

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	66 (1975)
Heft:	2
Artikel:	Enzymatische Bräunung und ihre Hemmung durch verschiedene Substanzen
Autor:	Dimpfl, D. / Somogyi, J.C.
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-982673

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 22.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

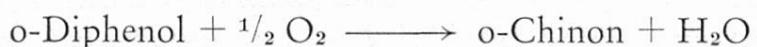
Enzymatische Bräunung und ihre Hemmung durch verschiedene Substanzen*

D. Dimpfl und J. C. Somogyi

Institut für Ernährungsforschung, Rüschlikon-Zürich
(Direktor: Prof. Dr. J. C. Somogyi)

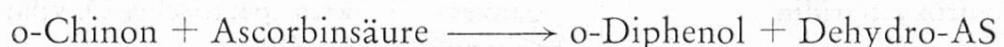
Die enzymatische Bräunung, wie sie z. B. bei der Verarbeitung von Früchten und Gemüsen vorkommt, ist sowohl vom biochemischen als auch vom lebensmitteltechnologischen Standpunkt aus von Interesse.

Der Vorgang läßt sich allgemein wie folgt formulieren:



o-Chinone reagieren leicht weiter und bilden höhermolekulare, stark gefärbte Verbindungen, sogenannte Melanine, welche die eigentliche Färbung bewirken.

Von verschiedenen Autoren wurde bis anhin vor allem die Wechselwirkung zwischen Polyphenolase (PPO) und Ascorbinsäure beschrieben. Kertesz und Zito (1) sind der Ansicht, daß die bräunungshemmende Wirkung von Ascorbinsäure darauf beruht, daß sie die ersten Oxydationsprodukte nach folgendem Schema reduziert:



Gemäß Baruah und Swain (2) wird das Enzym PPO durch Ascorbinsäure inaktiviert. Sie nahmen an, daß diese irreversible Inaktivierung auf einer Reduktion der Cu-Ionen des Enzyms beruht. Täufel und Voigt (3) folgern aus ihren Versuchen, daß die Hemmwirkung von Ascorbinsäure teilweise auf ihrer reduzierenden Wirkung der primär gebildeten Chinone basiert, teilweise jedoch durch eine irreversible Inaktivierung des Enzyms zustande kommt. Zu ähnlichen Schlüssen gelangte auch Ingraham (4, 5, 6) aufgrund seiner kinetischen Studien.

Unserer Ansicht nach könnte es sich aber bei der Hemmung der enzymatischen Bräunung durch Ascorbinsäure auch um eine kompetitive Wirkung handeln.

Ziel unserer Untersuchungen war es, einerseits den Reaktionsablauf der enzymatischen Bräunung weiter aufzuklären und andererseits den Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf diese Reaktionen und ihren Wirkungsmechanismus zu untersuchen.

* Vortrag gehalten an der Jahrestagung der Schweiz. Gesellschaft für Ernährungsforschung, Zürich, 4. Mai 1974.

Methodisches

Durch eine Reihe von Experimenten wurde ein Versuchsmodell ausgearbeitet, mit welchem sich einerseits der Wirkungsgrad verschiedener Hemmsubstanzen bestimmen läßt und welches andererseits zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus verwendbar ist.

Das Versuchsgemisch enthielt als Substrat verschiedene Diphenole, als Enzym Tyrosinase aus Pilzen bzw. Kartoffelpolyphenoloxidase sowie verschiedene Hemmstoffe. Als Puffer hat sich der Phosphatpuffer nach Sörensen bewährt. Die Versuche wurden bei einem pH von 6,5 und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Das Ausmaß der Bräunung wurde bei konstanter Temperatur spektralphotometrisch verfolgt bzw. bestimmt. Die Versuchsdauer betrug je nach Versuch 100—120 Minuten.

