

# Oxydationen in Obst und Obstsäften

Autor(en): **Biedermann, W.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **47 (1956)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983957>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Literatur

- 1) M. Tortelli und U. Fortini, Ann. Falsif. **4**, 139 (1911); Z.U.L. **22**, 139 (1911).
- 2) H. Kreis und E. Roth, Z.U.L. **26**, 38 (1913).
- 3) J. Grosfeld, Z.U.L. **73**, 409 (1937).
- 4) H. Hadorn und R. Jungkunz, diese Mitt. **44**, 453 (1953).
- 5) D. Holde und J. Marcusson, Ztschr. angew. Chem. **23**, 1260 (1910).
- 6) T. P. Hilditch, Hefter-Schönfeld, Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte I. Bd., S. 80, J. Springer, Wien (1936).
- 7) H. P. Kaufmann und W. H. Nitsch, Fette und Seifen **56**, 154 (1954); **57**, 473 (1955).

## Oxydationen in Obst und Obstsaften

Von W. Biedermann, Basel

(Arbeit ausgeführt an der Eidg. Versuchsanstalt, Wädenswil)

Bei der Herstellung von Fruchtsäften besteht heute das Bestreben, möglichst natürliche Produkte zu erzeugen. Jedoch fließt bekanntlich Apfelsaft bereits ab Presse völlig braun. Auch bei andern Früchten (Birnen, Trauben, Kirschen usw.) treten Bräunungserscheinungen auf, welche sowohl beim Lagerobst wie auch in der Fruchtsaft- und Konservenindustrie sehr unerwünscht sind. Dies gab den Anstoss für die folgenden Untersuchungen, welche in den Jahren 1951/52 an der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil, ausgeführt wurden.

### I. Übersicht über die Oxydationen in Fruchtsäften

Trotz vielen Publikationen herrscht noch wenig Klarheit auf dem Gebiet der Oxydationen in Fruchtsäften<sup>1)2)</sup>. Zahlreiche Arbeiten beschränken sich darauf, die Reaktionsmöglichkeiten aufzuzählen. So besteht heute die Auffassung, dass sich die Oxydationen in Fruchtsäften auf 3 verschiedene Arten abspielen können, nämlich

- a) nicht katalysierte Oxydationen
- b) durch Metallsalze katalysierte Oxydationen
- c) durch Enzyme katalysierte Oxydationen.

Aber schon diese Einteilung steht auf schwankenden Füßen: Man kennt zwar aus Modellversuchen die beträchtliche katalytische Wirkung der Metalle; wie stark sich jedoch Spurenmetalle in der Praxis tatsächlich auswirken, ist noch wenig untersucht. Ähnlich steht es mit den Punkten a und c.

Es scheint uns nun, dass man bisher die *Geschwindigkeit* der Oxydationsvorgänge zu wenig beachtet hat. Nach unseren Erfahrungen verlaufen in der Praxis die nichtenzymatischen Reaktionen a und b im allgemeinen langsam; zu ihrer Beobachtung benötigt man mehrere Stunden, Tage oder Wochen. Die enzy-

matischen Vorgänge c dagegen laufen schnell, zur Beobachtung genügen hier einige Minuten bis wenige Stunden. Dieses Einteilungsprinzip wird zwar von zahlreichen Grenzfällen und Ausnahmen in Frage gestellt, dürfte aber dennoch die Verständigung erleichtern.

Unter den Oxydationsvorgängen, welche sich erst im Laufe langer Zeiten (Lagerung) abspielen, gibt es möglicherweise sog. *sekundäre Oxydationen*. Darunter ist eine langsame Reaktion der anfänglich gebildeten Oxydationsprodukte mit reduzierend wirkenden Saftbestandteilen zu verstehen. Die primären Oxydationsprodukte sind in diesem Falle Zwischenglieder einer Redoxkette. Jedoch bereitet die sichere Erkennung solcher Reaktionen beträchtliche Schwierigkeiten.

Der Praktiker bemüht sich, seine Produkte vor Änderungen der *Farbe* und des *Aromas*, ferner vor *Vitaminverlust* zu schützen. Man hat gefunden, dass solche Veränderungen häufig oxydative Vorgänge sind. Daneben gibt es allerdings auch nichtoxydative Farb- und Aromaveränderungen.

Die *vorliegende Arbeit* beschäftigt sich in erster Linie mit Oxydationsvorgängen der Form c, d.h. mit enzymatischen Oxydationen. — Mit der Oxydation des Vitamins C haben wir uns nicht abgegeben.

## II. Die Oxydationsenzyme des Obstes

Bei der raschen Bräunung eines verletzten Apfels handelt es sich um eine Oxydation, welche durch die sog. *Polyphenoloxydase* katalysiert wird. Neben diesem schnell verlaufenden Vorgang gibt es im unverletzten Obst auch langsame enzymatische Oxydationen: Die Früchte *atmen* sowohl am Baum wie auf dem Lager, wobei Sauerstoff verbraucht und Kohlensäure gebildet wird. Nach gegenwärtiger Auffassung beruht die Atmung je nach Pflanzenart auf der Polyphenolase, auf der Cytochromoxydase (Warburgsches Atmungsferment)<sup>3)</sup> und bei manchen Pflanzenarten auch auf beiden Enzymsystemen zugleich<sup>4)</sup>. Als weitere Oxydase kommt in manchen Früchten die Ascorbinsäureoxydase vor, und vorübergehend sprach man ferner von einer Dioxymaleinsäureoxydase<sup>5)</sup>.

Neben diesen Oxydasen (sauerstoffübertragende Enzyme) findet man noch *weitere Oxydationsenzyme*: Katalase (sie zerlegt  $H_2O_2$ ) und Peroxydase (sie katalysiert Oxydationen in Gegenwart von  $H_2O_2$ ). Über die Bedeutung dieser Enzyme für den Stoffwechsel der Früchte ist noch wenig bekannt. — Schliesslich müssen mit Sicherheit auch wasserstoffübertragende Fermente (Dehydrasen) vorkommen, wenn auch solche bisher noch kaum aus Früchten isoliert worden sind.

Bei unseren Versuchen gingen wir von den Bräunungserscheinungen aus, welche sich beim Mahlen und Pressen des Obstes abspielen. Hiefür sind nach der Literatur die Polyphenoloxydase und die Peroxydase verantwortlich. Wir haben uns deshalb zunächst mit diesen beiden Enzymen beschäftigt.

### III. Die enzymatischen Bräunungsvorgänge

#### 1. Literatur

Die Erkenntnis, dass sich bei der Bräunung des Obstes enzymatische Oxydationen abspielen, stammt schon aus dem 19. Jahrhundert. Auch die Bezeichnung «Oxydase» datiert aus jener Zeit<sup>6)</sup>. Je nach der Herkunft unterschied man z.B. zwischen Laccase (welche den Milchsafte mancher Pflanzen bräunt), der Kartoffeloxydase, der Oenoxydase (welche das unerwünschte Braunwerden des Weines verursacht) usw. Diese verschiedenen Oxydasen sind jedoch einander sehr ähnlich, und wahrscheinlich handelt es sich immer um dasselbe Enzym. Theorien über den Mechanismus der Oxydation wurden von *Bach* und *Chodat*<sup>7)</sup>, von *Onslow*<sup>8)</sup> u.a. aufgestellt. Die Ansichten dieser Autoren sind zwar überholt, werden aber trotzdem noch gelegentlich in Betracht gezogen.

Eine gute Zusammenfassung über das Bräunungsenzym stammt von *Dawson* und *Nelson*<sup>9)</sup>. Diese Autoren nennen das Bräunungsferment *Tyrosinase*. Es ist weitverbreitet; Untersuchungen wurden vor allem an Präparaten aus Kartoffeln und aus Pilzen vorgenommen. Darnach ist die Tyrosinase ein Cu-haltiges Ferment, welches die Eigenschaft besitzt, Monophenole (Kresol, Tyrosin usw.) sowie Polyphenole zu chinonartigen, braunen Produkten zu oxydieren. Die Tyrosinase ist sehr empfindlich und verliert schon bei geringen äusseren Eingriffen die Fähigkeit der Monophenoloxydation; hingegen bleibt das Vermögen, Polyphenole zu oxydieren, viel besser erhalten. Nach *Dawson* und *Nelson* ist die früher übliche Einteilung der Oxydasen in Mono- und Polyphenoloxydasen somit hinfällig geworden.

Neben der *Tyrosinase* muss auf die *Peroxydase* hingewiesen werden. Das Enzym, welches erst in Gegenwart von  $H_2O_2$  wirksam wird, ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Verschiedene Autoren<sup>10)</sup> haben angeblich das gleichzeitige Vorkommen von  $H_2O_2$  und Peroxydase in Früchten festgestellt und schliessen daraus auf eine Bräunungswirkung der Peroxydase.

#### 2. Testung von Tyrosinase und Peroxydase

Bei unseren Versuchen benötigten wir häufig Nachweis- und Bestimmungsmöglichkeiten für Tyrosinase und Peroxydase.

##### a) Nachweis der Tyrosinase

Geeignet sind Lösungen von Phenolen oder von aromatischen Aminen. Beim Stehen an der Luft verfärben sich solche Lösungen nur langsam, in Gegenwart einer Oxydase dagegen sehr schnell. Wir verwendeten häufig das sog. *Rothenfusser-Reagens* (2,6 g Guajakol in 135 cm<sup>3</sup> Alkohol + 1,0 g p-Phenylendiamin-chlorhydrat in 15 cm<sup>3</sup> Wasser)<sup>11)</sup>; diese Lösung ergibt eine intensiv violette Farbe, wenn sie zum Saft von Äpfeln, Kartoffeln usw. gegeben wird. Auch auf angeschnittenen Früchten tritt die Farbenreaktion ein. Im folgenden werden wir die Abkürzung *R-Reagens* verwenden.



Der gebildete Farbstoff hat folgende Eigenschaften: Bei tieferen pH-Werten als etwa 3,2 entsteht zunächst eine blaugüne Stufe, welche sich mit Toluol ausschütteln lässt, wobei ein Farbumschlag nach rot auftritt. Die blaugüne Stufe hat die Eigenschaften eines Säure-Basenindikators: Auf Zusatz von Alkali schlägt der Farbstoff auf violett um, mit Säure entsteht daraus wieder die grüne Form. Letztere wird bei längerem Stehen an der Luft weiteroxydiert zu einer violetten Stufe, welche jedoch nicht mehr umzuschlagen vermag und sich nicht in Toluol löst.

Bei höheren pH-Werten als etwa 3,5 entsteht direkt violette Farbe, welche anfänglich noch den reversiblen pH-Umschlag nach grün zeigt. Bei längerem Stehen an der Luft verschwindet auch hier die Fähigkeit zum Umschlagen.

