



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

KA 2340/4-8up

### Chemické laboratorní metody v analýze potravin H1CL

Studijní podklady

Téma: **Principy enzymových metod v analýze potravin živočišného původu**

Vypracovala Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

#### Úvod:

Enzymové metody, které používají enzymy jako reagentie jsou dnes již v analýze potravin etablovány. V řadě případů jsou národními nebo mezinárodními normami. Přesto nejsou v současné době tak často používány.

#### Přednosti:

Enzymové metody mají mnoho předností, mezi které zejména patří:

1. specifita reakcí
2. správnost výsledků
3. jednoduché zacházení
4. časová nenáročnost
5. cenová dostupnost
6. nenáročná instrumentace.

Ad 1) Enzymy jsou biologické katalyzátory. Jsou izolovány z žijících organismů (orgány zvířat, části rostlin nebo mikroorganismy). Enzymy urychlují nejen in vivo, ale i in vitro velmi specificky rovnováhu chemických reakcí, bez vlivu na složení reaktantů. Avšak enzymová katalýza je odlišná od chemické katalýzy. Enzymová reakce je selektivně specifická jak pro substrát, tak i pro mechanismus reakce. Reakční mechanismus enzymových reakcí je stejný, jak v organické, tak v anorganické chemii.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Důležitý rozdíl vzhledem k chemickým reakcím je ten, že enzymové reakce probíhají prakticky bez vedlejších reakcí. Tyto vlastnosti enzymových reakcí vedou k tomu, že probíhají výrazně rychleji než možné vedlejší chemické reakce. Naproti tomu u chemických reakcí, kde hlavní reakce probíhá velkou rychlostí, současně probíhá i řada vedlejších reakcí.

Ad 2) Správnost výsledků je při pečlivém dodržování SOP (návodů=standardních operačních postupů) velmi dobrá.

Ad 3) Jednoduchost zacházení při provádění analýz pomocí enzymatických metod spočívá v principu, na kterém jsou tyto metody založeny. V podstatě jde o to, že jednotlivé komponenty testu (soupravy) jsou pipetovány rovnou do speciálních plastových kyvet v přesně určeném pořadí. Pouze startovací enzym se v této fázi nepoužije.

Po pečlivém promíchání se všechny kyvety (obvykle vzorek 3x a slepý roztok) změří na spektrofotometru a získá se absorbance pozadí ( $A_1$ ), do těchto kyvet se napipetuje určené množství startovacího enzymu a po zamíchání se nechá reakce probíhat po stanovený čas. Poté se kyvety znovu změří ( $A_2$ ) na spektrofotometru. Rozdíl hodnot  $\Delta A$  naměřených absorbancí ( $A_2 - A_1$ ) je hledanou správnou absorbancí, která se použije k výpočtu. Rozdíl absorbancí se vypočítá u slepé zkoušky ( $A_2 - A_1$ )<sub>SL</sub> i u vzorku ( $A_2 - A_1$ )<sub>VZ</sub>:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{VZ} - (A_2 - A_1)_{SL}$$

Ad 4) Nejnáročnějším krokem vlastního stanovení daného parametru potravin je příprava vlastního vzorku potravin, který musí být ve výsledku čirým filtrátem s hodnotou pH, která bude vyhovovat dané enzymatické reakci. Obvyklými kroky při přípravě vzorků potravin jsou:

- Homogenizace
- Přesná navážka
- Deproteinace



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- Úprava pH
- Filtrace.

Ad 6) Konečné analytické stanovení daného parametru vyžaduje pouze UV/VIS spektrofotometr. U většiny setů jsou roztoky připravené v plastových kyvetách k měření bezbarvé. Je to proto, že při reakci vniká z přidaného nikotinamidadenindinukleotidu (NAD) redukcí, za vzniku redukovaného nikotinamidadenindinukleotidu (NADH). A právě množství redukovaného koenzymu NADH je ekvivalentní koncentraci stanovovaného substrátu. NADH je sloučenina absorbující záření v UV oblasti spektra (při 340 nm).

### Výpočet:

Konečný výpočet koncentrace stanovovaného analytu se provádí na principu Lambert-Beerova zákona, bez použití kalibrační přímky.

Obecný vzorec pro výpočet je následující:

$$c = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A \text{ [g/l]}$$

$V$  konečný objem roztoku v kyvetě [ml]

$v$  objem použitého filtrátu vzorku [ml]

$MG$  molekulová hmotnost stanovovaného substrátu [g]

$d$  šířka kyvety [cm]

$\varepsilon$  extinkční molární koeficient NADH při 340 nm [6,3 l/mmol/cm]

Přečítáním výsledku ředěním vzorku se stanoví konečná koncentrace analytu v původním vzorku (g/kg a  $\mu\text{mol/g}$ ).



