

Dr Miodrag Pantelić,
Institut za voćarstvo — Čačak

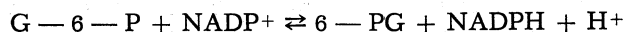
PRILOG METODICI ODREĐIVANJA ŠEĆERA (glukoze, fruktoze i saharoze) u voćnim plodovima pomoću fermentata*

Postoji više metoda za određivanje šećera u biljnom materijalu. Posljednjih dvadeset godina najviše se koriste metode papirne, kolonske i gasne hromatografije.

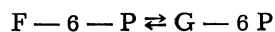
Kako je postupak kod navedenih metoda prilično dug, to smo želeli da uvedemo jednu biohemijsku metodu u istraživanjima u voćarstvu, koju je Drawet pripremio za brže određivanje šećera u pivu. To je i bio cilj našega rada.

Glukoza i fruktoza u prisustvu heksokinaze (H. K), reaguju sa adenzin — trifosfatom (ATP), i prelaze u glukozu — 6 — fosfat (G-6-P), odnosno u fruktozu — 6 — fosfat (F-6-P).

U prisustvu enzima glukozu — 6 — fosfat dehidrogenaze (G-6-PDH), G — 6 — P oksidiše se nikotinamid adenin — dinukleotidfosfatom (NADP) u 6 — fosfo-glukonsku — kiselinu.



Količina NADPH je ekvivalentna količini G — 6 — P, i ona je merljiva, a na osnovu njene absorpcije pri 340 m η , odnosno 366m η može se odrediti njen sadržaj. Fruktoza 6 — P (F-6-P) prelazi pomoću fosfo-glukoze izomeraze (PGI) u G — 6 P.



G — 6 P reaguje ponovo na NADP i prelazi u 6-fosfo-glukonsku kiselinu (6-PG) i NADPH čiju količinu zatim merimo.

Sarhoza se određuje što se prvo kod pH = 4,6 u prisustvu invertaze hidrolizuje u glukozu i fruktozu, a sve dalje određuju po prethodno opisanom principu.

Sarhoza + H₂O \rightleftharpoons klukoza + fruktoza. Glukoza se dalje određuje kod pH = 7,6.

MATERIJAL I METODIKA

Za ispitivanje je korišćen alkoholni ekstrakt ploda.

Za postupak su potrebni sledeći reaktivni:

- trietanolaminhidrolorid, TRA
- natrijumhidroksid, 4 N i 1 N

* Zahvaljujem se prof. dr F. Drawertu direktoru Hemijsko-tehnološkog Instituta u Weihenstephan-u (München), koji mi je omogućio izvođenje ovih ispitivanja, kao i njegovom suradniku Hagen-u, dipl. inž. na korisnim savetima.

- magnezijumsulfat $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, p. a
- nikotinamid — adein — dinukleotid fosfat, NADP — NaH_2
- adenzin — trifosfat, $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- natrijumkarbonat NaHCO_3 , p. a
- heksokinaza, HK
- glukozu — 6 fosfat — dehidrogenaza, G-6-PDH
- fosfo-glukoizomeraza, PGI
- sirćetna kiselina, 1N
- invertaza

Merenje ekstinkcije (E) vršeno je na Zeis-ovom spektrofotometru.

Pripremanje uzoraka

Šećeri su iz uzoraka ekstrahovani etilnim alkoholom (Pantelić 1967).

Pripremanje rastvora

Rastvor 1:

11,2 g trimetanolaminhidrata, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 150 ml bidest. H_2O rastvoriti, sa oko 5 ml N NaOH podesiti $\text{pH} = 7,6$ i dopuniti sa bidest. H_2O do 200 ml. Pri $+ 4^\circ\text{C}$ rastvor je neograničeno postojan.

Rastvor 2:

50 mg NADP, Na-So rastvoriti u 5 ml bidest. H_2O . Rastvor je na oko $+ 4^\circ\text{C}$ postojan četiri nedjelje.

