

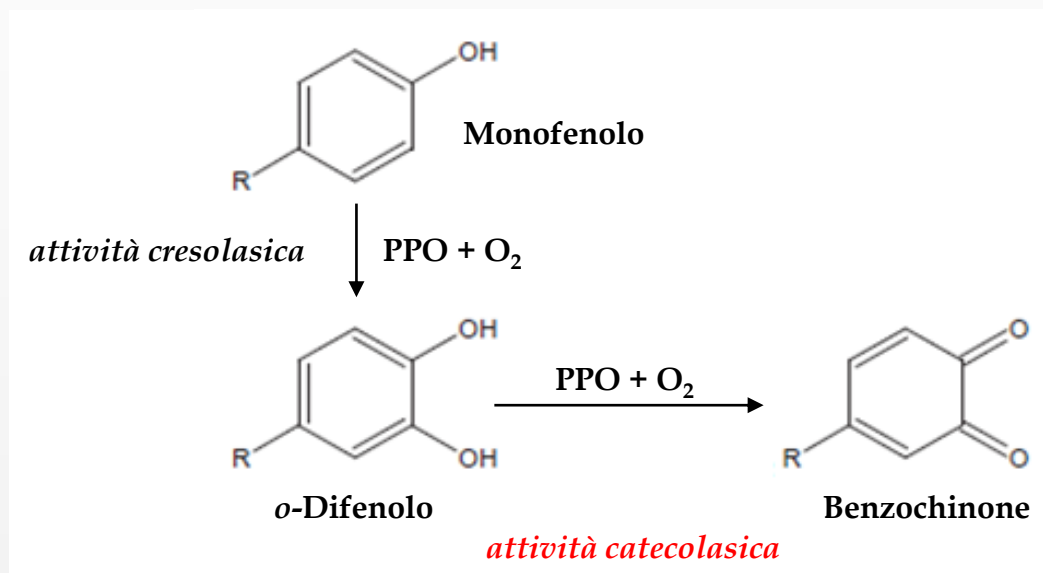
# Protocollo sperimentale:

Pesare circa 6 g di uva del vitigno Nero Antico (Gessopalena), dopo aver tolto la buccia, si taglia la polpa e si sospende in 1 ml di tampone McIlvaine (0.1 M acido citrico/0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 5.0, si omogeneizza in ghiaccio fino ad ottenere una soluzione omogenea. La soluzione ottenuta si centrifuga per circa 5 minuti a 13000xg, si raccoglie il sopranatante (nostro campione) evitando di toccare il pellet.

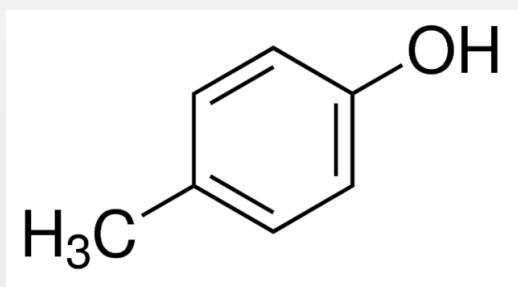
L'attività catecolasica del PPO è valutata spettrofotometricamente, registrando a T ambiente, per circa 7 minuti, l'aumento dell'assorbanza a 400 nm.

L'attività enzimatica si calcola conoscendo la variazione di assorbanza nel tempo alla lunghezza d'onda di 400 nm.