Experimentelles

Als erstes wurde eine Reihe von substituierten Diphenolen auf ihre Eignung als *Substrat* untersucht. Die untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Die Eignung verschiedener Diphenole als Substrat

Substrat	Absorptionsmaximum (nm)	Eigenschaften
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin	470	instabil
Brenzcatechin	405	instabil
4-Methylbrenzcatechin	475	instabil
2,3-Dihydroxy-naphthalin	420—520	Oxydation ungenügend
2,3-Dihydroxy-pyridin	ganzes Spektrum	kein spezifisches Oxydationsprodukt
Pyrogallol	360/420	mehrere Oxydationsprodukte
Pyrogallol-1-methyläther	460	kein ausgeprägtes Maximum des Oxydationsproduktes
Kaffeesäure	465	rel. gut, Oxydationsprodukt mäßig stabil
2,3-Dihydroxy-benzoësäure	410/620	rel. gut, Oxydationsprodukt mäßig stabil
3,4-Dihydroxy-nitrobenzol	—	Oxydation zu langsam
3,4-Dihydroxy-benzaldehyd	400	gut, Oxydation etwas langsam
3,4-Dihydroxy-benzoësäure	350	sehr gut

Es handelt sich um folgende Substanzen: Brenzcatechin, 4-Methyl-brenzcatechin, 2,3-Dihydroxy-naphthalin, 2,3-Dihydroxy-pyridin, Pyrogallol, Kaffeesäure, 2,3-Dihydroxy-benzoësäure, 3,4-Dihydroxy-nitrobenzol, 3,4-Dihydroxy-benzaldehyd, 3,4-Dihydroxy-benzoësäure und DOPA.

Wie aus dieser Tabelle entnommen werden kann, haben sich die meisten dieser Verbindungen als ungeeignet erwiesen, teils weil sie keine spezifischen Oxydations-

produkte ergaben, teils weil die gebildeten Produkte instabil waren und dadurch eine genaue Untersuchung verunmöglichten.

Als am besten geeignetes Substrat erwies sich 3,4-Dihydroxy-benzoësäure, da ihr Oxydationsprodukt einheitlich und stabil ist und ein gut definiertes Absorptionsmaximum bei 350 nm aufweist. Es eignet sich daher für kinetische Messungen. Die herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit, wie das bei 3,4-Dihydroxybenzoësäure der Fall ist, muß durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration kompensiert werden, um den Reaktionsverlauf meßbar zu gestalten.

Als Enzyme verwendeten wir Tyrosinase und Polyphenoloxydase. Da sich die zuerst benützte Tyrosinase als verunreinigt erwies, verwendeten wir später Kartoffelpolyphenoloxydase. Ein Vergleich der beiden Enzyme zeigte, daß die Polyphenoloxydase ca. 7—9mal aktiver war als die Tyrosinase.

Die *Hemmung folgender Substanzen* wurde untersucht: Ascorbinsäure, Cystein, Dithiothreitol, reduziertes Glutathion, Benzoësäure, Natriumcyanid, Natriumbisulfit und verschiedene Borate. Die Konzentration dieser Substanzen im Versuchsgemisch variierte je nach Art des Versuches.

Der am genauesten untersuchte Inhibitor war die Ascorbinsäure. Ihre Wirkung bei verschiedenen Konzentrationen ist in Abbildung 1 (Einzelversuch, verwendetes Enzym: Tyrosinase) und in Abbildung 2 (Mittelwerte von 5 Versuchen, verwendetes Enzym: Polyphenoloxydase) graphisch dargestellt.