Rastvor 3:

50 mg ATP, Na-so rastvoriti u 5 ml 5% NaHCO_3 . Rastvor je četiri nedjelje postojan na $+ 4^\circ\text{C}$.

Rastvor 4:

0,5 ml HK (2 mg/ml)
 0,5 ml G-6-PDH (1 mg/ml) izmešati.
 Ovaj rastvor je postojan pola godine na $+ 4^\circ\text{C}$.

Rastvor 5:

1 ml PGI (2 mg/ml). Na oko $+ 4^\circ\text{C}$ rastvor je postojan godinu dana.

Rastvor 6:

6,7 ml 1 N NaOH, 13,5 ml 1 N CH_3COOH pomešati sa 180 ml bidest. H_2O $\text{pH} = 4,6$. Ovaj rastvor je pri sobnoj temperaturi neograničeno postojan.

Rastvor 7:

25 mg invertaze rastvoriti u 5 ml bidest. H₂O. Rastvor je pri oko + 4°C jednu nedelju dana postojan.

ODREĐIVANJE GLUKOZE I FRUKTOZE

Ukoliko je alkoholni ekstrakt ploda mutan, isti profiltrirati. Sadržaj glukoze i fruktoze u probi, ne sme biti veći od 0,8 g/l, a ako je veći razblažiti prema tablici 1:

Tabela 1

Glukoza + fruktoza u g/l Glucose + fructose in g/l	Razblaženje sa bidest. H ₂ O Dilution with bidest. H ₂ O	Foaktr razblaženja F Dilution factor F
0,8 g	—	1
0,8 — 8 g	1 + 9	10
8 — 80 g	1 + 99	100
> 80 g	1 + 999	1000

Mi smo koristili ovu metodu za određivanje navedenih šećera u sledećim voćnim vrstama: šljivama, jabukama, kruškama, jagodama, malinama i kupinama, a razblaživali smo alkoholne ekstrakte navedenih vrsta u odnosu 1 + 99.

Iz tabele 2 možemo zaključiti da postoje neznatne razlike u sadržaju šećera. Ove razlike između rezultata dobivenim prema navedenim metodama su i nalaze se u granicama dozvoljenih greški.

Mjerenje sadržaja glukoze i fruktoze vršeno je na 340 m η , u staklenoj kiveti od 1 cm debljine, na temperaturi 20—25°C, gde nam je vazduh bio slepa proba.

U jednoj kiveti pipetirali smo redom: 3 ml rastvora 1, zatim 0,1 ml ATP 0,1 NADP i 0,2 ml probe. Sve ovo malim štapićem promešali i merili ekstinkciju E₁, zatim smo dodali 0,02 ml HK/G-6PDH, ponovo promešali i sačekali 10—15 minuta i merili E₂, zatim smo dodali 0,02 ml PGI, promešali i sačekali 10—15 minuta i merili E₃.

$$E_2 - E_1 = \Delta E \text{ glukoze}$$

$$E_3 - E_2 = \Delta E \text{ fruktoze}$$

$$\Delta E \text{ gluk.} \cdot 0,4953 \cdot F = g \text{ glukoze} / 1$$

$$\Delta E \text{ frukt.} \cdot 0,4968 \cdot F = g \text{ fruktoze} / 1$$

$$F = \text{faktor razblaženja}$$

Tabela 2 — Promene u sadržaju šećera u plodovima požege (period 15. VI — 2. X)

Table 2 — The Changes of Contents of Sugars in fruits of Požege (15. VI — 2. X)