# Substrati per la polifenolossidasi

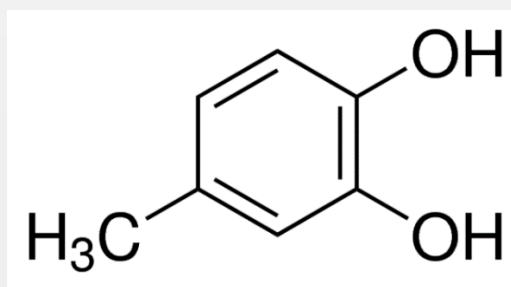


Diversi substrati per l'attività catecolasica:



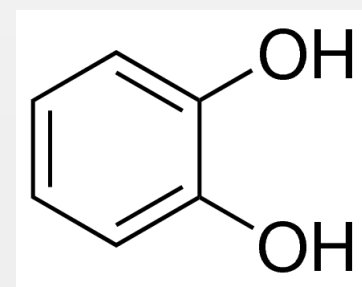
4-Methylphenol o *p*-Cresol

*attività cresolasica*



4-Methylcatechol

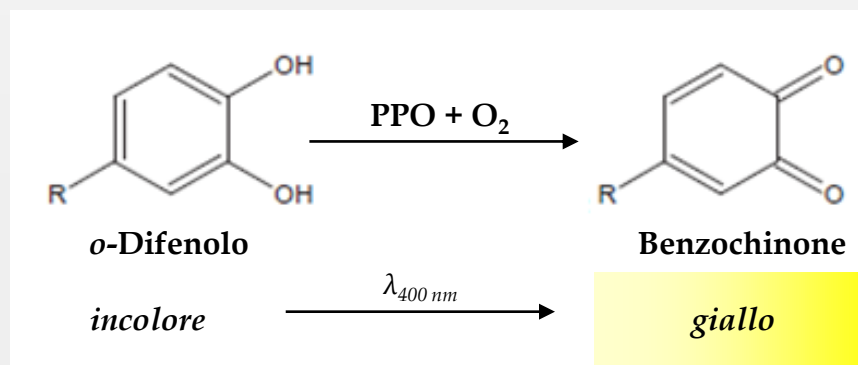
*attività catecolasica*



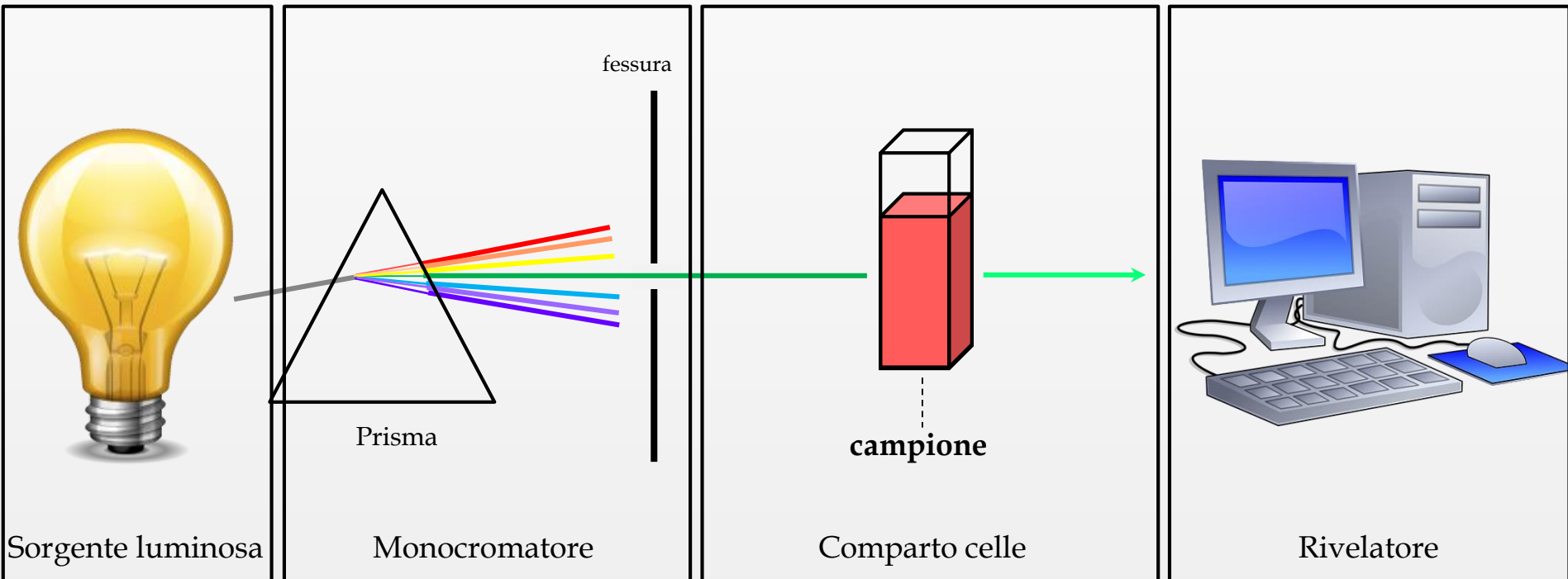
Pirocatecolo (catechol)

