

EWELINA KAMIŃSKA-KISZKA, ŁUKASZ WIT, LARYSA SIBIRNA,
VLADIMIR SIBIRNY, MYKHAILO GONCHAR

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ETANOLU METODĄ ENZYMATYCZNĄ W NAPOJACH ALKOHOLOWYCH I BEZALKOHOLOWYCH

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności metody enzymatycznej i zestawu analitycznego „Alkotest” do analizy ilościowej zawartości etanolu w winach, napojach owocowych i sokach, miodzie pitnym i piwie bezalkoholowym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono przydatność metody enzymatycznej do oznaczania zawartości etanolu w badanych produktach. Zastosowana metoda jest znacząco tańsza w porównaniu z innymi metodami enzymatycznymi dzięki niskim kosztom preparatu oksydazy alkoholowej (AO), otrzymanego ze zmutowanego szczepu drożdży metylotroficznych *Hansenula polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) z zaburzoną represją kataboliczną syntezy AO. Wykazano, że różny skład chemiczny win owocowych i soków nieznacznie wpłynął na oznaczanie zawartości alkoholu. Porównanie metody „Alkotest” i jej modyfikacji „Multiple Addition Test” umożliwiło wnioskowanie o braku istotnego negatywnego wpływu komponentów występujących w winach owocowych na wyniki oznaczania stężenia etanolu. Zastosowanie metod „Multiple Addition Test” i chromatografii gazowej (GC) potwierdziło ten wniosek. Wyniki uzyskane z porównania obu metod były zgodne, a współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio $r = 0,997$ ($p < 0,0001$) w przypadku win owocowych czerwonych oraz $r = 0,998$ ($p < 0,0001$) – win owocowych białych.

Słowa kluczowe: alkohol, oksydaza alkoholowa, wina owocowe, napoje owocowe, soki

Wprowadzenie

Testy na obecność etanolu i oznaczania jego zawartości są ważne do kontroli procesów fermentacji oraz w certyfikacji różnych napojów alkoholowych i bezalkoholowych. Istnieje wiele różnych chemicznych i fizykochemicznych metod oznaczania

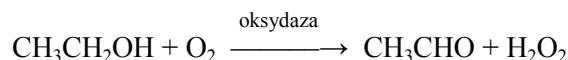
Mgr E. Kamińska-Kiszka, mgr Ł. Wit, Zamiejscowy Wydz. Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, ul Sokołowska 26, 36-100 Kolbuszowa; mgr L. Sibirna, dr V. Sibirny, Wydz. Biologiczno-Rolniczy Uniwersytetu Rzeszowskiego, ul. Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów; prof. dr hab M. Gonchar, Zamiejscowy Wydz. Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, ul Sokołowska 26, 36-100 Kolbuszowa, Instytut Biologii Komórki Państwowej Akademii Nauk Ukrainy we Lwowie, ul. Drahomanowa 14/16, 27005 Lwów, Ukraina

zawartości alkoholi [9, 10]. Najprostsze polegają na destylacji alkoholu, a następnie densymetrycznej lub refraktometrycznej analizie destylatu [6]. Wadami tych metod są czasochłonność, niska dokładność i trudność wykonania oznaczeń seryjnych. Chemiczne metody oznaczania alkoholi polegają na reakcji utleniania etanolu dwuchromianem potasu lub innym utleniaczem. Zawartość alkoholu oznacza się przez fotometryczny pomiar stężenia roztworu utleniacza lub miareczkowanie dwuchromianu tiosiarczanem sodu. Ich zaletą jest niski koszt analizy. W Polsce najpowszechniej wykorzystuje się metody chemiczne, których zastosowanie regulują odpowiednie normy [11]. Jednak prawie wszystkie te metody cechuje niska czułość i specyficzność, a ponadto nie mogą być stosowane w przypadku obecności w próbach różnych alkoholi. Spośród innych metod służących do oznaczania zawartości alkoholu na uwagę zasługują: chromatografia, chemo- i bio-sensorowe metody analizy alkoholi oraz metody enzymatyczne. W praktyce, szczególnie przydatna jest chromatografia gazowo-cieczowa, która zapewnia wysoką czułość, selektywność i możliwość jednoczesnej identyfikacji oraz ilościowego oznaczania różnych substancji [8]. Jednak z uwagi na wysoki koszt zakupu samego urządzenia i konieczność zatrudnienia wykwalifikowanego personelu nie jest metodą powszechnie stosowaną. Analogiczne ograniczenia dotyczą nowoczesnej, dającej możliwość bardzo szybkiej identyfikacji metody oznaczania etanolu za pomocą rezonansu jądrowo-magnetycznego (NMR) [6].

