

CHROM. 16,179

EINSATZ DER HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE ZUR BESTIMMUNG DER URIDINE-5'-DIPHOSPHOGLUCOSE:PHENOL- β -D-GLUCOSYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT *IN VITRO* MIT PARTIELL GE-REINIGTEM ENZYM AUS PFLANZEN VON *BETA VULGARIS* SSP. *RAPACEA* VAR. *ALTISSIMA* DÖLL

G. STÖLZEL*, U. POMMER, J. HARTUNG und H. GRÄSER

Pädagogische Hochschule "Dr. Theodor Neubauer", Erfurt/Mühlhausen, Wissenschaftsbereich Botanik-Pflanzenphysiologie-Biochemie, GDR-5700 Mühlhausen (D.D.R.)

(Eingegangen am 29. Juli 1983)

SUMMARY

*Employment of high-performance liquid chromatography for the determination of uridine-5'-diphosphoglucose:phenol- β -D-glucosyltransferase activity in vitro by use of partially purified enzyme from plants of *Beta vulgaris* ssp. *rapacea* var. *altissima* Döll*

Activity of uridine-5'-diphosphoglucose (UDPG):phenol- β -D-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.35) in protein extracts from leaves of young plants of sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *rapacea* var. *altissima* Döll) is detected by a cell-free system with UDPG as glucose donor and the methylester of *p*-hydroxybenzoic acid as substrate.

The analysis of products formed is carried out by high-performance liquid chromatography combined with UV-detection. Integration of peak areas yields an relative measure of the rate of glucoside formation. This measure is used immediately for comparative studies and determination of Michaelis constant (K_M) values. The method described here is suitable for analysing enzyme reactions *in vitro* without employment of radioactive substrates.

EINLEITUNG

Von Uridin-5'-diphosphoglucose (UDPG):Phenol- β -D-Glucosyltransferase katalysierte Reaktionen können nicht durch Messung einer Extinktionsänderung direkt verfolgt werden. Daher ist radioaktive Markierung von Donor- oder Akzeptor-substrat die überwiegend angewandte Technik zur Aktivitätsbestimmung bei diesem Enzym¹⁻⁵. In diesen Fällen ist die Arbeit mit Testansätzen im Mikromassstab möglich.

In vorliegender Arbeit werden Enzymtests analysiert, die mit ebenso geringen Substanzmengen ohne Einsatz radioaktiv markierter Substrate ausgeführt worden sind. Die hohe Leistungsfähigkeit der mit UV-spektroskopischer Detektion gekop-

pelten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), vor allem die gute Reproduzierbarkeit ihrer Trennergebnisse sowie die hohe Nachweisempfindlichkeit, bieten die Möglichkeit quantitativer Produktanalyse im Mikromassstab.

EXPERIMENTELLES

Chemikalien

Als Substrate im *in vitro* Enzymtest wurden verwendet: Uridin-5'-diphosphoglucose (Dinatriumsalz) von Boehringer, Mannheim (B.R.D.); *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester DAB 7 von Berlin-Chemie (D.D.R.).

Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Enzympräparation dienten Pflanzen von *Beta vulgaris* ssp. *rapacea* var. *altissima* Döll im Vier- bis Sechsstadium, die in gedämpfter Gartenerde gewachsen und mit Nährlösung nach Eschrich⁶ gegossen worden waren. Bevor die Blätter geerntet wurden, erfolgte über den Zeitraum von 5 Tagen eine täglich einmalige Applikation einer Lösung von *p*-Hydroxybenzoesäure in Eschrich-Nährlösung ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zwecks Enzyminduktion. Jeweils 25 g Frischmasse Blätter wurden entweder sofort extrahiert oder bei -25°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Enzympräparation

Folgende Pufferlösungen fanden Verwendung: P1: Kaliumphosphatpuffer ($c = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 7.5 mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol ($c = 0.015 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und 0.25% Triton X-100; P2: Kaliumphosphatpuffer ($c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 7.5 mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol ($c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und NaCl ($c = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); P3: Kaliumphosphatpuffer ($c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 7.5 mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol ($c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden im Kältelabor bei 4°C ausgeführt.

Nach Extraktion der zerkleinerten Blätter im doppelten Volumen P1 (30 min Extraktionszeit) und anschließender Filtration (Nylontuch) wurde der Extrakt zentrifugiert ($18,000 \times g$). Der Überstand wurde einer fraktionierten Ammonsulfatfällung unterworfen. Die im Bereich zwischen 40 und 80% Ammonsulfatsättigung gefällte Proteinfraktion wurde in 2 ml P2 gelöst und einer Gelfiltration an Sephacryl S-200 (Säule: $60 \times 2.5 \text{ cm}$) unterworfen. Fraktionen von je 7 ml wurden gesammelt und die Fraktionen 26 bis 31 vereinigt, wiederum auf 80% Ammonsulfatsättigung gebracht und das abzentrifugierte ($18,000 \times g$) Proteinpellet in 1.5 ml P3 gelöst. Eine 24-h Dialyse gegen 2000 ml zehnfach verdünnten P3 schloss sich an. Nach abschließender Zentrifugation ($18,000 \times g$) wurde der Überstand als partiell gereinigtes Enzym im Testansatz verwendet.

