



Spezialenzyme GmbH



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Science

Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens zur Herstellung von definierten Farbextrakten aus Apfeltrester auf Basis von Polyphenoloxidasen

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Janna Scherf



am 20. Dezember 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä

HAW Hamburg

2. Gutachter: Dr. Arno Cordes

ASA Spezialenzyme GmbH

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens zur Herstellung von definierten Farbextrakten aus Apfeltrester auf Basis von Polyphenoloxidasen“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Janna Scherf

Braunschweig, 20. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 PROBLEMDARSTELLUNG	1
1.2 ZIELSETZUNG	2
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 POLYPHENOLOXIDASEN	3
2.1.1 Vorkommen.....	3
2.1.2 Katalysierte Reaktionen	3
2.1.3 Struktur und biochemische Eigenschaften.....	4
2.1.4 Molekularer Reaktionsmechanismus.....	6
2.1.5 Abgrenzung der Laccasen von den PPOs	8
2.1.6 Enzymquellen	9
2.2 POLYPHENOLE	9
2.2.1 Vorkommen und Struktur	9
2.2.2 Polyphenole im Apfel und Apfeltrester.....	11
2.2.3 Phloridzin und seine Oxidationsprodukte	11
2.3 AKTUELLER STAND DER TECHNOLOGIE	13
3. METHODEN	14
3.1 VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT.....	14
3.1.1 Brenzcatechin-Test.....	14
3.1.2 2,6-Dimethoxyphenol-Test.....	15
3.1.3 ABTS-Test	15
3.2 EXTRAKTION.....	16
3.2.1 Extraktion der PPOs aus pflanzlichen Quellen	16
3.2.2 Extraktion der Polyphenole aus dem Apfeltrester	17
3.3 STABILISIERUNG DER ENZYMEXTRAKTE.....	18
3.3.1 Ammoniumsulfat-Fällung.....	18

3.3.2 Lyophilisation	18
3.3.3 Lagerung in Glycerin.....	18
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMEXTRAKTE.....	19
3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums	19
3.4.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums	19
3.4.3 Stabilität in Ethanol	20
3.4.4 Aktivität in Ethanol.....	20
3.5 REAKTION MIT PHLORIDZIN.....	21
3.6 REAKTION MIT DEM APFELTRESTEREXTRAKT	21
3.7 BESTIMMUNG DES GESAMTPOLYPHENOLGEHALTES NACH FOLIN-CIOCALTEU	22
4. MATERIAL.....	23
4.1 BIOLOGISCHE MATERIALIEN	23
4.1.1 Extraktionsgut	23
4.1.2 Enzyme	23
4.2 CHEMIKALIEN	23
4.3 GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	24
5. ERGEBNISSE.....	25
5.1 EXTRAKTION.....	25
5.1.1 Extraktion der PPOs aus pflanzlichen Quellen	25
5.1.2 Extraktion der Polyphenole aus dem Apfeltrester	26
5.2 STABILISIERUNG DER ENZYMEXTRAKTE.....	27
5.3 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMEXTRAKTE.....	31
5.3.1 Bestimmung der Laccase-Aktivität.....	31
5.3.2 Bestimmung des pH-Optimums	31
5.3.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	33
5.3.4 Stabilität in Ethanol	34
5.3.5 Aktivität in Ethanol.....	37
5.4 REAKTION MIT PHLORIDZIN.....	40
5.5 REAKTION MIT DEM APFELTRESTEREXTRAKT	43
6. DISKUSSION.....	46
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	53
ANHANG	57

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: Überblick der PPO-katalysierten Reaktionen.	3
ABBILDUNG 2: Das aktive Zentrum einer PPO aus Wallnussblättern in der Stäbchendarstellung.	5
ABBILDUNG 3: Tabellarische Auflistung der pH-Optima verschiedener PPOs in Abhängigkeit des eingesetzten Substrates.	6
ABBILDUNG 4: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus einer PPO aus <i>N. crassa</i> .	6
ABBILDUNG 5: Allgemeiner Mechanismus der Laccase-katalysierten Oxidation phenolischer Substanzen.	8
ABBILDUNG 6: Übersicht über die Stoffklassen der Flavonoide.	10
ABBILDUNG 7: Reaktionsweg zur Bildung von POPi und POPj aus Phloridzin.	12
ABBILDUNG 8: PPO-katalysierte Reaktion von Brenzcatechin zu 1,2-Benzochinon.	14
ABBILDUNG 9: Laccase-katalysierte Reaktion von 2,6-Dimethoxyphenol zu TMBP.	15
ABBILDUNG 10: Laccase-katalysierte Reaktion von ABTS zum ABTS ^{•+} -Radikal-Kation.	16
ABBILDUNG 11: Kalibriergerade zur Berechnung des Gesamtpolyphenolgehaltes.	22
ABBILDUNG 12: Enzymaktivität nach Extraktion in Abhängigkeit des Extraktionsmittels und des Extraktionsgutes.	25
ABBILDUNG 13: Enzymaktivität in den Extrakten (Lagerung -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit.	27
ABBILDUNG 14: Verbleibende Enzymaktivität in den resuspendierten Pellets nach AS-Fällung (Lagerung bei -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit.	28
ABBILDUNG 15: Verbleibende Enzymaktivität in den Lyophilisaten (Lagerung bei -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit.	29
ABBILDUNG 16: Verbleibenden Enzymaktivität bei Lagerung in 50 % Glycerin (Lagerung bei -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit.	30
ABBILDUNG 17: Enzymaktivitäten der Extrakte in Abhängigkeit des pH-Wertes.	32
ABBILDUNG 18: Enzymaktivitäten der Extrakte in Abhängigkeit der Temperatur.	33
ABBILDUNG 19: Enzymaktivität im Bananenextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit.	35
ABBILDUNG 20: Enzymaktivität im Beifußextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit.	36
ABBILDUNG 21: Enzymaktivität im Traubenextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit.	36

- ABBILDUNG 22:** Enzymaktivität des Bananenextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). **38**
- ABBILDUNG 23:** Enzymaktivität des Beifußextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). **38**
- ABBILDUNG 24:** Enzymaktivität des Traubenextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). **39**
- ABBILDUNG 25:** Darstellung des Reaktionsverlaufes von Bananen- und Beifußextrakt und Laccase A mit 0,001 M Phloridzin in McIlvaine-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten. **41**
- ABBILDUNG 26:** Darstellung des Reaktionsverlaufes von Bananen- und Beifußextrakt und Laccase A mit dem Apfeltrestereextrakt. **44**

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: Auflistung der zur Extraktion verwendeten Komponenten und Zusätze und deren Zweck.	17
TABELLE 2: Übersicht des verwendeten Extraktionsguts.	23
TABELLE 3: Übersicht der verwendeten Enzymgemische.	23
TABELLE 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien.	23
TABELLE 5: Zusammensetzung häufig verwendeter Pufferlösungen.	24
TABELLE 6: Übersicht der verwendeten Geräte und Hilfsmittel.	24
TABELLE 7: Mittels Brenzcatechin-Test bestimmte Aktivitäten aller Extraktionen mit Extraktionsmittel 2.	26
TABELLE 8: Zusammenfassung der Eigenschaften des Apfeltresterextraktes.	27
TABELLE 9: Zusammenfassung der Aktivitätsausbeuten nach Anwendung der jeweiligen Stabilisierungsmethode.	30
TABELLE 10: Ermittelte pH-Optima bei 25 °C mit Brenzcatechin als Substrat.	32
TABELLE 11: Ermittelte Temperatur-Optima bei pH 6,0 mit Brenzcatechin als Substrat.	34
TABELLE 12: Ergebnisse der pH-Wert-Ermittlung in den verschiedenen Apfeltresterextraktansätzen.	43

Abkürzungsverzeichnis

A	Enzymaktivität
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AS	Ammoniumsulfat
Cu	Kupfer
EtOH	Ethanol
GAE	Gallic acid equivalents
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxy
<i>ortho</i>	<i>o</i>
<i>para</i>	<i>p</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumkonzentration
POP	Phloridzin oxidation product
POP_i	Phloridzin oxidation product (farbloses Intermediat)
POP_j	Phloridzin oxidation product (gelber bis oranger Stoff)
PPO	Polyphenoloxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TMBP	3,3'-5,5'-Tetramethyl-1,1'-biphenyl-4,4'-diol
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VIS	visible

Zusammenfassung

Die Nachfrage für natürlich hergestellte, biologische Lebensmittelfarben steigt. Eine Möglichkeit zur Erzeugung ist die von Polyphenoloxidasen katalysierte Reaktion von Polyphenolen zu färbenden Chinonen und Melaninen. Insbesondere das in Äpfeln und im Apfeltrester vorkommende Dihydrochalkon Phloridzin bildet gelbliche Oxidationsprodukte, die als Färbemittel in Frage kommen. In dieser Arbeit soll mittels pflanzlicher Polyphenoloxidasen und fungaler Laccasen ein ethanolhaltiger, polyphenolreicher Extrakt aus Apfeltrester zu andersfarbigen Komponenten umgesetzt werden.

Dazu wurden Polyphenoloxidasen aus dem Fruchtfleisch von Bananen und Trauben und den Blättern des Beifußes extrahiert. Die entstandenen Enzymextrakte zeigten pH-Optima im neutralen Bereich. Das Temperatur-Optimum des Bananen-, Trauben- und Beifußextraktes lag bei jeweils 43, 30 und 35 °C. Des Weiteren wurden die Enzymextrakte bezüglich ihrer Stabilität und Aktivität in ethanolhaltigen Lösungen charakterisiert, um die Enzyme optimal einsetzen zu können.

Ein weiteres Kriterium für den Einsatz war die Umsetzung von Phloridzin. Bei der Reaktion mit reinem Phloridzin zeigten die Ansätze des Traubenextraktes, der Laccase C und Laccase F keinen Farbumschlag. Bananen- und Beifußextrakt und Laccase A waren in der Lage, die Reaktion von Phloridzin in gelbliche bis bräunliche Produkte zu katalysieren. Diese Enzyme wurden für die Umsetzung des Apfeltresterextraktes eingesetzt. Dabei wurde deutlich, dass jedes der Enzyme in der Lage ist, Farbveränderung im Extrakt hervorzurufen. Zu Faktoren, die die Reaktion maßgeblich beeinflussen, gehören unter anderem die Art und Herkunft der Enzyme, der pH-Wert und die Ethanolkonzentration im Reaktionsmedium.

1. Einleitung

1.1 Problemdarstellung

Die Farbe von Lebensmitteln spielt eine große Rolle bei der Kundenakzeptanz und –beliebtheit. Deshalb wird häufig auf Lebensmittelfarbstoffe zurückgegriffen. Sie sollen Farbveränderungen und Farbverluste ausgleichen, die bei der Lagerung, der Verarbeitung und dem Transport der Waren entstehen können. Verbraucher reagieren stark auf das Aussehen von Lebensmitteln. Wird ihre Farberwartung gegenüber bestimmten Lebensmitteln erfüllt, entscheiden sie sich für diese. Dabei werden sogenannte Schlüsselreize ausgelöst, z. B. die positive Erinnerung an frühere Geschmackserlebnisse ^[1]. Die meisten in Deutschland zugelassenen Farbstoffe zum Färben von Lebensmitteln gelten als Lebensmittelzusatzstoffe und müssen nach EU-Norm mit einer E-Nummer kenntlich gemacht werden ^[2].

Die Farbstoffe lassen sich in zwei Gruppen einteilen: natürliche und synthetische Farbstoffe. Die natürlichen Farbstoffe sind pflanzlichen oder tierischen Ursprungs und werden direkt aus ihren jeweiligen Quellen gewonnen. Synthetische Farbstoffe werden künstlich hergestellt und kommen so in der Natur nicht vor. Zu ihnen gehört auch die Gruppe der naturidentischen Stoffe. Als diese werden synthetische Nachbildungen von in der Natur vorkommenden Stoffen bezeichnet ^[1].

Früher wurden überwiegend synthetische Stoffe eingesetzt. Allerdings geraten diese immer mehr in Diskussion, gesundheitsschädlich zu sein. Dazu gehören in erster Linie Zuckercouleur-basierte Farbstoffe, die eine braune bis dunkelbraune Färbung verursachen und unter anderem in Cola, Whisky und Süßigkeiten enthalten sind. Besonders Ammoniumsulfid-Zuckercouleur (E150d) steht im Verdacht kanzerogen zu sein ^[3]. Auch dem zu den Azofarbstoffen gehörenden Tartrazin (E102) werden gesundheitsschädliche Eigenschaften nachgesagt. Es wird eingesetzt, um z. B. Süßwaren, Käserinde oder Liköre gelb bis orange zu färben. Neben der allergieauslösenden Wirkung wird vermutet, dass Tartrazin Hyperaktivität bei Kindern fördert ^[1].

Aufgrund des schlechten Rufes synthetischer Stoffe und der steigenden Verbrauchersensibilität werden mit der Zeit immer mehr natürliche Lebensmittelfarben und Extrakte aus biologischen Quellen eingesetzt. Für einige Farbschattierungen steht aber nur eine begrenzte Anzahl an farbgebenden Komponenten zur Verfügung. So gibt es zwar Alternativen für Gelb-, Karamell- und Brauntöne, allerdings erfüllen diese die Voraussetzungen der Lebensmittelindustrie nur unzureichend. Oft sind sie unter den gewünschten Verarbeitungs- und Lagerbedingungen wie pH-Wert, Temperatur oder Lichteinwirkung nicht stabil. Zu diesen natürlichen Alternativen gehört das Curcumin, welches aus der Gelbwurzel gewonnen wird. Es verursacht eine gelbe bis orange Färbung und wird z. B. in Margarine,

Marmelade und Senf eingesetzt. Allerdings ist der Stoff schlecht wasserlöslich und nicht lichtecht. Unter Lichteinfluss verliert er schnell an Farbintensität ^[1].

Es besteht also ein sehr hohes Potential für neue, natürliche Lebensmittelfarben im Bereich von gelb bis braun. Eine vielversprechende Quelle dafür stellen die bräunlichen Oxidationsprodukte der im Apfel enthaltenen Polyphenole dar. Bei der Beschädigung von Apfelgewebe werden fruchteigene Enzyme, die Polyphenoloxidasen (PPOs), freigesetzt. Unter Sauerstoffverbrauch oxidieren diese Enzyme Polyphenole zu gelblichen Chinonen. Diese polymerisieren leicht zu Melaninen, welche die bräunliche Färbung hervorrufen ^[4].

Unter den Apfelpolyphenolen spielt vor allem das glykosylierte Flavonoid Phloridzin eine Rolle. Es soll auf Arbeiten aufgebaut werden, die bereits die Verwendung von oxidiertem Phloridzin und anderen Apfelpolyphenolen als Färbemittel beschreiben ^{[4], [5]}. Als Polyphenolquelle soll Apfeltrester, der Pressrückstand bei der Apfelsaftherstellung, eingesetzt werden. Dieser fällt in großen Mengen an und ist dementsprechend verfügbar. Er bietet eine kostengünstige Substratquelle für die Erzeugung von neuartigen, natürlichen Farbextrakten. Diese sollen mittels pflanzlichen PPOs und fungalen Laccasen hergestellt werden.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, geeignete Polyphenoloxidasen für die Umsetzung von Phloridzin und weiteren Apfelpolyphenolen aus pflanzlichen Quellen zu isolieren und hinsichtlich ihres späteren Einsatzgebietes zu charakterisieren. Im Zuge dessen werden das Fruchtfleisch von Bananen und Trauben und die Blätter des Beifußes auf ihren PPO-Gehalt und dessen Eigenschaften untersucht.

Des Weiteren soll das Verhalten der PPOs und der von ASA Spezialenzyme produzierten Laccase-Gemische bei der Reaktion mit Phloridzin und einem aus Apfeltrester hergestellten polyphenolreichen Extrakt ermittelt werden. Ziel dabei ist die Erzeugung verschiedener Farbtöne im gelben bis bräunlichen Bereich durch Einsatz der unterschiedlichen PPOs und Laccasen und Variation der Reaktionsparameter.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Polyphenoloxidasen

2.1.1 Vorkommen

PPOs sind kupferhaltige Enzyme, die in Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien vertreten sind [6]. Sie katalysieren unter Sauerstoffverbrauch die Reaktion von Mono- bzw. Polyphenolen zu ihren korrespondierenden *ortho*-Chinonen. Polymerisieren oder kondensieren diese oft gelblichen *o*-Chinone in nichtenzymatischen Reaktionen weiter, entstehen bräunliche Pigmente. Diese sorgen für die unerwünschte Bräunung von Lebensmitteln wie Obst und Gemüse [7].

In Tieren und bei Menschen sind PPOs in die Biosynthese von Melanin involviert. Das Pigment gibt Haut und Haaren ihre Farbe und schützt vor UV-Strahlung [8]. Die biologische Funktion von PPOs in Pflanzen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund des Aktivwerdens bei Verletzungen oder Infektionen wird vermutet, dass sie bei der Abwehr von Krankheitserregern eine Rolle spielen. Erst wenn die Zellen beschädigt werden, kommen PPOs mit den hauptsächlich in der Vakuole lokalisierten Polyphenolen in Kontakt und setzen diese um [9].

2.1.2 Katalysierte Reaktionen

PPOs können zwei unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Im EC-System sind sie als Oxidoreductasen hinterlegt und werden nach ihren Aktivitäten in Monophenol Oxidase (EC 1.14.18.1) und Diphenol Oxidase (EC 1.10.3.1) eingeteilt [10]. Abbildung 1 zeigt einen Überblick der Reaktionen.

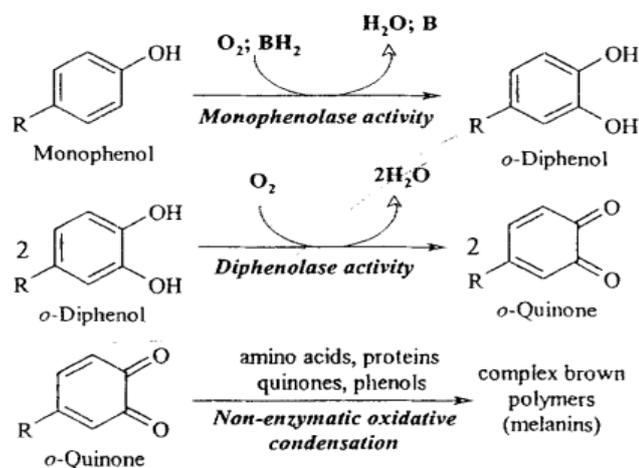


Abbildung 1: Überblick der PPO-katalysierten Reaktionen [6]. Mittels Monophenolase- und Diphenolaseaktivität erfolgt die Umsetzung zu Chinonen. Nicht enzymatische Folgereaktionen durch Polymerisation bilden Melanine. BH_2 bezeichnet eine reduzierende Komponente, die als Elektronen-Donor bei der Umsetzung von Monophenolen dienen kann.

Mittels Monophenolaseaktivität, auch Hydroxylase- oder Cresolaseaktivität genannt, findet die Hydroxilierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen statt. Die darauffolgende Reaktion von Diphenolen zu ihren korrespondierenden Chinonen ist eine 2-Elektronen-Transfer-Reaktion. Sie wird durch die Diphenolaseaktivität (alternativ Oxidase- oder Catecholaseaktivität) katalysiert. Zwei Diphenole werden oxidiert, indem jeweils zwei Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, welcher so zu Wasser reduziert wird. Es ist zu beachten, dass PPOs ausschließlich Diphenole in *ortho*-Stellung katalysieren, anders als Laccasen (siehe 2.1.5). Die nichtenzymatische Polymerisationsreaktion der Chinone kann von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden, darunter Proteine, Aminosäuren oder andere Chinonen und Phenole^[6].

In den höheren Pflanzenarten besitzen PPOs häufig Mono- und Diphenolaseaktivität, wobei die Diphenolaseaktivität die dominierende ist. Monophenolaseaktivität ist dabei immer an Diphenolaseaktivität gekoppelt. Sie zählen damit zu der Gruppe EC 1.14.18.1. Besitzen die Enzyme ausschließlich Diphenolaseaktivität, werden sie der Gruppe EC 1.10.3.1 zugeordnet^[10]. Bei der Umsetzung von Monophenolen kommt es häufig zu einer charakteristischen Lag-Phase, die durch die molekularen Mechanismen des Enzyms bedingt ist. Diese ist dann besonders ausgeprägt, wenn keine *o*-Diphenole oder andere reduzierende Substanzen als Co-Substrate zur Verfügung stehen. Da PPOs eine Vielzahl von Mono- und Polyphenolen umsetzen, können die katalysierten Reaktionen sehr komplex werden und führen zu vielen unterschiedlichen Reaktionsprodukten^[11].

PPO-Aktivität wird meistens photometrisch über die Bestimmung der entstehenden *o*-Chinone gemessen. Diese haben ihr Absorptionsmaximum im Bereich von 400 – 500 nm, je nach Art des gebildeten Chinons^[12].

2.1.3 Struktur und biochemische Eigenschaften

PPOs treten in vielfältigen Strukturen auf. Diese werden unter anderem von der Substratverfügbarkeit in den jeweiligen Pflanzenquellen und ihrer Aktivität (Monophenolase- und/oder Diphenolaseaktivität) beeinflusst. Allen gemeinsam ist aber ihr Gehalt an Kupfer im aktiven Zentrum^[6].

In Abbildung 2 ist das aktive Zentrum am Beispiel einer PPO aus Walnussblättern dargestellt. Es enthält zwei Kupferatome (CuA und CuB) als prosthetische Gruppe und zählt somit zu den dimeren Typ-III-Kupfer-Zentren. Jedes Kupferatom wird von drei Histidinresten koordiniert. Ein Lösungsmittelmolekül, vermutlich ein Hydroxidion, verbindet beide Kupfermoleküle miteinander. Zudem befindet sich ein sperriger aber flexibler Aminosäurerest, meist Phenylalanin, in der sogenannten „Blocker-Position“ über CuA. Dieser Rest versperrt zu einem gewissen Teil den Zugang zum aktiven Zentrum. Seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, wird aber des Öfteren mit der geringeren Monophenolaseaktivität in Verbindung gebracht^[13].

