

CENTRUM VOOR AGROBIOLOGISCH ONDERZOEK

WAGENINGEN

PEROXYDASE EN KATALASE IN PLANTEN

J.M. Braber

CABO-verslag nr. 22

106472

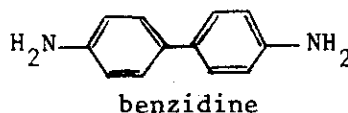
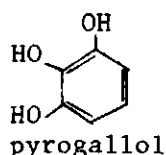
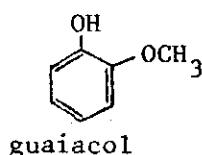
januari 1979

<u>INHOUD</u>	<u>Blz.</u>
1. Samenvatting van de huidige inzichten omtrent functie en werkingsmechanisme	5
1.1. Eigenschappen van de enzymen; reactiemechanisme	5
1.2. Biochemische functie van peroxydase en katalase	7
1.2.1. Voorkomen van peroxydase en katalase	7
1.2.2. Waterstofperoxyde-ontwikkeling in de plant	7
1.2.3. Functie van peroxydase en katalase	8
2. Bepaling van de peroxydase-activiteit in plantextracten	11
2.1. Inleiding	11
2.2. Optimale peroxydeconcentratie bij twee guaiacolconcentraties	13
2.3. Extinctieverandering per minuut bij diverse golflengtes	14
2.4. Optimale peroxydeconcentratie bij verschillende pH's	14
2.5. Invloed van de pH op de peroxydase-activiteit	15
2.6. Invloed van de guaiacolconcentratie op de activiteit	15
2.7. Discussie	16
3. Literatuur	21
Aanhangsel 1. Voorschrift voor de bepaling van de peroxydase-activiteit in plantaardig materiaal	23
Aanhangsel 2. Voorschrift voor de bepaling van de katalase-activiteit in plantaardig materiaal	27

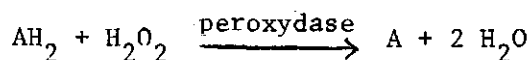
1. SAMENVATTING VAN DE HUIDIGE INZICHTEN OMTRENT FUNCTIE EN WERKINGSMECHANISME

1.1. Eigenschappen van de enzymen; reactiemechanisme

Onder peroxydassen vallen enzymen van een heel verschillende oorsprong, met een aspecifieke werking ten aanzien van de aard van de waterstofdonor. Peroxydassen (donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxydoreductase, EC 1.11.1.7) katalyseren de waterstofoverdracht van een groot aantal organische verbindingen, van eenvoudige fenolen, aromatische aminen, hydrochinonen, benzidine-derivaten enz. op waterstofperoxyde. Onder bovenstaande definitie vallen niet de in planten voorkomende lipoperoxydassen, cytochromperoxydassen. Natuurlijke waterstofdonors zijn bijvoorbeeld koffiezuur, chlorogeenzuur, ferulazuur en scopoletine. Nietnatuurlijke bijvoorbeeld guaiacol, p-fenyleendiamine, benzidine, o-tolidine, o-dianisidine en ascorbaat.

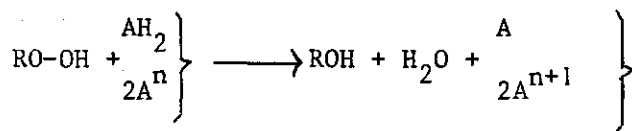


De reactie kan worden samengevat als:

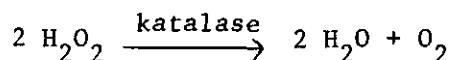


De reactie kan ook verlopen met methyl-, ethyl- of acetylperoxyde in plaats van waterstofperoxyde. De activiteitsmeting wordt meestal uitgevoerd met guaiacol als substraat. Met benzidineachtige substraten zijn nauwkeuriger metingen te doen, maar deze stoffen zijn vanwege carcinogene eigenschappen in onbruik geraakt (Pütter, 1970; Saunders, 1964).

Peroxydassen behoren, met het enzym katalase (waterstofperoxyde: waterstofperoxyde oxidoreductase, EC 1.11.1.6), tot de hydroperoxydassen. Beide zijn heemeiwitten met protohemine IX als prosthetische groep en driewaardig ijzer in de kern. Katalase heeft een molecuulgewicht van ca. 250.000 en bestaat uit vier eenheden met een molecuulgewicht van ca. 60.000-65.000 (Saunders, 1964; Sund, 1967). Voor komkommerkatalase is M = 225.000 met eenheden van 54.500 (Lamb et al., 1978). Voor katalase uit bladeren van *Lens culinaris* (linzen) wordt ook een molecuulgewicht gevonden van 225.000 bij eenheden van 54.000 (Schiefer et al., 1976). Peroxydase bestaat uit slechts één keten met een molecuulgewicht van ca. 40.000. Het reactiemechanisme van beide enzymen kan worden samengevat als volgt:

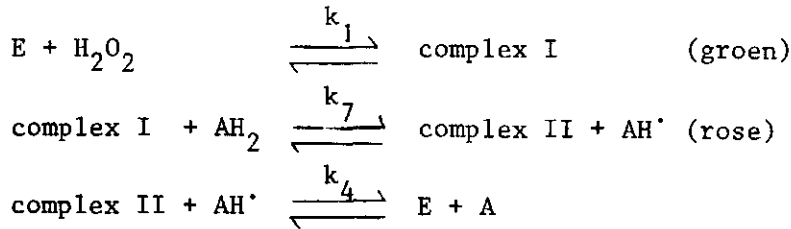


Katalase gebruikt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (R=H) als meest effectief oxydatiemiddel, of alkylhydroperoxyden met een korte ketenlengte, waarbij de reactiesnelheid afneemt in de volgorde H >> CH<sub>3</sub> > C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>. De beste elektronendonor is een tweede molecuul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A=O<sub>2</sub>). De katalasereactie wordt dan dus:

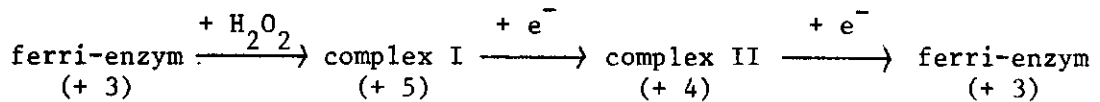


Als waterstofdonor kunnen ook andere verbindingen dan waterstofperoxyde fungeren, bijvoorbeeld ascorbaat, pyrogallol, methanol, natriumnitriet en mierzuur. Er wordt dan geen zuurstof ontwikkeld en de reactie verloopt als bij peroxydase.

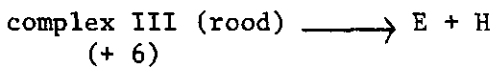
De peroxydasereactie verloopt in verschillende stappen:



De valentie van het ijzeratoom in het enzym verandert tijdens de reactie volgens het schema:

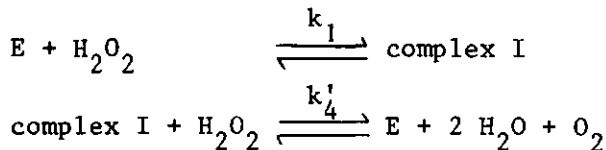


Het ferro-enzym (+ 2) en het oxy-enzym (+ 6) komen in de reactie niet voor. Complex I wordt in één stap tot het ferri-enzym gereduceerd als de waterstofdonor HJ of HSO<sub>3</sub> is. De tussenprodukten uit de tweede stap van het peroxydase-mechanisme zijn radicalen. Bij overmaat waterstofperoxyde ontstaat het oxy-enzym, dat uiteenvalt in het ferri-enzym en waarbij waterstof wordt vrijgemaakt:

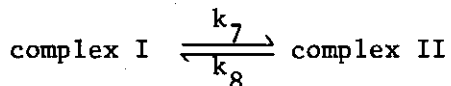


De peroxydase-activiteit wordt onder deze omstandigheden geremd (Yamazaki & Yokota, 1973).

De katalasereactie is ook in stappen te scheiden:



Bij overmaat peroxyde ontstaat het rode inactieve complex II, of het inactieve complex III (Mahler & Cordes, 1969; Paul, 1963).



Peroxydasen kunnen een katalase-achtig gedrag vertonen, katalase kan een peroxydase-achtige reactie teweegbrengen. Uit runderleverkatalase is door een loogbehandeling peroxydase-activiteit te ontwikkelen, die verdwijnt bij neutraliseren, waarna de katalase-activiteit weer terugkomt (Marklund, 1973).

Katalase is labiel in waterig milieu; de stabiliteit kan worden vergroot door toevoeging van kleine hoeveelheden van een organisch oplosmiddel, zoals ethanol of chloroform. Bij invriezen en ontdooien gaat de activiteit verloren. Er ontstaan molecuulaggregaten. In 5 M guanidine-HCl, in 8 M ureum of in zuur milieu (pH ca. 3) dissocieert katalase in dimeren (twee eenheden), die inactief zijn (Sund, 1967). Het pH-optimum voor de activiteit ligt bij 6,8-7,0 voor runderleverkatalase.

Plant aardig katalase is moeilijk als zuivere verbinding te isoleren. Katalase manifesteert zich meestal als één enkel iso-enzym bij iso-elektroforese en iso-elektrofocusing (Scandalios, 1969; Schiefer et al., 1976; Anonymus, 1975).

Peroxydase is goed oplosbaar in waterig milieu en een van de meest stabiele enzymen die bekend zijn. Dat maakt bepaling ervan aantrekkelijk; er hoeven weinig voorzorgen te worden genomen in verband met denaturatie en een preparaat kan in de diepvries worden bewaard. Peroxydase is alom in de natuur aan

te tonen; de activiteit in planten kan gecorreleerd worden met bijvoorbeeld bladveroudering en diverse stress-invloeden zoals zoutschade, ijzergebrek en infectie.