Enzymtest

Das *in vitro* Testsystem zum Nachweis von UDPG:Phenol- β -D-Glucosyltransferase-Aktivität im Proteinextrakt benutzt die Reaktion in Fig. 1. Die Verwendung des Methylesters als Akzeptorsubstrat schließt die Möglichkeit einer Glucoseesterbildung aus (vgl. Lit. 1). Die UV-Absorptionsmaxima wurden für das Akzeptorsubstrat mit 252 nm und für das Glucosid mit 249 nm bestimmt. Da klein hoch-

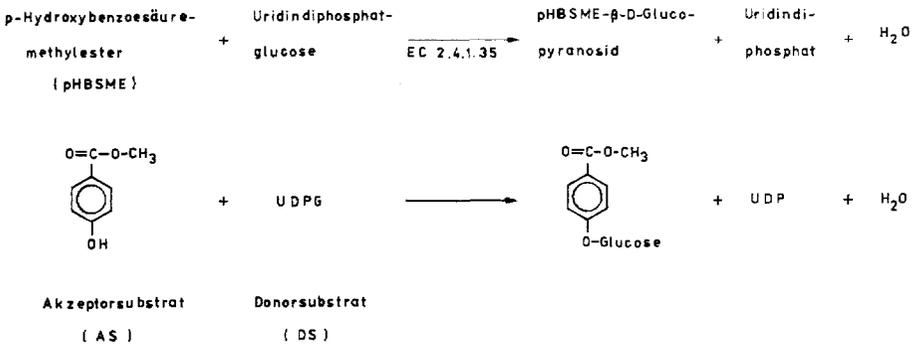


Fig. 1. Testsystem zum Nachweis von UDPG:Phenol- β -D-Glucosyltransferase-Aktivität.

gereinigtes Enzym verwendet wurde, trat als Nebenprodukt Uridin auf (Phosphataseaktivität), das sich von dem Glucosid jedoch klar abtrennen liess.

Ein Testansatz enthielt im Normalfall 50 μl Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 150 μl . Die Endkonzentrationen der übrigen Komponenten betragen bei Testbeginn: 1.0 mmol \cdot l $^{-1}$ UDPG (DS); 1.0 mmol \cdot l $^{-1}$ *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester (AS); 3.0 mmol \cdot l $^{-1}$ Saccharose; 10.0 mmol \cdot l $^{-1}$ CaCl $_2$.

Während der Inkubationszeit von 90 min lief die Reaktion in verschlossenen Teströhrchen bei 45°C (Start pH 7.5). Der Saccharosezusatz erhöhte die messbare Produktausbeute wahrscheinlich durch Abfangen von Glucosidase-Aktivität (vgl. Lit. 7). Da die Kontrollansätze ohne UDPG keinerlei Produkt lieferten, tritt eine Transglucosidierung mit Saccharose als Glucosedonator offenbar nicht ein (vgl. Lit. 8). Durch Zugabe von 100 μl Methanol wurde die Reaktion gestoppt. Anschliessend folgte kurze Zentrifugation der Teströhrchen zwecks Sedimentation ausgefallenen Proteins. Die Testansätze wurden bis zur Produktanalyse bei -25°C verschlossen aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Enzymlösung erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.*⁹.

Produktanalyse

Die Produktanalyse wurde mittels HPLC an folgender Gerätekombination vorgenommen: Chromatograph der Fa. Knauer mit HPLC-Pumpe (Modell 52.00), Spektralphotometer (Modell 85.00), Rheodyne Probenschleifen-Spritzventil (RH 71-25), Fertigsäule (250 mm \times 4.6 mm I.D.) gefüllt mit LiChrosorb RP-18 (10 μm), Vorsäule (40 mm \times 4.6 mm I.D.) gepackt mit Perisorb RP-18 (30-40 μm), die zum Schutz der analytischen Säule mittels einer direkten, totvolumenarmen Verbindung vorgeschaltet wurde.

Zur Registrierung der Chromatogramme wurden ein Linseis Zweikanal-Flachschreiber (Modell LS 24.70.70) und ein Spectra-Physics Minigrator-Rechnerintegrator (Modell 23000-111) eingesetzt.

Das Volumen der Probenschleife betrug 20 μl . Injiziert wurden jedoch 50 μl , so dass aus jedem Testansatz 4 chromatographische Analysen zwecks Bildung eines repräsentativen Mittelwertes möglich waren.

