Der „Apfeltest“ zum qualitativen Nachweis von Oxydasewirkungen

Von

Ingrid URSCHLER

Aus dem Werkschulheim Felbertal, Post Mittersill, Salzburg

Eingelangt am 26. August 1958

Wenn frische Schnittflächen von Pflanzenteilen in der Luft eine braune Farbe annehmen, so wird dies allgemein darauf zurückgeführt, daß phenolartige Substanzen durch Phenoloxidasen zu Melaninen oxydiert werden. Als Substrate kommen u. a. in Frage: Phenol, Tyrosin, p-Kresol, m-Kresol, Brenzcatechin, 3,4-Diphenylalanin etc. Es gibt mehrere Phenoloxidasen (Mono-, Di-, Polyphenoloxidasen), von denen einige hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften und Spezifität recht genau erforscht sind. Die chemische Zusammensetzung der Melanine, der braun bis schwarz gefärbten Endprodukte dieser Reaktionen, ist noch nicht näher bekannt.

In Pflanzen und Tieren sind die Phenoloxidasen weit verbreitet. Sie verlieren in Extrakten leider rasch ihre Wirksamkeit. Die üblichen Nachweisverfahren beruhen darauf, daß man dem zu prüfenden Extrakt eine bestimmte Substratmenge zusetzt, und nach Ablauf einer gewissen Zeit entweder die Menge des verbrauchten Substrates oder die durch die Oxydation aufgetretene Farbänderung bestimmt. Als beste Methode wird die Bestimmung der Sauerstoffabsorption im Warburgapparat angegeben.

Phenole können auch durch die unspezifischen Peroxydasen oxydiert werden; dabei wird der Sauerstoff Peroxyden, z. B. H_2O_2 entnommen, die Anwesenheit von Luftsauerstoff ist nicht erforderlich (BELOSERSKI & PROSKURJAKOW 1956, HOFFMANN-OSTENHOF 1954).

Zur Bestimmung der Peroxydaseaktivität muß den Extrakten außer einem geeigneten Substrat (meist wird Pyrogallol verwendet) noch eine geringe Menge H_2O_2 zugesetzt werden. Im übrigen verfährt man genau so wie beim Phenoloxydase-Nachweis. „Es muß allerdings betont werden, daß oftmals die Unterscheidung der Phenoloxidasen von anderen Fermenten, die ebenfalls die Substrate des Fermentes oxydieren, wie z. B. den unspezifischen Peroxydasen, auf Schwierigkeiten stößt.“ (HOFFMANN-OSTENHOF 1954).

Will man bei gleichzeitiger Anwesenheit von Phenoloxidasen, Peroxydase und Katalase im Extrakt nur die Peroxydase nachweisen, so muß man unter Sauerstoffausschluß arbeiten. Dazu gehört auch eine Inaktivierung der Katalase, die durch Spaltung von H_2O_2 freien Sauerstoff erzeugt. Nach BELOSERSKI & PROSKURJAKOW 1956 wird die Katalase-

wirkung nach Zusatz von 1 Mol NaNO_3 -Lösung und einer Pufferlösung von pH 5,3 ausgeschaltet.

Das klassische Beispiel der Lehrbücher für die durch Phenoloxidasen bewirkte Oxydation von Phenolderivaten zu Melaninen ist das Braunwerden angeschnittener Äpfel oder Kartoffeln an der Luft. Beide Organe enthalten sowohl Phenoloxidasen als auch die notwendigen Substrate. Im Moment des Zerschneidens kommt noch der Luftsauerstoff als dritte notwendige Bedingung für den Reaktionseintritt hinzu. Fehlt eine einzige dieser drei Bedingungen, also entweder der Sauerstoff, oder das Ferment, oder das Substrat, so unterbleibt die Reaktion. Man legt bekanntlich geschälte Äpfel oder Kartoffeln unter Wasser, um die Braunfärbung zu verhindern. Noch besser kann man die ursprüngliche Farbe bewahren, wenn man die angeschnittenen oder geschälten Äpfel oder Kartoffeln rasch in einen völlig sauerstofffreien Raum bringt, etwa in ein dicht schließendes Gefäß mit etwas alkalischer Pyrogallollösung. Bringt man die Pflanzen nach einiger Zeit wieder in normale Luft, so nehmen sie rasch eine braune Farbe an. Die zweite notwendige Bedingung, die Fermente, kann man durch kurzes Erhitzen der Versuchspflanzen (z. B. in einem Wasserbad von Siedetemperatur) ausschalten. Theoretisch müßte eine Braunfärbung eintreten, wenn man den so behandelten Geweben das Ferment nachträglich wieder zuführt. Fehlt einer Pflanze die dritte der notwendigen Bedingungen, nämlich ein geeignetes Substrat, so kann sie sich trotz Anwesenheit von Ferment und Sauerstoff nicht braun färben, es sei denn, man führt ihr von außen her phenolartige Substrate zu.