Peroxydasen worden aangetroffen in alle plantedelen (Hall et al., 1969). Het aantal iso-enzymen en de activiteit nemen toe bij veroudering (Shiao-Lim Chen et al., 1970; Dunleary & Ramaraje Urs, 1978; Lazar & Farkas, 1970), na infectie van planten met virussen (Bates & Chant, 1970) of schimmels (Staples & Stahmann, 1964) en na het "harden" door het geven van een koudeperiode (McCown et al., 1969). De iso-enzymen die erbij komen zijn steeds dezelfde als bij veroudering. De toenemende peroxydase-activiteit zou een indicator kunnen zijn van het ontwikkelingsstadium van de plant (Parish, 1968).

In de levensmiddelentechnologie wordt de peroxydase-activiteit gebruikt als indicator voor de kwaliteit van de conservering van groenten. Peroxydase is een van de meest hittebestendige enzymen; als er geen activiteit meer kan worden aangetoond mag worden aangenomen dat de conserveringsmethode afdoende is (Burnette, 1977).

## 1.2. Biochemische functie van peroxydase en katalase

### 1.2.1. Voorkomen van peroxydase en katalase

De functie van peroxydasen en katalase in de plant (en in andere levensvormen) is niet duidelijk. Er zijn een aantal theorieën over, die echter vaag blijven en geenszins bewezen zijn. Het is mijnsinziens de vraag of de in vitro waargenomen reacties van peroxydase en katalase wel in vivo optreden. In de bestaande theorieën is het belangrijkste aangrijpingspunt het organisme waarin de enzymen worden aangetroffen en de plaats in de cel waar ze voorkomen.

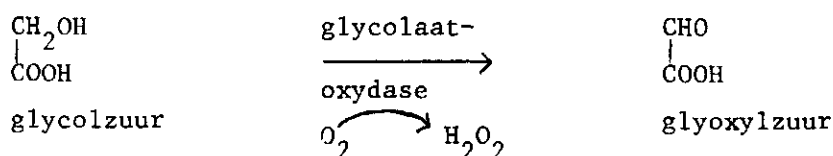
Peroxydasen komen voor in dieren en hogere planten, gisten, schimmels en bacteriën. Ze worden aangetroffen overal in de cel, aan de membranen en in het celvocht in de microsomen en in de mitochondriën. Het eerst geïsoleerd en het meest onderzocht is het mierikswortelperoxydase (horse-radish-peroxydase, HRP) (Saunders, 1964).

Katalase komt voor in bijna alle dierlijke cellen en organen, in de mitochondriën en op de peroxisomen, en in opgeloste vorm in erythrocyten. Het is ook in planten aanwezig, maar in lagere activiteit. Het enzym is in grote hoeveelheden aanwezig in aërobe cellen die een cytochromsysteem bevatten; het is aanwezig in alle aërobe micro-organismen en afwezig in obligaat anaërobe micro-organismen. Vooral in de peroxisomen komt katalase voor, te zamen met waterstofperoxyde-producerende enzymen (Anonymus, 1975).

### 1.2.2. Waterstofperoxyde-ontwikkeling in de plant

Zowel peroxydase als katalase katalyseren een reactie waarin waterstofperoxyde is betrokken. Als we iets over de in vivo-werking van de enzymen te weten willen komen is het dus zinvol om na te gaan, bij welke processen waterstofperoxyde wordt ontwikkeld.

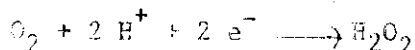
Het belangrijkste proces waarbij waterstofperoxyde vrij zou komen, is de fotorespiratie. Dit is een ademhalingsmechanisme, dat in het licht optreedt en wezenlijk anders is dan de donkerademhaling. Fotorespiratie komt voor bij planten die groeien in een gematigd klimaat en een C<sub>3</sub>-type fotosynthese vertonen. Bij dit proces wordt glycolaat onder invloed van glycolaat-oxydase tot glyoxylaat geoxydeerd onder waterstofperoxyde-ontwikkeling.



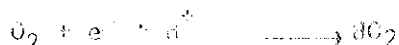
Dit proces wordt genoemd de waterstofperoxyde-afbouw of waterstofperoxyde-respiratie is niet bekend.

Een ander proces in de plant waarbij waterstofperoxyde zou worden ontwikkeld is de waterstofperoxyde-afbouw, dat bestaat uit twee cytochrome-afhankelijke processen: de waterstofperoxyde-afhankelijke cytochrome-afhankelijke processen treden op in bepaalde planteweefsels, met name aardappelknollen, bonen, wortelweefsel (Rich et al., 1976; Tolmos, 1977). Het is niet duidelijk of dit proces ook onder normale omstandigheden optreedt. Als dit zo is, is er per plasmale (op de mitochondriën) voldoende peroxydase en katalase aanwezig om het om te zetten.

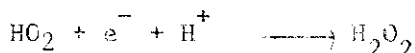
Een derde proces, waarbij waterstofperoxyde zou ontstaan, is de omzetting van radicalen onder invloed van het enzym superoxyde-dismutase. Dit enzym komt voor in de gehele plant, op mitochondriën en chloroplasten, vaak in combinatie met peroxydase en katalase (Giannopolitis & Ries, 1977). Onder fysiologische omstandigheden zou dit het normaal voorkomende trinitrozuursuurstof een reeks van reacties te kunnen ondergaan waarbij het tot en met dagerslagen zuurstofmoleculen kunnen ontstaan. Deze verbindingen zijn zeer reactief. De belangrijkste zijn het superoxyde-anion,  $O_2^{\cdot-}$ , het hydroxyradicaal,  $\cdot OH$ , en het singuleterzuurstof,  $^1O_2$  (Halliwell, 1974). De volgende reacties kunnen optreden:



of, in twee één-elektronoverdrachtstappen:

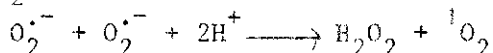


gevolgd door



$HO_2$  is zuur en dissocieert onder vorming van  $O_2^{\cdot-}$ . Dit kan gebeuren bij fysiologische pH-waarden en het superoxyde anion is aangetoond in geïsoleerde chloroplasten bij belichting.

Het  $O_2^{\cdot-}$  kan reducerend werken, oxyderend, of met zichzelf reageren.



De hierbij ontwikkelde zuurstof is in de singuletoestand en die is veel reactiever dan de grondtoestand (triplet,  $^3O_2$ ). Het oxydeert snel onverzadigde vetzuren.

Met  $H_2O_2$  geeft het  $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + \cdot OH + O_2$ .

Het hydroxyradicaal is een zeer sterk oxydatiemiddel, dat met vele organische moleculen kan reageren.

In de cel is het enzym superoxyde-dismutase aanwezig, dat  $O_2^{\cdot-}$  omzet in  $^3O_2$  en  $H_2O_2$ . Dit enzym komt voor in aerobe organismen, niet in anaerobe. In spinazieblad is het aangetoond in de chloroplasten (Halliwell, 1974).

### 1.2.3. Functie van peroxydase en katalase

Aan peroxydase zijn uiteenlopende werkingen toegedacht, gezien de grote verscheidenheid aan organische substraten die aan de reactie kunnen deelnemen. Een van de meest onderzochte veronderstelde functies is de betrokkenheid bij de ligninevorming aan celwanden (Halliwell, 1978). Geen enkele van de veronderstelde in vivo-functies wordt echter gestaafd met bewijs.

Omdat zowel peroxydase als katalase zo wijd verbreid voorkomen in de natuur en zo'n weinig specifieke werking schijnen te hebben, wordt wel gedacht, dat de belangrijkste functie in zijn algemeenheid bestaat uit het katalyseren van oxydaties, waarbij één elektron wordt overgedragen (Nicholls & Schonbaum, 1963). Een wat gespecificeerdere functie zou kunnen zijn dat ze waterstofperoxyde, dat een tijdlang schadelijk werd geacht voor de cel, opruimen.

In recente literatuur van Halliwell en Fridovich wordt waterstofperoxyde helemaal niet meer zo toxisch voor de cel gevonden, omdat het immers in planten

en dieren als normale metaboliët wordt beschouwd. Bovendien treden er, ondanks een hoge katalase-activiteit toch nog andere reacties met waterstofperoxyde op, bijvoorbeeld vorming van mierzuur uit glyoxylaat (Halliwell, 1974).

Genoemde auteurs beschouwen nu radicalen en singulet-zuurstof als schadelijk voor de cel. Een beschermingsmechanisme hiertegen is aanwezig in de vorm van het enzym superoxyde-dismutase, dat bij zijn werking waterstofperoxyde levert. Hiermee zou dan het aanwezige katalase reageren. In deze theorie heeft katalase dus indirect een beschermende werking, door verwijdering van een reactieprodukt uit ongewenste verbindingen, waardoor die reactie aflopend wordt. Bovendien wordt daarmee ook de ontwikkeling van het zeer actieve radicaal  $\cdot\text{OH}$  voorkomen.

Halliwell oppert verder, dat de rol van katalase en peroxydase in de dierlijke cel niet ligt in het volledig verwijderen van het aanwezige waterstofperoxyde, maar meer in het reguleren van de hoeveelheid. Daarmee wordt dan ook de hoeveelheid aanwezige radicalen geregeld, die een rol zouden kunnen spelen bij een afweermechanisme tegen bacteriën in een systeem met myeloperoxydase en halogeneionen of rhodanide-ionen ( $\text{CNS}^-$ ).

Myeloperoxydasen (aanwezig in witte bloedlichaampjes) kunnen aminozuren halogeneren onder invloed van waterstofperoxyde en halogenide-ionen. De infectie wordt hierbij met radicalen bestreden (Halliwell, 1974). In de plantecel zou iets dergelijks voor kunnen komen (Morrison & Schonbaum, 1976; Ramaraje Urs & Hill, 1978; Woolhouse, 1978).

Een andere mogelijke functie van peroxydasen of katalase zou kunnen zijn de afbraak van schadelijke stoffen, die in de enzymreactie dan als waterstofdonor optreden. In dieren wordt bijvoorbeeld op de peroxisomen methanol en ethanol afgebroken (Halliwell, 1974).

De genoemde waterstofperoxyde-genererende processen worden in de literatuur altijd in verband gebracht met katalase. Peroxydase wordt alleen beschreven in verband met het organische substraat, zoals bijvoorbeeld in de ligninevorming.