Als Eluent wurde ein Gemisch aus Methanol und Wasser (40:60) verwendet. Die Flussrate betrug 0.7 ml \cdot min $^{-1}$ bei einem Druck von 6.5 MPa. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 249 nm, die zuvor aus dem enzymatisch gebildeten

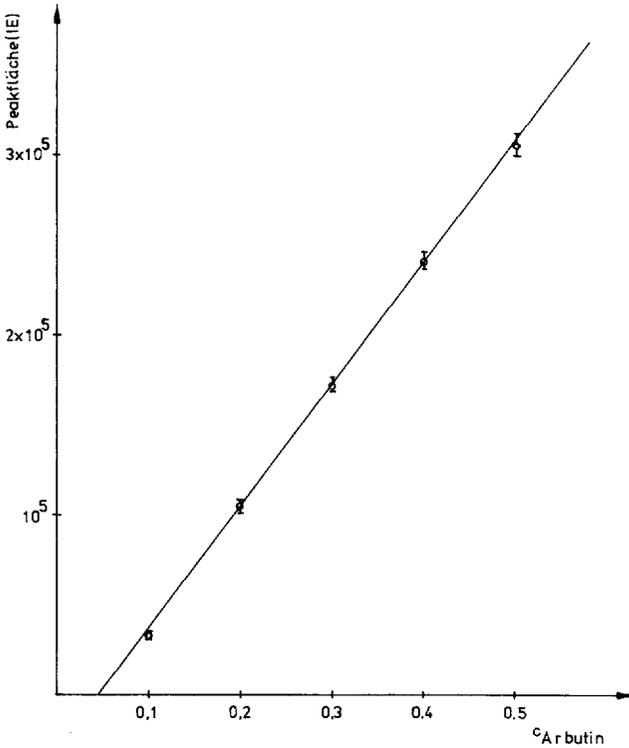


Fig. 2. Darstellung der Peakfläche (Integratoreinheiten) gegen die Substanzkonzentration ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

und HPLC isolierten Glucosid als UV-Absorptionsmaximum ermittelt worden war.

Die lineare Abhängigkeit der vom Integrator ausgedruckten Werte (Peakflächen) von der Substanzkonzentration wurde zuvor mit Lösungen von Arbutin (Hydrochinon- β -D-Glucopyranosid), einem von Pflanzen gebildeten phenolischen Glucosid¹⁰⁻¹² überprüft (Fig. 2).

Ausdruck für die gute Reproduzierbarkeit der mit unserer Anlage vorgenommenen HPLC Trennungen sind die geringen Standardabweichungen der Integratorwerte bei wiederholter Trennung aus einem Testansatz. Sie betragen für den Glucosidpeak 1.7% und für den wesentlich grösseren Akzeptorsubstratpeak 0.7%. Selbst für Trennungen aus mehreren gleichen Testansätzen blieb die Standardabweichung der Integratorwerte für die Fläche des Glucosidpeaks mit 3.4% noch sehr niedrig, obwohl hier zusätzlich objektiv bedingte Differenzen (z.B. Pipettierfehler) in die Messung eingingen. In der Auswertung dienten uns die auf eine Minute bezogenen Werte der Peakflächenmessung (Integratoreinheiten pro min, $\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) als Relativmass für die Reaktionsgeschwindigkeit (v).

Produktidentifizierung

Die Identifizierung des Reaktionsproduktes erfolgte über die enzymatische Umkehrreaktion mittels käuflicher β -Glucosidase (E.C. 3.2.1.21) aus *Prunus amygdalus* (Sigma, St. Louis, U.S.A.). Die Analyse der Produkte dieser Umkehrreaktion

erfolgte einerseits mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) auf Silufol-Platten, andererseits mittels HPLC. Für den spezifischen Glucosenachweis wurde die Enzymkombination von β -D-Glucoseoxidase (E.C. 1.1.3.4) und Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) nach Trinder¹³ und Bartl *et al.*¹⁴ eingesetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Produktnachweis

