

## PRIMJENA ENZIMA ZA ANALIZU MOŠTA I VINA

Primjena enzimskih preparata u proizvodnji vina započela je još 30-ih godina 20. stoljeća. Međutim preduvjeti za komercijalnu proizvodnju enzima za analitičke svrhe ostvareni su tek oko 1980.

Tradicionalne metode analize mošta i vina zahtijevaju određene materijalne troškove, trajanje analize je duže, potreban je iskusan analitičar, a uz to su i manje precizne.

Za razliku od tradicionalnih analitičkih metoda, enzimske metode su jednostavne, precizne i specifične, a od opreme je potreban samo spektrofotometar ili kolorimetar, mikropipeta s odgovarajućim nastavcima i nešto sitnog laboratorijskog inventara (kivete).

Mošt i vino su vrlo pogodni za enzimske analize jer su homogeni i uglavnom nije potrebna prethodna priprema uzorka, već se po potrebi samo priprave odgovarajuća razrjeđenja. Enzimskim kitovima mogu se odrediti različiti spojevi u moštu i vinu. U tablici 1. navedeni su primjeri spojeva koji se najčešće enzimski određuju, kao i njihov enološki značaj. Iz tablice je vidljivo je da se enzimski testovi mogu primijeniti u svim fazama procesa proizvodnje vina (prije berbe, prije početka i tijekom alkoholne fermentacije, za praćenje malolaktičke fermentacije i za analizu gotovog vina).

**Tablica 1.** Enološki značaj spojeva mošta i vina koji se često određuju enzimskim kitovima.

Spoj	Enološki značaj
Acetaldehid	Važan za okus i kompleksnost, ali nepoželjan u većim koncentracijama. Nastaje tijekom fermentacije i oksidacijom.
Octena kiselina	U malim koncentracijama pozitivno utječe na okus i kompleksnost, ali u većim koncentracijama je nepoželjna. Manje koncentracije proizvode kvasci, a veće mogu proizvesti mikroorganizmi kvarenja poput <i>Acetobacter aceti</i> . Spada u hlapljive kiseline među kojima je najzastupljenija.
Amonijak	Najvažniji anorganski izvor asimilabilnog dušika za kvasac (eng. Yeast Available Nitrogen, YAN)
L-arginin	Najvažnija aminokiselina u moštu obzirom na to da služi kao izvor asimilabilnog dušika za kvasac
L-askorbinska kiselina	Prirodno prisutna u grožđu i često se dodaje kao antioksidans.

Tablica 1. (nastavak)

Spoj	Enološki značaj
CO <sub>2</sub>	Njegova koncentracija važna je senzorsku percepciju vina u ustima
Etanol	Nastaje alkoholnom fermentacijom. Količine preko 17,5 % ukazuju na njegovo dodavanje.
D-fruktoza	Indikator kvalitete grožđa, jedan od dva glavna fermentabilna šećera u gožđu.
D-glukonska kiselina	Indikator kvalitete grožđa za proizvodnju određenih vina kao što je šampanjac.
D-glukoza	Indikator kvalitete grožđa, jedan od dva glavna fermentabilna šećera u gožđu.
Glicerol	Indikator kvalitete gotovog vina, važan za okus vina.
D-mliječna kiselina	Proizvode ju uglavnom bakterije mliječne kiseline koje uzrokuju kvarenje.
L-mliječna kiselina	Nastaje uglavnom iz L-jabučne kiseline tijekom malolaktičke fermentacije.
D-sorbitol	Velika koncentracija ukazuje na dodavanje voća
D-jabučna kiselina	Prisutna u značajnim koncentracijama samo u patvorenom vinu
L-jabučna kiselina	Indikator kvalitete grožđa. Vrlo je važna za kiselost grožđa, a konvertira se u manje kiselu L-mliječnu kiselinu tijekom malolaktičke fermentacije.
D-manitol	Nastaje iz D-fruktoze djelovanjem mikroorganizama kvarenja, što rezultira nepoželjnim okusom i aromom
Jantarna kiselina	Nastaje tijekom fermentacije
Saharoza	Dodaje se radi povećanja količine alkohola, što je dozvoljeno u određenim uvjetima, kao npr. u proizvodnji šampanjca.
Sulfit	Dodaje se rano tijekom procesa vinifikacije radi sprečavanja rasta neželjenih mikroorganizama, a kasnije za stabilizaciju gotovih vina.
Škrob	Dodaje se radi umjetnog povećanja koncentracije čvrstih tvari otopljenih u vinu (suhi ekstrakt), koja je parametar kvalitete vina.
Urea	Izvor asimilabilnog dušika za kvasac i prekursor etil-karbamata koji je karcinogen. Pretjerani dodatak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , (diamonijev fosfat, eng. diammonium phosphate, DAP) može dovesti do povećanih koncentracija uree u vinu.

