



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

Diplomarbeit

**Bestimmung der Aktivität  
von pectolytischen Enzymen im Apfel**

Verfasser: Stefanie Ewest  
Fachbereich: Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften  
Studiengang: Lebensmitteltechnologie  
Betreuer: Prof. Dr. Peter Meurer  
Prof. Dr. Mark Rüschen gen. Klaas

urn: nbn:de:gbv:519-thesis2009-0297-8

Neubrandenburg, 14. September 2009

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Meurer und Herrn Prof. Dr. Rüschen gen. Klaas danke ich für das überlassene Thema, das von ihnen in mir gesetzte Vertrauen, den wissenschaftlichen Freiraum sowie die wertvollen Hilfestellungen.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern möchte ich danken für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, die Einweisung an Geräten sowie die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Frau Dipl.- Päd. Antje Müller möchte ich für die Durchsicht dieser Arbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Katja Müller für die stets hilfreichen Diskussionen und Ideen, sowie für die gute Zusammenarbeit und der daraus entstandenen Freundschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich moralisch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Ohne sie wäre der Abschluss dieses Studiums niemals möglich gewesen.

## Abkürzungsverzeichnis

endo-PG	endo-Polygalacturonase
exo-PG	exo-Polygalacturonase
PE	Pectinesterase
Pektin C	Citruspektin
r	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Quadrat des Korrelationskoeffizienten
s	Standardabweichung
VK	Variationskoeffizient in %
$\bar{x}$	Mittelwert
$\eta_{\text{spez.}}$	spezifische Viskosität

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Stand der Wissenschaft und Technik</b> .....	<b>2</b>
2.1 Textur .....	2
2.2 Knackigkeit .....	2
2.3 Rohstoff Apfel.....	3
2.3.1 Kurzer Überblick.....	3
2.3.2 Zellwandaufbau .....	5
2.3.3 Textureigenschaften .....	6
2.3.4 Texturbeeinflussende Faktoren .....	6
2.4 Texturbeeinflussende Enzyme .....	7
2.4.1 Enzyme.....	7
2.4.2 Pectinesterase .....	9
2.4.3 Polygalacturonase.....	10
2.4.4 Pektin als Substrat .....	11
2.5 Bisherige Methoden zur Bestimmung der Aktivität zellwandbeeinflussender Enzyme....	12
<b>3 Materialien und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Apfelsorten .....	15
3.2 Herstellung der Enzymextrakte.....	17
3.3 Untersuchungsmethoden der Enzymextrakte.....	19
3.3.1 Pectinesterase .....	19
3.3.2 Exo-Polygalacturonase.....	21
3.3.3 Endo-Polygalacturonase.....	23
3.4 Statistische Methoden .....	25
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
4.1 Vorversuche .....	27
4.1.1 Unterschiede zwischen den Enzymextraktherstellungen .....	27
4.1.2 Reproduzierbarkeit der Messungen.....	28
4.1.3 Einfluss der Zeit auf die Enzymaktivität.....	34
4.2 Hauptversuche.....	37
4.2.1 Aktivität der pectolytischen Enzyme im Apfel.....	37
4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums der pectolytischen Enzyme.....	40
4.2.3 Verteilung der Enzyme in den einzelnen Apfelzonen.....	42

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>45</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>49</b>
<b>7 Abstract.....</b>	<b>50</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>10 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>11 Formelverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>56</b>
<b>Erklärung der selbständigen Arbeit.....</b>	<b>79</b>

## 1 Einleitung

Der Apfel zählt zu der am meisten verzehrten Obstsorte in Deutschland. Die Qualität spielt dabei eine wichtige Rolle. Als Qualitätsparameter gelten unter anderem Fruchtform, Farbe, Beschaffenheit der Schale, Aroma, Bekömmlichkeit, Nährwert und Textur.

Die Textur von Obst und Gemüse ist ein wichtiges Kriterium für die Kaufentscheidung des Verbrauchers. Knackige und feste Äpfel stehen für Frische. Deshalb ist es erforderlich, bei der Produktion die Textureigenschaften zu überprüfen. Außerdem ist die Verarbeitung von zu weichen Früchten technisch ungünstig.

Das Weichwerden der Früchte wird durch die Veränderung der Zellwandpolysaccharide, aufgrund von chemischen Reaktionen (z. Bsp. Kochen) oder enzymatischer Einwirkung verursacht. Wesentlich hierfür sind die Pektin abbauenden Enzyme wie Pectinesterase und Polygalacturonase.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, mit den an der Hochschule Neubrandenburg zur Verfügung stehenden Chemikalien und Geräten die Aktivität und Eigenschaften der zellwandbeeinflussenden Enzyme von Äpfeln zu bestimmen. Dafür werden die in der Vergangenheit bereits entwickelten Methoden zur Bestimmung der Knackigkeit von Gurken herangezogen. Die Untersuchungen der Enzymextrakte sollen am Ende reproduzierbare und vergleichbare Messergebnisse liefern.

Zur Charakterisierung der Apfelenzyme wird die Aktivität dieser in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur der Reaktion im entsprechenden Substrat ermittelt. Diese Parameter sind für die Anwendung wichtig, um bei der Enzymreaktion das Optimum zu erforschen.

## **2 Stand der Wissenschaft und Technik**

### **2.1 Textur**

Die Textur umfasst die strukturellen, physikalischen und chemischen Eigenschaften von Obst und Gemüse. Diese Eigenschaften können sowohl instrumentell als auch sensorisch bestimmt werden. Die strukturellen Eigenschaften umfassen den Zell- und Gewebeaufbau. Sie sind von den chemischen und physikalischen Merkmalen sowie dem Reifegrad abhängig.

Die Textur ist eng verbunden mit der Knackigkeit. Die Lagerung von Obst und Gemüse führt nach dem ansteigenden Gehalt einzelner Inhaltsstoffe zu einer schrittweisen Qualitätsverschlechterung und dem Zerfall des Zellverbandes. Es kommt zu einer Veränderung der Textur, die Knackigkeit nimmt ab. Dadurch wird das Obst und Gemüse weich.

### **2.2 Knackigkeit**

Die Knackigkeit ist bei Obst und Gemüse ein wesentliches Qualitätsmerkmal. Ein Apfel, dem die Knackigkeit fehlt, entspricht nicht den Eigenschaften, die von dieser Frucht erwartet werden. Die Knackigkeit entspricht, sensorisch betrachtet einem Erstbiss-Eindruck. Laut Stoll (1997) lässt ein Überdruck zwischen den Schneidezähnen eine Reihe flüssigkeitsgefüllter Zellen platzen, was von einem Geräusch begleitet wird. Die zerstörten Zellen setzen eine große Menge an erfrischenden Säften frei.

Die unterschiedliche Knackigkeit des Fruchtfleisches kann mit der Methode von Lapsley (1989) bestimmt werden. „Eine zylindrische Gewebeprobe wird in waagerechter Lage auf 2 senkrecht stehenden Platten gelegt. Mit einem messerähnlichen Werkzeug wird die Mitte des Zylinders bis zum Bruch desselben belastet. Die Kraft, welche hierfür benötigt wird, ergibt die Messwerte. Diese stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten der sensorischen Prüfung von Knackigkeit (Stoll, 1997).“ Nur Äpfel mit festen Zellwänden widerstehen dieser großen Kraft bis zum Bruch und dem verursachten Bruchton.

## 2.3 Rohstoff Apfel

### 2.3.1 Kurzer Überblick

Bei dem Apfel (*Malus*) handelt es sich um ein Kernobst. Er gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) und ist eine Sonderform der Sammelbalgfrucht. Das Fruchtfleisch entwickelt sich aus der Blütenachse. Die Bälge sind von dem Fruchtfleisch umgeben. Er besitzt ein Kerngehäuse mit 5 Kammern. Dort befindet sich in der Regel je ein Samen (Kern).

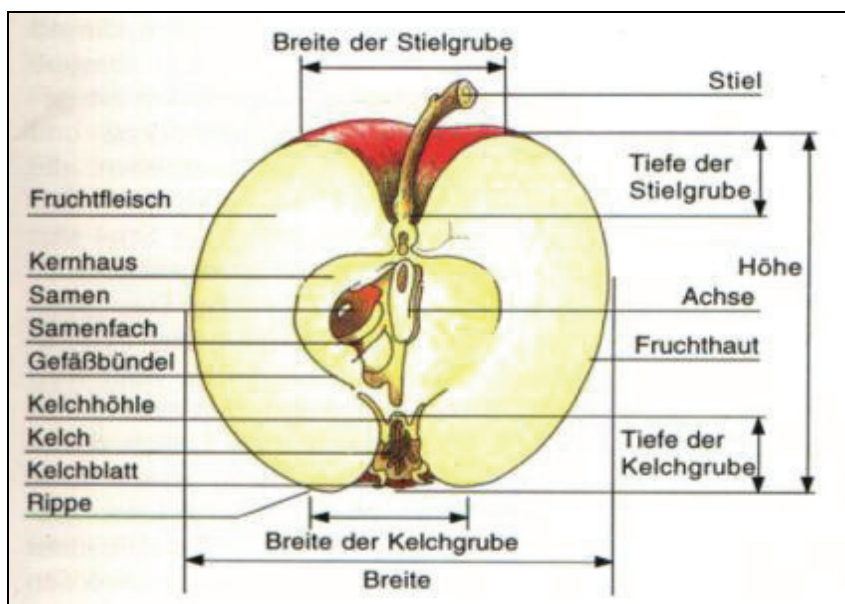


Abbildung 1: Aufbau eines Apfels (<http://dnx274.dyndns.org/apfel7/apfel2.html>)

Äpfel enthalten etwa 85 % Wasser, 0,3 % Protein und 0,32 % Mineralstoffe (Herrmann, 2001). Bei der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe spielen die Sorte, der Reifegrad, die Lagerzeit sowie die Anbaubedingungen, wie Boden, Klima und Sonne, eine wichtige Rolle.

Es gibt mittlerweile eine unübersehbare Vielfalt von Sorten, zum Beispiel Boskoop, Elstar, Golden Delicious, Gravensteiner, Idared und Jonagold. Sie werden oft nach ihrem Erntezeitpunkt unterschieden. Der Anbau von Äpfeln erfolgt in ganz Deutschland. Laut dem Ernährungsbericht von 2008 verzehrt jeder Deutsche pro Jahr ca. 20 Kilogramm Äpfel.

Ein Teil der Äpfel wird als Tafelobst angeboten, der andere Teil verarbeitet. Grundstoff vieler Produkte ist der Apfelsaft, der in verschiedenen Varianten und Produktarten angeboten wird: naturtrüb, klar, als Saft, Nektar oder Konzentrat. Weitere Beispiele zur Herstellung von Getränken sind Apfelwein, Cidre und Weinbrand. Beliebte Produkte aus Äpfeln sind Mus,



Kompott und Stücke. Letztere werden nur für die Großverbraucher und Backwarenindustrie (Strudel, Kuchen) hergestellt. Ein Teil der Ernte wird durch Trocknung zu Dörrobst (Apfelringe, -Chips) verarbeitet. Außerdem dienen Äpfel als Futtermittel.

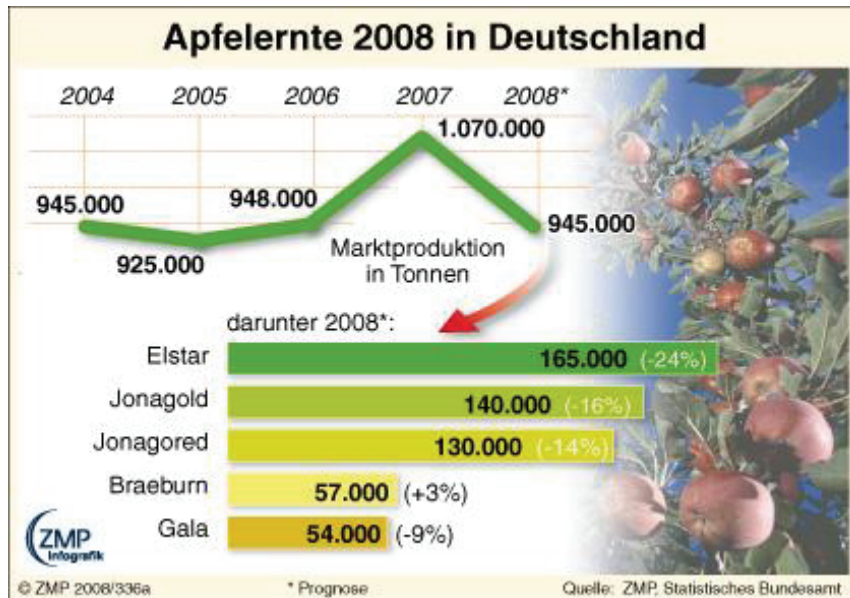


Abbildung 2: Apfelernte 2008 in Deutschland (ZMP, 2008)

Charakteristisch für den Reifevorgang sind folgende Prozesse: Stärkeabbau zu reduzierenden Zuckern, Säureabbau, Chlorophyllabbau, verringerte Fruchtfleischfestigkeit, Aroma- sowie Ethylenbildung, Entwicklung einer Wachsschicht auf der Schale und die Veränderung der Fruchtatmung. Der Apfel zählt zu den klimakterischen Früchten. Die Kohlendioxidabgabe steigt nach Beginn ihres Reifeprozesses an, somit reifen sie nach der Ernte nach. Die Atmungsaktivität nimmt deutlich zu.

Die Lagerung sollte möglichst kühl ( $T = 2$  bis  $6^{\circ}\text{C}$ ), dunkel und bei einer hohen Luftfeuchtigkeit (90 bis 95 %) stattfinden. Dabei ist es wichtig, dass die Äpfel flach und nicht übereinander angeordnet sind. Um die Haltbarkeit zu verlängern, wird die CA-Lagerung (Controlled atmosphere) angewandt. Es erfolgt eine ständige Kontrolle der Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehaltes. In diesem Lager herrschen niedrige Temperatur (1 bis  $5^{\circ}\text{C}$ ), hohe Luftfeuchtigkeit (ca. 92%), niedriger Sauerstoffgehalt und hoher Kohlendioxidgehalt. Dies sind Voraussetzungen, um die Fruchtatmung, Ethylenbildung und Texturveränderung zu verringern.

Eine weitere Möglichkeit zur Verlängerung der Lagerdauer ist die ULO-Lagerung (Ultra Low Oxygen). Dabei wird der Sauerstoffgehalt in der Atmosphäre bis auf 1 % gesenkt und somit die Fruchtalterung gegenüber der CA-Lagerung nochmals stark verlangsamt.

Reife Äpfel geben bei der Lagerung Ethylen ab, das bei anderen Obst und Gemüse eine Reihe von Veränderung auslöst. Dies führt zum Beispiel bei Bananen zu einem sehr schnellen Nachreifen.

### 2.3.2 Zellwandaufbau

Die Zellwand gliedert sich von außen nach innen in vier Schichten: Mittellamelle, Primärwand, Sekundärwand und Tertiärwand. Die Mittellamelle besteht aus Pektinen und bildet sich bei der Zellteilung zwischen beiden Tochterzellen aus. Die Primärwand enthält Mikrofibrillen, die kreuz und quer in einer Grundsubstanz aus Pektinen und Hemicellulose eingelagert sind.

Die Sekundärwand wird erst gebildet, wenn die Zelle ihr Wachstum beendet hat. Die Anlagerung von Mikrofibrillen erfolgt in Schichten. Die Sekundärwand besteht aus dicht gepackten Cellulosemikrofibrillen und Hemicellulosen, die in Mineralsubstanzen und vor allem in Lignine eingepackt sind. Abschließend folgt nach innen die Tertiärwand, die aus Pektin und Hemicellulose besteht. Sie ist chemisch besonders resistent.

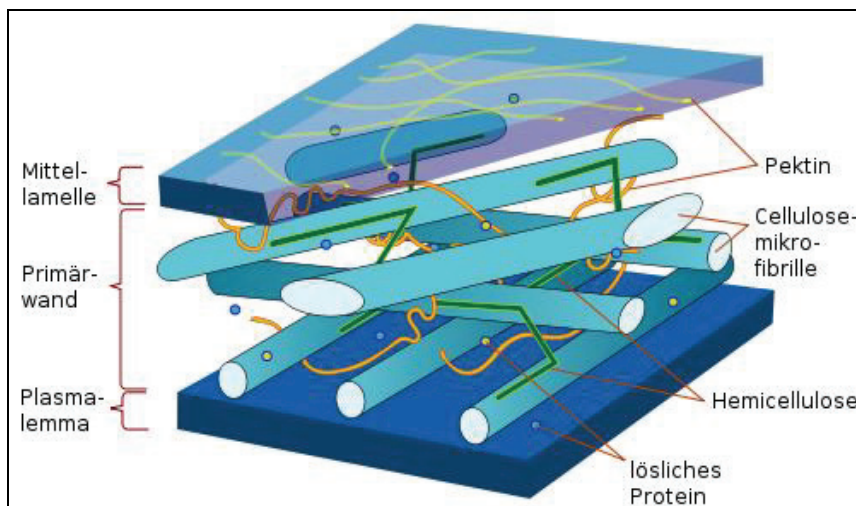


Abbildung 3: Schema pflanzliche Zellwand ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de))

Pektin ist ein bedeutendes strukturelles Polysaccharid der Mittellamellen und der primären Zellwand von Pflanzen. Bei unreifen Äpfeln ist das Pektin eng an die Zellwand der Frucht gebunden und lässt sich nicht mittels Wasser oder Druck extrahieren. Während der Reifung von Obst wird das Pektin allmählich löslich, was die Textur weicher macht und die Saftviskosität stark steigert.

### 2.3.3 Textureigenschaften

Wie schon erwähnt ist die Textur von Äpfeln ein wichtiges Qualitätskriterium. Sie hängt von der Festigkeit, Knackigkeit, Saftigkeit und Mehligkeit ab. Diese Merkmale werden vom Reifegrad, der Art und Weise der Lagerung und der Lagerdauer beeinflusst.

Für die Festigkeit und Aufrechterhaltung des Zellwandgerüsts ist vor allem der Celluloseanteil verantwortlich. Dieser kann in reifen Früchten etwa 0,3 bis 1,6 % des Fruchtgewichtes betragen. In frischen Äpfeln korreliert er stark mit der Festigkeit des Fruchtfleisches. Die Cellulosefibrillen sind in eine Matrix aus kolloidalem Material (Hemicellulose und Pektinen) eingebettet. Dies verstärkt wiederum die Zellwand. Somit weisen feste Äpfel einen höheren Celluloseanteil auf als weiche Äpfel. Für die Festigkeit der Zellwand ist das optimale Zusammenwirken von Cellulose, Pektinen und Calcium von großer Bedeutung.

Die Festigkeit korreliert stark mit der Knackigkeit, beide sind aber in sensorischen sowie apparativen Messungen voneinander unterscheidbar. Zwischen einer hohen Saftigkeit mit dem Merkmal hoher Festigkeit und Knackigkeit besteht ein Zusammenhang. Die Mehligkeit ist im Gegensatz zur Festigkeit, Knackigkeit und Saftigkeit ein unerwünschtes Texturmerkmal. „Diese Gewebedegradation beruht vor allem auf Pektinveränderungen in den Mittellamellen“ (Stoll, 1997).

Mit der ungewünschten Abnahme der Festigkeit wird das Weichwerden der Frucht beschrieben. Ursache hierfür ist die Veränderung der Zellwand, welche u.a. auf die pectolytische Enzyme zurückzuführen ist (Fehlhaber und Kleer, 2006).

### 2.3.4 Texturbeeinflussende Faktoren

Die Textur von Äpfeln kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden:

- Apfelsorte
- Anbaubedingungen (Klima, Boden, Wasser- und Nährstoffversorgung)
- Fruchtgröße und Reifegrad
- Lagerung
- Verarbeitungsbedingungen (Temperatur u.a.)

Die Menge sowie die Verteilung der Pektine sind entscheidend für die Festigkeit des Fruchtfleisches und damit verbunden für die Textur. Nach Stoll (1997) bilden die Calciumpektate im unlöslichen Protopektin „die vorherrschende Kittsubstanz im Zellverband, welche die interzelluläre Adhäsion sichern“. Enzyme und Umweltfaktoren können diesen Zellzusammenhalt schwächen. Deshalb kommt es zum Weichwerden der Frucht.

## **2.4 Texturbeeinflussende Enzyme**

### **2.4.1 Enzyme**

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die durch Peptidbindung miteinander verbunden sind. Es gibt 20 verschiedene Aminosäuren, die alle eine Carboxylgruppe (-COOH) und eine Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>) besitzen, sich aber im organischen Rest (R) unterscheiden. Die Verbindung der Aminosäuren erfolgt durch die Reaktion der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer anderen Aminosäure. Unter Wasserabspaltung wird die Peptidbindung (-CONH-) gebildet. Eine Verbindung von etwa 100 Aminosäuren wird als Protein bezeichnet.

Enzyme sind globuläre Proteine und wirken substratspezifisch. Sie besitzen eine taschenartige Vertiefung als aktives Zentrum. Hier können sich nur spezifische Substrate anlagern, die genau in das aktive Zentrum passen, so wie ein Schlüssel in ein Schloss. Beide gehen einen Enzym-Substrat-Komplex ein.

Enzyme wirken nicht nur substratspezifisch, sondern auch reaktionsspezifisch. Das bedeutet, dass ein Enzym meist nur bestimmte Reaktionen eines Substrates steuern kann (Belitz, 2008). Durch den Enzym-Substrat-Komplex wird die Aktivierungsenergie herabgesetzt, um z.B. Bindungen zu spalten und so das Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Enzyme sind in der Lage, als Katalysatoren die synthetisierenden sowie die abbauenden biochemischen Prozesse zu beschleunigen.

Laut Belitz (2008) laufen in Lebensmitteln „viele enzymkatalysierte Reaktionen ab und beeinflussen damit die Qualität positiv oder negativ“. Einige Beispiele dafür sind die Reifung von Obst, Gemüse, Fleisch- und Milchprodukten, die Herstellung von Backteigen aus Weizen- und Roggenmehl sowie das Brauen von alkoholischen Getränken.

Die ermittelte Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion ist ein Indiz für die Aktivität eines Enzyms. Hierfür ist es wichtig, dass die Versuchsparameter so gewählt werden, dass eine lineare Beziehung zwischen der Reaktionsdauer und dem Umsatz besteht. Als Maß für die

Enzymaktivität dient die Enzymeinheit. Gemäß der Festlegung der Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie versteht man darunter „diejenige Menge eines Enzyms, die unter definierten Bedingungen (z.Bsp. 30°C, optimaler pH-Wert, Substratüberschuss) innerhalb einer Minute 1 µmol Substrat umsetzt, 1 µmol eines definierten Spaltproduktes bildet oder den Umsatz von 1 µVal Substrat katalysiert“. Außerdem besteht eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration, der Temperatur und dem pH-Wert. In der Praxis wird die Enzymaktivität meistens je 1 ml oder 1g Trockensubstanz angegeben (Franzke, 1996).