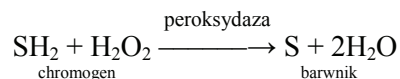
Już przed 50 laty zaproponowano metodę enzymatyczną oznaczania alkoholu etylowego polegającą na utlenieniu etanolu do aldehydu octowego za pomocą dehydrogenazy alkoholowej (ADH) w obecności dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD^+). Produkt tej reakcji (NADH) można oznaczyć spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$. Metoda jest wprawdzie selektywna, czuła i prosta w wykonaniu, ale z powodu wysokiej ceny enzymu i jego kofaktora NAD^+ nie należy do metod tanich [2].

Alternatywą dla dehydrogenazowej analizy etanolu jest wykorzystanie oksydazy alkoholowej (AO) drożdży metylotroficznych. W odróżnieniu od dehydrogenazy alkoholowej, AO zawiera ściśle związany z białkiem koenzym FAD, a reakcja, którą przeprowadza ma charakter nieodwracalny [3].

Reakcja utleniania alkoholu tlenem atmosferycznym do aldehydu octowego i nadtlenu wodoru katalizowana przez oksydazę alkoholową jest podstawą metody enzymatycznej AOP (oksydaza alkoholowa + peroksydaza chrzanowa):



Nadtlenek wodoru jest wykorzystywany następnie w reakcji katalizowanej przez drugi enzym – peroksydazę chrzanową do utlenienia bezbarwnego chromogenu do związku barwnego:



Powyższa reakcja jest podstawą analitycznego zastosowania AO w zestawie do oznaczania alkoholu zwanym „Alkotest”. Istotę pomiaru stanowi ilość wytworzonego nadtlenku wodoru. W zestawie tym, w przeciwieństwie do znanych analogów (np. 2,2-benzydyna, o-toluidyna, kwas 5-aminosalicylowy, 4-aminopirydyna i in.), jako chromogen wykorzystuje się nietoksyczną tetrametylobenzydynam (TMB-3,3',5,5') [7]. TMB pod wpływem nadtlenku wodoru i peroksydazy chrzanowej przekształca się w barwnik oznaczany fotometrycznie. Zestaw analityczny „Alkotest” został opracowany i opatentowany w Instytucie Biologii Komórki Państwowej Akademii Nauk Ukrainy [4]. W zaproponowanej modyfikacji w trakcie analizy z zastosowaniem peroksydazy wykorzystywana jest zmniejszona 10 do 20-krotnie ilość chromogenu TMB, a reakcja zatrzymywana jest przez dodawanie do mieszaniny reakcyjnej kwasu solnego o pH 1,4 - 2,1. W porównaniu z innymi metodami ten wariant analizy wykazuje szereg zalet tj. zwiększenie czułości (7-krotne), dokładność analizy [5] oraz zmniejszenie kosztów analizy, ponieważ AO zestawu „Alkotest” jest izolowana z komórek zmutowanego szczepu drożdży metylotroficznych *Hansenula polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). Mutant ten ma całkowicie zablokowaną produkcję katalazy i jest zdolny do ciągłej syntezy oksydazy alkoholowej podczas hodowli na podłożu mineralnym z glukozą [1].

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności zastosowania metody enzymatycznej i odpowiedniego zestawu analitycznego „Alkotest” do analizy ilościowej zawartości etanolu w winach, napojach owocowych i sokach.

Material i metody badań

Do badań użyto napojów owocowych i soków firm: Tymbark, Cappy, Fortuna, Hortex, win owocowych: Specjał, Cezar, Canelli, Waldwein, Nalewka Babuni, a także napojów winopodobnych tj. Truskawkowa beczka i Lipa miodowa oraz miód pitny i piwo bezalkoholowe.

Oznaczanie zawartości etanolu w badanych próbach prowadzono z użyciem zestawu analitycznego „Alkotest” o następującym składzie:

- chromogen – sucha mieszanina 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) ze składnikami buforu fosforanowego,
- enzymy – stabilizowana zawiesina oksydazy alkoholowej (AO) i peroksydazy chrzanowej w siarczanie amonu,
- standard – wzorcowy roztwór etanolu o stężeniu 10 g/l w obecności stabilizatora,
- 0,8 M HCl – odczynnik stosowany do zatrzymywania reakcji.