Im HPLC konnte nach Ablauf der enzymatisch katalysierten Reaktion ein

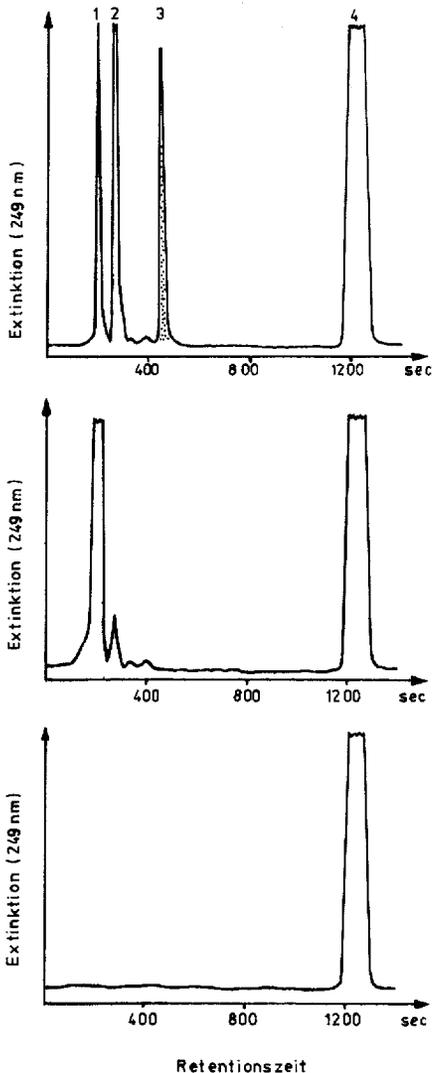


Fig. 3. HPLC von Produktanalysen. Oben: Normaltestansatz : peak 1 = UDPG und UDP, peak 2 = Uridin, peak 3 = Glucosid des *p*HBSME, peak 4 = *p*HBSME. Mitte: Kontrolle mit denaturiertem Enzym. Unten: Kontrolle ohne Donorsubstrat (UDPG) (peaks 1, 2 und 4 verkürzt dargestellt).

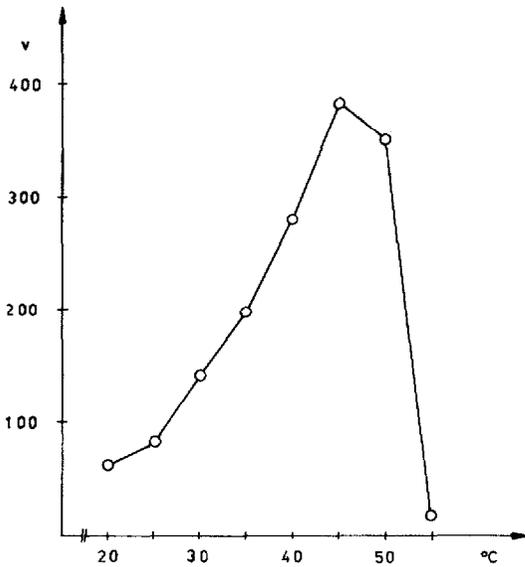


Fig. 4. Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Inkubationstemperatur.

Produktpeak mit einer Retentionszeit von 440 sec nachgewiesen werden, der in den Kontrollansätzen mit denaturiertem Enzym bzw. ohne Glucosedonator nicht auftrat (Fig. 3).

Diese Ergebnisse erlauben zwei Schlussfolgerungen: die Produktbildung ist von aktivem Enzym abhängig und zur Produktbildung ist UDPG erforderlich. Die Analyse der diesem Produktpeak zugrundeliegenden Substanz ergab den Nachweis des erwarteten O-Glucosides des Methylsters der *p*-Hydroxybenzoesäure.

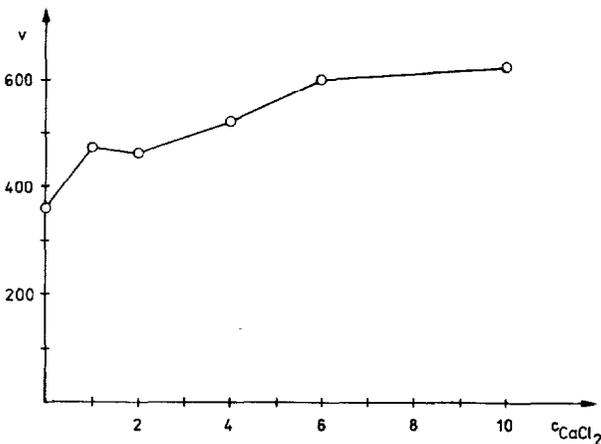


Fig. 5. Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Konzentration von CaCl_2 ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) im Testansatz.

Optimierung des Testsystems

Unter Verwendung des in Abschnitt *Produktanalyse* erläuterten Relativmasses für die Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) wurde zunächst geklärt, dass die Reaktion über wenigstens 90 min linear verläuft. Die gleiche Auswertungsmethode erlaubte die Optimierung einiger Parameter des Testsystems (Figs. 4 und 5).

Die Abbildungen zeigen, dass die Empfindlichkeit der Messungen ausreicht, um auch relativ geringe Differenzen in der Reaktionsgeschwindigkeit zu erfassen. Auf gleiche Weise wurde der optimale pH-Bereich für die Reaktion bei ca. 7.0 gefunden.

Vergleichende Messungen zur Produktbildung

Wie von anderen Autoren bereits gezeigt wurde^{15,16}, ist Glucosyltransferase-Aktivität im Rohextrakt nicht immer nachweisbar. Auch in unserem Falle waren Reinigungsschritte erforderlich. Die partielle Reinigung mittels fraktionierter Ammonsulfatfällung und anschließender Gelfiltration an Sephacryl S-200 steigerte die spezifische katalytische Aktivität um den Faktor 60. Sie war vorerst für unsere weiteren Untersuchungen ausreichend.

Mit diesem partiell gereinigten Enzym konnte die Abhängigkeit der Produktbildung von der zu Testbeginn im Ansatz vorliegenden Konzentration von Donor- und Akzeptorsubstrat dargestellt werden, die der erwarteten Sättigungskinetik folgt (Fig. 6).