Die katalytische Aktivität von Enzymen kann durch Inhibitoren beeinflusst werden. Sie reduzieren die Geschwindigkeit der Katalyse und hemmen somit das Enzym. Es gibt zwei Arten von Inhibitoren: die irreversiblen und die reversiblen. Irreversible Inhibitoren sind z. Bsp. Schwermetalle, Insektizide und starke Säuren. Diese Stoffe führen zur Denaturierung des Enzyms. Dabei wird die Struktur des Eiweißmoleküls zerstört. Diese Hemmung kann nicht wieder rückgängig gemacht werden. Bei der reversiblen Hemmung konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat. Je höher die Konzentration des Hemmstoffs ist, desto mehr Enzymmoleküle werden von ihm blockiert. Diese Reaktion kann rückgängig gemacht werden, indem man die Substratkonzentration erhöht. Es lassen sich drei Formen der reversiblen Hemmung unterscheiden: kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibierung. Auf diese wird jedoch nicht weiter eingegangen.

Basierend auf den Regeln für die Klassifizierung und Bezeichnung von Enzymen der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (I.U.P.A.C.) und der „International Union of Biochemistry“ (I.U.B.) werden Enzyme in 6 Hauptklassen eingeteilt:

1. Oxidoreduktasen
2. Transferasen
3. Hydrolasen
4. Lyasen
5. Isomerasen
6. Ligasen.

Jedem Enzym wird eine Schlüsselnummer (EC-Nummer) zugewiesen. Die erste Zahl gibt an, zu welcher Hauptklasse das Enzym gehört (Belitz, 2008).

Für die vorliegende Arbeit sind die Hydrolasen von großer Bedeutung. Hydrolasen sind Enzyme, die Bindungsspaltungen unter Anlagerung von Wasser katalysieren (Ester-, Peptid-, Glycosidbindungen). Dazu zählen die pectolytischen Enzyme Pectinesterase und Polygalacturonase, die in dieser Arbeit untersucht werden. Deshalb werden in den folgenden Abschnitten diese Enzyme näher erläutert.

### 2.4.2 Pectinesterase

Pectinesterasen (PE, EC 3.1.1.11) kommen verbreitet in Pflanzen und Mikroorganismen wie Hefen und Bakterien vor. Nach Schmormüller (1968) ist der PE-Gehalt reife- und sortenabhängig. Demzufolge enthalten überreife Früchte am meisten PE.

PE spaltet aus dem Pektin das estergebundene Methanol ab, sodass Pektin in Pektinsäure überführt wird. Die Carboxylgruppen des Pektins können in unterschiedlichem Maße mit Methanol verestert sein. Die PE greift diese Gruppen an, sodass die Makromoleküle zu niedermolekularen löslichen Pektinen abgebaut werden. Somit ist die PE neben der Polygalacturonase für den Abbau der Pektine verantwortlich (Belitz, 2008).

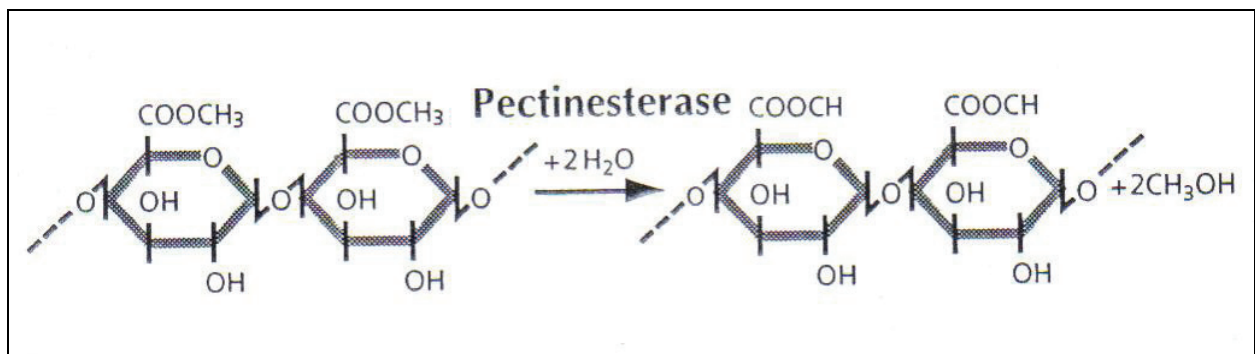


Abbildung 4: Vereinfachte Reaktionsformel der PE (Gierschner, Buckenhüskes, 1993)

PE wird überwiegend durch Fermentation mit Pilzkulturen (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*) gewonnen. Sie findet Anwendung in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie sowie bei der Weinherstellung. Bei der Fruchtsaferstellung erfolgt eine PE-Zugabe, um die Pressbarkeit des Fruchtfleisches zu verbessern und so die Saftausbeute zu erhöhen. Des Weiteren wird PE für die Fruchtsaft- und Weinklärung eingesetzt. Bei den zum Einsatz kommenden Enzymen handelt es sich in der Regel um eine Mischung verschiedener Enzyme (u.a. Polygalacturonasen). Dabei wird das Pektin je nach Veresterungsgrad und Molekulargewicht in unterschiedlicher Weise angegriffen. Während der Fruchtsaferstellung müssen die hochmolekularen Pektine in kurzkettige Bruchstücke abgebaut werden. Dadurch kann die gewünschte Viskositätssenkung und die Entstabilisierung des Trubes erreicht werden. Durch die Abnahme der Viskosität wird die Filtrierbarkeit verbessert und die trubstabilisierende Wirkung der Pektine verhindert.

Der isoelektrische Punkt von PE reicht von 3,1 für PE aus Pilzkulturen bis zu 11 für PE aus Tomaten. Die pH-Stabilität hängt von der Quelle des Enzyms ab und kann sich zwischen pH 1,1

und 10,0 erstrecken. In der Regel liegt das pH-Optimum von PE zwischen pH 6,0 und 8,0. Das Temperatur-Optimum liegt zwischen 40 und 70°C. Pflanzenenzyme weisen ein etwas höheres Optimum als mikrobielle Enzyme auf. Eine geringe Menge (0,1 bis 0,2 mM) an Salz wie Natrium- und Calciumchlorid erhöhen die katalysierende Wirkung der PE. Die Empfindlichkeit der PE gegenüber der thermischen Inaktivierung erhöht sich bei niedrigen pH-Bedingungen.

### 2.4.3 Polygalacturonase

Die Polygalacturonase (PG) gehört neben der PE zu den pektinspaltenden Enzymen. Sie kommt besonders in Schimmelpilzen und Bakterien vor, ist aber auch in Pflanzen zu finden. Nach Schormüller (1965) hydrolysiert PG die Glycosidbindungen zwischen Galacturonsäureresten im Pektin.

Exo-PG (EC 3.2.1.67) spalten Monogalacturonsäureeinheiten vom nichtreduzierenden Kettenende her ab. Laut Ruttloff (1996) zerlegt die endo-PG (EC 3.2.1.15) „Pektinsäure im Inneren der aus Galacturonsäure-Einheiten bestehenden Pektinsäure und führt zu einem raschen Abfall der Viskosität. Der Name weist schon darauf hin, dass die Polygalacturonsäure als Substrat dient.

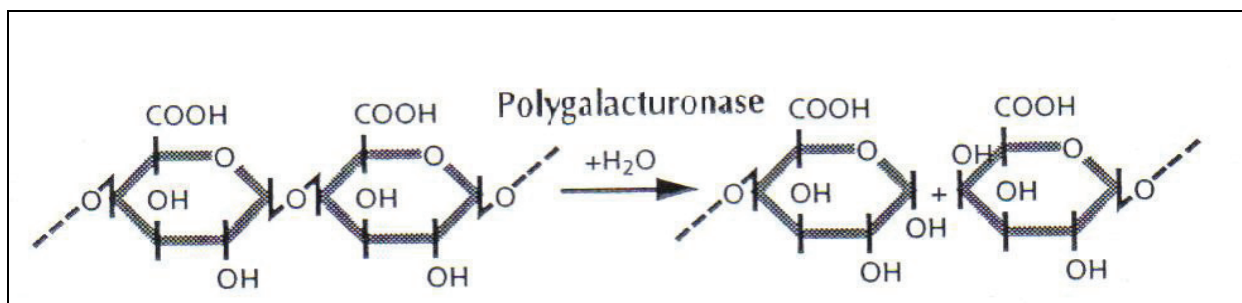


Abbildung 5: Vereinfachte Reaktionsformel der PG (Gierschner, Buckenhüskes, 1993)

Endo-PG sind jedoch auch aktiv auf Pektinen mit niedrigem oder gemäßigttem Veresterungsgrad. Kürzlich wurde gezeigt, dass endo-PG vom *Aspergillus niger* einen niedrigen Veresterungsgrad bevorzugt.

Angesichts der wichtigen Bedeutung des Pektins in der Primärzellwand der Pflanze ist es offensichtlich, dass die PG eine große Rolle in der Entwicklung der Pflanze spielen. Die PG-Aktivität ist in fast jedem Pflanzengewebe bestimmt worden. In der Tomate und Zitrone wurde

gezeigt, dass es mindestens drei Arten von PG gibt: blütenstaubspezifische PG, fruchtspezifische PG und abtrennungsspezifische PG (Whitaker, 2003).

Die PG in Tomaten ist in dieser Hinsicht eines der bestcharakterisierenden pflanzlichen Enzyme. Der Einfluss von endo-PG bezüglich der Fruchtreife und Verarbeitung von Nahrungsmitteln in den unterschiedlichen Varianten (als Püree, Ketschup, Saft) ist umfassend studiert worden. Während der Reifung kommt es zu einer Veränderung der Textur und verringerten Knackigkeit. Um die Tätigkeit der Enzyme zu verhindern, werden Tomaten nach Hitzebehandlung homogenisiert.

Obwohl alle PG zu den Glycosyl-Hydrolasen gehören, unterliegen sie beträchtlichen Schwankungen in der molekularen Masse (30 bis 75 kDa) und dem isoelektrischen Punkt ( $pI=3,8$  bis  $8,8$ ). Zurzeit ist keine Relation zwischen molekularer Masse und isoelektrischem Punkt bekannt. Endo-PG sind im Allgemeinen zwischen  $pH=3,5$  und  $6,0$  aktiv. Einige Enzyme haben ein ziemlich schmales  $pH$ -Optimum, während andere wiederum ein verhältnismäßig ausgedehntes  $pH$ -Optimum besitzen. Die Mehrheit der endo-PG wurden in mesophilen Organismen lokalisiert. Es wundert daher nicht, dass diese Enzyme auch mesophil sind. Eine Vielzahl der in dieser Hinsicht untersuchten PG haben ihr Temperatur-Optimum zwischen  $40$  und  $55^{\circ}C$ . In diesem Bereich beginnen jedoch erste Schritte der Denaturierung. Deshalb werden in der Regel die Untersuchungen bei Temperaturen zwischen  $25$  und  $37^{\circ}C$  durchgeführt. PG werden durch NaCl aktiviert, wobei einige PG zusätzlich durch  $Ca^{2+}$ -Ionen eine höhere Wirkung erhalten (Whitaker, 2003).

#### **2.4.4 Pektin als Substrat**

Pektin ist ein kompliziert zusammengesetztes Polysaccharid mit gelbildenden Eigenschaften, das in vielen Pflanzen, insbesondere im Obst und Gemüse, vorkommt. Es wird aus den Schalen von Citrusfrüchten und aus Apfeltrester gewonnen. Der Pektingehalt ist abhängig von der Rohware. Zitronenschalen enthalten bis zu  $30\%$  Pektin in ihrer Trockensubstanz, Orangenschalen  $15$  bis  $20\%$  und Apfelschalen ungefähr  $10\%$  (Acker, 1965).

Laut Heimann (1976) bestehen Pektine aus polymerhomologen Reihen von Galacturonsäuren, deren Carboxylgruppen teilweise mit Methanol verestert sind. Pektine sind unterschiedlich stark mit Methanol verestert. Bei einem Veresterungsgrad von über  $50\%$  handelt es sich um hochverestertes Pektin. Bei niedrigverestertem Pektin liegt der Veresterungsgrad unter  $50\%$ .



Sind alle Carboxylgruppen der Polygalacturonsäure frei, also unverestert, so liegt Pektinsäure vor, ihre Salze sind die Pektate.

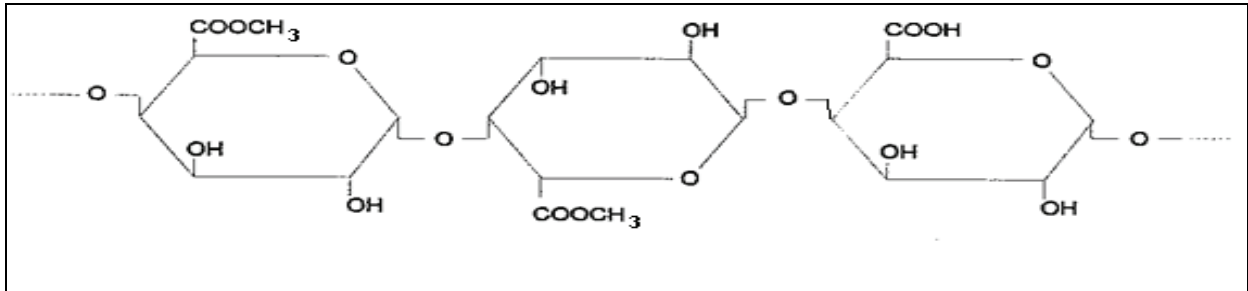


Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Pektinkette (www.uni-hohenheim.de, 2009)

Pektine sind Hauptbestandteile der Zellwand in den essbaren Anteilen von Früchten und Gemüse. Die zwischen den Zellwänden gelegenen Mittellamellen bestehen zur Hauptsache aus Protopektin, das die unlösliche Form des Pektins darstellt. Sie übernehmen Bau-, Stütz- und Verfestigungsfunktionen für das Zellgewebe. Des Weiterem können sie den Wasserhaushalt der Pflanzen aufgrund ihrer Quell- und Kolloidfähigkeit regeln.

Bei einem pH-Wert von 3 bis 4 ist die Stabilität von Pektin am größten. Im stärker saureren Milieu erfolgt die Hydrolyse von Glycosidbindungen. Im alkalischen Bereich werden sowohl die Esterbindungen als auch die Glycosidbindungen gespalten, wobei die Spaltung der letzteren durch Eliminierung erfolgt. Dieser Prozess kann leichter an den Galacturonsäureresten mit veresteter Carboxylgruppe stattfinden, da das H-Atom am C-5 saurer ist als bei den Resten mit freier Carboxylgruppe (Belitz, Grosch, 2008).

Pektin wird aufgrund seines Geliervermögens bei der Herstellung von Marmeladen und Gelees eingesetzt. Pektin findet jedoch auch Anwendung bei der Stabilisierung von angesäuerten Milchgetränken, Joghurts und Eiscremes.

## 2.5 Bisherige Methoden zur Bestimmung der Aktivität zellwandbeeinflussender Enzyme

Bei der Literaturrecherche konnten keine geeigneten Quellen gefunden werden, die über die Aktivität zellwandbeeinflussender Enzyme im Apfel berichten. Um sich einen Überblick zu schaffen, werden die Studien über Tomaten, Kiwis, Zitrusfrüchte und Bohnen verwendet.

Redgwell (2007) isolierte das Zellwandmaterial aus reifen Äpfeln, Kiwis sowie Tomaten und untersuchte diese auf ihre physiologischen Eigenschaften. Dabei fand er heraus, dass sich

während der Reifung die strukturellen Eigenschaften der Zellwand von Äpfeln deutlich von denen der Kiwi und Tomate unterscheiden.

Charakteristisch für das Reifen von Tomaten und Kiwis ist das Weichwerden der Frucht, welches durch die Veränderung der Zellwandpolysaccharide (insbesondere Pektin) verursacht wird. Reife Äpfel besitzen jedoch eine knackige, feste Textur. Redgwell (2007) stellte fest, dass Pektin nur geringfügig abgebaut wird.

Varela (2007) untersuchte die Texturveränderungen von „Fuji“ Äpfeln, die bei der Zugabe von Calciumchlorid auftreten. Calcium ist ein grundlegendes Element für die Struktur, Funktion und Stabilität der Zelle. Bei der Verarbeitung kommt es zum Verlust der Festigkeit, hauptsächlich infolge von enzymatischer Hydrolyse der Pektinstoffe der Zellwand, der Reaktion der pectolytischen Enzyme sowie der Verringerung von Zellwänden.

Die Textur wurde mittels TA-XTplus Texture Analyser gemessen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Calciumkonzentration, die Einwirkzeit sowie die Lagerdauer einen großen Einfluss auf die Festigkeit haben. Dies stimmt mit den vorhergehenden Forschungsarbeiten überein. Die Zugabe von 1 % Calciumchlorid wirkt dem Weichwerden des Apfels entgegen. Die Zellwand und die Mittellamelle werden gestärkt.

Hwang (2003) studierte die katalytische Wirkung von Pectinesterase aus Tomaten und Zitrusfrüchten. Die Extraktion der Pectinesterase wird mittels Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms erfolgt durch Titration mit 0,01 M NaOH- Lösung bei 25°C und einer Reaktionsdauer von 5 Minuten. 1 ml Pectinesterase wird zu 15 ml 0,5 %iger Pektinlösung (Pektin C, Veresterungsgrad 67 %) zugegeben und auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Eine Pectinesterase-Einheit entspricht der Menge Enzym, die pro Minute 1 µmol Carboxylgruppen freisetzt.

Er ermittelt 78,4 units/mg Protein in der Tomate und 56,0 units/mg Protein in Zitrusfrüchten. In Tomaten wird die Pectinesterase bei pH-Werten zwischen 2,5 und 8,5 und bei einer Temperatur von über 70°C inaktiviert. Das pH-Optimum liegt bei pH= 7,5 bis 8,5. Sowohl die Pectinesterase aus Tomaten, als auch die aus Zitrusfrüchten, weisen die höchste Aktivität bei 65°C auf. Die Pectinesterase aus Zitrusfrüchten besitzt ihr pH-Optimum bei pH= 6,5 und 8,5. In sauren Bereich wird sie gehemmt.

Mnkeni (1999) erforschte den Einfluss der Blanchierdauer, der Salzkonzentration sowie der Fermentation auf die Textur von grünen Bohnen. Die Bohnen wurden 1, 10 und 20 Minuten lang bei 90°C blanchiert und in 3,08 %iger und 4,6 %iger Salzlösung fermentiert. Die pectolytische Enzymaktivität wurde in frischen und fermentierten Bohnen gemessen. Die Textur von fermentiertem Gemüse wird durch den Reifegrad, die Lagerung und die Behandlung der

Rohware beeinflusst. Aber auch die Salzkonzentration, die Enzyme und Säuren spielen eine große Rolle.

Aus den vorhergehenden Studien fand man heraus, dass es eine Wechselbeziehung zwischen der Gurkenfestigkeit und der pectolytischen Enzymaktivität gibt, wenn eine Behandlung in Salzlösung durchgeführt wurde.

Mnkeni (1999) konnte 0,71 Pectinesterase-units und 1,12 exo-Polygalacturonase-units in einem Gramm Bohnen nachweisen. Außerdem fand man heraus, dass durch ein 1-minütiges Blanchieren der Bohnen die Aktivität der Pectinesterase und der exo-Polygalacturonase auf 50 % bzw. 85 % sinkt. Bei einer Blanchierzeit von 10 Minuten wurden nur sehr geringe Mengen dieser Enzyme ermittelt. Nach 20 Minuten wurden sie inaktiviert.

Laut Mnkeni wird die Pectinesterase in Gurken beim Blanchieren von 20 Minuten bei 75°C komplett inaktiviert. Während die exo-Polygalacturonase jedoch schon bei einer 5-minütigen Erhitzung auf 65°C gehemmt wird. Demzufolge ist die Pectinesterase thermisch stabiler.

Das pH-Optimum von Pectinesterase aus grünen Bohnen liegt bei pH= 6,0 und 8,5. Ab einen pH-Wert unter 3,0 beginnt die Inaktivierung. Die exo-Polygalacturonase zeigt die höchste Aktivität bei pH= 4,8 und 5,5 auf.



### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Apfelsorten

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung pectolytischer Enzymaktivitäten im Apfel. Zum Einsatz kommen die Apfelsorten Idared und Jonagold. Letztere wird nur für die ersten Analysen verwendet. Die untersuchten Tafeläpfel Idared werden in Brandenburg angebaut. Sie gehören zu der Qualitätsklasse II (Querdurchmesser von 70-80 mm).

Die folgende Tabelle zeigt die wichtigsten Merkmale.

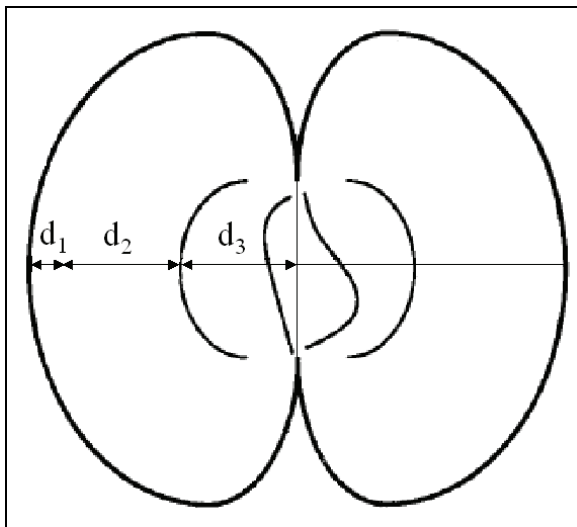
Tabelle 1: Merkmale von Idared und Jonagold

	<b>Idared</b>  (www.nyapplecountry.com)	<b>Jonagold</b>  (www.nyapplecountry.com)
<b>Geschmack</b>	mild mit schwachem Aroma	süß mit feiner Säure
<b>Aussehen</b>	mittel bis große Frucht; hell gelbes bis grünliches Fruchtfleisch	mittel bis große Frucht; cremefarbenes Fruchtfleisch
<b>Lagerfähigkeit</b>	sehr gut	gut
<b>Verwendung</b>	- Apfelmus und -kompott - zum Kochen, Backen und Einfrieren geeignet	- Apfelmus und -kompott - zum Kochen, Backen und Einfrieren geeignet
<b>Verfügbarkeit</b>	Oktober bis August	Oktober bis Mai

Um eventuelle Reifeschwankungen, die zu Textur- und Enzymaktivitätsveränderungen führen können, auszuschließen, verwendet man Äpfel der gleichen Charge. Bei den Versuchen werden die Proben, wie im Abschnitt 3.2 beschrieben, vorbereitet. Dabei variiert die Herstellung der Enzymextrakte. Diese entstehen zum einen mit der Ammoniumsulfatfällung und zum anderen mit der Ultrafiltration.