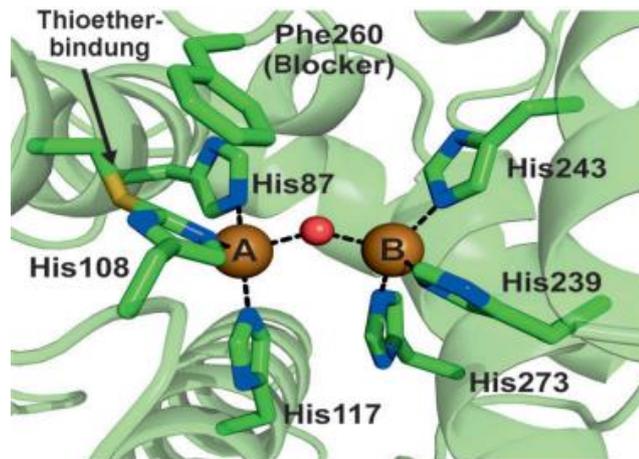


Abbildung 2: Das aktive Zentrum einer PPO aus Walnussblättern in der Stäbchendarstellung ^[13]. Zu sehen sind die histidinkoordinierten Kupferatome A und B, Phenylalanin in der Blockerposition und das Lösungsmittelmolekül (in Rot dargestellt). Die Thioetherbindung schränkt die Flexibilität des His108-Restes ein.

Innerhalb der Pflanzenzelle sind die PPOs vorwiegend in den Chloroplasten lokalisiert. Dort befinden sie sich entweder in löslicher Form oder an bzw. in der Thylakoidmembran gebunden. Bei den Pilzen wird vermutet, dass die Enzyme im Cytoplasma und zellwandgebunden vorliegen ^[10].

PPOs treten in vielfältigen molekularen Formen auf. Sie kommen in den meisten höheren Pflanzen vor und sind selbst innerhalb einer Pflanze in Form unterschiedlicher Isoenzyme vorhanden. Diese unterscheiden sich häufig in ihren biochemischen Eigenschaften ^[14].

Substratspezifität und -affinität variieren unter den PPOs und werden stark vom Substrat (Monophenol/Polyphenol) und der Art und Struktur dessen Seitenketten beeinflusst. Zudem spielt die Anzahl und Position der Hydroxylgruppen eine Rolle. Ebenso sind die pH- und Temperatur-Optima weit gefächert und ändern sich je nach eingesetztem Substrat. Für das pH-Optimum sind Werte von pH 4,0 – 8,0 üblich, für das Temperatur-Optimum 20 – 45 °C. Allerdings sind Fälle dokumentiert, bei denen das Optimum außerhalb der genannten Bereiche liegt. Das Molekulargewicht umfasst ebenfalls ein weites Spektrum und kann zwischen 32 und 200 kDa liegen ^[15]. Abbildung 3 zeigt Beispiele für das variierende pH-Optimum in Abhängigkeit des Substrates.

PPOs existieren in Pflanzen oft zu einem gewissen Anteil in latentem Zustand. Sie sind dann inaktiv, können aber durch verschiedene Methoden aktiviert werden. Dazu gehören unter anderem Behandlungen mit Säuren und Laugen oder mit dem Detergens SDS ^[16].

Enzyme Source	Substrate	pH Optimum	Reference
Almond	4-Methylcatechol	5.0	Fraignier <i>et al.</i> (1995)
Apple	4-Methylcatechol	3.5-4.5	Marques <i>et al.</i> (1995)
	Chlorogenic acid		
Apricot	4-Methylcatechol	5.0-5.5	Fraignier <i>et al.</i> (1995)
Avocado	4-Hydroxyanisole	5.0	Espin <i>et al.</i> (1997)
Cherry	4-Methylcatechol	4.5	Fraignier <i>et al.</i> (1995)
Cocoa	Catechol	6.8	Lee <i>et al.</i> (1991)
Cucumber	Catechol	7.0	Miller <i>et al.</i> (1990)
Dog-rose	Catechol	8.5	Sakiroglu <i>et al.</i> (1996)
	Pyrogallol	7.0	
	L-Tyrosine	7.0	
	<i>p</i> -Cresol	5.0	
Eggplant	4-Methylcatechol	~5.0-6.5	Perez-Gilbert and Carmona (2000)
	tert-Butylcatechol	~5.0-6.5	
	<i>p</i> -Cresol	7.5	
Field bean seeds	Catechol	4.0	Paul and Gowda (2000)
	4-Methylcatechol	4.0	
	L-DOPA ¹	5.0	

Abbildung 3: Tabellarische Auflistung der pH-Optima verschiedener PPOs in Abhängigkeit des eingesetzten Substrates^[6].

2.1.4 Molekularer Reaktionsmechanismus

Der molekulare Reaktionsmechanismus gekoppelter Mono- und Diphenolaseaktivität wurde umfassend anhand einer PPO des Schimmelpilzes *Neurospora crassa* untersucht. Er basiert auf der geometrischen und elektronischen Struktur des aktiven Zentrums und zeigt den Zusammenhang zwischen Mono- und Diphenolaseaktivität^[17]. In Abbildung 4 ist die grafische Darstellung zu sehen.

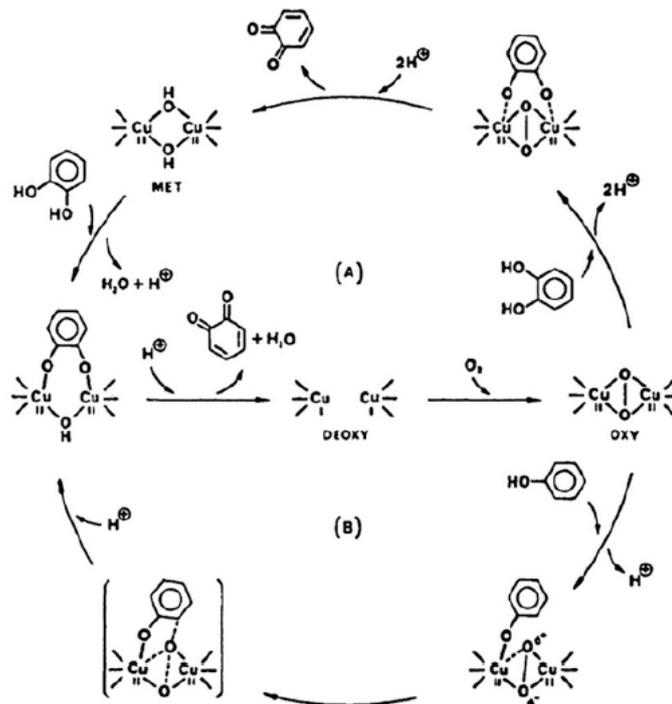


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus einer PPO aus *N. crassa*^[15]. Dargestellt sind der Dehydrierungsmechanismus (A) und die Hydroxilierung von Monophenolen (B).

Das aktive Zentrum existiert in den folgenden drei Formen:

- met-PPO (Cu^{+2})
- deoxy-PPO (Cu^{+1})
- oxy-PPO (Cu^{+2})

Die met-Form beschreibt den vermutlichen Ruhezustand des Enzyms. Der Mechanismus beinhaltet zwei separate Reaktionswege, die über das Intermediat deoxy-PPO verbunden sind.

Abbildung 4 (A) zeigt den Dehydrierungsmechanismus, welchem die Diphenolaseaktivität zugrunde liegt. Sauerstoff bindet an die Cu^{+1} -Atome der deoxy-Form und reduziert diese, sodass oxy-PPO entsteht. Die Cu^{+2} -Atome binden unter Abspaltung von Protonen Sauerstoffatome eines *o*-Diphenols. Es bildet sich der O_2 -*o*-Diphenol-Komplex. Das gebundene *o*-Diphenol wird zum *o*-Dichinon oxidiert, während die PPO unter Aufnahme von Protonen in ihre met-Form reduziert wird. Ein weiteres *o*-Diphenol kann nun unter Abspaltung von Wasser und einem Proton an die met-PPO binden. Durch Aufnahme von einem weiteren Proton werden das *o*-Chinon und Wasser gebildet und die PPO wird zurück in ihre deoxy-Form reduziert.

In Abbildung 4 (B) ist die Hydroxylierung von Monophenolen dargestellt. Monophenole können ausschließlich mit der oxy-Form von PPOs reagieren. Monophenolische Komponenten binden über das Sauerstoffatom ihrer Hydroxylgruppe an ein Cu^{+2} -Atom der oxy-PPO. Es bildet sich ein O_2 -Monophenol-PPO-Komplex. Ein PPO-gebundenes Sauerstoffatom kann nun für die Hydroxylierung des Monophenols in *o*-Position genutzt werden. Durch Protonenaufnahmen kann das entstandene Diphenol freigesetzt werden (hier nicht dargestellt) oder direkt in den Diphenolasezyklus übergehen und zu seinem korrespondierenden *o*-Chinon oxidiert werden, während die PPO in ihren deoxy-Zustand zurückkehrt.

Finden *in vitro* Reaktionen statt, geht man davon aus, dass die PPO in ihrer Ruheform, der met-Form, vorliegt. Sie muss also erst in ihren deoxy-Zustand reduziert werden, bevor Monophenole zu Diphenolen umgesetzt werden können. Die Dauer dieser Reduktion bedingt die unter 2.1.2 bereits erwähnte Lag-Phase. Durch Zusatz reduzierender Komponenten, wie z. B. *o*-Diphenolen, kann diese Phase verkürzt oder sogar aufgehoben werden^[15].

Da dieser Mechanismus zu dem Reaktionsverhalten der meisten untersuchten PPOs passt, kann angenommen werden, dass er auch auf die hier vorliegenden PPOs anwendbar ist.

2.1.5 Abgrenzung der Laccasen von den PPOs

Laccasen (*p*-diphenol Oxidasen, EC 1.10.3.2) sind ebenfalls Enzyme, die unter Sauerstoffverbrauch Polyphenole oxidieren. Sie kommen vorwiegend in Pilzen und Bakterien, seltener in höheren Pflanzen vor. Neben ihrer Rolle im Ligninauf- und Ligningabbau sind sie bei Pilzen an vielen Polymerisationsprozessen, wie z. B. der Pigmentsynthese in Sporen, beteiligt. Bei Pflanzen werden sie in Verbindung mit Zellschäden aktiv^[18].

Sie werden häufig zu den PPOs gezählt, zeigen in Struktur und Reaktionsmechanismus aber einige Unterschiede. Der deutlichste zeigt sich darin, dass sie neben *o*-Diphenolen auch Diphenole in *para*-Stellung und viele weitere aromatische und nicht-aromatische Substrate oxidieren können. Ihr aktives Zentrum enthält, im Gegensatz zu dem von PPOs, vier Kupferatome. Dazu gehören ein Typ-I-Kupferatom, welches für die blaue Erscheinungsform der Laccasen verantwortlich ist, und ein farbloses Typ-II-Kupferatom. Des Weiteren ist ein Typ-III-Kupfer-Dimer, ähnlich dem der PPOs, enthalten. Der Reaktionsmechanismus von Laccasen beruht auf der Bildung von freien Radikalen^[19] und ist in Abbildung 5 dargestellt.

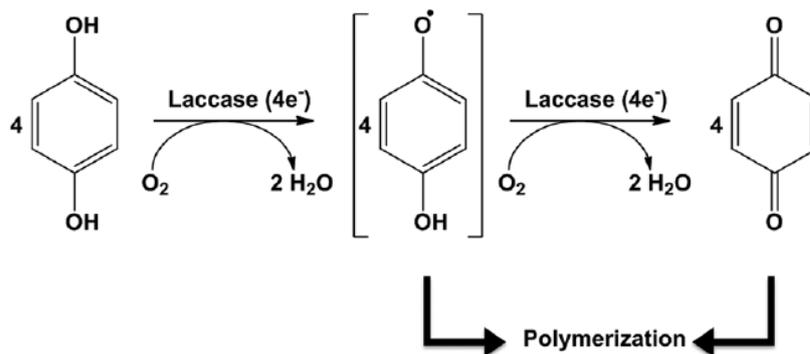


Abbildung 5: Allgemeiner Mechanismus der Laccase-katalysierten Oxidation phenolischer Substanzen^[19]. Laccasen oxidieren Phenole zu Phenoxyradikalen, welche durch erneute Katalyse in Chinone umgewandelt werden oder in Polymerisationsreaktionen eingehen.

Im Gegensatz zu den bei PPOs beobachteten 2-Elektronen-Transferreaktionen findet hier lediglich eine 1-Elektronen-Transferreaktion statt. Sauerstoff und die zu oxidierenden Substrate werden gleichzeitig im aktiven Zentrum gebunden. Ein Elektron von jeweils vier Substratmolekülen wird auf molekularen Sauerstoff übertragen, welcher so zu zwei Molekülen Wasser reduziert wird. Es finden also vier separate Monooxidationen statt, bei denen jeweils ein Elektron transferiert wird. Aus dem *p*-Diphenol entsteht ein freies Phenoxyradikal. Dieses kann durch erneute laccasekatalysierte Oxidation in sein *p*-Chinon umgewandelt werden oder mit anderen Stoffen oder Radikalen spontan polymerisieren. Der hier dargestellte Mechanismus wirkt nicht nur auf *p*-Diphenole, sondern auch auf *o*-Diphenole,

Monophenole und andere Substrate^[19]. Allerdings besitzen Laccasen keine Monophenolaseaktivität. Sie können nicht, wie viele PPOs, die Addition von Hydroxylgruppen an Monophenole katalysieren. Ein weiterer Unterschied zwischen den Laccasen und PPOs ist ihre Lokalisierung im Organismus. Während PPOs intrazellulär innerhalb der Chloroplasten oder Vesikel anderer Zellorganellen vorkommen, werden Laccasen extrazellulär gebildet. Beiden Enzymen gemeinsam ist aber ihre Vielfalt. Auch bei den Laccasen gibt es große Differenzen in Substratspezifität und -affinität. Diese werden zusätzlich stark von pH- und Temperatur-Werten beeinflusst. Je nach eingesetztem Substrat ändern sich die optimalen Reaktionsparameter^[20].

Da Laccasen sowie PPOs Polyphenole oxidieren und zur Bildung farbiger Reaktionsprodukte führen, könnten sie ebenfalls für die Herstellung von Farbextrakten aus Apfeltresterpolyphenolen geeignet sein.

2.1.6 Enzymquellen

Zur Extraktion pflanzlicher PPOs werden Bananen (*Musa*) und Trauben (*Vitis vinifera*) im lokalen Supermarkt erworben. PPOs aus diesen Quellen wurden bereits in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten untersucht und charakterisiert^{[21],[22]}. Des Weiteren werden die Blätter des Beifußes (*Artemisia vulgaris*) verwendet. In vorherigen, bei ASA Spezialenzyme durchgeführten Arbeiten konnte in dieser Pflanze ein hoher PPO-Gehalt festgestellt werden. Dem wurde bis zu dieser Arbeit aber nicht weiter nachgegangen. Der Beifuß ist auf der gesamten Nordhalbkugel verbreitet und wird in der Umgebung gesammelt.

Laccase A, C und F werden von der Firma ASA Spezialenzyme selbst mittels verschiedener Pilze hergestellt und als Enzymgemische angeboten.

2.2 Polyphenole

2.2.1 Vorkommen und Struktur

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen und kommen in allen höheren Pflanzen vor. Viele dieser Verbindungen besitzen eine antioxidative Wirkung und dienen in den Pflanzen als Abwehrstoffe gegen Krankheiten und Schädlinge oder als Schutz vor UV-Strahlung^[23].

Durch die Vielfältigkeit der Pflanzenpolyphenole ergeben sich sowohl chemische als auch strukturelle Unterschiede. Allen gemeinsam ist ein aromatisches Grundgerüst, an das mindestens zwei Hydroxylgruppen kondensiert sind. Dabei kann die Anzahl der Ringe und Anzahl sowie Position der Hydroxylgruppen stark variieren. Ausgangsstoff der Biosynthese aller Polyphenole ist Phenylalanin, welches aus dem Shikimisäureweg stammt. Die Synthese wird durch Licht induziert, die Speicherung

erfolgt vorwiegend in den Vakuolen der Zellen^[24]. Polyphenole werden in die zwei Hauptgruppen Phenolsäuren und Flavonoide unterteilt^[25].

Die Gruppe der Flavonoide macht einen Großteil aller Polyphenole aus. Sie sind meistens als wasserlösliche Pigmente in Früchten und Gemüse enthalten und bestehen aus zwei aromatischen Ringen, die durch einen Tetrahydropyran-Ring verbunden sind. Anhand struktureller Unterschiede können die Flavonoide in 6 Gruppen eingeteilt werden, die sich alle vom Flavan ableiten^[24].

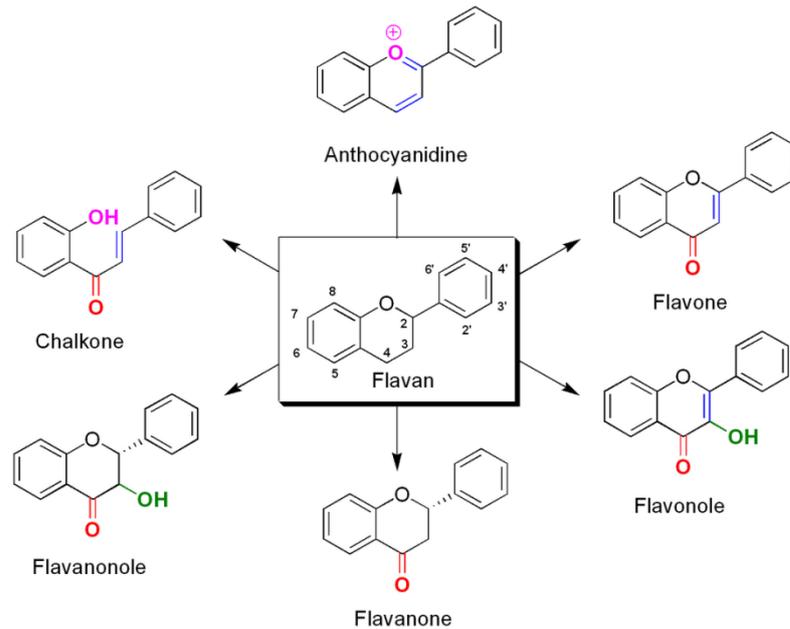


Abbildung 6: Übersicht über die Stoffklassen der Flavonoide^[26]. Dargestellt sind die Grundgerüste der Stoffe ohne zusätzlich kondensierte Hydroxylgruppen.

Flavonoide treten häufig in glykosylierter Form auf. Sie sind dann unter anderem an Zucker wie Glucose oder Rhamnose gebunden. Der zuckerfreie Anteil, wie in Abbildung 6 dargestellt, wird als Aglycon bezeichnet^[24].

Die zu den Chalkonen gehörenden Verbindungen sind ungesättigte Ketone, über deren Funktion bisher wenig bekannt ist. Von ihnen leitet sich der Leitstoff dieser Arbeit ab: das Dihydrochalkon Phloridzin. Es wird vermutet, dass Chalkone bei der Abwehr von Krankheitserregern eine Rolle spielen. Innerhalb des Biosyntheseweges von Flavonoiden sind Chalkone die ersten Flavonoid-Verbindungen und dienen als Ausgangsprodukt für die Synthese weiterer Flavonoide^[27].

2.2.2 Polyphenole im Apfel und Apfeltrester

Die gesundheitsfördernde Wirkung von Äpfeln wird oft ihrem Gehalt an Polyphenolen zugeschrieben. Diese gehören vorwiegend zu den Gruppen der Flavanole, Flavonole, Dihydrochalkone, Anthocyanidine und Phenolsäuren. Der Polyphenolgehalt ist sehr stark von der Apfelsorte, aber auch von äußeren Faktoren abhängig. Dazu gehören neben dem Klima Lichteinfluss, Anbau-, Ernte- und Verarbeitungsfaktoren. Der Gehalt kann bei etwa 66 – 211 mg/100 g Feuchtmasse liegen. Davon gehören 2 – 6 % zu den Dihydrochalkonen, zu denen auch das Phlorodzin zählt. Dieser Stoff und seine Derivate (z. B. Phloretin-xyloglucosid) stellen die Hauptkomponenten der Apfel-Dihydrochalkone dar. Ein maßgebender Teil der enthaltenen Polyphenole kommt in der Apfelschale und direkt darunter vor. Der größte Phloridzin-Anteil ist allerdings in den Apfelkernen lokalisiert^[28].

Als Apfeltrester werden die Pressrückstände bezeichnet, die bei der Fruchtsaftherstellung zurückbleiben. Bisher wurde er überwiegend als Tierfutter, Substrat für Biogasanlagen oder zur Gewinnung von Pektin genutzt. Der Reststoff ist lokal reichlich vorhanden. Dies wird sich aufgrund der Beliebtheit von Apfelsaft auch in Zukunft nicht ändern^[29]. Besonders Phloridzin und dessen Derivate sind konzentriert im Apfeltrester enthalten^[4].

Um den Trester als Substrat für die Herstellung von natürlichen Lebensmittelfarben nutzbar zu machen, müssen die Polyphenole, insbesondere das Phloridzin und seine Derivate, mittels Extraktion gewonnen werden^[30]. Ziel ist die Herstellung eines polyphenolreichen Extraktes, der arm an Störsubstanzen ist. Die extrahierten Polyphenole können dann mittels PPOs und Laccasen in färbende Extrakte umgesetzt werden.

2.2.3 Phloridzin und seine Oxidationsprodukte

Phloridzin gehört zur Klasse der ringoffenen Dihydrochalkone und kommt vorwiegend in der Wurzelrinde und den Blättern von Apfelbäumen sowie in Apfelkernen vor. Da der Stoff an Glucose gebunden ist, wird er auch als Glucosid bezeichnet. Sein Aglycon ist das Phloretin^[31].

Phloridzin ist vor allem als Inhibitor der Glucoseresorption in den Nierentubuli bekannt^[32]. Es ist als weißes bis gelbliches Pulver mit niedriger Löslichkeit erhältlich. In kaltem Wasser lässt es sich sehr schlecht lösen, dafür besser in warmem Wasser oder Ethanol.

Die enzymatische Oxidation von Phloridzin führt zu gelblichen bis orangen Oxidationsprodukten, den POPs, welche für den Einsatz als Lebensmittelfarbe in Frage kommen^[4]. Der komplette Reaktionsweg von Phlorodzin bis zu seinen Oxidationsprodukten mittels einer Polyphenoloxidase aus Pilzen wurde 2004 von Le Guernévé et al. beschrieben und ist in Abbildung 7 dargestellt.

