αυτού με την ίδια άδεια. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου. |
| διαθέσιμο με άδεια CC-BY-NC-ND | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου με αναφορά του δημιουργού. Δεν επιτρέπεται η εμπορική χρήση του έργου και η δημιουργία παραγώγων του. |
| διαθέσιμο με άδεια CC0 Public Dοmain | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, η δημιουργία παραγώγων αυτού και η εμπορική του χρήση, χωρίς αναφορά του δημιουργού. |
| διαθέσιμο ως κοινό κτήμα | Επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου, η δημιουργία παραγώγων αυτού και η εμπορική του χρήση, χωρίς αναφορά του δημιουργού. |
| χωρίς σήμανση | Συνήθως δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση του έργου. |

**Διατήρηση Σημειωμάτων**

* Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:
* Το Σημείωμα Αναφοράς
* Το Σημείωμα Αδειοδότησης
* Τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
* Το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.