

**Kohlenhydrate**

**Hemmung der  
Ethanolbildung aus Glucose  
(V 7)**

# Kohlenhydrate

## Hemmung der Ethanolbildung aus Glucose

Einige Enzymgifte wie z.B. Schwermetallionen und Oxidationsmittel hemmen die Aktivität bestimmter Enzyme, indem sie die für die Enzymkatalyse essentiellen Sulfhydrylgruppen blockieren (irreversible Hemmung). Diese Inhibitoren haben wenig oder gar keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat. Andere Inhibitoren reagieren mit dem Substrat oder mit einem Cofaktor. Dadurch wird die Umsatzrate herabgesetzt.

### a) Material und Reagenzien

Hefesuspension	1,0 %ig		
Glucose-Lösung	1,0 mol/L	HgCl <sub>2</sub>	0,1 mmol/L
NaF	0,9 mol/L	Perchlorsäure	0,5 mol/L

### b) Durchführung

In 20 Eppendorfhütchen werden jeweils 0,5 ml Perchlorsäure vorgelegt. In Röhrchen mit Schraubverschluß werden nach folgendem Pipettierschema die Lösungen pipettiert und die Reaktion durch Zugabe einer 1%igen Hefesuspension gestartet (Hefesuspension vor Zugabe unbedingt gut mischen).

Die Ansätze werden bei 37 °C inkubiert und in Abhängigkeit von der Zeit Proben entnommen.

Nr. der Probe	1	2	3	4
H <sub>2</sub> O [mL]	2,0	1,0	-	-
Glucose [mL]	-	1,0	1,0	1,0
NaF [mL]	-		1,0	-
HgCl <sub>2</sub> [mL]	-		-	1,0
Hefe [mL]	10,0	10,0	10,0	10,0

Alle Proben werden vor der Inkubation gemischt. Für die Nullproben werden sofort je 0,5 mL in Reaktionsgefäße mit vorgelegter Perchlorsäure pipettiert. Die übrigen Gläser werden gut verschlossen und während der gesamten Versuchsdauer bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Weitere Proben werden nach Aufschütteln der Suspension nach 15, 30, 45 und 60 min. (0,5 mL Probe + 0,5 mL Perchlorsäure) entnommen.

Die durch Perchlorsäure entweißten Ansätze werden alle 1 min. bei 15.000xg zentrifugiert und bis zur Messung aus dem klaren Überstand erschütterungsfrei gelagert.

### c) Bestimmung der Alkoholkonzentration

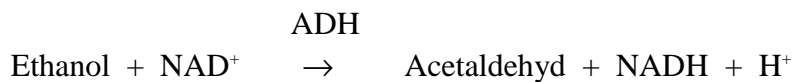
Messung der NADH-Zunahme bei 366 nm.

Für jede Probe werden in eine **Halbmikroküvette** pipettiert:

Puffer pH 9.7	1,0	mL
NAD-Lösung	0,10	mL
Probe	0,02	mL

(Zusammensetzung des Puffers pH 9,7: 0,6 mol/L Tris + 0,4 mol/L Lysinhydrochlorid)

Der Ethanolbestimmung liegt folgende Reaktion zugrunde:



Der Inhalt der Küvetten wird gut gemischt und die Anfangsextinktion  $E_0$  der einzelnen Küvetten bei 366 nm gemessen, nachdem die Lichtmarke des Photometers auf  $E = 0$  eingestellt wurde.

Die Ethanolbestimmung wird durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  ADH gestartet (gut mischen). Nach 15 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wird wie oben die Extinktion gemessen und  $E_{\text{Probe 1-4}}$  aus  $E_{15} - E_0$  errechnet.

NaF und  $\text{HgCl}_2$  enthaltende Lösungen müssen separat in den dafür vorgesehenen Gefäßen entsorgt werden. In diesen Gefäßen keine Küvetten oder Rührspatel entsorgen!

#### **d) Auswertung**

- 1) Berechnen Sie die Ethanolkonzentrationen in den Hefeinkubationsansätzen 1, 2, 3 und 4 bei 15, 30, 45 und 60 min.

Die Ethanolkonzentration erhalten Sie durch Einsetzen der berechneten  $\Delta E$ -Werte in Formel (5) im Kapitel Absorptionsphotometrie.

- 2) Die berechneten Ethanolkonzentrationen in mmol/L werden gegen die Inkubationszeiten aufgetragen.
- 3) Wie hoch sind die prozentualen Hemmungen?