Do produkcji AO – komponentu zestawu „Alkotest” – wykorzystano pozbawiony aktywności katalazy szczep mutantu drożdży metylotroficznych z uszkodzoną kataboliczną represją glukozową *Hansenula polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). AO izolowano z bezkomórkowego ekstraktu *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) przez strącanie siarczanem amonu w obecności 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,5 i 2,5 mM EDTA. Do ekstraktu dodawano siarczan amonu (do 50 % nasycenia). Mieszaninę pozostawiano na 12 h w temp. 4 °C do całkowitego rozpuszczenia soli. Osad białek oddzielano przez wirowanie (10 tys. obr./min, 4 °C, 15 min), a supernatant zawierający AO traktowano (NH₄)₂SO₄ (do 70 % nasycenia). Po wirowaniu osad AO po dwukrotnym przepłukaniu schłodzonym 2,84 M roztworem siarczanu amonu z 2,5 mM EDTA zawieszano w minimalnej objętości tego roztworu i przechowywany w temp. -10 °C.

Przebieg oznaczania etanolu prowadzono zgodnie z metodą Gonchar i wsp. [3].

Aktywność AO oznaczano na podstawie ilości (μmole) nadtlenu wodoru wytwarzanego w ciągu 1 min w przeliczeniu na 1 mg białka. Mieszanina reakcyjna zawierała 2,5 ml 0,3 mM *o*-dianizydyny w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7,5, 0,2 ml peroksydazy chrzanowej (1 mg/ml), 0,15 ml ekstraktu bezkomórkowego rozcieńczonego 100-krotnie. Mieszaninę inkubowano 5 min w temp. 30 °C, a następnie dodawano 0,15 ml 0,2 M metanolu. Całość inkubowano przez 20 min w temp. 30 °C. Reakcję zatrzymywano 0,8 M kwasem solnym. Nadtlenek wodoru analizowano spektrofotometrycznie przez oznaczanie ilości barwnego produktu utleniania *o*-dianizydyny w obecności peroksydazy przy długości fali $\lambda = 525$ nm.

Rozcieńczenia analizowanych próbek win (250×, 500×, 750×, 1000×, 1250× lub 1500×) wykonywano w zależności od oczekiwanej zawartości etanolu. Reakcje prowadzono w reżimie czasowym. Do 100 μl każdego rozcieńczenia badanej próby dodawano 3,5 ml mieszaniny chromogenu z enzymami w odstępach co 15 s. Reakcję hamowano po 15 min poprzez dodawanie 0,5 ml 0,8 M HCl do każdej próbki w tej samej kolejności i interwałach czasowych. W każdej serii wykonywano także próby kontrolne (dodawanie wody zamiast próbki) i próby wzorcowe (dodawanie standardowego roztworu etanolu zamiast próbki). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm wobec próby kontrolnej.

Oprócz standardowego oznaczania zawartości etanolu w próbkach metodą AOP z wykorzystaniem zestawu „Alkotest” zastosowano także jej modyfikację „Multiple Addition Test”. Metoda ta polegała na dodawaniu do oznaczonej objętości badanego wina w rozcieńczeniu 500× (100 μl) różnych ilości standardu etanolu (w celu wewnętrznej kalibracji na tle próbki badanej) i następnym oznaczeniu alkoholu według opisanej wyżej metody.

Do porównania wyników uzyskanych z metody AOP w modyfikacji „Multiple Addition Test” wykorzystano referencyjną metodę chromatografii gazowej (GC): Chromatograf LCM-80, kolumna 200×0,3 cm, detektor – katarometr. Do fiolki penicy-

linowej z 0,5 ml 50 % kwasu trójchlorooctowego (TCA) dodawano 0,5 ml badanej próbki. Fiolkę zamykano i wstrząsano. Za pomocą strzykawki dodawano 0,3 ml 30 % azotanu(III) sodu i po wymieszaniu 2 ml fazy gazowej wprowadzano do chromatografu. Jako standard wewnętrzny używano propanol; 2 ml 4 ‰ [g/l] propanolu mieszano z 2 ml badanej próbki i 1 ml mieszaniny dodawano do fiolki penicylinowej z 0,5 ml 50 % TCA. Po zamknięciu fiolki dodawano strzykawką 0,3 ml 30 % NaNO₂. Po 1 min mieszania, 2 ml fazy gazowej wstrzykiwano do chromatografu. Krzywą kalibracyjną wyznaczono z wykorzystaniem 1, 2, 3, 4 i 6 ‰ wodnego roztworu etanolu. Stężenie etanolu oznaczano na podstawie wysokości pików azotanu(III) etylu.

Wyniki i dyskusja

Wykorzystanie zestawu „Alkotest” w przeprowadzanych badaniach umożliwiło przeanalizowanie zawartości alkoholu w polskich winach owocowych, jak również w napojach i sokach owocowych.