Beim Nachweis der Tyrosinase müssen folgende *Störmöglichkeiten* in Betracht gezogen werden:

1. Die Autoxydation des Reagens. Dieser Vorgang benötigt jedoch bei pH 3—4 einige Tage bis Wochen, während sich die enzymatische Oxydation im Laufe von Minuten und Stunden abspielt. Sofern es sich nicht um den Nachweis von sehr geringen Enzymmengen handelt, liegt hier somit keine Schwierigkeit vor.
2. Beschleunigung der Oxydation durch *nichtenzymatische Katalysatoren* beliebiger Natur. Zur Unterscheidung der nichtenzymatischen Katalyse von den enzymatischen muss erhitzt werden. Dabei werden die Enzyme inaktiviert, und die Nachweisreaktion verläuft negativ. Wir haben jedoch im Obst niemals solch nichtenzymatische Katalysatoren angetroffen.
3. Tyrosinase kann durch Anwesenheit von *Peroxydase* und  $H_2O_2$  vorgetäuscht werden. In diesem Falle müsste die Farbreaktion auch in Abwesenheit von molekularem  $O_2$  positiv ausfallen. Wir fanden diese Möglichkeit weder bei Birnen, Äpfeln noch Trauben verwirklicht.

#### b) Bestimmung der Tyrosinase

In Frage kommen manometrische<sup>9)</sup>, colorimetrische und titrimetrische<sup>12)</sup> Methoden. Bei den erstern dient der  $O_2$ -Verbrauch im Warburg-Apparat als Mass für die Enzymaktivität. Bei den titrimetrischen Methoden gibt man ein Reduktionsmittel (z.B. Vitamin C) zur Oxydaselösung und bestimmt durch Titration die in einer bestimmten Zeit oxydierte Menge. Wir selbst haben eine colorimetrische Bestimmung angewendet, welche der Peroxydasebestimmung nach *Willstätter-Stoll* nachgebildet ist. Unsere Methode besitzt zwar noch einige Mängel, erwies sich aber für die gestellten Aufgaben als ausreichend genau.

Bei der Bestimmung der Tyrosinase muss die pH-Abhängigkeit des Enzyms berücksichtigt werden. Handelt es sich um die Ermittlung der in einem Saft herrschenden *Enzymaktivität*, so muss die Bestimmung beim pH-Wert des betreffenden Saftes durchgeführt werden. Ebenso darf man Versuche, bei denen nur die Änderung der Aktivität zur Diskussion steht, beim pH des Saftes ansetzen. — Anders verhält es sich natürlich beim Vergleich zweier Säfte hinsichtlich ihrer *Enzymmenge*. In diesem Falle muss ein bestimmter pH-Wert eingestellt werden. Als brauchbarer Puffer erwies sich z.B. Michaelislösung vom pH-Wert 4,62.

Auf die Ausarbeitung einer Standardmethode (Einheitenbestimmung) wurde verzichtet, da wir einer solchen nicht bedurften. Vielmehr haben wir unsere Bestimmungsmethode den jeweils im Saft herrschenden Verhältnissen angepasst. Hiefür zwei Beispiele:

*Tyrosinasebestimmung bei pH 4,6:* Eine Mischung von 6 cm<sup>3</sup> Michaelispuffer (pH 4,62), 10 cm<sup>3</sup> Wasser und 2 cm<sup>3</sup> Rothenfusser-Reagens wird in einem 100 cm<sup>3</sup>-Erlenmeyer auf 20° C gebracht. Man fügt 2 cm<sup>3</sup> des zu untersuchenden Saftes hinzu und hält unter Schütteln genau 3 Minuten auf 20° C. Nun wird die Reaktion durch Zusatz von 2 cm<sup>3</sup> 5 %iger NaF-Lösung gestoppt. Man giesst das Gemisch in einen 50 cm<sup>3</sup>-Scheidetrichter und schüttelt das gebildete Indophenol mit 20 cm<sup>3</sup> Toluol aus. Das violette Indophenol geht mit roter Farbe in die Toluolschicht. Letztere wird abgetrennt, durch Papier filtriert und colorimetriert. Wir benützen das Leifo unter Verwendung des Filters S 53. Die Extinktionsmessung ist möglichst bald auszuführen, da die Farbe der Lösung beim Stehen an der Luft sich langsam ändert. — Als Mass für die Enzymaktivität benützen wir den mit 1000 multiplizierten Bunsenschen Extinktionsmodul.

*Tyrosinasebestimmung beim pH des Saftes:* 20 cm<sup>3</sup> Fruchtsaft (evtl. verdünnter Fruchtsaft) wird bei 20° mit 2 cm<sup>3</sup> frischem Rothenfusser-Reagens versetzt unter Rückkühlung auf 20° C. Man schüttelt während einer standardisierten Zeit (z.B. 3 Min., oder z.B. 10 Min.). Hierauf wird die Reaktion mit 2 cm<sup>3</sup> einer 5 %igen NaF-Lösung gestoppt. Im weitem verfährt man wie bei der soeben angegebenen Bestimmung.

Es sei daran erinnert, dass es auch andere, eventuell noch besser geeignete Reagentien für eine solche Bestimmung gibt (z.B. Brenzkatechin).

### c) *Nachweis der Peroxydase*

Für den Nachweis werden ebenfalls aromatische Amine und Phenole verwendet. Im Unterschied zur Tyrosinase tritt jedoch die Peroxydase erst bei Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 %ige Lösung) in Funktion. Bei der Oxydation entstehen zum Teil andere Reaktionsprodukte als beim Tyrosinase-Nachweis.

Auch hier muss man *Störungen* in Betracht ziehen:

1. Es gibt Substanzen, welche Peroxydase vortäuschen können (z.B. häminartige Körper).
2. Gegenwart von Tyrosinase + O<sub>2</sub> würde den Peroxydasenachweis verfälschen. Für den letzteren muss deshalb der Sauerstoff ferngehalten werden.

Allerdings bleibt auch bei Ausschluss von O<sub>2</sub> eine Störmöglichkeit bestehen: Allfällig vorhandene Katalase zersetzt das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; der dabei freiwerdende Sauerstoff täuscht nun mit Tyrosinase eine Peroxydase vor.

### d) *Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Nachdem in den Pflanzen einmal Peroxydase gefunden war, begann man folgerichtig auch nach Peroxyden zu suchen, da erst diese dem Enzym die Tätigkeit ermöglichen. Doch lässt sich voraussagen, dass Peroxyde in der Pflanze nur beschränkte Lebensdauer besitzen können, infolge der Gegenwart der Katalase.

Wir beschränken uns hier auf den Hinweis, dass der Nachweis kleiner Mengen  $H_2O_2$  in Pflanzensäften heikel ist. Verschiedene in der Literatur aufgeführte Befunde (z.B. 12) halten denn auch einer strengen Kritik nicht stand.

### 3. Erfahrungen bei den Testversuchen

In der Literatur stösst man immer wieder auf Versuche, bei denen Tyrosinase und Peroxydase mit Farbreaktionen nachgewiesen wurden. Im folgenden (Tab. 1) möchten wir zeigen, dass für solche Farbtaste beträchtliche Erfahrung nötig ist, falls sie richtig gedeutet werden sollen.

Tabelle 1  
Farbreaktionen

		Phenylendiamin	Guajakol	Rothenfusser	Brenzkatechin	Benzidin
Äpfel	ohne $H_2O_2$	blass, grün-violett	—	grün-violett	braun	schwach violett
	mit $H_2O_2$	blass, grün-violett	orange-rosa	grün-violett	braun	violett bis blau
Birnen	ohne $H_2O_2$	blass, grün-violett	—	grün-violett	braun	schwach violett
	mit $H_2O_2$	blass, grün-violett	orange-rosa	grün-violett	braun	intensiv blau
Traubensaft	ohne $H_2O_2$	—	—	grün-violett	blass-braun	nicht geprüft
	mit $H_2O_2$	—	—	grün-violett	blass-braun	nicht geprüft
Kartoffeln	ohne $H_2O_2$	—	—	langsam violett	braun	blass violett
	mit $H_2O_2$	sofort intensiv grün	rötlich	schnell violett	braun	blau, instabil
Milch	ohne $H_2O_2$	—	—	—	—	—
	mit $H_2O_2$	intensiv blau	orange	violett	schw'rotbraun	blau

*Diskussion:* Bei Äpfeln, Birnen und Kartoffeln wurde die Reaktion direkt auf der Schnittfläche ausgeführt. Die Tabelle enthält Durchschnittsresultate, im einzelnen kommen beträchtliche Abweichungen vor. So hängt z.B. der Gehalt an Enzym und damit auch die Intensität der Farbe von der Sorte, daneben auch vom Reifezustand ab.

#### a) Die Färbungen beim Tyrosinase-nachweis (ohne Zusatz von $H_2O_2$ )

Von den untersuchten Reagentien arbeitet das Rothenfusser-Reagens am zuverlässigsten. Auch Brenzkatechin ist gut. Die übrigen geben nur schwache, Guajakol praktisch gar keine Reaktion.

Beim R-Reagens sind die entwickelten Farben zwar vom pH, sonst aber kaum vom Substrat abhängig. Bei Brenzkatechin dagegen treten je nach Substrat rotbraune bis gelbbraune Nüancen auf. — Unerwartet und unerklärt ist die auffallend schwache Reaktion von oxydasereichem Traubensaft mit Brenzkatechin.



Ferner ist uns nicht verständlich, weshalb das R-Reagens die Apfelytyrosinase sehr gut anzeigt, bei der Birnentyrosinase jedoch häufig nur schwache Reaktion gibt, wogegen z.B. Brenzkatechin in beiden Fällen sehr gut anspricht. Es ist zu vermuten, dass viele dieser Widersprüche durch fruchteigene Polyphenole bedingt sind, welche irgendwie in den Vorgang eingreifen.

#### b) Die Färbungen in Gegenwart von $H_2O_2$

Die beobachteten Farben stimmen zum Teil mit denen der Tyrosinasereaktion überein; in einigen Fällen hingegen tritt auf Zusatz von  $H_2O_2$  eine neue Farbe auf. So gibt auf Früchten Benzidin +  $O_2$  violette Farbe, mit  $H_2O_2$  dagegen ein instabiles Blau, das sich anfänglich durch weitem Zusatz von  $H_2O_2$  erneuern lässt.

Spezifisch für Peroxydase scheint die Guajakolreaktion zu sein, worauf schon von verschiedenen Autoren hingewiesen wurde. Die Färbungen sind jedoch recht schwach, so dass uns die Reaktion nicht sehr geeignet erscheint.

Am Beispiel des p-Phenylendiamin lässt sich deutlich ein Einfluss des Substrates nachweisen: Birnen geben ein blasses, schmutziges Grün bis Violett, Kartoffeln ein augenblicklich prächtiges, jedoch instabiles Grün, Milch ein intensives und beständiges Blau.

Unerwartet ist das Verhalten des R-Reagens gegenüber Birnenoxydase. (Dass letztere vorhanden ist, lässt sich auf Grund der Blaufärbung mit Benzidin +  $H_2O_2$  vermuten.) Da R-Reagens sich z.B. bei Milch vorzüglich zum Peroxydasenachweis eignet, wäre dasselbe bei Birnen zu erwarten. In Tat und Wahrheit tritt mit  $H_2O_2$  kaum eine zusätzliche Reaktion ein. — Auch für diese Widersprüche dürften fruchteigene Polyphenole mitverantwortlich sein.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass man bei der Interpretation von Farbtönen sehr vorsichtig sein sollte.