Samenvattend wordt in de recente literatuur als functie van katalase, en in mindere mate van peroxydase, gezien een beschermende werking op het goed functioneren van de cel, door ge- of verbruik van het, bij de omzetting van schadelijke radicalen door superoxyde-dismutase, ontwikkelde waterstofperoxyde.

In het algemeen zijn de beschreven toegedachte functies aan katalase en peroxydase zeer onbevredigend en wekken de indruk van een verklaring achteraf zonder deugdelijke argumenten. De stijgende peroxydase-activiteit in verouderend blad wordt uitgelegd als een positief proces ter bescherming van de bladfunctie. Meestal is het zo, dat een plant leeft bij de gratie van reductie van organische stof in plaats van oxydatie. Er is behoefte aan een zinniger verklaring der verschijnselen dan er tot op heden wordt gegeven. Een aangrijpingspunt ligt in het verloop van de activiteiten tijdens bladveroudering in onderlinge samenhang.

De peroxydase-activiteit in verouderend primair boneblad gaat stijgen vanaf het tijdstip dat het blad volgroeid is en de belangrijkste grootheden in het blad, zoals de fotosynthesesnelheid, het chlorofylgehalte en het organische stikstofgehalte gaan dalen. De katalase-activiteit in verouderend boneblad verloopt parallel aan deze grootheden en is maximaal in het juist volgroeide blad (Patra et al., 1978). Uit eigen onderzoek blijkt, dat de peroxydase-activiteit begint te stijgen op het moment dat de katalase-activiteit sterk daalt. Qua molecuulstructuur lijken katalase en peroxydase op hemoglobine (tetrameer) en myoglobine (monomeer).

Over het verloop van waterstofperoxyde-ontwikkeling in verouderend blad is wat betreft de superoxyde-dismutasetheorie niets bekend. De fotorespiratie in boneblad vertoont een soortgelijk verloop als de katalase-activiteit (Mulchi et al., 1971; Peet et al., 1977; Salin & Homann, 1971).

Een persoonlijke opvatting over peroxydase is, dat het beschouwd kan worden als degradatieprodukt van katalase. De vraagstelling over de fysiologische

rol van peroxydase, waarop na tientallen jaren onderzoek geen opheldering is verkregen, wordt daarmee overbodig. Peroxydase-"synthese" is dan niets anders dan degradatie van katalase, een belangrijk enzym bij ademhalingsprocessen, zij het dat de in vivo functie evenmin als die van peroxydase erg duidelijk is. De toename in activiteit en aantal iso-enzymen bij veroudering, infectie en andere stress-situaties weerspiegelt in deze zienswijze niet een beschermingsmechanisme, maar een afbraak van het voor het goed functioneren van een blad noodzakelijke katalase.

Bij verhitting van een runderleverkatalaseoplossing ontstaat peroxydase-activiteit (eigen waarneming). Na hittebehandeling ter conservering van levensmiddelen, die gecontroleerd wordt door rest-activiteitenbepaling van peroxydase, kan na verloop van tijd de peroxydase-activiteit weer toenemen (Adams, 1978). Dit zou ook verklaard kunnen worden uit degradatie (van katalase) via dimeren zonder activiteit, in monomeren. Voor een goede interpretatie van gegevens over peroxydase lijkt het dus noodzakelijk de katalase-activiteit in de beschouwingen te betrekken. Het onderzoek naar het in vitro gedrag van peroxydasen blijft natuurlijk van groot belang voor inzicht bij bijvoorbeeld voedselconservering.

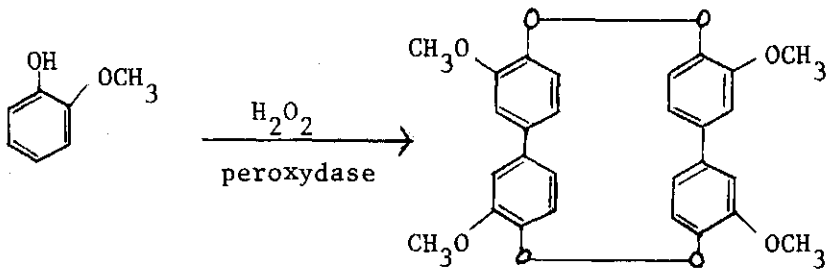
De functie van katalase in vivo is ook niet duidelijk. Dit zou wel eens kunnen komen doordat de in vitro waargenomen reactie een andere is dan de in vivo. De functie van een waterstofperoxyde-ontwikkeling wordt in de literatuur niet anders verklaard dan in een cirkelredenering over bescherming tegen ongewenste produkten. Het zou wel eens zo kunnen zijn, dat de waterstofperoxyde-productie pas begint als het levende systeem wordt verstoord, en dat de in vivo-functie van katalase gezocht moet worden in een primair zuurstofbindende en -regulerende werking, zoals bij hemoglobine, in plaats van in een enzymatische.



2. DE BEPALING VAN DE PEROXYDASE-ACTIVITEIT IN PLANTEXTRACTEN

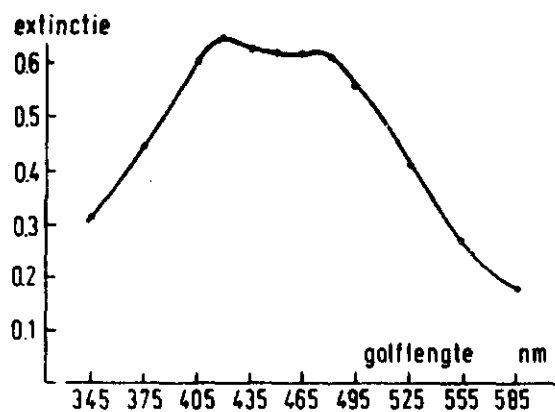
2.1. Inleiding

De activiteit van peroxydase wordt meestal bepaald met guaiacol (ook wel genaamd o-methoxyfenol, methylcatechol of o-hydroxyanisol) als waterstofdonor. Er ontstaat een tetrameer, het octadehydrotetraguaiacol (Maehly, 1959).

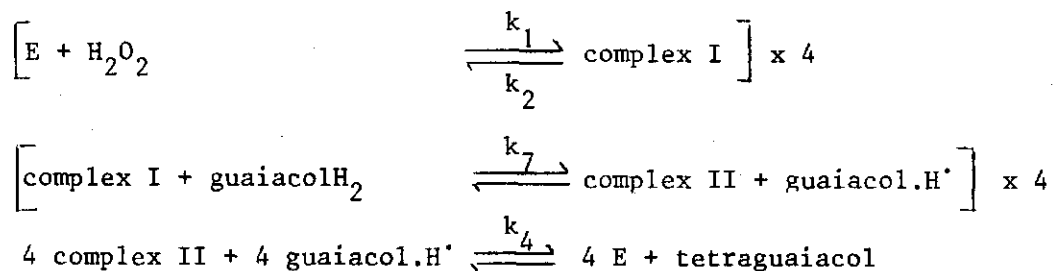


De verandering in extinctie in een standaardmengsel per tijdseenheid is een maat voor de peroxydase-activiteit. In het spectrum van het reactiemengsel komen pieken voor bij 420 nm en 470 à 480 nm. In de praktijk wordt ook wel bij 436 nm gemeten, omdat eenvoudige colorimeters deze golflengte beschikbaar hebben.

Grafiek 1. Extinctiespectrum van een standaardmeetoplossing met mierikswortel-peroxydase (HRP).



De volgende reacties treden op:



De absorptiemaxima van complex I liggen bij 658 en 407 nm en van complex II bij 561, 530 en 417 nm. Bij overmaat waterstofperoxyde wordt de reactie geremd door vorming van complex III (absorptiemaxima 416, 546 en 584 nm). Bij heel lage waterstofperoxyde-concentratie is de eerste reactiestap snelheidsbepalend, bij te hoge wordt de reactie geremd. Er is een optimum peroxyde-concentratie ten opzichte van elke substraatconcentratie, in dit geval guaiacol (Catedral & Daly, 1976).

De  $k_1$  is ca.  $10^7$  l.mol<sup>-1</sup>.sec<sup>-1</sup>. De  $k_4$  varieert van 17 (voor salpeterigzuur) tot  $8 \times 10^7$  (voor p-hydroxydifenyl) l.mol<sup>-1</sup>.sec<sup>-1</sup>.

Voor guaiacol is  $k_4 = 3 \times 10^5$  l.mol<sup>-1</sup>.sec<sup>-1</sup>.

De  $k_7$  is 40 tot 100 keer zo hoog als  $k_4$ . De  $k_2$  is verwaarloosbaar klein. De  $k_1/k_4$ -verhouding voor een bepaalde waterstofdonor, die varieert van 30 tot 130, wordt wel gebruikt om iso-enzymen van peroxydasen te karakteriseren (Kamel & Ghazy, 1973). Omdat  $k_4$  veel kleiner is dan  $k_1$  is in de totaalreactie de derde reactiestap snelheidsbepalend. Bij een optimale waterstofperoxydeconcentratie is de reactiesnelheid alleen afhankelijk van de enzymhoeveelheid en de guaiacol-concentratie, volgens de Michaelis-Menten theorie voor een éénsubstraatreactie. Die zegt, dat de reactiesnelheid afhangt van de substraatconcentratie volgens een hyperbool, waarbij de reactiesnelheid een maximumwaarde bereikt als het enzym verzadigd is. Door de reciproke reactiesnelheid en de reciproke substraatconcentratie tegen elkaar uit te zetten (volgens Lineweaver-Burk) ontstaat een rechte lijn, waaruit de maximale reactiesnelheid en de Michaelisconstante  $K_m$  te berekenen zijn.