# Metodo spettrofotometrico

*Occorre che substrato e prodotto abbiano un diverso assorbimento in qualche zona dello spettro (visibile-ultravioletto)*



# Spettrofotometro a singolo raggio



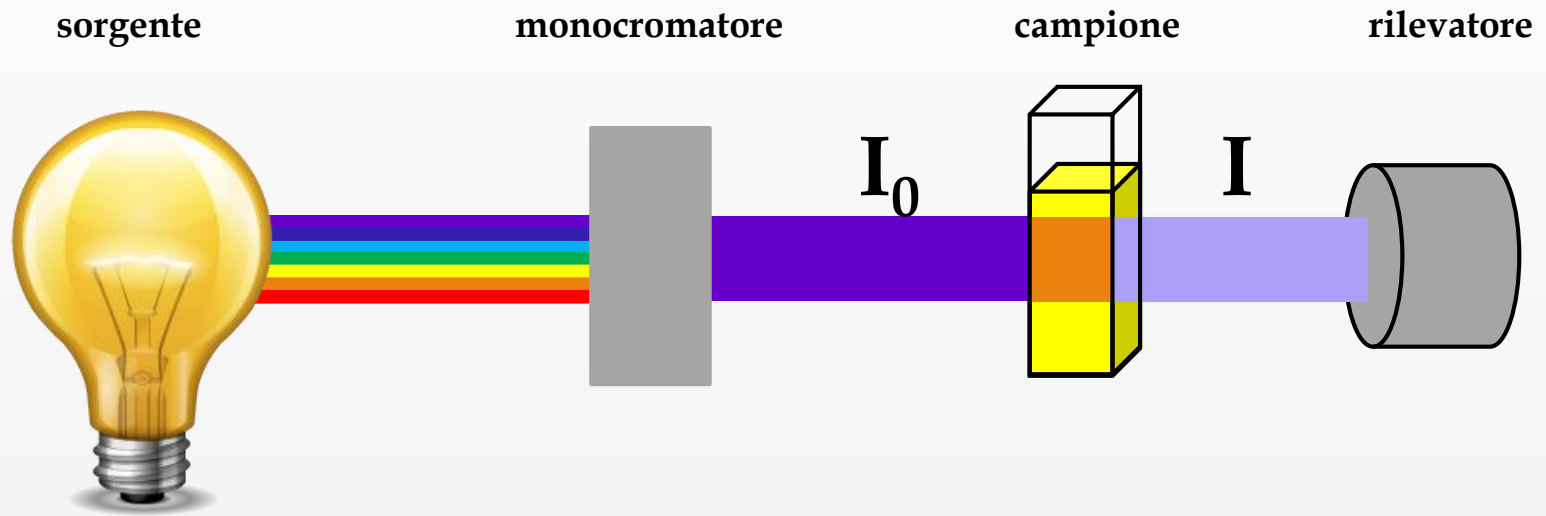
Luce:  
Visibile/ultravioletto

La radiazione  
proveniente dal  
monocromatore è  
inviata al campione

Il raggio passa  
attraverso il  
campione e  
fuoriesce con  
l'intensità trasmessa  
( $I_{\text{campione}}$ )

Il computer  
registra l'intensità  
trasmessa

## *Relazione tra concentrazione ed assorbimento di una sostanza ad una certa lunghezza d'onda*



### *Legge di Lambert-Beer: $A = \text{Log} I_0/I = \epsilon_{\lambda} c d$*

L'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente sia allo spessore dello strato attraversato.

