©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Horn, Austria)	**Vol. 33**	Fasc. 2	211–219	16. 2. 1994

Nachweis der Myrosinase (ß-Thioglucosidase) heimischer *Brassicaceae* unter Verwendung der Elektrophorese und der Eisen(II)-Schwefel-Detektion

Von

Helmut REINER und Robert EBERMANN*)

Mit 2 Abbildungen

Eingelangt am 18. September 1992

Angenommen am 7. Dezember 1992

Key words: *Brassicaceae,* myrosinase, myrosinase of leaves, isoenzymes, PAGE, iron(II)-sulphur-detection of myrosinase.

Summary

REINER H. & EBERMANN R. 1994. Detection of myrosinase (Thioglucoside Glucohydrolase) of indigenous *Brassicaceae* by use of electrophoresis and Fe(II)-S-detection. - Phyton (Horn, Austria) 33 (2): 211–219, with 2 figures. - German with English summary.

In the presence of Fe(II)-ions the glucosinolates from the leaves of *Brassicaceae* are degraded by myrosinase to nitriles and sulphur. On polyacrylamide the myrosinase was separated by electrophoresis, followed by Fe(II)-S-detection. Thus myrosinase of wild growing *Brassicaceae,* mainly from pannonic climate area of Austria, was made visible.

Zusammenfassung

REINER H. & EBERMANN R. 1994. Nachweis der Myrosinase(ß-Thioglucosidase) heimischer *Brassicaceae* unter Verwendung der Elektrophorese und der Fe(II)-S-Detektion. - Phyton (Horn, Austria) 33 (2): 211–219, mit 2 Abbildungen. - Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

In Anwesenheit von Fe(II)-Ionen werden die Glucosinolate aus den Blättern von *Brassicaceae* durch die Myrosinase zu den Nitrilen abgebaut, wobei Schwefel frei wird. Auf Polyacrylamidgel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der

*) Dipl.-Ing. H. REINER und Univ.-Prof. Dr. R. EBERMANN, Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur, Arbeitsgruppe für Lebensmittel-, Umwelt- und Naturstoffchemie, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien, Austria.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Myrosinase und die Fe(II)-S-Detektion im Inkubationsbad. Die Myrosinase wildwachsender Cruciferen, vor allem aus dem pannonischen Klimagebiet Österreichs, wurde nachgewiesen.

Einleitung

Abkürzungen: GSL Glucosinolat, ITC Isothiocyanat, TC Thiocyanat, CN Nitril siehe die Formeln am Ende der Einleitung.