Außerdem wird die Aktivität der pectolytischen Enzyme in drei verschiedenen Apfelzonen untersucht. Dafür werden Enzymextrakte aus Apfelschalen, Fruchtfleisch und Kerngehäuse hergestellt. Letzteres wird ohne Kerne aufbereitet, da diese eventuell die Herstellung problematisch machen. Zudem geht man davon aus, dass in den Apfelkernen keine pectolytische Enzymaktivität vorhanden ist.

In der nachfolgenden Abbildung ist die Unterteilung der einzelnen Apfelzonen schematisch dargestellt.



d<sub>1</sub> ...verwendeter  
„Durchmesser“ für  
das Apfelschalensextrakt  
**ca. 0,3 cm**

d<sub>2</sub> ...verwendeter  
„Durchmesser“ für das  
Fruchtfleischextrakt  
**ca. 2,0 cm**

d<sub>3</sub> ...verwendeter  
„Durchmesser“ für das  
Kernhausextrakt  
**ca. 1,5 cm**

Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Unterteilung in 3 Apfelzonen

Um die Verteilung der pectolytischen Enzyme in den einzelnen Bereichen des Apfels zu untersuchen, werden drei Enzymextrakte hergestellt. Um eine möglichst genaue Unterteilung durchzuführen, betrachtet man den Apfel als kreisförmige Figur. Folglich kann in der Apfelhälfte, wie in Abbildung 8 zu sehen, ein sogenannter „Durchmesser“ von ca. 8 cm eingezeichnet werden. Mit Hilfe dieses „Durchmessers“ erfolgt die Einteilung der zu untersuchenden Zonen.

Bei dem Enzymextrakt aus Schalen wird ca. 0,3 cm vom Apfeldurchmesser geschält. Halbiert man den Apfel, ist der Bereich des Kerngehäuses sehr gut sichtbar. Deshalb ist es einfacher, erst die Schalen und dann das Kerngehäuse zu entfernen. Als Rest bleibt das Fruchtfleisch übrig.

### 3.2 Herstellung der Enzymextrakte

Die zu untersuchenden Enzyme PE und PG liegen in dem Apfel in sehr geringen Konzentrationen vor. Um diese Enzyme untersuchen zu können, müssen diese aus dem Apfel extrahiert und aufkonzentriert werden. Für die ersten Untersuchungen trennt man die Proteine nach der Extraktion durch eine Ammoniumsulfatfällung ab. Da Enzyme thermisch labil sind, werden die gesamten Herstellungsschritte bei 4°C ausgeführt.

#### *Zerkleinerung des Gewebes und Extraktion:*

100 g gekühlte bzw. tiefgefrorene Äpfel werden mit 100 mg Saponin in einer 1 M NaCl-Lösung mittels Mixer zerkleinert, um auch die zellwandgebundenen Enzyme freizusetzen. Das muss sorgfältig erfolgen, damit ein möglichst vollständiger Zellaufschluss erzielt wird. In der homogenisierten Probe sind alle Konzentrations-, Temperatur- und Eigenschaftsunterschiede ausgeglichen. Danach folgt ein zweistündiges Rühren, das die Extraktion der Enzyme aus dem Apfel bewirkt.

#### *Aufkonzentrieren der Enzyme:*

Die Abtrennung störender Inhaltsstoffe steht hier im Vordergrund. Nach dem Rühren werden die festen Bestandteile durch ein Nylontuch abgetrennt und das Filtrat zentrifugiert (4°C, 25 Minuten, 19000 x g). Die Aufkonzentrierung lässt sich entweder mittels Ammoniumsulfatfällung oder Ultrafiltration durchgeführt.

##### 1.) Ammoniumsulfatfällung

Ammoniumsulfat wird dem klaren Überstand bis zu einer Sättigung von 30 % zugegeben, 30 Minuten gerührt und zentrifugiert (4°C, 25 Minuten, 19000 x g). Das Präzipitat ist aufgrund der nichtvorhandenen Aktivität zellwandabbauender Enzyme verworfen worden.

Es schließt sich eine weitere Ammoniumsulfatzugabe bis zu einer Sättigung von 80 % an. Nach dem Zentrifugieren (4°C, 25 Minuten, 19000 x g) wird das Präzipitat in ca. 25 ml Dialyselösung (0,1 M NaCl und 0,01 M Acetatpuffer pH= 5,6) gelöst.

## 2.) Ultrafiltration

Aufgrund von Zeitersparnis und besseren Erhalts der Enzymaktivitäten wird die Ammoniumsulfatfällung durch die Ultrafiltration ersetzt.

Die Ultrafiltration wird mittels Vivaflow 200 durchgeführt. Sie dient zur Aufkonzentrierung der Proteinlösung durch Filtration über eine semipermeable Membran. Die Proteinlösung wird mit Hilfe von Druck durch die Membran gedrückt. Bei der Membran handelt es sich um eine dünne, feinporige Wand. Diese hält alle Moleküle, die oberhalb der membranvorgegebenen Porengröße sind, zurück, sodass Wasser, Salz-Ionen u.a. durch die Membran ungehindert gelassen werden. Die Trennung der Proteinlösung erfolgt in zwei Fraktionen. Das Retentat enthält die vor der Membran aufkonzentrierten Moleküle. Das Permeat enthält somit alle restlichen Stoffe, die die Membran passieren.

Der klare Überstand wird mittels Ultrafiltrationssystem bei einem Druck von 1 bar auf ca. 35 ml aufkonzentriert. Die Membran spült man anschließend mit 10 ml gekühlter ( $T= 4^{\circ}\text{C}$ ) 0,5 M NaCl-Lösung, die zum Retentat zugegeben wird.

In der nachfolgenden Abbildung ist das Ultrafiltrationssystem zu sehen.



Abbildung 8: Aufkonzentrierung mit Hilfe der Ultrafiltration

### *Dialyse:*

Nach der Ammoniumsulfatfällung bzw. Ultrafiltration wird die Dialyse zweimal für mindestens 4 Stunden durchgeführt. Durch die Zugabe von 0,001 M Natriumazid wird das Wachstum von Mikroorganismen verhindert.

Der Prozess dient der Abtrennung löslicher Stoffe mit niedriger Molekülmasse aus einer Lösung hochmolekularer Stoffe mittels halbdurchlässiger Membran, die aus Cellulose besteht.

Nach der Dialyse werden die Enzymextrakte aufgrund einer geringen Niederschlagsbildung nochmals zentrifugiert. Mit der Bestimmung des genauen Volumens der Probe können die ermittelten Enzymaktivitäten auch auf das Apfelpgewicht bezogen werden.

Die so hergestellten Enzymextrakte werden direkt für die Untersuchungen verwendet.

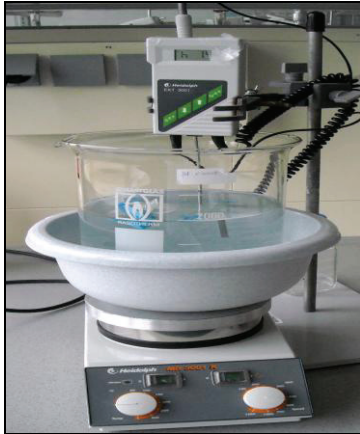


Abbildung 9: Herstellungsschritt Dialyse

### 3.3 Untersuchungsmethoden der Enzymextrakte

Die Enzymextrakte werden in Bezug auf PE-, exo- und endo-Polygalacturonase-Aktivität untersucht.

#### 3.3.1 Pectinesterase

Die Aktivität von PE wird durch Titration bestimmt. Aufgrund der Wirkung von PE auf hochverestertes Pektin werden Carboxylgruppen freigesetzt. Diese führen zur Absenkung des pH-Wertes in der Analysenlösung. Die Messung erfolgt unter Konstanthalten des pH-Wertes mittels Autotitrator. Natronlauge (NaOH) wird beim Absenken des pH-Wertes automatisch bis zum Erreichen des gewünschten Werts zudosiert. Der Verbrauch dieser Lauge pro Minute ist ein Maß für die Aktivität der PE.

Als Substrat dient eine 0,5 %ige Pektinlösung. Pektin C (Veresterungsgrad 70- 75 %) wird in 0,15 M NaCl gelöst. Zu 30 ml Substrat gibt man 3 ml Enzymextrakt und titriert es mit 0,01 M NaOH-Maßlösung unter Verwendung eines Autotitrators auf den jeweiligen pH-Wert. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgen bei pH 7,0. Bei der Bestimmung des pH-Optimums wird die Reaktionslösung auf pH-Werte von 5,0 bis 9,0 titriert. Die Analysenlösung wird während der



gesamten Bestimmung mittels Wasserbad und unter ständigem Rühren eines Magnetrührers auf 30°C temperiert.

Eine PE-Einheit entspricht der Menge Enzym, die pro Minute unter den gewählten Bedingungen 1 µmol Carboxylgruppen freisetzt (Meurer, 1991). Der Gehalt an PE wird wie folgt berechnet:

$$u_{\text{PE}}/\text{ml} = \frac{\mu\text{mol freigesetzte COO}^-}{\text{Zeit in min} \times \text{ml Enzymextrakt}} \quad (1)$$

Da 1 ml 0,01 M NaOH mit 10 µmol COO<sup>-</sup> korrespondiert, ergibt sich:

$$u_{\text{PE}}/\text{ml} = \frac{\text{Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml} \times 10}{\text{Zeit in min} \times \text{ml Enzymextrakt}} \quad (2)$$

Alle Ergebnisse der PE-Aktivitäten beziehen sich zusätzlich auf das Rohwarengewicht, um die Werte miteinander vergleichen zu können.

Um die katalytische Aktivität der PE zu bestimmen, wird die Zunahme der Produktkonzentration mit Hilfe des Verbrauches an 0,01 M NaOH-Maßlösung in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Zur Ermittlung des pH-Optimums werden in der Analysenlösung pH-Werte von 5,0 bis 9,0 eingestellt. Bei den alkalischen pH-Werten (ab pH= 8,0) besteht die Gefahr einer chemischen Entesterung des Substrates. Deshalb wird ein Blindwert ohne Enzym ermittelt und dieser vom Messwert mit Enzym abgezogen.

Wie die Versuche in dieser Arbeit gezeigt haben, eignet sich der Autotitrator für die beiden mikrobiellen Enzymextrakten Rohaspect® MPE und NovoShape® (aus *Aspergillus*), jedoch nicht für die Apfel-PE. Daher wurde der Autotitrator durch den Dosimaten ersetzt.

Wie schon erwähnt, hält der Autotitrator den pH-Wert während der gesamten Versuchsdauer konstant. Dies geschieht durch die sofortige Zudosierung von NaOH, wenn der pH-Wert unter den gewünschten Wert absinkt. Dieses Prinzip wird auch bei dem Dosimaten angewendet. Die Zudosierung erfolgt hier manuell. Alle Versuchsbedingungen (Temperatur, Reaktionsdauer, pH-Wert) müssen beibehalten werden.

Der Dosimat ist eine Titrierstation, die ein präzises Dosieren der NaOH-Maßlösung ermöglicht. Er besteht aus einer 1 ml-Wechseleinheit und der Reagenzienflasche mit Natronlauge, die über Schläuche miteinander verbunden sind. Durch einen Tastendruck wird die Base direkt in die

Analyselösung getropft. Der Verbrauch an NaOH-Maßlösung ist auf dem Display des Dosimaten zu sehen.



Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Bestimmung von PE mittels Dosimaten

Aufgrund der geringen PE-units stellt sich die Frage, ob eventuell ein Inhibitor im Enzymextrakt vorhanden ist. Deshalb wird ein Hemmstofftest durchgeführt. Als erstes wird die Aktivität des mikrobiellen Rohapect® MPE-Enzyms mit 1 M NaCl und danach mit destilliertem Wasser untersucht. Nun wird 10 ml Rohapect® MPE zum Substrat gegeben und nach einer kurzen Einwirkzeit von 30 Sekunden erfolgt die Zugabe von 10 ml Apfelschalenextrakt. Anhand der Enzymaktivität kann festgestellt werden, ob die geringe Konzentration von PE die Folge eines Inhibitors ist.

### 3.3.2 Exo-Polygalacturonase

Die exo-PG-Aktivität basiert auf der Zunahme der reduzierenden Gruppen in einer polygalacturonsäurehaltigen Analysenlösung. Zur Bestimmung dieser wird die Methode nach HONDA (1982) mit 2-Cyanacetamid angewendet. Die Messung der Analysenlösung erfolgt bei einer Wellenlänge von 276 nm. Laut Honda (1982) liegt das Absorptionsmaximum der Reaktionsprodukte, die sich aus der direkten Kondensation von 2-Cyanacetamid mit den reduzierten Gruppen bilden, bei 276 nm.

Der Enzymextrakt wird durch eine Gelfiltration (PD-10 Gelfiltrationssäule mit Sephadex G-25 Medium) gereinigt und zusammen mit 0,1 %iger Natriumpolygalacturonat-Lösung und 0,2 M

Acetatpuffer (pH= 5,0) 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Da  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Enzymaktivität steigern, enthält dieser Puffer 0,4 mM Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ).

Nach der Zugabe von 1 %iger 2-Cyanacetamid-Lösung und 0,2 M Boratpuffer (pH= 9,0) erhitzt man Analysenlösungen, die sich in verschlossenen Reagenzgläsern befinden, 11 Minuten lang im siedenden Wasserbad ( $T= 99,9^\circ\text{C}$ ). Mittels Eisbad erfolgt die Abkühlung dieser auf Raumtemperatur. Innerhalb von einer Stunde wird die Extinktion bei 276 nm gemessen.

Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der Enzymextrakt frei von Polysacchariden ist. Deshalb muss ein Enzymblindwert, in dem das Substrat durch Wasser ersetzt wird, für alle Messungen ermittelt werden. Der Gesamtblindwert setzt sich zusammen aus der Differenz von Substrat- und Pufferblindwert und der zusätzlichen Addition mit dem Enzymblindwert (siehe Anlage 2). Von den Messwerten wurde der Gesamtblindwert abgezogen.

$$B_G = B_S - B_P + B_E \quad (3)$$

Zur Bestimmung der Aktivität wird eine Eichgerade mit einer 0,01 M D-Galacturonsäure-Stammlösung erstellt. Dafür werden Standardlösungen mit 50 bis 200  $\mu\text{mol}$  Galacturonsäure/l hergestellt und genau wie oben beschrieben gemessen, jedoch ohne 3-stündige Inkubation. Unter Berücksichtigung der Geradengleichung kann die Berechnungsformel erstellt werden.

*Gleichung der Eichkurve:*

$$y = 0,0037 x + 0,0081 \quad (4)$$

*Berechnungsformel:*

$$u_{\text{PG}} = \frac{\Delta E - 0,0081}{0,0037} \times \frac{1}{1000 \times \text{Inkubationsdauer in min} \times \text{Enzymmenge in ml}} \times \frac{3,5 \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}} \quad (5)$$

$\Delta E$  ...Differenz von Probenextinktion und Gesamtblindwert

1000 ...Umrechnungsfaktor von nmol in  $\mu\text{mol}$

$\frac{3,5 \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$  ...Berücksichtigung der Verdünnung durch die Gelfiltration

Um das pH-Optimum von exo-PG zu bestimmen, werden Acetatpuffer von pH= 3,5 bis 5,6 verwendet.

### 3.3.3 Endo-Polygalacturonase

Die endo-PG hydrolysiert die Glycosidbindungen der Polygalacturonsäure. Die Abnahme der Viskosität einer Pektinlösung ist ein Maß für die Aktivität dieser Enzyme (Ruttloff, 1996).

Für die Messung stand ein Ubbelohde Viskosimeter mit einer Steuereinheit AVS 350 zur Verfügung. Dieser misst die Durchlaufzeiten in der Kapillare selbständig. Gemessen wird die Zeit, die die Reaktionslösung benötigt, um die verwendete Kapillare von der Firma Schott Typ 53210/I (innerer Durchmesser: 0,63 mm) zu durchfließen. Die Konstante K beträgt 0,01021. Die ermittelte Durchlaufzeit wird im Display angezeigt.

Als Substrat dient eine 0,4 %ige Pektinlösung, die in einem 0,12 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH=5,5) gelöst wird. 12,5 ml Substrat wird mit 2,5 ml Enzymextrakt gemischt und in das Kapillarviskosimeter gefüllt. Ein Wasserbad temperiert die Reaktionslösung auf 30°C über die gesamte Analysedauer. Nach einer Einwirkzeit von 3 Minuten wird die Reaktionslösung im Viskosimeter durch zwei Meßebenen (Lichtschranken) hochgepumpt. Der Druck fällt ab und dann beginnt die erste Messung ( $t_0$ ) der Durchlaufzeit. Nach 10 Minuten wird die Messung ( $t_1$ ) wiederholt.

Bei der Anwendung folgender Berechnungsformel dient die Änderung des Kehrwertes der spezifischen Viskosität als Maß für die Enzymaktivität:

$$\Delta \frac{1}{\eta_{\text{spez.}}} = \frac{t_W}{t_1 - t_W} - \frac{t_W}{t_0 - t_W} \quad (6)$$

$\eta_{\text{spez.}}$  ...spezifische Viskosität

$t_W$  ...Durchlaufzeit von reinem Wasser

$t_0$  ...Durchlaufzeit der Reaktionslösung (1. Messung: nach 3 Minuten Einwirkzeit)

$t_1$  ...Durchlaufzeit der Reaktionslösung (2.Messung: 10 Minuten nach  $t_0$ )

Eine endo-PG-Einheit entspricht der Menge Enzym, die  $\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$  einer Polygalacturonsäure-Lösung in 10 Minuten um 0,001 Einheiten senkt.

Die CR-Methode (Comparison ratio method) dient der Differenzierung zwischen endo- und exo-PG. Diese Methode ist schnell durchführbar, da schon nach kurzer Zeit feststeht, ob es sich um eine endo- oder exo-PG-Aktivität handelt (Tam, 1983).

$$CR = \frac{\Delta \frac{1}{\eta_{\text{spez.}}}}{\Delta \mu\text{mol reduzierende Gruppen}} \quad (7)$$

Wenn der ermittelte CR-Wert zwischen 3 und 11,5 liegt, handelt es sich um endo-PG. Für exo-PG sind die CR-Werte deutlich kleiner.

In den Vorversuchen wird der Ablauf der enzymkatalysierten Reaktion über die Abnahme der Substratviskosität in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

Zur Bestimmung des pH-Optimums werden Citrat-Phosphat-Puffer von pH= 3,5 bis 6,0 verwendet.

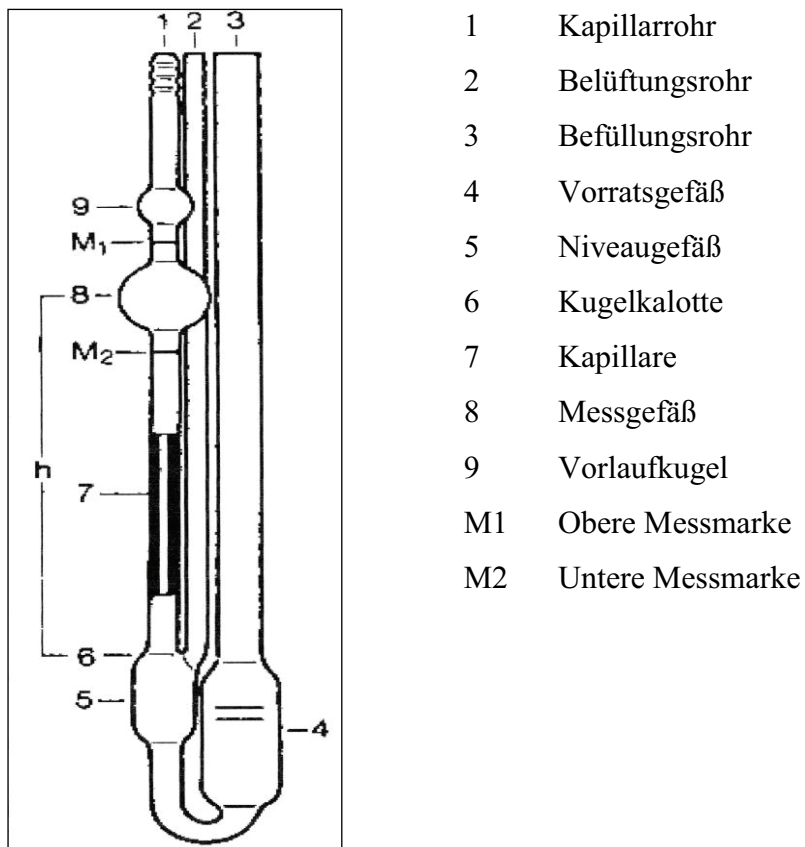


Abbildung 11: Ubbelohde Viskosimeter

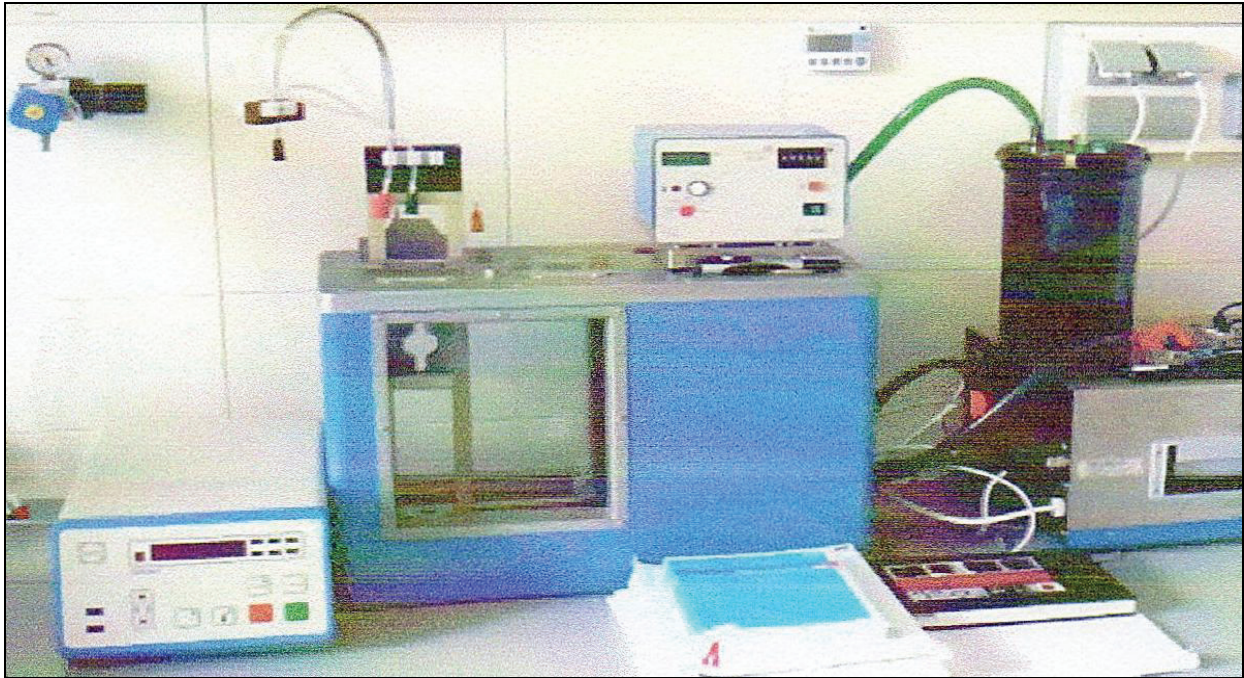


Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Bestimmung der endo-Polygalacturonase

### 3.4 Statistische Methoden

Für die Auswertung der Ergebnisse werden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient verwendet. Die statistischen Methoden dienen als Hilfsmittel, um die Werte miteinander vergleichen zu können sowie signifikante Unterschiede festzustellen.