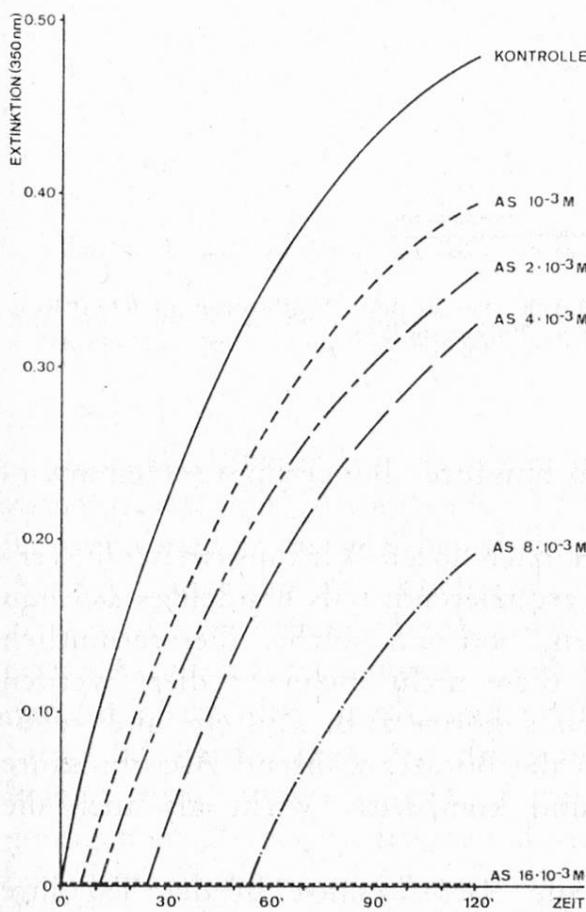


Abb. 1. Die Hemmung der enzymatischen Bräunung durch verschiedene Konzentrationen von Ascorbinsäure. Enzym: Tyrosinase.

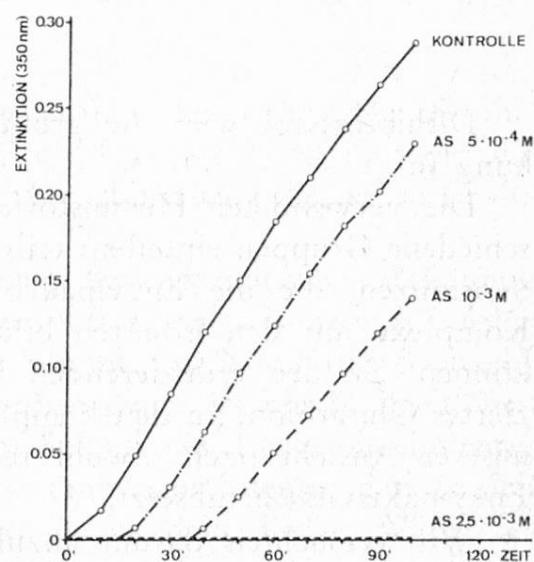


Abb. 2. Die Hemmung der enzymatischen Bräunung durch verschiedene Konzentrationen von Ascorbinsäure. Enzym: Polyphenolase.

Bei höheren Ascorbinsäurekonzentrationen ist nicht nur die Hemmung größer, sondern auch die sog. Nullzeit, d. h. die Zeit, bis die erste Farbbildung beginnt, wird verlängert. Auch dies ist ein Hinweis dafür, daß hier verschiedene Inhibitionsmechanismen vorliegen.

Auf gleiche Weise wurden die anderen Hemmstoffe getestet und ihre Wirkung miteinander verglichen. Das Versuchsgemisch von total 3 ml enthielt 0,1 ml des betreffenden Inhibitors in einer 5×10^{-4} molaren Konzentration (Abb. 3).