Die Myrosinase ist eine ß-Thioglucosidase (EC 3.2.3.1.) und somit spezialisiert auf den Abbau der Glucosinolate (GSLe), einer Verbindungsklasse, die charakteristisch ist für die *Brassicaceae*. Das Enzym kommt in allen Organen der Pflanze vor, ist aber in den Samen am besten untersucht. Eine gereinigte Myrosinase von *Brassica napus* – Samen hatte ein Molekulargewicht von 135.000. Die hervorstechendste Eigenschaft der Myrosinase ist die starke Aktivierbarkeit durch Ascorbinsäure, die beinahe die Rolle eines Coenzyms erfüllt. Je nach Reaktionsbedingungen kann die Myrosinase ein GSL in das entsprechende Isothiocyanat (ITC), das Thiocyanat (TC) oder das Nitril (CN) umsetzen (siehe die Formeln am Ende der Einleitung. Es ist besser, die Nachsilbe -cyanid statt -nitril zu verwenden, da sich dann die Nomenklatur des Restes nicht ändert. Allylcyanid wäre 3-Butenylnitril). Der Einfluß von Fe(II)-Ionen auf den enzymatischen Abbau der GSLe ist für die Detektion der Myrosinase von größtem Interesse (FENWICK & al. 1982). AUSTIN & GENT 1967 zeigten, daß Fe(II)-Ionen in 8-molarem Überschuß das 2-Hydroxy-3-butenyl-GSL selbst in Abwesenheit eines Enzyms teilweise in das entsprechende Nitril umsetzen. YOUNGS & PERLIN 1967 beschrieben die fast quantitative Entstehung von Allyl-CN aus Allyl-GSL durch 15minütiges Erhitzen auf 95° C in Anwesenheit von Fe(II). Da keine äquimolare Konzentration notwendig war, konnte die Wirkung des Fe(II) nur katalytisch sein. AUSTIN & al. 1968 fanden einen direkten Einfluß von Fe(II) auch auf den enzymatischen Abbau von 2-Hydroxy-3-butenyl-GSL. Bei pH 5,3 entstanden mit Myrosinase in Anwesenheit von katalytischen Mengen von Fe(II) die entprechenden Nitrile. TOOKEY & WOLFF 1970 beschrieben diesen Zusammenhang noch genauer. Die Zugabe von Fe(II) zu der gereinigten Myrosinase von *Crambe abyssinica* führte zur Bildung von 2-Hydroxy-3-butenyl-cyanid aus 2-Hydroxy-3-butenyl-GSL über einen weiten pH-Bereich (3,9 bis 6,7). HASAPIS & MACLEOD 1982 untersuchten den Einfluß von Fe(II) auf den Abbau des Benzyl-GSL in den Samen-Autolysaten von *Lepidium sativum*. Mit steigenden Fe(II)-Konzentrationen wird prozentuell immer mehr Nitril aus Benzyl-GSL gebildet.

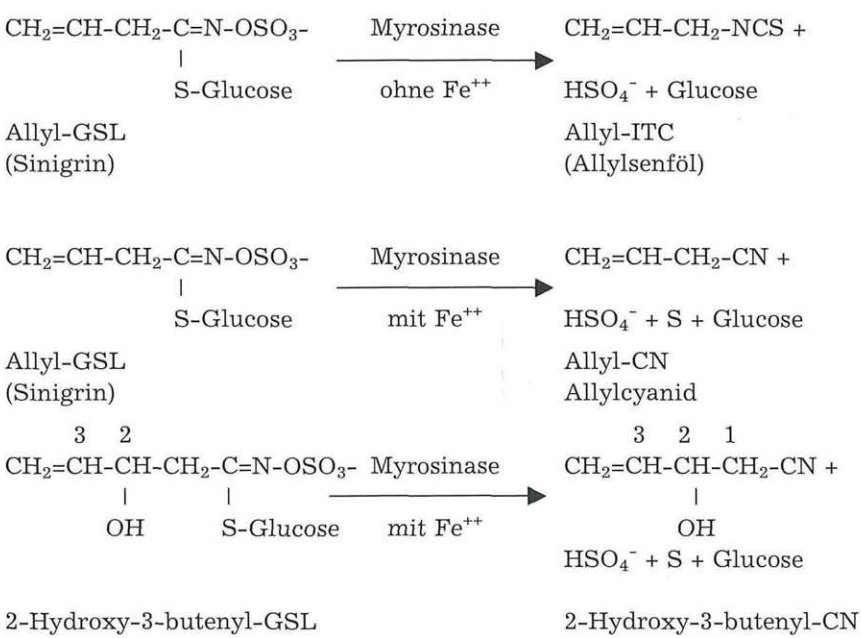
Aus Benzyl-GSL entstand:	Benzyl-CN	Benzyl-TC	Benzyl-ITC
ohne Fe(II)	67,2 %	15,8 %	17,0 %
mit Fe(II)($6x10^{-3}$M)	89,6 %	9,9 %	0,5 %
mit Fe(II)($5x10^{-1}$M)	96,5 %	3,2 %	0,3 %

