

Zur Bestimmung der Polyphenoloxydaseaktivität in Kartoffelknollen

KLAUS SCHALLER

Mitteilung aus dem Institut für Pflanzenernährung der Technischen Universität
München in Weihenstephan (BRD)

Eingegangen am 14. August 1972.

On the Determination of Polyphenoloxidase-Activity in Potatoes

Summary. The method of Voigt and Noske for the determination of polyphenoloxidase (PPO) was modified for analysis in potatoes by determining the pH-optimum with pH 5,8 in phosphate buffer and the temperature optimum with 22°C. The PPO was completely inhibited by $5 \cdot 10^{-4}$ mol cystein; the prepared acetone-dried samples can be preserved in the exsiccator for 3 weeks without any loss of activity.

Zusammenfassung. Die von Voigt u. Noske [8, 9] beschriebene Methode zur Bestimmung der Phenoloxydase-Aktivität (PPO) wurde für Kartoffelknollen modifiziert. Hierzu wurden das pH-Optimum mit pH 5,8 in Phosphatpuffer nach McIlvain sowie das Temperaturoptimum mit 22°C ermittelt. Durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol Cystein wurde eine totale Hemmung der PPO festgestellt. Die hergestellten Acetontrockenpräparate sind 3 Wochen im Exsiccator bei unveränderter Aktivität haltbar.

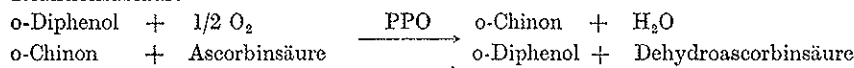
Einleitung

Die Polyphenoloxydase (PPO) benutzt als Substrat o-Diphenole (z. B. Kaffeesäure) und Polyphenole (z. B. Chlorogensäure), die zu den entsprechenden o-Chinonen oxydiert werden unter gleichzeitiger Hydroxylierung von Monophenolen.

In der Lebensmitteltechnologie ist sie von Bedeutung im Hinblick auf die sogenannte Rohdunkelung bei der Verarbeitung pflanzlicher Produkte, im Bereich der Phythopathologie wird sie als Teil eines Abwehrmechanismus der Pflanze gegen Parasiten diskutiert.

In einer Vielzahl von Methoden [1] wird die titrimetrische Bestimmung der PPO-Aktivität sehr häufig angewendet. Dem Enzymansatz wird eine bestimmte Menge Ascorbinsäure zur Reduktion der gebildeten Chinone zugesetzt und nach dem Abstoppen der Reaktion mit Metaphosphorsäure der nicht verbrauchte Rest zurücktitriert.

Reaktionsablauf:



Diese Bestimmung birgt Fehlermöglichkeiten in sich, insbesondere bei Vorliegen gefärbter Pflanzenextrakte (schlechter Umschlagspunkt!).

Im gleichen Maße anfällig sind auch spektrophotometrische Methoden, bei denen die Abnahme des zugesetzten Substrates bzw. die Zunahme des gebildeten Produktes im Absorptionsmaximum gemessen wird [4]. Hier wirkt sich besonders nachteilig aus, daß die gebildeten o-Chinone starke Inhibitoren sind und die Enzymreaktionen schnell zum Stillstand bringen.

Methodik

Nach Abwägung aller in den oben genannten Methoden auftretenden Fehlermöglichkeiten haben wir uns für die von Voigt u. Noske [8, 9] entwickelte Arbeitsweise entschieden: Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß das gebildete o-Chinon mit 3-Methylbenzthiazolinon-2-hydrason (Besthorn's Reagens) gekoppelt wird und aus dem Testansatz in eine unterschichtete Chloroform-Phase überführt wird; die Enzymreaktion wird auf diese Weise durch die entstehenden Reaktionsprodukte nicht gehemmt. Da die von Voigt u. Noske [8, 9] beschriebene Methode nur für Apfelmohngemate ausgearbeitet wurde, war ihre Brauchbarkeit für Kartoffelpräparate noch zu prüfen.