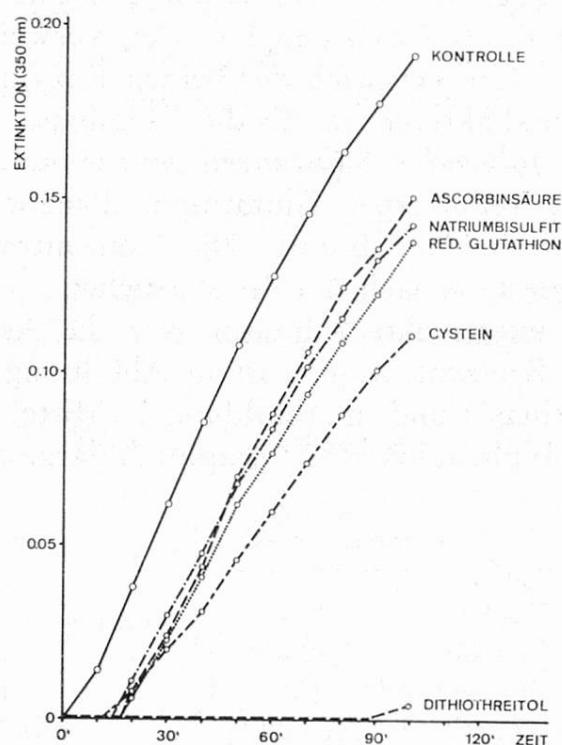


Abb. 3. Die Hemmung der enzymatischen Bräunung durch verschiedene Inhibitoren gleicher Konzentration (5×10^{-4} M). Enzym: Polyphenolase.

Dithiothreitol wies die größte und Ascorbinsäure die geringste Hemmwirkung auf.

Die verwendeten Hemmstoffe lassen sich nach ihrer Wirkungsweise in verschiedene Gruppen einteilen: teils wirken sie reduzierend, teils handelt es sich um Substanzen, die die Enzymaktivität hemmen, und um solche, die vermutlich Komplexe mit den Edukten bilden, so daß diese nicht mehr oxydiert werden können. Zu den reduzierenden Hemmstoffen gehören z. B. Cystein und reduziertes Glutathion, zu den komplexbildenden die Borate, während Ascorbinsäure unserer Ansicht nach sowohl reduzierend und kompetitiv wirkt als auch die Enzymaktivität herabsetzt.

Wir versuchten darum abzuklären, ob die Ascorbinsäure in der Tat ihre Wirkung nicht nur durch Rückreduktion der Chinone, sondern auch durch *Hemmung des Oxydationsenzymes* ausübt, wie das auch Täufel und Voigt (3) beschrieben haben.

Ascorbinsäure wurde mit Tyrosinase in einigen Fällen bei 4°C und vorwiegend bei 25°C während 2,4 und 6 Stunden stehengelassen. Als Kontrolle wurde das Enzym ohne Zugabe von Ascorbinsäure bei gleicher Temperatur und während der gleichen Zeit aufbewahrt.

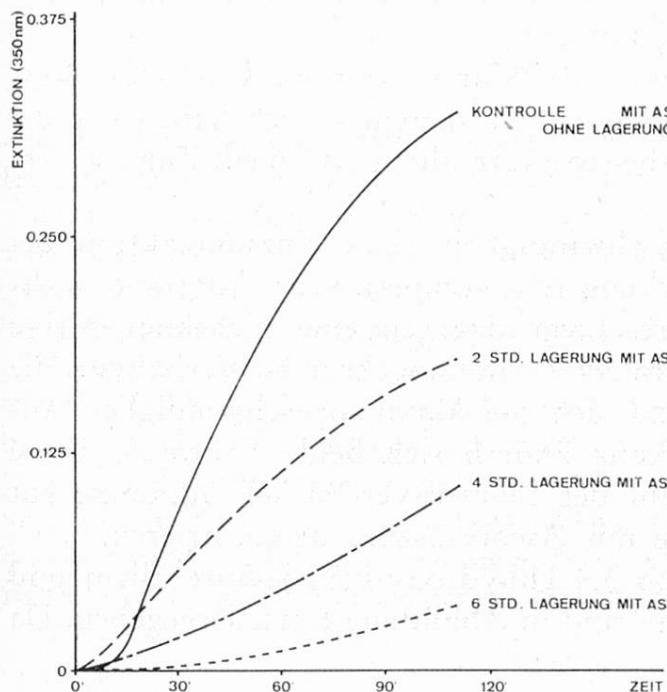


Abb. 4. Die Aktivitätsabnahme von Tyrosinase durch die Einwirkung von Ascorbinsäure.