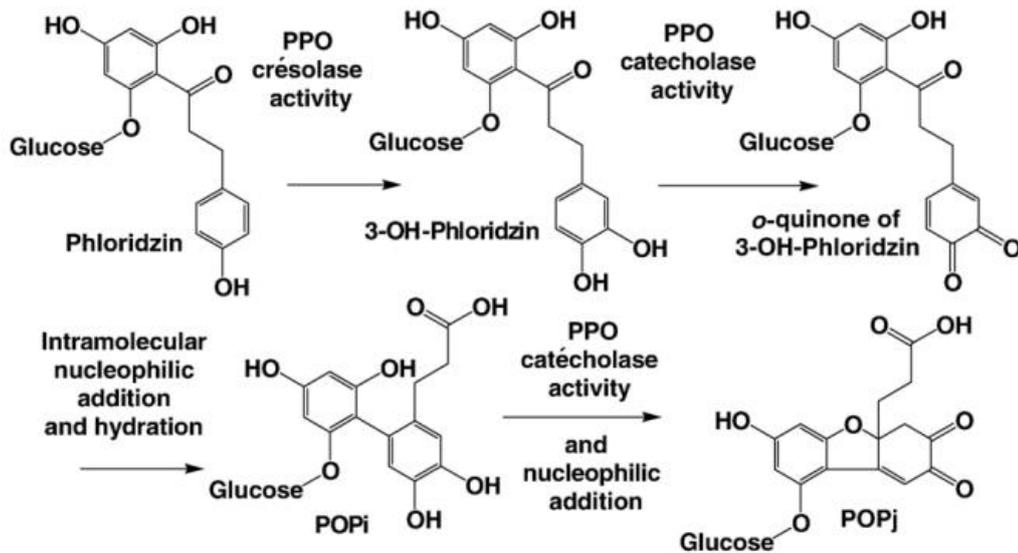


Abbildung 7: Reaktionsweg zur Bildung von POPi und POPj aus Phloridzin ^[4]. Über Monophenolaseaktivität entsteht 3-OH-Phloridzin. Mittels Diphenolaseaktivität und intramolekularen Reaktionen entstehen das Intermediat POPi und schließlich POPj.

Die Oxidation von Phloridzin folgt einem sehr speziellen sequentiellen Weg ohne Polymerisation, welcher für PPO-katalysierte Reaktionen eher unüblich ist. Die Reaktion findet in drei Schritten statt. Der erste Schritt beschreibt eine Lag-Phase von ca 2 h, hier findet noch keine Oxidation von Phloridzin statt, da sich die PPOs erst an das gegebene Substrat, den monophenolischen Anteil, anpassen müssen. In dieser Zeit konvertieren die PPOs in ihre oxy-Form.

Im zweiten Schritt wird Phloridzin komplett in das Intermediärprodukt POPi umgesetzt. Dies geschieht in drei Phasen, von denen die erste die limitierende ist. Durch langsame Cresolase-Aktivität (Addition einer Hydroxylgruppen) der PPO entsteht 3-Hydroxyphloridzin. Über die schnellere Catecholase-Aktivität (Oxidation zu *o*-Chinonen) wird 3-OH-Phloridzin zum korrespondierenden *o*-Chinon umgesetzt. Durch intramolekulare Reaktionen bildet sich in der dritten Phase das farblose Zwischenprodukt POPi. Im dritten und letzten Schritt erfolgt mittels Catecholase-Aktivität und intramolekularer Reaktion das gelbe Endprodukt POPj.

Der spezielle Reaktionsweg kann über die unterschiedliche Affinität der PPOs zu den entstehenden Zwischenprodukten erklärt werden. Die Affinität zu Phloridzin und 3-OH-Phloridzin ist höher als zu POPi. Dies führt dazu, dass diese Stoffe erst komplett umgesetzt werden und POPi im Medium akkumuliert. Erst danach steht das Enzym für die Oxidation von POPi zu POPj zur Verfügung.

Im Gegensatz zu Phloridzin ist POPj sehr gut wasserlöslich, was seinem Propionsäureanteil zuzuschreiben ist. In wässrigen Lösungen < pH 6,0 zeigt es eine klare gelbe Färbung, die bei pH-Werten > 6,0 ins Orange umschlägt. Außerdem ist es unter üblichen Verarbeitungsbedingungen, wie sie z. B. für Soft-Drinks oder fruchtbasierte Produkte üblich sind, ausreichend stabil ^[4].

2.3 Aktueller Stand der Technologie

PPOs gelten als Verursacher enzymatischer Bräunung in Lebensmitteln wie Obst, Gemüse und Getreide. Sie setzen so die Qualität von Nahrungsmitteln herab, die sich in der Degradierung von Farbe, Geschmack und Textur niederschlägt. Auf diesen Vorgang fokussiert sich die hauptsächliche Forschung zum Thema PPOs. Sie werden erforscht und charakterisiert um Möglichkeiten zu finden, ihre Aktivität zu kontrollieren und damit die Qualität von Lebensmitteln zu gewährleisten^[6].

Im Gegensatz dazu werden Laccasen bereits in vielen biotechnologischen Verfahren eingesetzt. Dazu gehören unter anderem die Entgiftung von Abwasser- und Ökosystemen, die Entfernung von Farbstoffen bei der Textilherstellung oder von Phenolen aus Most. Dies geschieht meist durch Fällung mit vorheriger Polymerisation der unerwünschten Stoffe^{[18], [20]}.

Die Reaktion von Phloridzin zu farbigen Reaktionsprodukten mittels einer PPO aus Pilzen und dessen Einsatz als Lebensmittelfarbstoff wurden bereits untersucht und diskutiert^[4]. Des Weiteren wurden polyphenolreiche Extrakte aus Apfeln gewonnen und erfolgreich mit fungalen PPOs zu Farbextrakten mit unterschiedlichen Eigenschaften umgesetzt^[5]. Es besteht aber noch ein hoher Forschungsbedarf auf diesem Gebiet. Der Neuheitsaspekt dieser Arbeit besteht in der Verwendung von Apfeltrester als Quelle färbender Substanzen und in der Nutzung pflanzlicher PPOs und fungaler Laccasen zur Erzeugung von biobasierten Farbextrakten.

3. Methoden

3.1 Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität

Um PPO- und Laccase-Aktivität nachweisen zu können, gibt es viele verschiedene Test-Varianten. Aufgrund des weit gefächerten Substratspektrums der Enzyme kommen unterschiedliche Substrate und Produktnachweise in Frage. Für diese Arbeit werden die bei ASA Spezialenzyme etablierten Methoden verwendet.

3.1.1 Brenzcatechin-Test

PPOs oxidieren Brenzcatechin unter Sauerstoffverbrauch zu dem gelblichen 1,2-Benzochinon. Diese Reaktion kann photometrisch nachgewiesen werden. In Abbildung 8 ist die Reaktion dargestellt.

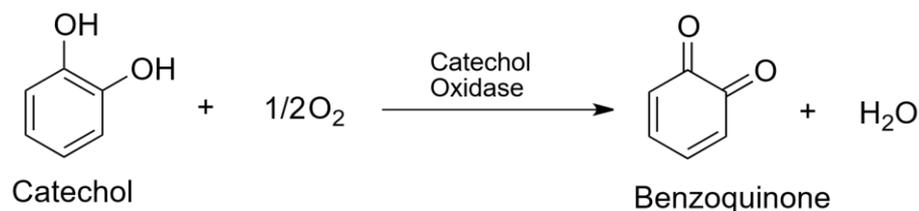


Abbildung 8: PPO-katalysierte Reaktion von Brenzcatechin zu 1,2-Benzochinon ^[33].

Für die Substratlösung werden 0,1 M Brenzcatechin in einem 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) gelöst. Diese Lösung muss frisch angesetzt werden, da Brenzcatechin unter Sauerstoff- und Lichteinfluss autooxidiert und sich die Lösung bräunlich verfärbt. Die Lösung sollte nur in farblosem Zustand verwendet werden.

Zu 2 ml Substratlösung werden 20 – 100 µl Enzymprobe gegeben und gut durchmischt. Die Extinktionszunahme wird mittels Photometer bei 415 nm und 25 °C über 1 min verfolgt. Sie sollte im Bereich von 0,05 – 0,1 liegen. Andernfalls muss das Enzym verdünnt oder aufkonzentriert werden. Die Aktivität in U/ml berechnet sich wie folgt:

$$A, \text{U/ml} = \frac{\Delta E_{415\text{nm}}}{\varepsilon \cdot d_{\text{Küvette}}} \cdot \frac{V_{\text{Testansatz}}}{V_{\text{Enzym}}} \cdot \text{Verd.}$$

Mit: $\varepsilon = 1 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

Alle Proben werden einer Doppelbestimmung unterzogen.

3.1.2 2,6-Dimethoxyphenol-Test

Dieser Test wird normalerweise angewendet, um Laccase-Aktivität zu detektieren. Als Substrat wird 2,6-Dimethoxyphenol, auch Syringol genannt, verwendet.

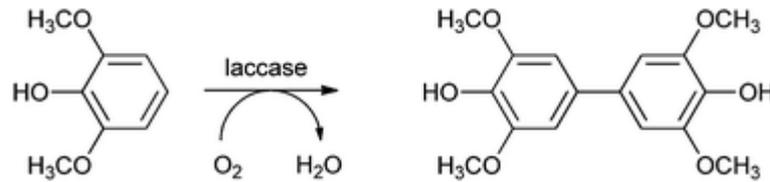


Abbildung 9: Laccase-katalysierte Reaktion von 2,6-Dimethoxyphenol zu TMBP^[34].

Abbildung 9 zeigt die Laccase-katalysierte Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol zu 3,3'-5,5'-Tetramethyl-1,1'-biphenyl-4,4'-diol (TMBP). Als Zwischenprodukte entstehen 2,6-Dimethoxyphenoxyl-Radikale, welche dann über Dimerisation das gezeigte Endprodukt bilden. Dieses kann mittels Photometer bei 469 nm nachgewiesen werden.

1700 μl McIlvain Puffer (eingestellt auf den gewünschten pH-Wert) werden mit 200 μl einer 5 mM 2,6-Dimethoxyphenol-Lösung versetzt und gemischt. Durch Zugabe von 100 μl Enzymprobe wird die Reaktion gestartet und die Extinktionszunahme über 2 min bei 25 °C im Photometer verfolgt. Sie sollte im Bereich von 0,3 – 0,9 liegen. Die Aktivität in U/ml berechnet sich wie folgt:

$$A, \text{U/ml} = \frac{\Delta E_{469\text{nm}}}{t \cdot d_{\text{Küvette}}} \cdot \frac{V_{\text{Testansatz}}}{V_{\text{Enzym}}} \cdot \frac{\text{Verd.}}{\varepsilon}$$

Mit: $t = 2 \text{ min}$

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

$\varepsilon = 27,5 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$V_{\text{Testansatz}} = 2 \text{ ml}$

$V_{\text{Enzym}} = 0,1 \text{ ml}$

3.1.3 ABTS-Test

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) wird häufig für den Nachweis von Laccase- oder Peroxidase-Aktivitäten verwendet. Unter Sauerstoffverbrauch wird das farblose ABTS zu dem grünen bis blauen ABTS \cdot^+ -Radikal-Kationen oxidiert. Die Reaktion ist in Abbildung 10 dargestellt.

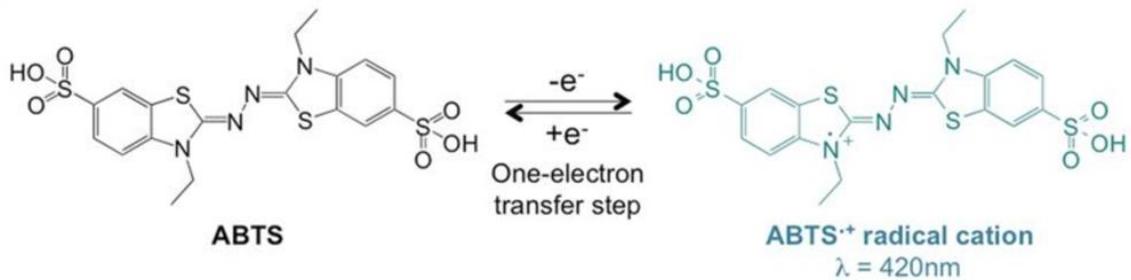


Abbildung 10: Laccase-katalysierte Reaktion von ABTS zum ABTS^{•+}-Radikal-Kation ^[35].

Das farbige Produkt kann photometrisch bei 420 nm nachgewiesen werden. Für den Testansatz werden 1880 μl McIlvaine Puffer (eingestellt auf den gewünschten pH-Wert) vorgelegt und mit 20 μl einer 10 mM ABTS-Lösung versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μl Enzymprobe gestartet und über 1 min bei 37 °C im Photometer verfolgt. Die Extinktionszunahme sollte im Bereich von 0,1 – 0,15 liegen. Die Enzymaktivität in U/ml berechnet sich wie folgt:

$$A, \text{U/ml} = \frac{\Delta E_{420\text{nm}}}{\varepsilon \cdot d_{\text{Küvette}}} \cdot \frac{V_{\text{Testansatz}}}{V_{\text{Enzym}}} \cdot \text{Verd.}$$

Mit:

- $d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$
- $\varepsilon = 36 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- $V_{\text{Testansatz}} = 2 \text{ ml}$
- $V_{\text{Enzym}} = 0,1 \text{ ml}$

3.2 Extraktion

3.2.1 Extraktion der PPOs aus pflanzlichen Quellen

Ziel der Extraktion ist es, die in biologischem Material enthaltenen Polyphenoloxidasen zu extrahieren. Hierzu werden eine definierte Menge Extraktionsgut mit VE-Wasser gewaschen, mit 100 ml Extraktionslösung versetzt und in einem Mixer 5 min bei Raumtemperatur homogenisiert.

Für die Extraktionslösung werden unterschiedliche Komponenten getestet. Neben den Grundkomponenten (Phosphatpuffer und Triton-X-100) werden Zusätze untersucht, welche die Bildung von eventuell störenden Reaktionsprodukten während der Extraktion verhindern sollen. In Tabelle 1 sind die Komponenten und Zusätze der Extraktionslösungen und deren Zweck aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der zur Extraktion verwendeten Komponenten und Zusätze und deren Zweck.

Komponente	Zweck ^[21]
0,1 M NaH₂PO₄ (pH 6,0)	Puffersystem im neutralen Bereich, niedrige Konzentration, um Einfluss auf die Kupfer-Ionen der PPOs gering zu halten.
1 % Triton-X-100	Nicht-ionisches Detergenz, amphipatisches Molekül, begünstigt Ablösen der PPOs von Membran.
Zusatz	Zweck ^[21]
1 % PVPP	Polymer, bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit Phenolen aus, so dass Chelate entstehen und die Reaktion mit PPOs verhindert wird.
0,01 M Ascorbinsäure	Reduziert Chinone zu Phenolen, verhindert so das Entstehen störender Reaktionsprodukte während der Extraktion.

Es werden Extraktionslösungen mit folgenden Zusatzkombinationen verwendet:

- Extraktionsmittel 1: Ascorbinsäure, PVPP
- Extraktionsmittel 2: Ascorbinsäure
- Extraktionsmittel 3: Ohne Zusatz

Anschließend wird das Homogenisat für 30 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (enthält Enzyme) wird für weitere Arbeiten bei -20 °C gelagert, das Pellet wird verworfen.

3.2.2 Extraktion der Polyphenole aus dem Apfeltrester

Um die enthaltenen Polyphenole als Substrat nutzen zu können, müssen diese durch Extraktion aus dem Apfeltrester gewonnen werden. Als Extraktionsmittel wird eine 70 %ige Ethanollösung eingesetzt. Dazu wird 96 %iges Ethanol entsprechend mit Leitungswasser verdünnt. Das Feststoff-/Lösungsmittelverhältnis beträgt 1:5. 20 g Apfeltrester werden zusammen mit 80 ml Extraktionsmittel 4 x 30 s in einem Mixer aufgeschlossen. Anschließend wird das Gemisch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die festen Bestandteile werden 20 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird filtriert und das Filtrat portioniert bei -20 °C für die spätere Verwendung gelagert.

3.3 Stabilisierung der Enzymextrakte

Um die Extrakte über einen längeren Zeitraum verwenden zu können, werden verschiedene Methoden zur Stabilisierung der Enzyme und ihrer Aktivität getestet. Ziel ist es, eine einfache und kostengünstige Lagerung zu ermöglichen. Die Aktivitätsbestimmung in den Lagerungsansätzen erfolgt jeweils mit dem Brenzcatechin-Test.

3.3.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Die im Extrakt enthaltenen Enzyme sollen mit Hilfe von Ammoniumsulfat gefällt und so stabilisiert werden. Die Fällung erfolgt mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung. Für jeden Extrakt werden folgende Ansätze erstellt: Zu jeweils 2 ml des Extraktes werden 1,5 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml und 10 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung gegeben. Die Ansätze werden 30 min unter Kühlung gerührt und dann 30 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden abgetrennt und auf Aktivität untersucht. Die Pellets werden in 1 ml 0,1 M NaH_2PO_4 -Puffer (pH 6,0) resuspendiert und ebenfalls auf ihre Aktivität getestet. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Die Aktivität in den resuspendierten Pellets wird in regelmäßigen Zeitabständen gemessen.

3.3.2 Lyophilisation

Die Extrakte werden zunächst tiefgefroren und anschließend einem Vakuum ausgesetzt. Als Endprodukt entsteht das Lyophilisat, ein poröser Stoff mit großer Oberfläche.

Jeweils 10 ml der Extrakte werden bei -20 °C eingefroren und anschließend über Nacht im Lyophilisator getrocknet. Um die Enzymaktivität zu bestimmen, wird eine geringe Menge des Lyophilisats in 1 ml VE-Wasser gelöst und kann so dem Aktivitätstest unterzogen werden. Das Lyophilisat wird bei -20 °C gelagert und die verbleibende Aktivität regelmäßig bestimmt.

3.3.3 Lagerung in Glycerin

Die Halbwertszeit eines Enzyms in Lösung wird normalerweise bei niedrigen Temperaturen verlängert. Um mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zu verhindern, werden die Extrakte 1:2 mit 100 %igem Glycerin verdünnt. So können sie bei -20 °C gelagert werden ohne zu gefrieren. Die Aktivität in den Proben wird in regelmäßigen Zeitabständen gemessen.

3.4 Charakterisierung der Enzymextrakte

Die gewonnenen Enzymextrakte werden hinsichtlich einiger ihrer Eigenschaften charakterisiert. Soweit nicht anders beschrieben, werden die verwendeten Enzymproben zwischen den einzelnen Messungen auf Eis gelagert.

3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums

Die Aktivität wird mit dem Brenzcatechin-Test bestimmt. Gemessen wird im pH-Bereich von pH 2,5 – 7,9 bei 25 °C. Dazu wird der Puffer nach McIlvaine verwendet, der auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt wird.

Da die Autooxidation von Brenzcatechin bei pH-Werten $\geq 7,0$ deutlich ansteigt, kann es nicht direkt im Puffer gelöst werden, ohne dass die Lösung sich braun verfärbt. Um dies zu verhindern, wird eine 1 M Brenzkatechin-Lösung separat in einem lichtundurchlässigen Gefäß mit VE-Wasser angesetzt. Für den Testansatz werden 1800 μl Pufferlösung des gewünschten pH-Wertes vorgelegt und mit 20 – 100 μl Enzymprobe gemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 μl der Brenzcatechin-Lösung gestartet. Zusätzlich wird für jeden pH-Wert ein Blindwert aufgenommen. Dieser enthält nur den Puffer und Substratlösung. Auf diese Weise kann die durch Autooxidation des Substrates verursachte Aktivität abgezogen werden. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie unter 3.1.1 beschrieben.

3.4.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Es wird mit dem Brenzcatechin-Test gearbeitet. Die Aktivität der Proben wird in Abhängigkeit der Temperatur von 16,4 – 60 °C bei pH 6,0 bestimmt.

Temperaturen ab 40 °C beschleunigen die Autooxidation von Brenzcatechin. Um das schnelle Verfärben der Lösung zu verhindern, wird eine 1 M Brenzcatechin-Lösung separat in einem lichtundurchlässigen Gefäß mit VE-Wasser angesetzt. 1800 μl Pufferlösung werden vorgelegt und mindestens 5 min im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt. Danach werden zügig 20 – 100 μl Enzymprobe und 200 μl Substratlösung zugegeben. Der Ansatz wird im entsprechend vortemperierten Photometer gemessen. Zusätzlich wird für jede gemessene Temperatur ein Blindwert, bestehend aus Puffer und Substratlösung, aufgenommen. Die Berechnung der Aktivitäten erfolgt wie unter 3.1.1 beschrieben.

3.4.3 Stabilität in Ethanol

Um zu ermitteln, welchen Einfluss Ethanol auf die Enzymstabilität hat, werden die Extrakte 4 – 5 h in 40 – 70 %igen Ethanollösungen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Lösungen erfolgt mit Leitungswasser, um die Beschaffenheit des Apfeltresterextraktes zu simulieren. Die Parameter werden entsprechend den späteren Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung des Apfeltresters gewählt.

- Beispiel: Enzymextrakt aus dem Beifuß
- 1:10 Verdünnung in 40 % Ethanol, $V = 1$ ml
- 100 µl Enzymextrakt
 - 417 µl Ethanol (96 %)
 - ad 1 ml Leitungswasser

Über diesen Zeitraum werden regelmäßig die Enzymaktivitäten gemessen. Eingesetzt wird dazu der Brenzcatechintest unter Normalbedingungen (pH 6,0 und 25 °C).

Als Blindwerte dienen Verdünnungen der Enzymextrakte ohne Ethanolzusatz. Diese werden unter gleichen Bedingungen inkubiert und ebenfalls regelmäßig gemessen.

3.4.4 Aktivität in Ethanol

Um zu testen, ob die extrahierten Enzyme direkt in Ethanollösungen Aktivität zeigen, und abschätzen zu können, ob oder wie weit der Apfeltresterextrakt verdünnt werden muss, wird eine abgewandelte Form des Brenzcatechintests angewandt. 0,1 M Brenzcatechin werden in 10 – 70 %igen Ethanollösungen gelöst. Die Verdünnung des 96 %igen Ethanols erfolgt jeweils mit Leitungswasser und höher konzentriertem Na-Citrat-Puffer (pH 6,0), so dass sich eine Endkonzentration von 0,1 M Puffer ergibt. So wird ermittelt, ob der Zusatz von Puffer in späteren Reaktionen lohnenswert ist.

- Beispiel: Substratlösung (50 % Ethanol), $V = 50$ ml
- 26,04 ml Ethnaol (96 %)
+23,96 ml Leitungswasser
 - 26,04 ml Ethanol (96 %)
+23,96 ml 0,207 M Na-Citrat-Puffer (pH 6,0)
- In beiden Lösungen werden jeweils 0,55 g (entspricht 1 M) Brenzcatechin gelöst.

Die Messung erfolgt mittels Photometer bei 415 nm und 25 °C. Zu 2 ml Substratlösung werden 20 – 100 µl gegebenenfalls verdünnte Enzymprobe gegeben, gut durchgemischt und über 1 min bei 415 nm gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgt wie unter 3.1.1 beschrieben.

3.5 Reaktion mit Phloridzin

Es wird getestet, ob die extrahierten PPOs und die von ASA Spezialenzyme vertriebenen Laccase-Gemische (liegen als Lyophilisate vor) in der Lage sind, Phloridzin zu den gewünschten gelben bis bräunlichen Produkten umzusetzen. Dazu werden 0,001 M Phloridzin-Lösungen in McIlvaine Puffer mit pH 4,0, 4,6 und 7,0 hergestellt.