1. Herstellung des Aceton-trockenpräparates

20 g gewürfelte Kartoffeln (Mischprobe) in ein weites Reagensglas (\varnothing 3 cm, Höhe 20 cm) einwiegen, mit 40 ml Aceton von -18°C übergießen und im „Ultra Turrax“ (Typ 18/2, Janke & Kunkel, Staufen/Br.) 30 sec mischen. Den erhaltenen Brei auf einer ausgewogenen Glasfilternutsche (Schott 15 G3) zehnmal mit jeweils 10 ml Aceton durchspülen, zunächst ohne Unterdruck. Gegen Ende des Spülvorgangs mit einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum anlegen und damit den größten Teil des Acetons entfernen. Den Rest im Vakuumexsiccator (nach ca. 3/4 Std) entfernen. Die Glasfilternutsche mit dem Präparat auswiegen und durch Subtraktion der Tara das je 20 g Frischmasse gewonnene Trockenpräparat ermitteln. Dieses in einer Reibschale zu einem trockenen, feinen Pulver verreiben. Hierdurch wird erreicht, daß keine Entmischung im Trockenpräparat mehr stattfindet und mit einer guten Durchschnittsprobe weitergearbeitet werden kann.

2. Enzymaktivität

10 ml Substratlösung (50 mg Brenzcatechin, Merck pro anal in Phosphatpuffer nach McIlvain) in einer Waschflasche mit Fritteneinsatz mit 10 mg Enzym-trockenpräparat, 60 ml Chloroform und 1 ml Besthorn's Reagens (1%ige Lösung des Hydrazons in Methanol) versetzen. Dann 20 min lang Luft (150 l/Std) durch den Ansatz leiten, die Chloroformschicht abtrennen, die wäßrige Phase noch einmal mit Chloroform ausschütteln und die vereinigte organische Phase auf ein bestimmtes Volumen (z. B. 80 ml) ergänzen. Die Intensität der entstandenen Rotfärbung im Spektralphotometer bei 500 nm (Abb. 1) in 1-cm-Küvetten messen. Als Blindwert dient eine Vergleichsprobe ohne Substrat.

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die von Voigt u. Noske [8, 9] vorgeschlagene Formel übernommen:

$$\text{PPO-Aktivität} = E \times \frac{T_1}{T_2}$$

Dabei ist: E = Extinktion der Chloroform-Phase bei 500 nm in 1-cm-Küvetten; T_1 = mg Trockenpräparat, das aus 20 g Frischmaterial gewonnen wird; T_2 = mg Trockenpräparat, das für den Enzymansatz verwendet wird.

Nach dieser Berechnung wird die Enzymaktivität auf den Trockensubstanzgehalt der Probe bezogen. Diese Bezugsgröße ist nicht ganz korrekt, exakter wäre der Proteingehalt. Sie wurde aber trotzdem beibehalten, da die Methode in dieser Form besser für große Serienbestimmungen geeignet ist.

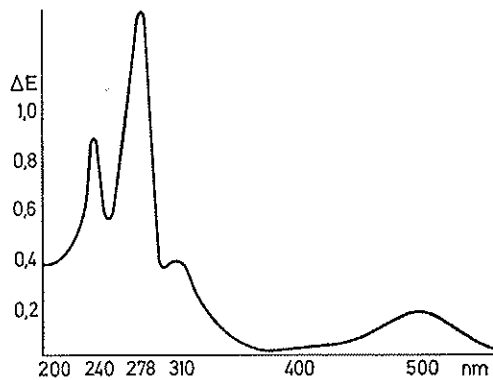


Abb. 1. Absorptionsspektrum der entstehenden Rotfärbung; gemessen im Zeiss-Spektrofotometer PM QII

3. Methodische Vorversuche

Die von Voigt u. Noske [8, 9] gefundene Abhängigkeit der entstehenden Rotfärbung von Enzymmenge, Luftdurchflußgeschwindigkeit und Reaktionsdauer konnte bestätigt werden. Da die Autoren jedoch keine Angaben über die Incubationstemperatur gemacht haben und das pH-Optimum der Kartoffelphenolase nicht bekannt war, mußten entsprechende Daten erarbeitet werden.

pH-Optimum: Die Enzymaktivität wurde wie unter 1. beschrieben in Phosphatpuffer nach Mellvain im Bereich von pH 3,0–8,6 gemessen (Abb. 2).

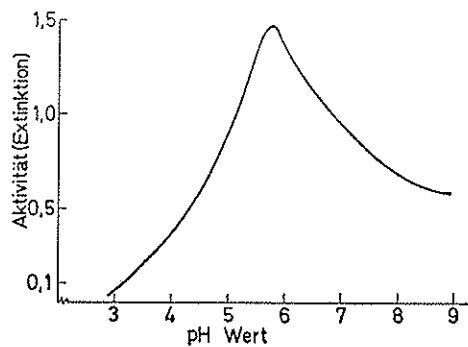


Abb. 2. pH-Optimum der PPO

Die PPO hat also ein sehr scharf definiertes Optimum bei pH 5,8. Im alkalischen Bereich ist der Abfall nicht so stark wie im sauren, wo die Aktivität bei pH 3,0 schon fast Null ist. Der von Voigt u. Noske [8, 9] empfohlene pH-Wert von 6,0 für Apfeltrockenpräparate würde auf Kartoffelpräparate übertragen gegenüber dem von uns ermittelten Optimum zu einem Aktivitätsverlust von 8 % führen.