### 4. Die Bräunung ist eine Tyrosinasereaktion

Auf die Tyrosinasenatur des Bräunungsvorganges weisen folgende Tatsachen hin:

- a) Kocht man unverletzte Äpfel, so verfärben sie sich nicht mehr, wenn sie nachträglich zerschnitten werden. Die schnelle Bräunung beruht somit tatsächlich auf einem enzymatischen Vorgang.
- b) Der Saft von gekochten Äpfeln beginnt sich wieder zu bräunen, falls man ihm Tyrosinasepräparate zusetzt, welche aus *Botrytis cinerea* gewonnen wurden. Folglich ist für die Reaktion keine spezifische, fruchteigene Tyrosinase erforderlich.
- c) Durch Zusatz von Kaliumfluorid, Vitamin C sowie durch Hitze lassen sich nicht nur sämtliche Farbreaktionen, sondern auch die Bräunungen verhindern. Überhaupt gehen die Tyrosinase-Aktivität, gemessen durch Farbtöne und die Aktivität geschätzt mittels der Bräunungsintensität, parallel.

Wir haben uns gefragt, wie weit neben der Tyrosinase auch *Peroxydase* beim Bräunungsvorgang eine Rolle spielt. Folgender Versuch mit Thurgauer Weinäpfeln gibt darüber Auskunft (siehe Tab. 2).



a) *Nachweis der Tyrosinase*

In den Kolben A der Apparatur (Fig. 1) wurde frisch gepresster Saft gegeben, in den Kolben B eine kleine Menge R-Reagens vorgelegt.

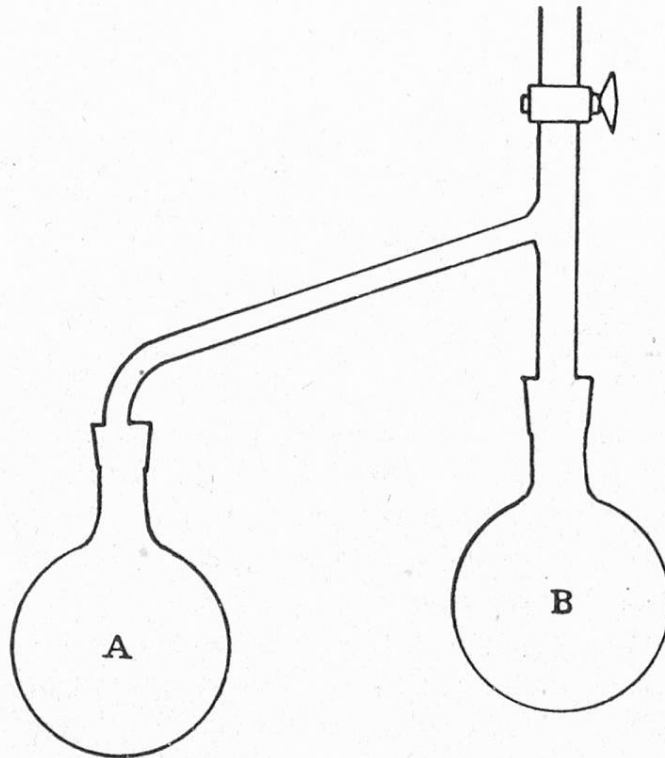


Fig. 1

Apparatur zum colorimetrischen Nachweis der Filtrationsenzyme in Säften

Die Apparatur wurde evakuiert, hierauf der Hahn H geschlossen und nun durch Kippen ein Teil des Saftes ins Gefäß B hinübergossen. Nach dem Kippen blieb der Saft hell, während sich eine Kontrolle an der Luft ziemlich schnell dunkel färbte. Als der Hahn geöffnet wurde, trat in kurzer Zeit Verfärbung ein. Der Saft enthielt somit Tyrosinase.

b) *Nachweis von Peroxydase*

Zunächst wurde die Tyrosinase-Empfindlichkeit von Benzidin geprüft. Es zeigte sich dabei, dass die Verfärbung in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur langsam eintritt und keine hohe Intensität erreicht.

Wird dagegen im Kolben B Benzidin +  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorgelegt, so erfolgt nach dem Kippen sofort Dunkelfärbung, welche der Kontrolle (Saft + Benzidin +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Luft) nicht nachsteht. Es ist somit Peroxydase vorhanden.

Tabelle 2

## Nachweis von Tyrosinase und Peroxydase im Saft von Thurgauer Weinäpfeln

Nr.	Reagens	Luftzutritt	Zugabe von $H_2O_2$	Beobachtete Verfärbung
1	R-Reagens	+	—	schnell und intensiv
2	R-Reagens	—	—	nichts
3	Benzidin	+	—	langsam und schwach
4	Benzidin	—	—	nichts
5	Benzidin	+	+	schnell und intensiv
6	Benzidin	—	+	schnell und intensiv

c) Abwesenheit von  $H_2O_2$ 

Aus der Tabelle geht als weiteres Resultat hervor, dass Peroxyd nicht im Saft vorhanden war, da sich sonst Versuch Nr. 4 wenigstens langsam verfärbt hätte. Es trat jedoch auch über Nacht keine Farbvertiefung auf.

Auf Grund der Versuche a—c beruht die Bräunung auf der Tätigkeit der Tyrosinase. Es ist zwar auch Peroxydase vorhanden, aber sie nimmt am Bräunungsvorgang nicht teil (siehe auch Versuche 1 und 2, Seite 106).

Ältere Autoren <sup>7)8)</sup> nahmen an, die Tyrosinase erzeuge unter dem Einfluss des Luftsauerstoffs ein Peroxyd, welches entweder selbst oder auch mit Peroxydase zusammen die Bräunung bewirke. Die Diskussion über diese Fragen ist noch nicht abgeschlossen, doch steht fest, dass die Tyrosinase auch allein zu bräunen vermag.

## 5. Beobachtungen an der Äpfeltyrosinase

Die folgenden Beobachtungen wurden nicht am gereinigten Enzym, sondern an Früchten und Fruchtsäften gemacht, da bei der Reinigung stets mit einer Veränderung der Enzymeigenschaften gerechnet werden muss. Für die Versuche wurde häufig der quantitative Tyrosinasetest verwendet.

## a) Verteilung der Tyrosinase in der Frucht

Farbteste ergaben, dass Tyrosinase im ganzen Apfel vorkommt, jedoch im Gebiet des Kerngehäuses stärker angereichert ist. Birnen weisen im Zentrum und unter der Schale reichlich Enzym auf, dazwischen liegt eine enzymarme Zone.

Bei diesen Versuchen färbten Phenylendiamin und R-Reagens die holzigen Bestandteile der Frucht (Gehäusewände, Steinzellen) intensiv orange an.

## b) Trub und Enzym

Wird ein frischgepresster Saft durch Papierfiltration möglichst schnell vom Trub befreit, so schreitet in der Folge die Bräunung nur langsam fort. Aktivität-

messungen ergaben, dass der filtrierte Saft fast gar kein Enzym enthält, da letzteres im Trub haftet (siehe Tab. 3 sowie Kurve 5 der Fig. 2b). Trübe Säfte dagegen bräunen sich schnell; offenbar vermag also die Tyrosinase die im Saft gelösten Polyphenole zu oxydieren, ohne selbst in Lösung zu gehen. — Es zeigte sich, dass schon sehr feine Trübungen den Enzymgehalt des Saftes stark erhöhen.

*Tabelle 3*

*Verteilung der Tyrosinase auf Trub und Flüssigkeit*

Test: 20 cm<sup>3</sup> Saft + 2 cm<sup>3</sup> Rothenfusser-Reagens bei 15<sup>0</sup> während 10 Minuten.  
Dann 1 cm<sup>3</sup> KF-Lösung, 20 cm<sup>3</sup> Toluol.

	Tyrosinase-Aktivität
Saft ab Presse, trüb	212
Saft ab Prese, filtriert	12

Die Menge Enzym, welche beim Pressen in Lösung geht, ändert sich je nach Obstsorte, Reifezustand und Pressdruck. Trauben geben das Enzym viel leichter in Lösung als Äpfel und Birnen. Sie eignen sich deshalb als Ausgangsmaterial für die Enzymgewinnung.