Red. br. Number	Datum berbe Harvest date	Procenat u odnosu na svežu materiju — Percent of fresh matter							
		Hromatografski postupak — Chromatography method			Fermentalni postupak — Enzymes method				
		Glukoza Glucose	Fruktoza Fructose	Saharoza Sucrose	gl. + fr. + sah. glucose + fruc- tose + sucrose	Glukoza Glucose	Fruktoza Fructose	Saharoza Sucrose	gl. + fr. + sah. glucose + fruc- tose + sucrose
1.	15. VI	0,88	0,10	—	0,98	0,96	0,14	0,10	1,20
2.	2. VII	1,53	0,23	0,30	2,06	1,57	0,19	0,18	1,94
3.	14. VII	2,08	0,43	0,61	3,12	1,95	0,39	0,50	2,84
4.	31. VII	2,30	0,80	0,82	3,92	2,44	0,79	0,70	3,93
5.	14. VIII	4,20	1,26	2,58	8,04	4,12	1,31	2,43	7,86
6.	3. IX	4,76	1,45	3,27	9,48	4,63	1,60	3,13	9,36
7.	21. IX	5,27	1,80	4,93	12,00	5,20	1,92	4,74	11,86
8.	2. X	6,76	2,33	4,60	13,72	6,66	2,48	4,51	13,65
	\bar{X}	$3,48 \pm 0,49$	$1,05 \pm 0,19$	$2,44 \pm 0,49$	$6,67 \pm 1,11$	$3,44 \pm 0,47$	$1,10 \pm 0,20$	$2,04 \pm 0,51$	$6,58 \pm 1,13$

ODREĐIVANJE SADRŽAJA SAHAROZE

Određivanje sadržaja saharoze vrši se iz istog rastvora u kome su već određeni sadržaji glukoze i fruktoze na sledeći način:

Uzeti u kivetu 0,20 ml probe, 0,10 ml pufera (rastvora 6) 0,10 ml invertaze (rastvor 7), promešati i ostaviti da stoji 15 minuta na sobnoj temperaturi zatim dodati 20,80 ml pufera (rastvor 1), 0,10 ml ATP (rastvor 2), i 0,10 ml NADP (rastvor 3) promešati i meriti E_1 . Nakon toga dodati 0,02 ml (HK/G-6-PDH) — rastvor 4, promešati i ostaviti da stoji 10—15 minuta i meriti E_2 .

$$E_2 - E_1 = \Delta E \text{ saharoze}$$

od ove vrednosti se oduzima dobivena vrednost E glukoze

$$(\Delta E \text{ sah.} - \Delta E \text{ gluk.}) \times F \times 0,9405 = g \text{ saharoze / l}$$

F = faktor razblaženja

$$0,9405 = 2 \cdot 0,495 \cdot 0,95$$

ZAKLJUČAK

1. Opisana je Drawet-ova metoda kvantitativnog određivanja glukoze, frutoze i saharoze pomoću fermenata.

2. Prilagodili smo navedenu metodu za određivanje glukoze, frutoze i saharoze iz alkoholnih voćnih plodova.

3. Kod postojeće kvantitativne metode za određivanje šećera pomoću fermenata izvršili smo izvesne male modifikacije:

a) za spravljanje rastvora broj 3, uzeli smo 50 mg ATP umesto 250 mg, i

b) za pripremanje rastvora 4, upotrebljen je 1 mg/ml G-6-PDH umesto 5 mg/ml.

4. Date su vrednosti sadržaja pojedinih šećera dobivene metodom hromatografije, kao i metodom fermenata.

LITERATURA

1. Drawet, F: Vitis, Ber. Rebenforsch, 4 185/1964).
2. Drawet, F.: und G. Kupfer: Z. analyt. chem. 211, 89 (1965)
3. Hans — Ulrich Bergmeyer: Methoden der enzymetischen Analyse. Verlag chemie — GMBH — Winheim 1962. pp 99, 117, 156.
4. Pantelić, M., 1967: Prilog metodici određivanja šećera (glukoze, frutoze i saharoze) u voćnim plodovima metodom hromatografije na hartiji kombinovane sa spektrofotometrijom. Jugoslavensko voćarstvo, br. 2, 1967.
5. Test-Fibel C. F. Beohringer Soehne G mb H. Mannheim Biochemische Abteilung.