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



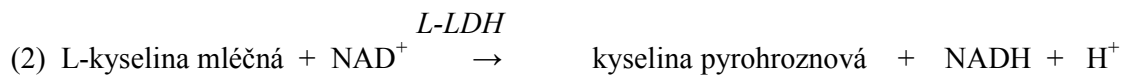
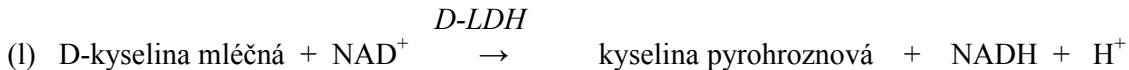
## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Příklady reakčních mechanismů, při stanovení některých analytů potravin:**

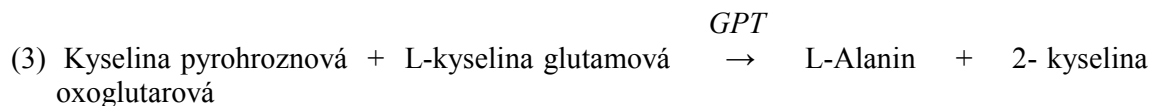
- **Stanovení D-a L-kyseliny mléčné v mléčných výrobcích**

*Princip metody:*

D-kyselina mléčná je pomocí enzymu D-laktátdehydrogenasy (D-LDH) a nikotinamidadeninukleotidu (NAD) oxidována na kyselinu pyrohroznovou. K oxidaci L-kyseliny mléčné je nutný enzym L-laktátdehydrogenasa (L-LDH). Tyto reakce jsou popsány v reakcích (1), (2).



Rovnováha této reakce leží větší měrou na straně kyseliny mléčné. Je proto nutné další špřaženou reakcí, kdy je kyselina pyrohroznová pomocí enzymu glutamátpyruváttransaminasou (GPT) a kyseliny glutamové převáděna na L-alanin a kyselinu oxoglutarovou posunuta kvantitativně na pravou stranu (3).



Množství NADH, vznikající v průběhu reakcí (1) a (2), které je ekvivalentní množství původně přítomné D- a L-kyseliny mléčné, se zjistí na základě jeho absorpce při 340 nm.

- **Stanovení laktulose v mléce a mléčných výrobcích**

Obsah laktulose slouží k charakteristice tepelného ošetření mléka a k odlišení pasterovaného mléka od UHT a sterilovaného mléka.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### *Princip metody:*

Extrakt vzorku, zbavený tuku a bílkovin, je podroben štěpení laktosy a laktulosity pomocí beta-D-galaktosidasy na monosacharidy glukosu a galaktosu, resp. glukosu a fruktosu.

Množství uvolněné fruktosy je ekvivalentní množství původně přítomné laktulosity.

Jestliže je laktosy významně vyšší množství v mléce než laktulosity, rušila by při jejím štěpení vzniklá glukosa stanovení fruktosy. Proto je třeba glukosu převést pomocí enzymu glukosooxidasy (GOD) převést na kyselinu glukonovou. Pak je možno stanovit malé množství laktosy vedle přebytku laktosy. Vznikající peroxid vodíku v této reakci je odstraněn pomocí katalasy. Zároveň tato reakce je zdrojem kyslíku pro předcházející oxidaci glukosy. Zbytková, nezoxidovaná glukosa a při štěpení laktulosity vzniklá fruktosa je pomocí hexokinasy a ATP fosforylována. Při reakci vzniklý glukosa-6-fosfát je pomocí glukosa-6-fosfát dehydrogenasy a NADP oxidován na 6-fosfoglukonát a NADPH. Množství NADPH je změřeno při 340 nm. Poté je přidán enzym fosfoglukoisomerasa (PGI) a fruktoso-6-fosfát je tím převeden na glukosa-6-fosfát. Poté je glukosa-6-fosfát zoxidován a stanoven při NADPH 340 nm.

- **Stanovení škrobu v masných výrobcích**

### *Princip metody:*

Škrob je štěpen pomocí enzymu amyloglukosidasy (AMG) při pH 4,6 na glukosové jednotky  
(1):



Vzniklá D-glukóza je při pH 7,6 pomocí enzymu hexokinasy (HK) a glukoso-6-phosphat-dehydrogenasy (G6P-DH) v následujících dvou reakcích (2,3) postupně zoxidována na kyselinu D-glukonovou. Množství v reakci (3) vzniklého NADPH je stanoveno spektrofotometricky při 340 nm a je ekvivalentní množství přítomného škrobu. Výsledky se vyjadřují jako obsah škrobu v g/100 g.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ HK



*G6P-DH*

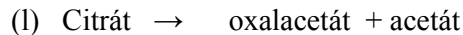


- **Stanovení kyseliny citronové v sýrech**

*Princip metody:*

Kyselina citronová je konvertována na kyselinu oxaloctovou a octovou v reakci katalyzované enzymem citrátlyasou (CL) (1).

*CL*

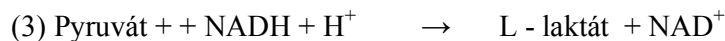


V dalším sledu reakcí je pomocí enzymu L-malátdehydrogenasy (L-MDH) a L-laktátdehydrogenasy (L-LDH) redukována kyselina oxaloctová a její dakarboxylační produkt kyselina pyrohroznová na kyselinu L-jablečnou a kyselinu L-mléčnou pomocí nikotinamidadeninukleotidu (NAD), který je v těchto reakcích redukován na nikotinamidadeninukleotid (NADH) (2)

*L-MDH*



*L-LDH*



Množství NADH, které se spotřebuje při reakci (2,3) je ekvivalentní množství původně přítomné kyseliny citonové. Množství NADH je stanoveno spektrofotometricky.