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Diesen deutlichen Effekt zeigen MacLeod & Rossiter 1985 auch für den Abbau des 2-Hydroxy-3-butenyl-GSL durch den Samenextrakt von *Brassica napus*. Mit steigender Fe(II)-Zugabe zum Autolysemedium nahm auch hier die Bildung der Nitrile zu. Bei einer Konzentration von $6x10^{-9}$ M und darüber wurden nur mehr Nitrile gebildet:

Fe(II)-Zugabe	5-Vinyloxazolidin-2-thion	Nitrile
0 M	54,3 %	45,7 %
6×10^{-11}M	21,8 %	78,2 %
6×10^{-10}M	9,0 %	91,0 %
6×10^{-9}M	–	100 %
6×10^{-8}M	–	100 %

Die folgenden Formeln erklären das Prinzip der beschriebenen Reaktionen:



Es wird also beim Glucosinolat-Abbau durch die Myrosinase in Anwesenheit von Fe(II) neben dem Nitril auch Schwefel freigesetzt. Dieses Prinzip wendete MacGibbon 1975 zur Detektion der Myrosinase am Gel an. Der entstehende Schwefel setzt sich als fein kolloidaler Niederschlag im Gel ab. Die Anwendung dieses Reagens für die Detektion der Myrosinasen verschiedener Brassica-Arten zeigte in der Arbeit von MacGibbon 1975 deutliche Myrosinasemuster.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

In unserer Arbeit werden wildwachsende Brassicaceen, die vor allem im pannonischen Raum Österreichs gesammelt wurden, mit der Detektionsmethode von MACGIBBON 1975 untersucht.(siehe auch: REINER 1987)

Material und Methoden

a) Pflanzenmaterial: Die frisch gesammelten Blätter wurden in Plastiksäckchen aufbewahrt. Die Bestimmung der Pflanzen erfolgte nach SCHMEIL-FITSCHEN 1973. Die Nomenklatur und Reihung in der Pflanzenliste wurden daher auch nach diesem Florenwerk durchgeführt. Herbarbelege wurden aufbewahrt.

b) Probenvorbereitung: Von den frischen Blättern der Cruciferen wurde jeweils 1 g mit 1 ml Puffer in der Reibschale verrieben. Nach Zentrifugation bei 9000 U/min (r = 7 cm) wurde die Lösung in andere Röhrchen pipettiert und konnte so bis zu 3 Wochen für die Bestimmung der Myrosinase gekühlt bei 4° C aufbewahrt werden.

c) Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE): Für die Auftrennung der Enzyme wurde eine Blockelektrophorese nach Raymond 1962 verwendet, welche von EBERMANN UND BODENSEHER 1968 weiterentwickelt wurde. Folgende Gelzusammensetzungen erwiesen sich für die Auftrennung der Enzyme am besten geeignet:
Sammelgel: 0,5%ig, 1:6 vernetzt
Trenngel: 10%ig, 1:75 vernetzt

d) Elektrophoresepuffer: 3 g Trihydroxymethylaminomethan und 14,4 g Glycin mit destilliertem Wasser auf 2 l aufgefüllt.

e) Auftrennung: Die Trennung erfolgte bei Gleichstrom, 300 V und 90 mA. Sie wurde nach etwa 5 h bei einer Wanderung der Front von 10 cm beendet.

f) Detektion: Nach der Elektrophorese wurde das Gel $^1/_2$ h in fließendem Wasser gewaschen und dann in die Inkubationslösung gelegt. Die folgenden Reagentien für die Detektion wurden in 0,1 N Essigsäure/Natriumacetatpuffer (pH = 5,5) gelöst:

Sinigrin	2 mg/ml
Ascorbinsäure	2 mM = 0,5 mg/ml
$FeCl_2.4H_2O$	$6x10^{-3}$ M (1,2 mg/ml)