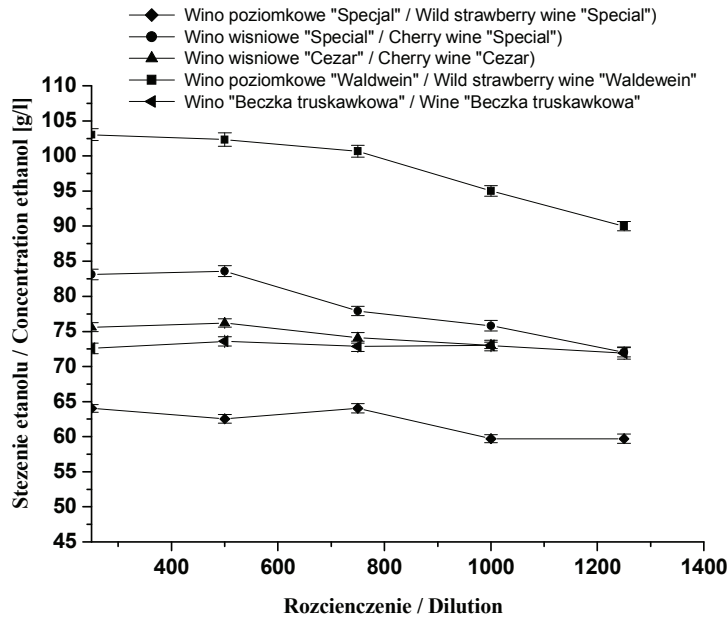
Wykorzystując metodę AOP do analizy zawartości etanolu nie prowadzi się destylacji alkoholu, która może eliminować komponenty wina czy soku, negatywnie wpływające na przebieg reakcji enzymatycznej. Do takich składników win należą np. fenole zakłócające działanie enzymów, substancje redukujące oraz pigmenty, które mogą być przyczyną uzyskania nieprawidłowych wyników.

Wina czerwone zawierają dużo fenoli, które podczas analizy mogą być utleniane przez H₂O₂, powstający w reakcji AO z etanolem w obecności peroksydazy. W takim przypadku reakcja utlenienia chromogenu TMB przez peroksydazę może konkurować z reakcją utleniania fenoli wina, co w konsekwencji może prowadzić do błędnych wyników. Warto zaznaczyć, że wpływ czerwonego wina na przebieg analizy etanolu jest bardziej istotny w porównaniu z winem białym. Zjawisko to tłumaczy się wyższym stężeniem pochodnych fenoli w winach czerwonych [12].

W celu potwierdzenia ewentualnego, negatywnego wpływu specyficznego składu chemicznego różnych win, soków i napojów owocowych na wyniki oznaczeń zawartości alkoholu, przeprowadzono stosowne analizy.

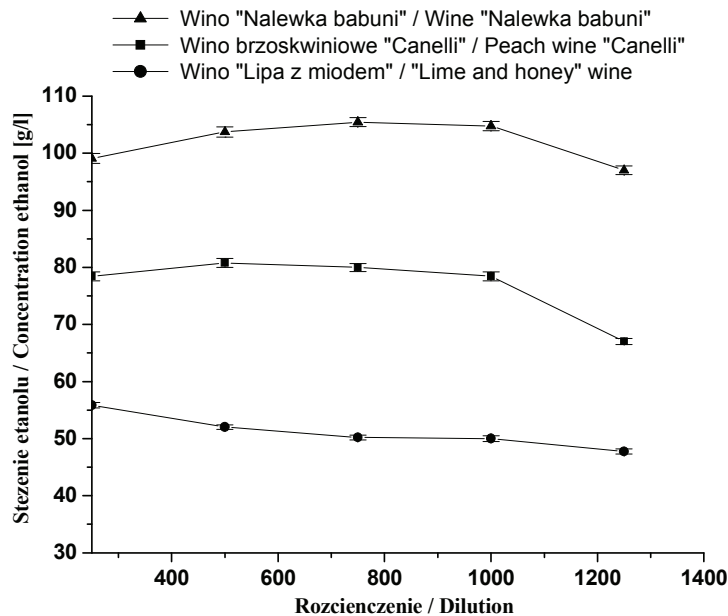
Pierwszym etapem badań było oznaczenie zawartości alkoholu w badanych winach ze standardowym wykorzystaniem zestawu enzymatycznego „Alkotest” w celu sprawdzenia przypuszczenia o możliwym negatywnym wpływie komponentów analizowanych produktów na wyniki oznaczania zawartości alkoholu. Na rys. 1. i 2. przedstawiono stężenia alkoholu w winach owocowych czerwonych i białych, odpowiednio, w zależności od ich rozcieńczenia.

Nie wykryto znacząco negatywnego wpływu chemicznego składu win na obliczone zawartości alkoholu, ponieważ w przypadku mniejszego rozcieńczenia, kiedy można oczekiwać największego negatywnego wpływu komponentów napojów na analizę enzymatyczną, te stężenia prawie nie zmniejszają się we wszystkich badanych



Rys. 1. Stężenie etanolu w winach czerwonych owocowych w zależności od rozcieńczenia próbek.