De peroxydase-activiteit werd gemeten volgens het volgende voorschrift:

Reactiemengsel: 1,7 ml fosfaatbuffer volgens Sørensen, bereid volgens tabel 1  
 pH 5,9  
 1,0 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> guaiacol in water  
 0,1 ml bladextract in buffer  
 0,2 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oplossing in water (= 0,3 mol.l<sup>-1</sup>)

De concentratie van de guaiacol in het reactiemedium is 33 mol.l<sup>-1</sup>, van de waterstofperoxyde 20 mol.l<sup>-1</sup>, bij het begin van de reactie. De extinctieverandering bij 420 nm werd gemeten in een cuvet van 1 cm bij 25 °C tegen een blanco, die bestond uit hetzelfde mengsel, waarin waterstofperoxyde was vervangen door water. Dit blancomengsel is stabiel gedurende minstens een uur. Het extinctieverloop werd automatisch geregistreerd met behulp van een recorder. Er ontstaat een curve, die nagenoeg recht is tijdens de eerste halve minuut van de reactie. Het meetbereik loopt van  $0,10 < \Delta E_{420}$  per minuut  $< 7$ .

Tabel 1. Primair-secundair fosfaat-buffers volgens Sørensen

Secundair 11,876 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tot 1 liter  
 Primair 9,073 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tot 1 liter  
 t = 18

secundair	primair	pH
0,25 ml	9,75 ml	5,283
0,50 ml	9,50 ml	5,589
1,00 ml	9,00 ml	5,906
2,00 ml	8,00 ml	6,239
3,00 ml	7,00 ml	6,463
4,00 ml	6,00 ml	6,643
5,00 ml	5,00 ml	6,813
6,00 ml	4,00 ml	6,979
7,00 ml	3,00 ml	7,168
8,00 ml	2,00 ml	7,381
9,00 ml	1,00 ml	7,731
9,50 ml	0,50 ml	8,043

De extinctieverandering wordt bepaald als de raaklijn aan het beginstuk van de curve en uitgerekend per minuut.

Een bladextract werd bereid door 10 g vers blad met 50 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> fosfaatbuffer pH 7,6 enkele minuten in een mixer te mengen en de suspensie gedurende een half uur af te centrifugeren bij 15.000 rpm (= 20.000 g). Het extract moet koel worden bewaard (of in de diepvries) of zo snel mogelijk gemeten worden.

De fosfaatbuffer wordt bereid uit 13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in bijna 1 l water, met gec. NaOH-oplossing de pH op 7,6 brengen en aanvullen tot 1 l. Bij sterk gekleurde extracten, zoals van rozebloembladeren, wordt in het extractiemedium 10% onoplosbare PVP (polyvinyl-pyrrolidon), Polyclar AT, toegevoegd.

De hier toegepaste bepalingmethode van de peroxydase-activiteit in plantextracten wijkt af van het voorschrift uit de klinische chemie (dat niet voor plantaardige monsters is ontwikkeld, (Pütter, 1970)). In beide gevallen blijkt de gemeten activiteit afhankelijk van de substraatconcentratie (guaiacol). Om de invloed van diverse factoren, die een rol spelen bij het meetresultaat, na te gaan, werden met een bonebladextract activiteiten gemeten onder uiteenlopende omstandigheden. Het extract was volgens voorschrift bereid en daarna in porties verdeeld in de diepvries bewaard (gedurende een week). Uit de metingen bij verschillende pH, guaiacolconcentratie, waterstofperoxyde-concentratie en golflengte kan de grootte van de correctie van elk meetresultaat worden afgeleid. Enkele bepalingen werden uitgevoerd met mierikswortel-peroxydase (HRP) van BDH. De peroxydase-activiteit werd steeds gemeten volgens het bovengenoemde voorschrift, tenzij anders vermeld.

## 2.2. Optimale peroxydeconcentratie bij twee guaiacolconcentraties

Reactiemengsel:

1 ml fosfaatbuffer pH 5,9

1 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol in water of  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol in water of in buffer

0,1 ml extract, onverdund of 1:1 verdund met buffer pH 5,9

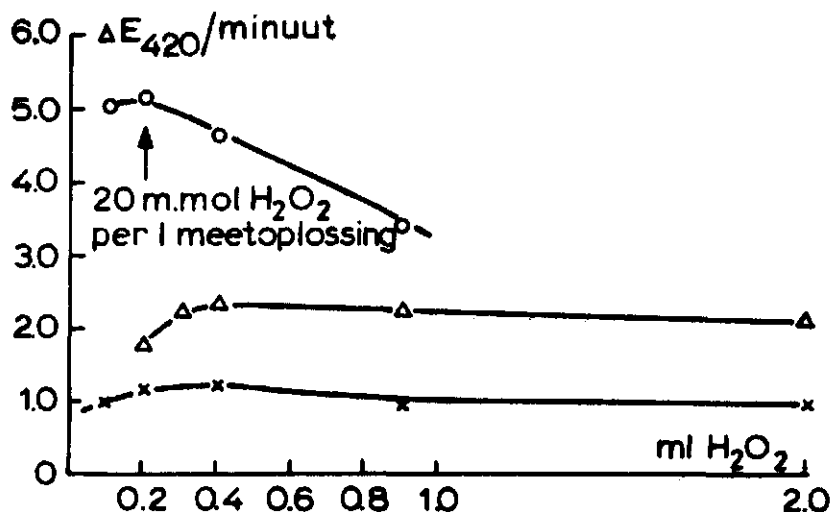
x ml 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  of 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (=  $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$  of  $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$ )

0,9-x ml water

Resultaten: zie grafiek 2.

Grafiek 2.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -optima bij verschillende guaiacolconcentraties. Buffer pH 5,9.

o =  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol; 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; extract 1:1 verdund  
 x =  $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol; 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; extract 1:1 verdund  
 Δ =  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol; 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; onverdund extract.



Conclusie:

Er is een optimale peroxydeconcentratie afhankelijk van de guaiacolconcentratie. Bij een guaiacolconcentratie van  $33 \text{ mmol.l}^{-1}$  in het reactiemedium is de optimale peroxydeconcentratie  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ , bij  $3,3 \text{ mmol.l}^{-1}$  guaiacol is de optimale peroxydeconcentratie ca.  $2 \text{ mmol.l}^{-1}$ .

De bufferconcentratie is niet zo belangrijk voor het meetresultaat. Bij het niet verdunde extract is de extinctieverandering per minuut tweemaal zo hoog als bij het verdunde extract. Er zijn dus in het plantextract geen sterk remmende factoren aanwezig. Hierdoor is het mogelijk om de enzymactiviteit te bepalen in een plantextract onder omstandigheden van het voorschrift. Het geschikte meetgebied kan nu namelijk bereikt worden door verdunning van het extract bij een constantblijvende guaiacolconcentratie.

### 2.3. Extinctieverandering per minuut bij diverse golflengtes

Voor de berekening van de peroxydase-activiteit op basis van stofomzetting is het noodzakelijk de extinctiecoëfficiënt van het omgezette substraat of het gevormde produkt bij de gebruikte meetgolflengte, in dit geval 420 nm, te kennen. Uit de literatuur zijn extinctiecoëfficiënten bekend voor tetraguaiacol bij 436 en 470 nm. Uit een spectrum is de verhouding tussen de extincties, en dus tussen de extinctiecoëfficiënten bij verschillende golflengtes te berekenen.

De uitgevoerde reactie verloopt zo vlug, dat het nauwkeuriger is om het spectrum te berekenen uit de gemeten extinctieverandering per minuut, dan om een reactiemengsel door te meten.

Reactiemengsel:

1 ml fosfaatbuffer pH 5,9, 1 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol in water, 0,1 ml extract 1:1 verdund, 0,2 ml 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $= 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ ), 0,7 ml water.

Resultaten:

$\Delta E_{420}/\text{min} = E_{420}$	na een minuut = 4,74	stel 1,00
$\Delta E_{436}/\text{min} = E_{436}$	na een minuut = 4,71	stel 0,99
$\Delta E_{470}/\text{min} = E_{470}$	na een minuut = 4,41	stel 0,93
$\Delta E_{480}/\text{min} = E_{480}$	na een minuut = 4,05	stel 0,85

De waarde die in de literatuur opgegeven wordt voor 470 nm is hoger dan voor 436 nm terwijl uit het spectrum het tegendeel wordt verwacht. Dit kan een gevolg zijn van bepaling bij een iets andere pH.

### 2.4. De optimale waterstofperoxydeconcentratie bij verschillende pH's

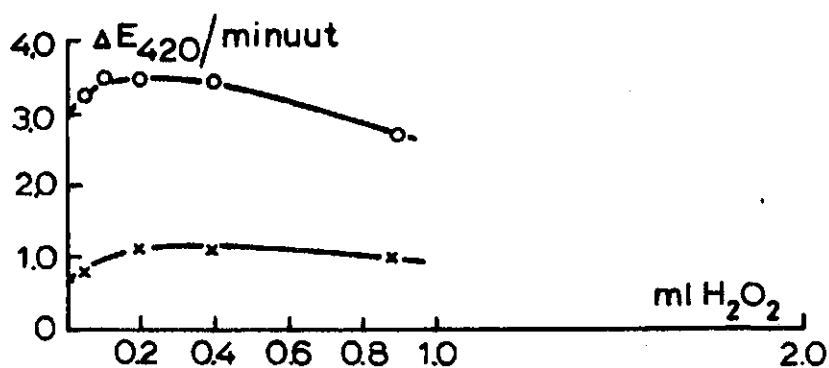
Reactiemengsel:

1 ml fosfaatbuffer pH 7,0  
1 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol of  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol  
0,1 ml extract onverdund of 1:1 verdund met buffer pH 7,0  
0,9-x ml water  
x ml 1% of 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$  of  $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$ )

Resultaten zie: grafiek 3.

Grafiek 3.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -optima bij verschillende guaiacolconcentraties. Buffer pH 7,0.

o =  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol; 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; extract 1:1 verdund.  
x =  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol; 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; onverdund extract.



Conclusie (zie grafiek 2):

De optimale waterstofperoxyde-concentratie is niet pH-afhankelijk.  
De activiteit bij pH 7,0 is ongeveer de helft van die bij pH 5,9.