*c) pH-Einfluss*

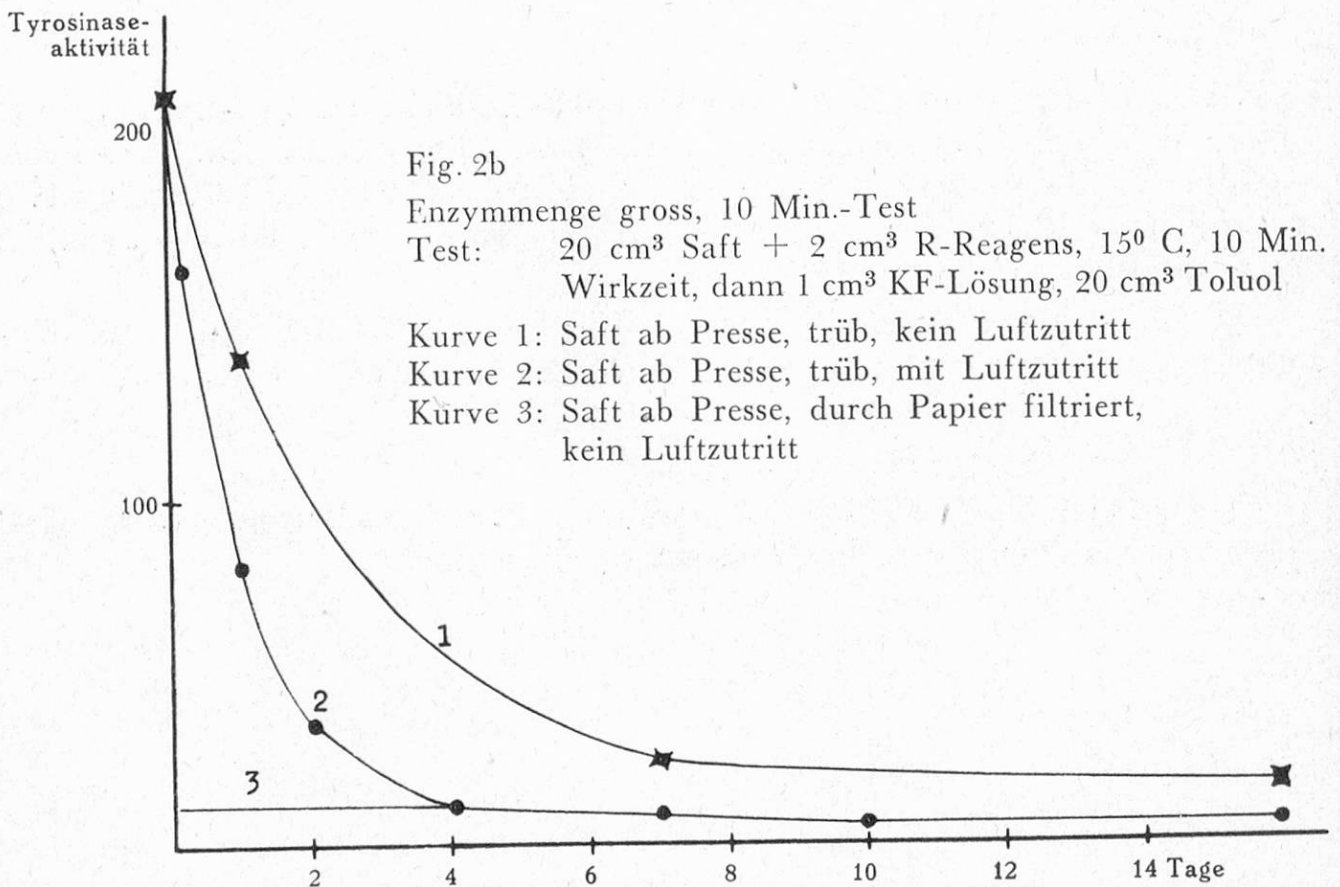
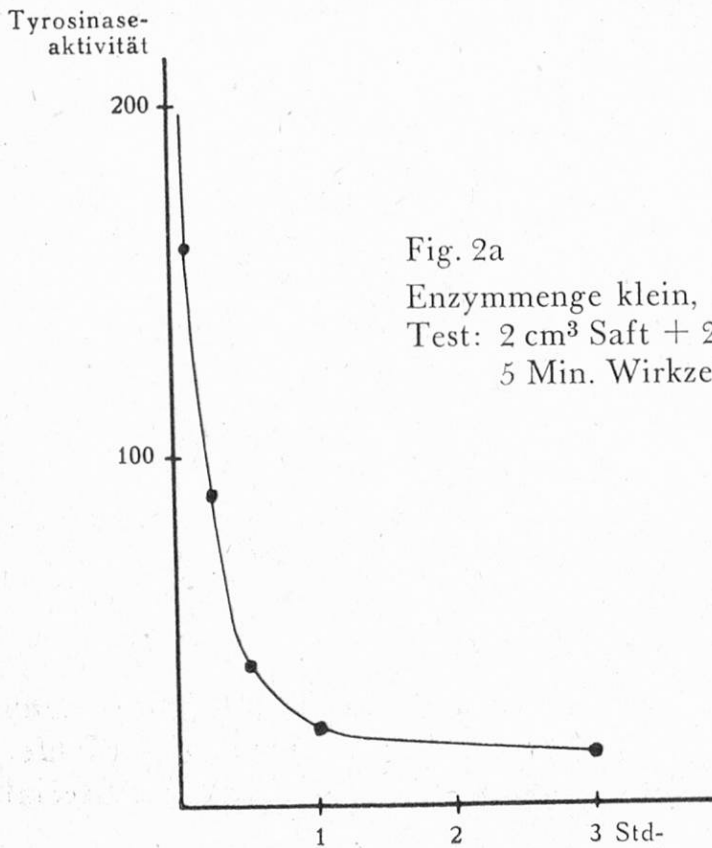
Nach Angaben von *Fleury*<sup>14)</sup> liegt das pH-Optimum der Tyrosinase bei pH 6,7—8. Wir selbst haben gefunden, dass Mineralsäuren das Enzym irreversibel inaktivieren. Mit steigendem pH nimmt dann die Aktivität zu. Oberhalb pH 6 stossen jedoch die Untersuchungen auf Schwierigkeiten wegen der Autoxydation der Testsubstanzen.

Die Obst- und Traubensäfte, deren pH-Werte bei 3—4 liegen, sind somit ziemlich weit vom pH-Optimum der Tyrosinase entfernt.

*d) Die Selbstinaktivierung der Tyrosinase*

Verfolgt man die Aktivität der Tyrosinase während des Bräunungsvorganges, so beachtet man einen schnellen Rückgang (Fig. 2a und 2b).

Fig. 2  
Die Selbstinaktivierung der Tyrosinase





In den ersten Minuten des Versuchs vollzieht sich der Abfall der Aktivität so rapid, dass es nicht möglich ist, exakte Messwerte zu ermitteln; über die Aktivität des Enzyms im unverletzten Apfel bleiben wir also leider im Ungewissen.

Bezüglich der Ursachen dieser Inaktivierung hat *Wieland*<sup>15)</sup> gezeigt, dass gasförmiger Sauerstoff das Enzym direkt zu schädigen vermag. Wahrscheinlich noch stärker wirken jedoch die bei der Oxydation entstehenden Substanzen, was aus folgendem Versuch hervorgeht:

*Tabelle 4*  
*Oxydationsprodukte als Enzymgifte*

Bohnapfelsaft, pH = 3,5  
Test: 17 cm<sup>3</sup> + 2 cm<sup>3</sup> R-Reagens, 20<sup>0</sup> C, 4 Minuten Wirkzeit

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Versuchslösung				Tyrosinase- aktivität
	frisch ab Presse ungekocht	frisch ab Presse gekocht	24 Std. an Luft, dann gekocht	R-Reagens	
	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	
I.	0	17	0	2	0
II	2	15	0	2	110
III	2	0	15	2	26

Der Vergleich der Versuche II und III lehrt, dass der an Luft gestandene Saft Hemmstoffe enthält, welche die Enzymaktivität herabsetzen. Solche Hemmungen wurden auch beim Arbeiten mit gereinigten Enzympräparaten beobachtet<sup>16)</sup>.

#### *e) Inaktivierung durch Wärme*

In der Literatur<sup>17)</sup> finden sich zahlreiche Angaben über den Zusammenhang von Temperatur und Erhitzungsdauer, welche zur Inaktivierung der Tyrosinase erforderlich sind. Diese Daten, welche vorwiegend für praktische Bedürfnisse ermittelt werden, weichen jedoch stark voneinander ab. Das rührt nach unserer Erfahrung vor allem daher, dass die Empfindlichkeit des Enzyms keine konstante Grösse ist: Zunächst sind natürlich mit steigender Enzymkonzentration höhere Erhitzungsdosen notwendig; gestandene Säfte, deren Aktivität bereits abgesunken ist, erfordern deshalb geringere Hitzeeinwirkung. Dann zeigt sich ferner, dass die Hitzeresistenz vom pH abhängt: Die Widerstandsfähigkeit ist am grössten beim pH-Optimum und fällt ab, wenn man sich von diesem entfernt. Schliesslich spielt der Lösungszustand des Enzyms eine grosse Rolle; das im Trub verankerte Ferment erweist sich nämlich im Vergleich mit dem gelösten als bedeutend widerstandsfähiger. Aus alledem geht her-

vor, dass es nicht zweckmässig ist, feste Angaben zu machen. Wir möchten uns vielmehr auf den Hinweis beschränken, dass bei Obstsaften bereits kürzestes Erhitzen auf 50° C die Tyrosinase deutlich angreift und dass das Enzym durch Temperaturen von 100° C sofort inaktiviert wird. Schliesslich sei noch hingewiesen auf die Beobachtung verschiedener Autoren<sup>18)</sup>, wonach sich durch Hitze inaktivierte Peroxydase allmählich wieder regenerieren kann. Solche Erscheinungen, welche auch bei der Tyrosinase vorkommen sollen, sind uns jedoch nicht begegnet.

#### f) *Inaktivierung durch Chemikalien*

Es gibt einige Substanzen, welche die Tyrosinase direkt zu blockieren vermögen, z.B. S-Verbindungen wie Thioharnstoff oder Sulfit. Ähnlich wirkt auch Cyanid; letzteres verliert jedoch in Gegenwart von Aldehyden seine Wirkung bald infolge Bildung von Cyanhydrinen. Auch SO<sub>2</sub> dürfte in grösserer Konzentration blockieren. Wahrscheinlich wirken diese Enzymgifte dadurch, dass sie sich als Komplexbildner an das Kupfer des Enzyms anlagern. Ein vortreffliches Enzymgift ist schliesslich das in der Tyrosinase-Literatur wenig genannte Fluorid \*), ähnlich, aber erst in höherer Konzentration wirken auch Chlorid und Bromid. (Es handelt sich dabei *nicht* um einen allgemeinen Salzeffekt.) Die Hemmung durch Halogene kommt insofern unerwartet, als gewöhnliche Cu-Halogenkomplexe sehr instabil sind.

Hingewiesen sei noch auf die Inaktivierung der Tyrosinase durch chinonartige Stoffe, wie sie z.B. beim Bräunungsvorgang gebildet werden.

#### g) *Haltbarkeit*

Der grossen Labilität der Tyrosinase stehen Versuche gegenüber, aus denen eine erstaunlich grosse Haltbarkeit des Enzyms hervorgeht. Hinsichtlich der Kälteresistenz liegen Beobachtungen an Kirschen vor. Danach lassen sich Kirschen monatelang tiefgekühlt lagern, ohne dass Bräunung auftritt; nach dem Auftauen hingegen tritt schnelle enzymatische Bräunung ein. Von Weinen, welche zum Braunwerden neigen, ist bekannt, dass der Zutritt von Luft selbst nach langer Lagerung noch zur Bräunung führen kann. Ebenso hat *Kelhofer* Versuche ausgeführt<sup>19)</sup>, aus denen mehrjährige Lebensdauer der Tyrosinase hervorgeht.

#### h) *Gewinnung des Enzyms*

Die Gewinnung der Tyrosinase aus Äpfeln bereitet einige Schwierigkeiten. Einerseits haftet das Enzym sehr fest im Trub und ist daraus nur schwer ablösbar. Andererseits wird die Tyrosinase ausserordentlich leicht verändert und inaktiviert.

Wir haben darauf hingewiesen, dass sich Trauben am besten als Ausgangsmaterial eignen dürften, da sie das Enzym relativ leicht abgeben. Wahrscheinlich

---

\*) Nach *Kelhofer*<sup>19)</sup> lässt sich Fluorid durch Waschen des enzymhaltigen Gewebes mit Wasser wieder entfernen.

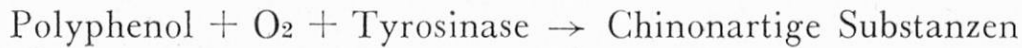
ist die Zugabe von Vitamin C während der Isolierung vorteilhaft. Letzteres soll die gebildeten Hemmstoffe (Chinone) sofort reduzieren, wodurch die Aktivität wohl besser erhalten bleibt.

#### IV. Die Wirkungen der Tyrosinase

Mit der Wirkung der Tyrosinase in unverletzten Früchten haben wir uns nicht beschäftigt. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf Maischen und Säfte.

##### 1. Der Bräunungsvorgang

Im wesentlichen haben wir den Bräunungsvorgang bereits besprochen. Es handelt sich um die Oxydation von Polyphenolen zu braunen, chinonartigen Substanzen:



Allerdings ist die genaue Konstitution der hier vorkommenden Polyphenole noch wenig untersucht.