#### *Mittelwert*

Der Mittelwert dient zum Erhalt eines Durchschnittswertes und schafft einen Überblick über die Gesamtheit der Ergebnisse. Somit können erste allgemeine Aussagen über die Gesamtheit der Enzymaktivitäten getroffen werden.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (8) \quad x_1, x_2, \dots \dots \text{Enzymaktivität; } n \dots \text{Anzahl der Messungen}$$

### Standardabweichung

Die Standardabweichung beschreibt, wie stark die einzelnen Messwerte um den Mittelwert streuen bzw. wie stark sie von ihm abweichen. Die Standardabweichung ist wie folgt definiert:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (9)$$

Je größer die Standardabweichung ist, desto größer ist die Streuung der Messwerte um den Mittelwert.

### Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient (VK) ist wie die Standardabweichung ein Maß für die Streuung. Die Berechnung des VK eignet sich, wenn verschiedene Verteilungen bezüglich ihrer Streuungsverhältnisse miteinander verglichen werden. Der Vergleich bezieht sich dabei auf die gesamte Verteilung und nicht nur auf einzelne Werte. Der VK beschreibt die prozentuale Streuung des Mittelwertes. Der VK wird wie folgt berechnet:

$$\text{VK (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (10)$$

s...Standardabweichung  
 $\bar{x}$ ...Mittelwert

### Korrelationskoeffizient

Mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten (r) kann ein linearer Zusammenhang zwischen 2 Variablen dargestellt werden. Die Berechnungsformel lautet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (11)$$

## **4 Ergebnisse**

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Extraktherstellung und der Untersuchungen der Enzymaktivitäten aus der Apfelsorte Idared dargestellt. Die vollständigen Tabellen und Messergebnisse befinden sich im Anhang.

### **4.1 Vorversuche**

Hier sind die Ergebnisse der Vorversuche aufgezeigt. Mit Hilfe dieser werden die Arbeits- und Wirkungsweisen der einzelnen Geräte, über die noch keine Vorkenntnisse vorhanden sind, erprobt. Des Weiteren untersucht man die vordefinierten Versuchsparameter und modifiziert diese.

#### **4.1.1 Unterschiede zwischen den Enzymextrakttherstellungen**

Um festzustellen, ob es Unterschiede zwischen den beiden Herstellungsverfahren (Ammoniumsulfatfällung und Ultrafiltration) gibt, werden diese hinsichtlich ihrer Handhabung und des Einflusses auf die Enzymaktivität untersucht.

Die Aufkonzentrierung der Enzyme mittels Ammoniumsulfatfällung ist aufwändiger, da die Fällung schrittweise erfolgt und nach jeder Zugabe von Ammoniumsulfat der Extrakt zentrifugiert werden muss.

Während die Ultrafiltration durchgeführt wird, kann zeitgleich die Vorbereitung weiterer Versuche (Substrat-, Pufferherstellung etc.) erfolgen. Für beide Herstellungsverfahren werden ca. 1,5 Arbeitstage veranschlagt.

Bei der Ammoniumsulfatfällung können ca. 30 ml Enzymextrakt produziert werden. Das Volumen des Extraktes mittels Ultrafiltration liegt mit ca. 45 ml deutlich höher. Um reproduzierbare Messwerte zu ermitteln, wird eine große Menge Enzymextrakt für die Versuche benötigt. Aufgrund dieses Zeitersparnis und der großen Probenanzahl ist die Aufkonzentrierung der Enzyme mit Hilfe der Ultrafiltration besser geeignet.

Wichtig für die Untersuchungen ist es, dass die Enzymaktivitäten bei den einzelnen Verfahren bestmöglich erhalten bleiben.



Um den zeitlichen Aufwand gering zu halten, werden die Enzymextrakte der Ammoniumsulfatfällung und Ultrafiltration nur bezüglich ihrer Pectinesterase-Aktivität gemessen.

Die 10-minütige Messung erfolgt mit dem Autotitrator. In der Tabelle 2 sind die ermittelten Werte aufgeführt.

Tabelle 2: Durchschnittliche PE-Aktivität aus zwei verschiedenen hergestellten Extrakten derselben Apfelcharge in units/g Apfel

Messung	Temperatur in °C	Ammoniumsulfatfällung	Ultrafiltration
1	30,0	0,015	0,129
2	30,1	0,011	0,128
3	30,1	0,014	0,095
Mittelwert $\bar{x}$ (n= 3)		0,013	0,117
Standardabweichung $\sigma$ ( $\pm$ )		0,002	0,016
VK		15,38	13,68

An den Messwerten ist zu erkennen, dass durch die Ultrafiltration die PE-Aktivität mit durchschnittlich 0,117 units/g Apfel höher ist als bei der Ammoniumsulfatfällung. Deshalb eignet sich diese Methode besser, um die Enzyme im Extrakt zu erhalten.

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die nachfolgenden Enzymextrakte ausschließlich mit der Ultrafiltration hergestellt.

#### 4.1.2 Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Reproduzierbarkeit der Messmethoden wird durch die Mehrfachbestimmung der Enzymaktivitäten ermittelt. Hierfür werden mehrere Extrakte hergestellt und bezüglich Pectinesterase-, exo- und endo-Polygalacturonase-Aktivität analysiert. Anschließend erfolgt ein Vergleich der Werte miteinander. Der Hintergrund dieser Untersuchung besteht darin, festzustellen, ob die Methoden reproduzierbare Werte liefern. Die Messungen werden, wie im Abschnitt 3.3 beschrieben, durchgeführt.

### *Reproduzierbarkeit der Pectinesterase-Aktivität*

Zu Beginn wird die Methode zur Bestimmung der PE-Aktivität geprüft. Dafür werden zwei industriell hergestellte Enzymextrakte mit Hilfe des Autotitrators untersucht. Die Tabelle 3 spiegelt die gemessenen Werte wider.

Tabelle 3: Mehrfachbestimmung der PE-Aktivität mittels Autotitrator von zwei mikrobiellen Enzymextrakten in units/ml

Probe	Temperatur in °C	Messzeit in min.	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 3)	Standardab- weichung $\sigma (\pm)$	VK
NovoShape®	40,0	5	571,667	7,33	1,28
Rohapect® MPE	30,0	5	276,4	8,52	3,08

Laut den Spezifikationen enthalten die Enzyme von NovoShape® mindestens 10 PE-units/ml (0,5 %iger Pektinlösung, T= 40°C, pH= 3,5) und von Rohapect® MPE mindestens 25 PE-units/ml (0,55 %iger Pektinlösung, T= 30°C, pH= 4,5). Demzufolge müssen die Messwerte mindestens diese PE-units erreichen. Wie aus der Tabelle zu entnehmen, ist dies auch der Fall. Beide Enzymextrakte zeigen sogar deutlich höhere PE-Aktivität. Die ermittelten Werte schwanken kaum. Das belegen die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient. Folglich ist ein Reproduzieren der Messung beider Enzymextrakte mittels Autotitrator möglich.

Außerdem muss der Autotitrator auch reproduzierbare Werte für die Apfelenzymextrakte liefern. Deshalb wird die PE-Aktivität von 2 verschiedenen Enzymextrakten mehrfach bestimmt.

Da schon am Anfang der Vorversuche einige Schwierigkeiten bei der Dosierung am Autotitrator aufkamen, werden die Extrakte auch mittels Dosimat auf PE-Aktivität gemessen. Für diesen Prozess wird statt 30 ml Pektinlösung und 3 ml Enzymextrakt, 200 ml Pektinlösung und 20 ml Enzym eingesetzt. Es ist aus Platzgründen nicht möglich, ein Becherglas mit einem Fassungsvermögen von 400 ml an den Autotitrator anzubauen. Folglich wird der Dosimat eingesetzt.

Die Enzymextrakte sollen erst mit Hilfe des Autotitrators und anschließend mit dem Dosimaten untersucht werden. Beide Methoden benötigen einen Thermostaten. Da nur einer zur Verfügung steht und der Versuchsaufbau sehr komplex ist, wird zuerst die Messung am Autotitrator durchgeführt. Die Bestimmung der PE-Aktivität erfolgt dann einen Tag später mittels Dosimat.

Um die Werte miteinander vergleichen zu können, werden beide Extrakte aus derselben Apfelcharge hergestellt. In Tabelle 4 sind diese Werte aufgelistet.

Tabelle 4: Vergleich der gemessenen PE-Aktivität mittels Autotitrator und Dosimat von zwei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge in units/g Apfel

Extrakt	Temperatur in °C	Messzeit in min.	Autotitrator			Dosimat		
			$\bar{x}$ (n=3)	$\sigma (\pm)$	VK	$\bar{x}$ (n=3)	$\sigma (\pm)$	VK
1	30,0	10	0,141	0,007	4,96	0,014	$3,5 \times 10^{-5}$	0,25
2	30,0	10	0,118	0,046	38,98	0,014	$1,7 \times 10^{-4}$	1,21

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass sich die ermittelten PE-units vom Autotitrator und Dosimaten stark unterscheiden. Zum anderen schwanken die Werte zwischen Extrakt 1 und 2, die mit Hilfe des Autotitrators gemessen wurden, deutlich. Die Ursache dafür ist, dass der Autotitrator mehrfach zu viel 0,01 M NaOH hinzu dosiert hat, sodass der pH- Wert auf ca. 7,5 bis 8,0 ansteigt. Aus diesem Grund konnte das Niveau von 7,0 nicht konstant gehalten werden. Diese Methode eignet sich nicht für so geringe PE-Aktivitäten, da die zu messenden pH-Schwankungen viel zu klein sind.

Die Ergebnisse mittels Dosimat weichen nur sehr gering von einander ab. Beide Extrakte weisen die gleiche PE-Aktivität auf. Deshalb beweisen die Resultate der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten, dass der Dosimat reproduzierbare Werte liefert. Somit werden die nachfolgenden Bestimmungen von Pectinesterase ausschließlich mit dem Dosimaten durchgeführt.

#### *Reproduzierbarkeit der exo-PG-Bestimmung*

Wie bereits erklärt, wird zur Bestimmung der exo-PG-Aktivität eine Eichgerade mit D-Galacturonsäure als Eichsubstanz angefertigt. In den nachfolgenden Abbildungen ist zu erkennen, dass die Gerade von 50 bis 200  $\mu\text{mol/l}$  D-Galacturonsäure linear ist. Die daraus resultierende Eichgerade lautet:  $y = 0,0037x + 0,0081$  und wird in der Berechnung der Enzymaktivität mit berücksichtigt (siehe Gliederungspunkt 3.3.2).

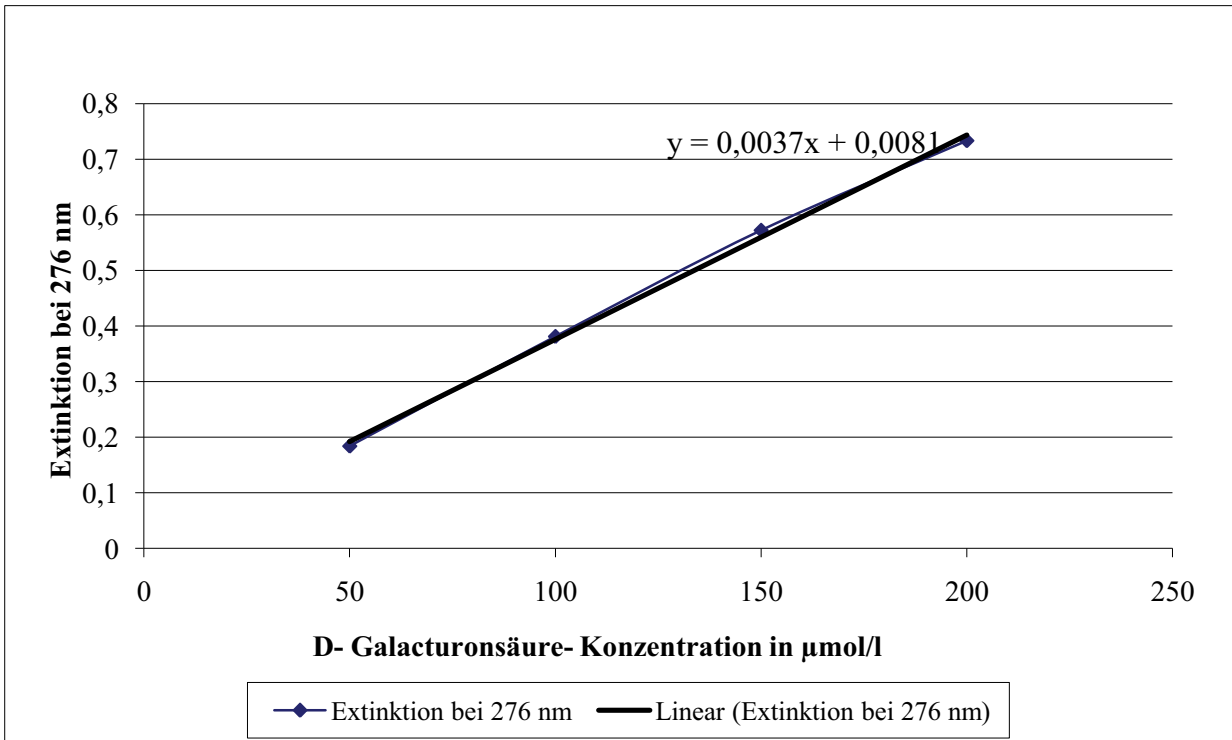


Abbildung 13: Eichgerade zur Bestimmung der exo-PG-Aktivität

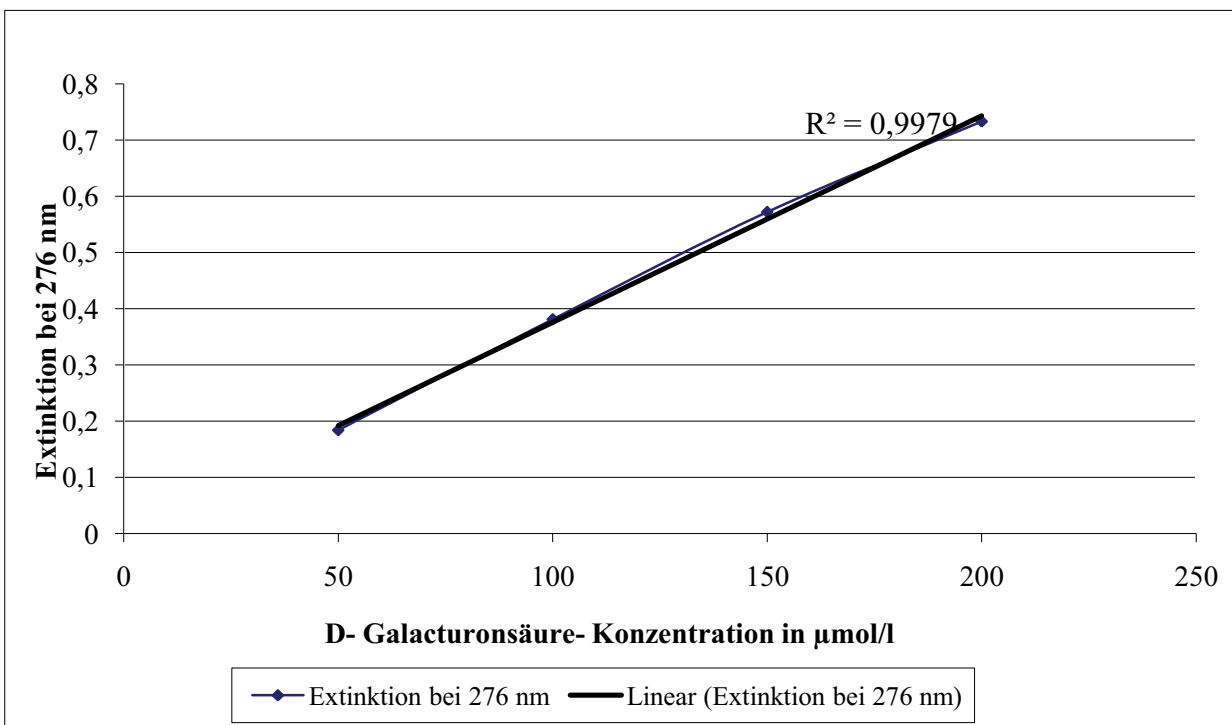


Abbildung 14: Untersuchung der Eichgeraden auf Linearität

Um die Methode nach Honda in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Messwerte zu untersuchen, wird die exo-PG-Aktivität von zwei industriell hergestellten Enzymextrakten sowie von drei Extrakten aus derselben Apfelcharge bestimmt. In der Tabelle 5 sind diese Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 5: Mehrfachbestimmung der exo-PG-Aktivität in units/ml Enzymextrakt

Probe	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 3)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	VK
NovoShape®	$1,4 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-7}$	53,57
Rohapect® MPE	$2,4 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-7}$	35,42
Extrakt 1	$9,3 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-5}$	4,73
Extrakt 2	$9,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-5}$	5,33
Extrakt 3	$8,2 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-5}$	3,41

Laut den Spezifikationen sind beide mikrobiellen Enzyme fast frei von Polygalacturonase. Die Tabelle lässt erkennen, dass sowohl NovoShape® als auch Rohapect® MPE sehr geringe exo-PG-Aktivitäten aufweisen. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen nehmen sehr kleine Werte an. Der Variationskoeffizient ist sehr hoch. Deshalb konnte nicht genau festgestellt werden, ob die Methode nach Honda reproduzierbare Werte liefert.

Die gemessenen Werte der Apfelextrakte belegen, dass alle eine ähnliche exo-PG-Aktivität besitzen. Sie weichen nur gering von einander ab, was die Standardabweichung und der Variationskoeffizient bestätigen. Folglich ist erwiesen, dass sich die Bestimmung nach Honda für die Apfeleenzyme eignet.

#### *Reproduzierbarkeit der endo-PG-Bestimmung*

Bei der Bestimmung der endo-PG-Aktivität werden drei verschiedene Probelösungen sowie Apfelelezymextrakte untersucht. Dies wird (wie in den vorherigen Versuchen) durch wiederholtes Messen der Durchlaufzeit ermittelt. In den Tabellen 6 und 7 sind die Werte zusammengefasst.

Tabelle 6: Mehrfachbestimmung der Durchlaufzeit von drei verschiedenen Probelösungen in s

Probe	Temperatur in °C	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 5)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	VK
reines Wasser	30,1	81,15	0,007	0,01
0,4 %ige Pektinlösung (ohne Enzymzugabe)	30,0	199,97	0,010	0,01
1 %ige NaOH-Lösung	30,0	80,90	0,010	0,01

Tabelle 7: Mehrfachbestimmung der endo-PG-Aktivität von 3 verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge in endo-PG-Einheiten/g Apfel

Extrakt	Temperatur in °C	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 3)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	VK
1	30,0	3,838	0,194	5,05
2	29,9	3,671	0,034	0,93
3	30,0	3,778	0,038	1,01

Aus den Tabellen 6 und 7 ist ersichtlich, dass die einzelnen Messwerte aller 3 Probelösungen wie auch von Extrakt 2 und 3 kaum voneinander abweichen. Die Mittelwerte der Enzymextrakte ähneln sich sehr. Sie liegen zwischen 3,7 und 3,8 endo-PG-Einheiten/g Apfel.

Auffällig ist, dass die Standardabweichung und der Variationskoeffizient bei den drei verschiedenen Probelösungen im Verhältnis zu den Apfelextrakten sehr kleine Werte annehmen. Die Ursache dafür ist, dass diese während der Mehrfachbestimmung im Ubbelohde Viskosimeter verweilen. Somit besitzen sie die gleiche Zusammensetzung und Temperatur innerhalb der wiederholten Messung, folglich streuen die Werte nur minimal.

Bei den Enzymextrakten muss nach 10 Minuten das Viskosimeter sorgfältig gereinigt und getrocknet werden. Erst dann kann die nächste Messung mit frischem Substrat und Enzym erfolgen. Obwohl das Substrat in ausreichender Menge sowie die Extrakte aus derselben Apfelcharge hergestellt wurden, kann es trotzdem zu geringen Abweichungen in ihrer Zusammensetzung kommen. Dadurch ändert sich die Viskosität der Reaktionslösung. Dies

könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass die Standardabweichung und der Variationskoeffizient schwanken.

Die geringe Standardabweichung und der Variationskoeffizient lassen insgesamt erkennen, dass das Viskositätsmessgerät AVS 350 gute reproduzierbare Werte liefert.

#### 4.1.3 Einfluss der Zeit auf die Enzymaktivität

In diesem Versuch wird der Einfluss der Zeit auf die Veränderung der Enzymaktivität untersucht. Die Reaktion zwischen Substrat und Enzym ist zeitlich begrenzt. Erfolgt die Messung über einen zu langen Zeitraum, kann sich dies negativ auf die berechnete Enzymaktivität auswirken.

Wichtig ist, dass die Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass eine Linearität zwischen der Reaktionsdauer und dem Umsatz besteht.

Der Enzymextrakt wird über einen Zeitraum von 15 Minuten hinsichtlich der PE-Aktivität gemessen. In der nachfolgenden Abbildung ist der zeitliche Verlauf der PE-Aktivität eines Apfelenzymextraktes grafisch dargestellt.