**Moguće enzimske analize prije berbe:**

Dozrijevanjem grožđa prije berbe značajno pada koncentracija L-jabučne kiseline, dok raste koncentracija D-glukoze i D-fruktoze. Potrebno je doseći ravnotežu, tako da ima dovoljno šećera za željenu alkoholnu jakost vina i optimalnu kiselost vina.

**Moguće enzimske analize prije početka alkoholne fermentacije**

Osim analize D-glukoze i D-fruktoze, potrebno je odrediti asimilabilni dušik (eng. Yeast Available Nitrogen, YAN) koji je potreban kvascu. U slučaju njegovog nedostatka dolazi do zastoja fermentacije i kvarenja. Izvori asimilabilnog dušika su arginin, urea, amonijevi ioni i primarne aminoskupine slobodnih aminokiselina.

Neki vinari i bez prethodne analize prakticiraju dodavanje dušika u obliku  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , (diamonijev fosfat, eng. diammonium phosphate, DAP), međutim ovakva praksa je nepoželjna jer urea koju proizvodi kvasac reagira s etanolom pri čemu nastaje etilkarbamat, koji je poznat kao humani karcinogen.

**Moguće enzimske analize tijekom alkoholne fermentacije**

Tijekom alkoholne fermentacije se enzimskim kitovima može pratiti potrošnja D-glukoze i D-fruktoze, porast koncentracije etanola, proizvodnja glicerola i octene kiseline te prisutnost asimilabilnih spojeva dušika.

**Moguće enzimske analize za praćenje malolaktičke fermentacije**

Može se uz pomoć enzimskih kitova pratiti razgradnja L-jabučne kiseline i nastajanje L-mliječne kiseline.

**Moguće enzimske analize gotovog vina**

Enzimske analize gotovog vina mogu se provesti u cilju postizanja stabilnosti vina, sprečavanja kvarenja, dokazivanja njegove autentičnosti i sigurnosti.

U cilju postizanja *stabilnosti vina*, mogu se enzimski odrediti sulfit ( $\text{SO}_2$ ) i L-askorbinska kiselina te rezidualna D-glukoza, D-fruktoza i L-jabučna kiselina.

Zbog *kvarenja vina* mogu biti prisutne visoke koncentracije octene kiseline, acetaldehida, D-mliječne kiseline i D-manitola, koji se također mogu enzimski odrediti.

*Autentičnost vina* (dokazivanje pokušaja patvorenja vina): – može se enzimski određivati prisutnost škroba (dodanog radi umjetnog povećanja suhog ekstrakta), limunske kiseline i D-jabučne kiseline (prisutne su u malim koncentracijama, a u većima se prisutne ako su dodane kao acidulanti), dodane saharoze ili dodanog etanola (ako ga ima preko 17,5 % v/v onda je etanol vjerojatno dodan).

*Sigurnost* – može se odrediti urea (ako je prisutna u većim koncentracijama reagira s etanolom i nastaje etil-karbamat).