Für die Entwicklung der Myrosinasereaktion wurden die Bäder mit dem Gel bei 40° C inkubiert. Die Banden erscheinen schon nach etwa 10 min dunkel und hellen sich langsam auf. Nach einigen Stunden ist die Tönung weiß. Das Foto zeigt das Gel nach 10minütiger Inkubationszeit. Nach dieser Zeit sind die Zonen und Banden am besten zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussionen

Mit Hilfe der empfindlichen Detektionsmethode von MACGIBBON 1975 war es möglich, die Aktivität der Myrosinase-Isoenzyme und ihre Isoenzymmusterung in den Blättern von 30 wildwachsenden Cruciferenarten sichtbar zu machen. Bisher waren bei wildwachsenden Cruciferen hauptsächlich die Substrate der Myrosinase, also die Glucosinolate, untersucht worden (Cole 1976).

Abbildung 1 zeigt das Ergebnis aller untersuchten Cruciferenarten in einer graphischen Zusammenstellung. Bei einer Wanderung der Front von

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

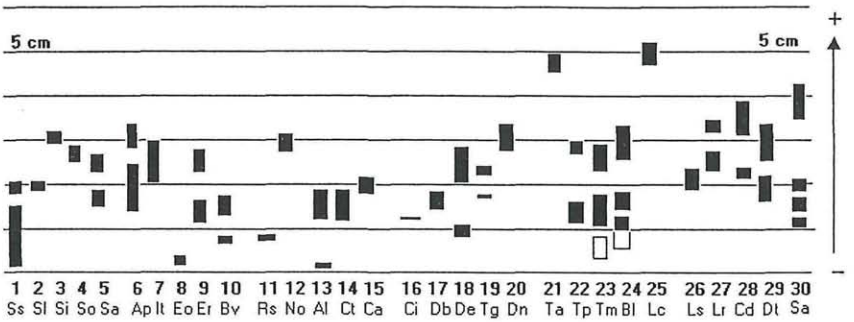


Abbildung 1: Zusammenstellung der Myrosinasemuster, Pflanzen in der folgenden Liste.

10 cm wanderten die Isoenzyme mit dem niedrigsten Molekulargewicht bis zu 5 cm (Nr 25, Nr21). Viele Pflanzen hatten ein sehr reich strukturiertes Muster (Nr 23, Nr 24, Nr 30). Die Graphik wurde entsprechend der elektrophoretischen Mobilität der in der Pflanzenliste aufgeführten