Fig. 1. Ethanol concentration in red fruit wines depending on the dilution of samples.



Rys. 2. Stężenie etanolu w winach białych owocowych w zależności od rozcieńczenia próbek.

Fig. 2. Ethanol concentration in white fruit wines depending on the dilution of samples.

Tabela 1

Stężenie etanolu w wybranych winach owocowych oznaczone metodami: rutynową AOP, „Multiple Addition Test”, techniką chromatografii gazowej.

Ethanol concentration in selected fruit wines as determined using the following methods: AOP routine method, „Multiple Addition Test”, and gas chromatography.

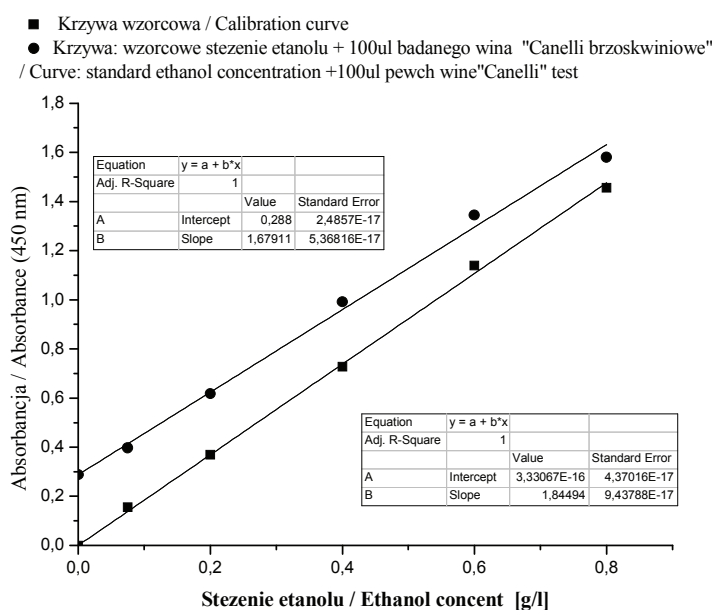
Wino Wine	Metoda / Method						
	Stężenie etanolu / Ethanol concentration [%]			Różnica wyników oznaczenia Difference in determination results			
	Rutynowa metoda AOP AOP Rou- tine Method	Multiple Addition Test (MAT)	Chromatografia gazowa / Gas Chromatography (GC)	Rutynowa AOP-GC AOP-GC Routine	MAT-GC	Test istotności różnicy Significance Test on Difference	
AOP-GC						MAT- GC	
Wino brzoskwiniowe „Canelli” / Peach Wine „Canelli”	9,80 ± 0,50 N = 4	8,63 ± 0,43 N = 4	9,02 ± 0,11 N = 4	+0,72	-0,39	t = 3,05; p ≤ 0,05	t = 1,76; p ≤ 0,2
Wino poziomkowe „Special” Wild strawberry wine „Special”	9,22±0,46 N=4	9,94 ± 0,53 N=4	8,52 ± 0,11 N = 4	+0,70	+1,42	t = 2,97 p ≤ 0,05	t = 5,24; p ≤ 0,002

próbkach. Odwrotnie, występuje zmniejszenie obliczonego (rys. 1 i 2) stężenia alkoholu w miarę rozcieńczenia, co oczywiście, może wynikać z błędu odczytu małych wartości absorbancji w rozcieńczonych próbkach z bardzo małym stężeniem alkoholu.

W drugim etapie badań dokonano porównywania wyników oznaczania zawartości alkoholu w czerwonych i białych winach owocowych otrzymanych za pomocą rutynowej metody AOP oraz modyfikacji „Multiple Addition Test” (MAT) (rys. 3 i 4). Liniowość wykresu w obydwu metodach jest bardzo dobra (współczynniki korelacji liniowej wynoszą odpowiednio $r = 0,9976$ ($p < 0,0001$) w przypadku win czerwonych i $r = 0,9974$ ($p < 0,0001$) win białych. Krzywe kalibracyjne rutynowej metody i MAT mają podobne wartości nachylenia tj. odpowiednio 1,679 i 1,845 – w przypadku win czerwonych oraz 1,678 i 1,845 – w przypadku win białych. Różnice między współ-