Na vježbama iz ovog modula koristit će se komercijalni enzimski kitovi za analizu glicerola, te za praćenje malolaktičke fermentacije (kitovi za L-jabučnu kiselinu i L-mliječnu kiselinu).

Do pogrešaka pri enzimskim analizama može doći zbog loše tehnike pipetiranja, dodavanja krivih volumena uzorka ili reagensa, nepravilno namještenog spektrofotometra (paziti da se namjesti odgovarajuća valna duljina!), neispravne pipete, reagensa kojima je istekao rok trajanja, kontaminiranih reagensa, neodgovarajuće temperature reakcije, gubitka reakcijske smjese iz kivete tijekom miješanja, otisaka prstiju na kivetama, krivog vremena inkubacije, grešaka u računanju, neispravnog instrumenta, izmjerene apsorbancije veće od 2,0 (očitanja apsorbancije u području 0,1 – 2,0 jedinice apsorbancije se smatraju preciznima).

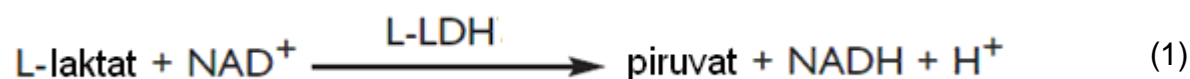
Ako se istodobno radi s više uzoraka onda treba mjeriti vrijeme od trenutka miješanja prve kivete.

## ENZIMSKO ODREĐIVANJE L-MLIJEČNE KISELINE (L-LAKTATA)

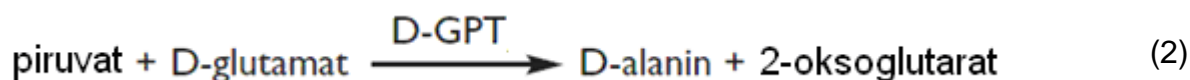
L-mliječna kiselina nastaje iz L-jabučne kiseline tijekom malolaktičke fermentacije. Na ovim vježbama za određivanje mliječne kiseline koristimo komercijalno dostupni enzimski kit K-LATE 03/06 (Megazyme, Irska). Količina reagensa u kitu dovoljna je za 50 određivanja.

### PRINCIP ODREĐIVANJA L-MLIJEČNE KISELINE (L-LAKTATA):

Za kvantificiranje L-mliječne kiseline potrebne su dvije kemijske reakcije. Prvu reakciju katalizira L-laktat dehidrogenaza (L-LDH), koja oksidira L-mliječnu kiselinu (L-laktat) u piruvat u prisutnosti nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) (1).



Budući da je ravnoteža ove reakcije pomaknuta ulijevo, u smjeru nastanka L-mliječne kiseline i  $\text{NAD}^+$ , potrebna je druga reakcija koja „hvata“ nastali piruvat. To se postiže konverzijom piruvata u D-alanin and 2-oksoglutarat uz pomoć enzima D-glutamat-piruvat transaminaza (D-GPT) uz suvišak D-glutamata (2).



Pri 340 nm mjeri se povećanje apsorbancije zbog nastalog NADH, koji je u stehiometrijskom odnosu s količinom L-mliječne kiselinu u uzorku.

Ova metoda je linearna u rasponu 0,3 - 30  $\mu\text{g}$  L-mliječne kiseline. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka koje iznose 0,005 – 0,010. Sadržaj kita, kao i upute za čuvanje navedeni su u tekstu koji slijedi.

SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE L-MLIJEČNE KISELINE (L-LAKTATA):

- Bočica 1: glicilglicin pufer (25 mL, 0,5 M, pH 10) i 0,5 M D-glutamat, uz natrijev azid (0,05 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 2: NAD<sup>+</sup> (380 mg) + PVP. Stabilnost preko 5 godina pri -20 °C.
- Bočica 3: Suspenzija D-glutamat-piruvat transaminaze (1,1 mL, 1000 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 4: Suspenzija L-laktat dehidrogenaze (1,1 mL, 2000 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 5: standard L-mliječne kiseline (5 mL otopine, 0,15 mg/mL) u natrijevom azidu (0,02 % w/v). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.