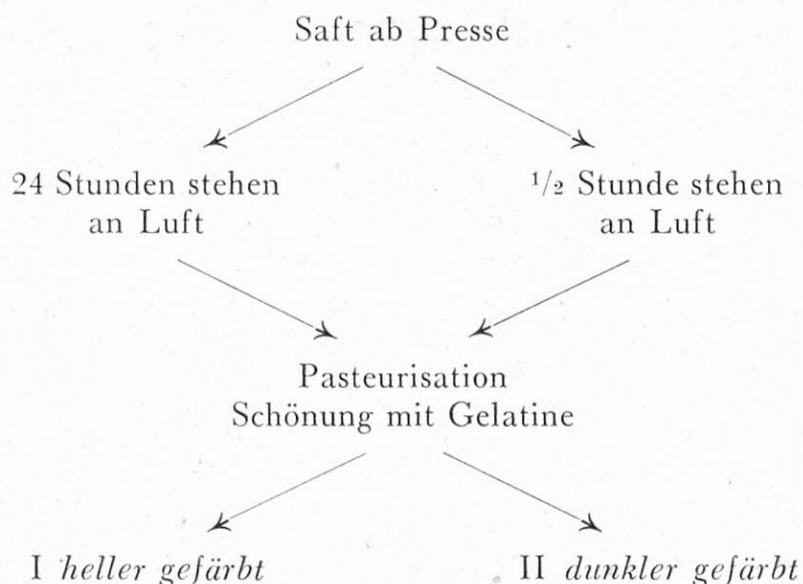
Neben dieser enzymatischen Veränderung können die Polyphenole des Obstes auch *nichtenzymatisch* oxydiert werden, wobei ebenfalls braune Produkte entstehen. Mit Jodlösung verläuft dieser Vorgang schnell, mit molekularem Sauerstoff dagegen sehr langsam.

Durch Zusatz von *Reduktionsmitteln* lässt sich die Bräunung verhindern, bzw. teilweise rückgängig machen. In Frage kommen Ascorbinsäure, SO<sub>2</sub> u.a., welche bei der Entfärbung durch den braunen Chinonkörper oxydiert werden. Auch gärende Hefe reduziert die Bräunungsstoffe deutlich; Gärmost ist deshalb heller als Süßmost.

*Melaninbildung*: Lässt man Mahlbrei einige Tage unter Zusatz von geeigneten Konservierungsmitteln stehen, so wird er dunkel. Hingegen ist der daraus gepresste Saft umso heller, je länger man mit dem Abpressen zuwartet; bei genügender Wartezeit resultiert sogar ein gelber Presssaft. Die Ursache dieser Erscheinung besteht in einer Bindung der Chinone an Bestandteile des Gewebes. Möglicherweise lagern sich die braunen Chinone an N-haltige Substanzen an unter Bildung von schwerlöslichen Melaninen. Daneben wurde aber bereits von *Kelhofer*<sup>19)</sup> eine «physikalische Adsorption» in Betracht gezogen.

Wahrscheinlich um etwas Ähnliches handelt es sich bei folgender Erscheinung, welche wir gelegentlich — nicht immer — angetroffen haben:





Da die Tyrosinase im Saft I 24 Stunden, im Saft II aber nur eine halbe Stunde wirken konnte, sollte eigentlich Saft I dunkler sein als Saft II. In Wirklichkeit ist er etwas heller; demnach hat die Gelatine aus Saft I mehr Farbstoff entfernen können. Wir müssen also annehmen, dass die Farbstoffe des Saftes II durch die langfristige Oxydation in einen besonders gut fällbaren (evtl. hochmolekularen) Zustand verwandelt wurden.

## 2. Die Oxydation des Gerbstoffs

Die Catechingerbstoffe der Früchte sind mit den Bräunungsstoffen der Früchte nahe verwandt. Es handelt sich in beiden Fällen um Polyphenole, welche durch Tyrosinase oxydiert werden können. Deshalb lassen sich die meisten unserer Ausführungen über den Bräunungsvorgang und über das Bräunungsenzym auf die Gerbstoffoxydation übertragen.

Die erste sorgfältige Untersuchung über die enzymatische Gerbstoffoxydation stammt unseres Wissens von *Kelhofer*<sup>19)</sup>. In dieser zu wenig beachteten Arbeit findet sich schon ein erstaunlich grosser Teil des heutigen Wissens vor. Auf einige Punkte, welche in unserem Zusammenhang von Interesse sind, möchten wir hinweisen:

1. Durch enzymatische Oxydation geht der herbe Geschmack gerbstoffreicher Birnsäfte verloren. Dieser Vorgang verläuft gleichzeitig wie das Braunwerden, hält jedoch länger an. Die Versuche wurden quantitativ ausgeführt (Gerbstoff-Titration).
2. Während sich die nichtoxydierte Form des Gerbstoffs leicht im Saft löst, wird die oxydierte Stufe im Fruchtgewebe festgehalten. Vermutlich aus diesem Grunde ist Presssaft aus gestandener Maische leichter filtrierbar als aus frischer.



3. Die Eigenschaften der Oxydase wurden untersucht (Temperatureinfluss, Säureeinfluss, Hemmung usw.). Eine mit Chloroform konservierte Oxydase-lösung war nach 2 Jahren noch aktiv.
4. Das Brechen der gerbstoffreichen Säfte (Scheidsäfte) wird beschrieben; es handelt sich dabei um eine langsame Ausfällung des (polymerisierten?) Gerbstoffs. Die Faktoren, welche das Brechen fördern und hemmen, werden aufgezählt. Unter anderem wird darauf hingewiesen, dass Oxydation den Eintritt des Brechens beschleunigt.
5. Unbegründet scheint uns die Ansicht *Kelhofers*, die im Saft gelöste und die im Gewebe verankerte Oxydase seien 2 verschiedene Enzyme.

### *3. Veränderung von Geruch und Geschmack*

Über die für das Apfelaroma charakteristischen Substanzen ist wenig bekannt. Man hat zwar, ausgehend von sehr grossen Apfelmengen, flüchtige Fraktionen abgetrennt<sup>20)</sup>. Diese bestanden aus Alkoholen, Estern, Aldehyden usw. Jedoch scheiterte der Versuch, das Apfelaroma auf Grund dieser ausführlichen Analyse künstlich herzustellen. Offenbar wurden also entscheidende Bestandteile übersehen. Wenn wir im folgenden von den Aromaveränderungen sprechen, handelt es sich unseres Erachtens um diese entscheidenden Bestandteile, deren chemische Formel allerdings unbekannt bleibt.

Wir haben festgestellt, dass die Tyrosinase auch die geruchlichen und geschmacklichen Qualitäten des Obstes zu verändern vermag. Vergleicht man das Aroma geraffelter Äpfel, welche 0 Stunden, 1 Stunde und 24 Stunden an der Luft standen, so lassen sich reproduzierbare Unterschiede feststellen.

Für solche Differenzierungen gibt es jedoch keine Messmethode. Man muss deshalb auf das Urcil einer grösseren Zahl von Degustatoren abstellen, welche blind und möglichst ohne jede Beeinflussung probieren. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, die Sinneseindrücke in Worte umzusetzen. Immerhin ergaben sich von selbst einige stets wiederkehrende Bezeichnungen, welche wir im folgenden verwendet haben.

#### *a) Die Aromaveränderungen sind Oxydationen*

1. Lässt man geriebene Äpfel an der Luft stehen, so ändert sich das Aroma. Es ist anfangs frisch, nach einigen Stunden dagegen faulig. Am schnellsten verlaufen die Veränderungen in der ersten halben Stunde. – Bei Säften bestehen ähnliche, aber weniger eindruckliche Verhältnisse.
2. Verhindert man den Zutritt von Sauerstoff, so kommen die Veränderungen zum Stillstand.
3. Reduktionsmittel (Vitamin C, SO<sub>2</sub>) verhindern die Aromaveränderungen. (Durch SO<sub>2</sub> wird das Aroma weitgehend ausgelöscht, während Vitamin C häufig einen grasigen Geschmack erzeugt.) Sind die Reduktionsmittel weg-oxydiert, so setzen sowohl Bräunung als auch Aromaveränderungen von neuem ein. – Durch Zusatz von Vitamin C zu einer oxydierten Maische kann deren Aroma teilweise aufgefrischt werden.

### *b) Die Aromaveränderungen sind Enzymreaktionen*

1. Trubfreie, d.h. enzymarme Säfte ändern nicht nur die Farbe, sondern auch das Aroma viel langsamer als trübe Produkte.
2. KF, welches zahlreiche Oxydationsenzyme hemmt, verhindert die Aromaveränderungen. (Beim Zusatz von KF entwickelt sich allerdings bald ein schwacher heuähnlicher Geruch; die Hemmung lässt sich deshalb mit KBr oder KCl noch schöner demonstrieren.)
3. Pasteurisierte Säfte sind auch bei Zutritt von Luft weitgehend aromastabil. Die Stabilität ist allerdings nicht vollkommen. Jedoch sind die Veränderungen von deutlich anderer Art als die enzymatischen und meistens viel langsamer.

Zur Demonstration eignen sich möglichst schwach oxydierte Säfte. Zu ihrer Gewinnung sind besondere Vorsichtsmassnahmen und forciertes Arbeitstempo erforderlich. Solche Säfte haben meist gelbgrüne Farbe und ein ganz «unentwickeltes», etwas grasiges Aroma, welches bei manchen Sorten deutlich an das Aroma von Büchsenapfelmus erinnert.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die Veränderungen des Aromas gehen den Farbveränderungen in jeder Hinsicht parallel. Sämtliche Eingriffe, welche die Farbveränderungen beschleunigen, stabilisieren oder rückgängig machen, haben dieselbe Wirkung auf das Aroma. Es steht für uns deshalb ausser Zweifel, dass die schnellen Aromaveränderungen enzymatische Oxydationen sind. Als Oxydationsenzym kommt nur die Tyrosinase in Betracht.

### *c) Die Oxydationskurve eines Süssmostes*

Die Figur 3 soll die enzymatischen Aromaveränderungen eines Süssmostes graphisch darstellen. Die Kurven beruhen auf den Resultaten zahlreicher, blind ausgeführter Degustationsversuche mit erprobten Teilnehmern. Als Ordinate wurde der «Oxydationsgrad» des Saftes aufgetragen. Es handelt sich dabei allerdings nicht um eine messbare Grösse, sondern um bei der Degustation wahrgenommene Sinneseindrücke. Dementsprechend ist die Figur 3 lediglich als ein Schema zu verstehen.

