

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 3: Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκερίνης 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](#_Toc411582431)

[Σκοπός: 2](#_Toc411582432)

[Στόχοι: 2](#_Toc411582433)

[Περίληψη: 3](#_Toc411582434)

[Πειραματικό μέρος 4](#_Toc411582435)

[Αποτελέσματα - Υπολογισμοί 5](#_Toc411582436)

[Παράδειγμα 6](#_Toc411582437)

[Βιβλιογραφία 6](#_Toc411582438)

# Περιγραφή:

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερίνης με χρήση ενζυμικών αντιδράσεων με εφαρμογή στα τρόφιμα και ποτά.

Ως γνωστόν η γλυκερίνη αποτελεί παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και επομένως μπορεί να βρεθεί σε μικρές ποσότητες στα κρασιά.

Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της γλυκερίνης στα διάφορα καλλυντικά, στα οποία συναντάται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

# Σκοπός:

Η κατανόηση της χρήσης των ενζύμων στην ενζυμική ανάλυση και του ρόλου του συνενζύμου NAD(P) / NAD(P)H για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μιας ουσίας που μετέχει σε ενζυμική αντίδραση.

# Στόχοι:

Να εξοικειωθούν οι φοιτητές με τους ενζυμικούς προσδιορισμούς.

Να εξοικειωθούν με τη λειτουργία των φασματοφωτομέτρων UV μονής και διπλής δέσμης.

Να γίνει κατανοητός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γλυκερίνης αγνώστου δείγματος, βάσει των μετρήσεων που έχουν λάβει.

# Περίληψη:

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται και αυτή (όπως οι αντίστοιχες για τον ποσοτικό προσδιορισμό αιθανόλης, γλυκόζης, φρουκτόζης) σε ενζυμικές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο μας επιτρέπει προσδιορισμό πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκερίνης.

Η σειρά των εν λόγω ενζυμικών αντιδράσεων έχει ως εξής:

Η υπάρχουσα στο δείγμα γλυκερίνη παρουσία τού ενζύμου γλυκερινοκινάση (GK), αντιδρά με ένα μόριο ΑΤΡ και φωσφορυλιώνεται προς 3-φωσφορική γλυκερίνη και ADP σύμφωνα με την αντίδραση (1)

GK

(1) Γλυκερίνη + ATP 3-Φωσφορική γλυκερίνη + ADP

Το παραγόμενο από την αντίδραση (1) ΑDP παρουσία φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέως (PEP) και ενζύμου πυροσταφυλικής κινάσης (PK), μετατρέπεται σε ΑΤΡ και πυροσταφυλικό όπως στην αντίδραση (2 )

PK

(2) ADP + PEP ATP + Πυροσταφυλικό

Τέλος το παραγόμενο πυροσταφυλικό οξύ, παρουσία τού ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH) και συνενζύμου NADH σχηματίζει L-γαλακτικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση (3)

L-LDH

(3) Πυροσταφυλικό + NADH + H+ L- Γαλακτικό οξυ + NAD+

Παρατηρούμε ότι το ποσό του NADH που οξειδώνεται κατά την αντίδραση (3), αντιστοιχεί στοιχειομετρικά στο ποσό του σχηματιζόμενου από την αντίδραση (2) πυροσταφυλικού και επομένως αντιπροσωπεύει το ποσό της γλυκερίνης στο δείγμα.

Μετρώντας την απορρόφηση του NADH στα 340nm (όπου ως γνωστόν απορροφά έντονα) και εφαρμόζοντας γνωστούς τύπους της φασματοφωτομετρίας, προσδιορίζουμε έμμεσα την γλυκερίνη.

Συγκεκριμένα εφαρμόζεται τύπος:

 (1)

όπου:

**Ν** - τελικός όγκος (ml)

**ν** - όγκος δείγματος (ml)

**ΜW** - μοριακό βάρος γλυκερίνης (g/mοl)

**ε** - συντελεστής απορρόφησης του NADH 340nm ε = 6,3 ()

**d** - πάχος κυψελίδας (cm)

**ΔΑ** - διαφορά απορρόφησης δείγματος – τυφλού

**F** - συντελεστής αραίωσης

Τα όρια προσδιορισμού είναι 0.03 - 0.4 g/lt.

Aν τα αποτελέσματα είναι εκτός των ανωτέρω ορίων γίνονται κατάλληλες αραιώσεις.