PRIPREMA REAGENSA ZA ANALIZU:

Bočica 1 i bočica 5 - koriste se bez pripreme.

Koncentracija D-glutamata je blizu zasićenja, stoga pri produženom skladištenju može kristalizirati mala količina D-glutamata na dnu bočice. Ovo ne utječe na analizu i može se ignorirati ili se otapa inkubacijom u toploj vodi uz povremeno vrtloženje sve dok se otopina ne izbistri.

Priprema bočice 2:

Otopite sadržaj bočice 2 u 5,5 mL destilirane vode, podijelite u alikvotne odgovarajućeg volumena i čuvajte u polipropilenskim kivetama pri -20 °C do upotrebe. Prilikom upotrebe držite ih na hladnom. Nakon otapanja, reagens je stabilan preko 2 godine pri -20 °C.

Priprema bočica 3 i 4:

koriste se bez pripreme, osim što se prije prvog otvaranja moraju protresti da se ukloni ostatak enzima koji se mogu istaložiti na gumenom čepu. Nakon toga čuvajte bočice u uspravnom položaju. Vrtloženjem bočica homogenizirajte sadržaj prije upotrebe. Stabilno preko 2 godine pri 4 °C.

**POSTUPAK ODREĐIVANJA L-LAKTATA:**

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Konačni volumen u kiveti: 2,24 mL

Volumen uzorka (**0,1 – 1,5 mL**) koji sadrži 0,3 - 30 µg L-mliječne kiseline.

Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi.

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	1,6 mL (1600 µL)	1,6 mL (1600 µL)
uzorak	-	0,1 mL (100 µL)
Otopina 1 (glicilglicin pufer)	0,5 mL (500 µL)	0,5 mL (500 µL)
Otopina 2 (NAD <sup>+</sup> )	0,1 mL (100 µL)	0,1 mL (100 µL)
Suspenzija 3 (D-GTP)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu 5-6 puta).		
Nakon <b>3 minute</b> očitati apsorbanciju ( <b>A<sub>1</sub></b> )		
Potom dodati suspenziju 4:		
Suspenzija 4 (L-LDH)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Promiješati (plastičnom špatulom ili zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu 5-6 puta).		
Očitati apsorbanciju ( <b>A<sub>2</sub></b> ) na kraju reakcije (oko <b>10 minuta</b> ).		
Ako reakcija nije stala nakon 10 minuta, nastaviti očitavati apsorbancije <b>svakih 5 min</b> sve dok se vrijednost ne ustali ili se konstantno povećava tijekom 5 minuta.		

**RAČUNANJE KONCENTRACIJE L-LAKTATA:**

Odredite razliku apsorbancija ( $A_2 - A_1$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzmite od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije  $\Delta A_{\text{L-mliječne kiseline}}$ . Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija L-mliječne kiseline može se dalje izračunati prema jednadžbi:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \cdot \Delta A_{\text{L-mliječne kis.}} \quad [\text{g/L}] \quad (3)$$

gdje je:

$c$  – koncentracija mliječne kiseline (g/L)

$V$  – konačni volumen (mL)

$MW$  – molarna masa L-mliječne kiseline (g/mol) = 90,1

$\epsilon$  – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM =  $6300 \text{ (l mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$

$d$  - put svjetlosti (1 cm)

$v$  - volumen uzorka (mL)

Ako je uzorak bio razrijeđen, rezultat treba množiti s faktorom razrijeđenja.

Ako je vrijednost  $\Delta A_{\text{L-mliječne kiseline}}$  preniska ( $< 0,100$ ) onda uzmite manje razrijeđeni uzorak.

Druga mogućnost je da povećate volumen uzorka tako da u kivetu pipetirate do maksimalno 1,5 mL, a pritom suma volumena uzorka i destilirane vode i dalje treba ostati 1,6 mL (tako da ukupan volumen reakcijske smjese bude 2,24 mL).