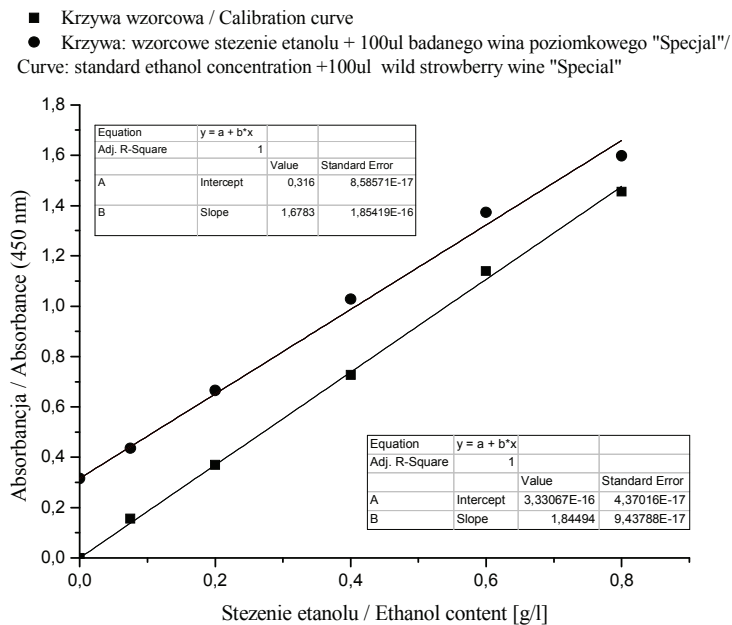
czynnikami kalibracyjnymi rutynowej metody i metody MAT nie przekraczają 9,0 %. Stężenia etanolu uzyskane z użyciem obydwóch metod są zgodne (tab. 1). Dane te, a także bardzo bliski do równoległego charakter krzywych kalibracyjnych wskazują, że obecność substancji potencjalnie hamujących w winach owocowych czerwonych i białych w nieznacznym sposób wpływają na przebieg reakcji utleniania TMB przez peroksydazę.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono oznaczenie zawartości alkoholu w badanych próbkach za pomocą chromatografu gazowego (GC), która wykazała niewielkie różnice stężeń etanolu w porównaniu z metodą enzymatyczną. Stężenie etanolu mierzone techniką GC w próbkach wina czerwonego i białego wynosiło odpowiednio 8,52 i 9,02 %, natomiast w modyfikacji „Multiple Addition Test” (MAT) w winie czerwonym 9,94 %, a białym 8,63 % (tab. 1). Porównanie różnicy wyników rutynowej metody AOP i MAT w odniesieniu do GC wykazało, że MAT nie cechuje się lepszą korelacją wyników analitycznych w porównaniu z rutynową AOP (test istotności różnicy p waha się od 0,002 do 0,2 w zależności od typu wina; tab. 1). W związku z powyższym można stwierdzić, że do seryjnych oznaczeń alkoholu w winach (białych i czerwonych) zasadne jest stosowanie mniej skomplikowanego rutynowego wariantu analizy, który nie wymaga wewnętrznej kalibracji.



Rys. 3. Zawartość etanolu w białym winie owocowym „Camelli brzoskwiniowe” metodą “Multiple Addition Test”.

Fig. 3. Ethanol content in white peach wine “Camelli” by “Multiple Addition Test” method.



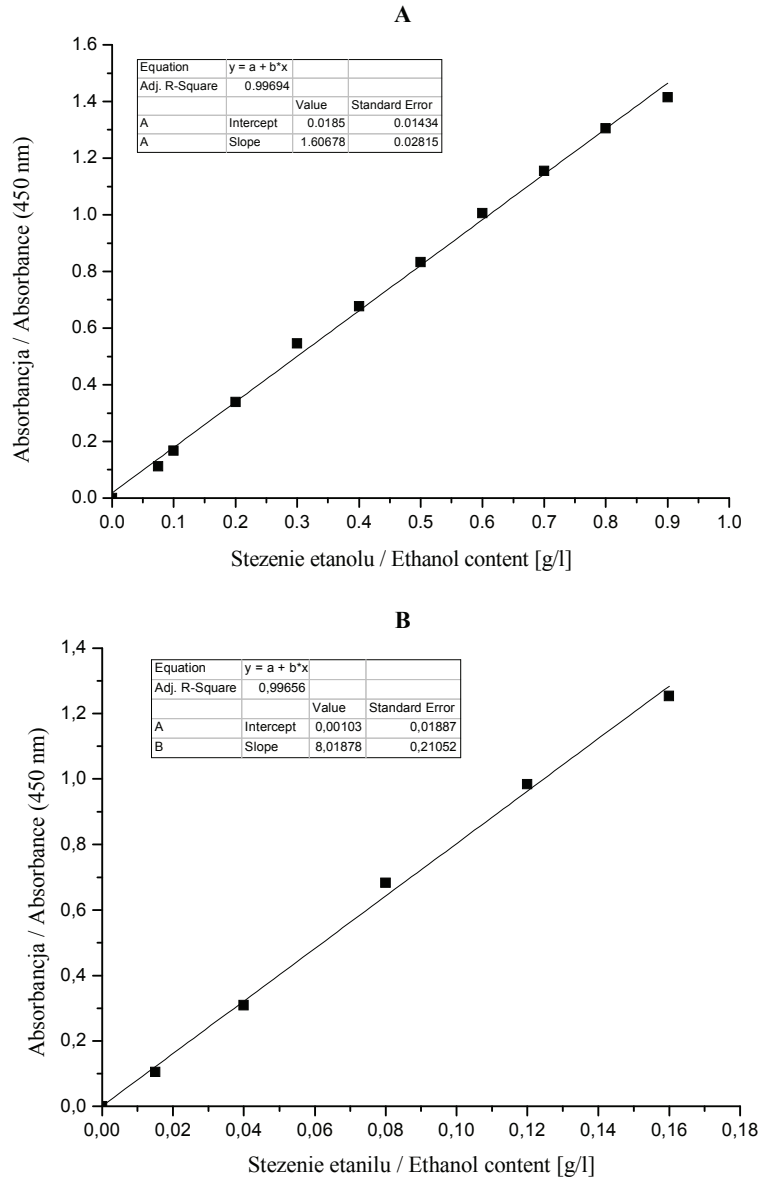
Rys. 4. Zawartość etanolu w czerwonym winie owocowym „Special wiśniowe” metodą „Multiple Addition Test”.