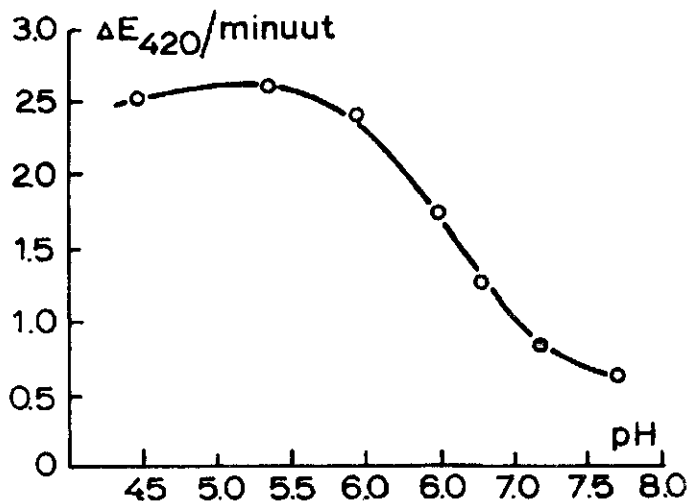
#### 2.5. De invloed van de pH op de peroxydase-activiteit

Reactiemengsel:

1,7 ml fosfaatbuffer pH x  
1,0 ml  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol in water  
0,2 ml 0,2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oplossing (=  $0,06 \text{ mol.l}^{-1}$ )  
0,1 ml onverdund extract

Resultaten: zie grafiek 4.

Grafiek 4. pH-afhankelijkheid van de peroxydase-activiteit.



Conclusie:

Het verloop van de activiteit is te zien in de grafiek.

Bij pH 5 ligt ongeveer het optimum.

Bij pH 7, een pH waarbij vaak gemeten wordt in de literatuur, is de activiteit ongeveer de helft van de maximale. Het optimumgebied is vrij breed. Dit hangt samen met het aantal iso-enzymen, die elk weer een eigen optimum zullen vertonen. In het gebruikte bonebladextract is het aantal iso-enzymen ongeveer vier, waarvan één erg overheersend.

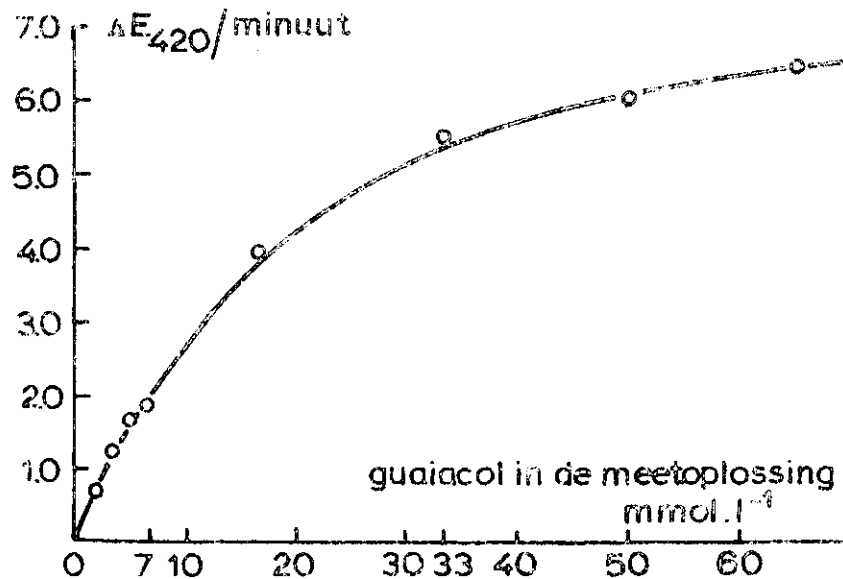
#### 2.6. De invloed van de guaiacolconcentratie op de activiteit

Reactiemengsel:

Fosfaatbuffer pH 5,9, guaiacol in buffer pH 5,9  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  in optimale concentratie, 0,1 ml extract 1:1 verdund met buffer pH 5,9,  
totaalvolume 3,0 ml.

Resultaten: zie grafiek 5.

Grafiek 5. Afhankelijkheid van de guaiacolconcentratie.  
Buffer pH 5,9; optimale  $H_2O_2$ -concentratie voor ieder meetpunt.



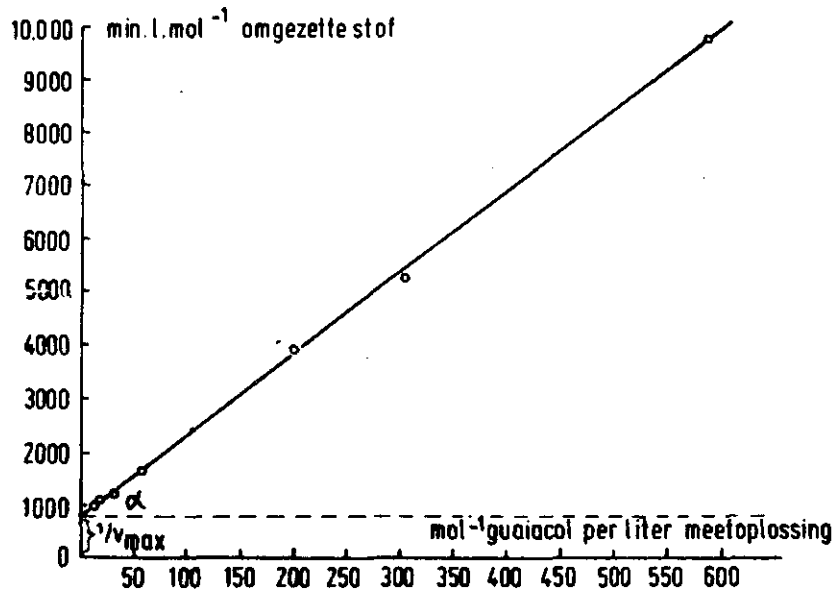
Conclusie:

Uit de metingen blijkt, dat na optimalisering van pH en waterstofperoxydeconcentratie de gemeten reactiesnelheid in een bepaald monster nog afhankelijk is van de guaiacolconcentratie. Dat geldt ook voor de meetomstandigheden in het voorschrift uit de klinische chemie (Pütter, 2970). Dat is in afwijking van de eisen die aan een standaardbepalingsmethode mogen worden gesteld. Er moet namelijk eigenlijk gemeten worden in het gebied van substraatverzadiging, waar de reactiesnelheid onafhankelijk is van de guaiacolconcentratie. In de praktijk is het niet mogelijk om onder die omstandigheden te werken, o.a. omdat de oplosbaarheid van guaiacol beperkt is. Zie verder onder 2.7.

2.7. Discussie

De peroxydase-activiteit als functie van de guaiacolconcentratie kan worden uitgezet als  $1/v$  tegen  $1/[S]$ , of de reciproke-waarde van de omgezette hoeveelheid substraat per liter per minuut in de meetoplossing tegen de reciproke-waarde van de guaiacolconcentratie. Deze manier van uitzetten levert een rechte lijn, waaruit volgt dat de Michaelis-Menten theorie voor een éénsubstraatreactie van toepassing is voor de peroxydasenactie, als de waterstofperoxydaseconcentratie optimaal is. Zie grafiek 6.

Grafiek 6. Lineweaver-Burk-grafiek van de peroxydase-activiteit in boneblad-extract. Meting in buffer pH 5,9 bij 25 °C met guaiacol als substraat. De H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-concentratie was in ieder meetpunt optimaal.



Tabel 2.

Beginconcentratie guaiacol in de meetoplossing gmol.l <sup>-1</sup>	[S] <sup>-1</sup> in l.mol <sup>-1</sup>	Extinctieverandering in het standaardreactiemengsel ΔE <sub>420</sub> .min <sup>-1</sup>	μmol omgezet substraat. min.l <sup>-1</sup>	v <sup>-1</sup> in l.min. μmol <sup>-1</sup>
0,067	14,9	6,45	993	1,01x10 <sup>-3</sup>
0,050	20,0	6,03	927	1,08x10 <sup>-3</sup>
0,033	30,3	5,53	852	1,17x10 <sup>-3</sup>
0,017	59	3,95	608	1,64x10 <sup>-3</sup>
0,005	200	1,66	256	3,91x10 <sup>-3</sup>
0,0033	303	1,24	191	5,24x10 <sup>-3</sup>
0,0017	588	0,67	103	9,71x10 <sup>-3</sup>

\* ) De hoeveelheid omgezette stof wordt berekend uit de specifieke extinctie van het gevormde tetrameer, met de Wet van Lambert-Beer:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

waarin:

E<sub>λ</sub> = de gemeten extinctie bij golflengte λ

ε<sub>λ</sub> = de molaire extinctie bij golflengte λ

c = de concentratie van het gevormde produkt

l = de dikte van het cuvet

Voor een enzymactiviteitsbepaling geldt  $\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{\Delta c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot l}{\Delta t}$

l wordt uitgedrukt in cm; als ε in cm<sup>2</sup>.μmol<sup>-1</sup> of l.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> wordt uitgedrukt, dan moet c worden uitgedrukt in μmol.ml<sup>-1</sup>.

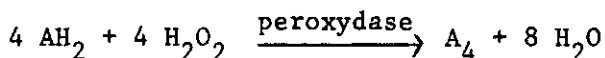
Bij ε in cm<sup>2</sup>.mmol<sup>-1</sup> wordt c uitgedrukt in mmol.ml<sup>-1</sup>.

De gevormde hoeveelheid tetraguaiacol, Δc, volgt nu uit:

$$\Delta E_{420} \text{ per minuut} = \Delta c \cdot \epsilon_{420} \cdot l \cdot l, \text{ zodat } \Delta c = \frac{\Delta E_{420} / \text{min}}{\epsilon_{420}} \cdot \mu\text{mol.ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$\epsilon_{436}$  voor tetraguaiacol =  $25,5 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$  (Pütter, 1970)  
 $\epsilon_{470}$  voor tetraguaiacol =  $26,6 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$  (Maehly, 1959).