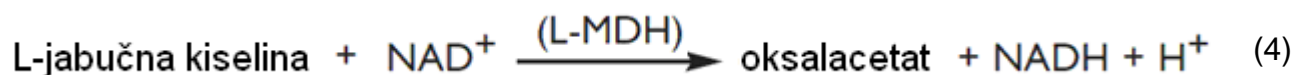
## ENZIMSKO ODREĐIVANJE L-JABUČNE KISELINE (L-MALATA)

Kao spoj koji sudeluje u citratnom ciklusu, L-jabučna kiselina (L-malat) se nalazi u svim živim organizmima. U vinskoj industriji se koncentracija L-jabučne kiseline prati zajedno s koncentracijom L-mliječne kiseline kako bi se detektirala jabučno-mliječna fermentacija. Osim ove spektrofotometrijske metode koju primjenjujemo na vježbama, postoji i alternativna metoda namijenjena malim vinarijama koja koristi jeftiniji kolorimetar, a također postoji i kit za L-jabučnu kiselinu koji je optimiran tako da se može koristiti uz auto-analizator.

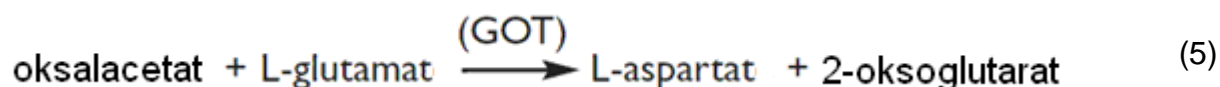
### PRINCIP:

Na ovim vježbama za određivanje jabučne kiseline koristimo komercijalno dostupni enzimski kit K-LMALR (Megazyme, Irska).

Za kvantificiranje L-jabučne kiseline potrebne su dvije kemijske reakcije. Prvu reakciju katalizira L-malat dehidrogenaza (L-MDH), koja oksidira L-jabučnu kiselinu u oksalacetat u prisutnosti nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) (4).



Budući da je ravnoteža ove reakcije (4) pomaknuta ulijevo, u smjeru nastanka L-jabučne kiseline i  $\text{NAD}^+$ , potrebna je druga reakcija koja „hvata“ nastali oksalacetat. To se postiže konverzijom oksalacetata u L-aspartat and 2-oksoglutarat uz pomoć enzima glutamat-oksalacetat transaminaza (GOT) uz suvišak L-glutamata (5).



Pri 340 nm mjeri se povećanje apsorbancije zbog nastalog NADH, koji je u stehiometrijskom odnosu s količinom L-jabučne kiselinu u uzorku.

Ova je metoda specifična za L-jabučnu kiselinu. Linearna je u rasponu 0.5 - 30  $\mu\text{g}$  L-mliječne kiseline. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka koje iznose 0,005 – 0,010. Vrijeme analize je 10-ak minuta, a količina

kemikalija u kitu je dovoljna za 50 određivanja. Sadržaj kita, kao i upute za čuvanje navedeni su u tekstu koji slijedi.

#### SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE L-JABUČNE KISELINE (L-MALATA):

- Bočica 1: glicilglicin pufer (6 mL, 1 M, pH 10) i D-glutamat (1 M), uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 2: NAD<sup>+</sup> (380 mg) + PVP (60mg). Stabilnost preko 5 godina pri -20 °C.
- Bočica 3: Suspenzija glutamat-oksalacetat transaminaze (1,25 mL, 600 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 4: Suspenzija L-malat dehidrogenaze (1,25 mL, 15 000 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.

Bočica 5: standard L-jabučne kiseline (5 mL otopine, 0,15 mg/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Standard L-jabučne kiseline analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka. Koncentracija L-jabučne kiseline određuje se iz ekstinkcijskog koeficijenta NADH.