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

ΑΠΑIΤΟΥΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΤIΔΡΑΣΤΗΡIΑ

1. Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους
2. Κυψελίδες από χαλαζία
3. Eνζυμικά ΚIΤ για προσδιορισμό γλυκερίνης
4. Σιφώνια των 1 και 2 ml
5. Μικροπιπέτες των 10 μl
6. Χρονόμετρο

Τα μπουκάλια του ΚIΤ για προσδιορισμό γλυκερίνης περιέχουν:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα pΗ 7.4 , NADH, ATP, PEP, MgSΟ4 και σταθεροποιητές.
2. Διάλυμα ενζύμων: ΡΚ (240 U), L-LDH (220 U).
3. Διάλυμα ενζύμου GK (34 U).

Όλες οι αναφερόμενες στο θεωρητικό μέρος αντιδράσεις γίνονται σε κυψελίδες φασματοφωτόμετρου και μετρώνται οι απορροφήσεις στα 340nm.

Μετρώνται οι απορροφήσεις σε τυφλό (με απεσταγμένο νερό) και στο δείγμα.

Ακολουθείται η παρακάτω πορεία:

**Κυψελίδα τυφλού**

Προσθέτουμε 1,00 ml από το αντιδραστήριο (1)

Προσθέτουμε 2,00 ml δις απεσταγμένο νερό

Προσθέτουμε 0,010 ml από το αντιδραστήριο (2)

Αναδεύουμε και μετά 5 min μετρούμε την απορρόφηση (Α1τ)

Προσθέτουμε 0,010 ml από το αντιδραστήριο (3)

Αναδεύουμε και μετά 5-10 min μετρούμε την απορρόφηση (Α2τ)

**Κυψελίδα δείγματος**

Προσθέτουμε 1,00 ml από το αντιδραστήριο (1)

Προσθέτουμε 1,90 ml δις απεσταγμένο νερό

Προσθέτουμε 0,100 ml δείγματος

Προσθέτουμε 0,010 ml από το αντιδραστήριο (2)

Αναδεύουμε και μετά 5 min μετρούμε την απορρόφηση (Α1δ) [αντιδράσεις (2), (3)]

Προσθέτουμε 0,010 ml από το αντιδραστήριο (3)

Αναδεύουμε και μετά 5-10min μετρούμε την απορρόφηση (Α2δ) [αντίδραση (1) και ακολούθως (2), (3)]

Προσθέτουμε πρώτα το αντιδραστήριο (2) και κατόπιν το (3) με σκοπό να μετασχηματίσουμε το πυροσταφυλικό που πιθανά υπάρχει στο δείγμα και να μην υπολογίσουμε και αυτό σαν γλυκερίνη.

|  |
| --- |
| Αποτελέσματα - Υπολογισμοί |

Αντικαθιστώντας στη σχέση (1) βρίσκουμε ότι για την γλυκερίνη ισχύει:



Αφού μετρήσουμε τις απορροφήσεις υπολογίζουμε το ΔA από την σχέση:

ΔA = ΔAδ-ΔΑτ = (Α1δ – Α2δ) - (Α1τ – Α2τ)

# Παράδειγμα

Σε ένα άγνωστο δείγμα κρασιού προσδιορίζεται ενζυμικά η γλυκερίνη

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων στο δείγμα και το τυφλό είχαν ως εξής:

**Τυφλό**  **Δείγμα**

Α1τ 1,50 Α1δ 1,30

Α2τ 1,43 Α2δ 0,34

επομένως ΔA= (1,30 – 0,34) - (1,50 – 1,43) ⇒ ΔA = 0,96 – 0,07 ⇒ ΔA = 0,89

οπότε αντικαθιστώντας στον τύπο υπολογίζουμε την ποσότητα της γλυκερίνης

**C γλυκερίνης = 0,3928 g/l**

# Βιβλιογραφία

1. Ι. Γ. Γεωργάτσου, Τ. Α. Γιουψάνη, Δ.Α. Κυριακίδη, «Ενζυμολογία »

Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2001

1. BοehringerMannheimBiοchemica “Methοds οf Biοchemical Analysis and Fοοd Analysis” 1987
2. Eggstein, M. & Kuhlmann, E. (1974) in Methοds οf Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., νοl. 4, pp. 1825-1831; Νerlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New Yοrk and Lοndοn.

|  |
| --- |
| **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 3: Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκερίνης 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.