

Ergebnisprotokoll Versuch 22

Bestimmung der Phenolaseaktivität in Kartoffelpreßsaft

1. Stichworte

- Phenolasen (*Monophenolasen, Diphenolasen, natürliche Bedeutung*)
- Messmethoden (*Sauerstoffelektrode, Proteinbestimmung nach Lowry-Potty*)

2. Einleitung

Die Phenolaseaktivität eines Kartoffelpreßsaftes soll mithilfe einer Sauerstoffelektrode anhand der Umsetzung von Brenzkatechin respektive Tyrosin bestimmt werden. Ferner soll der Einfluß von Hitze, Komplexbildnern und durch eine Proteinbestimmung nach *Lowry-Potty* die spezifische Aktivität der untersuchten Phenolasen ermittelt werden.

3. Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde nach den Angaben des Praktikumsskriptes¹ und nach Anweisung des Assistenten durchgeführt. Lediglich das Erhitzen des Kartoffelpreßsaftes zur Denaturierung der Phenolasen fand bei 60 anstatt 100 Grad Celsius statt.

4. Messdaten

4.1 Bestimmung der Phenolaseaktivität mit einer Sauerstoffelektrode

| | Versuchsbeschreibung | Polarogramm | |
|---|---|-------------|-----------|
| | | Amplitude | Strecke* |
| | Kalibrierung der Sauerstoffelektrode | 12,6 cm | 0,2 cm |
| 1 | Basisstrom ohne Substratzugabe | – | – |
| 2 | Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz | 10,2 cm | 1,6 cm |
| 3 | Phenolaseaktivität bei Tyrosinumsatz | 2,7 cm | † 0,01 cm |
| 4 | Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 57µM KCN | 4,2 cm | 1,2 cm |
| 5 | Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 114µM KCN | 1,0 cm | 1,3 cm |
| 6 | Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 142µM KCN | – | – |
| 7 | Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Brenzkatechinumsatz | 3,8 cm | 0,3 cm |
| 8 | Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Tyrosinumsatz | 3,8 cm | † 0,01 cm |

† Annahme, da Wert graphisch nicht ermittelbar.

* Papiervorschub für Messung drei, sieben und acht 10cm/h, sonst 100cm/h – siehe auch Praktikumsskript¹!

4.2 Proteinbestimmung nach *Lowry-Potty*

| | Verdünnung | Absorbtion | |
|------------------------------------|------------|------------|------------|
| | | Messung I | Messung II |
| Folin-Reagenz | 1:10 | 0,639 | 0,621 |
| | 1:20 | 0,211 | 0,212 |
| | 1:50 | 0,093 | 0,099 |
| | 1:100 | 0,049 | 0,045 |
| Folin-Reagenz CuSO ₄ | 1:10 | 1,434 | 1,490 |
| | 1:20 | 0,716 | 0,746 |
| | 1:50 | 0,400 | 0,435 |
| | 1:100 | 0,254 | 0,247 |

5. Auswertung der Messdaten

5.1 Auswertung Phenolaseaktivität

$$n[\text{O}_2] = \frac{\text{Amplitude}_{\text{Versuch}_n}}{\text{Amplitude}_{\text{Kalibrierung}}} \cdot 0,253 \frac{\mu\text{mol O}_2}{\text{ml}} \cdot 1,6 \text{ ml} = \frac{\text{Amplitude}_{\text{Versuch}_n}}{\text{Amplitude}_{\text{Kalibrierung}}} \cdot 0,405 \mu\text{mol O}_2$$

$$t = \frac{\text{Strecke}_{\text{Versuch}_n}}{\text{Papiervorschub}} \cdot 60 \frac{\text{min}}{\text{h}} = \frac{\text{Strecke}_{\text{Versuch}_n}}{\left[100 \frac{\text{cm}}{\text{h}} \text{ resp. } 10 \frac{\text{cm}}{\text{h}} \right]} \cdot 60 \frac{\text{min}}{\text{h}}$$

| Versuchsbeschreibung | Polarogramm | |
|---|-----------------------|------------|
| | O ₂ [μmol] | Zeit [min] |
| Kalibrierung der Sauerstoffelektrode | 0,405 | 0,12 |
| Basisstrom ohne Substratzugabe | – | – |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz | 0,328 | 0,96 |
| Phenolaseaktivität bei Tyrosinumsatz | 0,087 | 0,06 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 57μM KCN | 0,135 | 0,72 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 114μM KCN | 0,032 | 0,78 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 142μM KCN | – | – |
| Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Brenzkatechinumsatz | 0,122 | 1,8 |
| Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Tyrosinumsatz | 0,122 | 0,06 |