**A** = Assorbanza, di solito viene chiamata densità ottica (OD, *Optical Density*).

**$\epsilon$**  = Coefficiente di estinzione molare ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) della sostanza che assorbe luce alla lunghezza d'onda  $\lambda$ , con un cammino ottico di 1 cm.

**c** = concentrazione molare (moli/L) della soluzione che assorbe la luce.

**d** = cammino ottico della radiazione nella soluzione (o spessore).

*Per determinare la velocità della reazione enzimatica:*

*Sfruttiamo la legge di Lambert-Beer*

$$A = \epsilon C d \longrightarrow \Delta A = \epsilon \Delta C d$$

$$\Delta C \text{ (mol/L)} = \frac{\Delta A}{\text{min} \times \epsilon \frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \times \text{cm}}$$

*In base alle legge di Lambert-Beer, occorre conoscere il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) del pirocatecolo (chinone) a 400 nm che rappresenta l'assorbanza di una soluzione con concentrazione 1 M e cammino ottico unitario (1 cm).*

$$\epsilon = 1417 \text{ mol/L (M)}$$

$$\epsilon = 1,417 \text{ mmol/L (mM)}$$

$$\epsilon = 0,001417 \text{ } \mu\text{mol/L (}\mu\text{M)}$$

*Ricordate che:*

$$1 \text{ mol/L} = 1 \text{ mmol/mL}$$

$$1 \text{ mmol/L} = 1 \text{ } \mu\text{mol/mL}$$

$$1 \text{ } \mu\text{mol/L} = 1 \text{ nmol/mL}$$

*Ai fini pratici si utilizza la concentrazione  $c$  in mmol/L.*

*Per il pirocatecolo a 400 nm,  $\epsilon \times d = 1,417 \text{ mmol/L (}\mu\text{mol/mL)}$*

ESTIMATED MOLAR EXTINCTION COEFFICIENTS FOR THE QUINONE  
PRODUCTS OF SEVEN *o*-DIPHENOLIC SUBSTRATES<sup>a</sup>

Substrate	pH	Wave-length (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$S_{\epsilon}$	$n$	$S_{S_{\epsilon}}$	95% C.L.	Re-ported	References
Pyrocatechol	5.8-6.8	390	1417	15	8	0.0028	48	1400 <sup>b,c</sup> 1330 <sup>b</sup> 1830 <sup>c</sup>	Dawson and Tarpley (7) Mason (8) Mason (8)
3,4-Dihydroxy phenylacetic acid	5.8-6.8	390	1311	30	8	0.0032	95		
4-tert-Butyl-catechol	5.8-7.8	400	1150	18	12	0.0037	57		
4-Methyl-catechol	5.8-7.8	412	1010	22	12	0.0065	70		
	5.8-6.8	400	1400	32	8	0.0036	101	1350 <sup>c</sup>	Mayer <i>et al.</i> (3)
	7.8	495	2140	31	4	0.0036	99		
L-Dopa	5.8-6.8	480	3388	25	8	0.0018	80	3715 <sup>b</sup> 3467 <sup>c</sup>	Mason (9)
	5.8-6.8	305	9181	100	8	0.0070	318	9350 <sup>b,c</sup>	Mason (9)
3,4-Dihydroxy-hydrocinnamic acid	5.8-7.8	412	1124	15	12	0.0036	102		
	7.8	495	2295	32	4	0.0022	48		
Dopamine	5.8-6.8	465	2455	20	8	0.0076	64	2511 <sup>c</sup>	Palmer (17)
	5.8-6.8	300	8968	127	8	0.0072	404	8912 <sup>c</sup>	Palmer (17)

<sup>a</sup> Calculations are based on five initial substrate concentrations with four replicates each per pH. Substrate replicates ( $n$ ) are pooled when pH has no significant effect on peak product absorbance at a given wavelength. The 95% confidence limits (C.L.) define the upper confidence limit when added to  $\epsilon$  and the lower limit when subtracted from it.