Durch Inhibitoren bedingte Veränderungen der Produktbildungsrate werden im HPLC deutlich sichtbar (Fig. 7).

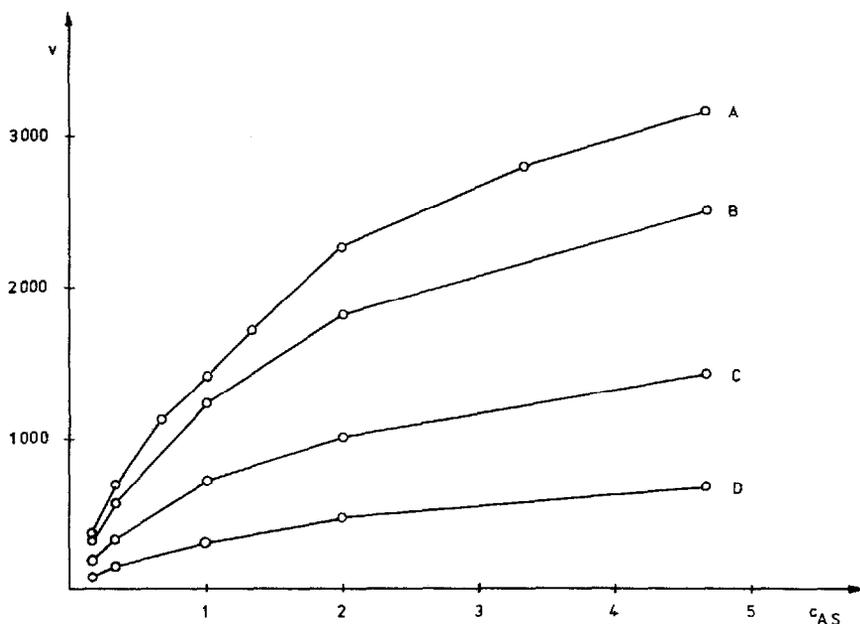


Fig. 6. Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Konzentration des Akzeptorsubstrates (c_{AS} $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) bei verschiedenen, jeweils konstanten Konzentrationen des Donorsubstrates (c_{DS}). A, $c_{\text{DS}} = 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; B, $c_{\text{DS}} = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; C, $c_{\text{DS}} = 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; D, $c_{\text{DS}} = 0.125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

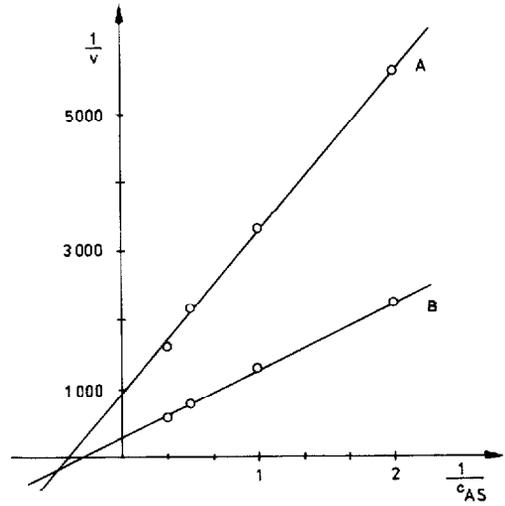
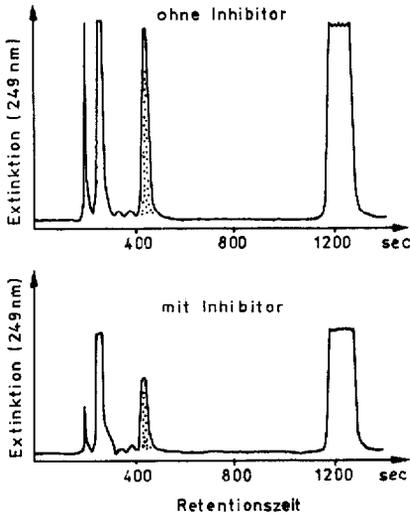


Fig. 7. HPLC von Produktanalysen. Inhibitor: HgCl_2 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (Glucosidpeak punktiert).

Fig. 8. Doppelt reziproke Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Konzentration des Akzeptorsubstrates (c_{AS} in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) nach Lineweaver-Burk. A, $c_{\text{Inhibitor}} = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; B, $c_{\text{Inhibitor}} = 0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($c_{\text{DS}} = 0.5 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Mittels der vom Integrator ausgedruckten Werte für die Peakflächen ist die Inhibitorwirkung zahlenmässig erfasst worden (Tabelle I).

Die herkömmliche doppelt reziproke Darstellung dieser Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Diagramm (Fig. 8) sowie die Darstellung nach der Methode von Eisenthal und Cornish-Bowden¹⁷ (Fig. 9) lassen den nicht-kompetitiven Charakter dieser Hemmung deutlich erkennen.

Bestimmung des K_m -Wertes für das Donorsubstrat

Auch die zur Charakterisierung von Enzymen üblicherweise benutzten Michaelis-Konstanten (K_M) können unter Verwendung der Relativwerte für die Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) ermittelt werden.