Die Reaktion findet mit einer Endkonzentration von 20 U/ml in der Lösung statt. Zu jeweils 3 ml der Lösungen werden entsprechende Volumina der Enzymextrakte und entsprechende Einwaagen der Laccase-Gemische gegeben und gut durchmischt. Die Ansätze werden bei Raumtemperatur inkubiert und in regelmäßigen Abständen immer wieder durchmischt, um genügend Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Die Dokumentation des Reaktionsverlaufes erfolgt photographisch.

3.6 Reaktion mit dem Apfeltresterextrakt

Um den Effekt der Enzyme auf den Apfeltresterextrakt zu untersuchen, werden für die verwendeten PPO-Extrakte und Laccase-Gemische jeweils 3 Ansätze erstellt. Diese bestehen aus unverdünntem, 1:2 mit Leitungswasser verdünntem und 1:2 mit Puffer verdünntem Apfeltresterextrakt. Als Puffer wird McIlvaine-Puffer verwendet, der auf das pH-Optimum des jeweiligen Enzyms eingestellt ist.

Die Reaktion findet mit einer Endkonzentration von 20 U/ml in den Apfeltresterextrakten statt. Zu jeweils 3 ml des Extraktes bzw. verdünnten Extraktes werden entsprechende Volumina der Enzymextrakte und entsprechende Einwaagen der Laccase-Gemische gegeben und gut durchmischt. Die Ansätze werden bei Raumtemperatur inkubiert und in regelmäßigen Abständen immer wieder durchmischt, um genügend Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Nach Zentrifugation bei 3500 rpm für 10 min erfolgt die Dokumentation des Reaktionsverlaufes photographisch anhand des Überstandes.

3.7 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu

Die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes erfolgt nach der Folin-Ciocalteu-Methode. Sie beruht auf der Redoxreaktion von Phenolen im alkalischen Milieu mit Wolframat und Molybdat zu einem blauen Farbkomplex. Dieser kann photometrisch nachgewiesen werden ^[36].

Der Polyphenolgehalt wird mittels einer Gallussäure-Kalibriergerade ermittelt. Dementsprechend wird die Konzentration in Gallussäure-Äquivalenten (GAE = gallic acid equivalents) angegeben. Für die Kalibriergerade werden Gallussäure-Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 – 1 g/l hergestellt. Nach Abzug der Blindwerte werden die Extinktionswerte in einem Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Geradengleichung können unbekannte Probenwerte bestimmt werden.

Testansatz:	Wasser	100 µl
	Probe / Blindwert / Kalibrierlösung	20 µl
	Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	100 µl
	→ mischen, 3 min stehen lassen	
	Na ₂ CO ₃ -Lösung (7,5 %ig)	200 µl
	Wasser	ad 2000 µl
	→ mischen, 30 min im Dunkeln stehen lassen	

Die Extinktion der Probe wird photometrisch bei 760 nm gemessen. Nach Abzug des Blindwertes kann ihre Konzentration ermittelt werden. Alle Proben werden einer Doppelbestimmung unterzogen.

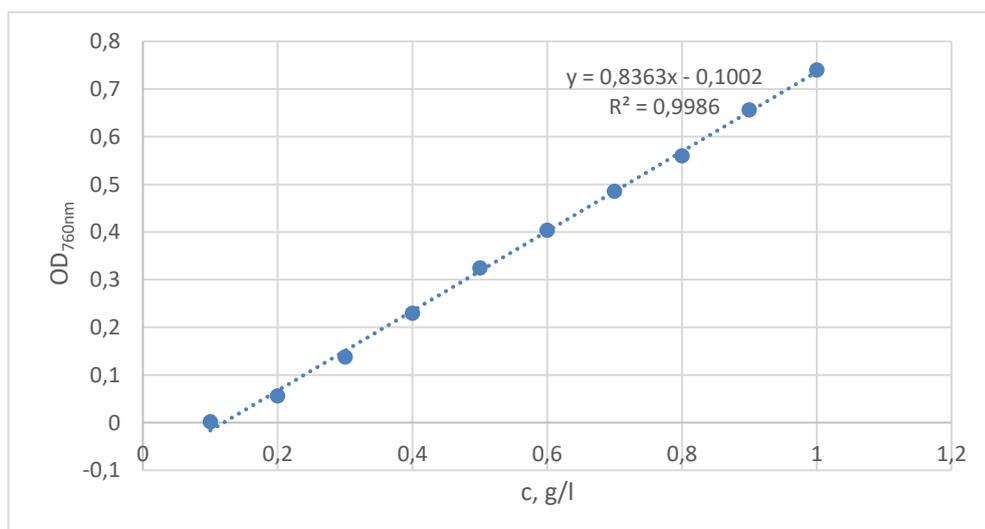


Abbildung 11: Kalibriergerade zur Berechnung des Gesamtpolyphenolgehaltes.

4. Material

4.1 Biologische Materialien

4.1.1 Extraktionsgut

Tabelle 2: Übersicht des verwendeten Extraktionsguts.

Extraktionsgut	Hersteller/Bezugsquelle
Banane (<i>Musa</i>)	Edeka Zentrale AG & Co. KG, Wolfenbüttel
Weißer Tafeltraube (<i>Vitis vinifera</i>)	Edeka Zentrale AG & Co. KG, Wolfenbüttel
Beifuß (<i>Artemisia vulgaris</i>)	Umgebung
Apfeltrester (getrocknet)	albi GmbH & Co. KG, Berghülen-Bühlenhausen

4.1.2 Enzyme

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Enzymgemische.

Enzymgemische*	Herkunft	Hersteller/Bezugsquelle
Laccase A	<i>Agaricus bisporus</i>	ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel
Laccase C	<i>Trametes spec.</i>	ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel
Laccase F	<i>Trametes trogii.</i>	ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel

*Datenblätter zu den jeweiligen Enzymgemischen befinden sich im Anhang

4.2 Chemikalien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Name	Hersteller/Bezugsquelle
ABTS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Riedel de Haën
Brenzcatechin	Fluka, Schweiz
Citronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
2,6-Dimethoxyphenol	Fluka, Schweiz
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin (100 %)	Dr. Peter Lobinger Chemie GmbH
Phloridzin Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe

Tabelle 5: Zusammensetzung häufig verwendeter Pufferlösungen.

Puffer	Herstellung
0,1 M Na-Citrat-Puffer	7,94 g tri-Natriumcitrat Dihydrat auf 270 ml VE-Wasser und 1,89 g Citronensäure-Monohydrat auf 90 ml VE-Wasser. Citronensäure in Natriumcitrat geben bis pH 6,0 erreicht ist.
0,1 M Natriumphosphat-Puffer	1,38 g NaH ₂ PO ₄ auf 100 ml VE-Wasser. Mit konz. NaOH-Lösung auf pH 6,0 einstellen.
Mcllvain-Puffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung werden mit 0,1 M Citronensäure-Monohydrat-Lösung auf den gewünschten pH-Wert zwischen 2,5 und 8 eingestellt.

4.3 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Gerät	Name/Firma
Eismaschine	Eismaschine ZBE 30-10, Ziegra Eismaschinen
Filter	Rotilabo-Faltenfilter Typ 113P, Roth
Standmixer	MX 2 Plus, Steba
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Roth
Reaktionsgefäße	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 ml, Roth • 5 ml, Roth • 50 ml, Roth
Spektralphotometer	UV/VIS Nicolet Evolution 100, Thermo Electron Corporation
Thermostat	PCB 150 Water Peltier System, Thermospectronics
Waagen	<ul style="list-style-type: none"> • Satorius analytic A 200S. Ablesbarkeit 0,0001 g • Satorius analytic LC 6200S. Ablesbarkeit 0,01 g
Wasserbad	12B, Julabo
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Du Pont Instruments • Centrifuge 5475C, Eppendorf • Heraeus SEPATECH Zentrifuge, Kendro Laboratory Products

5. Ergebnisse

5.1 Extraktion

5.1.1 Extraktion der PPOs aus pflanzlichen Quellen

Die Extraktionen mit den unterschiedlichen Zusätzen werden nach der Enzymaktivität in den jeweiligen Extrakten bewertet. Diese wird mittels Brenzcatechin-Test direkt nach der Extraktion ermittelt. Die Aktivitätsangabe erfolgt in U/g Einwaage bzw. Feuchtmasse. Abbildung 12 zeigt die aus Banane, Traube und Beifuß gewonnenen Aktivitäten in Abhängigkeit des eingesetzten Extraktionsmittels.

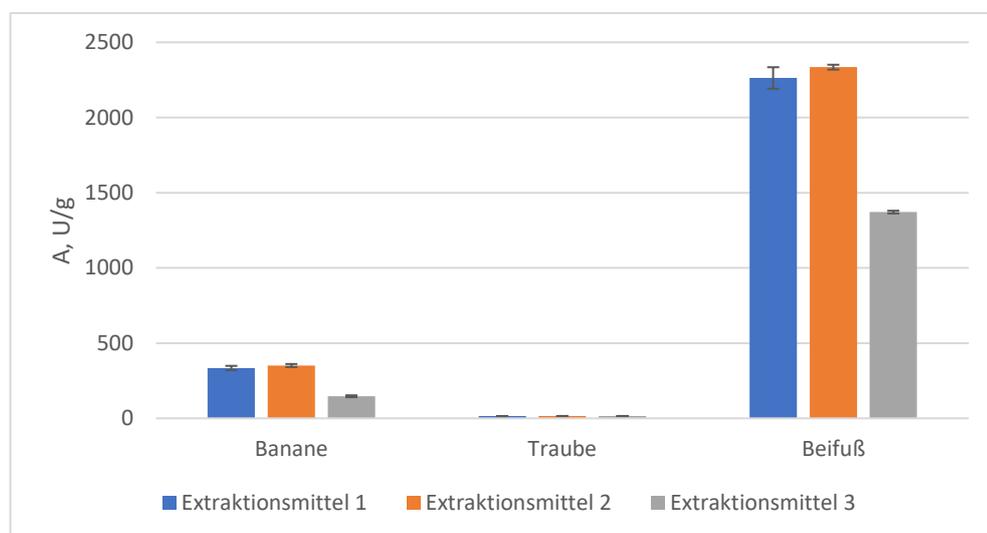


Abbildung 12: Enzymaktivität nach Extraktion in Abhängigkeit des Extraktionsmittels und des Extraktionsgutes. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Alle Extraktionsmittel bestehen aus 0,1 M NaH_2PO_4 -Puffer (pH 6,0) und 1 % Triton-X-100. Weitere Zusätze: Extraktionsmittel 1: 1 % PVPP, 0,01 M Ascorbinsäure. Extraktionsmittel 2: 0,01 M Ascorbinsäure. Extraktionsmittel 3: Keine Zusätze. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Hier wird deutlich, dass die Aktivitäten vor allem von der Extraktionsquelle abhängig sind. Die höchste Aktivität wird in den Beifußextrakten erreicht und liegt zwischen ca. 1300 und 2300 U/g. Aus den Bananen können bis zu 350 U/g extrahiert werden. Mit ca. 14 U/g besitzen die Traubenextrakte die geringste Aktivität. Mit Extraktionsmittel 1 und 2 werden, im Gegensatz zu Extraktionsmittel 3, die jeweils höheren Aktivitäten erreicht. Daraus lässt sich schließen, dass ein Zusatz von PVPP und/oder Ascorbinsäure vorteilhaft ist. Bei der Banane und dem Beifuß erbringt jeweils das Extraktionsmittel 2 die höchsten Aktivitäten. Ein Zusatz von PVPP ist demnach nicht nötig. Die Aktivität in den Traubenextrakten bleibt in allen drei Extraktionen konstant. Ascorbinsäure und PVPP haben hier keinen erkennbaren Einfluss auf die Enzymextraktion aus Trauben.

Für alle weiteren Extraktionen werden die Grundkomponenten plus 0,01 M Ascorbinsäure als Extraktionsmittel verwendet. Tabelle 7 zeigt, dass aber auch bei gleichbleibenden Extraktionsbedingungen innerhalb der gleichen Quelle Aktivitätsschwankungen von bis zu 82 % auftreten.

Tabelle 7: Mittels Brenzcatechin-Test bestimmte Aktivitäten aller Extraktionen mit Extraktionsmittel 2. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Extraktion	A, U/g		
	Banane	Traube	Beifuß
1	351,2	14,53	2335
2	830,5	17,66	2926
3	317,8	13,49	1136
4	145,6	21,59	2543

Die höchsten, in dieser Arbeit registrierten Schwankungen betragen für Banane, Traube und Beifuß jeweils 82, 37 und 61 %. Ein Grund dafür sind die vielen Faktoren, die Einfluss auf den PPO-Gehalt in Pflanzen haben. Dazu gehören unter anderem Reifegrad, Wachstums-, Ernte- und Lagerbedingungen, Art der Weiterverarbeitung und Zeitpunkt der Extraktion. Des Weiteren könnten leichte Abweichungen in den Extraktionsbedingungen eine Auswirkung auf die Aktivitätsschwankungen haben. Dazu gehört z.B. die Zeitspanne zwischen Homogenisieren und Abzentrifugieren, die häufig Verzögerungen unterlag. Auch nicht konstante Raumtemperatur und die Erwärmung des eingesetzten Mixers könnten Einfluss auf den Extraktionserfolg nehmen.

5.1.2 Extraktion der Polyphenole aus dem Apfeltrester

Das Resultat der Apfeltrester-Extraktion sind ca. 50 ml Extrakt. Vermutlich geht ein geringer Teil der ursprünglichen 80 ml Ethanollösung aufgrund der Flüchtigkeit von Ethanol verloren. Ein weiterer Teil geht in den Aufarbeitungsschritten Zentrifugation und Filtration verloren. Dabei verbleibt der größte Teil aber in den Apfeltresterrückständen nach der Zentrifugation. Der Trester wird in getrocknetem Zustand eingesetzt, so dass er einen Teil des Extraktionsmittels aufnimmt, der höher als das Trockengewicht des Tresters ist. In diesem Fall ist die Flüchtigkeit von Ethanol vernachlässigbar, so dass eine Konzentration von ca. 70 % Ethanol im Apfeltresterextrakt angenommen werden kann.

Der Extrakt wird hinsichtlich seines pH-Wertes und seines Gesamtpolyphenolgehalts (angegeben in GAE) charakterisiert. Der Polyphenolgehalt wird mit der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Eigenschaften des Apfeltresterextraktes.

Eigenschaft	Apfeltrester
Ethanolgehalt, %	≈70
pH-Wert	4,6
GAE, g/l	1,36
GAE, mg/g Einwaage	5,44

Da Äpfel fruchteigene PPOs besitzen, wird der Apfeltresterextrakt mit dem Brenzcatechin-Test auf Enzymaktivität untersucht. Es kann keine Aktivität nachgewiesen werden. Vermutlich wurden die enthaltenen PPOs unter den Prozessparametern der Apfeltresterherstellung inaktiviert.

5.2 Stabilisierung der Enzymextrakte

Werden die Enzymextrakte unbehandelt bei -20 °C gelagert, verlieren sie innerhalb von 80 h bis zu 50 % ihrer Aktivität. Vor allem die Aktivität im Beifußextrakt sinkt stark. Abbildung 13 zeigt die Aktivitätsverluste in den Extrakten.

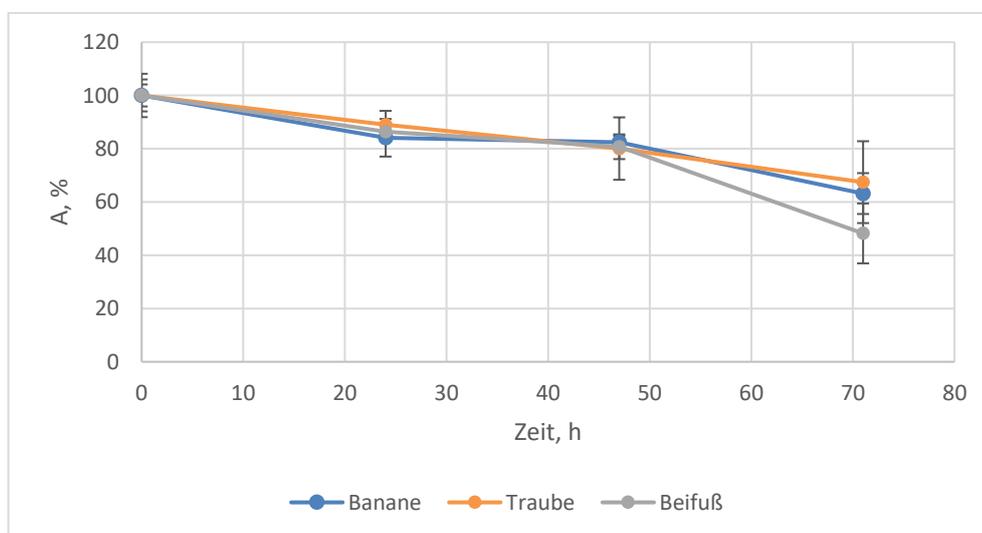


Abbildung 13: Enzymaktivität in den Extrakten (Lagerung -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Um die Extrakte über einen längeren Zeitraum effektiv nutzen zu können, werden herkömmliche Verfahren zur Stabilisierung getestet.

Die treibende Kraft des Aussalzens mittels Ammoniumsulfat (AS) beruht auf der Kohäsion von Wassermolekülen, die Proteine aus der Lösung drängt. Werden Salze zugesetzt, werden Wassermoleküle für die Bildung der Hydrathüllen um die Ionen verbraucht und vom Protein

abgezogen. Die Proteine werden aus der Lösung verdrängt. Auf diese Weise erfolgt eine teilweise Aufreinigung und Stabilisierung der Extrakte.

Abbildung 14 zeigt die Aktivität in den resuspendierten Pellets nach der AS-Fällung über den beobachteten Zeitraum. Dargestellt sind die Fällungen mit den jeweils höchsten Aktivitätsausbeuten.

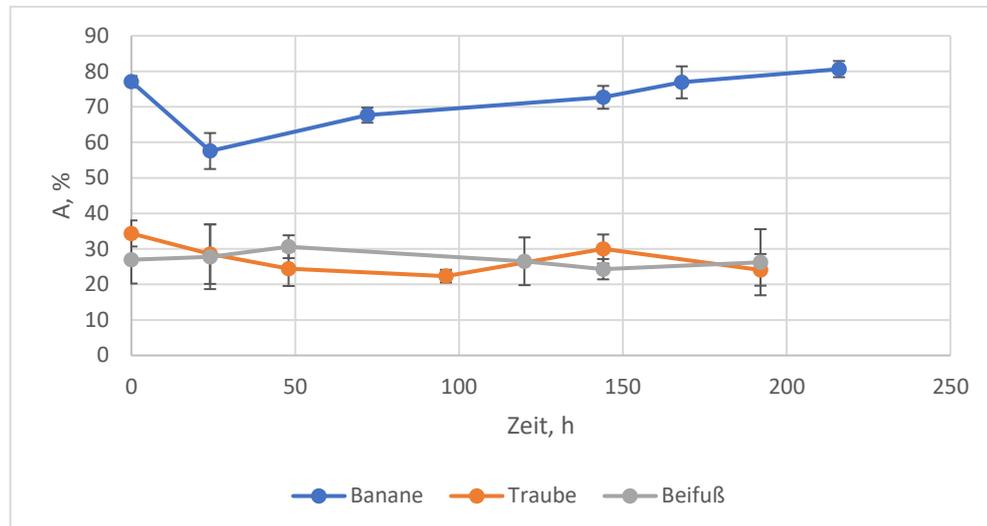


Abbildung 14: Verbleibende Enzymaktivität in den resuspendierten Pellets nach AS-Fällung (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und pH 6,0. Jeweils 2 ml Bananen-, Trauben- und Beifußextrakt werden mit 2 ml, 3,5 ml und 8 ml gesättigter AS-Lösung gefällt. Die Pellets werden in 1 ml $0,1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 6,0) resuspendiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Die höchsten Ausbeuten werden bei der AS-Fällung für den Bananen-, Trauben- und Beifußextrakt mit je 2 ml, 3,5 ml und 8 ml gesättigter AS-Lösung im resuspendierten Pellet erreicht (s. Tabelle 9). Im Bananenextrakt können nach der Fällung 77 % der ursprünglichen Aktivität im Extrakt wiedergefunden werden. Die geringen Ausbeuten des Trauben- und Beifußextraktes könnten über eine denaturierende oder inhibierende Wirkung von Ammoniumsulfat auf die Enzyme erklärt werden, denn auch in den Überständen kann keine Aktivität gemessen werden. Ein weiterer Grund könnte im Lösungsverhalten der Pellets liegen. Werden diese bei der Resuspendierung nicht vollständig gelöst, bleibt der ungelöste Teil der Enzyme inaktiv. Bei regelmäßiger Messung der Aktivität in den resuspendierten Pellets wird deutlich, dass die Messwerte Schwankungen von bis zu 32 % unterliegen. Dies ist zum einen der hohen Ungenauigkeit von biologischen Testverfahren zuzuschreiben, kann aber auch die These der zum Teil ungelösten Pellets unterstützen. Je nachdem, wie viel der Pellets nach dem Auftauen in Lösung geht, sinkt bzw. steigt die Aktivität entsprechend. Insgesamt bleibt die Aktivität nach der Fällung in allen Extrakten über den beobachteten Zeitraum konstant.

Bei der Lyophilisation wird das enthaltene Wasser unter dem Einfluss des Unterdrucks während des Trocknungsvorgangs sublimiert, geht also direkt vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand über.