5.2 Auswertung Proteinbestimmung

| Verdünnung | Mittlere Absorptionsdifferenz |
|------------|-------------------------------|
| 1:70 | 0,832 |
| 1:140 | 0,521 |
| 1:350 | 0,322 |
| 1:700 | 0,204 |

→ Im linearen Bereich der Kalibriergeraden.

$$\beta_{\text{Protein}} = [\text{Proteingehalt aus Kalibriergerade für } D_E = 0,204] \cdot 700$$

Unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet sich der Proteingehalt des Kartoffelpreßsaftes auf 198,1mg Protein pro Milliliter.

6. Berechnung der relativen und spezifischen Phenolaseaktivität

$$A_{\text{rel}} = \frac{n[\text{O}_2]_{\text{Versuch}_n}}{t_n \cdot \text{Probenvolumen}} = \frac{n[\text{O}_2]_{\text{Versuch}_n}}{t_n \cdot 1,6 \text{ ml}}$$

$$A_{\text{spez}} = \frac{n[\text{O}_2]_{\text{Versuch}_n}}{t_n \cdot \text{Proteingehalt}_{200\mu\text{l}}} = \frac{n[\text{O}_2]_{\text{Versuch}_n}}{t_n \cdot 198,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot 0,2 \text{ ml}} = \frac{n[\text{O}_2]_{\text{Versuch}_n}}{t_n \cdot 39,6 \text{ mg}}$$

| Versuchsbeschreibung | Phenolaseaktivität | |
|---|---|--|
| | A_{rel} $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$ | A_{spez} $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$ |
| Basisstrom ohne Substratzugabe | – | – |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz | 0,21 | 8,6 |
| Phenolaseaktivität bei Tyrosinumsatz | 0,91 | † 36,6 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 57μM KCN | 0,12 | 4,7 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 114μM KCN | 0,03 | 1,0 |
| Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz unter Einwirkung von 142μM KCN | – | – |
| Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Brenzkatechinumsatz | 0,04 | 1,7 |
| Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Tyrosinumsatz | 1,27 | † 51,3 |

† Diese Werte können aufgrund der Annahme unter 4.1 nur bedingt ausgewertet werden.

7. Diskussion der Versuchsergebnisse

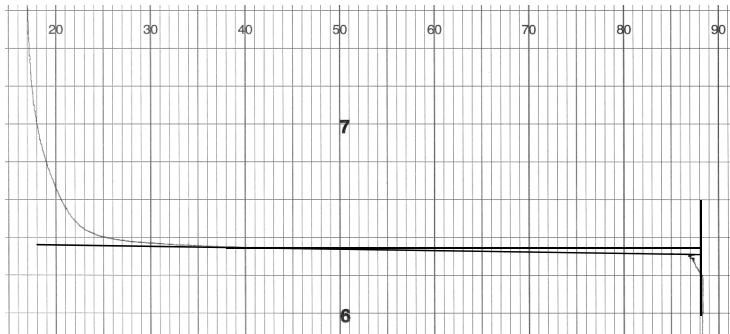
Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phenolase durch Cyanid konnte gezeigt werden. Grund dafür ist die Komplexbildung des katalytischen Kupferatoms im Zentrum der Phenolase, die infolgedessen den Elektronentransport zwischen Sauerstoff und Substrat über die Oxidationsstufe +I nicht mehr gewährleisten kann. Am Umsatz von Brenzkatechin konnten wir zeigen, dass die Aktivität der Phenolase durch Erhitzen auf 60°C für 10 Minuten deutlich verringert wird. Eine vollständige Denaturierung und damit Inaktivierung der Phenolase im Kartoffelpreßsaft konnten wir bei dieser Temperatur nicht erzielen. Ein Vergleich der Substrate Tyrosin und Brenzkatechin ist mit den von uns gewonnenen Daten nicht möglich, da wir bei der Umsetzung von Tyrosin die 4fache Substratmenge einsetzen mußten. Bei Einsatz äquivalenter Substratmengen konnte kein Tyrosinumsatz erzielt werden.