TABELLE I

HEMMUNG DER GLUCOSYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT DURCH SCHWERMETALL-IONEN

HgCl_2 , $c = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $c_{\text{DS}} = 0.5 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, Inkubation: 90 min, 45°C .

c_{AS} ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	Produktbildung ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$)		Verminderung der Aktivität (%)
	Kontrolle	mit Inhibitor	
3.33	1709.4	586.8	65.7
2.0	1284.4	463.8	63.9
1.0	774.9	301.5	61.1
0.5	446.9	178.8	60.0

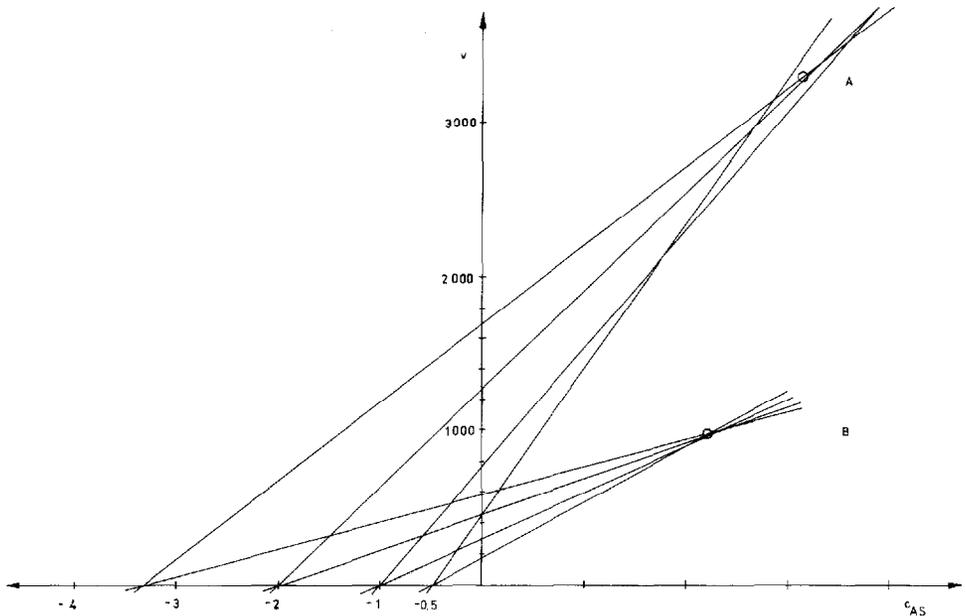


Fig. 9. Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die negative Akzeptorsubstratkonzentration ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) nach Eisenthal und Cornish-Bowden¹⁷, A, $c_{\text{Inhibitor}} = 0.0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; B, $c_{\text{Inhibitor}} = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Kreise markieren die Lage der Medianwerte.

Bei Zweisubstratreaktionen sind zu diesem Zweck mehrere Messungen erforderlich. Wir variierten die Akzeptorsubstrat-Konzentration (c_{AS}) in verschiedenen Testansätzen mit jeweils konstant gehaltener Donorsubstrat-Konzentration (c_{DS}). Die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk lieferte die bekannten Geraden, deren Schnittpunkte mit der Ordinate die Kehrwerte der jeweiligen apparenten Maximalgeschwindigkeiten darstellen (Fig. 10).

Die Lage der Schnittpunkte der Geradenschar lässt nach Morrison¹⁸ den Schluss zu, dass ein "sequential reaction mechanism" vorliegt. Analoge Ergebnisse erhielt Frear¹⁹ mit einer UDPG: Arylamin-N-Glucosyltransferase aus Sojabohnen. Aus unseren Messergebnissen wurden die Kehrwerte der apparenten Maximalgeschwindigkeiten für die verschiedenen Donorsubstrat-Konzentrationen wie folgt berechnet (Tabelle II).

Bei Zweisubstratreaktionen kann nach Morrison¹⁸ der K_{M} -Wert für das jeweils konstant gehaltene Substrat (hier das Donorsubstrat) aus einer doppelt reziproken Darstellung der apparenten Maximalgeschwindigkeit gegen die Konzentration dieses Substrates ermittelt werden (Fig. 11). Die Berechnung des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse lieferte für das Donorsubstrat (UDPG) den K_{M} -Wert von $0.85 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

DISKUSSION

Aus den in vorliegender Arbeit dargestellten Möglichkeiten der Auswertung von Produktanalysen enzymatisch katalysierter Reaktionen einer Glucosyltransfe-