Dies ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung der empfindlichen Extrakte, die in flüssigem Zustand möglicherweise nicht lange haltbar sind. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

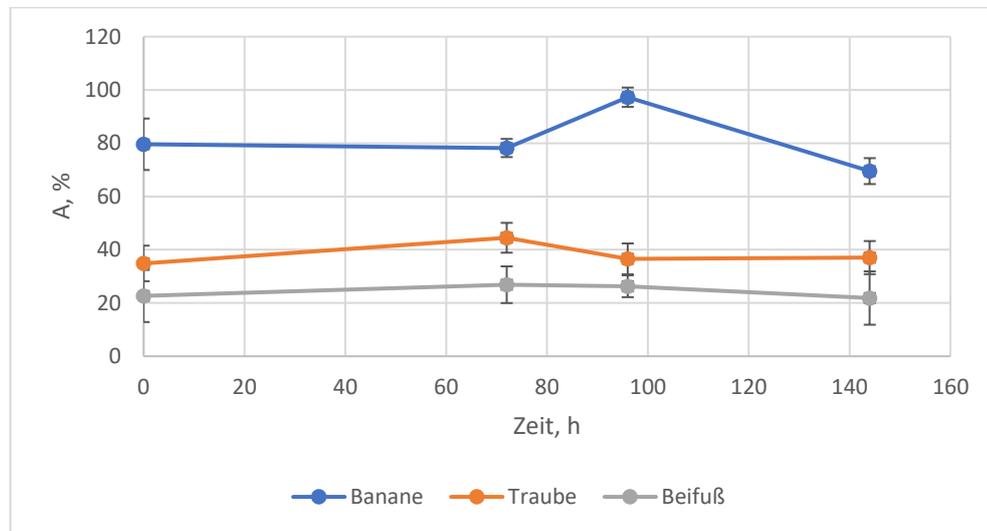


Abbildung 15: Verbleibende Enzymaktivität in den Lyophilisaten (Lagerung bei -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Die Reduzierung der Aktivität im Bananenextrakt durch Anwendung dieser Methode ist am geringsten. Im Trauben- und Beifußextrakt verbleiben nur knapp 1/3 der Aktivitäten (s. Tabelle 9). Bei der Messung der Lyophilisate sind die Schwankungen der Messergebnisse deutlich geringer als bei der AS-Fällung. Dies könnte auf die gute Löslichkeit der Lyophilisate zurückzuführen sein. Allerdings geht auch hier nach Anwendung der Methode einiges an eingesetzter Aktivität verloren. Im Lyophilisat des Bananen-, Beifuß- und Traubenextraktes bleiben jeweils 78, 35 und 24 % der ursprünglichen Aktivität übrig. Die verbleibende Aktivität im Bananenlyophilisat ist mit der aus der AS-Fällung vergleichbar und kann als zufriedenstellende Ausbeute betrachtet werden. Die im Trauben- und Beifußlyophilisat verbleibende Aktivität ist dagegen gering. Dafür kann aber auch hier über den beobachteten Zeitraum kein Aktivitätsabfall registriert werden.

Zudem kann es zu Aktivitätsverlusten kommen, wenn die Probe eingefroren und aufgetaut wird. Beim Übergang vom flüssigen in den festen Zustand bilden sich Wasserkristalle, welche die Enzymstruktur schädigen und somit die Aktivität beeinträchtigen können. Ein Zusatz von Glycerin verhindert das Einfrieren der Extrakte bei niedrigen Temperaturen. Abbildung 16 zeigt die verbleibende Aktivität in den Extrakten nach Zusatz von 50 % Glycerin über die Zeit.

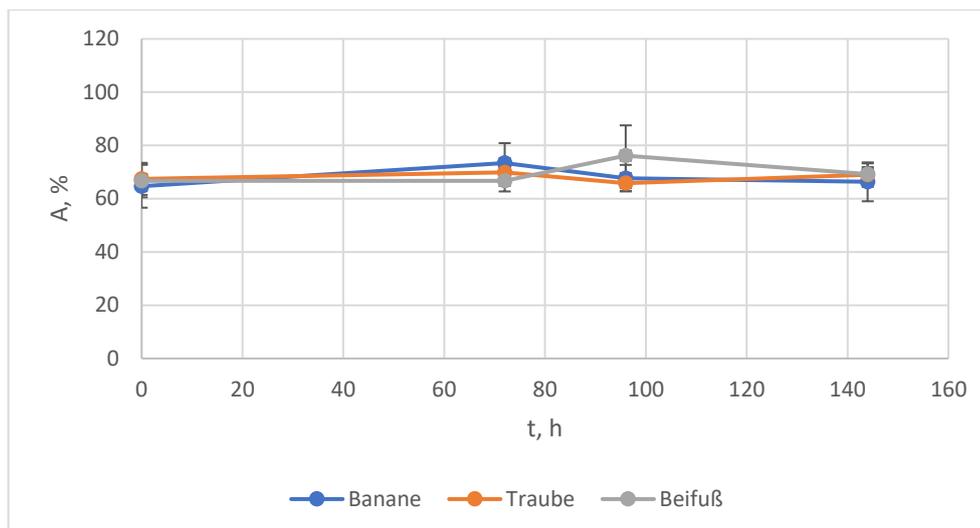


Abbildung 16: Verbleibende Enzymaktivität bei Lagerung in 50 % Glycerin (Lagerung bei -20 °C) in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Bei dieser Methode werden die Extrakte 1:2 mit 100 %igem Glycerin verdünnt. Diese Verdünnung ist bei den verbleibenden Aktivitäten mit einberechnet. Zwar ist bei dieser Methode die verbleibende Aktivität im Bananenextrakt etwas niedriger als in den vorherigen Methoden, dafür steigt die Ausbeute bei Traube und Beifuß deutlich an. Auch hier sind leichte Schwankungen der Messwerte zu erkennen. Die Aktivität bleibt aber in allen Extrakten konstant.

Tabelle 9 fasst die erzielten Ausbeuten an verbleibender Aktivität nach Anwendung der jeweiligen Methode, bezogen auf die ursprüngliche Aktivität in den eingesetzten Extrakten, zusammen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Aktivitätsausbeuten nach Anwendung der jeweiligen Stabilisierungsmethode.

Stabilisierungsmethode	A, %		
	Banane	Traube	Beifuß
AS-Fällung	77	34	27
Lyophilisation	78	35	24
50 % Glycerin	65	67	67

Alle Methoden bewirken eine Stabilisierung der Aktivitäten. Aufgrund der positiven Ausbeuten bezüglich Trauben- und Beifußextrakt und der immer noch im ausreichenden Bereich liegenden Ausbeute des Bananenextraktes, wird die Lagerung in 50 % Glycerin für die Stabilisierung der Enzymextrakte gewählt. Außerdem ist diese schnell und unkompliziert in der Handhabung und wirkt sich nicht reduzierend auf das Probenvolumen aus.

5.3 Charakterisierung der Enzymextrakte

Enzyme erhalten ihre Spezifität aufgrund ihrer räumlichen Struktur. Diese Konformation beruht auf Wechselwirkungen von ionischen, kovalenten, hydrophoben, hydrophilen und Van-Der-Waals-Bindungen innerhalb des Moleküls. Diese beeinflussen maßgeblich die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Enzyms. Eine Veränderung der Milieubedingungen wie Substratbeschaffenheit, pH-Wert, Temperatur oder Ethanolkonzentration beeinflussen je nach Eigenschaften des Enzyms die räumliche Struktur und somit die Aktivität.

5.3.1 Bestimmung der Laccase-Aktivität

Da die Enzymextrakte keiner weiteren Reinigung unterzogen werden, enthalten sie neben PPOs noch andere Bestandteile. Ob unter diesen Bestandteilen Laccasen enthalten sind oder ob Laccase-Nebenaktivität vorhanden ist, soll mittels der bei ASA Spezialenzyme vorhandenen Testmethoden für die Detektion von Laccase-Aktivität bestimmt werden. Alle Extrakte werden mit den unter 3.1 beschriebenen Methoden auf Aktivität untersucht.

ABTS und 2,6-Dimethoxyphenol sind typische Laccase-Substrate. Bei Verwendung dieser Verbindungen kann in keinem der Extrakte Aktivität nachgewiesen werden. Nur mit Brenzcatechin als Substrat kann Aktivität gemessen werden. Dieses Ergebnis lässt auf die Abwesenheit von Laccasen in den vorliegenden pflanzlichen Enzymextrakten schließen.

5.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Alle PPO-Extrakte zeigen eine starke Abhängigkeit des pH-Wertes. Diese Abhängigkeit beruht bei den meisten Enzymen auf einer pH-bedingten Strukturänderung, welche durch Protonierung oder Deprotonierung funktionaler Gruppen von Aminosäuren und Cofaktoren im Aktiven Zentrum verursacht wird. Diese Änderungen können die Funktionalität der Enzyme begünstigen oder einschränken^[37]. In Folge dessen ergibt sich meist ein glockenförmiger Kurvenverlauf der Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Aktivitäten werden mittels Brenzkacatechin-Test bei 25 °C ermittelt. In Abbildung 17 sind diese prozentual in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt.

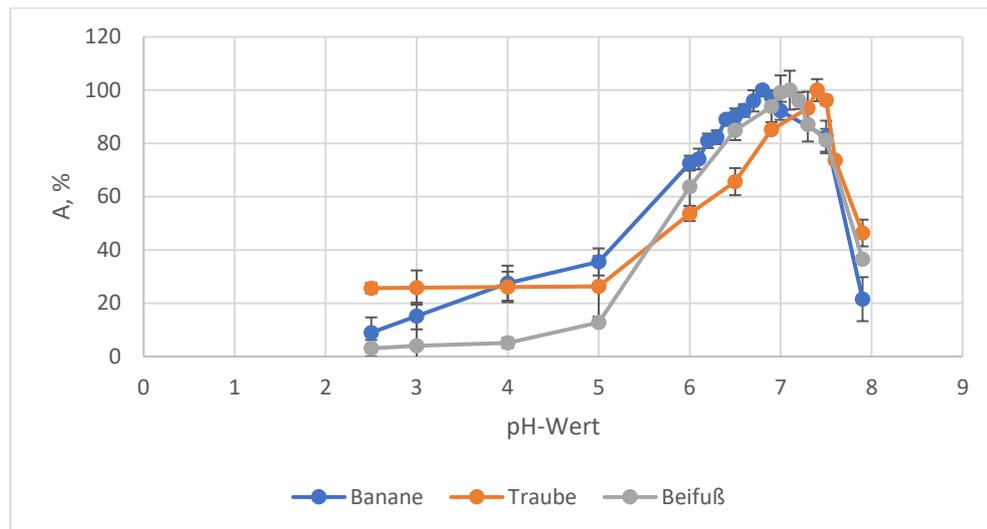


Abbildung 17: Enzymaktivitäten der Extrakte in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH-Wert-Variationen des McIlvaine-Puffers. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Die hier aufgezeichneten Kurven folgen dem typischen Optimumsverlauf. Die Maxima der Kurven geben die jeweils höchste Aktivität und somit das pH-Optimum der Extrakte an. Die Aktivität des Beifußes bleibt bis pH 5,0 nur gering, steigt aber dann steil an, bis das Optimum bei pH 7,1 erreicht ist. Wird dieser Wert überschritten, fällt die Aktivität schnell ab. Die Aktivität der Banane steigt bis pH 5,0 fast konstant an. Ab diesem Wert nähert sich die Kurve mit größerer Steigung ihrem Optimum bei pH 6,8. Danach sinkt die Aktivität bis pH 7,5 auf ca. 80 % und fällt erst bei höheren pH-Werten steil ab. Auffällig ist die konstant gleichbleibende Aktivität von ca. 25 % des Traubenextraktes im Bereich pH 2,5 – 5,0. Ab höheren pH-Werten steigt die Aktivität auf ihr Optimum bei pH 7,4 und fällt mit ähnlicher Steigung wieder ab.

Es fällt auf, dass die Kurven der einzelnen Extrakte unterschiedlich breit sind. Am schmalsten ist die der Traube, was zeigt, dass die pH-Empfindlichkeit hier höher als bei den anderen Extrakten ist. Dies trifft allerdings nur auf den spitz zulaufenden Bereich der Kurve bei pH 6,5 – 7,9 zu. Insgesamt verhalten sich die Extrakte aber ähnlich und sind am aktivsten im neutralen Bereich. Zu beachten ist, dass die Messungen mit Brenzcatechin als Substrat stattfinden. Wird ein anderes Substrat eingesetzt oder ändert sich die Temperatur, können die pH-Kurven anders ausfallen. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse bezüglich der pH-Optima bei 25 °C mit Brenzcatechin als Substrat zusammen.

Tabelle 10: Ermittelte pH-Optima bei 25 °C mit Brenzcatechin als Substrat.

Quelle	pH-Optimum
Banane	6,8
Traube	7,4
Beifuß	7,1

5.3.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Alle von Enzymen katalysierten Reaktionen sind temperaturabhängig. Bis zu einem gewissen Grad kann eine Temperaturerhöhung enzymatische Reaktionen beschleunigen. Wird die für das Enzym optimale Temperatur aber überschritten, kommt es zu Konformationsänderungen, und die Reaktion wird nicht mehr ordnungsgemäß ausgeführt. Dies kann bis zur irreversiblen Denaturierung führen^[6]. Abbildung 18 zeigt die mit dem Brenzcatechin-Test bei pH 6,0 gemessenen prozentualen Aktivitäten der PPO-Extrakte in Abhängigkeit der Temperatur.

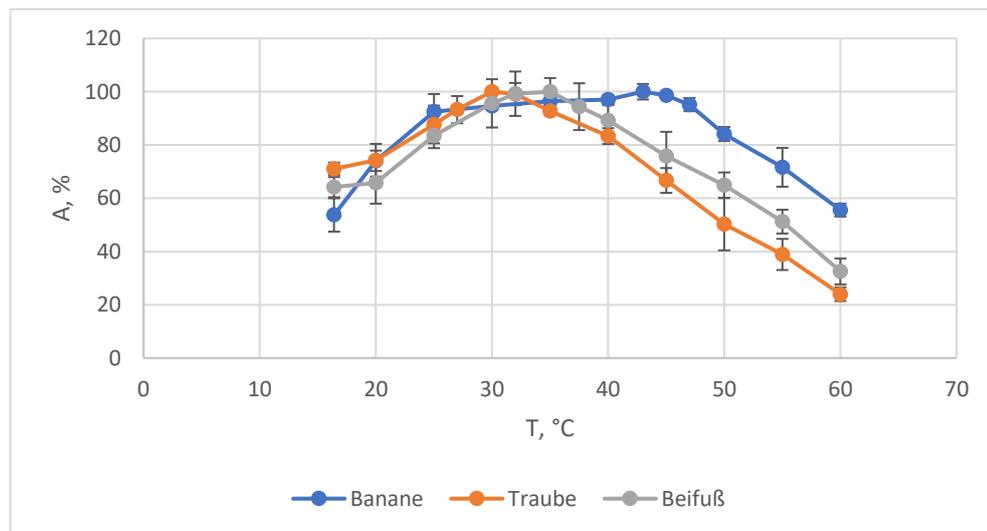


Abbildung 18: Enzymaktivitäten der Extrakte in Abhängigkeit der Temperatur. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei pH 6,0 und variierenden Temperatureinstellungen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Auffallend ist, dass bei relativ niedriger Temperatur von 16,4 °C im Bananen-, Trauben- und Beifußextrakt noch jeweils 54, 71 und 64 % Aktivität vorhanden ist. Wird die Temperatur leicht erhöht, steigt die Aktivität im Bananenextrakt steil an. Schon bei 25 °C erreicht sie 92 %. Zwischen 25 °C und 45 °C zeigt die Kurve einen plateauähnlichen Verlauf, die Aktivität bleibt über 90 %. Erst bei höheren Temperaturen beginnt die Aktivität zu sinken. Die Kurven des Trauben- und Beifußextraktes ähneln sich. Bei Temperaturerhöhung beginnen die Aktivitäten schnell zu steigen und haben bei 25 °C bereits 88 % (Traube) und 84 % (Beifuß) erreicht. Nach Überschreiten ihrer Optima bei 30 °C (Traube) und 35 °C (Beifuß) sinken die Aktivitäten konstant. Bei 60 °C zeigen der Bananen-, Trauben- und Beifußextrakt noch jeweils 56, 24 und 33 % Aktivität.

Das Temperatur-Optimum von Enzymen hängt meist stark von den Lebensbedingungen des Organismus ab, aus dem es stammt. In diesem Fall könnten also unter anderem die Wachstumsbedingungen der hier als Quelle dienenden Pflanzen Einfluss auf das Optimum ausüben. Die Bananen besitzen das höchste Temperatur-Optimum. Sie stammen aus tropischen Regionen, in

denen hohe Temperaturen erreicht werden können. Trauben werden meist im nördlichen Mittelmeerraum angebaut, während der Beifuß auf der ganzen Nordhalbkugel verbreitet ist. Hier herrschen gemäßigte Temperaturen. Dementsprechend besitzen Enzyme aus diesen Pflanzen niedrigere Temperaturoptima. Allerdings kann nicht immer von den Temperaturen des Lebensraumes auf die Temperaturoptima der Enzyme geschlossen werden. Auch bei der Bestimmung des Temperaturoptimums nehmen das eingesetzte Substrat und der pH-Wert einen starken Einfluss auf das Verhalten der Enzyme. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse bezüglich der Temperatur-Optima bei pH 6,0 mit Brenzcatechin als Substrat aufgeführt.

Tabelle 11: Ermittelte Temperatur-Optima bei pH 6,0 mit Brenzcatechin als Substrat.

Quelle	Temperatur-Optimum, °C
Banane	43
Traube	30
Beifuß	35

5.3.4 Stabilität in Ethanol

Unter Stabilität versteht man den Erhalt der Enzymaktivität unter bestimmten Bedingungen. Die Stabilität der PPOs in Ethanol spielt für ihren späteren Einsatz eine wichtige Rolle. Sie müssen im ethanolhaltigen Apfeltresterextrakt lange genug stabil bleiben, um genügend Substratumsatz zu gewährleisten. Als polares, organisches Lösungsmittel kann Ethanol Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Enzymstruktur stören. Abbildung 19 zeigt die Aktivität des Bananenextraktes in Abhängigkeit der Lagerungszeit in unterschiedlich konzentrierten Ethanollösungen bei Raumtemperatur, gemessen mit dem Brenzcatechin-Test.

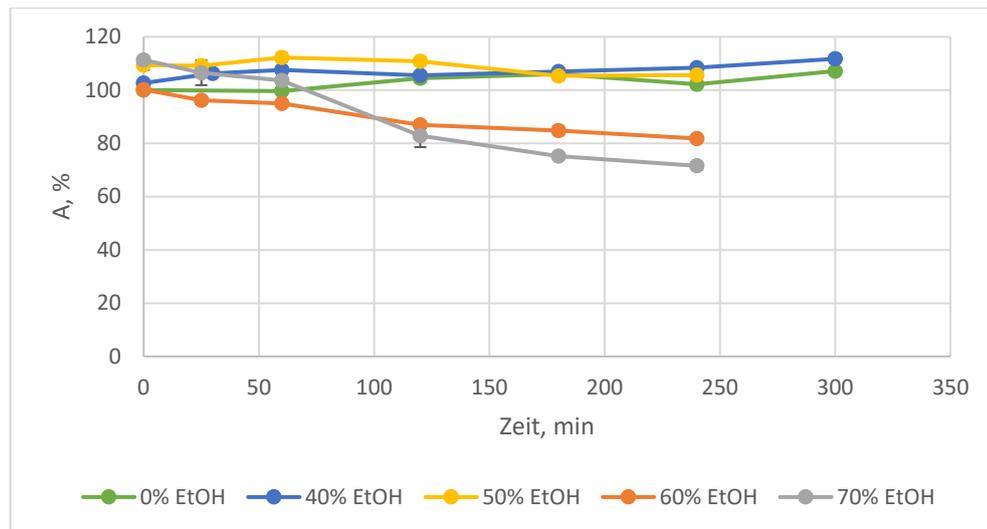


Abbildung 19: Enzymaktivität im Bananenextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Als Referenz ist die Aktivität des Extraktes bei Lagerung in 0 % Ethanol dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Aktivität mit der Zeit leicht ansteigt. Grund dafür könnte eine durch die Raumtemperatur und/oder das Leitungswasser verursachte aktivitätsfördernde Konformationsänderung oder eine durch Verdunstung bedingte Konzentrierung des Ansatzes sein. Bei Lagerung in 40 und 50 % Ethanol ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Hier ist sogar eine anfängliche Aktivitätssteigerung zu erkennen. Ab 60 % Ethanol ist eine Aktivitätsabnahme zu beobachten. Nach 4 h sind aber immer noch 75 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Nach einem Anstieg der Aktivität zu Beginn der Lagerung in 70 % Ethanol, sinkt diese innerhalb von 4 h auf 72 % Restaktivität. Konzentrationen bis zu 50 % Ethanol haben keinen erkennbaren Einfluss auf die Stabilität der PPOs im Bananenextrakt in dem hier untersuchten Zeitraum. Erst ab höheren Konzentrationen verlieren die Enzyme an Stabilität und somit an Aktivität.

Anders verhält es sich beim Beifußextrakt. In Abbildung 20 sind dessen Aktivitäten in Abhängigkeit der beschriebenen Lagerungsbedingungen dargestellt.

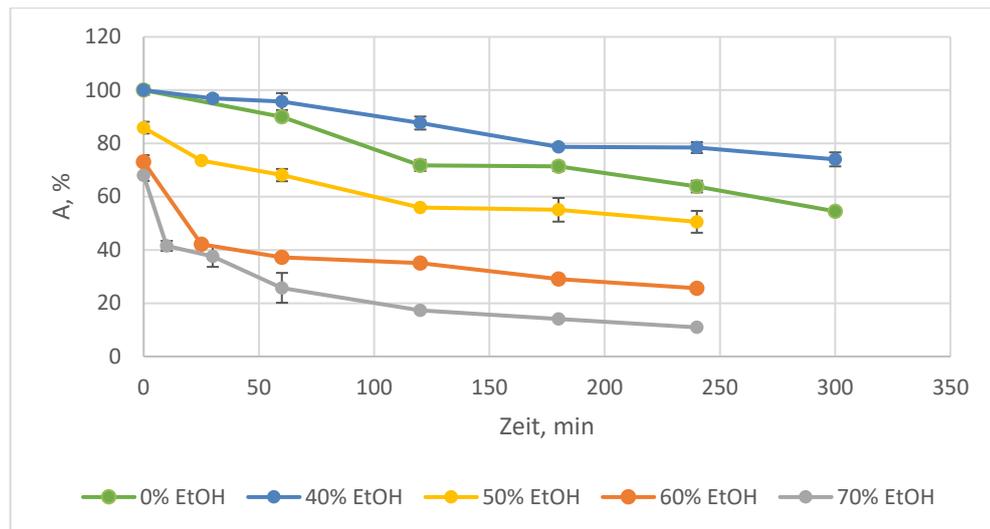


Abbildung 20: Enzymaktivität im Beifußextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Auch hier ist zum Vergleich die Lagerung in 0 % Ethanol dargestellt. Dabei sinkt die ursprüngliche Aktivität im Beifußextrakt innerhalb von 5 h kontinuierlich auf 55 %. Die Lagerung in Ethanollösungen bis 40 % begünstigt die Stabilität, die Aktivität fällt mit der Zeit langsamer ab. Ab 50 % Ethanol nimmt die Aktivität erst stärker ab und sinkt dann kontinuierlich. Je höher die Ethanolkonzentration, desto ausgeprägter zeigt sich dieser Kurvenverlauf. Nach 4 h Lagerung in 60 und 70 % Ethanol verbleiben in den Extrakten noch jeweils 26 und 11 % Restaktivität.

