

Príspevok k stanoveniu pyrokatechín-oxydázovej aktivity

P. KOVÁCS

Katedra biochémie a mikrobiológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

Stanovenie aktivity fenolázového komplexu patrí medzi metódy často používané v rastlinnej biochémii [1 — 3]. Celkove ich delíme na dve skupiny: na priame a nepriame [4, 5]. Jednou z najrozšírenejších nepriamych metód na stanovenie pyrokatechín-oxydázovej aktivity je chronometrická metóda C. R. Dawsona a spolupracovníkov [6]. Je založená na sledovaní ubúdania rôznych presne definovaných množstiev kyseliny L-askorbovej z inkubátu, ktorý sa skladá z enzýmového preparátu, z tlmivého systému, z pyrokatechínu ako substrátu a z kyseliny L-askorbovej, ktorej oxydácia sa počas stanovenia sleduje. Čas, za ktorý sa prítomná kyselina L-askorbová premení vznikajúcimi chinónmi na kyselinu dehydroaskorbovú, sledujú uvedení autori kontinuálnym prikvapávaním inkubačnej zmesi do okysleného roztoku jodidu draselného, škrobového mazu a pyrogalolu. V okamihu objavenia chinoidných látok, produktov enzýmovej oxydácie pyrokatechínu, vzniká z jodidov jód, čo sa prejaví tvorbou modrého obláčika v indikačnom roztoku. Registráciou času, za ktorý sa uvedené modré sfarbenie objaví, súčasne sa zistí aj čas spotreby prítomného množstva kyseliny L-askorbovej. Presnosť stanovenia tohto času udávajú autori [7] napríklad $60,4 \pm 0,35$ sekúnd pri $n = 4$. Z nameraných časových údajov sa potom vypočíta enzýmová aktivita [6].

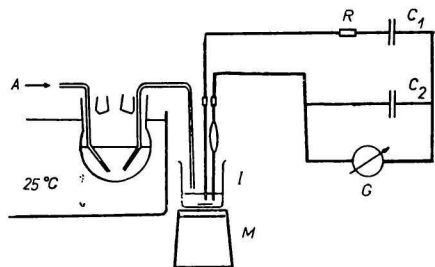
Pri aplikácii uvedenej metódy na sledovaný materiál — rôzne sfarbené homogenáty listia vřby, ako aj pripravené enzýmové preparáty zo zemiakov — sa ukázalo, že je obťažné objektívne zachytiť objavenie modrého sfarbenia v indikačnom roztoku pozorovaním voľným okom, pričom za použitia sfarbených enzýmových preparátov je to ešte ťažšie a nepresnejšie.

Pokúsili sme sa preto objektívne zachytiť čas, potrebný na zoxydovanie pridaného množstva kyseliny L-askorbovej za použitia potenciometrickej indikácie pomocou lesklej platinovej elektródy a nasýtenej kalomelovej elektródy typu A (Laboratorní potřeby, n. p.) (obr. 1).

Experimentálna časť

Stanovenie enzýmovej aktivity

Enzýmové preparáty — homogenáty vřbového listia v citrátovom-fosfátovom tlmivom roztoku 0,02 M o pH 5,1 a preparát pripravený zo zemiakov podľa [8].



Obr. 1. Schematické znázornenie zapojenia pri potenciometrickom stanovení pyrokatechín-oxydázovej aktivity.

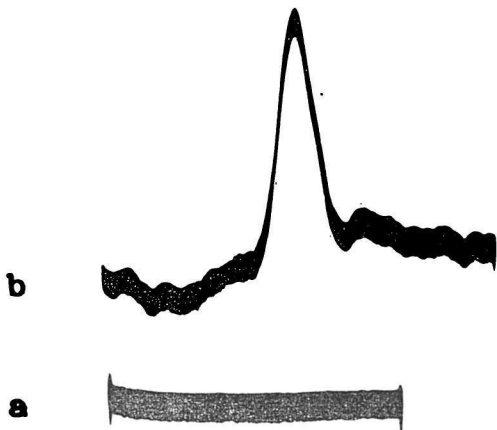
A — vzduch, I — indikačná nádoba, M — elektromagnetická miešačka, G — registračný zrkadlový galvanometer, R a C — odpor, resp. kondenzátory s hodnotami: $R = 25 \text{ k}\Omega$, $C_1 = 12 \text{ }\mu\text{F}$, $C_2 = 300 \text{ }\mu\text{F}$.

Pyrokatechín — resublimovaný a 6 krát prekryštalizovaný. Pripravoval sa vždy čerstvý vo forme 2 % roztoku.

Kyselina L-askorbová — roztok sa pripravil vždy čerstvý podľa [6].

Objem v trojhrdlej banke sme do konštantného objemu 85 ml dopĺňovali destilovanou vodou. Do reakčnej banky, v ktorej bolo všetko okrem enzýmového preparátu, zaviedli sme kapilárnu trubicu a obsah banky sme za stáleho prebublávania vzduchom nechali 30 sekúnd prikvapkávať do indikačnej nádoby rýchlosťou dve kvapky za sekundu. V indikačnej nádobe bolo 40 ml destilovanej vody, ktorá sa premiešavala elektromagnetickým miešadlom. Po tomto čase sme začali registráciu pomocou zapojeného registračného zrkadlového galvanometra LG — 1—5 firmy GRW VEB z NDR, načo sme pridali aj enzýmový preparát.