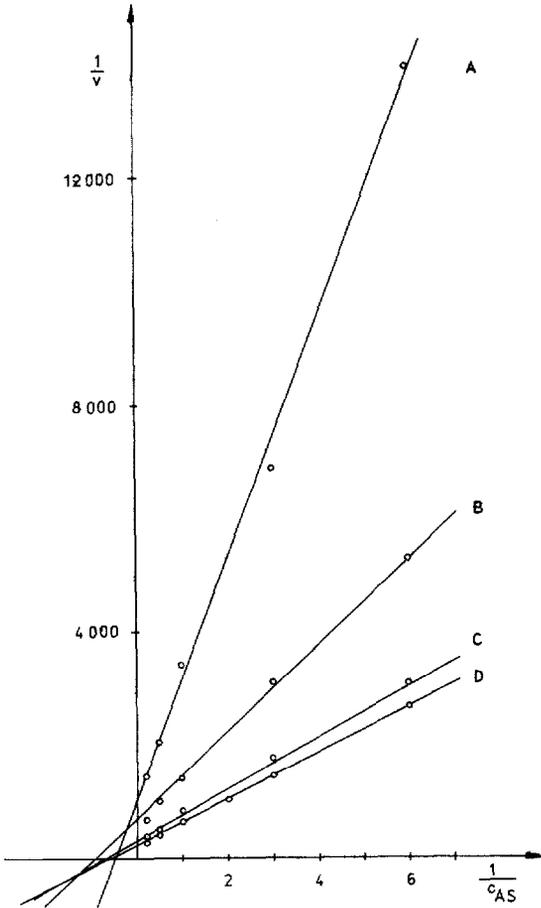


Fig. 10. Doppelt reziproke Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Konzentration des Akzeptorsubstrates (c_{AS} in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) bei verschiedenen, jeweils konstanten Konzentrationen des Donorsubstrates (Lineweaver-Burk-Diagramm). A, $c_{DS} = 0.125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; B, $c_{DS} = 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; C, $c_{DS} = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; D, $c_{DS} = 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

rase mittels Peakflächen-Integration von HPL-Chromatogrammen wird erkennbar, dass diese Methode für enzymkinetische Studien gut einsetzbar ist. Die günstigen Werte der Standardabweichung bei wiederholter Trennung zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, und dies bei sehr geringen Substanzeinsatz. Bedingung ist jedoch, unkontrollierte Konzentrationsänderungen als Folge von Verdunstungsvorgängen weitgehend auszuschalten.

Die hohe Leistungsfähigkeit der HPLC ist schon von anderen Autoren in ihrem Wert für Umsatzbestimmungen mit Enzympräparationen erkannt und eingesetzt worden^{15,20,21}. Unter Nutzung dieser Methode werteten wir ein zellfreies Testsystem zum Nachweis von Glucosyltransferase-Aktivität in pflanzlichen Proteinextrakten quantitativ aus. Die HPLC ermöglichte uns eine saubere Abtrennung des Produktes (Glucosides) von den übrigen Komponenten des Testgemisches. So konnte die mittels Integration sehr empfindliche Registrierung auch geringer Veränderungen der Peak-

TABELLE II

KEHRWERTE DER MAXIMALEN REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION DES DONORSUBSTRATES

c_{DS} ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$\frac{1}{V}$ ($\text{min} \cdot \text{IE}^{-1}$)
0.125	1029.8
0.25	596.4
0.5	322.1
1.0	244.2

fläche genutzt werden, um Differenzen in der Produktbildung verschiedener Testansätze zu erfassen. Für vergleichende Untersuchungen und für K_M -Wert-Bestimmungen können die Integratorwerte direkt verwendet werden. Andere Charakteristika von Enzymreaktionen erfordern Stoffmengenangaben (mol), diese sind über Eichkurven zu ermitteln. Dazu ist das Reaktionsprodukt in chromatographisch reiner Form erforderlichlich.

Ein anderer, von Matsui und Nagai²¹ beschrittener Weg der quantitativen Auswertung von HPLC über die Messung der Peakhöhen führt nach unseren Erfahrungen zu deutlicher Verringerung der Nachweisempfindlichkeit.

Von anderen Autoren wird der Nachweis von Glucosyltransferase-Aktivität über die gebildete Menge UDP geführt^{11,12,23}. Diese Methode setzt voraus, dass der Testansatz von Phosphatase-Aktivität völlig frei ist, d.h. es wird höherer Aufwand in der Enzymreinigung oder die quantitative Hemmung der Phosphatase erforderlichlich.

Unabdingbare Voraussetzung für den Einsatz unserer Methode der quantitativen Produktanalyse ist die saubere Abtrennung des für die Auswertung benutzten Produktes im Chromatogramm. Dies ist zu bedenken, wenn verschiedene Akzeptorsubstrate oder Effektoren des Enzyms eingesetzt werden sollen, die in dem zur Detektion benutzten Wellenlängenbereich absorbieren. Wegen Schwierigkeiten der Pro-