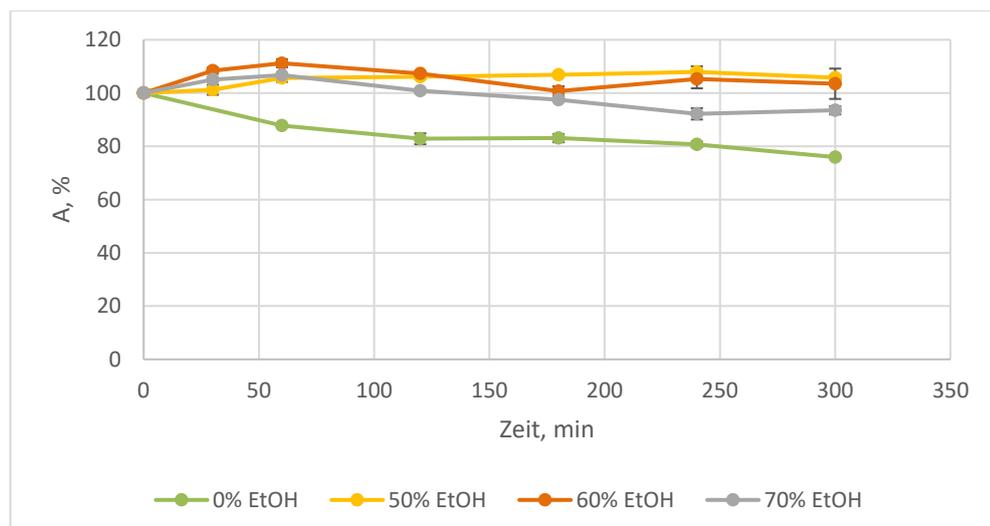


Abbildung 21: Enzymaktivität im Traubenextrakt bei Lagerung in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser) und Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C und pH 6,0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Die Aktivität im Traubenextrakt unter den schon beschriebenen Bedingungen ist in Abbildung 21 dargestellt. Auffallend ist hier, dass die Stabilität bei Lagerung in 0 % Ethanol am geringsten ist. Nach 5 h ist die Aktivität um 24 % gesunken. Lagerungen in Konzentrationen bis zu 70 % Ethanol erhöhen die Stabilität. In 70 % Ethanol ist nur eine leichte Aktivitätsabnahme zu beobachten, während 60 und 50 % die Stabilität über den beobachteten Zeitraum sogar erhöhen.

Aus den hier durchgeführten Versuchen geht hervor, dass die PPOs aus dem Beifußextrakt am sensibelsten bezüglich ihrer Stabilität auf Ethanol reagieren. Dies war zu erwarten, da sich in vorherigen Beobachtungen schon zeigte, dass die Beifuß-PPOs nach Extraktion sehr instabil sind. Die Stabilität der Bananen-PPOs wird erst ab 60 % beeinflusst. Hier ist die Aktivitätsabnahme verglichen mit dem Beifuß aber gering. Am positivsten sind die Ergebnisse der Trauben-PPOs zu bewerten. Die Aktivität im Extrakt nimmt nicht wie erwartet ab, sondern steigt bei Lagerung in ethanolhaltigen Lösungen an. Möglicherweise wäre im Falle des Traubenextraktes eine Lagerung in 50 % Ethanol sinnvoller als in 50 % Glycerin. Selbst in unverdünntem Apfeltresterextrakt wären die Trauben-PPOs stabil und die Bananen-PPOs ausreichend stabil. Dieser enthält aufgrund des ethanolhaltigen Extraktionsmittels ca. 70 % Ethanol. Um die Beifuß-PPOs über mehrere Stunden stabil zu halten, sollte der Extrakt aber auf ca. 30 – 40 % Ethanol verdünnt werden.

5.3.5 Aktivität in Ethanol

Neben der Stabilität spielt auch die Aktivität in Ethanol eine Rolle. Da die Reaktion der Enzyme mit den Apfeltrester-Polyphenolen im Apfeltresterextrakt stattfindet, sollten die Enzyme in Gegenwart von Ethanol aktiv sein. Um dies zu testen, wird Brenzcatechin in unterschiedlich konzentrierten Ethanollösungen (mit Puffer oder Leitungswasser verdünnt) gelöst und darin direkt enzymatisch umgesetzt. An dieser Stelle ist anzumerken, dass Brenzcatechin in der 10 %igen, mit Leitungswasser verdünnten Ethanollösung schnell autooxidiert und diese gelb färbt. Ab 60 % Ethanol fällt der verwendete Puffer aus und die Lösung wird trüb. Deswegen stehen für diese Parameter keine verlässlichen Messwerte zur Verfügung.

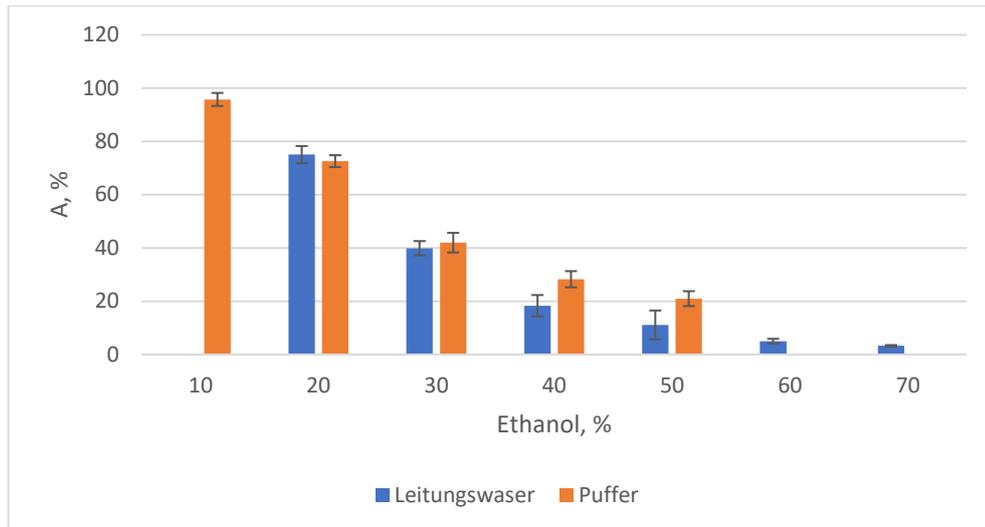


Abbildung 22: Enzymaktivität des Bananenextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C. Substrat und Enzym werden direkt in die Ethanollösungen gegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

In Abbildung 22 ist die Aktivität des Bananenextraktes in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und des eingesetzten Verdünnungsmittels dargestellt. Je höher der Ethanolgehalt, desto stärker nimmt die Aktivität ab. Bei ca. 30 % Ethanol gehen bereits 60 % Enzymaktivität verloren. Insgesamt sind die Aktivitäten im Puffer höher als im Leitungswasser. Dies fällt besonders bei 40 und 50 % Ethanol auf. Der positive Einfluss des Puffers scheint sich bei steigender Ethanolkonzentration zu erhöhen.

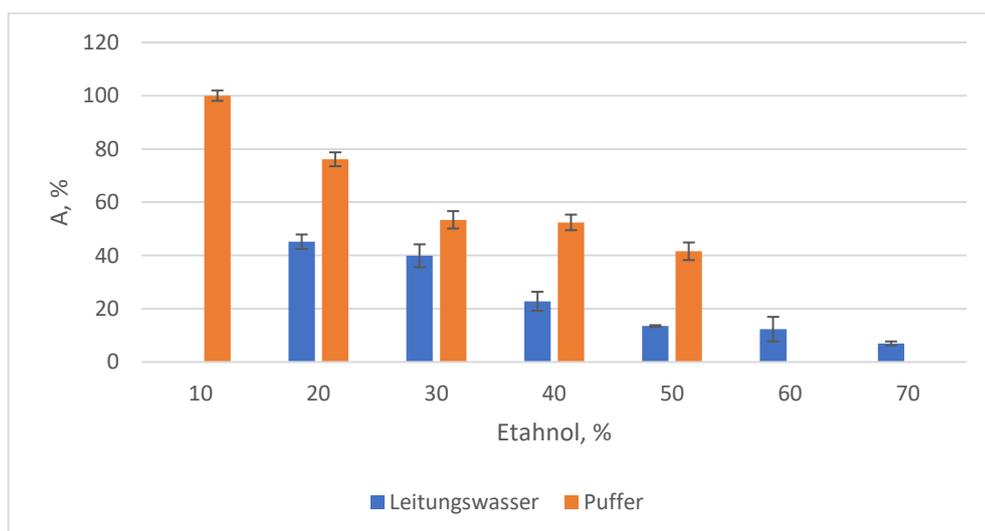


Abbildung 23: Enzymaktivität des Beifußextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanollösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C. Substrat und Enzym werden direkt in die Ethanollösungen gegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Der Unterschied beim Einsatz von Leitungswasser oder Puffer tritt beim Beifußextrakt deutlicher in Erscheinung. Abbildung 23 zeigt die Aktivitäten im Beifußextrakt unter den beschriebenen Parametern. Hier fällt auf, dass bei Verwendung von Puffer bis zu 50 % mehr Aktivität erzielt werden kann. 10 % Ethanol haben keinen Einfluss auf die Aktivität. Erst ab 20 % beginnt sie mit steigender Konzentration zu sinken. Bei 30 und 40 % Ethanol und unter Einsatz von Puffer bleiben ca. 50 % der ursprünglichen Aktivität erhalten.

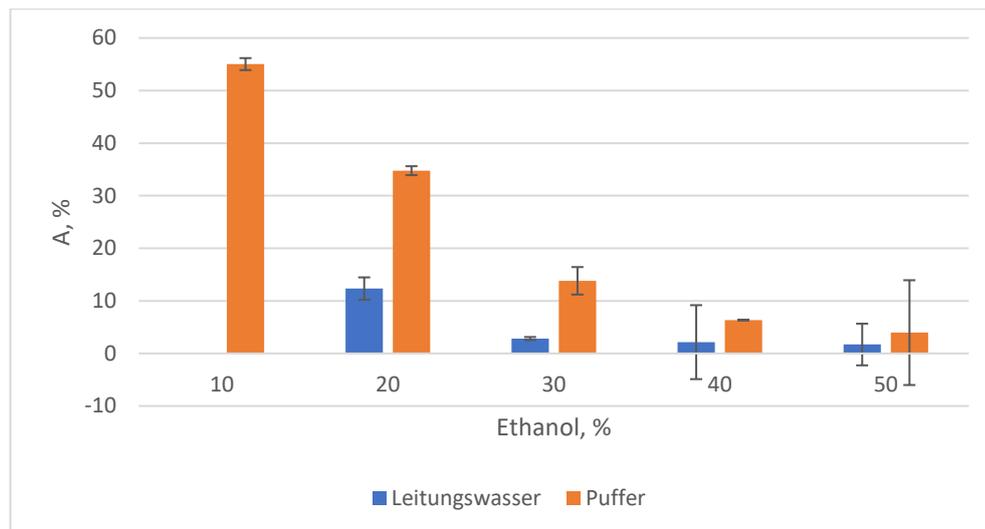


Abbildung 24: Enzymaktivität des Traubenextraktes in verschiedenen konzentrierten Ethanolösungen (verdünnt mit Leitungswasser oder Na-Citrat-Puffer pH 6,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M in den Lösungen). Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels Brenzcatechin-Test bei 25 °C. Substrat und Enzym werden direkt in die Ethanolösungen gegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Der Traubenextrakt zeigt die geringste Aktivität in Ethanol. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse. Schon bei 10 % Ethanol sinkt die Aktivität auf 55 %. Auch in diesem Fall wird der Einfluss des Verdünnungsmittels deutlich. Allerdings sind die im Puffer erreichten Aktivitäten im Vergleich zu denen des Bananen- und Beifußextraktes gering. Schon ab 40 % Ethanol sinken die Aktivitäten auf unter 10 %. Bei Konzentrationen höher als 50 % Ethanol kann keine Aktivität festgestellt werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein Einsatz der PPOs in unverdünntem Apfeltresterextrakt mit ca. 70 % Ethanolgehalt nicht sinnvoll wäre. In solch einem Medium zeigen alle PPO-Extrakte weniger als 20 % Aktivität. Verdünnt man den Extrakt 1:2, können Bananen- und Beifuß-PPOs noch mit 40 – 50 % ihrer Aktivität arbeiten. Um mit dem Traubenextrakt arbeiten zu können, müsste der Apfeltresterextrakt weiter verdünnt werden. Allerdings würde dies auch mit einer höheren Abnahme des Polyphenolgehaltes im Tresterextrakt einhergehen.

5.4 Reaktion mit Phloridzin

Um entscheiden zu können, welche vorliegenden Enzyme (PPO-Extrakte und Laccase-Gemische) für die Umsetzung des Apfeltresterextraktes geeignet sind, wird zunächst untersucht ob sie den Leitstoff Phloridzin oxidieren. Dazu werden die unter 3.5 beschriebenen Ansätze erstellt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt, da die verwendeten PPOs unter dieser Bedingung mindestens 80 % ihrer Aktivität zeigen. Die Werte pH 4,0 und 7,0 werden gewählt, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Farbgebung der Oxidationsprodukte von Phloridzin zu prüfen. pH 4,6 entspricht dem pH-Wert des Apfeltresterextraktes.

Aufgrund der niedrigen Aktivität im Traubenextrakt kann nicht mit einer Endkonzentration von 20 U/ml in der Phloridzin-Lösung gearbeitet werden. Dies würde zu einer hohen Volumenzunahme und damit zur starken Verdünnung des Substrates führen. Die Reaktion wird mit 8 U/ml durchgeführt. Allerdings kann selbst nach 67 h keine Farbänderung bei den gewählten pH-Werten in der Lösung festgestellt werden. Ebenso wenig reagieren Laccase C und F in dieser Zeit mit Phloridzin. Aufgrund der Ergebnisse werden diese Enzyme im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. In Abbildung 25 sind die Farbentwicklungen während der Reaktion mit Bananenextrakt, Beifußextrakt und Laccase A dargestellt.

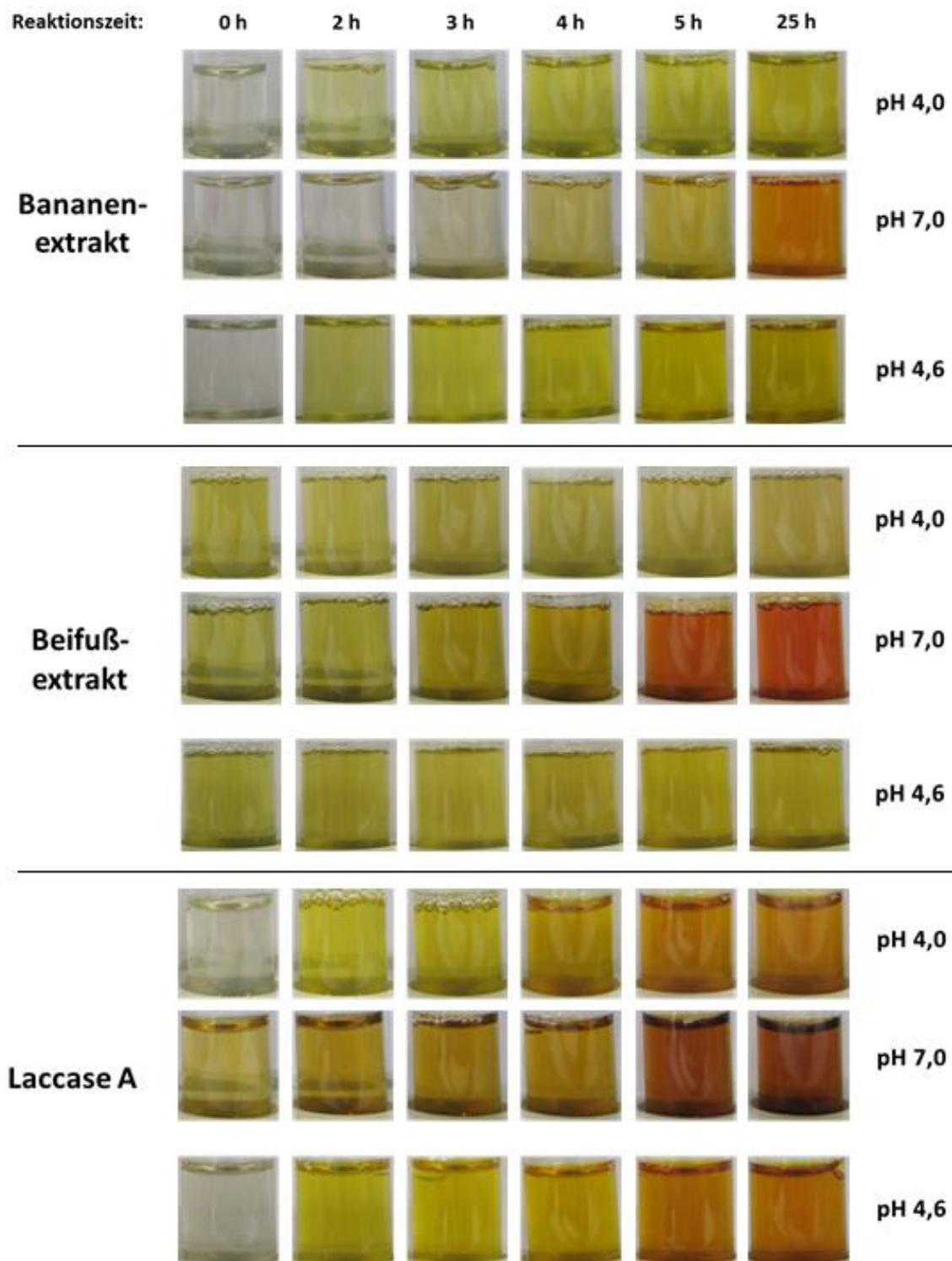


Abbildung 25: Darstellung des Reaktionsverlaufes von Bananen- und Beifußextrakt und Laccase A mit 0,001 M Phloridzin in McIlvaine-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten. Die eingesetzte Enzymkonzentration beträgt 20 U/ml. Dargestellt sind die farblichen Veränderungen der Lösungen in Abhängigkeit der Zeit, des pH-Wertes und der eingesetzten Enzyme.

Betrachtet man die Reaktionen des Bananenextraktes mit Phloridzin, fällt auf, dass zum Zeitpunkt 0 h bei keinem der pH-Werte eine Färbung auftritt. Erst nach zwei Stunden beginnen sich die Lösungen bei pH 4,0 und 4,6 zu verfärben. Die Farbzunahme bei pH 7,0 wird erst ab ca. 5 h deutlich erkennbar. Nach 5 h Reaktionszeit ist bei pH 4,0 und 4,6 optisch keine Zunahme der Farbintensität mehr erkennbar. Auch nach 25 h Inkubation bei Raumtemperatur scheinen sich die Farben der Lösungen nicht mehr zu ändern. Anders sieht es bei pH 7,0 aus. Hier nimmt die Farbintensität langsamer zu als bei niedrigeren pH-Werten. Erst nach ca. 20 h ändert sich der Farbton nicht mehr. Nach 25 h ist ein deutlicher Unterschied der Farbtöne zwischen den pH-Werten 4,0 und 7,0 zu erkennen. Dies beruht auf den Eigenschaften der POPs, die bei pH-Werten > 6,0 von gelb bis leicht orange zu orange bis braun wechseln. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Farbgebung der Oxidationsprodukte ist bei allen hier eingesetzten Enzymen zu erkennen.

Schon zum Zeitpunkt 0 h tritt bei allen Beifußextrakt-Ansätzen eine leicht grünliche Färbung auf. Diese ist aber kein Produkt einer enzymatischen Reaktion, sondern wird von der intensiven dunkelgrünen Farbe des Beifußextraktes selbst verursacht. Bei pH 4,0 ist über den gesamten betrachteten Reaktionszeitraum keine Farbveränderung erkennbar. Aber bei pH 4,6 schlägt die grünliche Färbung nach 5 h leicht ins gelbliche um. Die nicht oder nur schwach erkennbaren Farbveränderungen bei niedrigen pH-Werten könnten durch Überdeckung der grünlichen Eigenfarbe der Lösung verursacht werden. Des Weiteren zeigen Beifuß-PPOs im Bereich niedriger pH-Werte geringe Aktivität, so dass eventuell nur wenig Phloridzin umgesetzt werden kann. pH 7,0 dagegen entspricht dem Optimum der Beifuß-PPOs. Hier ist nach 5 h eine deutliche orange-braune Färbung zu erkennen. Diese verändert sich auch nach 25 h Reaktionszeit nicht.

Die intensivsten Farbgebungen können bei den Reaktionen der Laccase A beobachtet werden. Hier fällt auf, dass zum Zeitpunkt 0 h bei pH 7,0 bereits eine erkennbare Färbung eintritt. Auch bei den anderen pH-Werten scheint die Reaktion schneller abzulaufen. Bei pH 4,0 und 4,6 entsteht nach 5 h ein oranger Farbton, der sich von den gelblichen Tönen der PPOs unterscheidet. In der Lösung mit pH 7,0 ergibt sich nach 5 h ein dunkelbrauner Ton. Auch dieser unterscheidet sich von den mit PPOs erzeugten, leuchtend orangen Farbtönen unter gleichen Bedingungen.

5.5 Reaktion mit dem Apfeltresterextrakt

Um die Eignung von Bananen- und Beifuß-PPOs und Laccase A zur Umsetzung des Apfeltresterextraktes in farbige Produkte zu prüfen, werden die unter 3.6 beschriebenen Ansätze erstellt. Die Ergebnisse der pH-Wert-Ermittlung in den Ansätzen unverdünnt, verdünnt mit Leitungswasser und verdünnt mit Puffer entsprechend den pH-Optima der Enzyme, aber ohne Enzymzusatz, sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Ergebnisse der pH-Wert-Ermittlung in den verschiedenen Apfeltresterextraktansätzen.

Verdünnungsmittel	Verdünnung	pH-Wert
-	-	4,6
Leitungswasser	1:2	4,0
Puffer pH 7,1 (Banane)	1:2	7,0
Puffer pH 6,8 (Beifuß)	1:2	6,7
Puffer pH 5,6 (Laccase A)	1:2	5,4

Setzt man Leitungswasser zur Verdünnung ein, fällt der pH-Wert des Ansatzes auf 4,0. Bei Verwendung von Puffer mit höheren pH-Werten als der des Apfeltresterextraktes steigt der pH-Wert in den Ansätzen. In allen mit Puffer verdünnten Ansätzen liegt der pH-Wert beinahe bei dem des eingesetzten Puffers. Zu beachten ist, dass sich der Polyphenolgehalt in den verdünnten Ansätzen halbiert.