Uit de metingen van de extinctieveranderingen bij verschillende golflengten volgt, dat  $\epsilon_{420}$  bijna gelijk is aan  $\epsilon_{436}$ , dus stel  $\epsilon_{420} = 26 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ .  
 Uit de netto reactievergelijking



volgt, dat per gevormd tetrameermolecule vier moleculen guaiacol of vier moleculen waterstofperoxyde worden omgezet.

Per minuut verdwijnen er dus:

$$\frac{4 \times \Delta E_{420}/\text{min}}{\epsilon_{420}} \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{4000}{26} \cdot \Delta E_{420}/\text{min} \cdot \mu\text{mol guaiacol of}$$

waterstofperoxyde per liter meetoplossing.

De activiteit is alleen afhankelijk van de guaiacolconcentratie. De maximale reactiesnelheid is af te leiden uit de grafiek.

$$1/v_{\text{max}} = 0,78 \times 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{mol}^{-1}.$$

$$v_{\text{max}} = 1280 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

$$\Delta E_{420}/\text{min}_{\text{max}} = 8,31.$$

Voor het enzym kan nu uit de Lineweaver-Burk-grafiek de Michaelis-constante worden uitgerekend.

$$K_M = v_{\text{max}} \cdot \text{tga} = 19 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}.$$

Deze constante geldt ook bij 470 nm.

In de literatuur worden waarden voor de Michaelis-constanten opgegeven van 0,6; 1,0; 1,0 en 0,2  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  guaiacol voor tarwebladextract (Catedral & Daly, 1976).

3,28; 5,26 en 3,85  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  guaiacol voor tabakscallusextract (Nessel & Mäder, 1977).

en 9,1 en 4,5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  guaiacol, ook voor tabaksweefselextract (Schafer et al., 1971).

Volgens de theorie van Michaelis-Menten is de reactiesnelheid onafhankelijk van de guaiacolconcentratie, als  $[S] \geq 10 \times K_M$ , dus als  $[S] \geq 190 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . De reactie is dan van de nulde orde.

Als  $[S] \ll K_M$  is de reactie van de eerste orde; de reactiesnelheid is recht evenredig met de guaiacolconcentratie. Bij  $[S] = K_M$  is  $v = \frac{1}{2} v_{\text{max}}$ . In de buurt van deze concentratie is de reactie een mengvorm tussen de eerste en nulde orde.

In ons eigen voorschrift is de  $[S] = 33 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  dus  $> K_M$ , maar niet zoveel dat  $v_{\text{max}}$  wordt benaderd.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}. \quad [\text{H}_2\text{O}_2] : [S] = 1 : 1,6$$

De maximale reactiesnelheid voor een bepaald monster is te berekenen uit de gemeten waarde bij  $33 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  guaiacol, door deze te vermenigvuldigen met een factor:

$$\frac{\Delta E_{420}/\text{minuut}_{\text{max}}}{\Delta_{420}/\text{minuut}_{33 \text{ mmol}}} = \frac{8,31}{5,53} = 1,5.$$

Het voorschrift voor de peroxydasebepaling in de klinische chemie wordt uitgevoerd bij lagere guaiacolconcentratie (Chance, 1959; Pütter, 1970).



Het reactiemengsel bestaat uit:

2,90 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> fosfaatbuffer pH 7,0  
0,05 ml guaiacol (2,2 mg.ml<sup>-1</sup>)  
0,04 ml waterstofperoxyde (1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.30% per ml)  
0,01 ml enzymoplossing in buffer

[S] = 0,3 mmol.l<sup>-1</sup> in de eindoplossing, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 0,12 mmol.l<sup>-1</sup>.

[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] : [S] = 1 : 2,5.

De tijd, die nodig is om van extinctie 0,050 naar 0,100 in de meetoplossing te komen bij 436 nm wordt bepaald.

Een twee-substraatreactie is per definitie van de tweede orde onder omstandigheden ver beneden substraatverzadiging, dat wil zeggen dat de gemeten reactiesnelheid van een bepaald monster afhankelijk is van de waterstofperoxydeconcentratie en van de guaiacolconcentratie in het geval van de peroxydase-activiteitsbepaling. Door het waterstofperoxyde in een optimale verhouding ten opzichte van het guaiacol te houden is het mogelijk de formules, die gelden voor een reactie van de eerste orde, te gebruiken voor de berekening van de reactiesnelheid van een bepaald monster onder omstandigheden van guaiacolverzadiging, uit de gemeten waarde bij een willekeurige guaiacolconcentratie.

De theoretisch beste meetmethode voor een enzymactiviteit is onder omstandigheden van substraatverzadiging, waarbij de reactie van de nulde orde is, dus onafhankelijk van elke substraatconcentratie. Voor wat betreft waterstofperoxyde is deze situatie niet te verwezenlijken, aangezien een hogere concentratie de reactie remt. Voor de guaiacol is dit ook niet haalbaar, omdat een guaiacoloplossing in water verzadigd is bij 0,13 mol.l<sup>-1</sup>.

Onder de gebruikte omstandigheden is goed te meten. De guaiacolconcentratie, 33 mmol.l<sup>-1</sup>, ligt in een gebied waar de reactie een mengsel is van de eerste en de nulde orde. De afhankelijkheid van de guaiacolconcentratie is zo gering, 0,8 mmol.l<sup>-1</sup> per minuut guaiacol verdwijnt er uit het gebruikte monster, dat aan het begin van de reactie de extinctieverandering per tijdseenheid een rechte lijn is. Na 1/2 - 1 minuut begint de curve af te buigen. Dit heeft verschillende oorzaken. De waterstofperoxydeconcentratie daalt ook met dezelfde snelheid als de guaiacolconcentratie, ten gevolge van de reactie met peroxydase.

In een plantextract is meestal ook het enzym katalase aanwezig, dat een gedeelte van het waterstofperoxyde kan omzetten. De katalase-activiteit kan van invloed zijn op de optimale peroxydeconcentratie per type monster. Bij het doorgemeten monster is de invloed nauwelijks merkbaar geweest, aangezien de optimale peroxydeconcentraties onafhankelijk bleken van de verdunning van het monster.

Verder kan de afbuiging van de curve nog veroorzaakt worden door ontleding van het gevormde tetrameer, ca. 5% gedurende tien minuten.

In de praktijk wordt de extinctieverandering gemeten als de helling van de geproduceerde rechte lijn, of bij een afbuigende curve, als de helling van de raaklijn daaraan bij het begin van de reactie, en uitgedrukt als  $\Delta E_{420}$  per minuut.

De gemeten peroxydase-activiteit is afhankelijk van de pH in het meetmilieu. Voor elk type monster zal de optimum pH-waarde ergens anders liggen, afhankelijk van het aantal iso-enzymen en de onderlinge verhouding daarvan.

De pH 5,9 uit het voorschrift werd gekozen, omdat HRP daar het optimum had en omdat uit de literatuur bekend is, dat veel plantaardige peroxydase hun optimum hebben tussen pH 5 en 6. Voor het bonebladextract was het optimum rond pH 5, terwijl het extract bij pH 7,6 werd bereid. Deze pH wordt in het algemeen gebruikt voor plantaardige eiwitextracties, omdat daarbij het meeste eiwit in oplossing gaat. Er zijn optimum pH-waarden voor plantaardige peroxydase gevonden van 4 tot 8,5.

Het praktisch bruikbare meettraject loop van  $0,10 < \Delta E_{420}/\text{min} < 7$ . Plantextracten van boneblad, aardappelblad en tarweblad volgens voorschrift bereid, kunnen als zodanig worden gemeten of hoeven tot hoogstens 25 keer te worden

verdund om in het meettraject te vallen. Omdat de activiteit afhankelijk is van de substraatconcentratie en de pH in het reactiemengsel moeten deze altijd vermeld worden en voor vergelijkende proeven moet dus steeds bij dezelfde omstandigheden worden gemeten.

Omdat zo weinig bekend is over de functie van de peroxydassen is grote voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de meetgegevens en heeft de bepaling slechts vergelijkende waarde.

### 3. LITERATUUR

- Adams, J.B.: The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature short time processing of vegetables. *J. Fd. Technol.* 13 (1978): 281-297.
- Bates, D.C., S.R. Chant: Alterations in peroxidase activity and peroxidase isozymes in virus infected plants. *Ann. appl. Biol.* 65 (1970): 105-110.
- Burnette, F.S.: Peroxidase and its relationships to food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.* 42 (1977): 1-6.
- Catedral, F., J.M. Daly: Partial characterization of peroxidase isoenzymes from rust-affected wheat leaves. *Phytochemistry* 15 (1976): 627-631.
- Chance, B.: Catalases and peroxidases, Part 2, Special methods. In: *Methods of biochemical analysis*, vol. 1:408-424. Ed. D. Glick. Interscience publishers inc., New York, 1959.
- Chen, Shiao-Lim, L.R. Towill, J.R. Loewenberg: Isozyme patterns in developing *Xanthium* leaves. *Physiol. Plant.* 23 (1970): 434-443.
- Dunleavy, J.M., N.V. Ramaraje Urs: Peroxidase activity in roots and leaves of soybeans. *Crop Sci.* 18 (1978): 104-108.
- Giannopolitis, C.N., S.K. Ries: Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher plants: *Plant Physiol.* 8 (1971): 309-314.
- Hall, T.C., B.H. McCown, Sh. Desborough, R.C. McLeester, G.E. Beck: A comparative investigation of isozyme fractions separated from plant tissues. *Phytochemistry* 8 (1969): 385-391.
- Halliwell, B.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytol.* 73 (1974): 1075-1086.
- Halliwell, B.: Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140 (1978): 81-88.
- Kamel, M.Y., A.M. Ghazy: Peroxydases of *Solanum melongea* leaves. *Phytochemistry* 12 (1973): 1281-1285.
- Lamb, J.E., H. Riezman, W.M. Becker, C.J. Leaver: Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. *Plant Physiol.* 62 (1978): 754-760.
- Lazar, G., G.L. Farkas: Patterns of enzyme changes during leaf senescence. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 21 (1970): 389-396.
- Maehly, A.C.: Peroxidase assays. In: *Methods of biochemical analysis*. Vol. 1, 387. Ed. D. Glick. Interscience publishers inc., New York, 1959.
- Mahler, H.R., E.H. Cordes. In: *Biological chemistry*: 590-592. Ed. Harper & Row, New York, 1969.
- Marklund, S.: Tryptic digestion and alkaline denaturation of catalase. *Biochim. Biophys. Acta* 321 (1973): 90-97.
- McCown, B.H., T.C. Hall, G.E. Beck: Plant leaf and stem proteins. 2. Isozymes and environmental change. *Plant Physiol.* 44 (1969): 210-216.
- Morrison, M., G.R. Schonbaum: Peroxydase-catalysed halogenation. *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976): 860-888.
- Mulchi, C.L., R.J. Volk, W.A. Jackson: Oxygen exchange of illuminated leaves at CO<sub>2</sub>-compensation. In: *Photosynthesis and photorespiration*, 35-50. Ed. M.D. Hatch, C.B. Osmond, R.O. Slatyer, 1971. Wiley-Interscience, New York
- Nessel, A., M. Mäder: Ueber die physiologischen Bedeutung der Peroxydase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften. 2. pH-optima, Michaelis-Konstanten, Maximale Oxidationsraten. *Z. Pflanzphysiol.* 82 (1977): 247-260.
- Nicholls, P., G.R. Schonbaum: Catalases. In: *The Enzymes*, Vol. 8, 222-225. 2e druk, Ed. P. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck; Acad. Press., New York, 1963.
- Parish, R.W.: Studies on the senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. 1. The effects of cutting, and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis. *Planta* 82 (1968): 1-13.
- Patra, H.K., M. Kar, D. Mishra: Catalase activity in leaves and cotyledons during plant development and senescence. *Biochem. Biophys. Pflanzen* 172 (1978): 385-390.