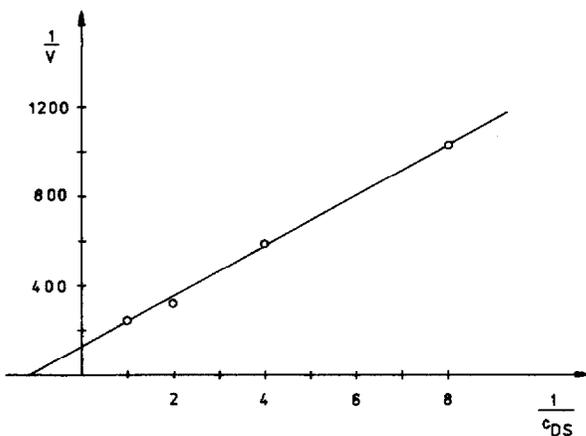


Fig. 11. Doppelt reziproke Darstellung der apparenten Maximalgeschwindigkeit ($\text{IE} \cdot \text{min}^{-1}$) gegen die Konzentration des Donorsubstrates (c_{DS} in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

duktabtrennung haben wir einige phenolische Verbindungen als Akzeptorsubstrat zunächst verworfen, obwohl diese von anderen Autoren zum Nachweis von Glucosidierungen in Pflanzen verwendet worden sind^{11,12,24,25}. Gelingt die chromatographische Trennung einwandfrei, dann liefert die hier dargestellte Methode sehr gute Ergebnisse.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis von Glucosyltransferase-Aktivität (UDPG:Phenol- β -D-Glucosyltransferase, E.C. 2.4.1.35) in Proteinextrakten aus Blättern von jungen Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris* ssp. *rapacea* var. *altissima* Döll) wird mit einem zellfreien Testsystem geführt. Als Donorsubstrat findet UDPG, als Akzeptorsubstrat *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester Verwendung. Die Produktanalyse wird mittels HPLC und gekoppelter UV-Detektion vorgenommen. Die gute Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse sowie die hohe Nachweisempfindlichkeit machen diese Methode sehr wertvoll, vor allem, wenn mit Testsystemen im Mikromassstab und ohne radioaktive markierte Substrate gearbeitet werden soll.

DANK

Für zuverlässige technische Assistenz sind wir Frau Ute Peters zu hohem Dank verpflichtet.

LITERATUR

- 1 A. Fleuriot, J. J. Macheix, R. Suen und R. K. Ibrahim, *Naturforsch.*, 35c (1980) 967-972.
- 2 C. Peaud-Lenoel und M. Axelos, *Carbohyd. Res.*, 24 (1972) 247-262.
- 3 R. Pont-Lezica, P. A. Romero und M. A. Dankert, *Pl. Physiology*, 58 (1976) 675-680.
- 4 E. D. Sevier und M. Shannon, *Biochim. Biophys. Acta*, 497 (1977) 578-585.
- 5 N. A. M. Saleh, J. E. Poulton und H. Grisebach, *Phytochemistry*, 15 (1976) 1865-1868.
- 6 W. Eschrich, *Planta*, 70 (1977) 99-124.
- 7 L. Nagels, M. Molderez und F. Parmentier, *Phytochemistry*, 20 (1981) 965-967.
- 8 J. D. Anderson, L. Hough und J. B. Pridham, *Biochem. J.*, 77 (1960) 564-566.
- 9 G. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 10 J. B. Pridham, *Phytochemistry*, 3 (1964) 493-497.
- 11 T. Yamaha und C. E. Cardini, *Arch. Biochem. Biophys.*, 86 (1960) 127-132.
- 12 M. Tabata, F. Ikeda, N. Hiraoka und M. Konoshima, *Phytochemistry*, 15 (1976) 1225-1229.
- 13 P. Trinder, *Ann. Clin. Biochem.*, 6 (1969) 24-27.
- 14 K. Bartl, R. Deeg und J. Ziegenhorn, *GIT-Labor-Medizin*, 4 (1981) 89-94.
- 15 B. Entsch, C. W. Parker, D. S. Letham und R. W. Summons, *Biochim. Biophys. Acta*, 570 (1979) 124-139.
- 16 P. Müller, H.-D. Knöfel und G. Sembdner, in K. Schreiber, H. R. Schütte und G. Sembdner (Herausgeber), *Biochemistry and Chemistry of Plant Growth Regulators*, Halle, 1974, S. 115-119.
- 17 R. Eisenthal und A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.*, 139 (1974) 715-720.
- 18 J. F. Morrison, *Austr. J. Sci.*, 27 (1964-65) 317-327.
- 19 D. S. Frear, *Phytochemistry*, 7 (1968) 381-390.
- 20 M. Molderez, L. Nagels und F. Parmentier, *Phytochemistry*, 17 (1978) 1747-1750.
- 21 M. Matsui und F. Nagai, *Anal. Biochem.*, 105 (1980) 141-146.
- 22 J. Kamsteeg, J. v. Brederode und G. v. Nigtevecht, *Biochem. Genet.*, 16 (1978) 1045-1058.
- 23 E. Cabib und L. F. Leloir, *J. Biol. Chem.*, 231 (1958) 259-275.
- 24 H. Harms, H. Söchtig und K. Haider, *Plant Soil*, 32 (1969) 257-272.
- 25 A. D. M. Glass und B. A. Bohm, *Phytochemistry*, 9 (1970) 2197-2198.