Verdünnt man den Apfeltresterextrakt, tritt eine sofortige Trübung auf. Diese könnte von Substanzen verursacht werden, die bei Konzentrationen < 70 % Ethanol ausfallen. Gibt man die Enzyme zu den Lösungen, bildet sich nach einiger Zeit auch in den unverdünnten Ansätzen ein Niederschlag. Eventuell fallen Reaktionsprodukte oder die Enzyme selbst aus. Um dennoch einen Farbumschlag in den Ansätzen erkennen zu können, werden diese zum Zeitpunkt 0 h und nach 20 h Reaktionszeit zentrifugiert und die Überstände fotografiert. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse.

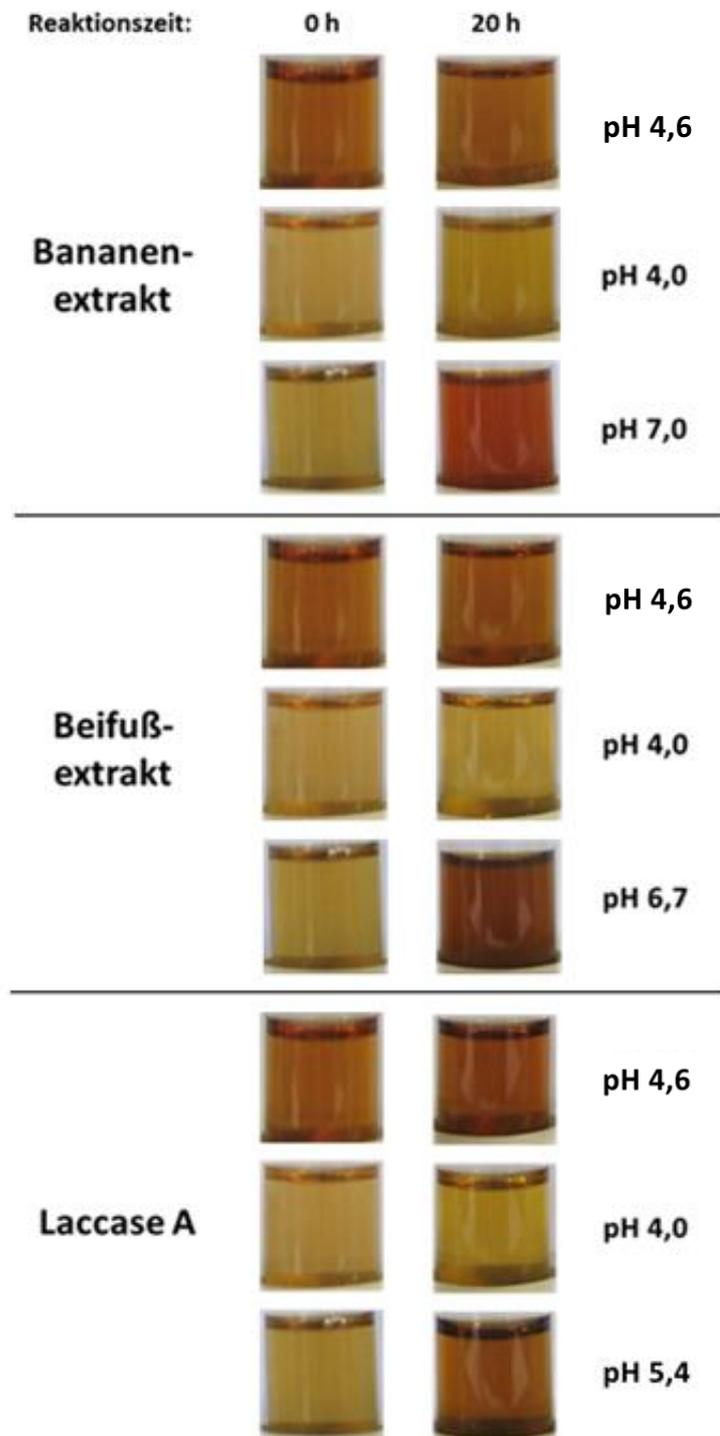


Abbildung 26: Darstellung des Reaktionsverlaufes von Bananen- und Beifußextrakt und Laccase A mit dem Apfeltresterextrakt. Je nach Art der Verdünnung ergeben sich unterschiedliche pH-Werte: pH 4,6 (unverdünnt), pH 4,0 (1:2 Leitungswasser), pH 7,0 (1:2 McIlvaine-Puffer pH 7,1), pH 6,7 (1:2 McIlvaine-Puffer pH 6,8), pH 5,4 (1:2 McIlvaine-Puffer pH 5,6). Für die unterschiedlichen Enzyme wird jeweils ein Puffer entsprechend des pH-Optimums gewählt. Die eingesetzte Enzymkonzentration beträgt 20 U/ml. Dargestellt sind die farblichen Veränderungen der Lösungen in Abhängigkeit der Zeit und des pH-Wertes.

Betrachtet man die Ansätze zum Zeitpunkt 0 h, fällt auf, dass der Apfeltresterextrakt selbst eine orange-braune Färbung aufweist. Durch Verdünnung mit Puffer oder Leitungswasser schlägt diese ins gelbliche um. In den Ansätzen mit unverdünntem Apfeltresterextrakt bei pH 4,6 ist bei keinem der Enzymextrakte bzw. -gemische ein deutlicher Farbumschlag erkennbar. Wie erwartet, hindert eine zu hohe Ethanolkonzentration die Enzyme daran, ihre Funktion zu erfüllen.

In den mit Leitungswasser verdünnten Ansätzen scheint der gelbliche Farbton nach 20 h intensiver geworden zu sein. Die Bananen-PPOs arbeiten bei pH 4,0 noch mit knapp 30 % ihrer Aktivität, während die Aktivität der Beifuß-PPOs auf unter 10 % sinkt, bezogen auf Brenzcatechin. Da im Ansatz des Beifußextraktes ein leichter Farbumschlag erkennbar ist, könnten sich die Optimalbedingungen aufgrund der Beschaffenheit des Apfeltresterextraktes verschoben haben. Im Gegensatz zum unverdünnten Apfeltresterextrakt findet hier, trotz geringerem Polyphenolgehalt, eine Reaktion statt. Dies ist auf den niedrigeren, durch die Verdünnung erzielten Ethanolgehalt von ca. 35 % zurückzuführen.

Die auffälligste Farbänderung wird in den Ansätzen mit pH-Werten nahe den ermittelten Optimumswerten der jeweiligen Enzyme erzielt. Bei allen eingesetzten Enzymen ist ein deutlicher Farbumschlag von der gelblichen Ausgangslösung ins bräunliche zu erkennen. Dies war zu erwarten, da Enzyme ihre volle Aktivität unter den jeweils optimalen Bedingungen entfalten. Dabei unterscheiden sich die von den jeweiligen Enzymen erzeugten Farbtöne untereinander. Während der Bananen-Ansatz eine rotbraune Färbung aufweist, ist der Beifuß-Ansatz dunkelbraun und der Laccase A-Ansatz hellbraun gefärbt. Ein Faktor, der diese unterschiedliche Farbgebung beeinflusst, ist der pH-Wert. Hier verhält es sich ähnlich wie bei der Reaktion mit reinem Phloridzin. Die Reaktionen bei pH 4,0 ergeben einen gelben Farbton, während die des Bananen- und Beifußextraktes bei pH 7,0 und pH 6,7 eine dunklere braune Färbung hervorrufen. Die Laccase A produziert bei pH 5,6 einen hellbraunen Farbton, der ebenfalls zu den Beobachtungen unter 5.4 passt.

6. Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Umsetzung von aus Apfeltrester gewonnenen Polyphenolen, insbesondere von Phloridzin, zu definierten Farbextrakten mit Hilfe von pflanzlichen Polyphenoloxidasen und fungalen Laccasen möglich ist. Die Hauptaufgabe bestand darin, geeignete PPOs ausfindig zu machen, sie zu charakterisieren und entsprechend einzusetzen.

Die Aktivitäten in den Bananen-, Trauben- und Beifußextrakten wurden mittels Brenzcatechintest bestimmt. Je nach pflanzlicher Quelle konnten unterschiedlich hohe PPO-Aktivitäten extrahiert werden. Dabei lag der Beifuß mit durchschnittlich 2235 U/g vorne, gefolgt von der Banane mit 411 U/g. Die Traube mit 17 U/g zeigte die geringste Aktivität. Hier ist zu betonen, dass PPO-Aktivitäten stark von äußeren Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und eingesetztem Substrat abhängig sind. Um die PPO-Affinität gegenüber anderen Substraten zu prüfen, müssen weitere Tests mit poly- bzw. monophenolischen Substraten durchgeführt werden. Zu häufig eingesetzten PPO-Substraten zählen 4-Methylcatechin, Pyrogallol, Chlorogensäure oder Gallussäure^[15]. Sie besitzen alle mindestens einen aromatischen Ring, an den Hydroxylgruppen substituiert sind, unterscheiden sich aber stark in der Struktur ihrer Seitenketten. Möglicherweise können durch den Einsatz anderer Substrate höhere Aktivitäten erzielt werden.

Oft werden während der Extraktion neben Ascorbinsäure weitere Stoffe zugesetzt, die die Reaktion der PPOs mit pflanzeigenen Polyphenolen verhindern sollen. Dazu zählen unter anderem der Komplexbildner EDTA und Konzentration > 1 % PVP, PVPP oder PEG^{[21], [22], [38]}. Auf diese Weise wird die Bildung von möglicherweise inhibierenden Produkten und die bräunliche Verfärbung des Extraktes unterbunden. Diese Stoffe werden nach der Extraktion durch weitere Aufreinigungsschritte wieder entfernt, um in späteren Reaktionen keinen negativen oder inhibierenden Effekt auf die PPOs auszuüben. Da in dieser Arbeit aber ein schnelles Extraktionsverfahren nötig war, wurden lediglich 0,01 M Ascorbinsäure und 1 % PVPP als Zusätze getestet und auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet. Dabei zeigte sich, dass die Extraktion mit Zusätzen deutlich erfolgreicher verlief als ohne. Allerdings besteht bei der Extraktion der PPOs noch Optimierungsbedarf. Neben der Konzentration und Auswahl der Zusätze sollten der pH-Wert, die Extraktionsdauer und -temperatur an die jeweiligen Extraktionsquellen angepasst werden. Die Beifuß-PPOs verlieren bei Raumtemperatur sehr schnell an Aktivität. Hier sollte eine Kühlung während der Extraktion in Betracht gezogen werden, um der Wärmeentwicklung des Mixers entgegen zu wirken. Trauben- und Bananen-PPOs scheinen in der Hinsicht weniger empfindlich zu sein. Um den optimalen pH-Wert zu bestimmen, können Stabilitätstests mit den Enzymen durchgeführt werden, denn oft ist das pH-Optimum nicht der Wert, bei dem die Enzyme am stabilsten sind.

Außerdem sollte eine teilweise Aufreinigung der Enzyme stattfinden. Dies hat in vielen Fällen einen stabilisierenden Effekt auf PPOs. Denn auch wenn anfänglich hohe Aktivitäten extrahiert wurden, nehmen diese in den Extrakten, selbst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, schnell ab. Dies kann Folge der Beschaffenheit der unbehandelten Enzymextrakte sein. Neben den PPOs sind viele weitere Substanzen wie Proteine, Kohlenhydrate und Polyphenole im Extrakt enthalten, die Einfluss auf die Enzymaktivität und -stabilität nehmen können. Die Beifuß-PPOs stellten sich als besonders empfindlich heraus. Eine weitere Aufreinigung könnte dem entgegenwirken. Dazu könnten weitere Versuche zur AS-Fällung stattfinden. Auch der Einsatz von Ionenaustauschchromatographie^[39] oder Fällung mit organischen Substanzen^[21] sind in der Literatur beschrieben. Zwar hielten die eingesetzten Verfahren zur Stabilisierung die Aktivität in den Extrakten über den beobachteten Zeitraum konstant, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass störende Substanzen enthalten sind. Zudem gingen alle Stabilisierungsverfahren mit einer deutlichen Aktivitätsabnahme einher. Die Lagerung in 50 % Glycerin reichte aber für die Zwecke dieser Arbeit aus und ermöglichte genügend Stabilität, um die PPO-Extrakte zu charakterisieren.

Bei der Charakterisierung muss berücksichtigt werden, dass pro Extrakt kein einzelnes Enzym extrahiert wurde. In den meisten Pflanzen liegen PPOs in Form mehrerer Isoenzyme vor. So konnten beispielsweise im Bananenfruchtfleisch insgesamt 17 PPO-Isoenzyme und weitere in der Schale nachgewiesen werden^[40]. Dementsprechend sind gemessene Aktivitäten Resultat eines Zusammenspiels mehrerer PPO-Isoenzyme. Hier fand also die Charakterisierung der jeweiligen PPO-Systeme in den Extrakten statt.

Mit den bei ASA Spezialenzyme vorliegenden Testmethoden zur Bestimmung der Laccase-Aktivität konnte keine Reaktion beobachtet werden. Die eingesetzten Substrate, ABTS und 2,6-Dimethoxyphenol, sind etablierte Stoffe zur Ermittlung von Laccase-Aktivität. Das Ausbleiben der Reaktion spricht für die Abwesenheit von Laccasen und Laccase-Nebenaktivität in den pflanzlichen Extrakten. Dies war zu erwarten, da Laccasen häufiger in Pilzen und Bakterien, aber seltener in höheren Pflanzen vertreten sind. Ausschließlich mit dem Brenzcatechintest konnte Aktivität nachgewiesen werden. Diese Testmethode spiegelt allerdings nur die Diphenolaseaktivität in den Extrakten wider. Ebenfalls interessant wäre eine Messung der Monophenolaseaktivität, die bei der Reaktion mit Phloridzin eine wichtige Rolle einnimmt. Dafür müsste allerdings eine neue Testvorschrift mit geeignetem monophenolischen Substrat erstellt werden.

Dokumentierte pH-Optima von pflanzlichen PPOs sind sehr weit gefächert, liegen aber normalerweise zwischen pH 4,0 – 8,0. Mit den hier ermittelten pH-Optima der Extrakten im neutralen Bereich befinden sich die Werte im genannten Rahmen. Wichtig ist es, für jedes pH-Optimum das eingesetzte Substrat anzugeben. Des Weiteren wird das pH-Optimum von der Extraktionsmethode und dem bei der Aktivitätsbestimmung verwendeten Puffer beeinflusst. Je nach Variation dieser Bedingungen ergeben

sich unterschiedliche Optima für gleiche PPO-Systeme. Für aus Trauben extrahierte PPOs wurde ein pH-Optimum von 3,5 – 4,0 mit 4-Methylcatechin als Substrat ermittelt ^[41]. Bei Verwendung von Brenzcatechin zeigten sich Optima im Bereich von 6,0 – 7,3 ^[21]. Diese Werte passen zu dem hier bestimmten Optimum von pH 7,4. Ebenso passt das für die Bananen-PPOs bestimmte Optimum von pH 6,8 zu den literarischen Werten. Diese dokumentieren ein Optimum bei pH 6,5 mit Dopamin ^[42] und im Bereich von pH 7,0 mit Brenzcatechin ^[43]. Für die Beifuß-PPOs gibt es derzeit keine Vergleichswerte in der Literatur. Mit pH 7,1 fügen sie sich aber ebenfalls in den für pflanzliche PPOs typischen neutralen Bereich ein. Hinsichtlich ihres späteren Einsatzgebietes im Medium Apfeltrester wären pH-Optima im sauren Bereich wünschenswert. Allerdings konnte an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass sich die pH-Optima bei Einsatz von Apfelpolyphenolen als Substrat in den gewünschten Bereich verschieben. Da die deutlichste Reaktion aber in den mit Puffer verdünnten Ansätzen stattfand, ist anzunehmen, dass sich die pH-Optima bei der Umsetzung des Apfeltresters weiterhin im neutralen Bereich befinden.

Ebenso wie die pH-Optima umfassen die Temperatur-Optima von pflanzlichen PPOs ein weites Spektrum von ca. 20 – 45 °C. Neben den üblichen Einflussfaktoren der Temperatur auf enzymatische Reaktionen wird hinsichtlich PPOs der Einfluss auf die Löslichkeit von Sauerstoff diskutiert. Mit steigender Temperatur verringert sich auch der gelöste Sauerstoff im Reaktionsmedium. Dieser ist für die Reaktion von PPOs essentiell und beeinflusst die Aktivität der Enzyme ^[15]. Auch die Abhängigkeit des Substrates ist deutlich erkennbar. So ist in der Literatur für Trauben-PPOs ein Temperatur-Optimum von 25 – 45 °C mit 4-Methylcatechin ^[41] und eins von 25 °C mit Catechin ^[44] verzeichnet. Das hier ermittelte Optimum von 30 °C wurde mittels Brenzcatechin bestimmt und liegt zwischen den Literaturwerten. Für Bananen-PPOs ist ein Optimum von 30 °C mit Dopamin und Brenzcatechin angegeben ^{[43], [42]}. Der hier ermittelte Wert von 43 °C liegt höher. Allerdings ist zu beachten, dass sich die Aktivität im Bananenextrakt zwischen 25 und 45 °C nur minimal ändert. Auch hinsichtlich des Temperatur-Optimums gibt es für Beifuß-PPOs keine Einträge in der Literatur. Die charakterisierten Enzymextrakte zeichnen sich durch hohe Aktivitäten bei niedrigen Temperaturen aus. Schon bei 25 °C steigen ihre Aktivitäten auf über 80 %. Dies wirkt sich positiv auf den späteren Einsatz und die Prozessführung des Verfahrens aus, da kein zusätzlicher Wärmeeintrag für den Reaktionsablauf nötig ist und so Kosten eingespart werden können.

Um die Enzyme im ethanolhaltigen Apfeltresterextrakt einsetzen zu können, mussten diese auf ihre Stabilität im besagten Lösungsmittel untersucht werden. Dabei wurde deutlich, dass eine gewisse Konzentration an Ethanol einen stabilisierenden Effekt auf die PPO-Extrakte ausübt. Ab 50 % Ethanol beginnen die Aktivitäten im Beifußextrakt über den beobachteten Zeitraum stark zu sinken. 60 % Ethanol bewirkt einen leichten Abfall im Bananenextrakt und selbst 70 % Ethanol haben noch eine stabilisierende Wirkung auf die Trauben-PPOs. Anders verhält es sich mit der Aktivität direkt in den

Ethanollösungen. Während 40 % Ethanol auf alle Extrakte stabilisierend wirken, zeigen die Enzyme in 40 %iger Ethanollösung nur knapp 50 % (Beifuß-PPOs), 30 % (Bananen-PPOs) und 5 % (Trauben-PPOs) ihrer ursprünglichen Aktivität. Dabei fällt auf, dass je instabiler sich die Extrakte gegenüber Ethanol zeigten, desto aktiver waren sie in der Lösung selbst. Vermutlich stabilisiert Ethanol die PPOs in einer inaktiveren Form. Das Lösemittel sorgt dafür, dass die Enzyme in diesem stabileren Zustand verbleiben. Bis zu gewissen Konzentrationen ist der Vorgang reversibel, so dass in ethanolfreien Lösungen wie Puffer der Wechsel in die aktivere Form möglich ist. Ab zu hohen Konzentrationen ist die Wirkung von Ethanol aber irreversibel. Möglicherweise finden aufgrund der Polarität des Lösemittels starke Änderungen in der dreidimensionalen Struktur der Enzyme statt, sodass keine Zustandsänderungen mehr möglich sind. In Folge dessen sinkt die Stabilität. Der stabilisierende Effekt zeigt sich am deutlichsten im Traubenextrakt. Bis zu 70 % Ethanol bewirken eine reversible Fixierung der PPOs in ihrer inaktiveren Form, so dass die Stabilität zwar positiv ausfällt, in den Lösungen selbst aber wenig bis keine Aktivität gemessen werden kann. Die Beifuß-PPOs zeigen in mit Puffer verdünnten Ethanollösungen die höchsten Aktivitäten. Vermutlich fällt die Fixierung in der inaktiveren, stabileren Form durch Ethanol weniger stark aus als in den anderen Extrakten. Sie liegen vorwiegend in instabilerer aber aktiverer Form vor. Deswegen können direkt in den Ethanollösungen noch relativ hohe Aktivitäten im Vergleich zu den anderen Extrakten gemessen werden, die Stabilität ist aber geringer. Insgesamt zeigten alle Extrakte höhere Aktivitäten in den mit Puffer verdünnten Lösungen. Dies war zu erwarten, da die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung ebenfalls in Gegenwart von gelösten Salzen und anderen Stoffen vorliegen, die stabilisierend auf ihre Struktur wirken können. Die mit Puffer verdünnten Ethanollösungen entsprechen eher der natürlichen Umgebung als die mit Leitungswasser verdünnten Lösungen.

Bei der Reaktion mit Phloridzin wurden neben den PPO-Extrakten auch die bei ASA Spezialenzyme vorliegenden Laccase-Gemische A, C und F getestet. Laccase C und F sowie der Traubenextrakt zeigten keine Reaktion. Im gesamten Arbeitsverlauf war die Aktivität im Traubenextrakt am geringsten. Dies könnte an einem niedrigen PPO-Gehalt von Trauben im Vergleich zu Banane und Beifuß liegen. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorliegen von latenten PPOs im Traubenextrakt. Um dies zu prüfen, könnten Methoden zur Aktivierung der Enzyme angewandt werden. Dazu zählen die Exposition der Enzyme gegenüber sauren pH-Werten, unterschiedlichen Konzentrationen von SDS oder ungesättigten Fettsäuren. Als weitere Aktivierungsmethode wird die Inkubation mit Proteasen beschrieben. In vielen Fällen konnte festgestellt werden, dass PPOs in zwei Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht existieren: eine schwere, inaktive Form und eine leichtere, aktive Form. Die aktive Form entsteht durch partielle Proteolyse am carboxyterminalen Ende des Enzyms. ^[6]

Im Verlauf der Reaktion von Laccase A, Bananen- und Beifußextrakt wurde die Abhängigkeit der Farbe der entstehenden POPs vom pH-Wert deutlich. Ansätze der PPO-Extrakte zeigten < pH 6,0 eine

gelbliche Färbung, bei höheren pH-Werten eine orange. Die Ansätze der Laccase A resultierten in deutlich dunkleren Farben. Bei Werten $< \text{pH } 6,0$ zeigte sich eine orange Färbung, die bei höheren pH-Werten in bräunliche Töne umschlug. Des Weiteren waren die Farbumschläge in den Laccase A-Ansätzen zu früheren Reaktionszeitpunkten erkennbar als die der PPO-Ansätze.