- Paul, K.G.: Peroxidases. In: *The Enzymes*, Vol. 8: 227-274. 2e druk Ed. P. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck; Acad. Press., New York, 1963.
- Peet, M.M., A. Bravo, D.H. Wallace, J.L. Ozbun: Photosynthesis, stomatal resistance, and enzyme activities in relation to yield of field-grown dry bean varieties. *Crop Sci.* 17 (1977): 287-293.
- Pütter, J.: Peroxydasen. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band 1: 648-653. Ed. H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
- Ramaraje Urs, N.V., J.H. Hill: Inactivation of southern bean mosaic virus by a horseradish peroxidase-hydrogen peroxide system. *Phytopath. Z.* 91 (1978): 365-368.
- Rich, P.R., A. Boveris, W.D. Bonner, A.L. Moore: Hydrogen peroxide generation by the alternate oxidase of higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (1976): 695-703.
- Salin, M.L., P.H. Homann: Changes of photorespiratory activity with leaf age. *Plant Physiol.* 48 (1971): 193-196.
- Saunders, B.C., A.G. Holmes-Siedle, B.P. Stark: In: *Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and of some related catalysts*. Ed. Butterworths, London, 1964.
- Scandalios, J.G.: Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* 3 (1969):37-79.
- Schafer, Ph., S.H. Wender, E.C. Smith: Effect of scopoletin on two anodic isoperoxidases isolated from tobacco tissue culture W-38. *Plant Physiol.* 48 (1971): 232-233.
- Schiefer, S., W. Teifel, H. Kindl: Plant microbody proteins. I. Purification and characterization of catalase from leaves of *Lens culinaris*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357 (1976): 163-175.
- Solomos, Th.: Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 28 (1977): 279-297.
- Staples, R.C., M.A. Stahmann: Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopath.* 54 (1964): 760-764.
- Sund, H., K. Weber, E. Mölbart: Dissoziation der Rinderleber-Katalase in ihre Untereinheiten. *Europ. J. Biochem.* 1 (1967): 400-410.
- Woolhouse, H.W.: Senescence processes in the life cycle of flowering plants. *Biosci.* 28 (1978): 25-31.
- Yamazaki, I.; K. Yokota: Oxidation states of peroxidase. *Mol. Cell. Biochem.* 2 (1973): 39-52.
- Anonymus: Catalase. In: *Biochemica Information II*, 45-47. Ed. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, 1975.

## Aanhangsel

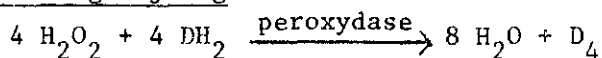
### VOORSCHRIFT VOOR DE BEPALING VAN DE PEROXYDASE-ACTIVITEIT IN PLANTAARDIG MATERIAAL

#### Principe

Aan een extract met peroxydase-activiteit worden waterstofperoxyde en guaiacol toegevoegd, waarna de ontwikkeling van de bruinroze kleur in een dubbelstraal-spectrofotometer wordt geregistreerd bij 420 nm. De peroxydase-activiteit wordt uitgedrukt als de extinctieverandering per minuut per mg opgelost eiwit (bepaald volgens de methode van Lowry), op blad-basis of anderszins.

De meetomstandigheden zijn zodanig, dat de enzymactiviteit afhankelijk is van de guaiacolconcentratie. Het praktische meetgebied loopt van  $0,10 < \Delta E_{420}/\text{min} < 7,0$ . Als de meetoplossing buiten dit gebied blijkt te vallen, moet het monster worden verdund (of geconcentreerd). De guaiacolconcentratie mag niet worden veranderd.

#### Reactievergelijking



#### Extractiemethode

10 g fijngesneden blad (of ander monster) wordt met 50 ml, of zoveel minder als mogelijk is om toch nog een goede suspensie te krijgen, van een  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfaatbuffer pH 7,6 ca. drie minuten in een mixer gehomogeniseerd en de suspensie gedurende een half à één uur afgecentrifugeerd bij 15.000 rpm (= 20.000 g) onder koeling. Het extract wordt afgeschonken en in de koelkast of in de diepvries bewaard. De fosfaatbuffer wordt bereid uit 13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  met water verdund tot bijna een liter, dan met geconcentreerde NaOH-oplossing de pH op de juiste waarde gebracht en aangevuld tot 1 l. Bij sterk gekleurde monsters zoals tulpebloembladeren, wordt in het extractiemedium 10% onoplosbare polyvinyl-pyrrolidon (PVP) Polyclar AT, toegevoegd.

#### Werkwijze

In een cuvet van 1 cm worden achtereenvolgens gepipetteerd:

- 1,7 ml fosfaatbuffer volgens Sørensen, pH 5,9 (bereid volgens tabel)
- 1,0 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  guaiacol (1,11 ml vloeibare guaiacol in 100 ml water of 1,24 gram vaste stof)
- 0,1 ml bladextract in buffer (al of niet verdund)

Het mengsel wordt geschud, daarna wordt 0,2 ml 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oplossing toegevoegd, weer geschud en de extinctieverandering wordt onmiddellijk gemeten tegen een blanco, die bestaat uit het reactiemengsel waarin de waterstofperoxyde is vervangen door water. De concentratie van de guaiacol in het reactiemedium is  $33 \text{ mmol.l}^{-1}$ , van de waterstofperoxyde  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ , bij het begin van de reactie.

Primair-secundair fosfaatbuffer volgens Sörensen.

Secundair 11,376 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  per liter

Primair 8,578 g  $\text{H}_2\text{PO}_4$  per liter

pH =

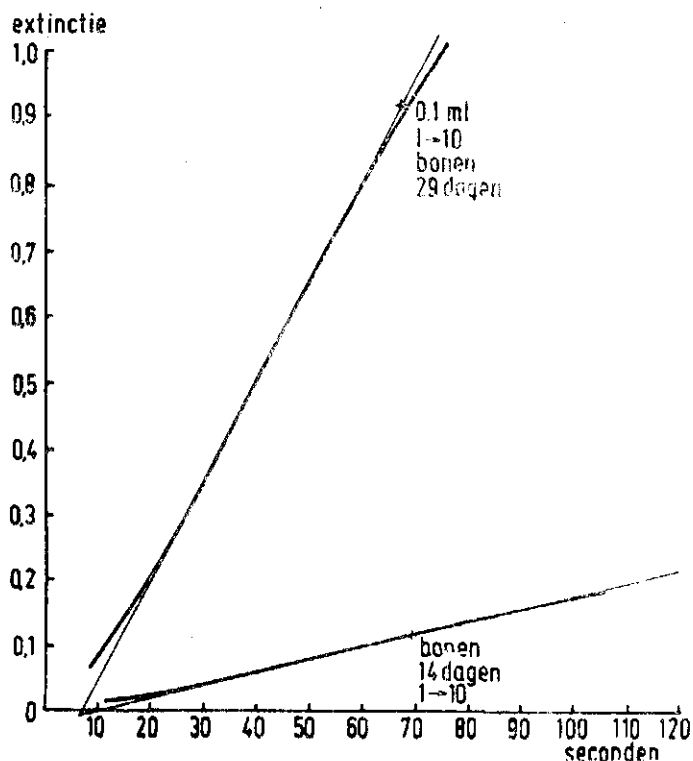
secundair	primair	pH
0,25 ml	9,75 ml	5,288
0,50 ml	9,50 ml	5,589
1,00 ml	9,00 ml	5,906
2,00 ml	8,00 ml	6,239
3,00 ml	7,00 ml	6,462
4,00 ml	6,00 ml	6,643
5,00 ml	5,00 ml	6,813
6,00 ml	4,00 ml	6,979
7,00 ml	3,00 ml	7,152
8,00 ml	2,00 ml	7,328
9,00 ml	1,00 ml	7,507
9,50 ml	0,50 ml	8,041

De 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oplossing wordt verdund uit een 35%-oplossing, medische kwaliteit. De buffer en de guaiacol zijn in een waterbad op 25 °C gebracht en het cuvettenhuis wordt ook op die temperatuur gehouden. De reagentia worden toegevoegd met Seripettors. De toename in extinctie bij 420 nm wordt automatisch geregistreerd. De peroxydase-activiteit wordt hieruit bepaald door de raaklijn te trekken aan de gevormde curve op de recorder. Meestal is deze curve van zichzelf een nagenoeg rechte lijn. Bij een gebogen lijn wordt de raaklijn aan het begin van de reactie bepaald.