#### PRIPREMA ZA ANALIZU:

Bočica 1 i bočica 5 koriste se bez pripreme.

#### Priprema Bočice 2:

Otopite sadržaj bočice 2 u 6 mL destilirane vode, podijelite u alikvote odgovarajućeg volumena i čuvajte u polipropilenskim kivetama pri -20 °C do upotrebe. Prilikom upotrebe držite ih na hladnom (u ledu). Ukoliko se radi o kitu za veći broj određivanja (116 uzoraka) nemojte otapati sadržaj druge bočice dok se ne potroši prva. Nakon otapanja, reagens je stabilan preko 2 godine pri -20 °C.

#### Priprema bočica 3 i 4:

koriste se bez pripreme, osim što se prije prvog otvaranja moraju protresti da se ukloni ostatak enzima koji se mogu istaložiti na gumenom čepu. Nakon toga čuvajte bočice u uspravnom položaju. Vrtloženjem bočica homogenizirajte sadržaj prije upotrebe. Stabilno preko 2 godine pri 4 °C.

## POSTUPAK ODREĐIVANJA L-JABUČNE KISELINE:

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Konačni volumen u kiveti: 2,34 mL

Volumen uzorka (0,1 – 2 mL) koji sadrži 0,5 - 30 µg L-jabučne kiseline.

Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi.

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	2,1 mL (2100 µL)	2,00 mL (2000 µL)
uzorak	-	0,1 mL (100 µL)
Otopina 1 (glicilglicin pufer)	0,1 mL (100 µL)	0,1 mL (100 µL)
Otopina 2 (NAD <sup>+</sup> /PVP)	0,1 mL (100 µL)	0,1 mL (100 µL)
Suspencija 3 (GOT)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu).		
Nakon otprilike <b>3 minute</b> očitati apsorbanciju ( <b>A<sub>1</sub></b> ).		
Dodati suspenciju 4 (L-MDH):		
Suspencija 4 (L- MDH)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Promiješati (zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu).		
Očitati apsorbanciju (A <sub>2</sub> ) na kraju reakcije (oko 3 minute).		

## RAČUNANJE:

Odredite razliku apsorbancija ( $A_2 - A_1$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzmete od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije  $\Delta A_{L\text{-malic acid}}$ . Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija L-jabučne kiseline može se dalje izračunati prema jednadžbi:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \cdot \Delta A_{L\text{-jabučne kiseline}} \quad [\text{g/L}] \quad (6)$$

gdje je:

V – konačni volumen (mL) = 2,34 mL

MW – molarna masa L-jabučne kiseline (g/mol) = 134,09

$\epsilon$  – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM =  $6300 \text{ (l mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$

d- put svjetlosti (1 cm)

v- volumen uzorka (mL) = 0,1

$$c = 0.4980 \cdot \Delta A_{\text{L-jabučne kiseline}} \quad [\text{g/L}] \quad (7)$$

Određivanje L-jabučne kiseline u uzorcima bijelih i crnih vina može se provesti bez prethodne obrade uzorka, pa se uzorak samo razrjeđuje i to obično u omjeru 1:10 te se uzima 0,1 mL uzorka. Ako je uzorak bio razrijeđen, rezultat treba množiti s faktorom razrijeđenja (faktor je 10 za razrijeđenje 1:10).

Ako je jabučna kiselina razgrađena tijekom jabučno-mliječne fermentacije onda se određuje iz originalnog uzorka.

## ENZIMSKO ODREĐIVANJE GLICEROLA

### OPĆENITO O GLICEROLU:

Glicerol se analizira u proizvodnji vina jer je indikator njegove kvalitete. Na koncentraciju glicerola u vinu utječe više faktora (zrelost grožđa, prisutni mikroorganizmi, tip opreme koja se koristi u vinskom podrumu, pH i temperatura fermentacije, izvori dušika te soj kvasca koji provodi fermentaciju). Koncentracija glicerola a u suhim stolnim vinima je otprilike 4-10 g/L. Rijetko je veća od 12 g/L, osim ako je grožđe inficirano plijesni *Botrytis cinerea* i tada može sadržavati čak 25 g/L.