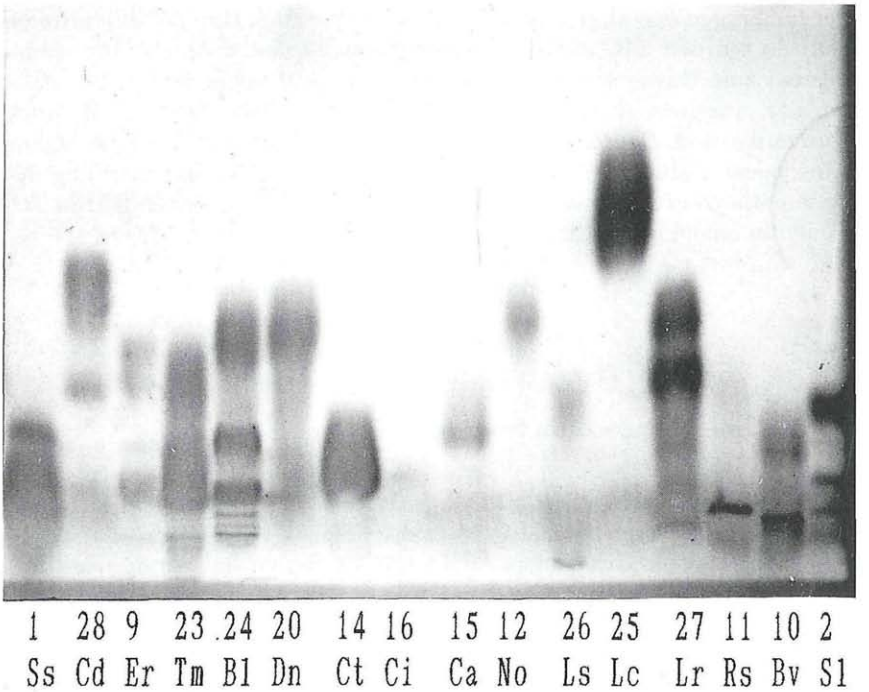


Abbildung 2: Fotographie eines Geles nach 10minütiger Inkubationszeit in Originalgröße, Pflanzen in der folgenden Liste.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Individuen zusammengestellt. Besonderheiten werden in der Liste für die jeweiligen Pflanzen kommentiert.

In Abbildung 2 wird das Foto eines Geles mit den Myrosinase-Mustern von Pflanzen von 2 Aufsammlungen vorgestellt. Die Muster sind eindeutig den Arten zuzuordnen und klar wiederzuerkennen. Vorkommende Abweichungen von der Reproduzierbarkeit können wie folgt erklärt werden:

Im Lebenslauf der Pflanze ist die Aktivität der Myrosinase nicht konstant. Die deutlichsten und stärksten Muster sind in den Blättern junger Pflanzen zu finden. Die Banden mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität sind immer nachweisbar. Die Anwendung der Myrosinasemuster als Ordnungsprinzip für die Systematik müßte in größeren Untersuchungen bearbeitet werden. Die Myrosinase ist gegenüber den ca. 100 Glucosinolaten sehr unspezifisch. Daher ist es möglich, mit einem Substrat, dem Sinigrin, die Myrosinase in Pflanzen nachzuweisen, in denen Sinigrin nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorkommt. Ökologische Einflüsse könnten auf die Musterung ebenfalls einen großen Einfluß haben. Diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Trotz dieser Einschränkungen könnten die Myrosinase-Isoenzymmuster für Fragen der Abgrenzung von Arten (oder auch Unterarten) hilfreich sein. So wurden z.B. von der Gattung *Sisymbrium* 5 Arten untersucht. Gemeinsame Muster ergaben sich nicht, aber die Myrosinase-Isoenzymmuster der einzelnen Arten waren gut zu reproduzieren (Nr 1 bis 5). Auch *Cardamine* und *Dentaria,* zwei nahestehende Gattungen, zeigten keine gemeinsamen Muster (Nr 14 bis 18). Für eine weitere Untersuchung der Systematik wäre es sinnvoll, die Samen der Pflanzen zu verwenden, da sich Samen in einem einheitlichen Endreifestadium befinden.

Liste der untersuchten Pflanzen:

Die Liste der untersuchten Pflanzen enthält folgende Angaben:

* laufende Nummer
* Abkürzung und vollständiger botanischer Name (Nomenklatur nach SCHMEIL-FITSCHEN 1973)
* Fundorte und Datum der Funde
* Wachstumsstadium: J junge Pflanze vor der Blüte
  A Anfang der Blüte
  H Hochblüte
  E Ende der Blüte
  V verblühte Pflanze

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

1 Ss *Sisymbrium strictissimum* L., Steife Rauke
a) Eichkogel bei Mödling, 11.5.85, J, siehe Foto
b) selber Fundort, 2.6.92, J

2 Sl *Sisymbrium loeselii* Jusl., Loesels Rauke
a) bei Essling, 19.5.85, A, siehe Foto
b) Mödling, 2.6.92, H
Bei a konnte zusätzlich noch eine fein strukturierte Zone gefunden werden, siehe Foto.