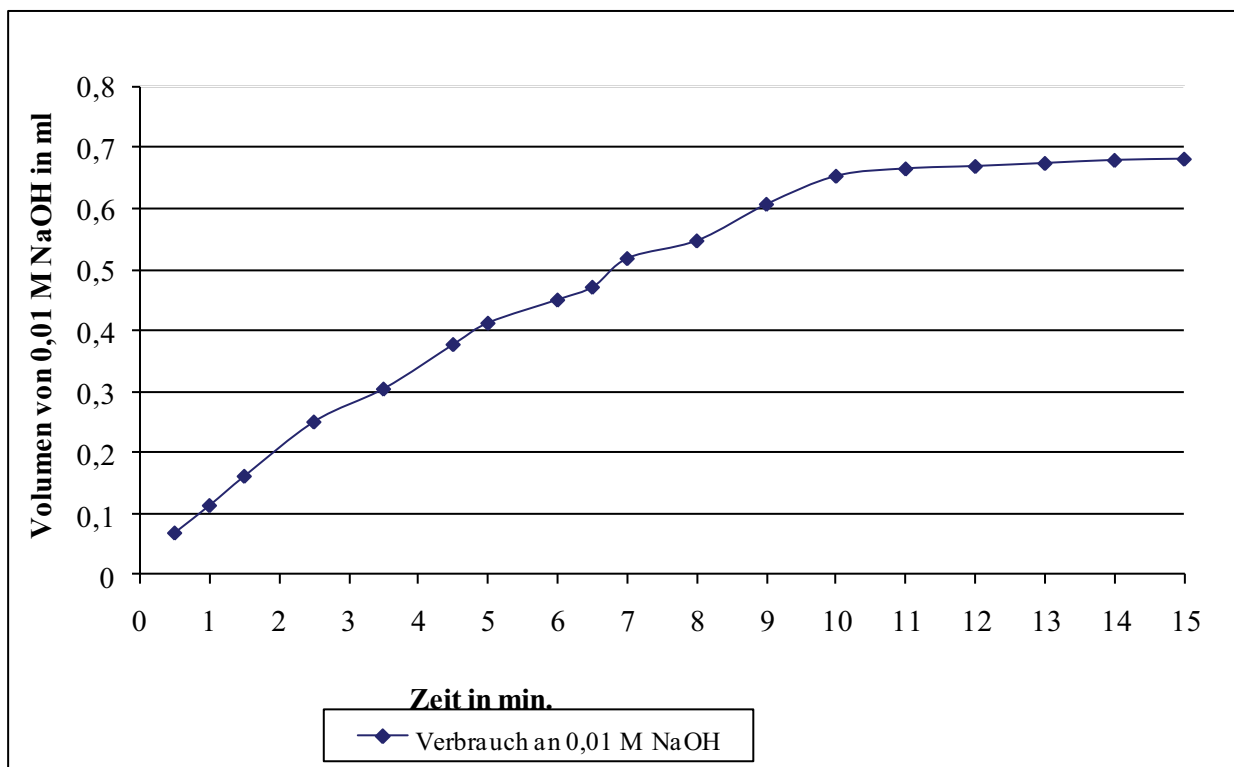


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der PE-Aktivität eines Apfelenzymextraktes bei 30,1 °C

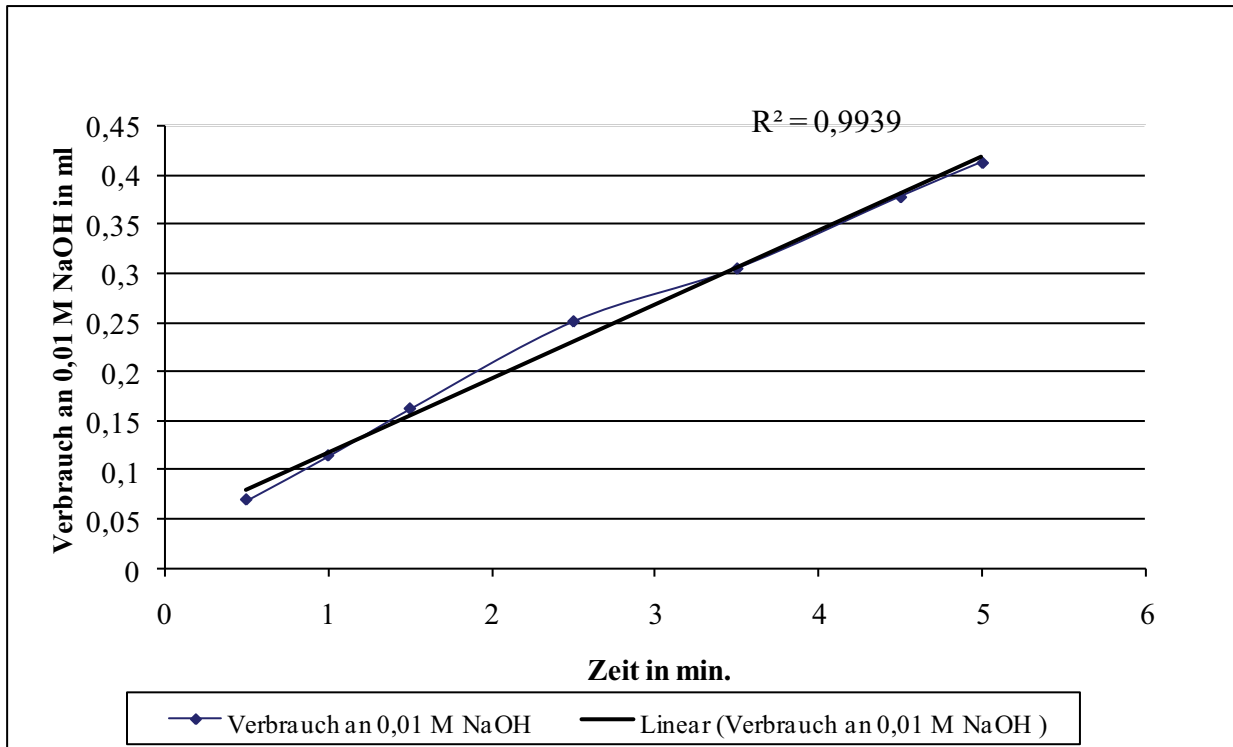


Abbildung 16: Überprüfung der Linearität des zeitlichen Verlaufs von PE

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass bis zu einer Reaktionsdauer von 5 Minuten die Enzymaktivität linear ansteigt. Ab einer Zeit von 6 Minuten sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit fortlaufend, was anhand des Verbrauches an Natronlauge zu erkennen ist. Ursache dafür ist, einerseits die Sättigung des Enzyms mit dem Substrat und andererseits der zunehmende Mangel an Substrat. Das Enzym baut nur noch wenig Pektin ab, sodass die Entstehung freier Carboxylgruppen stark abnimmt. Der Verbrauch an 0,01 M NaOH-Maßlösung sinkt von anfänglich 0,4 ml (Reaktion bis 5 Minuten) auf ca. 0,25 ml (Reaktion von 5 bis 15 Minuten).

Um die PE-Aktivität in Apfelenzymextrakten möglichst optimal untersuchen zu können, werden die nachfolgenden Messungen nur im Bereich der Linearität, also bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten, durchgeführt.

Außerdem wird der Einfluss der Zeit auf die endo-PG-Aktivität untersucht. Hierfür wird die Abnahme der Viskosität einer 0,4 %igen Pektinlösung, die auf der Wirkung des Enzyms Polygalacturonase beruht, über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen.



In der Abbildung 14 ist der zeitliche Verlauf der endo-PG-Aktivität eines Apfelenzymextraktes zu sehen.

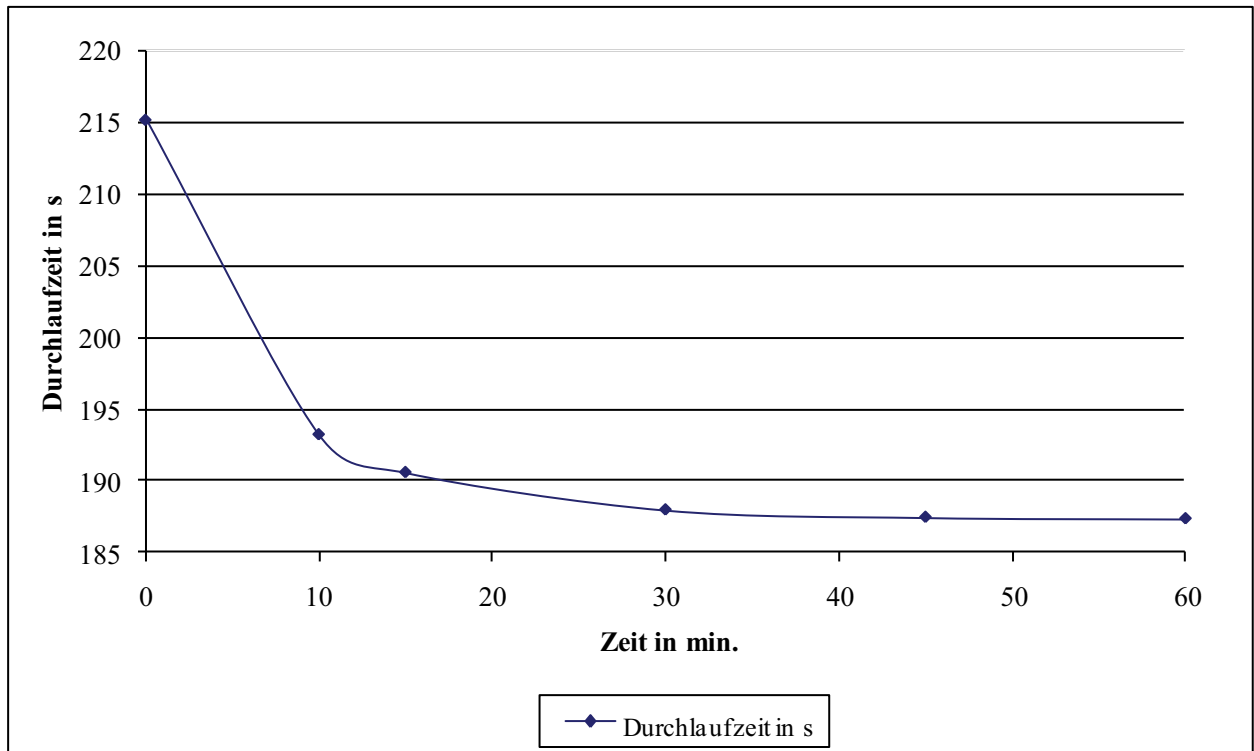


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der endo-PG-Aktivität eines Apfelenzymextraktes

Der Kurvenverlauf bestätigt, dass die Viskosität der Pektinlösung während der ersten 10 Minuten stark abnimmt. Am Anfang der Messung beträgt die Durchflusszeit 215 Sekunden und nach 10 Minuten nur noch 193 Sekunden. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist in diesem Bereich am höchsten. In der Zeit von 15 bis 30 Minuten fällt die Viskosität nur noch leicht ab. Sie nähert sich der Durchlaufzeit von 187 Sekunden an. Ab einer Reaktionsdauer von 30 Minuten erfolgt keine weitere Abnahme der Viskosität, da die endo-Polygalacturonase das Pektin nicht mehr abbauen kann. Der Grund dafür ist, dass das Pektin weitgehend abgebaut ist und somit kein Substrat mehr vorhanden ist. Außerdem tritt eine Sättigung des Enzyms ein.

Damit die endo-PG-Aktivität optimal gemessen werden kann, beträgt die Reaktionsdauer der nachfolgenden Versuche 10 Minuten.

## 4.2 Hauptversuche

Im Anschluss an die Vorversuche erfolgt die Durchführung der Hauptversuche. Dazu werden die in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse berücksichtigt.

### 4.2.1 Aktivität der pectolytischen Enzyme im Apfel

Die durchschnittlichen Aktivitäten der Pectinesterase, exo- und endo-Polygalacturonase werden in diesem Abschnitt gemessen. Die Tabellen 8, 10 und 11 geben die Werte wieder.

Tabelle 8: Aktivität der PE in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Extrakt	Messung	Temperatur in °C	units/ml	units/g Apfel
1	1	30,0	0,044	0,020
	2	30,1	0,045	0,020
2	1	30,0	0,048	0,021
	2	30,0	0,049	0,021
3	1	29,9	0,047	0,021
	2	30,0	0,048	0,021
Mittelwert (n= 6) (u <sub>PE</sub> /g Apfel)			0,021	
Standardabweichung (u <sub>PE</sub> /g Apfel)			4,9 x 10 <sup>-4</sup>	
Variationskoeffizient			2,33	

An der Tabelle ist zu erkennen, dass der Apfel eine geringe Aktivität von Pectinesterase hat. Er enthält durchschnittlich nur 0,021 units/g.

Da dieser Wert sehr klein ist, kommt der Verdacht auf, dass sich im Enzymextrakt eventuell ein Inhibitor befindet. Um dies zu untersuchen, wird ein Hemmstofftest durchgeführt.

Dafür wird zuerst die PE-Aktivität vom mikrobiellen Rohapect® MPE mit 1 M NaCl und mit destilliertem Wasser bestimmt. Im Anschluss daran wird ein Enzymextrakt aus Apfelschalen zusammen mit dem Rohapect® MPE auf PE-Aktivität untersucht, weil möglicherweise auf den Apfelschalen künstliche Wachse oder Rückstände von Düngemittel und Insektiziden sind. Diese könnten die Enzymaktivität hemmen bzw. inaktivieren.

Tabelle 9: Ergebnisse des Hemmstofftestes

Versuch	Zugabe in ml				Menge Substrat in ml	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml
	Rohapect® MPE (1: 50 Verdünnung)	Apfel-enzym	1 M NaCl	dest. Wasser			
1	10	-	10	-	200	0,318	0,032
2	10	-	-	10	200	0,577	0,058
3	10	10	-	-	200	0,923	0,092

Bei dem ersten Versuch mit Rohapect® MPE und 1 M NaCl wird weniger Natronlauge verbraucht (ca. 0,3 ml) als bei der Zugabe des Enzyms mit destilliertem Wasser (ca. 0,6 ml). Etwa die Hälfte der Aktivität ist vorhanden. Ursächlich dafür ist, dass NaCl die Enzymaktivität steigert, jedoch nur bis zu einer bestimmten Konzentration (laut Whitaker, 2003: 0,1 bis 0,2 mM). Ist die NaCl-Menge höher, nimmt die Aktivität ab.

Wenn sich ein Inhibitor im Apfelextrakt befinden würde, müsste die Enzymaktivität von Rohapect® MPE bei der Zugabe des Extraktes gehemmt werden. Demzufolge muss der Verbrauch an NaOH-Maßlösung schnell zum Erliegen kommen.

Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen, steigt der Verbrauch an Natronlauge und damit verbunden die Enzymaktivität.

Tabelle 10: Aktivität der exo-PG in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfel-charge

Extrakt	Messung	uPG/ml	uPG/g Apfel
1	1	$8,4 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$
	2	$8,8 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$
2	1	$9,6 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-4}$
	2	$9,9 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4}$
3	1	$9,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$
	2	$9,1 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
Mittelwert (n= 6) (u <sub>PG</sub> /g Apfel)		$4,0 \times 10^{-4}$	
Standardabweichung (u <sub>PG</sub> /g Apfel)		$1,8 \times 10^{-5}$	
Variationskoeffizient		4,46	

Tabelle 11: Aktivität der endo-PG in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfel-charge

Extrakt	Messung	endo-PG/min	endo-PG-Einheiten/ g Apfel
1	1	8,417	3,746
	2	8,350	3,717
	3	8,555	3,808
2	1	8,273	3,714
	2	8,157	3,663
	3	8,205	3,684
3	1	8,785	3,882
	2	8,467	3,741
	3	8,686	3,838
Mittelwert (n= 9) (endo-PG-Einheiten/g Apfel)		3,755	
Standardabweichung (endo-PG-Einheiten /g Apfel)		0,069	
Variationskoeffizient		1,84	

Die Werte aus den Tabellen 10 und 11 belegen, dass die Aktivitäten von Pectinesterase und exo-Polygalacturonase im Apfel deutlich niedriger als von endo-Polygalacturonase sind. Daher ist die Konzentration dieser beiden Enzyme geringer. Nur  $4,0 \times 10^{-4}$  exo-PG-units/g und 0,021 PE-units/g Rohware können ermittelt werden.

Für einen besseren Überblick sind die durchschnittlichen Enzymaktivitäten noch einmal in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Durchschnittliche Enzymaktivitäten aus drei Apfelenzymextrakten derselben Charge

Enzymeinheit	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 6)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	VK
PE-units/g Apfel	0,021	$4,9 \times 10^{-4}$	2,38
exo-PG-units/g Apfel	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-5}$	4,46
endo-PG-Einheiten/ g Apfel	3,755 (n= 9)	0,069	1,84

#### 4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums der pectolytischen Enzyme

In diesem Abschnitt wird der Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit und damit verbunden auf die Aktivität der pectolytischen Enzyme Pectinesterase, exo- und endo-Polygalacturonase untersucht, deren Verlauf in den nächsten Abbildungen grafisch dargestellt ist.

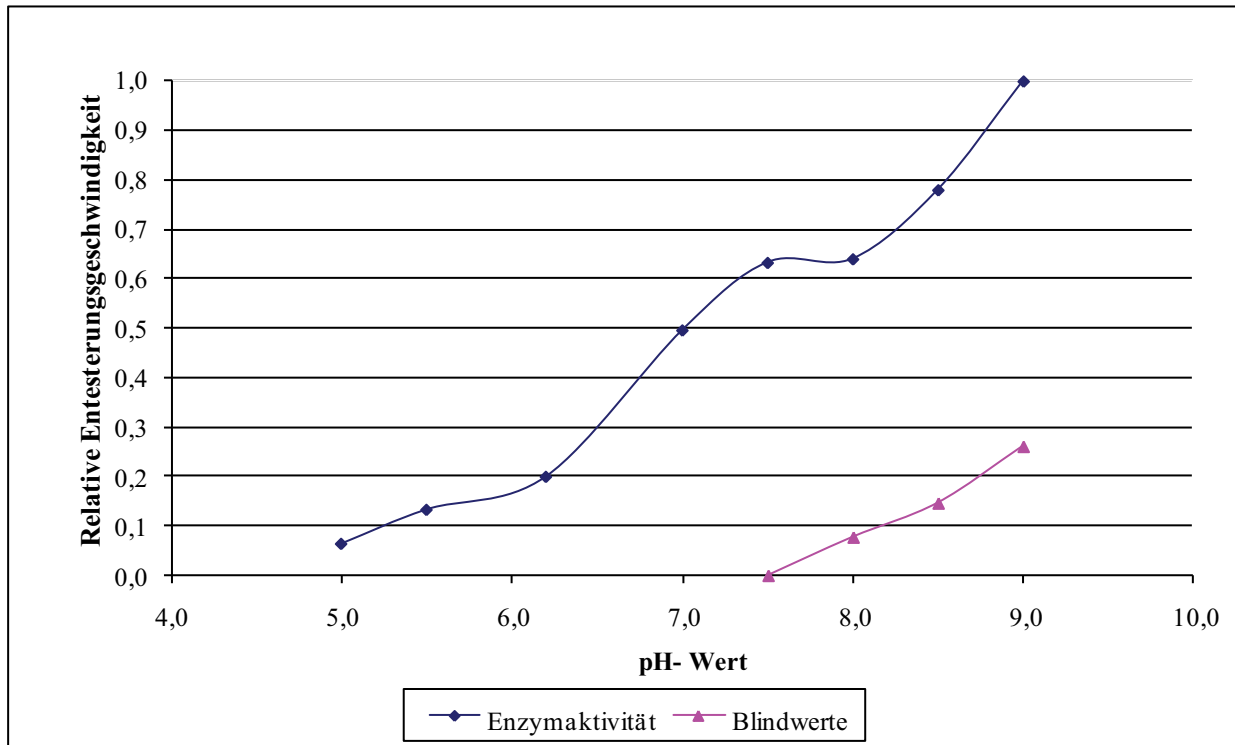


Abbildung 18: PE-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Das pH-Optimum der Pectinesterase liegt mit pH= 9,0 im alkalischen Bereich. Bei den Substraten mit pH-Werten über 7,5 besteht die Gefahr einer chemischen Entesterung des Pektins. Deshalb werden Blindwerte ohne Enzym mitgeführt und vom Messwert mit Enzym abgezogen. Wie aus der Abbildung 18 zu erkennen, wird die Pectinesterase unter einem pH-Wert von 5,0 inaktiviert. Bei pH= 7,0 ist die relative Entesterungsgeschwindigkeit halb so hoch wie bei pH= 9,0.

Für die grafische Darstellung des pH-Optimums von exo- und endo-Polygalacturonase wird der Mittelwert der einzelnen Messungen verwendet.

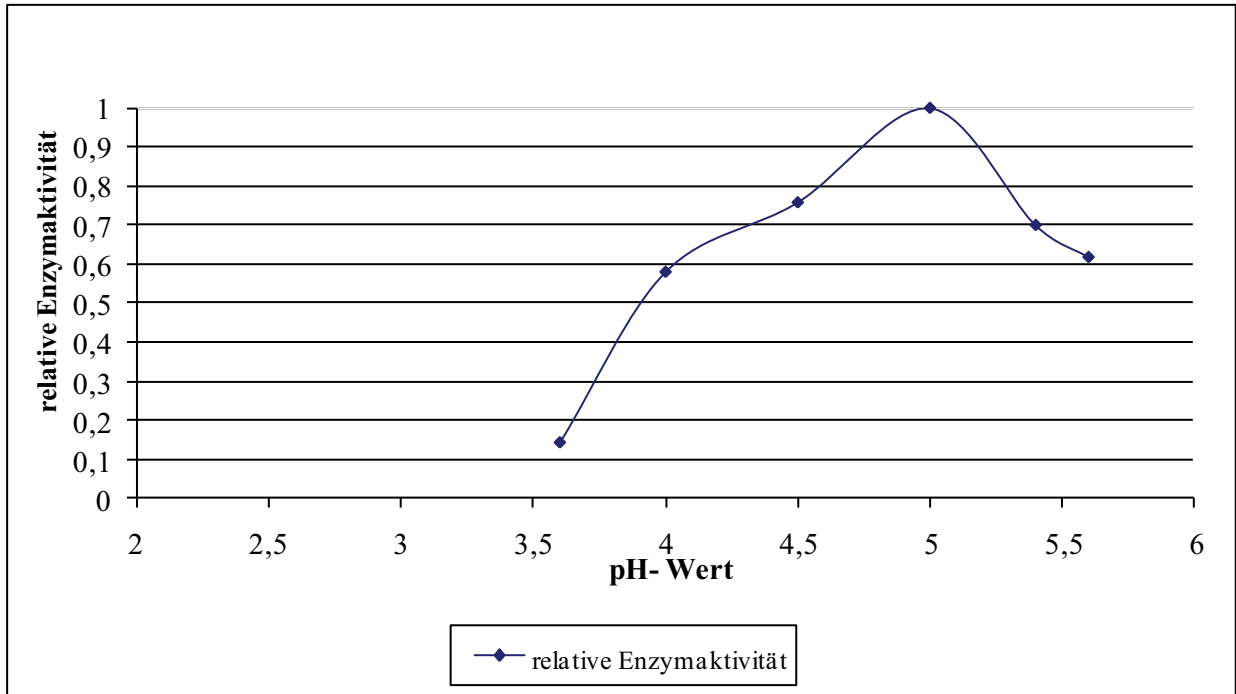


Abbildung 19: Exo-PG-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die exo-Polygalacturonase weist bei pH= 5,0 ihr Aktivitätsoptimum auf. Die Wirkung des Enzyms wird unterhalb von pH= 3,5 gehemmt. Die Abbildung verdeutlicht die Abnahme der Enzymaktivität zwischen pH-Wert 5,0 und 5,6.