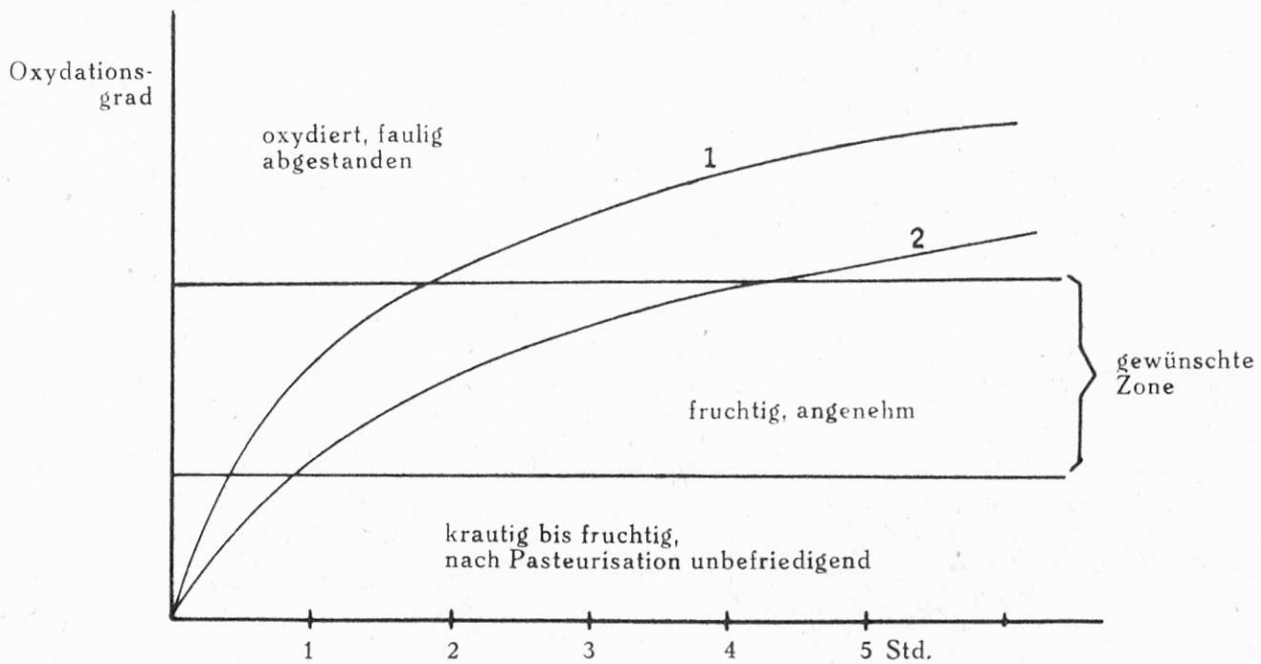


Fig. 3

Schematische Aromakurve eines Süßmostes ab Presse \*)

Kurve 1: Trubreich, enzymreich, säurearm, warm

Kurve 2: Trubarm, enzymarm, säurereich, kalt

Für den Kurvenverlauf lassen sich folgende Regeln angeben: Die Kurve verläuft umso flacher, je geringer der Luftzutritt zum Saft, je tiefer das pH, je tiefer die Temperatur und je geringer der Enzymgehalt eines Saftes. (Letzterer hängt von der Sorte, vom Reifezustand des Obstes und vom Trubgehalt des Saftes ab.)

#### 4. Die Selbstentlüftung des Saftes

Verfolgt man den  $O_2$ -Gehalt eines Saftes ab Presse, so findet man einen rapiden Abfall im Laufe der ersten halben Stunde (Fig. 4). Hiefür ist die Tyrosinase verantwortlich; durch ihre intensive Tätigkeit wird in kurzer Zeit praktisch der ganze im Saft gelöste Sauerstoff aufgebraucht. Der Saft entlüftet sich also selbst. Wird dagegen die Tyrosinase durch Zusatz von NaF inaktiviert, so bleibt der  $O_2$ -Gehalt hoch. — Inaktiviert man die Tyrosinase durch Hitze und lässt hierauf den Saft an der Luft stehen, so steigt sein  $O_2$ -Gehalt schnell in die Höhe.

Säfte, die sofort nach dem Pressen schnell auf  $70^\circ C$  erhitzt wurden, zeigten nach dem Erkalten einen besonders geringen  $O_2$ -Gehalt, obwohl die angewendete Temperatur zur Austreibung des  $O_2$  nicht genügt. Die Erscheinung beruht darauf, dass beim Erhitzen das Temperaturoptimum der Tyrosinase durchlaufen wird.

\*) Um zum krautigen Geschmack zu gelangen, muss in forciertem Tempo und unter Ausschluss von  $O_2$  gemostet werden.

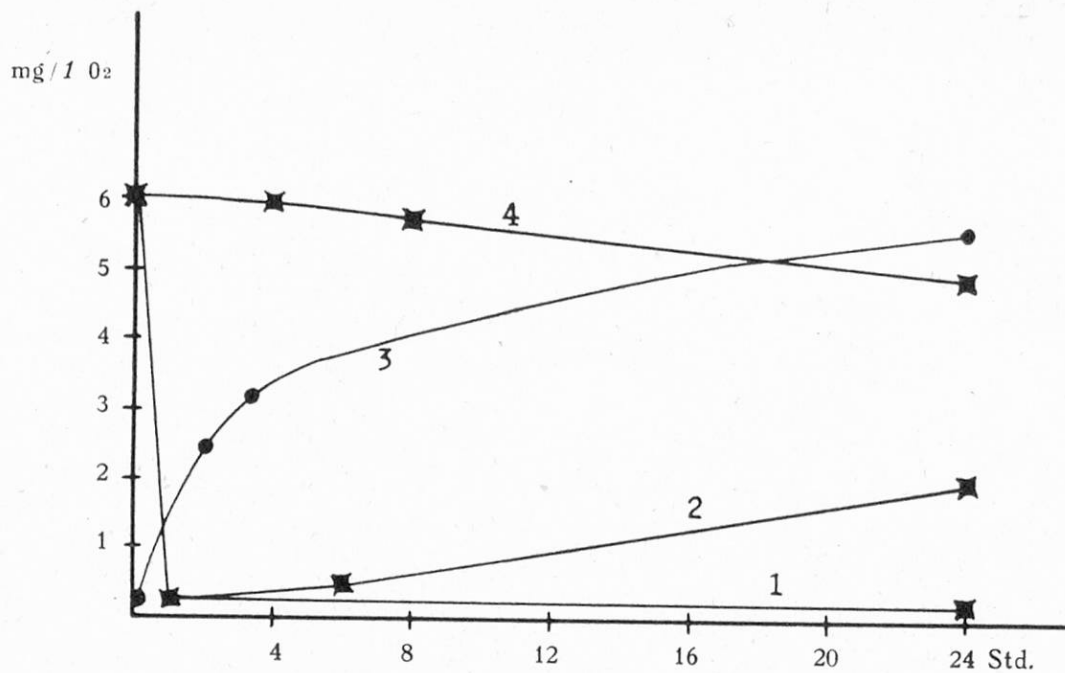


Fig. 4

Einfluss verschiedener Behandlungen auf den O<sub>2</sub>-Gehalt eines Apfelsafts ab Presse

- Kurve 1: Saft ab Presse, verschlossene Flasche (kein Luftzutritt)
- Kurve 2: Saft ab Presse, offene Flasche (Luftzutritt)
- Kurve 3: Pasteurisierter Saft, mit Luftzutritt
- Kurve 4: Saft ab Presse, Zusatz von NaF schon zur Maische, verschlossene Flasche

#### Ausführung der O<sub>2</sub>-Messungen

Der Saft ab Presse wurde direkt in kleine Flaschen spundvoll eingefüllt und letztere sorgfältig verschlossen. Nach geeigneten, abgestuften Zeiten wurden die Fläschchen geöffnet und der O<sub>2</sub>-Gehalt des Saftes polarographisch bestimmt. Dabei resultierte die Kurve 1.

Zur Aufnahme der ersten zwei Kurvenpunkte war es notwendig, die schnell verlaufende Oxydationsreaktion zu unterbrechen, was durch Zugabe von etwas NaF-Lösung geschah. Ohne dieses Hilfsmittel wäre der O<sub>2</sub>-Spiegel im Laufe der Messung zu stark abgefallen.

Lässt man den Saft ab Presse nicht in verschlossenen Flaschen, sondern in *offenen Gefäßen* stehen, so erhält man praktisch dieselbe Kurve. Somit verläuft der O<sub>2</sub>-Verbrauch viel schneller als die O<sub>2</sub>-Nachlieferung aus der Atmosphäre. — Bei längeren Wartezeiten kann allerdings der O<sub>2</sub>-Gehalt infolge Luftberührung wieder ansteigen. Natürlich hängen in diesem Fall die Messresultate von den Gefäßdimensionen ab, daneben auch von der Tiefe, in welcher die Probe entnommen wurde.

Die Selbstentlüftung der Süßmoste ist zu berücksichtigen bei der Diskussion über Qualitätsverbesserungen. In letzter Zeit werden für die gewerbliche Süßmostherstellung verschiedene technische Neuerungen vorgeschlagen, wobei auch die künstliche Entlüftung ernsthaft erwogen wird. Der Gedanke stammt aus der



Citrusindustrie. Dort wendet man solche Verfahren mit Erfolg an, um ungünstige Oxydationen zu verhindern. Man bringt dabei den Saft ab Presse in ein Vakuum, durch welches der Sauerstoff abgesaugt wird.

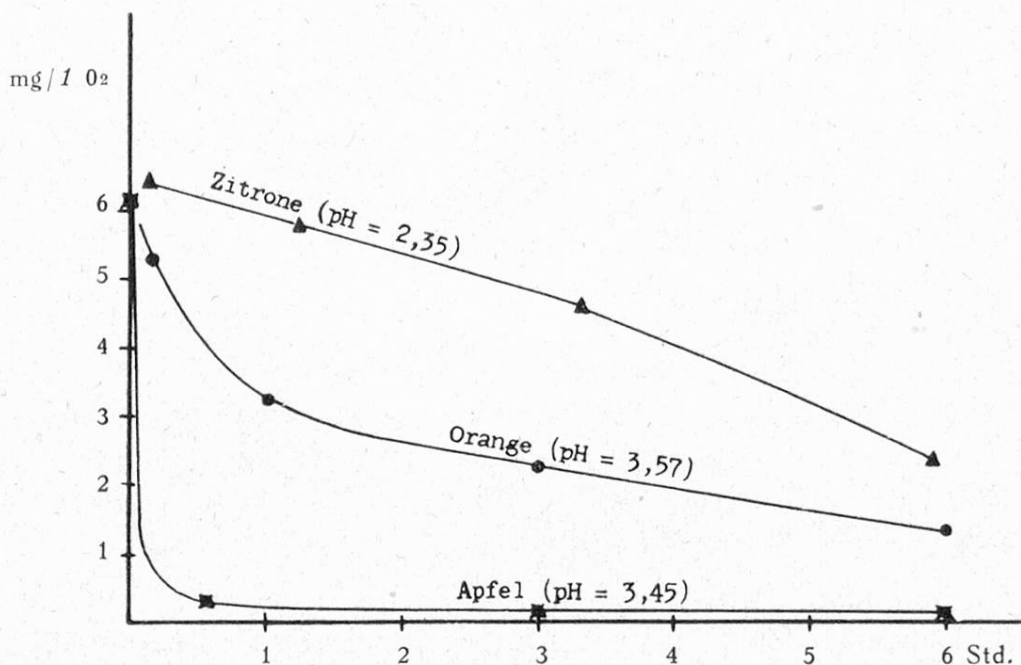


Fig. 5

Vergleich der Selbstentlüftung bei Apfel- und Citrussäften

Es ist jedoch nicht richtig, solche Entlüftungsverfahren schematisch auf Obst-säfte zu übertragen. Dies geht aus der Figur 5 hervor. Man sieht, dass bei Citrus-säften der O<sub>2</sub>-Gehalt nach dem Pressen nur ganz langsam zurückgeht. Die Verwendung von Entlüftungsapparaturen ist somit sinnvoll (vgl. allerdings *Kefford*<sup>21</sup>). Anders verhält es sich bei den Kernobstsäften. Letztere entlüften sich infolge ihres Tyrosinasegehaltes selbst, und zwar besser, als dies mit Appa-raturen zu erreichen wäre. In diesem Falle wäre eine künstliche Entlüftung über-flüssig, jedenfalls so lange, als dem Saft nicht neue Luft zugeführt wird.