Fig. 4. Ethanol content in red cherry wine “Special” by „Multiple Addition Test” method.

W tab. 1. przedstawiono zastosowane metody oznaczania stężenia alkoholu w wybranych białych i czerwonych winach owocowych.

W celu zwiększenia czułości metody oznaczanie zawartości etanolu w sokach i napojach bezalkoholowych wykonano z dodatkiem 5-krotnie wyższego stężenia enzymów. Przy wykorzystaniu rutynowego wariantu metody AOP, liniowość krzywej kalibracyjnej była zachowana do stężenia analitu 0,9 g/l (rys. 5A). Przy 5-krotnym zwiększeniu stężenia enzymów (AO i PO) w mieszaninie reakcyjnej (rys. 5B) zaobserwowano również 5-krotne zwiększenie nachylenia krzywej kalibracyjnej (8,02 vs. 1,61), czego można było oczekiwać na podstawie zakończenia reakcji enzymatycznej na etapie 5-10 % enzymatycznego przekształcenia analitu [2]. Przy zastosowaniu takiej metody w badanych sokach i napojach bezalkoholowych wykryto śladowe ilości alkoholu, co nie jest możliwe z wykorzystaniem standardowej metody. Ten wariant metody mimo użycia większej ilości enzymów wykazuje 5-krotnie wyższą czułość (tab. 2).

Zaletami enzymatycznej metody z zastosowaniem zestawu „Alkotest” są dobre właściwości analityczne, wysoka stabilność i powtarzalność wyników, co pozwala na wykorzystanie zestawu do kontroli zawartości etanolu w czerwonych i białych winach owocowych, jak również w sokach i napojach bezalkoholowych.



Rys. 5. Krzywe kalibracyjne do oznaczania etanolu metodą AOP. A – w warunkach standardowych; B – z 5-krotnym stężeniem enzymów.

Fig. 5. Calibration curves to be used in determining ethanol using AOP method. A – under standard conditions; B – using a 5-fold higher concentration of enzymes.

Tabela 2

Stężenie etanolu w sokach i napojach bezalkoholowych metoda rutynową AOP i z udziałem 5-krotnego stężenia enzymów.

Ethanol concentration in juices and non-alcoholic beverages using AOP routine method and with the addition of 5-fold higher concentration of enzymes.

Soki i napoje bezalkoholowe Juices and non-alcoholic beverages	Napój truskawkowy „Cappy” Strawberry drink „Cappy”	Sok jabłkowy Antonówka „Fortuna” Apple juice Antonówka „Fortuna”	Malinowa pasja „Karmi” Raspberry passion „Karmi”	Piwo bezalkoholowe „TESKO” Non-alcoholic beer „TESCO”
Stężenie etanolu – metoda rutynowa AOP Ethanol concentration – AOP routine method [%]	0,035 ± 0,003	0,024 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,005 ± 0,0005
Stężenie etanolu z 5-krotnym stężeniem enzymów Ethanol concentration at 5-fold higher enzyme concentration [%]	0,068 ± 0,004	0,043 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,049 ± 0,003