3 Si *Sisymbrium irio* L., Schlaffe Rauke
a) Peter-Jordan-Str., Wien, 5.7.85, H
b) am Donaukanal, Wien, 25.5.92, H

4 So *Sisymbrium orientale* Torn., Orientalische Rauke
a) Mödling, 6.7.85, H
b) Gumpoldskirchen, 2.6.92, H

5 Sa *Sisymbrium altissimum* L., Ungarische Rauke
a) Donauinsel, 7.7.85, V
b) Essling, 22.5.92, H

6 Ap *Alliaria petiolata* (Bieb.) Cavara und Grande, Gemeine Knoblauchsrauke
a) Mödling, 30.4.85, H
b) Hocheck, 3.6.92, H

7 It *Isatis tinctoria* L., Färber-Waid
Simmering, Wien, 4.7.85,V

8 Eo *Erysimum odoratum* Ehrh., Wohlriechender Schöterich
Leithagebirge, 2.6.92, H

9 Er *Erysimum repandum* Höjer, Sperriger Schöterich
Essling, 12.5.85, V, siehe Foto

10 Bv *Barbarea vulgaris* R.Br., Echtes Barbenkraut
Hocheck im Wienerwald, 18.5.85, H, siehe Foto

11 Rs *Rorippa sylvestris* (L.)Bess., Wald-Sumpfkresse
Donauinsel, Wien, 29.5.85, H, siehe Foto

12 No *Nasturtium officinale* R.Br., Echte Brunnenkresse
kultiviert aus einem Garten bei Mödling, 29.5.85, H, siehe Foto

13 Al *Armoracia lapathifolia* Usteri, Kren
a) Gießhübl bei Wien, 30.4.85, J
b) Praterbrücke, Wien, 14.6.92, V

14 Ct *Cardamine trifolia* L., Klee-Schaumkraut
a) Hocheck im Wienerwald, 18.5.85, H, siehe Foto
b) Hocheck im Wienerwald, 3.6.92, V

15 Ca *Cardamine amara* L., Bitteres Schaumkraut
a) Lackenbach im Burgenland, 26.5.85, H, siehe Foto
b) bei Altenmarkt im Wienerwald, 3.6.92, H

16 Ci *Cardamine impatiens* L., Spring-Schaumkraut
Lackenbach im Burgenland, 26.5.85, V, siehe Foto

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

17 Db *Dentaria bulbifera* L., Zwiebel-Zahnwurz
Hocheck im Wienerwald, 18.5.85, H

18 De *Dentaria enneaphyllos* L., Weiße Zahnwurz
a) Hocheck im Wienerwald, 18.5.85, H
b) Hocheck im Wienerwald, 3.6.92, V

19 Tg *Turritis glabra* L., Kahles Turmkraut
Ödenburger Gebirge, Burgenland, 26.5.85, H

20 Dn *Draba nemorosa* L., Hain-Felsenblümchen,
bei Essling, Wien, 12.5.85, V, siehe Foto

21 Ta *Thlaspi arvense* L., Acker-Hellerkraut
a) bei Mödling, 30.4.85, J
b) bei Breitenbrunn im Burgenland, 2.6.92, A

22 Tp *Thlaspi perfoliatum* L., Stengelumfassendes Hellerkraut
bei Mödling, 30.4.85, H

23 Tm *Thlaspi mantanum* L., Berg-Hellerkraut
a) Mödlinger Klause, 11.5.85, H, siehe Foto
b) Mödlinger Klause, 2.6.92,V
Bei Probe a wurde noch eine fein strukturierte Zone ganz am Anfang gefunden (nicht ausgefülltes Rechteck in der Graphik).

24 Bl *Biscutella laevigata* L., Glattches Brillenschötchen
a) Mödlinger Klause, 11.5.85 ,H, siehe Foto
b) Mödlinger Klause, 2.6.92, V
Bei Probe a sind nahe dem Start noch fein strukturierte Banden zu sehen (nicht ausgefülltes Rechteck in der Graphik).

25 Lc *Lepidium campestre* (L.) R.Br., Feld-Kresse
Ödenburger Gebirge, Burgenland, 26.5.85, V, siehe Foto, zeigt die am weitesten gewanderte Bande von allen untersuchten Pflanzen bei 5 cm.