<sup>b</sup> Enzymatically prepared quinone.

<sup>c</sup> Quinone prepared with silver oxide in anhydrous ether.

# Determinazione dell'unità enzimatica (UI)

Corrisponde alla quantità di enzima che converte 1  $\mu\text{mole}$  di reagente nel prodotto in 1 minuto, nelle condizioni di reazione standard (ottimali)

**Variazione di assorbanza**  
(A campione - A bianco)

**Volume miscela di reazione (mL)**

**Unità enzimatiche**  
( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{L}^{-1}$  (U/L))

**Rapporta la concentrazione ad 1 litro**

**UI** = 
$$\frac{\Delta A \cdot V_{\text{tot}} \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot t \cdot V_e}$$

**Coefficiente di estinzione molare**

**Cammino Ottico (cm)**

**Tempo della reazione (minuti)**

**Volume del campione (mL)**

The diagram illustrates the formula for determining Enzyme Units (UI). The formula is 
$$\text{UI} = \frac{\Delta A \cdot V_{\text{tot}} \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot t \cdot V_e}$$
. Each variable in the formula is enclosed in a colored circle, and an arrow points from a descriptive label to that circle. The labels and their corresponding variables are: 

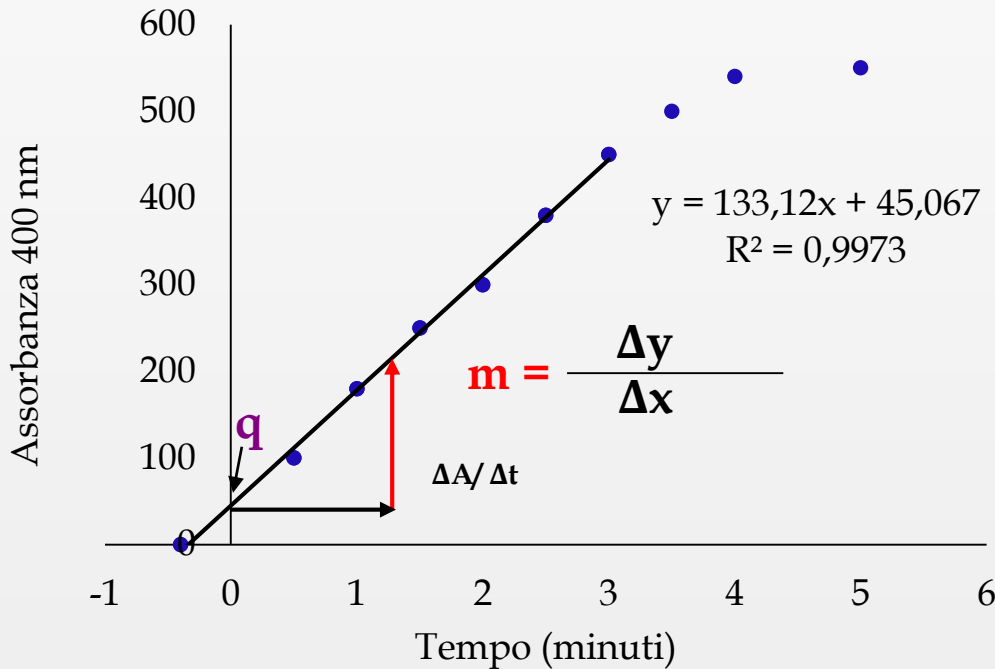
- Variazione di assorbanza (A campione - A bianco)** points to  $\Delta A$  (red circle).
- Volume miscela di reazione (mL)** points to  $V_{\text{tot}}$  (green circle).
- Rapporta la concentrazione ad 1 litro** points to the constant  $1000$  (pink circle).
- Coefficiente di estinzione molare** points to  $\epsilon$  (purple circle).
- Cammino Ottico (cm)** points to  $d$  (black circle).
- Tempo della reazione (minuti)** points to  $t$  (yellow circle).
- Volume del campione (mL)** points to  $V_e$  (green circle).