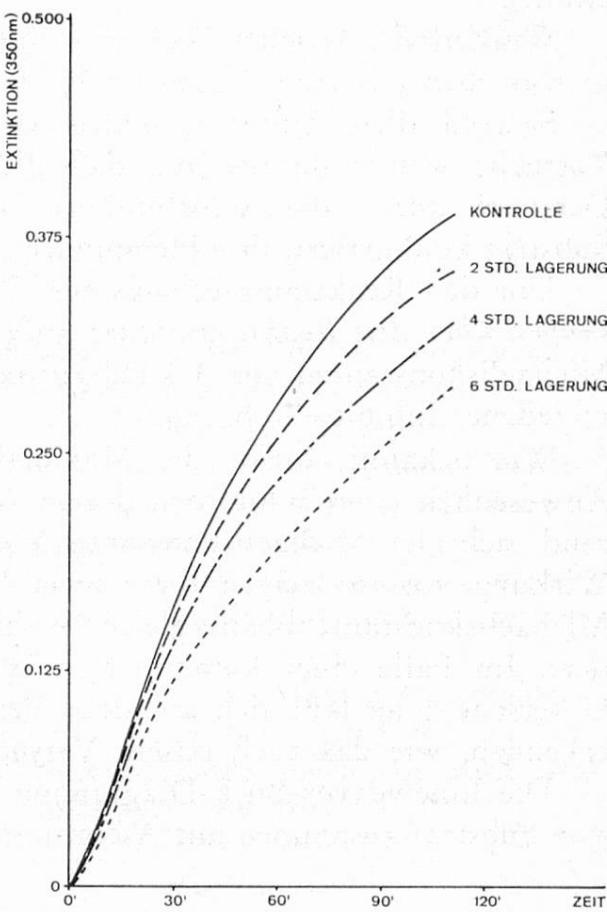


Abb. 5. Die Änderung der Aktivität von Tyrosinase nach verschiedener Lagerungsdauer.

Falls das Enzym mit Ascorbinsäure bei 25°C aufbewahrt wird, geht die Enzymaktivität mit fortlaufender Zeit stark zurück (Abb. 4). Wird dagegen die Tyrosinase unter den gleichen Bedingungen ohne Ascorbinsäure gelagert, so ist die Aktivitätsabnahme wesentlich geringer (Abb. 5).

Aus diesen Versuchen folgt, daß die Hemmung der enzymatischen Bräunung durch Ascorbinsäure teilweise wohl durch Rückreduktion, teilweise jedoch infolge der Inhibition des Oxydationsenzymes zustande kommt. Auch aus der Beobachtung, daß bei höheren Ascorbinsäurekonzentrationen einerseits die Nullzeit verlängert wird, andererseits die Farbintensität am Schluß der Reaktion eindeutig geringer ist als bei niedrigeren Konzentrationen, kann man folgern, daß es sich bei dieser Wirkung nicht um eine rein reduzierende handeln dürfte. Wäre dies der Fall, müßte — nach Ablauf der Nullzeit — in der Zeiteinheit die gleiche Menge an Ascorbinsäure oxydiert werden, unabhängig davon, welche Ascorbinsäurekonzentration im Ansatz enthalten war.

Schon Thompson und Mitarbeiter (7) haben in ihren Versuchen nachgewiesen, daß ein Gemisch von Kupfer und bestimmten Proteinen — sie verwendeten hauptsächlich Kasein und Albumin — bei der Reaktion mit Ringverbindungen, die eine Aethylengruppierung enthielten, eine Bräunung hervorrief. Die gebildeten Produkte waren denen, die bei anderen Bräunungsreaktionen entstehen, sehr ähnlich.

Wurden die gleichen Versuche mit Ascorbinsäure als Substrat durchgeführt, so war ebenfalls eine Bräunung des Versuchsgemisches zu beobachten.

Sowohl diese Untersuchungen als auch unsere noch nicht abgeschlossenen Versuche weisen darauf hin, daß die Ascorbinsäure als Substrat dienen kann. Demnach dürfte die Ascorbinsäure auch auf kompetitive Weise, indem sie das Substrat konkurriert, ihre Hemmwirkung ausüben.