8. Quellen

- 1 Arbeitsunterlagen zum Praktikum Pharmazeutische Biologie III SS 2004
 Methoden der phytochemischen Untersuchung, Pharmazeutische Biologie
 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Fassung SS 2004

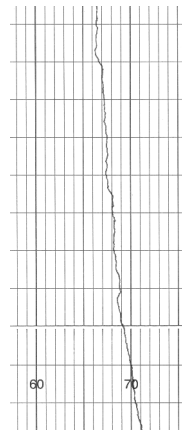
Alle Abbildungen im Maßstab 1:2

Kalibrierung der Sauerstoffelektrode



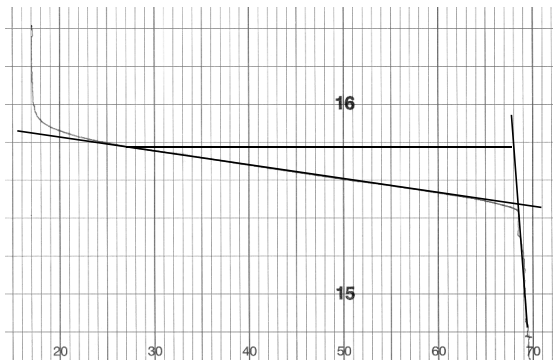
12,6 cm \equiv 0,405 $\mu\text{mol O}_2$

Messung des Basisstromes



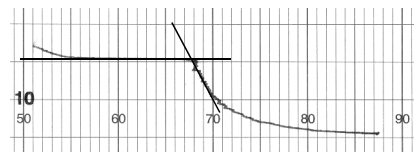
Kein sprunghafter Sauerstoffumsatz

Messung der Phenolaseaktivität bei Brenzkatechinumsatz



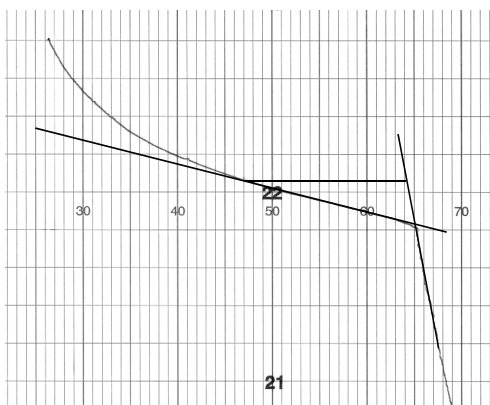
10,2 cm \equiv 0,328 $\mu\text{mol O}_2$

Messung der Phenolaseaktivität bei Tyrosinumsatz



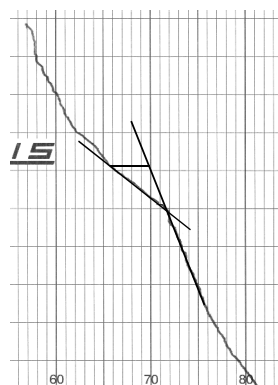
2,7 cm \equiv 0,087 $\mu\text{mol O}_2$

Messung der Phenolaseaktivität unter Einwirkung von 57 $\mu\text{M KCN}$



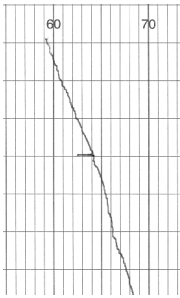
4,2 cm \equiv 0,135 $\mu\text{mol O}_2$

Messung der Phenolaseaktivität unter Einwirkung von 114 $\mu\text{M KCN}$



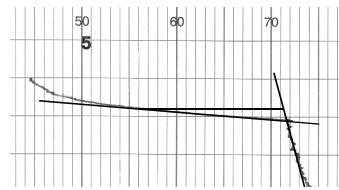
1,0 cm \equiv 0,032 $\mu\text{mol O}_2$

Messung der Phenolaseaktivität unter Einwirkung von $142\mu\text{M KCN}$



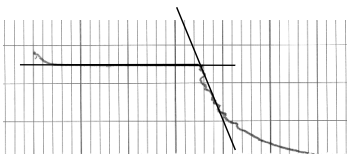
Kein sprunghafter Sauerstoffumsatz

Messung der Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Brenzkatechinumsatz



$3,8\text{ cm} \equiv 0,122\ \mu\text{mol O}_2$

Messung der Phenolaseaktivität nach Erhitzen bei Tyrosinumsatz



$3,8\text{ cm} \equiv 0,122\ \mu\text{mol O}_2$

Exemplarische Darstellung des Auswertevorgehens