26 Ls *Lepidium sativum* L., Garten-Kresse
junge Pflänzchen aus Holland vom Markt, 1985, J, siehe Foto

27 Lr *Lepidium ruderale* L., Stink-Kresse
Lackenbach im Burgenland, 26.5.85, V, siehe Foto

28 Cd *Cardaria draba* (L.) Desv., Gemeine Pfeilkresse
a) bei Essling, Wien, 12.5.85, H, siehe Foto
b) bei Essling, Wien, 2.6.92, V

29 Dt *Diplotaxis tenuifolia* (Jusl.) DC, Schmalblättriger Doppelsame
a) Mödling, 11.5.85, A
b) Mödling, 2.6.92, A

30 Sa *Sinapis alba* L., Weißer Senf
Samen in einem Kistchen gezogen, 1985, J

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

AUSTIN F.L.& GENT C.A. 1967. (S)-3-Hydroxypent-4-enethionamide: A new reaction product of a natural thioglucoside. - Chem.Comm.:(2),71-72.

AUSTIN F.L., GENT C.A. & Wolff I.A. 1968. Enantiomeric 3-hydroxypent-4-enethionamides from thioglucosides of *Crambe* and *Brassica* seeds by action of ferrous salts. - Can.J.Chem. 46: 1507-1512

COLE R.A. 1976. Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. - Phytochemistry 15: 759-762.

EBERMANN R. & BODENSEHER H. 1968. Bestimmung der Transferrintypen bei Rindern durch vertikale Polyacrylamidgel-Elektrophorese. - Experientia 24: 523-524.

FENWICK G.R., HEANEY R.K.& MULLIN W.J. 1982. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. - CRC Crit.Rev.Food Sci.Nutr. 18: 123-201.

HASAPIS X. & MACLEOD A.J. 1982. Effects of metal ions on benzylglucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed autolysates. - Phytochemistry 21: 559-563.

MACGIBBON D.B. 1975. An improved reagent for detecting glucosinolase activity in acrylamide gel electropherograms. - New Zealand J.Sci 18: 217-219.

MACLEOD A.J.& ROSSITER J.T. 1985. The occurence and activity of epithiospecifier protein in some *Cruciferae* seeds. - Phytochemistry 24: 1895-1898.

RAYMOND S. 1962. A convenient apparatus for vertical gel electrophoresis. - Clin.Chem. 8: 455-470.

REINER H. 1987. Elektrophoretische Untersuchungen zum Glucosinolase-Glucosinolatsystem in *Brassicaceae* (Cruciferen). - Diplom Arbeit, Universität für Bodenkultur, Wien

SCHMEIL-FITSCHEN 1973. Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten, Heidelberg

TOOKEY H.L. & WOLFF I.A. 1970. Effect of organic reducing agents and ferrous ion on thioglucosidase activity of *Crambe abyssinica* seed. - Can.J.Biochem. 48: 1024-1028.

YOUNGS C.G. & PERLIN A.S. 1967. Fe(II)-catalyzed decomposition of sinigrin and related thioglycosides. - Can.J.Chem. 45: 1801-1804.

Phyton (Horn, Austria) 33 (2): 219–220 (1994)

Recensio

GHAZANFAR Shahina A. 1992. An Annotated Catalogue of the Vascular Plants of Oman and their Vernacular Names. – In: Scripta Botanica Belgica, 2. – Lex. 8°, 153 Seiten, 2 Abb.; kart. – National Botanic Garden of Belgium, B-1860 Meise. – BeF 1850,–. – ISBN 90-72619-08-0.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1994

Band/Volume: 33_2

Autor(en)/Author(s): Reiner Helmut, Ebermann Robert

Artikel/Article: Nachweis der Myrosinase (ß-Thioglucosidase) heimischer Brassicaceae unter Verwendung der Elektrophorese und der Eisen (II)-Schwefel-Detektion. 211-219