Um den Reaktionsmechanismus weiter aufzuklären, wurden *kinetische Messungen über den Reaktionsablauf* aufgenommen. Zu diesem Zweck haben wir die Michaeliskonstanten von 3.4-Dihydroxy-benzoësäure allein und nach Zugabe verschiedener Inhibitoren bestimmt.

Wie bekannt, bleibt die Maximalgeschwindigkeit einer Enzymreaktion bei Anwesenheit eines Inhibitors, dessen Wirkung rein kompetitiv ist, konstant, während sich die Michaeliskonstante ändert. Liegt dagegen eine nichtkompetitive Wirkung vor, so zeigen diese zwei Parameter ein umgekehrtes Verhalten: die Michaeliskonstante bleibt gleich, während sich die Maximalgeschwindigkeit ändert. Im Falle einer kombinierten Wirkung ändern sich beide Faktoren. Diese Unterscheidung läßt sich aus dem Verlauf der Lineweaver-Burk-Diagramme gut erkennen, wie das auch unsere Versuche mit Ascorbinsäure demonstrieren.

Die Lineweaver-Burk-Diagramme von 3.4-Dihydroxy-benzoësäure allein und von Substrat zusammen mit Ascorbinsäure sind in Abbildung 6 wiedergegeben. Da

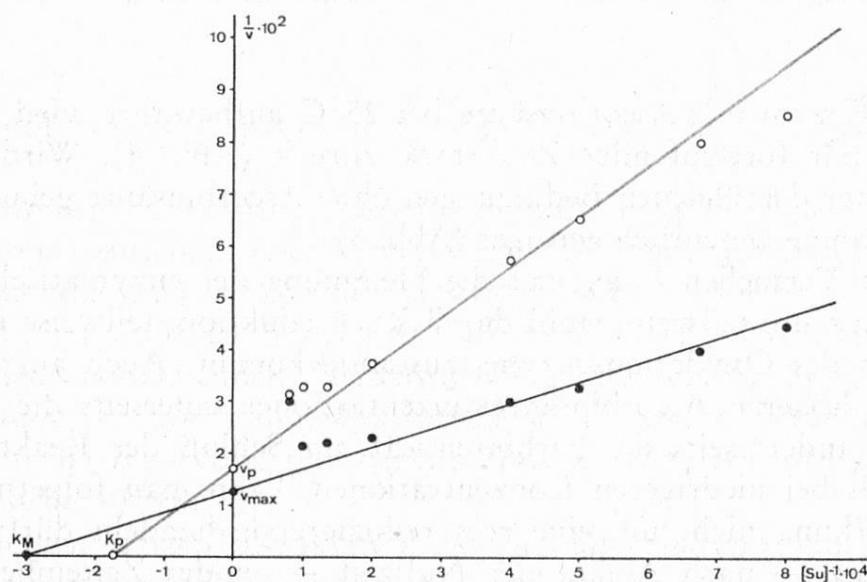


Abb. 6. Lineweaver-Burk-Diagramme von 3.4-Dihydroxy-benzoësäure mit und ohne Ascorbinsäurezugabe.

sich sowohl die Michaeliskonstante als auch die Maximalgeschwindigkeit änderten, dürfte die Hemmwirkung der Ascorbinsäure eine kombinierte sein.

Durch im Gang befindliche Experimente wird versucht, den Anteil der verschiedenen Arten der Bräunungshemmung durch Ascorbinsäure — Reduktion, Enzymaktivierung und kompetitive Wirkung — zu bestimmen.

Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung der Eidg. Alkoholverwaltung durchgeführt, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

Zusammenfassung

Der Reaktionsablauf der enzymatischen Bräunung und der Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf diese Reaktionen und ihren Wirkungsmechanismus wurden untersucht.

Zwölf verschiedene Diphenole wurden auf ihre Eignung als Substrat geprüft. 3.4-Dihydroxy-benzoësäure hat sich als bestes Substrat erwiesen, da sie ein stabiles Oxydationsprodukt ergibt und ein gut definiertes Absorptionsmaximum besitzt. Als Enzym wurden Tyrosinase ex mushrooms und Polyphenoloxydase aus Kartoffeln verwendet.