Temperatur-Optimum.

Bei der unter 1. beschriebenen Arbeitsweise kommt es, bedingt durch das Hindurchleiten der Luft durch den Reaktionsansatz, zu einem Verdampfen des Chloroforms und somit zu einer Abkühlung des gesamten Enzymansatzes. Da in der zitierten Arbeit keine genaue Temperatur angegeben ist, ermittelten wir für unsere Bedingungen das Temperaturoptimum.

Hierzu wurden die Waschflaschen in einen „Ultrathermostaten“ (Meßgerätewerk Lauda) bzw. Kryomaten (Typ KD 50, Meßgerätewerk Lauda) gestellt und durch die Ansätze vorgewärmte bzw. gekühlte Luft durchgeleitet.

Aus Abb. 3 wird ersichtlich, daß die PPO unter dem gegebenen Versuchsbedingungen ein Optimum bei 22°C besitzt; die Bestimmungen müssen also in einem Thermostaten durchgeführt werden.

Erstaunlich ist allerdings, daß im Bereich tieferer Temperaturen (0 bis -12°C) noch eine verhältnismäßig hohe Aktivität vorhanden ist (bei -12°C sind erst 52% der ursprünglichen Aktivität verloren gegangen).

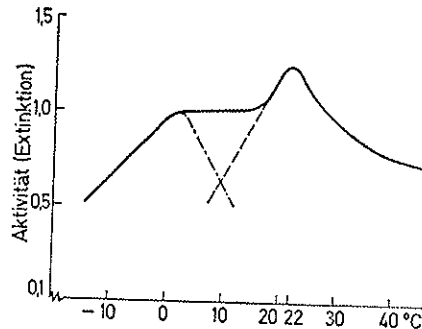


Abb. 3. Temperaturoptimum der PPO

Die in Abb. 3 gestrichelt eingezeichnete Linie könnte zu der Vermutung Anlaß geben, daß das Enzym zwei Temperaturoptima besitzt. Dies könnte durch die Untersuchungen von Marcræ u. Duggleby [3] erhärtet werden, die für die Phenoloxydase zwei aktive Zentren postulieren.

Diese Ergebnisse bestätigen damit die Befunde von Kiermeier [2], wonach bestimmte Enzyme in pflanzlichem bzw. tierischem Material sowie in Mikroorganismen trotz tiefer Temperaturen noch teilweise aktiv bleiben können. Dieses Verhalten der PPO kann dazu beitragen, das Nachdunkeln „vorfritierter“ Pommes frites zu erklären, die während des Einfrierens – sofern keine Schockgefrierung vorgenommen wird – meistens einen sogenannten „Rot- oder Blaustich“ bekommen [6].

Hemmung der Aktivität: Es ist bekannt, daß z. B. Ascorbinsäure als Inhibitor der PPO im Bereich von $4 \cdot 10^{-5}$ mol wirken kann [7]. In den folgenden Versuchen wurde die Hemmwirkung des Cysteins auf Kartoffel-PPO geprüft. Zu diesem Zwecke wurden Reaktionsansätze mit steigenden Mengen Cystein versetzt und nach dem Abstoppen der Reaktion die Extinktion der organischen Phase gemessen (Tab. 1).

Tabelle 1. Wirkung steigender Cysteinmengen auf die PPO-Aktivität

Cysteinzugabe in 10^{-5} mol	Aktivität in % der Kontrolle
0,1	112
0,5	103
0,8	94
1	71
2	62
5	34
8	27
10	9
50	0

Im Bereich von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-6}$ mol Cystein tritt eine leichte Stimulation der PPO-Aktivität ein, eine weitere Steigerung der CysteinKonzentration führt jedoch zu einem Abfall von 6 bis schließlich 100 %.