Na ovim vježbama za određivanje glicerola koristimo komercijalno dostupni enzimski kit koji sadži reagense potrebne za 70 određivanja (kit K-GCROL, Megazyme, Irska).

### PRINCIP:

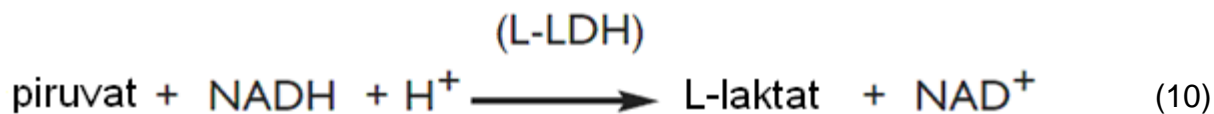
Glicerol se fosforilira pomoću adenzin-5'-trifosfata (ATP) u L-glicerol-3-fosfat reakcijom koju katalizira glicerokinaza (GK) (8).



Adenzin-5'-difosfat (ADP) koji nastaje u reakciji (1) ponovo se konvertira u ATP uz nastajanje piruvata (reakcija 9). U reakciji s ADP još sudjeluje fosfoenolpiruvat (PEP), a katalizirana je enzimom piruvat kinaza (PK)



Djelovanjem enzima L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), piruvat se reducira u L-laktat pomoću reduciranog nikotinamid-adenin dinucleotida (NADH) uz nastajanje NAD<sup>+</sup> (10).



Pri 340 nm mjeri se smanjenje apsorbancije zbog potrošnje NADH. Nastali NAD<sup>+</sup> (reakcija 10) je u stehiometrijskom odnosu s količinom glicerola u uzorku.

Ova je metoda specifična za glicerol. Linearna je u rasponu 0,8 - 35 µg glicerola u uzorku. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka

koje iznose 0.005 - 0.010, što odgovara koncentraciji glicerola od otprilike 0,086-0,171 mg/L u uzorku.

Ukoliko je konverzija glicerola završena unutar 5 minuta, može se zaključiti da nije bilo interferencija. Ovo se može dalje provjeriti dodavanjem glicerola u kivetu nakon završetka reakcije (oko 20 µg u 0,1 mL), što treba dovesti do značajnog povećanja apsorancije.

Vrijeme analize je 10-ak minuta, a količina kemikalija u kitu je dovoljna za 70 određivanja. Sadržaj kita, kao i upute za čuvanje navedeni su u tekstu koji slijedi.

#### SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE GLICEROLA:

- Bočica 1: Tris/HCl pufer (20 mL, 1 M, pH 7,4) i magnezijev klorid (30 mM M), uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 2: 14 tableta koje sadrže NADH, ATP i PEP. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Maksimalna trajnost ovih tableta postiže se čuvanjem u zabrtvljenom kontejneru u prisutnosti siilkagela pri 4 °C ili pri -20 °C.
- Bočica 3: sadrži 1,5 mL suspenzije piruvat kinaze (600 U/mL) i L-laktat dehidrogenaze (550 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 4: Suspenzija glicerokinaze (1,5 mL, 85 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 5: standard glicerola (5 mL otopine, 0,20 mg/mL) uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Standard glicerola analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.

---

## PRIPREMA REAGENSA ZA ANALIZU GLICEROLA:

Bočica 1 i bočica 5 koriste se bez pripreme.

