

**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα**

**Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας**

Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε)

**Ενότητα 1: Προσδιορισμός της αιθανόλης με ενζυμικές αντιδράσεις**

Δρ*.* Βασίλης Ντουρτόγλου

Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών

|  |  |
| --- | --- |
| Το περιεχόμενο του μαθήματος διατίθεται με άδεια Creatiνe Commons 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](#_Toc411522520)

[Σκοπός: 2](#_Toc411522521)

[Στόχοι: 2](#_Toc411522522)

[Περίληψη: 3](#_Toc411522523)

[Πειραματικό μέρος 5](#_Toc411522524)

[Αποτελέσματα – Υπολογισμοί 6](#_Toc411522525)

[Βιβλιογραφία 7](#_Toc411522526)

# Περιγραφή:

Η ανίχνευση της αιθανόλης στα τρόφιμα και διάφορα ποτά, γίνεται σήμερα με μία σύγχρονη μέθοδο που βασίζεται σε δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές είναι γνωστές στην αλκοολική ζύμωση. Η πρώτη αντίδραση της οξείδωσης της αιθανόλης πρoς ακεταλδεϋδη, πραγματοποιείται παρουσία του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και η οξείδωση της ακεταλδεϋδης σε oξικό οξύ παρουσία του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρoγoνάση (Al-DH).

# 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 τη χρήση των ενζυμικών ΚΙΤ.

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

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

# Περίληψη:

Εάν μία ουσία μετέχει σε μία ενζυμική αντίδραση, αυτή η αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας με ενζυμική ανάλυση. Διάφορες τεχνικές μέτρησης μπορεί να χρησιμοποιηθούν. Η τεχνική φυσικά δεν επηρεάζει τις αρχές της ενζυμικής ανάλυσης. 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 της αιθανόλης είναι οι εξής:

α) Οξείδωση αιθανόλης προς ακεταλδεΰδη παρουσία του ενζύμου αλκοολική αφυδρoγoνάση (ΑDH).

CH3CH2OH + NAD+ CH3CHO + NADH + H+

Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης κανονικά στρέφεται προς τη δημιουργία της αιθανόλης. Είναι δυνατόν όμως να στραφεί η αντίδραση προς τα δεξιά, δηλαδή προς την δημιουργία της ακεταλδεΰδης όταν το περιβάλλον είναι αλκαλικό και αυτό κάτω από την επίδραση της δεύτερης αντίδρασης που είναι η οξείδωση της αλδεΰδης προς οξικό οξύ.

β) Οξείδωση ακεταλδεΰδης σε οξικό οξύ παρουσία του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρoγoνάση (Al-DH).

CH3CHO + NAD+ + H2Ο Al-DH CH3CΟOH + NADH + H+

Όπως βλέπουμε και στις δύο αντιδράσεις, o αποδέκτης υδρογόνων κατά την οξείδωση της αιθανόλης και της ακεταλδεΰδης είναι το NAD+, που και στις δύο περιπτώσεις ανάγεται προς ΝΑDH + H+.

Παρατηρούμε ότι η οξείδωση 1 mole αιθανόλης αντιστοιχεί στην αναγωγή 2 mole NAD+. Επομένως o ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό του παραγόμενου NADH. Το ΝΑDH απορροφά έντονα στα 340 nm και επομένως o προσδιορισμός του γίνεται φασματοφωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση στα 340 nm. Στη συνέχεια o ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης γίνεται με την βοήθεια του παρακάτω τύπου:

 (1)

όπου:

Ν - τελικός όγκος (ml)

ν - όγκος δείγματος (ml)

ΜW - μοριακό βάρος αιθανόλης (g/mol)

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

d - πάχος κυψελίδας (cm)

ΔΑ - διαφορά απορρόφησης δείγματος – τυφλού

F - συντελεστής αραίωσης

|  |
| --- |
| Πειραματικό μέρος |

ΑΠΑIΤΟΥΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΤIΔΡΑΣΤΗΡIΑ

1. Φασματοφωτόμετρo υπεριώδoυς
2. Κυψελίδες από χαλαζία
3. ΚIΤ για προσδιορισμό αιθανόλης
4. Σιφώνια των 1 και 2 ml
5. Μικρoπιπέτες των 500 και 100 μl
6. Χρονόμετρο

Τα μπουκάλια του ΚIΤ περιέχουν:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ΚΗ2ΡΟ4 / Κ2ΗΡΟ4 , pΗ 9,0
2. Δισκία που περιέχουν NAD (4 mg), AL-DH και σταθεροποιητές.
3. ADH (7000 U) και σταθερoπoιητές.

Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις γίνονται σε κυψελίδες φασματοφωτόμετρoυ. Στην αρχή γίνεται η μέτρηση σε τυφλό με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια στο άγνωστο δείγμα. Οι ενδείξεις της απορρόφησης του τυφλού αφαιρούνται από τις ενδείξεις της απορρόφησης του δείγματος με αιθανόλη.

Ακoλoυθoύμε την παρακάτω σειρά:

**Κυψελίδα 1 (τυφλό)** κατά σειρά εκτελούμε τα εξής:

* τοποθετούμε 3,0 ml από το αντιδραστήριο (1), (2) \*
* τοποθετούμε 0,1 ml απεσταγμένo νερό ανακινούμε και μετά 3 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A1τ)
* τοποθετούμε 0,05 ml από το αντιδραστήριο (3) ανακινούμε και μετά 10min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A2τ)

**Κυψελίδα 2 (δείγμα)** κατά σειρά εκτελούμε τα εξής:

* τοποθετούμε 3,0 ml από το αντιδραστήριο (1), (2)
* τοποθετούμε 0,1 ml δείγμα, ανακινούμε και μετά 3 min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A1δ)
* τοποθετούμε 0,05 ml από το αντιδραστήριο (3), ανακινούμε και μετά 10min μετρούμε την απορρόφηση στα 340 nm (A2δ)

\* Όπου το αντιδραστήριο (1) είναι το ρυθμιστικό διάλυμα ΚΗ2ΡΟ4 / Κ2ΗΡΟ4,

pΗ 9,0 και το (2) είναι δισκία που περιέχουν NAD, AL-DH και σταθεροποιητές. Διαλύουμε ένα δισκίο από αυτά σε 3,0 ml αντιδραστηρίου (1).

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

Για την αιθανόλη ισχύει:



Όπου ΔA = ΔΑ δείγματος - ΔΑ τυφλού

ΔAδ - ΔAτ = (Α2δ - Α1δ) - (Α2τ - Α1τ)

Γίνονται δύο μετρήσεις για το αυτό δείγμα χρησιμοποιώντας βέβαια το ίδιο τυφλό.

Τα των μετρήσεων έχουν ως εξής:

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕIΣ**

Η ποσότητα της αιθανόλης που ανιχνεύεται με την ενζυματική μέθοδο είναι από 0,5μg - 6μg. Γι' αυτό το λόγο τα δείγματά μας ίσως χρειαστούν αραίωση. Τον συντελεστή της αραίωσης τον πολλαπλασιάζουμε με την ποσότητα της αιθανόλης που βρέθηκε βάσει του τύπου για να υπολογίσουμε την αληθινή περιεκτικότητα της αιθανόλης στο δείγμα.

**ΠΑΡΑΔΕIΓΜΑ**

Για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα δείγματος σε αιθανόλη, 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 | 0,68 | 0,67 |
| ΔΑ | 0,10 | 0,63 | 0,62 |

Επομένως ΔΑ1 = 0,53 και ΔΑ2 = 0,52

Αντικαθιστώντας στο τύπο για την συγκέντρωση αιθανόλης βρίσκουμε:

C1 = 0,06095 g/lt και C2 = 0,05989 g/lt

# Βιβλιογραφία

1. Beutler, H. –O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., νol. ΝI, pp. 598-606; Νerlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
2. BoehringerMannheimBiochemica “Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis” 1987
3. BoehringerMannheimBiochemica “Methods of Enzymatic Food Analysis” 1984

|  |
| --- |
| **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**

Copyright ΤΕΙ Αθήνας, Βασίλειος Ντουρτόγλου, 2014. Βασίλειος Ντουρτόγλου. «Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία (Ε). Ενότητα 1: Προσδιορισμός της αιθανόλης με ενζυμικές αντιδράσεις». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: [ocp.teiath.gr](https://ocp.teiath.gr/).

**Σημείωμα Αδειοδότησης**

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creatiνe Commons 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://creatiνecommons.org/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 Domain | 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.