 Additionally, a blue arrow points from the text **Unità enzimatiche ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{L}^{-1}$  (U/L))** to the **UI** variable in the numerator.



# Calcolo del $\Delta A/\text{min}$

Substrato utilizzato catecolo e lettura dell'assorbanza a 400 nm



Variabile dipendente

Variabile indipendente

intercetta

$$Y = m * X + q$$

Coefficiente angolare o pendenza della retta

# Protocollo di lavoro

Preparare il substrato alla concentrazione di 0,1 M: pesare la quantità corrispondente in grammi pari a 0,1 M di catecolo e sciogliere in tampone McIlvaine, pH 5,0.

Preparare l'inibitore alla concentrazione di 50 mM: pesare la quantità corrispondente in grammi pari a 50 mM di acido ascorbico e sciogliere in tampone McIlvaine, pH 5,0.

M= moli/L

# Protocollo di lavoro

Bianco	
<b>Substrato pirocatecolo (0,1 M)</b>	1 mL

Attività PPO	
<b>Substrato pirocatecolo (0,1 M)</b>	900 $\mu$ L
<b>Succo d'uva</b>	100 $\mu$ l

Inibizione dell'attività PPO*	
<b>Succo d'uva</b>	100 $\mu$ L
<b>Inibitore (acido ascorbico 50 mM)</b>	50 $\mu$ L
<b>Substrato pirocatecolo (0,1 M)</b>	850 $\mu$ L

\* Una volta aggiunto l'inibitore al succo d'uva, incubare per circa 30 minuti ed infine aggiungere il substrato.

## CALCOLO DELLA VELOCITÀ INIZIALE DELLA REAZIONE:

$A = C \times \varepsilon \times d$  (legge di Lambert-Beer)

$\Delta A/\Delta t$  (assorbanza/min) = variazione di assorbanza al minuto

$\varepsilon$  = coefficiente di estinzione molare per il catecolo =  $1417 \text{ (mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}\text{)}$

$d$  = cammino ottico = 1 cm

Calcolare le  $\mu\text{moli}$  di prodotto formate in 1 mL di miscela di reazione:

dividere il valore di  $\Delta A/\text{min}$  per il coefficiente di estinzione molare ( $\mu\text{moli/mL}$ ) del catecolo ( $\lambda_{400 \text{ nm}} = 1,42 \mu\text{moli}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ ) e per il cammino ottico (1 cm).

$$\mu\text{moli prodotto formato/mL} = \frac{\Delta A}{1,42 \mu\text{moli}^{-1} \text{ mL cm}^{-1} \times \text{cm}}$$

Calcolare le unità di attività enzimatica/mL (UI) di soluzione saggiata, tenendo conto dei  $\mu\text{L}$  di omogenato di uva utilizzati per il saggio. (Una unità enzimatica è la quantità di enzima che converte in prodotto una  $\mu\text{mole}$  di substrato per minuto nelle condizioni ottimali di pH e temperatura per il saggio).

$$\text{U/mL} = \frac{\mu\text{moli prodotto/mL} \times V \text{ miscela di reazione (1 mL)}}{V_e \text{ (0,100 mL di succo d'uva)}}$$

(Una unità enzimatica è la quantità di enzima che converte in prodotto una  $\mu\text{mole}$  di substrato per minuto nelle condizioni ottimali di pH e temperatura per il saggio).

# *Precauzioni nei dosaggi enzimatici*

- **Substrati e tamponi devono essere di alta purezza;**
- **L'enzima purificato non deve contenere composti che interferiscono con il dosaggio;**
- **L'enzima deve essere stabile;**
- **Controllo di pH e temperatura;**
- **La velocità deve essere costante nell'intervallo considerato ( $v_0$ )**