



Bleichung von Melanin mittels einer Manganperoxidase aus dem Basidiomyceten *Irpex consors* und deren Anwendung zur Farbstabilisierung von Fruchtzubereitungen

M. Förstner, J. Möller, L. Müller, H. Zorn*

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus Liebig Universität 35392 Giessen, Deutschland



Einleitung

Melanine sind ubiquitär vorkommende Farbstoffe, welche durch enzymatische Bräunung aus phenolischen Vorstufen entstehen. Sie kommen in Haut, Haaren und Zellwänden vor und sind für die Braunfärbung von Früchten verantwortlich. Durch die Bräunung von angeschnittenem oder verarbeitetem Obst werden eigentlich noch genießbare Früchte vom Verbraucher abgelehnt, was zu hohen Verlusten führt.

Da Basidiomyceten über ein enormes Enzymspektrum verfügen, wurden daraus gewonnene Enzympräparationen auf ihr Potential zur Farbstabilisierung hin untersucht. Dazu wurden 25 Basidiomyceten auf einen bleichenden Effekt gegen Melanin gescreent. Aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors* wurde mittels mehrerer Reinigungsschritte ein Enzym isoliert, das anschließend biochemisch charakterisiert und in Applikationstests eingesetzt wurde.

Workflow



Ergebnisse

1. Screening der Basidiomyceten

Effektive Bleichung von Melanin durch den Weißfäulepilz *Irpex consors* sowohl in Submerskultur als auch emers auf Agarplatten.

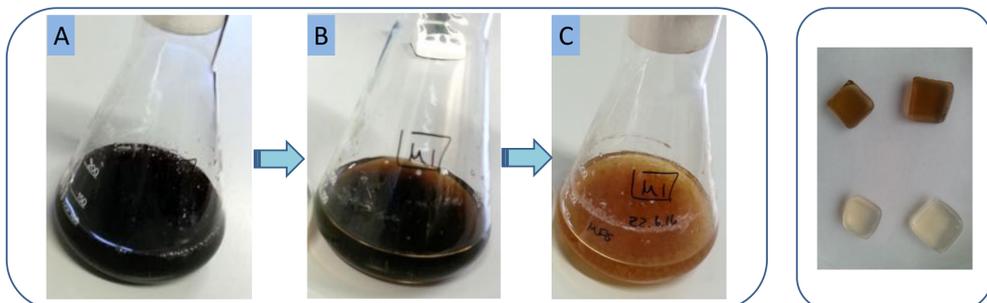


Abb. 1 Melaninbleichung durch *Irpex consors* in Submerskultur nach [A] 24 h; [B] 48 h; [C] 120 h



Abb. 2 Entfärbung melaninfärbter Agarstückchen, oben Negativkontrolle, unten ICO Subm.kult.

2. Enzymcharakterisierung

Die aus *Irpex consors* mittels FPLC erhaltenen Enzymfraktionen mit Peroxidaseaktivität (gemessen mittels ABTS-Assay) wurden für die weitere Charakterisierung gepoolt und in SDS- bzw. IEF-Gelen untersucht; die Proteinfärbung erfolgte mittels Coomassie bzw. ABTS-Aktivitätsfärbung.

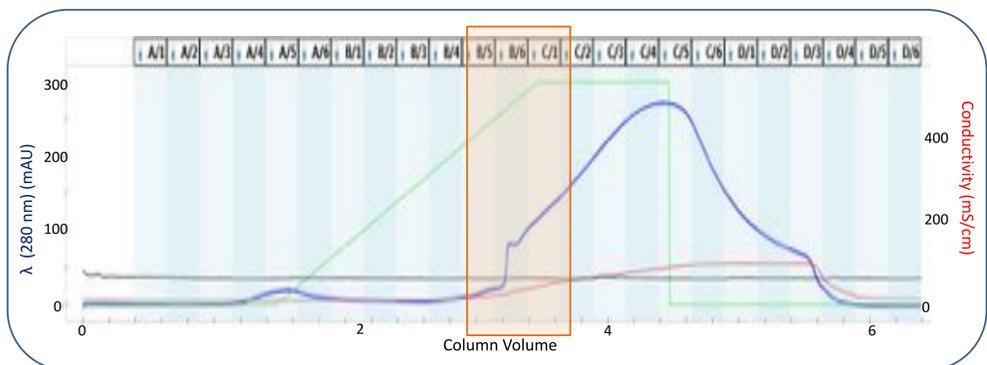


Abb. 3 FPLC-Chromatogramm (Anionenaustausch) des Kulturüberstands von *Irpex consors*, Fraktionen B5-C1 zeigten Peroxidaseaktivität