Tabelle 2. Aufhebung der durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol Cystein bewirkten Hemmung der PPO mittels PCMB

PCMB-Zusatz in 10^{-4} mol	Aktivität in % der Kontrolle
0	0
1	39
2	46
3	48
5	51

Wenn man dem Ansatz aber entsprechende Mengen an p-Chlormercuribenzoat (PCMB) zusetzt, kann ein Teil der Enzymaktivität zurückgewonnen werden (Tab. 2).

Eine Hemmung der PPO durch PCMB allein konnte dagegen nicht beobachtet werden, damit ist indirekt bewiesen, daß dieses Enzym keine aktiven SH-Gruppen besitzt, sondern ein Schwermetallprotein darstellt. Durch Zusatz eines „SH-Gruppenblockers“ kann die durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol Cystein bewirkte totale Hemmung der PPO zu rund 50 % wieder aufgehoben werden.

Haltbarkeit des Acetontrockenpräparates. Acetontrockenpräparate zur Bestimmung der Kartoffel-PPO haben nach Weaver u. Hautala [10] eine Haltbarkeit von mehr als einem Jahr. Unsere Versuche ergaben aber, daß eine unveränderte Aktivität nur über einen Zeitraum von 3 Wochen gegeben ist (Tab. 3).

Tabelle 3. Aktivität der PPO in Acetontrockenpräparaten bei verschiedener Lagerzeit

Lagerzeit in Wochen	Aktivität der PPO	Aktivitätsverlust gegenüber Zeitpkt. 0 in %
0	0.926	—
1	0.926	—
3	0.926	—
4	0.835	10
5	0.702	24
6	0.474	50

Nach 6 Wochen ist bereits ein Verlust von 50 % eingetreten. Die Trockenpräparate wurden im abgedunkeltem und evakuiertem Exsiccator aufbewahrt.

4. Endgültige Arbeitsweise zur Bestimmung der Polyphenoloxydase-Aktivität

Die Herstellung des Acetontrockenpräparates erfolgt wie unter 1. beschrieben; die Präparate werden im Vakuumexsiccator aufbewahrt und innerhalb 3 Wochen verarbeitet.

10 ml Substratlösung (50 mg Brenzcatechin, Merck pro anal. Phosphatpuffer nach McIlvain pH 5,8) in einer Waschflasche mit 10 mg Enzymtrockenpräparat, 60 ml Chloroform und 1 ml Besthorn's Reagens (1%ige Lösung des Hydrazons in Methanol) versetzen. Die Waschflaschen in einen Thermostaten bei 22°C bringen (Ultra Thermostat, Meßgerätewerk Lauda), sodann 20 min lang Luft hindurchleiten (150l/Std) und weiter verfahren wie unter 1. beschrieben.

Diskussion

Der vorliegenden „endgültigen Arbeitsweise“ zur Bestimmung der Aktivität der Phenoloxydase in Kartoffelknollen haftet eine gewisse Fehlermöglichkeit an, da die Enzymaktivitäten auf Trockensubstanz bezogen werden und nicht wie gewöhnlich auf Protein im Enzymansatz. Wie aber an anderer Stelle nachgewiesen werden konnte [5], sind die Schwankungen der Trockensubstanzgehalte von Kartoffeln während der Lagerperiode sehr gering (1–2 %). Die Aktivitäten der Polyphenoloxydase nehmen aber z. T. bis zu 200 % ab, so daß diese Fehlerquelle im Rahmen unserer Arbeiten als gering erachtet werden kann. Unter Berücksichtigung dieses Mangels ist die Methode sehr gut für Routineanalysen und vergleichende Untersuchungen geeignet.

Literatur

1. Amberger, A.: Habilitationsschrift TU München, 1952.
2. Kiermeier, F.: *Naturwissenschaften* **39**, 323—325 (1951).
3. Marcrae, A.R., Duggleby, R.G.: *Phytochemistry* **7**, 855—861 (1968).
4. Matsuzawa, T.: *Tokushima J. Exp. Med.* **7**, 143—153 (1960).
5. Schaller, K.: Diss. TU München, 1971.
6. Schönfeld, V.A.: Persönliche Mitteilung
7. Täufel, K., Voigt, J.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **126**, 19 (1964).
8. Voigt, J., Noske, R.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **129**, 359—364 (1965).
9. — — *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **130**, 9—12 (1966).
10. Weaver, M.L., Hautala, E.: *J. Sci. Food. Agr.* **20**, 627—629 (1969).

Dr. Kl. Schaller
Hessische Forschungsanstalt für
Wein, Obst und Gartenbau
D-6222 Geisenheim
Rüdesheimer Straße
Bundesrepublik Deutschland