Auf Grund dieser einfachen Überlegung kann man mit Gemüsepflanzen, die sich an der Luft normalerweise nicht verfärben, einige hübsche Versuche anstellen. Streicht man auf frische Schnittflächen von Kohlrabi, Karfiol, Kren usw. in dünner Schicht einen Brei von gekochten Äpfeln auf, so kann man nach mehreren Stunden eine deutliche Braunfärbung der Schnittflächen beobachten. Werden die Versuchsobjekte vor dem Aufstreichen des Apfelbreies durch Erhitzen getötet, so unterbleibt die Braunfärbung. Besonders eindrucksvoll ist es, nur ein Stück einer größeren Schnittfläche durch kurzes Auflegen eines heißen Metallgegenstandes abzutöten. Diese Stelle färbt sich nach dem Aufstreichen des Breies nicht braun, sondern hebt sich mit scharfen Grenzen von der dunkel werdenden Umgebung ab. Streicht man auf einer nicht mit Hitze behandelten Fläche den Apfelbrei so dick auf, daß der Sauerstoff keinen Zutritt hat, so bleibt diese Stelle hell, dunkelt aber nach, sobald man den Überschuß an Apfelbrei entfernt.

Gießt man sehr verdünntes wässriges Apfelmus in flache Schalen aus und legt über Nacht kleine Stücke von Kohlrabi, Kren usw. so hinein, daß sie zur Hälfte über den Flüssigkeitsspiegel emporragen, so sind am nächsten Morgen besonders die in die Luft ragenden Schnittflächen braun gefärbt; die untergetauchten Partien sind z. T. ganz hell geblieben. Überschichtet man dünnflüssigen wässrigen Apfelbrei in einem höheren Gefäß

mit Öl, und befestigt die Gewebstückchen der Versuchspflanzen darin so, daß sie ständig ganz untergetaucht sind, so tritt anfangs keine, nach 1 bis 2 Tagen höchstens eine sehr schwache Reaktion ein. (Ein völliger Sauerstoffausschluß ist bei dieser Versuchsanordnung ja nicht möglich). Wurde das Material zuvor durch Einlegen in Alkohol abgetötet, so war die Reaktion — bei freiem Zutritt von Luftsauerstoff — nicht gehemmt.

Bei Verwendung einer verdünnten wässrigen Lösung von Brenzcatechin anstelle von Apfelsmus wurden in allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

Die dabei auftretende Färbung ist, im Gegensatz zur ausgesprochenen Braunfärbung mit Äpfeln, anfangs ein Rosabraun, das später stark nachdunkelt. Anstelle von Apfelsmus kann man natürlich auch Brei von gekochten Kartoffeln verwenden, die Reaktionen fallen dabei aber schwächer aus.

Nach HOFFMANN-OSTENHOF 1954 wird die Wirksamkeit von Phenoloxidasen durch KCN bzw. HCN reversibel gehemmt. Kleine Stücke von Kohlrabi und Kren wurden mit 0,1% bzw. 1% KCN infiltriert und in der üblichen Weise mit Apfelsmus bestrichen; die Braunfärbung unterblieb. (Merkwürdigerweise war die Braunfärbung roher Äpfel nach Infiltration mit 1% KCN nur wenig, nach Infiltration mit 0,1% KCN allerdings stark gehemmt.) Auch das Bestreichen frischer Schnittflächen von Kren und Kohlrabi mit Apfelsmus, das mit 0,1% bzw. 1% KCN verrührt worden war, führte zu einer Hemmung der Braunfärbung. Nach 20 Stunden war noch keinerlei Reaktion bemerkbar. Die Gewebstücke wurden nach dieser Zeit gut gesäubert, mit Leitungswasser abgespült und mit KCN-freiem Apfelsmus bestrichen. Nach einiger Zeit, zuerst bei den mit 0,1% KCN, später bei den mit 1% KCN vorbehandelten Versuchsobjekten wurde eine Braunfärbung bemerkbar. Nach 24 Stunden waren alle Stücke deutlich hellbraun gefärbt.

Keinerlei Ergebnisse konnten mit Preßsäften verschiedener Gemüsepflanzen erzielt werden. Nach BELOSERSKI & PROSKURJAKOW 1956 verlieren die Phenoloxidasen in Extrakten rasch ihre Wirksamkeit. Bei den relativ langen Versuchszeiten dürfte eine Inaktivierung der Fermente in den Extrakten als Erklärung genügen.

Auf Grund dieser experimentellen Befunde scheint mit der Schluß erlaubt, daß die Versuchspflanzen Phenoloxydase enthalten, aber keine phenolartigen Substrate. Aus den gekochten Äpfeln diffundieren diese Substrate in die Zellen der Versuchspflanzen, kommen dort mit der Phenoloxydase in Berührung, und die Melaninbildung setzt ein. Als einfacher Demonstrationsversuch für den Unterricht dürfte der „Apfeltest“ recht brauchbar sein. Man muß allerdings mit einer (maximal) 12- bis 24-stündigen Versuchsdauer rechnen, um genügend dunkle Färbungen zu erhalten.

Aber auch die Peroxydaseaktivität läßt sich mit Hilfe des „Apfeltestes“ zeigen. Verrührt man ein Schälchen voll dünnflüssigem Apfelsmus

mit einem Tropfen 10% H_2O_2 (ja nicht zu viel, sonst wird die Peroxydase inaktiviert) und legt die Versuchsobjekte, am besten wieder Kren- oder Kohlrabistücke, auch halbierte junge Kürbiskerne, hinein, so tritt fast augenblicklich eine starke Braunfärbung auf. Diese Reaktion fällt auch positiv aus, wenn die Versuchsobjekte in der Apfelbreiflüssigkeit vorher einige Tage lang unter Öl aufbewahrt worden sind, und dann erst mit H_2O_2 versetzt werden.

Auch bei Verwendung verdünnter Brenzcatechinelösungen als Substrat und bei Verwendung von Preßsäften als Fermentquelle wurden gute Ergebnisse erzielt.

Nach dem eingangs Gesagten berechtigen diese Versuche aber noch nicht zu dem Schluß, daß dabei tatsächlich nur Peroxydase nachgewiesen wurde. Da die im Gewebe vorhandene Katalase mit dem zugesetzten H_2O_2 reagiert, war bei allen Versuchen Sauerstoff zugegen. Von der Anwesenheit der Katalase kann man sich auf sehr einfache Weise überzeugen. Die Schnittflächen der Versuchspflanzen werden mit 10 bis 12% H_2O_2 überschüttet; nach einigen Sekunden ist ein mehr oder weniger heftiges Aufschäumen zu bemerken. An durch Hitze abgetöteten Stellen schäumt das Wasserstoffsuperoxyd nicht auf.

Zur Inaktivierung der Katalase wurde den Preßsäften und Gewebestücken 1 Mol $NaNO_3$ und, in Ermangelung einer geeigneten Pufferlösung, etwas verdünnte Essigsäure zugesetzt, bis keine Katalaseaktivität mehr nachweisbar war. Dennoch fielen die Peroxydaseproben positiv aus. Der Kren ist bekanntlich sehr reich an Peroxydase und wird daher von allen einschlägigen Lehr- und Praktikumsbüchern als besonders günstiges Versuchsobjekt angeführt.

Folgende Objekte gaben positive Phenoloxydase- und Peroxydasereaktionen; die anatomischen Angaben beziehen sich auf den Phenoloxydasetest.

Kren oder Meerrettich, *Armoracia lapathifolia*, besonders die den Wurzeln aufsitzenden Sproßachsen. Braun färben sich die Zellen an der Schnittfläche oder in einer tieferen Schichte, über der noch 8 bis 10 Reihen ungefärbter Zellen liegen. Die Gefäßbündel sind besonders intensiv gefärbt, auch im Inneren, wenn sie mit der Schnittfläche in Verbindung stehen.

Kohlrabi, *Brassica oleracea* var. *gongylodes*, Sproßknollen. Die Zellen an der Schnittfläche und die Gefäßbündel, die ins Innere führen, färben sich braun.

Karfiol oder Blumenkohl, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, Infloreszenzachsen. Die Schnittflächen werden bei längerem Liegenlassen an der Luft fast schwarz, besonders wenn Brenzcatechin als Substrat verwendet wird. Einzelne tiefer im Gewebe liegende Tracheiden (Speichertracheiden?) mit ringförmig verdickten Zellwänden werden dunkelbraun. (Die Braunfärbung der Infloreszenzen an Druckstellen rührt daher, daß die vielen kleinen

Tragblätter verletzt wurden. Sie enthalten offenbar außer Oxydasen auch geeignete Substrate.)

Kürbis, *Cucurbita pepo*, junge Früchte. Besonders die Samen reagieren positiv. Bei einem kleinen Kürbis („Zucchette“) trat mit Brenzcatechin und H_2O_2 anfangs eine purpurrote Färbung auf, die bald nachdunkelte.

Gurke, *Cucumis sativus*, junge Früchte. Auf Querschnitten heben sich die Gefäßbündel als dunkle Punkte ab.

Knoblauch, *Allium sativum*, Niederblätter und Achsen.

Küchenzwiebel, *Allium cepa*. Phenoloxydase nur im Zwiebelkuchen, Peroxydase im Zwiebelkuchen und in den Niederblättern.

Pflanzen, die im Apfeltest positiv reagieren, können natürlich ihrerseits wieder zum Nachweis von phenolartigen Substraten herangezogen werden.

Zusammenfassung

Der Brei von gekochten Äpfeln ist als Substrat für den qualitativen Nachweis von Phenol- und Peroxydasewirkungen geeignet. Anstelle von Preßsäften oder Enzymextrakten können frisch angeschnittene Pflanzenteile verwendet werden. Einige einfache Demonstrationsversuche werden beschrieben.

Schrifttum

- BELOSERSKI A. N. & PROSKURJAKOW N. I. 1956. Praktikum der Biochemie der Pflanzen. Deutsche Ausgabe. Berlin.
HOFFMANN-OSTENHOF O. 1954. Enzymologie. Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1959

Band/Volume: [8_1_2](#)

Autor(en)/Author(s): Urschler Ingrid

Artikel/Article: [Der "Apfeltest" zum qualitativen Nachweis von Oxydasewirkungen. 69-73](#)