

Disk-elektrophoretischer Nachweis der Polyphenoloxydasen aus Rebenblättern

von

H. SCHAEFER

Über die Aktivität der Polyphenoloxydase in den Blättern verschiedener *Vitis*-Arten liegen bisher Angaben von HENKE (1959, 1961) und von GEBBING (1968) vor. Untersuchungen über Extraktion, Nachweis, Substratspezifität und weitere Eigenschaften dieses Ferments in Rebenorganen wurden von DRAWERT und GEBBING (1963, 1967 a, b) und GEBBING (1968) durchgeführt. Über das Vorkommen von Isoenzymen der Polyphenoloxydase in der Rebe ist bisher nichts bekannt.

Zum elektrophoretischen Nachweis der Phenol- bzw. Polyphenoloxydasen (E. C. 1.10.3.1. und 1.10.3.2.) wurden bisher drei Verfahrenstypen in der Literatur angegeben: Anfärbung der Gele 1. in gepuffertem wäßrigem Milieu (CHEUNG und MARSHALL 1969), 2. in alkoholischer Substratlösung (CONSTANTINIDES und BEDFORD 1967) und 3. auf mit Substrat getränktem Filtrierpapier (TAKEO und URITANI 1966; URITANI und STAHMANN 1961).

Im Verlauf von Untersuchungen über mögliche Unterschiede im Eiweiß- und Enzymmuster der Blätter von reblausresistenten und -anfälligen Rebensorten stellte sich heraus, daß keines der beschriebenen Verfahren sofort befriedigende Ergebnisse bei der Analyse der Blatthomogenate erbrachte. Die erste und die dritte Methode erfüllten keineswegs unsere Forderung nach einer exakten Trennung der Isoenzyme der Polyphenoloxydase. Hinzu kommt die Schwerlöslichkeit mancher Substrate in wäßrigem Milieu. Bei Einhaltung bestimmter Bedingungen erwies sich jedoch der zweite Weg als erfolgreich.

Vorversuche ergaben, daß die Polyphenoloxydasen durch Homogenisieren der frischen Rebenblätter in einer Lösung von 40 ml 0,1 M Tris, enthaltend 80 mg Ascorbinsäure, 80 mg ÄDTA, 150 mg di-Natriumtetraborat und 2 g Polyäthylenglykol 40 000, pro 7—8 g Blätter (SCHAEFER 1970) extrahiert werden können. Bei Verwendung dieses Extraktionsgemisches können auch die Proteine und die Peroxydase isoliert werden (SCHAEFER 1969 und 1970); der Zusatz von Coffein (DRAWERT und GEBBING 1967 a) hat sich aber bei unseren elektrophoretischen Untersuchungen nicht bewährt.

Von dem zentrifugierten und durch Celite-Filtration gereinigten Homogenat werden 0,15—0,25 ml entsprechend etwa 0,15—0,2 mg Protein, versetzt mit 80%iger Saccharoselösung, auf die nach DAVIS (1964) und ORNSTEIN (1964) hergestellten 7%-igen Polyacrylamidgele ohne Bildung eines besonderen Probegels aufgegeben. Nach der bei 2—5 mA/Gel im Kühlraum durchgeführten Elektrophorese werden die Gele 20—30 min lang in 80%igem Äthanol vorfixiert und sodann in einer Lösung von 0,3 M Gallussäure + 1% Brenzkatechin 24 h lang inkubiert. Es treten nunmehr grüne Banden, die zum Teil sehr scharf sind, auf weißem, in der Gelmitte etwas gelbgrünem Untergrund auf. Nach 20—24 h wird die Inkubationslösung durch 80%-iges Äthanol ersetzt. Die Auswertung der Gele soll dann innerhalb von 1—2 Tagen durchgeführt werden, da später eine unerwünschte Farbvertiefung mit Verschmelzung einiger Zonen und Gelb- bis Braunfärbung anderer Banden eintritt, so daß eine exakte Differenzierung der Isoenzyme besonders in der Gelmitte kaum noch

möglich ist. Ein großer Teil der Isoenzyme ist jedoch noch nach mehreren Wochen Lagerung bei Zimmertemperatur zu erkennen. Ohne die Vorfixierung werden weniger Banden entdeckt, sie ist also unbedingt notwendig.

Bei Verwendung von nur 30%igem Äthanol (CONSTANTINIDES und BEDFORD 1967) verblassen die Banden und werden wesentlich unschärfer. Bei Aufbewahrung der Gele in 3%iger Essigsäure verfärben sich etliche Banden diffus gelb und lassen sich kaum noch auswerten. Eine Anfärbung bei 38° C brachte keine Vorteile.

Die Homogenate können einige Tage lang in einer Gefrierbox aufbewahrt werden; das Isoenzymmuster änderte sich in dieser Zeit nicht.

Ähnliche, wenn auch etwas unklarere Anfärbungen wie mit dem beschriebenen Substrat wurden mit Gallussäure + p-Cumarsäure oder mit Gallussäure + Kaffeesäure erzielt. Bei Verwendung von Gallussäure + Hydrochinon oder + Pyrogallol sowie von Gallussäure, Brenzkatechin, Pyrogallol, Guajakol, p-Cumarsäure, Chlorogensäure und o-Phenylendiamin ohne weiteren Zusatz waren ein oder mehrere Isoenzyme nicht nachweisbar, das Muster der Banden war bei einigen dieser Substrate vor allem in der Gelmitte diffus. Die Reaktion mit Gallussäure + Guajakol ergab zwar eine günstige Trennung, jedoch verblaßte die Färbung sehr schnell. Mit Kaffeesäure allein wurde nur eine Bande deutlich angefärbt; eine weitere Differenzierung des übrigen Musters trat aber nicht auf. Der Zusatz von Aminosäuren (DRAWERT und GEBBING 1963) führte nicht zu einer Verbesserung der Detektion.

Literaturverzeichnis

- CHEUNG, D. S. M. and MARSHALL, K. C., 1969: Antigenic and some kinetic properties of three p-diphenol oxidase isoenzymes of *Trametes versicolor*. Biochim. Biophys. Acta 178, 177—180.
- CONSTANTINIDES, S. M. and BEDFORD, C. L., 1967: Multiple forms of phenoloxidase. J. Food Sci. 32, 446—450.
- DAVIS, B. J., 1964: Disc electrophoresis. — II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404—427.
- DRAWERT, F. und GEBBING, H., 1963: Ein qualitativer Schnelltest auf Polyphenoloxydase. Naturwiss. 50, 522—523.
- — — und — — —, 1967 a: Über aktiv und latent gebundene Phenoloxidase und ihre Ablösung von pflanzlichen Zellstrukturen. Naturwiss. 54, 226—227.
- — — und — — —, 1967 b: Sprühtest zur Prüfung der Substratspezifität von Phenoloxidasen. Z. Naturforsch. 22 b, 559—560.
- GEBBING, H., 1968: Über pflanzliche Polyphenoloxidasen. Diss. Karlsruhe.
- HENKE, O., 1959: Untersuchungen über den Einfluß von *Vitis cinerea* Arnold auf einige biochemische Eigenschaften der Kreuzungsnachkommen. Z. Pflanzenzücht. 41, 253—270.
- — —, 1961: Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen Parasit und Wirt am Beispiel Reblaus-Rebe. Phytopathol. Z. 41, 387—426.
- ORNSTEIN, L., 1964: Disc electrophoresis. — I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321—349.
- SCHAEFER, H., 1969: Untersuchungen zur Methodik der Extraktion und Disk-Elektrophorese der Blatteiweiße der Gattung *Vitis*. Weinwiss. 24, 205—232.
- — —, 1970: Über die Isolierung und Disk-Elektrophorese der Isoenzyme der Peroxydase aus den Blättern der Gattung *Vitis*. Wein-Wiss. 25, 277—282.
- TAKEO, T. and UBITANI, I., 1966: Tea leaf polyphenol oxidase. Part II. Purification and properties of the solubilized polyphenol oxidase in tea leaves. Agricult. Biol. Chem. (Tokyo) 30, 155—163.
- URITANI, I. and STAHMANN, M. A., 1961: Changes in nitrogen metabolism in sweet potato with black rot. Plant Physiol. 36, 770—782.

Eingegangen am 10. 11. 1970

Dr. H. SCHAEFER
Landes-Lehr- und Forschungsanstalt
für Wein- und Gartenbau
673 Neustadt/Weinstraße