Veľmi výhodným sa ukázalo deriváčné zapojenie — prvá derivácia priebehu zmien potenciálu [9]. Dostali sme tak na registračnom fotografickom papieri trvalé záznamy, z ktorých ukážku vidieť na obr. 2.



Obr. 2. Záznamy registračného galvanometra.

a) úsečka, udávajúca rýchlosť pohybu bubna s fotografickým papierom — 60 sekúnd; b) záznam pri meraní aktivity sledovaného enzýmu — maximum udáva čas, za ktorý sa zoxidovala kyselina L-askorbová.

Ak poznáme rýchlosť pohybu registračného bubna, môžeme vypočítať dobu objavenia maxima a tým i objavenia chinoidných látok v inkubáte. Dosiahli sme tak hodnoty so smerodajnou odchýlkou $38,4 \pm 0,16$ sekúnd pri $n = 5$. Ďalšie hodnotenie a výpočet aktivity sú už totožné s pôvodne uvedeným spôsobom [6].

Opísaná úprava pôvodnej metódy dovoľuje rýchlu sériovú analýzu i veľkého počtu sfarbených vzoriek so súčasťou možnosťou získania trvalých záznamov

nameraných hodnôt. Ako sa ukázalo pri predbežných pokusoch, bude sa dať výhodne využiť pri bližšom štúdiu reakčnej kinetiky sledovaných reakcií.

Používaním kyseliny L-askorbovej ako inertnej redoxnej látky pri stanovení aktivity fenolázového komplexu sa zaoberáme na inom mieste [10], kde poukazujeme na komplexnosť účinku tejto kyseliny na aktivitu fenolázového komplexu.

Na technickej spolupráci sa zúčastnila V. Hudcová.

Súhrn

Opisuje sa úprava chronometrickej metódy na stanovenie pyrokatechín-oxydázovej aktivity. Čas potrebný na zoxydovanie kyseliny L-askorbovej v priebehu enzýmovej reakcie v inkubáte sa meria pomocou lesklej platinovej a nasýtenej kalomelovej elektródy, ktoré vznik chinoidných produktov registrujú potenciálovým skokom. Zodpovedajúce výchylky zapojeného registračného zrkadlového galvanometra sa zaznamenávajú na fotografickom papieri. Získávajú sa tak trvalé a objektívne hodnotiteľné záznamy.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОКАТЕХИН-ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

П. Ковач

Кафедра биохимии и микробиологии Фармацевтического факультета
Университета имени Коменского,
Братислава

Описывается измененный метод хронометрического определения пирокateхин-оксидазной активности. Время, необходимое на окисление L-аскорбиновой кислоты при протекании энзимной реакции в инкубаторе, измеряется с помощью электрода из платины и насыщенного каломельного электрода, которые появление хиноидных продуктов регистрируют потенциальным скачком. Соответствующие отклонения подключенного регистрирующего зеркального гальванометра записываются на фотографическую бумагу. Таким образом получают постоянные и поддающиеся объективной оценке записи.

BEITRAG ZUR BESTIMMUNG DER BRENZCATECHIN-OXYDASEAKTIVITÄT

P. Kovács

Lehrstuhl für Biochemie und Mikrobiologie der Pharmazeutischen Fakultät
an der Komenský-Universität, Bratislava

Der Autor beschreibt eine Anordnung der chronometrischen Methodik für die Bestimmung der Brenzcatechin-Oxydaseaktivität. Die für die Oxydation der L-Ascorbinsäure im Verlauf der Enzymreaktion im Inkubat erforderliche Zeit wird unter Zuhilfenahme

einer Platin- und einer gesättigten Kalomelektrode gemessen, die die Entstehung von chinoiden Produkten durch einen Potentialsprung registrieren. Die entsprechenden Ausschläge des angeschalteten Registrationspiegelgalvanometers werden auf photographischem Papier registriert. Auf diese Weise erhält man dauernde und objektiv bewertbare Registrierungen.

LITERATÚRA

1. Tomaszewski M., *Post. Biochem.* **6**, 357 (1960).
2. Király Z., Farkas G. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **66**, 474 (1957).
3. Rubin B. A., *Ukrajn. biochim. ž.* **32**, 595 (1960).
4. Sisler E. C., Evans H. J., *Plant Physiol.* **33**, 255 (1958).
5. Kovács P., *Kandidátska dizertačná práca*. Karlova univerzita, Praha 1961.
6. Miller W. H., Mallette M. F., Roth L. J., Dawson C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 514 (1944); Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. II, 819. Academic Press, New York 1955.
7. Miller W. H., Dawson C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 3375 (1941).
8. Belozerskij A. N., Proskurjakov N. I., *Praktičeskoje rukovodstvo po biochimii rastenij*. Gosudarstvennoje izdatelstvo „Sovetskaja nauka“, Moskva 1951.
9. Berčík J., Tölgyessy J., *Potenciometria*. Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava 1957.
10. Kovács P., *Sborník II. celoštátnych biochemických dní*, 34. Starý Smokovec 1961; *Naturwiss.* **49**, 395 (1962).

Do redakcie došlo 12. 2. 1962

Adresa autora:

Inž. Peter Kovács, C. Sc., Katedra biochémie a mikrobiológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava, Kalinčiakova 8. •