Die Ursache für diese Differenzen liegt vermutlich in den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen von PPOs und Laccasen. Die Reaktion von PPOs mit Phloridzin ist unter 2.2.3 beschrieben. Das Auftreten einer Lag-Phase, in der das Enzym seinen Zustand an das gegebene Substrat anpasst, um die Addition einer Hydroxylgruppe zu katalysieren und das Intermediärprodukt POP_i zu bilden, ist auch hier zu erkennen. Erst nach ca. 2 h können bei den Bananen-PPOs und nach 3 h bei den Beifuß-PPOs gelbliche Färbungen beobachtet werden, die auf die Bildung von POP_j und vorhandene Monophenolaseaktivität schließen lassen. Laccasen besitzen keine Monophenolaseaktivität im Sinne der Addition von Hydroxylgruppen. Sie oxidieren ihre Substrate zu Phenoxyradikalen, die in Lösung schnell weiter reagieren. Die Vermutung liegt nahe, dass in den Laccase-Ansätzen nicht nur die unter 2.2.3 beschriebenen POPs entstehen, sondern Polymerisationsprodukte mit ähnlichen, färbenden Eigenschaften, welche die dunkleren Farbtöne hervorrufen. Da aber auch bei den Laccase A-Ansätzen der Einfluss des pH-Wertes deutlich wird, liegen vermutlich POPs in der Lösung vor. Dies könnte auf das Vorliegen von Laccase A als Enzymgemisch zurückzuführen sein. Literaturrecherchen ergaben, dass aus dem Pilz *Agaricus bisporus*, aus dem Laccase A stammt, bereits PPOs isoliert wurden. Eventuell ist neben den Laccasen ein PPO-Anteil enthalten, der mittels Monophenolaseaktivität den ersten Reaktionsschritt Richtung POP_j katalysiert. Die Reaktion der Laccasen und anschließende spontane Polymerisation könnten zu weiteren färbenden oder reduzierenden Produkten führen. Letztere würden die Monophenolaseaktivität der PPOs begünstigen und die Lag-Phase verkürzen. Auf diese Weise würde Phloridzin schneller in seine Reaktionsprodukte umgesetzt werden.

Folgt man dieser Theorie, könnte der Grund für die ausbleibende Reaktion der Laccasen C und F der fehlende PPO-Anteil im Enzymgemisch sein. Die Gemische stammen aus den Pilzen *Trametes spec.* und *Trametes trogii.*, von denen bisher keine Isolation von PPOs, welche die hier beschriebenen Mono- und Diphenolaseaktivitäten besitzen, bekannt ist.

Für die Reaktion mit dem Apfeltresterextrakt erwiesen sich die mit Puffer verdünnten Ansätze erwartungsgemäß am geeignetsten. Hier rufen die Reaktionen mit den eingesetzten Enzymen abweichende Farbtöne, bezogen auf die Reaktion mit reinem Phlorodzin, hervor. Hinsichtlich des Apfeltresterextraktes ist zu beachten, dass neben Phloridzin noch weitere Polyphenole und andere Substanzen enthalten sind. Diese können zu weiteren unbekanntem Reaktionsprodukten führen und die ablaufenden Reaktionen und die Enzyme selbst positiv oder negativ beeinflussen. Das Vorhandensein von reduzierenden Substanzen würde beispielsweise die Monophenolaseaktivität der PPOs begünstigen, während andere Begleitstoffe die Reaktion eventuell stören. Außerdem besitzt der

Apfeltresterextrakt selbst eine braun-rote Färbung. Diese könnte die Farbe entstehender Produkte überdecken, so dass die Reaktion optisch nicht genau verfolgt werden kann. Auch der im Reaktionsverlauf entstehende Niederschlag könnte die Reaktion negativ beeinflussen. Polyphenole die ausfallen, können von den PPOs und Laccasen nicht mehr umgesetzt werden. Sollten die Enzyme selbst ausfallen, werden diese wahrscheinlich inaktiv und können die Reaktion nicht mehr katalysieren. Auch beim Einsatz von Apfeltresterextrakt ist die Abhängigkeit der Farbbildung bezüglich des pH-Wertes erkennbar. Bei pH 4,0 konnte in allen Ansätzen nach 20 h eine leicht intensivere Gelbfärbung beobachtet werden, während die Ansätze im neutralen pH-Bereich rot bis braun gefärbt waren. Allerdings könnte die weniger deutliche Reaktion bei pH 4,0 auch der geringen Enzymaktivität in diesem Bereich zuzuschreiben sein. Zudem ist im Apfeltresterextrakt weniger Phloridzin als in den Vorversuchen mit dem reinen Stoff enthalten. Der Polyphenolgehalt und seine Zusammensetzung schwanken stark in Äpfeln und somit auch im Trester. Der Anteil von Dihydrochalkonen liegt meist zwischen 2 – 6 %. Angenommen, 2 % der extrahierten Polyphenole wären Phloridzin, so würde sich eine Konzentration von 0,027 g/l, bezogen auf den gemessenen Gesamtpolyphenolgehalt, ergeben. Das ist gerade mal 1/20 der in vorherigen Versuchen eingesetzten Phloridzinkonzentration. Trotzdem findet eine klare Verfärbung der Lösung in den mit Puffer verdünnten Ansätzen statt. Die entstehenden Brauntöne unterscheiden sich je nach eingesetztem PPO-Extrakt bzw. Laccase-Gemisch und pH-Wert. Um den Einfluss der eingesetzten Enzyme und des pH-Wertes differenzieren zu können, sollten weitere Versuche stattfinden.

Die Reaktionen im Tresterextrakt finden in Anwesenheit von ca. 35 % Ethanol statt. Um der aktivitätshemmenden Wirkung von Ethanol auf PPOs entgegen zu wirken, könnten auch hier Aktivatoren zugesetzt werden. Möglicherweise wird so die Zustandsänderung von einer vermutlich inaktiveren in eine aktivere Form begünstigt.

Außerdem sollte eine Optimierung der Tresterextraktion erfolgen. Dabei sind eine Entfernung der Störstoffe sowie eine Konzentrierung der Polyphenole, insbesondere der Dihydrochalkone, anzustreben. Ein von Störsubstanzen freier Extrakt würde sich vermutlich positiv auf die Niederschlagbildung bei der Verdünnung und im Laufe der Enzymreaktion auswirken.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde dennoch deutlich, dass Laccase A, Bananen- und Beifuß-PPOs in der Lage sind, Polyphenole, insbesondere Phloridzin, aus Apfeltrester zu andersfarbigen Stoffen umzusetzen. Wichtig sind dabei eine nicht zu hohe Ethanolkonzentration und die Wahl des richtigen pH-Wertes bezüglich Enzym und gewünschter Farbe.

Um aus den hier vorliegenden Ergebnissen einen Prozess zur Herstellung von Lebensmittelfarben zu entwickeln, ist noch ein hoher Optimierungs- und Forschungsaufwand nötig. Zudem sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Reaktionsparameter sowie der eingesetzten PPOs und Laccasen erfolgen, um die Erzeugung definierter Farbextrakte steuern und reproduzieren zu können. Außerdem

müssen die entstandenen Extrakte auf färbende Eigenschaften untersucht werden. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass die Herstellung von Farbextrakten mit den hier eingesetzten Enzymen grundsätzlich möglich ist. Da die Nachfrage für Alternativen zu synthetischen Lebensmittelfarben besteht, ist die Produktion natürlicher Farbstoffe aus Apfeltrester mittels PPOs und Laccasen ein vielversprechender Ansatzpunkt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] A. Downham und P. Collins, „Colouring our foods in the last and next millenium,“ *International Journal of Food Science and Technology*, Volume 35, pp. 5-22, 2000.
- [2] „Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft,“ Informationstechnikzentrum Bund (ITZ Bund), [Online]. Available: https://www.bmel.de/DE/Ernaehrung/Kennzeichnung/kennzeichnung_grafik_node.html. [Zugriff am 5. Dezember 2017].
- [3] M. F. Jacobson, „Carcinogenicity and regulation of caramel colorings,“ *International Journal of Occupational and Enviromental Health*, Volume 18, pp. 254-259, 2012.
- [4] S. Guyot, S. Serrand, J. M. Le Quere, P. Sanoner und C. M. Renard, „Enzymatic sythesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple,“ *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 8, pp. 443-450, 2007.
- [5] M. Fromm, H. M. Loos, S. Bayha, R. Carle und D. R. Kammerer, „Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds,“ *Food Chemistry*, Volume 136, pp. 1277-1287, 2013.
- [6] R. Yoruk und M. R. Marschall, „Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review,“ Institute of Food and Agricultural Sciences, Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, 2003.
- [7] A. G. Mathew und H. A. B. Parpia, „Food Browning as a Polyphenol Reaction,“ *Advances in Food Research*, Volume 19, pp. 75-145, 1971.
- [8] H. Z. Hill, „The function of melanin or six blind people examine an elephant,“ *BioEssays*, Volume 14, pp. 49-56, 1992.
- [9] H. Maki und Y. Morohashi, „Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds,“ *Journal of Plant Physiology*, Volume 163, pp. 1-10, 2006.
- [10] A. M. Mayer, „Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review,“ *Phytochemistry*, Volume 67, pp. 2318-2331, 2006.
- [11] V. Kahn und P. S. H., „Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase,“ *Phytochemistry*, Volume 19, pp. 379-385, 1980.
- [12] F. S. Interesse, P. Ruggiero, G. D'Avelle und F. Lamparelli, „Partial purification and some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase,“ *Science of Food and Agriculture*, Volume 31, pp. 459-466, 1980.

- [13] A. Bijelic, M. Pretzler, C. Molitor, F. Zekiri und A. Rompel, „Kristallstruktur einer pflanzlichen Tyrosinase aus Walnussblättern: Die Bedeutung "substratlenkender Aminosäurereste" für die Enzymspezifität,“ *Angewandte Chemie*, pp. 14889-14893, 2015.
- [14] E. Harel und A. M. Mayer, „Interconversion of sub-units of catechol oxidase from apple chloroplasts,“ *Phytochemistry, Volume 7*, pp. 199-204, 1968.
- [15] A. Jukanti, Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants, Singapur: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2017.
- [16] A. Sanchez-Ferrer, R. Bru und F. Garcia Garmona, „Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton x-114,“ Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Spain, 1989.
- [17] E. I. Solomon, M. D. Lowery, D. E. Root und B. L. Hemming, „Electronic Structures of Active Sites in Copper Proteins and Their Contributions to Reactivity,“ *Advances in Chemistry, Volume 246*, pp. 121-164, 1996.
- [18] V. Hahn und F. Schauer, „Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen,“ *Biospektrum -Heidelberg-, Volume 15*, pp. 526-528, 2009.
- [19] I. Goncalves, C. Silva und A. Cavaco-Paulo, „Ultrasound enhanced laccase applications,“ *Green Chemistry, Volume 17*, pp. 1362-1374, 2015.
- [20] D. M. Mate und M. Alcalde, „Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology,“ *microbial biotechnology, Volume 10*, pp. 1457-1467, 2017.
- [21] E. S. Lago-Vanzela, F. C. Pavezzi, N. Martin, E. Gomes und R. Da Silva, „Isolation and characterisation of latent and active polyphenoloxidase in BRS Clara and BRS Morena seedless table grapes,“ *Plant Physiology and Biochemistry, Volume 49*, pp. 1251-1258, 2011.
- [22] F. S. Nematpour, K. Haghbeen, M. K. Babaei, F. R. Jazii, O. Nouraeen und M. B. Yancheshmeh, „The Banana Pulp Polyphenoloxidase is a Tyrosinase,“ *Journal of Biological Science, Volume 8*, pp. 526-533, 2008.
- [23] F. Daayf, A. El Hadrami, A. F. El-Bebany, M. A. Henriquez, Z. Yao, H. Derksen, I. El-Hadrami und L. R. Adam, „Phenolic Compounds in Plant Defense and Pathogen Counter-defense Mechanisms,“ *Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 3*, pp. 191-208, 2012.
- [24] K. Bhooshan Pandey und S. I. Rizvi, „Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease,“ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2*, pp. 270-278, 2009.

- [25] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy und L. Jimenez, „Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases,“ *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Volume 45*, pp. 287-306, 2005.
- [26] „Naturstoffe & Forschung,“ 31. Mai 2017. [Online]. Available: https://de.naturalproducts.wiki/_detail/wiki/naturstoffe/flavklassen.png?id=flavonoide. [Zugriff am 6. Dezember 2017].
- [27] D. Treutter, „Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis,“ *Plant Biology, Volume 7*, pp. 581-591, 2005.
- [28] M. Ceymann, *Polyphenol content and profile in apples and its potential relevance in human health*, ETH Zürich, 2013.
- [29] M. L. Sudha, V. Baskaran und K. Leelavathi, „Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making,“ *Food Chemistry, Volume 104*, pp. 686-692, 2007.
- [30] C. A. Perussello, Z. Zhang, A. Marzocchella und B. K. Tiwari, „Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds,“ *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Volume 16*, pp. 776-796, 2017.
- [31] O. P. Jones, „Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots,“ *Nature, Volume 262*, pp. 392-393, 1976.
- [32] B. Shapiro, „The mechanism of phloridzin glucosuria,“ *Biochemical Journal, Volume 41*, pp. 151-154, 1947.
- [33] „Wikimedia Commons,“ 3. Februar 2012. [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catechol-Quinone.svg>. [Zugriff am 6. Dezember 2017].
- [34] M. C. Franssen, P. Steunenbergh, E. L. Scott, H. Zuilhof und J. P. M. Sanders, „Immobilised enzyme in biorenewables production,“ *Royal Society of Chemistry, Volume 42*, pp. 6491-6533, 2013.
- [35] S. Loic, F. Denat und D. Monchaud, „Insights into how nucleotide supplements enhance the peroxidase-mimicking DNAzyme activity of the G-quadruplex/hemin system,“ *Nucleic Acids Research*, pp. 1-14, 2012.
- [36] K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm und B. R., „Assesment of antioxidant activity by using different in vitro methods,“ *Free Radical Research, Volume 36*, pp. 177-187, 2002.
- [37] K. F. Tipton und H. B. F. Dixon, „Effects of pH on enzymes,“ *Methods in Enzymology, Volume 63*, pp. 183-234, 1979.

- [38] M. M. Sojo, E. Nunez-Delicado, F. Garcia-Carmona und A. Sanchez-Ferrer, „Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase Using Triton X-114 and PEG 8000 for Removal of Polyphenols,“ *Journal of Agricultural an Food Chemistry, Volume 46*, pp. 4924-4930, 1998.
- [39] U. Gawlik-Dziki, U. Szymanowaska und B. Baraniak, „Characterisation of polyphenol oxidase from broccoli (Brassica oleracea var. botrytis italica) florets,“ *Food Chemistry, Volume 105*, pp. 1047-1053, 2007.
- [40] M. W. Montgomery und V. C. sgarbieri, „Isoenzymes of banana polyphenol oxidase,“ *Phytochemistry, Volume 14*, pp. 1245-1249, 1975.
- [41] E. Valero, R. Varon und F. Garcia-Carmona, „Characterization of Polyphenol Oxidase from Arien Grapes,“ *Journal of Food Science, Volume 53*, pp. 1482-1485, 1988.
- [42] C.-P. Yang, S. Fujita, M. Ashrafuzzaman, N. Nakamura und N. Hayashi, „Purification and Characterization of Polphenol Oxidase from Banana (Musa sapientum L.) Pulp,“ *Journal of Agricultural an Food Chemistry, Volume 48*, pp. 2732-2735, 2000.
- [43] M. U. Ünal, „Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cevendishii),“ *Food Chemistry, Volume 100*, pp. 909-913, 2007.
- [44] G. Rapeanu, A. V. Loey, C. Smout und M. Hendrickx, „Bichemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (Vitis vivifera ssp. Sativa),“ *Food Chemistry, Volume 94*, pp. 1619-1625, 2006.

Anhang

Datenblätter der Laccasen

Laccase A

Spezialenzyme für Analytik und Synthesen Produktinformation		
Laccase A		
Benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2		
Beschreibung:	Enzymgemisch zur Polymerisation und Entfernung von phenolischen Substanzen. Polyphenoloxidase oxidiert ortho- und para-Diphenole zu den entsprechenden Chinonen und Phenoxyradikalen, welche spontan polymerisieren und aus der Lösung ausgefällt werden.	
Herkunft:	Agaricus bisporus	
Aktivität:	1 500 U/g (Substrat: Brenzkatechin), > 1.5 U/g (Substrat: Syringaldazin); > 60 U/mg Protein; (Lyophilisat)	
Substratspezifität	Laccase A setzt eine große Anzahl von Substraten um, z.B. Brenzkatechin, 2,6-Dimethoxyphenol, Syringaldazin	
	Substrat	Relative Aktivität (%)
	p-Phenylendiamin	100
	N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin	94
	Gulaccol	72
	Pyrogallol	62
	1-Naphtol	60
	Katechin	26
	Ascorbinsäure	16
	Phloroglucinol	8
Inhibitoren:	Das Enzym wird von verschiedenen metallbindenden Reagenzien und Detergenzien gehemmt	
	Substrat	Relative Aktivität (%)
	Na-Azid (1 mM)	100
	Na-Azid (0.1 mM)	90
	KCN (1 mM)	100
	KCN (0.1 mM)	96
	Cetylpyridiniumbromid (1 mM)	87
	Cetylpyridiniumbromid (0.1 mM)	5
	Cetyltrimethylammoniumbromid (1 mM)	80
	Cetyltrimethylammoniumbromid (0.1 mM)	8
	EDTA (1 mM)	26
	EDTA (0.1 mM)	5
ASA Spezialenzyme GmbH	Tel.: +49 (0)5331 8825-30	E-Mail: service@asa-enzyme.de
Am Exer 19 C	Fax: +49 (0)5331 8825-32	Internet: www.asa-enzyme.de
D-38302 Wolfenbüttel		Seite 1 / 2
Germany		Stand: 09/2015

Spezialenzyme für Analytik und Synthesen
Produktinformation



Anwendung:	Ausfällung von phenolischen Substanzen Enzymatische Bräunung von Lebensmitteln (Kakao, Kaffee u.a.) Verklebung von Spanplatten Veränderung der Elastizität und Konsistenz von Pasten, Gummistoffen, Dispersionsmitteln, Phenolharzen Herstellung von Mikrobiziden Analytik von Phenolen
Reaktionsparameter:	pH-Wert Optimum: 5,6, aktiv im Bereich pH 2,5 – 8,5 Temperatur Optimum: 50 - 60°C, aktiv im Bereich 15 – 70°C
Bestellnr.:	2025
Lieferform:	Lyophilisat
Lagerung:	kühl lagern, -20°C Lagerstabilität: 6 Monate stabil bei -20°C
Literatur:	[1] Wood, D.A., (1979), J. Gen. Microbiol., 117 , 327-338 [2] Wrigley, S.K., Gibson, J.F., (1987), Biochim. Biophys. Acta, 916 , 259-264

ASA Spezialenzyme GmbH
 Am Exer 19 C
 D-38302 Wollenbüttel
 Germany

Tel.: +49 (0)5331 8825-30
 Fax: +49 (0)5331 8825-32

E-Mail: service@asa-enzyme.de
 Internet: www.asa-enzyme.de
 Seite 2 / 2
 Stand: 09/2015

Laccase C

Spezialenzyme für Analytik und Synthesen
Produktinformation



Laccase C

Benzendiol: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2

Beschreibung:	Enzymgemisch zur Umsetzung von phenolischen Verbindungen in huminstoffähnlichen Polymeren. Laccase oxidiert ortho- und para-Diphenole zu den entsprechenden Chinonen und Phenoxyradikalen, welche spontan polymerisieren und aus der Lösung ausgefällt werden.
Herkunft:	Trameles spec.
Aktivität:	1 000 U/g (Substrat: Syringaldazin), > 400 U/g (Substrat: Brenzkatechin); > 45 U/mg Protein
Substratspezifität:	Laccase C setzt eine große Anzahl von phenolischen (auch halogeniert) Substraten um
Anwendung:	Ausfällung von phenolischen Substanzen Enzymatische Bräunung von Lebensmitteln (Kakao, Kaffee u.a.) Verklebung von Spanplatten Veränderung der Elastizität und Konsistenz von Pasten, Gummistoffen, Dispersionsmitteln, Phenolharzen Analytik von Phenolen
Reaktionsparameter:	pH-Wert Optimum: 5,0, aktiv im Bereich pH 3,0 – 7,5 Temperatur Optimum: 70°C, aktiv im Bereich 20 – 80°C
Bestell-Nr.:	2020
Lieferform:	hellbraunes Pulver
Lagerung:	kühl lagern, 4 – 6°C
Literatur:	Wood, D.A., (1979), J. Gen. Microbiol., <u>117</u> , 327-338

ASA Spezialenzyme GmbH
Am Esen 19 C
D-38302 Wolfenbüttel
Germany

Tel.: +49 (0)5331 8825-30
Fax: +49 (0)5331 8825-32

E-Mail: service@asa-enzyme.de
Internet: www.asa-enzyme.de

Seite 1 / 1
Stand: 09/2016

Laccase F

Spezialenzyme für Analytik und Synthesen
Produktinformation



Laccase F

Benzendiol: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2

Beschreibung:	Enzymgemisch zur Umsetzung von phenolischen Verbindungen in huminstoffähnlichen Polymeren. Laccase oxidiert ortho- und para-Diphenole zu den entsprechenden Chinonen und Phenoxyradikalen, welche spontan polymerisieren und aus der Lösung ausgefällt werden.
Herkunft:	Trameles trogl.
Aktivität:	> 60 000 U/g (Substrat: ABTS), > 10 000 U/g (Substrat: Syringaldazin); > 100 U/mg Protein
Substratspezifität:	Laccase F setzt eine große Anzahl von phenolischen (auch halogeniert) Substraten um
Anwendung:	Ausfällung von phenolischen Substanzen Erzymatische Bräunung von Lebensmitteln (Kakao, Kaffee u.a.) Verklebung von Spanplatten Veränderung der Elastizität und Konsistenz von Pasten, Gummistoffen, Dispersionsmitteln, Phenolharzen Analytik von Phenolen
Stabilität:	Hohe Stabilität bei Temperaturen < 45°C
Reaktionsparameter:	pH-Wert Optimum: < 3,0, aktiv im Bereich pH 2,5 – 7,0 Temperatur Optimum: 55°C, aktiv im Bereich 20 – 70°C
Bestell-Nr.:	2035
Lieferform:	dunkelbraunes Pulver
Lagerung:	kühl lagern, 4 – 6°C
Literatur:	Ming-Qiang AI, (2015), J. Microbiol. Biotechnol., <u>25(8)</u> , 1361-1370

ASA Spezialenzyme GmbH
Am Exer 19 C
D-38302 Wolfenbüttel
Germany

Tel.: +49 (0)5331 9825-30
Fax: +49 (0)5331 9825-32

E-Mail: service@asa-enzyme.de
Internet: www.asa-enzyme.de

Seite 1 / 1
Stand: 02/2017