### 5. Das Redoxpotential

Das Redoxpotential von Säften ab Presse stellt sich nur langsam ein und ist nicht sehr gut reproduzierbar.

Wir haben Säfte im hellen, nicht oxydierten Zustand einerseits, im oxydierten Zu-stand andererseits gemessen und nur geringe Differenzen gefunden. Jedenfalls ist das Redoxpotential kaum imstande, praktisch brauchbaren Aufschluss über den Oxydations-zustand von Fruchtsäften zu liefern.

## V. Weshalb bräunt sich die intakte Frucht nicht?

Die Beantwortung dieser Frage scheint auf den ersten Blick einfach zu sein. Es liegt nahe anzunehmen, dass die unverletzte Frucht keinen gasförmigen Sauerstoff enthält; erst durch das Zerschneiden kommt das Gewebe mit Sauerstoff der Luft in Berührung, worauf die Oxydationen beginnen können.

Man hat dementsprechend versucht, durch Fernhalten des Luftsauerstoffes helle, ungebräunte Säfte herzustellen. (Das Obst wurde hiezu unter Kohlensäure gemahlen und gepresst.) Diese Versuche schlugen jedoch fehl, es resultierte trotz der Anwendung von  $\text{CO}_2$  ein brauner Pressaft. Die Schuld daran trug der *im Obst* enthaltene, gasförmige Sauerstoff.

### 1. Nachweis von Sauerstoff im Apfel

*Versuch 1:* Die Haut eines Apfels wurde mit einem Rasiermesser fein geritzt, in die Ritze ein Faden gelegt und hierauf die Wunde sorgfältig mit Vaseline gegen Luft verschlossen. Nun wurde der Apfel mit Hilfe des Fadens angeschnitten, ohne dass Aussenluft Zutreten konnte. Nach einer Stunde wurde geöffnet; die Schnittfläche war braun gefärbt.

*Versuch 2:* Evakuiert man einen Apfel unter Paraffinöl, so entweicht die Luft in Form von Blasen durch Haut und Kelchröhre. Nach Aufhebung des Vakuums saugt sich der Apfel mit Paraffinöl voll. In diesem Zustand rufen «innere Verletzungen» keine Bräunung mehr hervor. Erst bei Zutritt von Sauerstoff beginnt sich die Farbe zu verändern.

Aus diesen beiden Versuchen geht folgendes hervor: Das Innere der Frucht enthält neben Polyphenolen und Tyrosinase auch gasförmigen Sauerstoff. Bräunung tritt nur ein, wenn das Gewebe verletzt wird und wenn tatsächlich Sauerstoff vorhanden ist. Die im Apfel eingeschlossene  $\text{O}_2$ -Menge reicht für die Bräunung aus.

### 2. Bestimmung der Luftmenge im Apfel

Es wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

#### a) Raffelmethode

2 Äpfel wurden einmal ungeraffelt und einmal geraffelt in einen mit Toluol beschickten Messzylinder gebracht.

	Flüssigkeitsstand
Toluol allein	365 $\text{cm}^3$
Zusatz der ganzen Äpfel	515 $\text{cm}^3$
Zusatz der geraffelten Äpfel	487 $\text{cm}^3$
Äpfelvolumen	150 $\text{cm}^3$
Gasvolumen	28 $\text{cm}^3 = 18,5\%$ des Gasvolumens

## b) Schrumpfmethode

Das Volumen zweier Äpfel wurde vor und nach Behandlung mit Benzoldampf gemessen. Durch Evakuieren des Apfels über Benzol (2 Std.) wird das Gewebe schlaff. Lässt man wieder Luft zuströmen, so schrumpft der Apfel zusammen, ohne dabei wesentliche Luftmengen einzusaugen.

Volumen vor Behandlung	139 cm <sup>3</sup>
Volumen nach Behandlung	109 cm <sup>3</sup>
Gasvolumen	30 cm <sup>3</sup> = 21,5 % des Gesamtvolumens

Da es sich hier nur um rohe Methoden und nicht um dieselben Früchte handelt, ist die Übereinstimmung der Resultate befriedigend. Wir finden also einen Gasraum von rund 20 % des Gesamtvolumens. Nach *Ulrich* <sup>22)</sup> und andern enthält dieser Gasraum ca. 18 % O<sub>2</sub>. Somit enthält ein Apfel etwa 4 Volumprozent Sauerstoff.

Übrigens beruht die *weisse Farbe* des Obstfleisches zum Teil auf diesem Luftgehalt. Saugt man nämlich die Luft heraus und ersetzt sie durch Wasser, so erscheint das Apfelgewebe durchsichtig und gelblich. In den Zwischenzellräumen fein verteilte Luft dagegen gibt Anlass zu intensiver Lichtstreuung. Dadurch wird das Gewebe undurchsichtig und erscheint weiss.

### 3. Bräunung durch mechanische Verletzung

Obwohl im Apfelinnern alle drei zur Bräunung erforderlichen Komponenten vorhanden sind, bleibt der unverletzte Apfel weiss. Dies rührt her von einer räumlichen Trennung der beteiligten Substanzen. Man nimmt an, dass die Polyphenole im Zellsaft gelöst seien und durch den Tonoplasten von den Oxydasen getrennt würden. Diese Annahme ist jedoch bis heute noch nicht streng bewiesen.

Sobald das Gewebe irgendwie verletzt wird, können die Bräunungssubstanzen miteinander in Kontakt treten, worauf die Bräunung beginnt. Mechanisch verletzend wirken: Zerschneiden und Mahlen der Früchte, Aufprallen des Apfels am Boden (Fallflecken), Wurm- und Pilztätigkeit. Bei den Fallflecken handelt es sich um «innere Verletzungen», sie lassen sich leicht künstlich erzeugen.

### 4. Bräunung durch chemische Verletzung

Neben der mechanischen gibt es auch eine «chemische» Verletzung. Lässt man Äpfel in evakuierten Gefässen über organischen Lösungsmitteln stehen, so tritt mit manchen Substanzen Bräunung und Weichwerden ein, besonders nachdem man wieder Luft Zutreten lässt. Somit machen diese Stoffe die trennenden Wände des Gewebes durchlässig; sie erhöhen die Permeabilität.



Tabelle 5

## Bräunung von Äpfeln durch Dämpfe von Lösungsmitteln

Keine Bräunung	Luft, Wasser, NH <sub>3</sub> , Äthylen, Aceton, Methanol
Sehr schwache Wirkung	Methanol, Äthylalkohol, Eisessig
Schwache, langsame Bräunung	Acetaldehyd, Butanol
Mittelstarke Bräunung	Petroläther
Starke und schnelle Bräunung	Dichloräthylen, Hexan
Sehr starke und sehr schnelle Bräunung	Trichloräthylen, Chloroform, Äther, Benzol, Toluol

Besonders kräftig wirkt z.B. Chloroform; eine Behandlung in Chloroformdampf von 10 Minuten Dauer kann bereits eine kräftige Bräunung der Haut nach sich ziehen (Wartezeit ca. 1 Tag). Aus der Tabelle 5 geht hervor, dass die *fettlösenden* Substanzen besonders kräftig wirken, zugleich handelt es sich um Stoffe mit ausgesprochen narkotischer Wirkung. (Über den Zusammenhang zwischen Fettlösungsvermögen, Permeabilitätserhöhung und narkotischer Wirkung besteht eine umfangreiche Literatur.)<sup>23)</sup>

Ähnlich wie die Fettlösungsmittel wirken auch einige fruchteigene *Stoffwechselprodukte*, deren Natur allerdings noch nicht bekannt ist. Diese Stoffe erzeugen — falls sie sich anstauen können — die Haut- und Fleischbräune und vielleicht auch das Teigwerden der Birnen. Durch Aufbewahren von Früchten in geschlossenen Behältern lassen sich Haut- und Fleischbräune künstlich beschleunigen. — Mit Hilfe von Ölpapier wird versucht, diese lipophilen Substanzen dem Lagerobst zu entziehen und dadurch die Bräunungen zu verhindern.

## VI. Nichtenzymatische Oxydation

Die Oxydation von Polyphenolen ist ein Vorgang, der durch die Tyrosinase stark beschleunigt wird, sich jedoch auch in Abwesenheit des Enzyms abspielt: Lösungen von Polyphenolen verfärben sich an der Luft. Die Geschwindigkeit dieser Oxydation wird durch tiefes pH gesenkt und durch Metallkatalysatoren erhöht. — Wir haben bereits darauf hingewiesen, dass auch bei Obstsaften solche enzymfreie Oxydationen vorkommen. Mit Jod, KMnO<sub>4</sub> usw. verlaufen sie verhältnismässig schnell, mit Sauerstoff dagegen langsam.

Um die nichtenzymatische, durch O<sub>2</sub> bewirkte Bräunung zu untersuchen, benutzen wir verschiedene Ausgangsprodukte: den hellen Saft gekochter Äpfel einerseits, andererseits ungebräunten Süssmost, welcher im Eiltempo unter CO<sub>2</sub> hergestellt und sogleich pasteurisiert worden war. Aus mehreren Versuchen mit übereinstimmenden Resultaten teilen wir folgendes mit:

Tabelle 6  
*Nichtenzymatische Oxydation*  
 (Saft bzw. Früchte vor Versuch erhitzt)

Nr.	Behandlung	Luftzutritt	Befund nach 10 Tagen	
			Farbe	Degustation
1	Unbehandelt	—	hell	fruchtig
2	KF	—	hell	
3	Unbehandelt	+	gebräunt	unangenehm
4	KF	+	gebräunt	
5	Komplexon III	+	gebräunt	

Wir finden somit, dass bei Luftzutritt *langsame Bräunung* eintritt (Nr. 3—5). Letztere beruht im vorliegenden Versuch nicht etwa auf der Wirkung von Restenzymen, denn die mit KF behandelten Proben stimmten mit den unbehandelten völlig überein (Nr. 1 mit 2 und Nr. 3 mit 4). — Mit dem Zusatz von Komplexon III, welches Schwermetalle ausserordentlich fest bindet, suchten wir einen Hinweis auf die Wirkung von *Metallkatalysatoren* zu erhalten (Nr. 5). Auch hier stimmte der Farbton mit dem der Kontrolle überein. Daraus, sowie aus zahlreichen andern Beobachtungen schliessen wir, dass Metallspuren bei den langsamen Oxydationen von Obstsaften nicht die grosse und entscheidende Rolle spielen, die man ihnen gelegentlich zuschreibt.

Neben der Farbvertiefung haben wir ferner eine nachteilige *Veränderung des Aromas* festgestellt. Allerdings wird hier nicht die bei der enzymatischen Oxydation beobachtete Geruchsskala durchlaufen, und es entsteht nicht wie dort ein fauliger Geschmack. Bei der Oxydation der Aromastoffe führen somit die enzymatische und die nichtenzymatische Oxydation zu verschiedenen Produkten.