De  $\Delta E_{420}$ /minuut wordt genoteerd; zie figuur 1.

Figuur 1. Recordercurve van een peroxydase-activiteitsmeting. Papersnelheid 5 sec.cm<sup>-1</sup>, extinctiebereik 0-0,1. De extinctie bij 420 nm werd geregistreerd voor standaardreactiemengsels van tienmaal verdunde verse extracten van primair boneblad van 14 en 29 dagen oud. De extinctieverandering per minuut is af te lezen door de raaklijn te trekken aan het begin van de curve.

Voor boneblad van 14 dagen oud is  $\Delta E_{420}/\text{min} = 0,115$ .  
 Voor boneblad van 29 dagen oud is  $\Delta E_{420}/\text{min} = 0,915$ .



Als de activiteit van het monster te hoog is ( $\Delta E_{420}/\text{min} > 7$ ), moet het extract verdund worden met extractiebuffer tot het in het meetgebied valt.

Voor elk type extract kan de optimale pH worden bepaald door de buffer uit het voorschrift te vervangen door een andere uit de Sorensen-reeks. Het pH-optimum strekt zich vaak uit over een gebied, afhankelijk van het aantal iso-enzymen dat aanwezig is.

De optimale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -concentratie moet per type monster worden gecheckt, en hangt vermoedelijk samen met de katalase-activiteit. De guaiacoloplossing is een week houdbaar, mits koel en donker bewaard. De waterstofperoxyde-oplossing moet steeds vers worden bereid, ze is slechts enkele uren houdbaar.

Bij bloembladeren kan PVP worden toegevoegd in het extract en moet de extinctieverandering worden gemeten bij 480 nm, omdat bij 420 nm een storing optreedt. De beste golflengte moet per type monster uit het spectrum worden afgeleid.

De peroxydase-activiteit wordt uitgedrukt per mg oplosbaar eiwit in het extract, of per gram versgewicht.

De hoeveelheid oplosbaar eiwit wordt bepaald volgens de methode van Lowry, zie blz. 26.

#### Berekening van de peroxydase-activiteit op stofomzettingsbasis

De peroxydase-activiteit kan worden uitgedrukt als extinctieverandering per tijdseenheid per mg oplosbaar eiwit in het extract. Dit is in de literatuur voor planteperoxydase de meest gebruikelijke methode. Bij de berekening moet gecorrigeerd worden voor de volumevergroting van het extract door het vocht uit het monster. Op deze wijze kan de activiteit ook worden betrokken op een blad, of op  $\text{cm}^2$  bladoppervlak.

De activiteit kan ook worden uitgedrukt als verdwenen hoeveelheid guaiacol of waterstofperoxyde per tijdseenheid. Hiervoor gebruiken we de formule (wet van Lambert-Beer):

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times l$$

waarin:

$E_{\lambda}$  = de gemeten extinctie bij golflengte  $\lambda$

$\epsilon_{\lambda}$  = de molaire extinctie bij golflengte  $\lambda$ , in  $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$

$c$  = de concentratie van het gevormde produkt, in  $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$

$l$  = de weglengte in het cuvet, in cm.

Voor een enzymactiviteitsbepaling geldt:

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{\Delta c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot l}{\Delta t}$$

$\epsilon$  voor  $D_4$  (zie de reactievergelijking op blz. 11) =  $26 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ .

Per tetrameer verdwijnen er vier moleculen waterstofperoxyde of guaiacol. De hoeveelheid omgezette stof volgt uit de formule:

$$p = \Delta E_{420} / \text{minuut} = 4 \Delta c \times \epsilon_{420} \times l \times l$$

als de weglengte in het cuvet 1 cm is en de tijdbasis 1 minuut. Per minuut verdwijnen er dus  $\frac{4 \times p}{\epsilon_{420}}$   $\mu\text{mol}$  per ml meetoplossing.

Dat is onder de gegeven reactieomstandigheden ca. 0,8 mmol guaiacol per liter meetoplossing.

De omgezette hoeveelheid stof per eenheid van bladoppervlakte bijvoorbeeld kan hieruit worden berekend als volgt:

$$\frac{\text{ml totaal extract}}{\text{cm}^2 \text{ geëxtraheerd blad}} \times \frac{\text{ml meetoplossing}}{\text{ml gebruikt extract}} \times \frac{4}{26} \times \frac{p}{60} =$$

$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  of guaiacol per  $\text{cm}^2$  bladoppervlakte per seconde.

#### Bepaling van oplosbaar eiwit in plantextract volgens Lowry\*

Een hoeveelheid extract, die 25-500  $\mu\text{g}$  eiwit bevat, wordt behandeld met een gelijk volume 10% trichloorazijnzuur (TCA), eindconcentratie 5%, een nacht koel en donker weggezet (niet langer) en daarna afgecentrifugeerd. Het neerslag wordt uitgewassen met 1% TCA en weer afgecentrifugeerd. Het residu wordt opgelost in 1 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH.

#### Reagentia

- Oplossing A : 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH  
Oplossing B : 0,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in 1% Na- of K-tartraat  
Oplossing C : 50 ml oplossing A mengen met 1 ml oplossing B (dagelijks vers maken)  
Oplossing D : Folin-Ciocalteu's fenolreagens (Merck).  
Verdunnen tot  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  zuur. De zuurgraad wordt bepaald door titratie met  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH en is ca.  $2 \text{ mol.l}^{-1}$ .

#### Werkwijze

Aan 1 ml eiwitoplossing in loog wordt 5 ml oplossing C toegevoegd. Na schudden en tien minuten laten staan wordt 0,5 ml oplossing D toegevoegd en weer geschud. Na nog dertig minuten staan wordt de blauwe kleur gemeten bij 500 nm. Als de extinctie te hoog is ( $> 0,80$ ) moet de eiwitoplossing in loog worden verdund (met loog) en de bepaling opnieuw worden uitgevoerd. De uitkomsten worden berekend met behulp van een ijklijn gemaakt met runderbloedalbumine p.a.

\* O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A. Lewis Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin-phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.



## Aanhangsel 2

### VOORSCHRIFT VOOR DE BEPALING VAN DE KATALASE-ACTIVITEIT IN PLANTAARDIG MATERIAAL

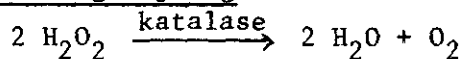
#### Principe

Aan een waterstofperoxyde-oplossing wordt een extract met katalase-activiteit toegevoegd. Na een bepaalde tijd wordt de reactie gestopt door toevoeging van zwavelzuur.

De resterende hoeveelheid waterstofperoxyde wordt bepaald door titratie met kaliumpermanganaatoplossing.

De katalase-activiteit wordt uitgedrukt als  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  omgezet per minuut per mg opgelost eiwit in het extract.

#### Reactievergelijking



#### Extractie van het plantemateriaal

10 gram fijngemaakt vers monster wordt met 50 ml gekoelde fosfaatbuffer  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  pH 7,6 een minuut in een Braunmixer (stand 3) gehomogeniseerd en de suspensie  $\frac{1}{2}$ -1 uur gecentrifugeerd bij 15.000 rpm (= 20.000 g) onder koeling. Het extract wordt afgeschonken en de katalasebepaling wordt hierin zo snel mogelijk uitgevoerd.

De hoeveelheid oplosbaar eiwit in het extract wordt bepaald volgens de methode van Lowry (zie blz.26). De katalase-activiteit wordt uitgedrukt per mg oplosbaar eiwit.

#### Katalase-activiteitsbepaling

##### Reagentia

2 mmol.l <sup>-1</sup> KMnO <sub>4</sub>	(316 mg per l)
2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(gec. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 ml tot 100 ml)
ca. 0,035% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(3 ml 35% waterstofperoxyde, medicinaal zuiver,
= 10 mmol.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup>	eerst tot 300 ml en dag nog tienmaal verdunnen)
0,1 mol.l <sup>-1</sup> fosfaatbuffer, pH 7,6	(13,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> oplossen in bijna 1 l water;
	de pH op 7,6 brengen met gec. NaOH en aanvullen tot
	1 l)

#### Blanco-waterstofperoxydebepaling

Vooraf wordt 10,0 ml waterstofperoxyde-oplossing, waaraan buffer en zwavelzuur is toegevoegd, getitreerd met kaliumpermanganaatoplossing om te zien of de concentraties binnen de buretgrens vallen en om het verschil met de blanco-monsterwaarde te kunnen bepalen.

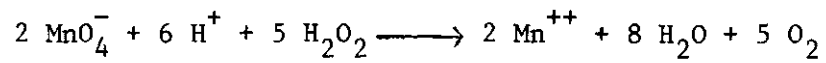
Dit verschil mag niet te groot zijn. Als het groter is dan 1-2 ml, moet het monster worden verdund.

#### Werkwijze

De bepaling wordt uitgevoerd bij 25 °C (eventueel bij kamertemperatuur). Aan 10,0 ml waterstofperoxyde-oplossing + 3,0 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfaatbuffer wordt 0,2 ml plantextract toegevoegd.

Na anderhalf en tien minuten (de bepaling wordt ingezet in drievoud) wordt de reactie gestopt door toevoeging van 10 ml 2% zwavelzuur. Een blanco-monsterbepaling wordt ingezet op t=0 door eerst zwavelzuur en vervolgens het plantextract toe te voegen. De overgebleven hoeveelheid waterstofperoxyde wordt berekend uit titratie met  $2 \text{ mmol.l}^{-1}$  KMnO<sub>4</sub>, tot een zwakroze kleur in de oplossing blijft.

1 ml 2 mmol.l<sup>-1</sup> KMnO<sub>4</sub> is equivalent met 5 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, volgens de reactie:



De katalase-activiteit van 0,2 ml monster is dus per minuut:

$$5 \times (\text{aantal ml permanganaat blanco-monster} - \text{idem bepaling})/t = A$$

De activiteit per mg oplosbaar eiwit is dus:

$$5 \times A / \text{hoeveelheid oplosbaar eiwit in mg per ml extract.}$$