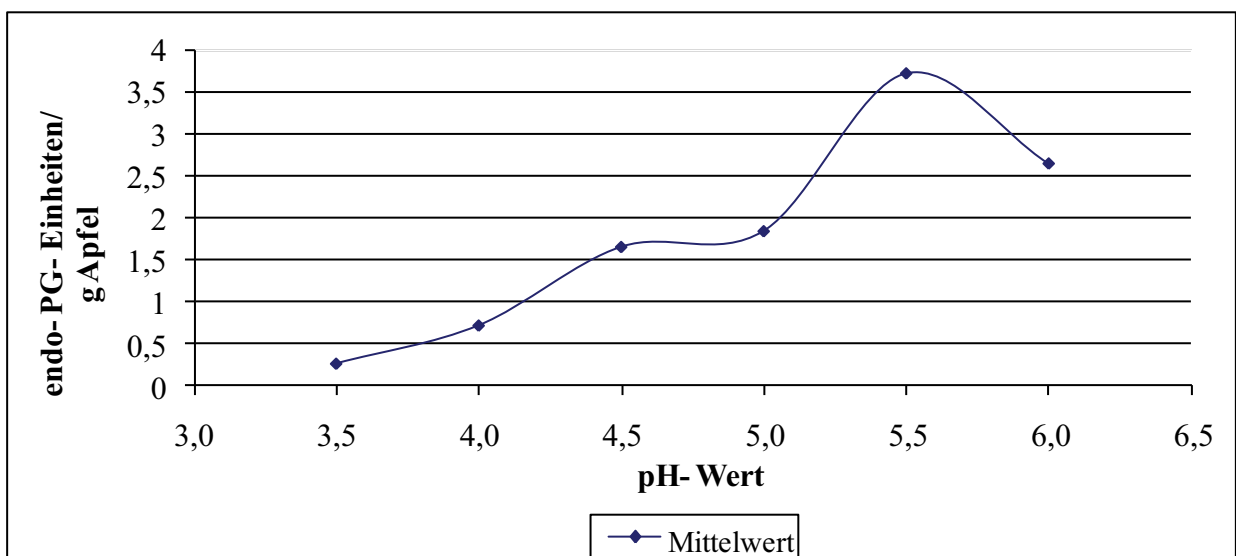


Abbildung 20: Endo-PG-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die höchste Aktivität der endo-Polygalacturonase wurde bei pH= 5,5 gemessen. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei pH kleiner 3,5.

Auffällig ist der Kurvenverlauf zwischen pH= 4,5 und 5,0, da in diesem Bereich die Enzymaktivität nur minimal ansteigt. Die eventuelle Ursache dafür ist, dass bei der Messung von pH-Wert 5,0 die Reaktionslösung 1 Minute länger bei 99,9°C erhitzt wurde. Dadurch kann das Enzym seine maximale Wirkung für diesen pH-Wert nicht erreichen.

#### 4.2.3 Verteilung der Enzyme in den einzelnen Apfelzonen

Um festzustellen, ob die zellwandbeeinflussenden Enzyme in den einzelnen Apfelzonen unterschiedlich stark verteilt sind, wurden drei Extrakte aus Apfelschalen, Fruchtfleisch und Kerngehäuse analysiert. In den nachfolgenden Tabellen sind diese Werte aufgelistet.

Tabelle 13: Messergebnisse der PE-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen in units/g Apfel

Extrakt	Temp. in °C	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 2)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	Variationskoeffizient
Apfelschalen	30,0	0,029	$3,7 \times 10^{-4}$	1,26
Fruchtfleisch	30,0	0,015	$3,9 \times 10^{-4}$	2,68
Kerngehäuse	30,0	0,004	$1,3 \times 10^{-4}$	3,30

Tabelle 14: Messergebnisse der exo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen

Probe	uPG/ml	uPG/g Apfel	Mittelwert $\bar{x}$ (n= 2)	Standardabweichung $\sigma (\pm)$	Variationskoeffizient
			in unit/g Apfel		
Apfelschalen	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$	0,57
	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-4}$			
Fruchtfleisch	$6,2 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-6}$	0,82
	$6,1 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$			
Kerngehäuse	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-6}$	5,79
	$1,2 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-5}$			

Tabelle 15: Messergebnisse der endo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen

Probe	Messung	PG/min	endo-PG-Einheiten/ g Apfel	Mittelwert	Standardab-	Variations-
				$\bar{x}$ (n= 3)	weichung $\sigma (\pm)$	koeffizient
in endo-PG-Einheiten/ g Apfel						
Apfelschalen	1	11,095	4,982	5,074	0,080	1,58
	2	11,278	5,064			
	3	11,530	5,177			
Fruchtfleisch	1	6,626	2,896	2,960	0,088	2,97
	2	7,056	3,084			
	3	6,632	2,899			
Kerngehäuse	1	2,153	0,951	1,020	0,049	4,80
	2	2,394	1,057			
	3	2,381	1,052			

Die hier dargestellten Werte bestätigen, dass alle drei pectolytischen Enzyme die höchste Aktivität in den Apfelschalen haben. Im Fruchtfleisch halbiert sich diese Aktivität. Im Extrakt, der aus dem Kerngehäuse des Apfels gewonnen wurde, sind die geringsten Enzymaktivitäten nachweisbar.

Um ermitteln zu können, wie viel Enzymaktivitäten im kompletten Apfel enthalten sind, wird eine Mengenzbilanz durchgeführt.

Tabelle 16: Bilanz der durchschnittlichen Enzymaktivitäten im Apfel

	Menge in g	in %	PE (units/g Apfel)	endo-PG (units/ g Apfel)	exo-PG (units/g Apfel)
Apfelschale	34,7	23,1	0,029	5,074	$5,3 \times 10^{-4}$
Fruchtfleisch	99,9	66,6	0,015	2,960	$2,7 \times 10^{-4}$
Kerngehäuse	15,4	10,3	0,004	1,020	$5,0 \times 10^{-5}$
Gesamt	150	100	0,017	3,249	$3,5 \times 10^{-4}$



Die Tabelle 16 zeigt, dass 0,017 PE-units/g und damit 2,550 PE-units in einem 150 g schweren Apfel zu finden sind. Die endo-Polygalacturonase ist mit 3,249 Einheiten/g enthalten. Daraus resultiert, dass 487,35 units in der gesamten Rohware nachweisbar sind.

Nur durchschnittlich  $3,5 \times 10^{-4}$  exo-PG-units befinden sich in einem Gramm Apfel. Daher ist die exo-Polygalacturonase mit ca. 0,053 units im Apfel im Gegensatz zu den beiden anderen pectolytischen Enzymen am wenigsten vorhanden.

## 5 Diskussion

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, kann festgestellt werden, dass das Ziel dieser Arbeit erreicht wurde. In diesem Kapitel erfolgt die Auswertung der Ergebnisse, die Darstellung der Probleme sowie die Vorschläge für weitere Untersuchungen.

In dem Abschnitt 4.1.1 kann bewiesen werden, dass es Unterschiede zwischen den Herstellungsverfahren mit Ammoniumsulfatfällung und Ultrafiltration gibt. Wegen der Zeitersparnis, der großen Probenanzahl und dem verbesserten Erhalt der Enzyme (Tabelle 2) erweist sich die Aufkonzentrierung der Enzyme mit Hilfe der Ultrafiltration als besser geeignet. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die Enzymextrakte ausschließlich mit Ultrafiltration hergestellt.

Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen (Punkt 4.1.2) steht die Reproduzierbarkeit der Messwerte. Dafür werden die Enzymaktivitäten durch Mehrfachbestimmung ermittelt.

Zu Beginn erfolgt die Prüfung der Methode zur Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität. Dabei stellt sich heraus, dass die Messung mit dem Autotitrator für die mikrobiellen Enzymextrakte NovoShape® und Rohapect® MPE geeignet ist. Dies bestätigt die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient, die nur kleine Werte annehmen. Darüber hinaus muss der Autotitrator auch für die Apfelenzymextrakte reproduzierbare Werte liefern. Deshalb werden zwei verschiedene Enzymextrakte aus derselben Apfelcharge hinsichtlich ihrer Pectinesterase-Aktivität untersucht. Aufgrund der hohen Standardabweichung der Messwerte kann der Autotitrator nicht zur Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität herangezogen werden.

Schon am Anfang der Vorversuche gab es Probleme bei der Dosierung der 0,01 M NaOH-Maßlösung. Da die Werte innerhalb eines Extraktes sehr schwanken ( $VK = 39,25$ ), ordnet man diese nicht als Ausreißer ein. Bei der Suche nach dem Problem stellt sich heraus, dass die Kommunikation zwischen der pH-Elektrode und dem Autotitrator bei so geringen pH-Schwankungen nicht ausreicht bzw. mangelhaft ist. Somit dosierte der Autotitrator oft zu viel Lauge in die Reaktionslösung, sodass der pH-Wert stark ansteigt.

Um die pH-Schwankungen besser bestimmen zu können, wird die Substrat- und Enzymmenge auf 200 ml bzw. 20 ml erhöht. Es ist trotz Umbau nicht möglich, diese Mengen an Reaktionslösung mittels Autotitrator zu messen. Deshalb wird der Dosimat eingesetzt. Die ermittelten Werte weichen jetzt nur sehr gering von einander ab ( $VK = 0,25$  bis  $1,21$ ). Aus den berechneten Standardabweichungen bzw. Variationskoeffizienten resultiert, dass der Dosimat reproduzierbare Werte liefert.

Für die Apfelextrakte eignet sich die Methode nach HONDA (1982) zur Bestimmung der exo-Polygalacturonase-Aktivität. Alle Extrakte besitzen eine ähnliche Enzymaktivität (ca.  $8,8 \times 10^{-4}$

exo-PG-units/ml). Die Untersuchung der endo-Polygalacturonase-Aktivität mit Hilfe des Ubbelohde-Viskosimeters liefert ebenfalls reproduzierende Werte, wobei sich die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient zwischen den einzelnen Extrakten unterscheidet (Tabelle 7). Der Variationskoeffizient des ersten Extraktes nimmt einen Wert von 5,05 an. Bei den Extrakten 2 und 3 liegt dieser Wert bei 1,00. Eventuelle Verunreinigungen bzw. Reinigungsrückstände (z. Bsp. Natronlauge, Wasser, Aceton) in der Kapillare können dafür verantwortlich sein, dass diese Werte Unterschiede aufweisen.

Weiterhin wird der zeitliche Einfluss der Messung auf die Veränderung der Enzymaktivität analysiert. Dabei stellt sich heraus, dass die Pectinesterase-Aktivität bis zu einer Reaktionsdauer von 5 Minuten linear ansteigt. Folglich ist die Reaktionsgeschwindigkeit in diesem Zeitraum sehr hoch. Ab einer Zeit von 6 Minuten sinkt sie schnell ab. Deshalb erfolgten die weiteren Messungen über eine Reaktionszeit von 5 Minuten. Zudem wird der zeitliche Verlauf der endo-Polygalacturonase-Aktivität dargestellt. Ferner stellt sich heraus, dass die Viskosität der Pektinlösung in den ersten 10 Minuten deutlich abnimmt, danach nur noch leicht. Infolge dessen wurde die endo-Polygalacturonase-Aktivität innerhalb von 10 Minuten gemessen.

Für das Weichwerden von Obst und Gemüse werden in der Regel die pectolytischen Enzyme verantwortlich gemacht. In den Hauptversuchen werden sie hinsichtlich ihrer Enzymaktivität charakterisiert. Dabei fällt auf, dass die Pectinesterase eine sehr geringe Aktivität im Vergleich zu anderen Lebensmitteln zeigt. Mnkeni (1999) konnte beispielsweise 0,71 PE-units/g Bohnen nachweisen. Bei Gurken wurden sogar 0,97 PE-units/g ermittelt. Folglich kommt der Verdacht auf, dass sich möglicherweise ein Inhibitor im Enzymextrakt befindet. Deshalb wird ein Hemmstofftest durchgeführt. Wenn ein Inhibitor im Apfelschalenextrakt vorhanden ist, so müsste theoretisch die Aktivität des mikrobiellen Enzyms bei Zugabe des Extraktes gehemmt werden. Das ist jedoch nicht der Fall. Der Verbrauch an Natronlauge stieg weiter an, sodass sich die Enzymaktivität erhöhte. Also kann festgestellt werden, dass das mikrobielle Enzym nicht gehemmt wird. Demzufolge ist es möglich, dass der Inhibitor auf Apfel-Pectinesterase wirkt, jedoch nicht auf mikrobielle Enzyme. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass im Apfelextrakt kein Inhibitor enthalten ist. Aus diesem Grund müssten weitere Untersuchungen über das Vorhandensein von Inhibitoren stattfinden (z.Bsp. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie/ HPLC).

Bei dem Apfel handelt es sich um eine Sammelbalgfrucht. Die Frucht entsteht aus der Blütenachse. Somit ist das Kerngehäuse die eigentliche Frucht. Beim Fruchtfleisch handelt es sich um ein verdicktes Gewebe um die Blütenachse. Infolge dessen lässt sich die geringe Pectinesterase-Aktivität in den Extrakten aus Apfelschalen und Fruchtfleisch erklären.

Die im Apfel enthaltene Pectinesterase hat ihr pH-Optimum bei pH 9,0 und ist über den gesamten pH-Bereich, in dem die Untersuchung stattfand, aktiv. Die Messungen der Enzymaktivität sollten eher bei höheren pH-Werten ( $\text{pH} > 7,0$ ) durchgeführt werden. Da die Gefahr einer chemischen Entesterung des Pektins besteht, müsste die Reaktion jedoch nur bei pH-Werten von 7,1 bis 8,0 erfolgen. Laut Literaturangaben liegt das pH-Optimum von Pectinesterase bei pH 6,0 bis 8,0 (Belitz, 2008). Hwang (2003) fand die höchste Aktivität dieses Enzyms sowohl in Tomaten als auch in Zitrusfrüchten bei pH 6,5 bis 8,5. Deshalb stimmt das in dieser Arbeit ermittelte pH-Optimum mit dem aus der Literatur überein.

Da große Mengen an Enzym (20 ml) pro Messung eingesetzt werden müssen, erfolgt eine Einfachbestimmung des pH-Optimums. Um die Ergebnisse zu bestätigen, sollte diese Untersuchung wiederholt werden.

Die Pectinesterase wird unter einem pH-Wert von 5,0 gehemmt. Der Apfel weist einen pH-Wert von 3,3 auf. Daher lässt sich die Tatsache vermuten, dass es kaum Pectinesterase-Aktivität aufgrund des sauren pH-Wertes gibt. Die Pectinesterase ist somit kaum in der Lage, das Pektin abzubauen. Während der Lagerung nimmt der Säuregehalt der Äpfel ab. Deshalb wäre eine Untersuchung der Pectinesterase-Aktivität in Abhängigkeit der Lagerdauer sinnvoll. Ein weiterer Grund für diese Untersuchung ist, dass in überreifen Früchten der Gehalt an Pectinesterase deutlich höher ist ([www.uni-jena.de](http://www.uni-jena.de)).

Die Untersuchungen ergeben, dass durchschnittlich  $4,0 \times 10^{-4}$  exo-Polygalacturonase-units/g im Apfel enthalten sind. Das entspricht etwa der Hälfte der in Gurken ermittelten units (Meurer, 1991). Dieses Enzym weist eine geringe Aktivität auf. Wie schon erläutert ist die Aktivität der Pectinesterase im Apfel sehr gering. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von hochverestertem Pektin zu niedrigveresterten Pektin und Methanol. Dadurch schafft es erst die Voraussetzung für die hydrolytische Spaltung der Pektinkette durch Polygalacturonasen. Wegen der geringen Aktivität der Pectinesterase könnte man vermuten, dass die exo-Polygalacturonase kaum aktiv wird.

Das Aktivitätsoptimum wird bei pH 5,0 gemessen. Dies belegen auch die Untersuchungen von Mnkeni (1999) an Bohnen. Die exo-Polygalacturonase zeigt die höchste Aktivität bei pH 4,8 und 5,5 auf. Da der zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendete Acetatpuffer einen pH-Wert von 5,0 besaß, lief die Reaktion unter optimalen Bedingungen.

Im Apfel ist die Aktivität der endo-Polygalacturonase im Vergleich zu den beiden anderen Enzymen am höchsten. Das pH-Optimum liegt bei pH 5,5. Im stark sauren pH-Bereich wird die endo-Polygalacturonase inaktiviert. Laut Whitaker (2003) ist die endo-Polygalacturonase zwischen pH 3,5 und 6,0 aktiv. Folglich stimmen die ermittelten Werte mit der Literatur überein.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die höchste Aktivität der drei pectolytischen Enzyme in den Apfelschalen nachweisbar ist (Tabelle 16). Im Fruchtfleisch halbiert sich diese und im Kerngehäuse werden nur sehr geringe Enzymaktivitäten gemessen. Pektin ist ein Hauptbestandteil der Zellwand, daher kommt es vermehrt in den Fruchtschalen vor. Allgemein nimmt der Gehalt an Pektin im Meso- und Endokarp ab. Anhand dieser Tatsache könnte sich die Aktivitätsverteilung der Enzyme erklären lassen. Da das Vorkommen von Pektin im Fruchtfleisch und Kerngehäuse geringer ist, können die Enzyme nur begrenzt aktiv sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aktivitäten der Pectinesterase, exo- und endo-Polygalacturonase mit den zur Verfügung stehenden Chemikalien und Geräten erfolgreich gemessen werden kann. Um sicher feststellen zu können, ob die im Obst und Gemüse enthaltenen Enzyme die Textur beeinflussen, sollte man die bereits untersuchten Methoden an anderen Lebensmitteln durchführen sowie parallel die Textur mittels Texture Analyser messen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel war es, mit den an der Hochschule Neubrandenburg zur Verfügung stehenden Chemikalien und Geräte die Aktivität sowie die Eigenschaften der pectolytischen Enzyme des Apfels zu untersuchen. Dafür wurden die in der Vergangenheit bereits erfolgreichen Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von Gurken angewandt. Bei einem verwertbaren Ergebnis soll die Arbeit das Fundament darstellen, um weitere Lebensmittel hinsichtlich der zellwandbeeinflussenden Enzyme zu analysieren.

In der Zukunft könnte festgestellt werden, ob durch gezielte Einflussnahme auf die Enzymaktivität die Textur von verarbeiteten Rohwaren verbessert werden kann.

Zur Charakterisierung der pectolytischen Enzyme werden unter Verwendung der Ultrafiltration Enzymextrakte hergestellt. Die Durchführung dieser Methode ist schnell und einfach. Aufgrund der guten reproduzierbaren Werte erwies sie sich als geeignet.

Die Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität erfolgt durch Titration mittels Dosimaten. Die Analysenlösung wird zu Beginn der Messung auf pH= 7,0 eingestellt. Bei der Reaktion von Pectinesterase auf hochverestertes Pektin werden Carboxylgruppen freigesetzt, die den pH-Wert der Lösung senken. Dieser wird durch die Zugabe von Natronlauge wieder auf 7,0 gebracht. Der Verbrauch der Base pro Minute ist ein Indiz für die Aktivität der Pectinesterase.

Für die Untersuchung der exo-Polygalacturonase wird die Methode nach HONDA (1982) mit 2-Cyanacetamid angewendet. Bei einer Wellenlänge von 276 nm erfolgt die Messung der Extinktion. Die Abnahme der Viskosität einer Pektinlösung ist ein Maß für die Aktivität der endo-Polygalacturonase.

Um das Ziel zu erreichen, wurden einige Vorversuche hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse durchgeführt. Es stellt sich heraus, dass alle Verfahren hinsichtlich der Aufgabenstellung umsetzbar sind.

Die Untersuchungen ergeben, dass Äpfel der Sorte Idared durchschnittlich 0,021 PE-units/g und 0,0004 exo-PG-units/g enthalten. Außerdem werden 3,755 endo-PG-Einheiten/g Rohware gefunden. Unter anderem ist feststellbar, dass die höchste Aktivität der drei pectolytischen Enzyme in den Apfelschalen ist. Etwa die Hälfte dieser Aktivität wird im Fruchtfleisch erreicht. Im Kerngehäuse werden nur sehr geringe Enzymkonzentrationen nachgewiesen.

Zusätzlich wird bei den Enzymen die Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert gemessen.

Die Pectinesterase des Apfels hat ein pH-Optimum bei 9,0. Durch pH-Werte unter 5,0 wird sie inaktiviert. Die exo-Polygalacturonase weist bei pH 5,0 ihr Aktivitätsoptimum auf. Die höchste Aktivität der endo-Polygalacturonase wird bei pH 5,5 gemessen.

## **7 Abstract**

The texture of fruit and vegetables is an important quality criterion. Crisp and firm apples stand for freshness. The softening of the fruits is caused by the change of the cell wall polysaccharides. The pectolytic enzymes play a major role in the degradation of the cell wall material. Pectinesterase, exo- and endopolygalacturonase activities were determined in apple.

The aim of this work consists in determining the activity of the pectolytic enzymes of apples with in the college of Neubrandenburg to available chemicals and devices.

In order to characterize the apple enzymes, the influence of the pH value is examined on their activity.

## 8 Literaturverzeichnis

Acker, Berger u.a.: Handbuch der Lebensmittelchemie. 1. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 1967.

Acker, Schormüller u.a.: Handbuch der Lebensmittelchemie. Analytik der Lebensmittel. 2.Band/ Teil 2. Berlin: Springer Verlag, 1967.

Acker, Schormüller u.a.: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bestandteile der Lebensmittel. 1. Band. Berlin: Springer Verlag, 1965.

Acker, Schormüller u.a.: Handbuch der Lebensmittelchemie. Obst, Gemüse, Kartoffeln, Pilze. 5. Band/ Teil 2. Berlin: Springer Verlag, 1968.

Belitz, Grosch u.a.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 2008.

Bersin: Kurzes Handbuch der Enzymologie. 3. Auflage. Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft, 1950.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.: Ernährungsbericht 2008. Bonn: DGE e.V., 2008.

Fehlhaber, Kleer: Handbuch Lebensmittelhygiene. Praxisleitfaden mit wissenschaftlichen Grundlagen. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 2006.