Über die O<sub>2</sub>-Menge, welche für diese Veränderungen erforderlich ist, wissen wir noch nichts genaues. Wahrscheinlich genügt schon ein geringes Quantum. Nach Beobachtungen in der Praxis muss nämlich zur Veränderung von Obstkonzentrat O<sub>2</sub>-freies Wasser verwendet werden; andernfalls werden Farbe und Aroma des so bereiteten Getränkes nachteilig verändert <sup>24</sup>).

Im Laboratorium lässt sich die nichtenzymatische Oxydation durch Anwendung von Sauerstoff und von höheren Temperaturen beschleunigen: Mit Süssmost zur Hälfte gefüllte Flaschen wurden einerseits mit O<sub>2</sub>, andererseits mit N<sub>2</sub> gründlich gespült, hierauf mit Bügelverschluss verschlossen und auf 80—100° C erhitzt. Dabei traten deutliche Differenzen in Farbe und Aroma auf.

Neben den oxydativen Farbänderungen gibt es auch *nichtoxydative*. Am bekanntesten ist wohl die sog. Maillard-Reaktion, welche auf der Verbindung von Zucker mit N-haltigen Substanzen beruht <sup>25</sup>). Bis heute ist jedoch nicht bekannt, ob diese Reaktion in der Süssmosterei eine praktische Rolle spielt. —

Eine weitere Farbänderung ist die Aufhellung des Süssmostes ab Presse beim Pasteurisieren. Möglicherweise handelt es sich hier um eine sog. sekundäre Oxydation (siehe Abschnitt I). — Auch bei den Aromaveränderungen gibt es natürlich nichtoxydative Vorgänge; als Beispiel nennen wir den Kochgeschmack.

## VII. Einige Konsequenzen für die Praxis

1. Während seiner Herstellung ist der Obstsaft dem atmosphärischen Sauerstoff sehr stark ausgesetzt. Vor allem ist dies beim Pressen der Fall, wo der Saft in dünnen Fäden über die Packroste rieselt. In diesem Zeitpunkt ist die Tyrosinase noch hochaktiv und sorgt für eine intensive O<sub>2</sub>-Aufnahme. Mit grosser Geschwindigkeit setzen die Oxydationsvorgänge ein, so dass der abfliessende Saft bereits braun gefärbt ist.
2. Durch Mahlen und Pressen unter CO<sub>2</sub> lässt sich die Bräunung nicht zuverlässig verhindern, da die Äpfel gasförmigen Sauerstoff enthalten. Zudem ist die völlige Verhinderung der Oxydationen degustativ ungünstig (krautiges Aroma). Erst durch schwache Oxydation entsteht das gewünschte fruchtige Aroma.
3. Enzymatische Oxydationen lassen sich durch Anwendung von Hitze zu einem beliebigen Zeitpunkt unterbrechen (Inaktivierung der Tyrosinase). Die erforderliche Temperatur und die Erhitzungsdauer sind allerdings von Produkt zu Produkt verschieden, da die Resistenz der Tyrosinase von zahlreichen Faktoren (pH, Lösungszustand) abhängt.
4. Während der Oxydation (Mahlen, Pressen) geht die Aktivität der Tyrosinase schnell zurück (Selbstinaktivierung). Sie ist aber im Schönungsbotich noch gross genug, den im Saft gelösten Sauerstoff in kurzer Zeit völlig aufzubrauchen (Selbstentlüftung). Eine künstliche Entlüftung ist bei Äpfel- und Birnsäften deshalb unnötig. — Bei weiterer, übermässiger O<sub>2</sub>-Zufuhr führt die enzymatische Oxydation allerdings zu einem fauligen Aroma. Dies lässt sich verhindern, indem man den Luftzutritt zum Schönungsgefäss verhindert.
5. Durch die Schönung wird der grösste Teil der Tyrosinase entfernt, da letztere an den Trubstoffen haftet. Lässt man zu einem solchen enzymarmen oder enzymfreien Saft Sauerstoff zutreten, so kann der letztere *nichtenzymatisch* oxydieren. Bei diesem Vorgang entsteht neben einer Farbveränderung auch eine deutliche Verschlechterung des Aromas, wobei wahrscheinlich schon geringe O<sub>2</sub>-Mengen ausreichen. Man soll deshalb einen geschönten Saft nach Möglichkeit vor Luftzutritt bewahren.

### Zusammenfassung

1. *Das Enzym*
  - a) In Äpfeln und Birnen wurden Tyrosinase und Peroxydase nachgewiesen. Für die schnellen Veränderungen bei der Herstellung des Saftes ist nur die Tyrosinase



verantwortlich. — Auf zahlreiche Störungen beim Nachweis der Enzyme durch Farbstoffe wird hingewiesen.

- b) Ein quantitativer Tyrosinasetest wird beschrieben.
- c) Die Tyrosinase haftet fest im Trub und vermag den Saft zu verändern, ohne selbst in Lösung zu gehen. Durch Filtration wird sie zum grössten Teil entfernt. — Für die Inaktivierung durch Hitze lassen sich nur grobe Richtlinien angeben, da die Resistenz des Enzyms von der Konzentration, vom pH und vom Lösungszustand abhängt.

## 2. Die Wirkungen

- a) Durch Tyrosinasewirkung werden verändert: Farbe, Gerbstoffgehalt, Aroma und O<sub>2</sub>-Gehalt des Pressaftes. Auf das Redoxpotential hat das Enzym nur geringen Einfluss.
- b) Durch Tyrosinasewirkung entstehen aus den Polyphenolen der Frucht braune Farbstoffe. Letztere werden, verglichen mit den Polyphenolen, leichter vom Fruchtgewebe festgehalten und leichter durch Gelatine gefällt. Oxydierte Säfte können deshalb heller sein als nichtoxydierte.
- c) Die enzymatischen Aromaveränderungen werden beschrieben.
- d) Durch Tyrosinasewirkung verliert der Obstsaft nach dem Pressen seinen anfänglichen O<sub>2</sub>-Gehalt in kurzer Zeit (Selbstentlüftung). Künstliche Entlüftung ist deshalb unnötig.
- e) Die Tyrosinaseaktivität fällt nach dem Pressen rapid ab, weil bei der Oxydation Enzymgifte gebildet werden (Selbstinaktivierung).

## 3. Verhältnisse im Apfel

- a) Der Gasgehalt von Äpfeln wurde zu 20 Vol. % ermittelt. Diese Luft ist mitbeteiligt an der weissen Farbe des Fruchtfleisches. Der in der Frucht vorhandene Sauerstoff reicht zur Bräunung aus.
- b) Infolge von Trennwänden ist der Kontakt der 3 Bräunungskomponenten verhindert. Die Oxydationen setzen erst ein, wenn das Gewebe mechanisch oder chemisch verletzt wird. — Die chemische Verletzung beruht auf der Erhöhung der Permeabilität. Besonders wirksam sind fettlösende Substanzen.

4. Neben der enzymatischen Oxydation werden nichtenzymatische Oxydationsvorgänge beschrieben.

5. Für die Praxis werden einige Konsequenzen gezogen.

## Résumé

La présence de tyrosinase et de peroxydase a été mise en évidence dans des pommes et des poires. C'est à la tyrosinase seule que sont dues les rapides transformations du jus de ces fruits au cours de leur obtention.

On décrit un test quantitatif pour le dosage de la tyrosinase. — On a trouvé que les pommes contiennent environ 20 % de gaz, (air) en vol., et que c'est à cet air qu'elle doivent la couleur blanche de leur chair.

On décrit l'oxydation enzymatique et non-enzymatique de jus de fruits.

Quelques recommandations pratiques sont faites.

## Summary

Tyrosinase and peroxydase have been detected in apples and pears. To tyrosinase alone are due the quick changes observed in the juices of these fruits in the course of their preparation.

A test for the quantitative determination of tyrosinase is described. — It has been found that apples contain about 20 vol.-% gas (air) and that it is to this gas content that they owe the white colour of their pulp.

The enzymatic as well as the non-enzymatic oxidation of fruit juices is described. A few practical recommendations are made.

## Literatur

- 1) *J. Lavollay*, Oxydationserscheinungen bei der Herstellung und Lagerung von Fruchtsäften. Bericht über den II. internat. Kongress der Fruchtsafthersteller 1950, S. 51–80, Verlag E. Kalt, Zug, Schweiz.
- 2) *Cruess*, Commercial Fruit and Vegetable Products 1948, S. 877.
- 3) *Ann. Rev. of Plant Physiology* **1**, 211 (1950).
- 4) *Ann. Rev. Bioch.* 1951, S. 8; *Z. Fortschr. Botanik.* **12**, 298 (1942/48).
- 5) *Z.* 1940, I, 1210 ff.
- 6) *Schoenbein*, *Phil. Mag.* **11**, 137 (1856).
- 7) *Bach und Chodat*, *Ber.* **35**, 2466 (1904).
- 8) *Onslow*, *Bioch. J.* **18**, 549 (1924); *Plant Biochemistry* S. 123 (1931).
- 9) *Nelson und Dawson*, *Adv. in Enzymology* **4**, 99 (1944); ferner *Klein*, *Handbuch der Pflanzenanalyse IV*, 975 (1933).
- 10) *Balls und Hale*, *Ind. Eng. Chem.* **27**, 335 (1935).  
*James und Crang*, Jahresbericht der brit. Versuchsanstalt Long Ashton, S. 234 (1948).
- 11) *Rothenfusser*, *Z.U.N.G.* **16**, 71 (1908).
- 12) *Purr*, Betriebsmethode zur Peroxydasebestimmung, *Z.Unters.Lebensm.* **90**, 208 (1950). Die Methode lässt sich zu einer Tyrosinasebestimmung umarbeiten.
- 13) *Willstätter und Stoll*, *Ann. der Chemie* **416**, 21 (1918).
- 14) *Fleury*, *C. r. d. l'Acad. des sciences* **178**, 1027 (1924).
- 15) *Wieland*, *Ber.* **63**, 66 (1930).
- 16) *J. Am. chem.* **72**, 820 (1950).
- 17) *Euler*, *Chemie der Enzyme II*, S. 365 ff.; *Chem. Abstr.* 1948, 8888b und 1949, 9275h.
- 18) *z.B. Bioch. Z.* 318, 413 (1948).
- 19) *Kelhofer*, *Landw. Jahrbuch der Schweiz* 1908, S. 343.
- 20) *White*, *Food Res.* 15 (1), 68 (1950).
- 21) *Kefford, McKenzie und Thompson*, Der Einfluss des Sauerstoffs auf die Geschmacksänderung und den Verlust an Ascorbinsäure bei Orangensaft in Konservenbüchsen (siehe Bericht über den II. internat. Kongress der Fruchtsafthersteller, Anm. 1).
- 22) *Ulrich*, *Comptes rendus* **228**, 500 (1949).
- 23) *Winterstein*, *Die Narkose* (1926).
- 24) *Brunner*, *Schweiz. Ztschr. Obst und Weinbau* **61**, 212 (1952).
- 25) *Patron*, *Fruits outre mer* **5**, 167 (1950).  
*Friedmann und Kline*, *J. biol. Chem.* **184**, 599 (1950).