Wnioski

1. Metoda enzymatyczna AOP z zastosowaniem „Alkotestu” pozwala na określenie z dużą dokładnością zawartości etanolu w winach owocowych, jak również w sokach i napojach bezalkoholowych. Cechuje ją wysoka czułość bardzo dobra liniowość w szerokim zakresie stężeń analitu.
2. Zastosowanie „Alkotestu” znacznie ułatwia oznaczanie stężenia etanolu, a analiza jest mniej czaso- i pracochłonna.
3. Porównanie rutynowej metody „Alkotest” i jej modyfikacji „Multiple Addition Test” wykazało brak istotnego wpływu hamujących komponentów występujących w winach owocowych, które działałyby negatywnie na wyniki oznaczania stężenia etanolu.
4. Porównywanie metody „Multiple Addition Test” z referencyjną metodą GC wykazało nieznaczne różnice zawartości etanolu w badanych próbach.
5. Zwiększenie 5-krotne stężenia enzymów w porównaniu z rutynową metodą „Alkotest” pozwoliło na wykrycie śladowych zawartości etanolu w badanych sokach, napojach oraz w piwie bezalkoholowym.

Literatura

- [1] Davin A., Vion-Dury J., Viout P., Cozzone P.J.: Rapid evaluation of ethanol content and metabolism in human plasma using quantitative proton magnetic resonance spectroscopy. *Alkohol*, 1994, **29**, 479-483.

- [2] Eienthal R., Danson M.J.: Enzyme Assays. Ed. Univ. Press, Oxford 2002, p. 302.
- [3] Gonchar M.V., Maidan M.M., Pavlishko H.M., Sibirny A.A.: A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. Food Technol. Biotechnol., 2001, **39** (1), 37-42.
- [4] Gonchar M.V., Maidan M.M., Sibirny A.A.: Sposob kilkisnoho wyznaczenia perekysu wodniu ta substrativ oksydaz u biologicznych objektach. Patent Ukrainy, 1996, 10752, Bull. N4.
- [5] Gonchar M.V., Sibirny A.A.: Sposob opredelenija perekisi wodoroda w biologicznych objektach. Awtorskoe svidetelstvo (patent) SSSR, 1991, 1636772. Bull. Izobretenij N11.
- [6] Helrich K.: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Arlington, 1990, **2**, 739-745.
- [7] Holland V., Saunders B., Rose F., Walpole A.: A safer substitute for benzidine in the detection of blood, Tetrahedron, 1974, **30**, 3299-3302.
- [8] Jain N.C., Cravey R.H.: Analysis of alcohol. II. A review of gas chromatographic methods. J. Chromatogr. Sci., 1972, **10**, 263-267.
- [9] Mekhuzl N.A.: W: Sbornik mezhdunarodnykh metodov analiza i otsenki vin i susel (Collected Book of International Methods of Analysis and Estimation of Wines and Musts), Pishchevaya Promyshlennost, Moscow 1993, pp. 38-61.
- [10] Pavlishko H. M., Ryabinina O.V., Zhilyakova T. A., Sakharov I.Yu., Gerzhikova V.G, Gonchar M.V.: Oxidase-peroxidase method of ethanol assay in fermented musts and wine products. Applied Biochem. Microbiol., 2005, **41**, 604-609.
- [11] PN-90 A-79120/04. Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego.
- [12] Somers T.C., Verette E.: Phenolic composition of natural wine types. In: Modern Methods of Plant Analysis. Linskeus H.F. and Jackson J.F. (Eds.). Springer, Berlin 1988, pp. 219-257.

DETERMINING THE CONTENT OF ETHANOL USING ENZYMATIC METHOD IN ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC BEVERAGES

S u m m a r y

The objective of the study was to assess the usefulness of enzymatic method and analytical „Alkotest” kit applied to perform a quantitative analysis of the ethanol content in wines, fruit drinks and juices, meads, and non-alcoholic beer. Based on the assessment results obtained, the usefulness of the enzymatic method was proved as regards its application in determining the ethanol content in the products under analysis. The method used is considerably less expensive compared to other enzymatic methods because of the low costs of alcohol oxidase preparation (AO) produced from a *Hansenula polymorpha* C-105 (*gcr 1 catX*), a mutated methylotrophic yeast strain with the disturbed catabolic repression of the AO synthesis. It was proved that the different chemical compositions of fruit wines and juices slightly impacted the determination of the content of alcohol therein. Based on the comparison of the „Alkotest” method and its modified „Multiple Addition Test” version, it was possible to state that there was no significant negative effect of components contained in fruit wines on the determination results of the ethanol concentration. The application of the „Multiple Addition Test” and Gas Chromatography (GC) methods confirmed the above conclusion. The results achieved from comparing the two methods were comparable, and the correlation coefficients amounted to, respectively, 0.997 at $p < 0.0001$ for red fruit wines and 0.998 at $p < 0.0001$ for white fruit wines.

Key words: alcohol, alcohol oxidase, fruit wines, fruit drinks, juices ☒