Von den untersuchten Inhibitoren (Ascorbinsäure, Cystein, Dithiothreitol, reduziertes Glutathion, Benzoësäure, Natriumcyanid, Natriumbisulfit, verschiedene Borate) übte das Dithiothreitol die größte Hemmwirkung aus.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen scheint die Ascorbinsäure ihre Hemmwirkung auf drei verschiedene Arten auszuüben: durch Rückreduktion, durch Hemmung der Oxydasen und kompetitiv. Im Gang befindliche Untersuchungen sollen mit Hilfe der Michaeliskonstanten die Frage des Wirkungsmechanismus weiter abklären.

Résumé

La réaction du brunissement enzymatique des fruits et légumes et l'influence de divers inhibiteurs sur elle ainsi que son mécanisme sont étudiés.

L'efficacité comme substrat de 12 diphénols a été étudiée. L'acide 3.4-dihydroxybenzoïque s'est révélé être le meilleur des substrats examinés. Il donne par oxydation un composé stable ayant une absorption maximum bien définie. Comme enzymes, des tyrosinases de mushrooms et des polyphénoloxydases de pommes de terre ont été utilisées.

Parmi les inhibiteurs testés (acide ascorbique, cystéine, dithiothreitol, glutathion réduit, acide benzoïque, cyanure de sodium, hydrogénosulfite de sodium, divers borates) le plus actif s'est révélé être le dithiothreitol.

Selon les essais effectués jusqu'ici, il semble que l'acide ascorbique agit de 3 manières: par rétro-réduction, par inhibition des oxydases et par compétition. Des études en cours ont pour but d'éclaircir, à l'aide des constantes de Michaelis, le mécanisme de l'action.

Summary

Twelve different diphenols were tested as substrates. 3,4-Dihydroxy benzoic acid was found to be the most suitable for these experiments since it forms a stable oxidation product with a well defined absorption maximum. As enzymes tyrosinase ex mushrooms and potato polyphenoloxidase were used.

Among the investigated inhibitors (ascorbic acid, cysteine, dithiothreitol, reduced glutathione, benzoic acid, sodium cyanide, sodium bisulphite and various borates) the greatest effect was shown by dithiothreitol.

According to our experiments ascorbic acid seems to act in three different ways: by reduction of the primary oxidation product, by inhibition of the enzyme polyphenoloxidase and by competition with the substrate.

We attempt to clarify by further experiments the exact reaction mechanism of the inhibitory effect of ascorbic acid and other substrates by determination of the Michaelis constants.

Literatur

1. Kertesz, D. and Zito, R.: Phenolase. In Oxygenases (Hrsg. O. Hayaishi), S. 307. Academic Press, New York 1962.
2. Baruah, P. and Swain, T.: The effect of L-ascorbic acid on the in vitro activity of polyphenoloxidase from potato. Biochem. J. **55**, 392 (1953).
3. Täufel, K. und Voigt, J.: Zur inhibierenden Wirkung von Ascorbinsäure gegenüber der Polyphenoloxidase des Apfels. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **126**, 19—24 (1964—65).
4. Ingraham, L. L.: Reaction inactivation of polyphenoloxidase: temperature dependence. J. Am. Chem. Soc. **76**, 3777 (1954).
5. Ingraham, L. L.: Reaction inactivation of polyphenoloxidase: catechol and oxygen dependence. J. Am. Chem. Soc. **77**, 2875 (1955).
6. Ingraham, L. L.: Variation of the Michaelis constant in polyphenoloxidase catalyzed oxidations: substrate structure and concentration. J. Am. Chem. Soc. **79**, 666 (1957).
7. Thompson, J. B., Kocher, R. B. and Fritzsch, H. W.: A browning reaction involving copper-proteins. Arch. Biochem. **19**, 47 (1948).

Prof. Dr. J. C. Somogyi

Institut für Ernährungsforschung

CH-8803 Rüschlikon