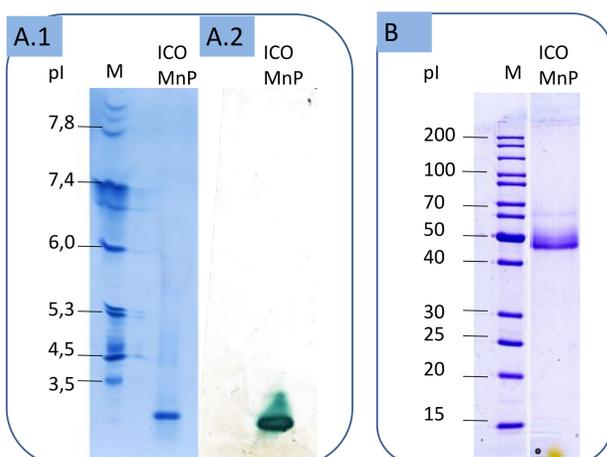


Abb. 4 [A]: Isoelektrische Fokussierung der gepoolten Peroxidase-Enzymfraktionen (ICO MnP) mit Coomassie-Färbung (A.1) und ABTS-Aktivitätsfärbung (A.2); pl 2,8; M: Marker pl 10 - 3
[B]: SDS-PAGE der gepoolten Peroxidase-Enzymfraktionen (ICO MnP) mit Coomassie-Färbung; Molekülmasse ca. 47 kDa; M: Marker 10 - 200 kDa

3. β -Carotin-Abbau



Abb. 5 Bleichung einer β -Carotinlösung, links Negativkontrolle, rechts Umsetzung mit MnP aus ICO, Inkubationszeit 60 min

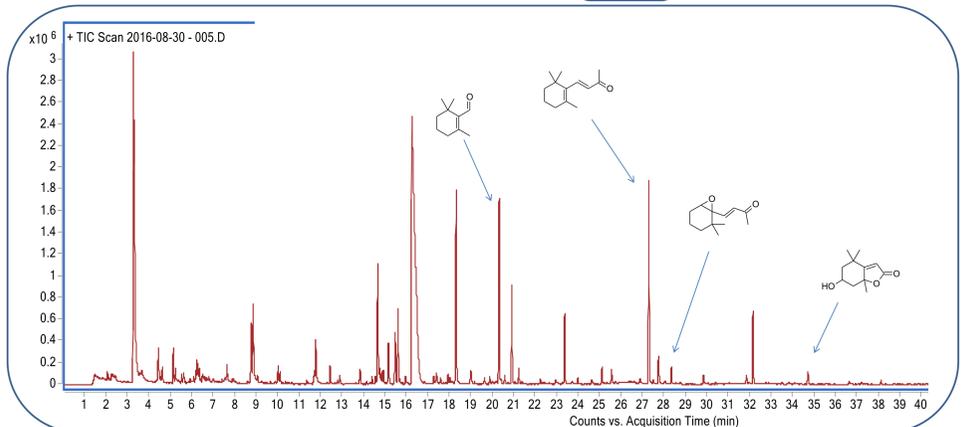


Abb. 6 HS-SPME GC-MS-Chromatogramm der bei der Umsetzung von β -Carotin mit MnP aus *Irpex consors* entstehenden Abbauprodukte

Tab. 1 Identifizierte Abbauprodukte von β -Carotin durch MnP aus *Irpex consors* und deren berechnete Koväts-Indices in Vergleich zu Literaturwerten [1]

Substanz	R _t [min]	Koväts-Index	Koväts-Index (Lit)
β -Cyclocitral	20,323	1.616	1.623
β -Ionon	27,288	1.939	1.955
5,6-Epoxy- β -Ionon	28,347	1.997	1.964
4-Dihydroactinidiolid	34,700	2.332	2.348

4. Applikation im 2-Enzym-System

Erfolgreiche kontinuierliche *in-situ*-Produktion des benötigten Wasserstoffperoxids durch Kombination der Peroxidase mit Glucoseoxidase.

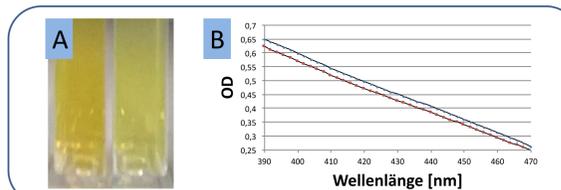


Abb. 7 [A] optische Aufhellung von frischem Apfelsaft, Inkubationszeit 60 min, links Negativkontrolle, rechts 2-Enzym-System [B] Teilausschnitt Änderung des Absorptionsspektrums, blau Negativkontrolle, rot 2-Enzym-System

Fazit

Durch Submerskultivierung und verschiedenen Reinigungsschritte konnte eine Peroxidase aus *Irpex consors* isoliert, charakterisiert und identifiziert werden. In Applikationsversuchen zeigte diese neben Melanin auch auf andere Substrate wie β -Carotin eine bleichende Wirkung. Die teilweise aromarelevanten Abbauprodukte von β -Carotin konnten mittels HS-SPME und GC-MS identifiziert werden. Eine farbstabilisierende Wirkung konnte bei ersten Einsätzen mit Fruchtsaft gezeigt werden; hierbei wurde das benötigte Wasserstoffperoxid mit einem 2-Enzym-System mittels Glucoseoxidase *in-situ* produziert.

Lit:
[1] Kováts, E.: Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. In *Helv. Chim. Acta* 1958 (41(7)), pp. 2061915-2061932.