### Priprema Bočice 2:

Prije vađenja tableta iz bočice zagrijte bočicu na sobnu temperaturu (po mogućnosti u eksikatoru) radi sprečavanja kondenzaciju vlage na kontejneru. Ukoliko se otvori bočica dok je još hladna onda tablete apsorbiraju vlagu i smanjuje se stabilnost komponenata sadržanih u tabletama

Procijenite koliko analiza treba provesti da bi prema tome otopili potrebu količinu reagensa. Da bi dobili volumen reagensa koji je potreban za 5 planiranih analiza otopite jednu tabletu iz bočice 2 u 1,1 mL (tj. 2 puta po 550 $\mu$ L) Tris/HCl pufera (bočica 1) i otapajte 1-2 minute. Otapanje možete poboljšati nježnim mućkanjem ili miješanjem. Nakon otapanja će se s vremenom apsorbancija otopljenog NADH postepeno smanjivati, ali je ovako pripremljen reagens prikladan za upotrebu otprilike 4 dana ukoliko se čuva pri 4 °C, odnosno oko 4 tjedna ako se čuva pri -20 °C.

### Priprema bočica 3 i 4:

koriste se bez pripreme, osim što se prije prvog otvaranja moraju protresti da se ukloni ostatak enzima koji se mogu istaložiti na gumenom čepu. Nakon toga čuvajte bočice u uspravnom položaju. Vrtloženjem bočica homogenizirajte sadržaj prije upotrebe. Stabilno preko 2 godine pri 4 °C.

Koncentracija glicerola određuje se iz ekstinkcijskog koeficijenta NADH.

**POSTUPAK ODREĐIVANJA GLICEROLA:**

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Volumen uzorka (0,1 – 2 mL) koji sadrži 0,8 - 35 µg L-jabučne kiseline.

*Određivanje glicerola u uzorcima bijelih i crnih vina može se provesti bez prethodne obrade uzorka, pa se uzorak samo razrjeđuje i to obično u omjeru 1:20 te se uzima 0,1 mL uzorka.*

*Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi.*

*Konačni volumen u kiveti iznosi **2,34 mL**.*

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	<b>2,1 mL (2100 µL)</b>	<b>2,00 mL (2000 µL)</b>
uzorak	-	<b>0,1 mL (100 µL)</b>
Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)	<b>0,2 mL (200 µL)</b>	<b>0,2 mL (200 µL)</b>
Suspenzija 3 (PK/L-LDH)	<b>0,02 mL (20 µL)</b>	<b>0,02 mL (20 µL)</b>
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu).		
Nakon otprilike <b>4 minute</b> očitati apsorbanciju ( <b>A<sub>1</sub></b> ) (kad završi reakcija koja se odvija kada se doda suspenzija 3) (PK/L-LDH).		
Dodati suspenziju 4 (GK):		
Suspenzija 4 (L- MDH)	<b>0,02 mL (20 µL)</b>	<b>0,02 mL (20 µL)</b>
Promiješati (zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu).		
Očitati apsorbanciju ( <b>A<sub>2</sub></b> ) na kraju reakcije ( <b>oko 5 minuta</b> ). Ako se reakcija nije zaustavila nakon 5 minuta onda nastavite očitavati apsorbanciju u intervalima od <b>2 minute</b> sve dok se apsorbancija ne ustali.		



**RAČUNANJE KONCENTRACIJE GLICEROLA:**

Odredite razliku apsorbancija ( $A_1 - A_2$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzmite od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije  $\Delta A_{\text{glycerol}}$ . Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija glicerola može se dalje izračunati prema jednadžbi:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \cdot \Delta A_{\text{glycerol}} \quad (11)$$

gdje je:

$c$  – koncentracija glicerola (g/L)

$V$  – konačni volumen (mL) = 2,34 mL

$MW$  – molarna masa glicerola (g/mol) = 92,01

$\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM =  $6300 \text{ (l mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$

$d$  – put svjetlosti (1 cm)

$v$  – volumen uzorka (mL) = 0,1 mL

$$c = 0.3421 \times \Delta A_{\text{glycerol}} \quad (12)$$

Ako je uzorak bio razrijeđen, rezultat treba množiti s faktorom razrijeđenja (za razrijeđenje 1:20 množi se faktorom 20).