Franzke: Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1996.

Gierschner, Buckenhüskes: Beiträge des Symposiums: Aktueller Stand und Trends in der Lebensmitteltechnologie. Universität Hohenheim Institut für Lebensmitteltechnologie, 1993.

Gross: A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanacetamide. Hort Science (1982), Nr. 17, Seite 933-934.



Heimann: Grundzüge der Lebensmittelchemie. 3. Auflage. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 1976.

Herrmann: Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse. 1. Auflage. Stuttgart: Ulmer, 2001.

Honda, Nishimura u.a.: A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanacetamide. *Analytical Biochemistry* (1982), Nr. 119, Seite 194-199.

[http://www.uni-jena.de/data/unijena\\_/faculties/bio\\_pharm/ieu/ls\\_lmc/X.Obst\\_Gemuese\\_2.Teil.pdf](http://www.uni-jena.de/data/unijena_/faculties/bio_pharm/ieu/ls_lmc/X.Obst_Gemuese_2.Teil.pdf); Stand 04.06.09, 14:00

[http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Schema\\_pflanzliche\\_Zellwand.svg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Schema_pflanzliche_Zellwand.svg); Stand 15.08.2009, 14:30

Hwang, Lee, u.a.: Transacylation and de-esterification reactions of pectin as catalyzed by Pectinesterases from Tomato and Citrus. *Journal of agricultural and food chemistry* (2003), Nr. 51, Seite 6287- 6292.

Meyers Lexikonredaktion: Duden Grundwissen Biologie. 1. Auflage. Mannheim: Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, 1999.

Meyers Lexikonredaktion: Duden Grundwissen Chemie. 1. Auflage. Mannheim: Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, 1999.

Mnkeni, Gierschner, Maeda: Effect of blanching time and salt concentration on pectolytic enzymes, texture and acceptability of fermented green beans. *Plant Foods for Human Nutrition* (1999), Nr. 53, Seite 285- 296.

Panda, Gowrishankar: Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2005), Nr. 67, Seite 160- 169.

Redgwell, Curti, Gehin- Delval: Physicochemical properties of cell wall materials from apple, kiwifruit and tomato. (2008), Nr. 227, Seite 607- 618.

Redgwell, Curti, Gehin- Delval: Role of pectic polysaccharides in structural integrity of apple cell wall material. (2008), Nr. 227, Seite 1025- 1033.

Schwendt: Taschenatlas der Lebensmittelchemie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 1999.

Stoll: Der Apfel. 1. Auflage. Zürich: Enrico Negri AG, 1997.

Suelter: Experimentelle Enzymologie. 1. Auflage. Stuttgart: Fischer, 1990.

Varela, salvador, Fiszman: The use of calcium chloride in minimally processed apples: A sensory approach. (2007), Nr. 224, Seite 461- 467.

Whang, Lee u.a.: Transacylation and de-esterification reactions of pectin as catalyzed by pectinesterases from tomato and citrus. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2003), Nr. 51, Seite 6287- 6292.

Whitaker, Voragen, Wong: Handbook of Food Enzymology. 10. Auflage. New York: Marcel Dekker AG, 2003.

[www.uni-hohenheim.de/150lt/Vortraege\\_Kolloquium\\_2008/Hydrokolloide%20in%20Lebensmitteln.pdf](http://www.uni-hohenheim.de/150lt/Vortraege_Kolloquium_2008/Hydrokolloide%20in%20Lebensmitteln.pdf); Stand 12.07.09, 10:30

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale von Idared und Jonagold.....	15
Tabelle 2: Durchschnittliche PE-Aktivität aus zwei verschieden hergestellten Extrakten derselben Apfelcharge in units/g Apfel.....	28
Tabelle 3: Mehrfachbestimmung der PE-Aktivität mittels Autotitrator von zwei mikrobiellen Enzymextrakten in units/ml .....	29
Tabelle 4: Vergleich der gemessenen PE-Aktivität mittels Autotitrator und Dosimat von zwei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge in units/g Apfel....	30
Tabelle 5: Mehrfachbestimmung der exo-PG-Aktivität in units/ml Enzymextrakt.....	32
Tabelle 6: Mehrfachbestimmung der Durchlaufzeit von drei verschiedenen Probelösungen in s .....	33
Tabelle 7: Mehrfachbestimmung der endo-PG-Aktivität von 3 verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge in endo-PG-Einheiten/g Apfel .....	33
Tabelle 8: Aktivität der PE in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge .....	37
Tabelle 9: Ergebnisse des Hemmstofftestes.....	38
Tabelle 10: Aktivität der exo-PG in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge .....	38
Tabelle 11: Aktivität der endo-PG in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge .....	39
Tabelle 12: Durchschnittliche Enzymaktivitäten aus drei Apfelenzymextrakten derselben Charge .....	39
Tabelle 13: Messergebnisse der PE-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen in units/g Apfel.....	42
Tabelle 14: Messergebnisse der exo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen.....	42
Tabelle 15: Messergebnisse der endo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelbereichen.....	43
Tabelle 16: Bilanz der durchschnittlichen Enzymaktivitäten im Apfel .....	43

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Apfels ( <a href="http://dnx274.dyndns.org/apfel7/apfel2.html">http://dnx274.dyndns.org/apfel7/apfel2.html</a> ) .....	3
Abbildung 2: Apfelernte 2008 in Deutschland (ZMP, 2008).....	4
Abbildung 3: Schema pflanzliche Zellwand ( <a href="http://www.wikipedia.de">www.wikipedia.de</a> ) .....	5
Abbildung 4: Vereinfachte Reaktionsformel der PE (Gierschner, Buckenhüskes, 1993) .....	9
Abbildung 5: Vereinfachte Reaktionsformel der PG (Gierschner, Buckenhüskes, 1993).....	10
Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Pektinkette (Grassinger, 1998) .....	12
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Unterteilung in 3 Apfelzonen .....	16
Abbildung 8: Aufkonzentrierung mit Hilfe der Ultrafiltration .....	18
Abbildung 9: Herstellungsschritt Dialyse .....	19
Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Bestimmung von PE mittels Dosimaten .....	21
Abbildung 11: Ubbelohde Viskosimeter .....	24
Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Bestimmung der endo-Polygalacturonase.....	25
Abbildung 13: Eichgerade zur Bestimmung der exo-PG-Aktivität .....	31
Abbildung 14: Untersuchung der Eichgeraden auf Linearität .....	31
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der PE-Aktivität eines Apfelenzymextraktes bei 30,1 °C .....	34
Abbildung 16: Überprüfung der Linearität des zeitlichen Verlaufs von PE .....	35
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der endo-PG-Aktivität eines Apfelenzymextraktes.....	36
Abbildung 18: PE-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	40
Abbildung 19: Exo-PG-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	41
Abbildung 20: Endo-PG-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	41

## 11 Formelverzeichnis

(1) Allgemeine Formel für die Pectinesterase-Aktivität .....	20
(2) Berechnung der Pectinesterase-Aktivität.....	20
(3) Berechnung des Gesamtblindwertes.....	22
(4) Gleichung der Eichgeraden .....	22
(5) Berechnung der exo-Polygalacturonase-Aktivität.....	22
(6) Berechnung der endo-Polygalacturonase-Aktivität.....	23
(7) Berechnung der CR-Methode .....	24
(8) Mittelwert.....	25
(9) Standardabweichung.....	26
(10) Variationskoeffizient.....	26
(11) Korrelationskoeffizient.....	26

## Anhang

### *A1 Analysevorschriften*

#### **Extrakterstellung mittels Ammoniumsulfatfällung**

##### Geräte

- Küchenmixer
- Magnetrührer
- Nylontuch
- Kühlzentrifuge
- Zentrifugenbecher
- Reibschale mit Pistill
- Dialyseschlauch (ZelluTrans ROTH, Ø 25,5 mm, 8.000 bis 10.000 MWCO)

##### Reagenzien

- 1 M NaCl (p.a.)
- Saponin (Roth)
- Ammoniumsulfat
- Dialyselösung, bestehend aus:
  - 0,1 M NaCl
  - 0,01 M Acetatpuffer pH 5,6 nach GOMORI (1955)
  - 0,001 M Natriumazid (Merck)

##### Durchführung

100 g gekühlte bzw. tiefgefrorene Rohware mit 100 ml gekühlter ( $T= 4^{\circ}\text{C}$ ) 1 M NaCl und 100 mg Saponin 1 Minute lang im Küchenmixer zerkleinern sowie 1 Minute homogenisieren. Danach erfolgt das zweistündige Rühren des Probengemisches bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss wird die homogene Probe über ein Nylontuch gefiltert. Das zusätzliche Auswringen des zusammengelegten Tuches bewirkt ein gutes Auspressen des Filterkuchens. 25 Minuten wird das Extrakt bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 19000-facher Erdgeschwindigkeit zentrifugiert. Nun erfolgt die Zugabe von gemahlenem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 30 % (errechnet mittels Tabelle aus COOPER 1980) zum klaren Überstand und das 30-minütige Rühren mit anknüpfendem

Zentrifugieren bei 4°C und 19000-facher Erdgeschwindigkeit für 25 Minuten. Das Präzipitat wird verworfen. Zum klaren Überstand wird Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % zugegeben und 30 Minuten gerührt sowie anschließend 25 Minuten bei 4°C und 19000-facher Erdgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat in 25 ml Dialyselösung aufgenommen. Den Dialyseschlauch zweimal in demineralisiertem Wasser für jeweils ca. 15 Minuten kochen. Danach die Enzymlösung in den Dialyseschlauch füllen, ihn fest verschlossen und zweimal für mindestens 4 Stunden in je 2 Liter Dialyselösung bei 4°C rühren. Nun erfolgt das Zentrifugieren des dialysierten Enzymextraktes bei 4°C und 30000-facher Erdgeschwindigkeit für 20 Minuten. Mit Hilfe eines Messzylinders wird das Volumen vom Überstand bestimmt, um spätere Analysedaten auf das Apfelgewicht beziehen zu können.

### **Extrakterstellung mittels Ultrafiltration**

#### Geräte

- Küchenmixer
- Magnetrührer
- Nylontuch
- Kühlzentrifuge
- Zentrifugenbecher
- Ultrafiltrationssystem Vivaflow 200 (Membran aus Polypropylen, 10.000 MWCO)
- Dialyseschlauch (ZelluTrans ROTH, Ø 25,5 mm, 8.000 bis 10.000 D Ausschlussgrenze)

#### Reagenzien

- 0,75 M NaCl (p.a.)
- Saponin (Roth)
- Dialyselösung, bestehend aus:
  - 0,1 M NaCl
  - 0,01 M Acetatpuffer pH 5,6 nach GOMORI (1955)
  - 0,001 M Natriumazid (Merck)

#### Durchführung

100 g gekühlte bzw. tiefgefrorene Rohware werden mit 200 ml gekühlter (T= 4°C) 0,75 M NaCl und 100 mg Saponin 1 Minute lang im Küchenmixer zerkleinert sowie 1 Minute homogenisiert.

Danach erfolgt das zweistündige Rühren des Probengemisches bei 4°C. Im Anschluss die homogene Probe über ein Nylontuch filtern. 25 Minuten wird das Extrakt bei 4°C und 19000-facher Erdgeschwindigkeit zentrifugiert. Unter ständiger Kühlung mit Eis wird der Überstand mittels Ultrafiltration auf ca. 35 ml aufkonzentriert (p= 1bar). Nach der Aufkonzentration wird die Membran mit 10 ml gekühlter (T= 4°C) 0,5 M NaCl gespült. Diese Lösung wird zum konzentrierten Retentat hinzugegeben.

Den Dialyseschlauch zweimal in demineralisiertem Wasser für jeweils ca. 15 Minuten kochen. Danach die Enzymlösung in den Dialyseschlauch füllen, den Schlauch verschließen und zweimal für mindestens 4 Stunden in je 2 Liter Dialyselösung bei 4°C rühren. Nun erfolgt das Zentrifugieren des dialysierten Enzymextraktes bei 4°C und 30000-facher Erdgeschwindigkeit für 20 Minuten. Mit Hilfe eines Messzylinders wird das Volumen vom Überstand bestimmt, um spätere Analysedaten auf das Rohwarengewicht beziehen zu können.

### **Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität mittels Autotitrator**

#### Geräte

- Mettler DL 67 Titrator mit pH-Glaselektrode
- Thermostat
- Wasserbad (T= 30°C)
- Magnetrührer
- thermostatisierbares Reaktionsgefäß mit ca. 100 ml Fassungsvermögen
- Stoppuhr
- Pipetten

#### Reagenzien

- 0,5%ige Pektinlösung: 1 g Pektin C (Veresterungsgrad 70 bis 75 %, Cargill) wird langsam unter ständigem Rühren in ein Becherglas, welches mit 30 ml 1 M NaCl und ca. 150 ml destilliertem Wasser gefüllt ist, gegeben. Das Gemisch wird unter weiterem Rühren auf ca. 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgt das Einstellen der Lösung mit 0,3 M NaOH auf einen pH von 6,5 sowie das Auffüllen auf 200 ml mit destilliertem Wasser. Die pH-Einstellung entfällt vor der Bestimmung des pH-Optimums.
- 0,01 M NaOH-Maßlösung (Roth) als Titer

Durchführung

In das thermostatisierbare Reaktionsgefäß werden 30 ml Substrat und 3 ml Enzymextrakt eingefüllt. Der Autotitrator wird sofort gestartet. Innerhalb der ersten 2 Minuten erfolgt die Vortitration auf pH 7,0. Im Anschluss daran, beginnt der Autotitrator mit der eigentlichen Messung. Dabei wird der Verbrauch an 0,01 M Natronlauge aufgezeichnet. Nach 10 Minuten wird der Messvorgang abgebrochen und die Enzymaktivität mit der nachfolgenden Formel (2) berechnet.

$$u_{PE}/ml = \frac{\mu\text{mol freigesetzte COO}^-}{\text{Zeit in min} \times \text{ml Enzymextrakt}} \quad (1)$$

Da 1 ml 0,01 M NaOH mit 10  $\mu\text{mol COO}^-$  korrespondiert, ergibt sich:

$$u_{PE}/ml = \frac{\text{Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml} \times 10}{\text{Zeit in min} \times \text{ml Enzymextrakt}} \quad (2)$$

Damit die Pectinesterase-Aktivität zusätzlich auf 1 g Apfel ermittelt werden kann, werden die berechneten units/ml mit dem Gesamtvolumen des Enzymextraktes multipliziert und durch das eingesetzte Rohwarengewicht dividiert.

**Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität mittels Dosimat**Geräte

- siehe Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität mittels Autotitrator
- pH-Meter InoLab (WTW) mit pH-Glaselektrode
- Rührer
- Dosimat mit 1 ml-Wechseleinheit (Metrohm)
- Becherglas (ca. 400 ml Fassungsvermögen)

Reagenzien

- siehe Bestimmung der Pectinesterase-Aktivität mittels Autotitrator



Durchführung

In das Becherglas, das sich im Wasserbad befindet, werden 200 ml Substrat und 20 ml Enzymextrakt eingefüllt. Innerhalb einer Minute wird die Reaktionslösung auf den gewünschten pH-Wert titriert. Anschließend startet die Messung. Sobald der pH-Wert absinkt wird mit Hilfe des Dosimaten Natronlauge hinzudosiert. Der Verbrauch dieser Base wird manuell aufgezeichnet. Nach 5 Minuten wird der Messvorgang abgebrochen. Genau wie bei der Methode mit dem Autotitrator wird die Pectinesterase-Aktivität berechnet.

**Bestimmung der exo-Polygalacturonase-Aktivität**Geräte

- Spektralphotometer specord s100 (Analytik Jena AG) mit der Software *Aspect Plus*
- Wasserbäder (T= 30°C und 100°C)
- Eisbad
- Stoppuhr
- Reagenzgläser mit Deckel
- Pipetten
- Quarzküvetten (d= 10 mm)
- PD-10 Gelfiltrationssäule mit Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare)

Reagenzien

- Na-Salz der Polygalacturonsäure, 0,1%ige Lösung
- 0,2 M Acetatpuffer p.a., pH= 5,0 nach GOMORI (1955), mit 0,4 mM gelöstem CaCl<sub>2</sub>
  - zur Bestimmung des pH-Optimums auch andere pH-Werte, Herstellung nach GOMORI (1995)
- 0,2 M Boratpuffer p.a., pH= 9,0 nach GOMORI (1955)
- Cyanacetamid (Merck), 1%ige Lösung
- Galacturonsäure (Merck), 0,01 M Stammlösung in destilliertem Wasser

Zur Bestimmung der exo-PG-Aktivität wird zuerst eine Eichgerade mit D-Galacturonsäure als Eichsubstanz angefertigt.

Eichgerade

Durch Verdünnen der 0,01 M Galacturonsäurestammlösung werden Standardlösungen mit 50 bis 200  $\mu\text{mol}$  Galacturonsäure/l hergestellt. Es werden je 0,5 ml dieser Standardlösungen und 0,5 ml Acetatpuffer in einem Reagenzglas mit 1 ml Cyanacetamidlösung und 2 ml Boratpuffer gemischt und 11 Minuten im siedenden Wasserbad ( $T= 99,9^\circ\text{C}$ ) erhitzt. Im Anschluss wird die Reaktionslösung mittels Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktionsmessung erfolgt innerhalb von einer Stunde bei 276 nm in Quarzküvetten.

Bestimmung

Die Gelfiltrationssäule wird mit ca. 20 ml destilliertem Wasser gespült. Danach wird 2,5 ml Enzymextrakt auf die Säule gegeben und anschließend mit 3,5 ml destilliertem Wasser eluiert. 0,25 ml gereinigtes Enzymextrakt wird zusammen mit 0,25 ml Substratlösung und 0,5 ml Acetatpuffer in einem Reagenzglas gemischt und 3 Stunden lang bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 1 ml Cyanacetamidlösung und 2 ml Boratpuffer. Das Reagenzglas wird verschlossen und 11 Minuten in siedenden Wasserbad ( $T= 99,9^\circ\text{C}$ ) erhitzt. Mittels Eisbad erfolgt die Abkühlung dieses auf Raumtemperatur. Innerhalb von einer Stunde wird die Extinktion bei 276 nm in Quarzküvetten gemessen.

Für jede Enzymprobe muss ein Enzymblindwert mitgeführt werden.

- $B_E$ = Enzymblindwert
  - 0,5 ml Acetatpuffer
  - 0,25 ml Enzymlösung
  - 0,25 ml destilliertes Wasser
- $B_S$ = Substratblindwert
  - 0,5 ml Acetatpuffer
  - 0,25 ml Substratlösung
  - 0,25 ml destilliertes Wasser
- $B_P$ = Pufferblindwert
  - 0,5 ml Acetatpuffer
  - 0,5 ml destilliertes Wasser
- Gesamtblindwert  $B_G= B_E + B_S - B_P$

Berechnung

Gleichung der Eichkurve:

$$y = 0,0037 x + 0,0081 \quad (4)$$

Berechnungsformel:

$$u_{PG} = \frac{\Delta E - 0,0081}{0,0037} \times \frac{1}{1000 \times \text{Inkubationsdauer in min} \times \text{Enzymmenge in ml}} \times \frac{3,5 \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}} \quad (5)$$

$\Delta E$  ...Differenz von Probenextinktion und Gesamtblindwert

1000 ...Umrechnungsfaktor von nmol in  $\mu\text{mol}$

$\frac{3,5 \text{ ml}}{2,5 \text{ ml}}$  ...Berücksichtigung der Verdünnung durch die Gelfiltration

**Bestimmung der endo-Polygalacturonase-Aktivität**Geräte

- Ubbelohde Kapillarviskosimeter, K= 0,01021, (Schott Typ 53210/I)
- Steuereinheit AVS 350 (Schott)
- Stoppuhr
- Wasserbad mit Thermostaten (T= 30°C)
- Pipetten
- Magnetrührer

Reagenzien

- 0,4 %ige Lösung von Pektin C (Veresterungsgrad 70 bis 75 %, Cargill) in 0,12 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH= 5,5, nach GOMORI, 1955):  
Das Pektin C wird in 100 ml Puffer eingestreut und auf 60 bis 70 °C erwärmen. Danach wird die Lösung abgekühlt (T= 20°C) und mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

### Durchführung der Messung

12,5 ml Substrat wird mit 2,5 ml Enzymextrakt gemischt und gleichzeitig die Stoppuhr gestartet. Anschließend wird die Reaktionslösung in das Kapillarviskosimeter gefüllt. Ein Wasserbad temperiert diese Lösung auf 30°C über die gesamte Analysedauer. Nach einer Einwirkzeit von 3 Minuten wird die Reaktionslösung in der Kapillare hochgepumpt. Die Steuereinheit AVS 350 misst die Zeit über zwei Lichtschranken, die die Flüssigkeit zum Durchfließen der Kapillare benötigt. Nach 10 Minuten wird die Messung ( $t_1$ ) wiederholt.

Die Kapillare wird vor jedem Probenwechsel dreimal mit 0,1 M NaOH-Lösung gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült. Dann erfolgt das Trocknen der Kapillare mit Aceton.

### Berechnung

Die Durchlaufzeit von Wasser ( $t_w$ ) bei 30°C beträgt 81,15 s. Mit Hilfe der einzelnen Durchlaufzeiten der Reaktionslösung ( $t_0$ ,  $t_1$ ) und dem Wasserwert kann man den Kehrwert der spezifischen Viskosität ermitteln. Die Differenz dieser Kehrwerte multipliziert mit dem Faktor 1000 und dividiert durch 10 Minuten entspricht einer endo-Polygalacturonase-Einheit.

$$\Delta \frac{1}{\eta_{\text{spez.}}} = \frac{t_w}{t_1 - t_w} - \frac{t_w}{t_0 - t_w} \quad (6)$$

$\eta_{\text{spez.}}$  ...spezifische Viskosität

$t_w$  ...Durchlaufzeit von reinem Wasser

$t_0$  ...Durchlaufzeit der Reaktionslösung (1. Messung: nach 3 Minuten Einwirkzeit)

$t_1$  ...Durchlaufzeit der Reaktionslösung (2.Messung: 10 Minuten nach  $t_0$ )

Eine endo-PG-Einheit entspricht der Menge Enzym, die  $\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$  einer Polygalacturonsäure-Lösung in 10 Minuten um 0,001 Einheiten senkt.

**Bestimmung der Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymextraktherstellungen**

Tabelle 17: Bestimmung der PE-Aktivität aus 2 verschiedenen hergestellten Enzymextrakten derselben Apfelcharge

		Ammoniumsulfatfällung			Ultrafiltration		
Messung	Zeit in min.	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml	units/g Apfel	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml	units/g Apfel
1	10	0,172	0,057	0,015	0,872	0,291	0,129
2	10	0,127	0,042	0,011	0,860	0,287	0,128
3	10	0,158	0,053	0,014	0,638	0,213	0,095
Apfelmenge in g		103,68			101,06		
Enzymextraktes in ml		27,70			44,97		
Mittelwert $\bar{x}$		0,013			0,117		
Standardabweichung $\sigma (\pm)$		$2 \times 10^{-3}$			$1,6 \times 10^{-2}$		
VK		15,38			13,68		

### Reproduzierbarkeit der Messungen

Tabelle 18: Bestimmung der PE-Aktivität mittels Autotitrator von 2 mikrobiellen Enzym-extrakten

Probe	Messung	Temp. in °C	Zeit in min.	Verdünnung	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml Enzymextrakt im Original
NovoShape	1	40,0	5	100	5,756	575,6
	2	40,1	5	100	5,614	561,4
	3	40,0	5	1000	0,867	578,0
Mittelwert $\bar{x}$				571,667		
Standardabweichung $\sigma (\pm)$				7,33		
VK				1,28		
Rohapect	1	30,2	5	100	4,017	267,8
	2	30,0	5	100	4,101	273,4
	3	30,0	5	1000	0,432	288
Mittelwert $\bar{x}$				276,400		
Standardabweichung $\sigma (\pm)$				8,52		
VK				3,08		

Tabelle 19: Bestimmung der PE-Aktivität mittels Autotitrator von zwei verschiedenen Enzym-extrakten aus derselben Apfelcharge

Probe	Messung	Temp. in °C	Zeit in min.	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml	units/g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK
Extrakt 1	1	30,0	10	0,972	0,324	0,151	0,141	0,007	4,96
	2	29,9	10	0,860	0,287	0,133			
	3	30,0	10	0,891	0,297	0,138			
Apfelmenge in g					101,06				
Volumen des Enzymextraktes in ml					46,97				
Extrakt 2	1	30,2	10	1,172	0,391	0,177	0,118	0,046	38,98
	2	30,0	10	0,422	0,141	0,064			
	3	29,9	10	0,752	0,251	0,114			
Apfelmenge in g					102,45				
Volumen des Enzymextraktes in ml					46,50				

Tabelle 20: Bestimmung der PE-Aktivität mittels Dosimat von zwei verschiedenen Enzymextrakten (1 Tag alt) aus derselben Apfelcharge

Probe	Messung	Temp. in °C	Zeit in min.	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ml	units/g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK
Extrakt 1	1	30,0	10	0,602	0,030	0,014	0,014	$3,5 \times 10^{-5}$	0,25
	2	30,0	10	0,605	0,030	0,014			
Apfelmenge in g					101,06				
Volumen des Enzymextraktes in ml					46,97				
Extrakt 2	1	29,9	10	0,635	0,032	0,014	0,014	$1,7 \times 10^{-4}$	1,21
	2	30,0	10	0,620	0,031	0,014			
Apfelmenge in g					102,45				
Volumen des Enzymextraktes in ml					46,50				

Tabelle 21: Messergebnisse zur Bestimmung der Eichgeraden

D- Galacturonsäure- Konzentration in $\mu\text{mol/l}$	Extinktion bei 276 nm
50	0,1841
100	0,3812
150	0,5721
200	0,7332

Tabelle 22: Bestimmung der exo-PG-Aktivität von zwei mikrobiellen Enzymextrakten

Messung	NovoShape			Rohapect		
	Extinktion	$\Delta E$	units/ml	Extinktion	$\Delta E$	units/ml
1	0,3816	0,0083	$1,2 \times 10^{-6}$	0,3813	0,0086	$3,0 \times 10^{-6}$
2	0,3818	0,0085	$2,4 \times 10^{-6}$	0,3810	0,0083	$1,2 \times 10^{-6}$
3	0,3815	0,0082	$6,0 \times 10^{-7}$	0,3813	0,0086	$3,0 \times 10^{-6}$
Mittelwert $\bar{x}$	$1,4 \times 10^{-6}$			$2,4 \times 10^{-6}$		
Standardabweichung $\sigma (\pm)$	$7,5 \times 10^{-7}$			$8,5 \times 10^{-7}$		
VK	53,57			35,42		

Tabelle 23: Bestimmung der exo-PG-Aktivität von 3 verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Probe		Extinktion der Probe	$\Delta E$	units/ ml	units / g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK	
						in units/ml			
Extrakt 1	1	0,2444	0,1121	$8,7 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$9,3 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-5}$	4,73	
	2	0,2501	0,1249	$9,8 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$				
	3	0,2487	0,1184	$9,3 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$				
	Apfelmenge in g								
	Volumen des Enzymextraktes in ml								
Extrakt 2	1	0,2663	0,1135	$8,9 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-5}$	5,33	
	2	0,2666	0,1220	$9,6 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$				
	3	0,2589	0,1080	$8,4 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$				
	Apfelmenge in g								
	Volumen des Enzymextraktes in ml								
Extrakt 3	1	0,2199	0,1016	$7,9 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	$8,2 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-5}$	3,41	
	2	0,2245	0,1096	$8,5 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$				
	3	0,2207	0,1046	$8,1 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-4}$				
	Apfelmenge in g								
	Volumen des Enzymextraktes in ml								

Tabelle 24: Bestimmung der Durchlaufzeit von Wasser, 0,4 %iger Pektinlösung (ohne Enzym) und 1 %iger NaOH-Lösung in s

Messung	Wasser	1%ige NaOH-Lösung	0,4%ige Pektinlösung (ohne Enzymzugabe)
1	81,15	80,9	199,96
2	81,16	80,88	199,97
3	81,14	80,90	199,98
4	81,15	80,92	199,95
5	81,16	80,88	199,97
Mittelwert in s	81,15	80,90	199,97
Standardabweichung	0,007	0,010	0,010
VK	0,01	0,01	0,01



Tabelle 25: Bestimmung der endo-PG-Aktivität von drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Extrakt		Messung	Durchlaufzeit in s	$\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$	Einheiten /min	Einheiten/ g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK
1	1	$t_0$	206,57	0,0895	8,9501	3,9848	3,838	0,194	5,05
		$t_1$	191,33						
	2	$t_0$	206,72	0,0801	8,0056	3,5642			
		$t_1$	192,88						
	3	$t_0$	206,59	0,0891	8,9070	3,9656			
		$t_1$	191,41						
Apfelmenge in g					100,67				
Volumen des Enzymextraktes in ml					44,82				
2	1	$t_0$	207,14	0,0852	8,5213	3,6430	3,671	0,034	0,93
		$t_1$	192,42						
	2	$t_0$	206,96	0,0870	8,6989	3,7189			
		$t_1$	192,01						
	3	$t_0$	207,12	0,0854	8,5373	3,6498			
		$t_1$	192,38						
Apfelmenge in g					102,64				
Volumen des Enzymextraktes in ml					43,88				
3	1	$t_0$	205,86	0,0882	8,8165	3,8224	3,778	0,038	1,01
		$t_1$	190,98						
	2	$t_0$	205,72	0,0872	8,7232	3,7819			
		$t_1$	191,01						
	3	$t_0$	206,03	0,0860	8,6035	3,7301			
		$t_1$	191,43						
Apfelmenge in g					103,01				
Volumen des Enzymextraktes in ml					44,66				

**Einfluss der Zeit auf die Enzymaktivität**

Tabelle 26: Bestimmung der PE-Aktivität über den Verbrauch an 0,01 M NaOH eines Apfel-enzymextraktes innerhalb von 15 Minuten bei 30,1°C

Reaktionsdauer in min.	verbrauchtes Volumen an 0,01 M NaOH in ml
0,5	0,069
1	0,114
1,5	0,162
2,5	0,251
3,5	0,305
4,5	0,378
5	0,413
6	0,451
6,5	0,472
7	0,519
8	0,548
9	0,608
10	0,654
11	0,666
12	0,67
13	0,675
14	0,68
15	0,682

Tabelle 27: Bestimmung der endo-PG-Aktivität über einem Zeitraum von einer Stunde mittels Apfelenzymextraktes

Messung	Reaktionsdauer in min.	Durchlaufzeit in s
t <sub>0</sub> (nach Einwirkzeit)	0	215,23
t <sub>1</sub>	10	193,20
t <sub>2</sub>	15	190,55
t <sub>3</sub>	30	187,93
t <sub>4</sub>	45	187,41
t <sub>5</sub>	60	187,31

## A3 Hauptversuche

**Aktivität der pectolytischen Enzyme im Apfel**

Tabelle 28: PE-Aktivität in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Extrakt	Messung	Temperatur in °C	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	Zeit in min.	units/ml	units/g Apfel
1	1	30,0	0,442	5	0,044	0,02
	2	30,1	0,451	5	0,045	0,02
	Apfelmenge in g		100,38			
	Volumen des Enzymextraktes in ml		44,74			
2	1	30,0	0,476	5	0,048	0,021
	2	30,0	0,487	5	0,049	0,021
	Apfelmenge in g		103,17			
	Volumen des Enzymextraktes in ml		44,68			
3	1	29,9	0,469	5	0,047	0,021
	2	30,0	0,476	5	0,048	0,021
	Apfelmenge in g		101,58			
	Volumen des Enzymextraktes in ml		44,80			
Mittelwert ( $u_{PE}/g$ Apfel)			0,021			
Standardabweichung ( $u_{PE}/g$ Apfel)			$4,9 \times 10^{-4}$			
Variationskoeffizient			2,33			

Tabelle 29: Ergebnisse des Hemmstofftests bei 30,0°C

Versuch	Zugabe in ml				Menge Substrat in ml	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	Zeit in min.	units/ml	
	Rohapect® MPE*	Enzym-extrakt aus Apfelschalen	1 M NaCl	dest. Wasser					
1	1	10	-	10	-	200	0,32	5	0,032
	2	10	-	10	-	200	0,316	5	0,032
2	1	10	-	-	10	200	0,577	5	0,058
	2	10	-	-	10	200	0,576	5	0,058
3	1	10	10	-	-	200	0,923	5	0,092
	2	10	10	-	-	200	0,922	5	0,092
Apfelmenge in g						100,76			
Volumen des Enzymextraktes in ml						44,80			

\* eingesetztes Enzymextrakt Rohapect® MPE wurde vor der Messung mit dest. Wasser verdünnt (1:50)

Tabelle 30: exo-PG-Aktivität in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Extrakt	Messung	Extinktion der Probe	$\Delta E$	uPG/ml	uPG/g Apfel	
1	1	0,2318	0,1075	$8,4 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$	
	2	0,2359	0,1129	$8,8 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	
	Apfelmenge in g			100,56		
	Volumen des Enzymextraktes in ml			44,72		
2	1	0,2467	0,1221	$9,6 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-4}$	
	2	0,2506	0,1262	$9,9 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4}$	
	Apfelmenge in g			102,98		
	Volumen des Enzymextraktes in ml			44,70		
3	1	0,2389	0,1177	$9,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$	
	2	0,2366	0,1159	$9,1 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	
	Apfelmenge in g			101,63		
	Volumen des Enzymextraktes in ml			44,82		
Mittelwert (uPG/g Apfel)				$4,0 \times 10^{-4}$		
Standardabweichung (uPG/g Apfel)				$1,8 \times 10^{-5}$		
Variationskoeffizient				4,46		

Tabelle 31: endo-PG-Aktivität in drei verschiedenen Enzymextrakten aus derselben Apfelcharge

Extrakt	Messung		Durchlaufzeit in s	$\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$	Einheiten/min	Einheiten/g Apfel
1	1	$t_0$	205,98	0,0842	8,417	3,746
		$t_1$	191,67			
	2	$t_0$	206,31	0,0835	8,350	3,717
		$t_1$	192,03			
	3	$t_0$	205,49	0,0856	8,555	3,808
		$t_1$	191,08			
Apfelmenge in g					100,34	
Volumen des Enzymextraktes in ml					44,66	
2	1	$t_0$	205,83	0,0827	8,273	3,714
		$t_1$	191,77			
	2	$t_0$	206,23	0,0816	8,157	3,663
		$t_1$	192,26			
	3	$t_0$	206,17	0,0821	8,205	3,684
		$t_1$	192,14			
Apfelmenge in g					100,76	
Volumen des Enzymextraktes in ml					45,24	
3	1	$t_0$	204,99	0,0879	8,785	3,882
		$t_1$	190,35			
	2	$t_0$	205,36	0,0847	8,467	3,741
		$t_1$	191,11			
	3	$t_0$	205,24	0,0869	8,686	3,838
		$t_1$	190,69			
Apfelmenge in g					101,21	
Volumen des Enzymextraktes in ml					44,72	
Mittelwert ( $u_{\text{PG/g Apfel}}$ )					3,755	
Standardabweichung ( $u_{\text{PG/g Apfel}}$ )					0,069	
Variationskoeffizient					1,84	

**Bestimmung des pH- Optimums der pectolytischen Enzyme**

Tabelle 32: Bestimmung des pH-Optimums von PE

pH-Wert	Temp. in °C	Gesamtverbrauch an 0,01 M NaOH in ml	Verbrauch an 0,01 M NaOH ohne Enzymzugabe (Blindwert)	Zeit in min.	units/ml	units/g Apfel	relative Enzymaktivität
5,0	30,1	0,062	0	5	0,006	0,003	0,065
5,5	30,0	0,128	0	5	0,013	0,006	0,134
Apfelmenge in g				102,04			
Volumen des Enzymextraktes in ml				44,64			
6,2	30,2	0,192	0	5	0,019	0,008	0,200
7,0	29,9	0,476	0	5	0,048	0,021	0,496
Apfelmenge in g				101,98			
Volumen des Enzymextraktes in ml				44,62			
7,5	30,1	0,607	0	5	0,061	0,027	0,633
8,0	29,9	0,714	0,1	5	0,061	0,028	0,640
Apfelmenge in g				100,32			
Volumen des Enzymextraktes in ml				44,85			
8,5	30,0	0,937	0,189	5	0,075	0,033	0,780
9,0	30,1	1,296	0,337	5	0,096	0,043	1,000
Apfelmenge in g				100,58			
Volumen des Enzymextraktes in ml				44,76			
9,2	30,0	1,531	0,642	5	0,0889	0,0397	0,9270
Apfelmenge in g				100,14			
Volumen des Enzymextraktes in ml				44,74			

Tabelle 33: Bestimmung des pH-Optimums von exo-PG

Extrakt	Messung	pH-Wert	Extinktion der Probe	Gesamtblindwert	$\Delta E$	uPG/ml	uPG /g Apfel	
1	1	3,6	0,1335	0,1215	0,0120	$3,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$	
	2		0,1322	0,1141	0,0181	$8,4 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-4}$	
	1	4	0,1875	0,1155	0,0720	$5,4 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$	
	2		0,1883	0,1172	0,0711	$5,3 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$	
	1	4,5	0,2132	0,1216	0,0916	$7,0 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	
	2		0,2121	0,1216	0,0905	$6,9 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	
	Apfelmenge in g					100,34		
	Volumen des Enzymextraktes in ml					44,66		
	2	1	5	0,2407	0,1249	0,1158	$9,1 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$
		2		0,2411	0,1237	0,1174	$9,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$
1		5,4	0,1913	0,1075	0,0838	$6,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$	
2			0,1917	0,1073	0,0844	$6,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$	
1		5,6	0,1689	0,0897	0,0792	$6,0 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	
2			0,1687	0,0977	0,0710	$5,3 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$	
Apfelmenge in g					100,76			
Volumen des Enzymextraktes in ml					44,72			

Tabelle 34: Bestimmung des pH-Optimums von endo-PG (Teil 1)

Extrakt	pH- Wert	Messung		Durchlaufzeit in s	$\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$	Einheiten/min	Einheiten/g Apfel		
1	3,5	1	$t_0$	205,67	0,006	0,618	0,275		
			$t_1$	204,50					
		2	$t_0$	205,41	0,006	0,557	0,245		
			$t_1$	204,36					
		3	$t_0$	205,45	0,006	0,551	0,245		
			$t_1$	204,41					
		Mittelwert $\bar{x}$						0,256	
		Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,014	
		Variationskoeffizient						5,30	
	4,0	1	$t_0$	202,65	0,016	1,576	0,701		
			$t_1$	199,85					
		2	$t_0$	202,48	0,016	1,551	0,690		
			$t_1$	199,73					
		3	$t_0$	202,71	0,017	1,660	0,739		
			$t_1$	199,76					
		Mittelwert $\bar{x}$						0,710	
		Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,021	
		Variationskoeffizient						2,93	
	4,5	1	$t_0$	205,26	0,035	3,520	1,567		
			$t_1$	198,92					
		2	$t_0$	204,91	0,038	3,789	1,686		
$t_1$			198,15						
3		$t_0$	205,03	0,038	3,781	1,683			
		$t_1$	198,27						
Mittelwert $\bar{x}$						1,645			
Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,056			
Variationskoeffizient						3,78			
Apfelmenge in g						100,34			
Volumen des Enzymextraktes in ml						44,66			



Tabelle 35: Bestimmung des pH-Optimums von endo-PG (Teil 2)

Extrakt	pH- Wert	Messung		Durchlaufzeit in s	$\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$	Einheiten/min	Einheiten/g Apfel		
2	5,0	1	$t_0$	205,03	0,0402	4,018	1,804		
			$t_1$	197,87					
		2	$t_0$	204,89	0,041	4,135	1,830		
			$t_1$	197,55					
		3	$t_0$	204,79	0,042	4,214	1,865		
			$t_1$	197,33					
		Mittelwert $\bar{x}$						1,833	
		Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,025	
		Variationskoeffizient						1,36	
	5,5	5,5	1	$t_0$	205,62	0,085	8,469	3,748	
				$t_1$	191,31				
			2	$t_0$	205,47	0,083	8,344	3,692	
				$t_1$	191,38				
			3	$t_0$	205,53	0,083	8,348	3,694	
				$t_1$	191,42				
		Mittelwert $\bar{x}$						3,711	
		Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,027	
		Variationskoeffizient						0,69	
	6,0	6,0	1	$t_0$	203,69	0,060	5,987	2,649	
$t_1$				193,53					
2			$t_0$	203,52	0,060	5,985	2,648		
			$t_1$	193,39					
3			$t_0$	203,73	0,060	5,919	2,619		
			$t_1$	193,67					
Mittelwert $\bar{x}$						2,639			
Standardabweichung $\sigma (\pm)$						0,014			
Variationskoeffizient						0,53			
Apfelmenge in g						100,76			
Volumen des Enzymextraktes in ml						45,24			

**Verteilung der Enzyme in den einzelnen Apfelzonen**

Tabelle 36: Bestimmung der PE-Aktivität in den einzelnen Apfelzonen

Extrakt	Messung	Verbrauch an 0,01 M NaOH in ml	units/ ml	units/ g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK	
Apfelschalen	1	0,726	0,073	0,030	0,029	$3,7 \times 10^{-4}$	1,26	
	2	0,708	0,071	0,029				
	Apfelmenge in g				105,21			
	Volumen des Enzymextraktes in ml				43,10			
Fruchtfleisch	1	0,327	0,033	0,014	0,015	$3,9 \times 10^{-4}$	2,68	
	2	0,345	0,035	0,015				
	Apfelmenge in g				101,95			
	Volumen des Enzymextraktes in ml				44,56			
Kerngehäuse	1	0,094	0,009	0,004	0,004	$1,3 \times 10^{-4}$	3,30	
	2	0,088	0,009	0,004				
	Apfelmenge in g				104,91			
	Volumen des Enzymextraktes in ml				44,92			

Tabelle 37: Bestimmung der exo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelzonen

Extrakt	Extinktion der Probe	$G_B$	$\Delta E$	uPG/ml	uPG /g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK		
Apfelschalen	1	0,2734	0,1240	0,1494	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6}$	0,57	
	2	0,2725	0,1247	0,1478	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-4}$				
	Apfelmenge in g						100,76			
	Volumen des Enzymextraktes in ml						45,24			
Fruchtfleisch	1	0,2055	0,1232	0,0823	$6,2 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-6}$	0,82	
	2	0,2042	0,1231	0,0811	$6,1 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$				
	Apfelmenge in g						101,22			
	Volumen des Enzymextraktes in ml						44,24			
Kerngehäuse	1	0,1371	0,1168	0,0203	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-6}$	5,79	
	2	0,1377	0,1159	0,0218	$1,2 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-5}$				
	Apfelmenge in g						101,25			
	Volumen des Enzymextraktes in ml						44,72			

Tabelle 38: Bestimmung der endo-PG-Aktivität in den einzelnen Apfelzonen (E.= Einheiten)

Extrakt	Messung		Durchlaufzeit in s	$\Delta 1/\eta_{\text{spez.}}$	E./ min	E./ g Apfel	$\bar{x}$	$\sigma (\pm)$	VK
Apfelschalen	1	t <sub>0</sub>	208,9	0,1109	11,095	4,981	5,074	0,080	1,58
		t <sub>1</sub>	189,9						
	2	t <sub>0</sub>	208,0	0,1128	11,278	5,064			
		t <sub>1</sub>	189,3						
	3	t <sub>0</sub>	208,5	0,1153	11,530	5,177			
		t <sub>1</sub>	189,0						
Apfelmenge in g							100,76		
Volumen des Enzymextraktes in ml							45,24		
Fruchtfleisch	1	t <sub>0</sub>	198,73	0,0663	6,626	2,896	2,960	0,088	2,97
		t <sub>1</sub>	188,43						
	2	t <sub>0</sub>	198,98	0,0706	7,056	3,084			
		t <sub>1</sub>	188,03						
	3	t <sub>0</sub>	198,56	0,0663	6,632	2,899			
		t <sub>1</sub>	188,28						
Apfelmenge in g							101,22		
Volumen des Enzymextraktes in ml							44,24		
Kerngehäuse	1	t <sub>0</sub>	196,93	0,0215	2,153	0,951	1,020	0,049	4,80
		t <sub>1</sub>	193,48						
	2	t <sub>0</sub>	196,88	0,0239	2,394	1,057			
		t <sub>1</sub>	193,06						
	3	t <sub>0</sub>	197,02	0,0238	2,381	1,052			
		t <sub>1</sub>	193,21						
Apfelmenge in g							101,25		
Volumen des Enzymextraktes in ml							44,72		

Tabelle 39: Bestimmung der Durchlaufzeit von reinem Enzymextrakt in s

Probe	Messung	eingesetzte Menge in ml	Durchlaufzeit in s
normales Apfelextrakt*	1	15	92,29
	2	15	92,24
Apfelschalensextrakt	1	15	95,69
	2	15	95,51
Fruchtfleischextrakt	1	15	89,27
	2	15	89,15
Kerngehäuseextrakt	1	15	87,01
	2	15	87,11

\*Das normale Apfelextrakt wird aus einer zufälligen Mischung aus Schalen sowie Fruchtfleisch hergestellt.

**Erklärung der selbständigen Arbeit**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift