

Agrovoc descriptors: vitis vinifera, grapevines, grapes, metalloproteins, copper

Agris category code: F60

COBISS koda 1.01

Vpliv bakrovih spojin na aktivnost polifenol oksidaz v listih, vršičkih in grozdju vinske trte sorte 'Merlot' (*Vitis vinifera* L.)

Denis RUSJAN¹, Robert VEBERič², Zora KOROŠEC-KORUZA³

Prispelo 16. junij 2004; sprejeto 15. oktober 2004

Received June 16, 2004; accepted October 15, 2004

IZVLEČEK

Polifenol oksidaze (PPO) so metaloproteini, saj sta v molekuli vezana dva bakrova iona. Raziskovali smo vpliv bakrovih spojin, kot še vedno nenadomestljive v vinogradništvu na aktivnost PPO pri vinski trti (*Vitis vinifera* L.) sorte 'Merlot' v vinorodnem okolišu Goriška brda v letu 2003. Za boljše razumevanje odziva trte na količine bakrovih spojin smo priredili tri obravnavanja, in sicer: obravnavanje z enkratno (IPG), večkratno (BB) aplikacijo in (K) brez uporabe bakrovih spojin. Aktivnost PPO v listih se v času rastle dobe spreminja, saj smo največjo aktivnost PPO v listih in vršičkih določili v fenofazi 'jagode velikosti graha', najmanjšo pa v času zorenja grozdja oziroma ob trgatvi. Pri foliarni uporabi bakrovih spojin se povprečna aktivnost PPO v nezrelem grozdju statistično ne razlikuje od K, zato sklepamo, da ob dani fenofazi bakrove spojine ne vplivajo na aktivnost PPO. V nadaljevanju zorenja grozdja, v času tehnološke zrelosti grozdja se aktivnost PPO v grozdju zmanjšuje. V polni zrelosti grozdja smo določili manjšo povprečno aktivnost kateholaze in večjo povprečno aktivnost kresolaze. Kljub še vedno nejasni vlogi PPO v rastlinah, je bila pri uporabi bakrovih spojin v listih trte, pa tudi grozdju, glede na kontrolo aktivnost PPO nekoliko večja, ampak statistično neznačilna.

Ključne besede: baker, polifenol oksidaze, vinska trta, grozdje, Merlot

ABSTRACT

THE INFLUENCE OF SPRAYING OF COPPER COMPOUNDS ON POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY IN LEAVES, SHOOT TIPS AND GRAPE OF VINE CV.'MERLOT' (*Vitis vinifera* L.)

Polyphenol oxidases (PPO) are metalproteins, which contain two Cu-atoms per molecule. The influence of copper (Cu), which is still irreplaceable in viticulture, on PPO activity at grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. 'Merlot' was tested in Goriška brda winegrowing district. In 2003 three different treatments with Cu-compounds were applied as follows: IPG (integrated control with 1 Cu treatment), BB (with several Cu-treatment in row) and K (no Cu treatment). The PPO activity in vine leaves varies during vegetation. The highest PPO activity in vine leaves and shoot tips was determined at phenophases 'green fruit', but lowest PPO activity at

¹ Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995

² Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995

³ Doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995

maturation and at vintage. The applications with copper compound have no influence on PPO activity in green berries, the differences among treatments are not significant. During the maturation the PPO activity decreases. At vintage the activity of catecholase in berries still decreased, but the activity of cresolase increase. Although the role of PPO in plants is still unknown, in our research the PPO activity in leaves, shoot tips and in berries was higher at several Cu-treatments, according to control, but not statistically significant.

Key words: copper, polyphenol oxidase, vine, grape, Merlot

1 UVOD

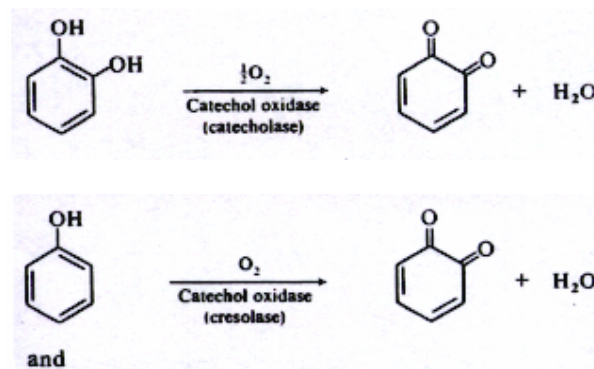
Ker postaja okolje vse bolj onesnaženo in človekovemu zdravju neprijazno, poskušamo pridelavo grozdja in vina prilagoditi razmeram, v katerih bi bila uporaba fitofarmaceutskih sredstev in mineralnih gnojil čim manjša. Bakrove spojine so med temi še vedno nenadomestljive, kar potrjuje njihova 200 letna ter večstranska uporaba. V integrirani pridelavi se omejuje uporabo bakrenih sredstev, zaradi kopičenja bakra v tleh, katera se stoletja uporablja le za vinograd. V integrirani pridelavi grozdja je dovoljeno na leto vnesti na hektar vinograda največ 5 kg čistega bakra. Baker je element, ki je za aktivnost encimov citohrom oksidaze, askorbat oksidaze, fenolaze, lakaze, diamin oksidaze, superoksid dismutaze in druge nujno potreben, saj je sestavni del teh encimov. Sandmann in Böger (1983) navajata tri skupine beljakovin, v katerih je baker vezan na molekulo, in sicer: 'modre' beljakovine: plastocianini - funkcija je transport elektrona, brez aktivnosti oksidaz, 'ne-modre' beljakovine: peroksidaze - funkcija je oksidacija monofenolov do difenolov in 'multi-bakrove' beljakovine: oksidaze (askorbat in fenol oksidaze), ki vsebujejo najmanj štiri atome bakra na molekulo beljakovine in katalizirajo reakcijo: $2AH_2 + O_2 \rightarrow 2A + 2H_2O$. Oksidaze so prisotne v kloroplastih, kjer imajo še vedno precej neznano funkcijo. Molekulska masa encima katehol oksidaza precej variira, saj je odvisna od vrste rastline (Droppa in Horvath, 1990). Oksidaze so prisotne v membranah kloroplastov, ki imajo veliko razmerje klorofila a/b, čeprav na takem mestu ni bila dokazana večja aktivnosti PS 1 (Mayer in Harel, 1979). Čeprav so oksidaze prisotne v kloroplastih še ni dokazano, da vplivajo na potek fotosinteze. Domnevajo, da naj bi v kloroplastih zmanjševale koncentracijo kisika in sodelovale pri biosintezi kinonov, ki so del cikla transporta elektronov.

2 POLIFENOL OKSIDAZE IN VINSKA TRTA

Oksidoreduktaze so encimi, ki katalizirajo oksidacijsko redukcijske reakcije. Substrat, ki ga oksidirajo, ponavadi imenujemo donor vodika. Znotraj skupine oksidoreduktaz imamo 14 podskupin encimov, katerih sistematično ime naj bi temeljilo na sistemu donor proti akceptorju. Najbolj znani encimi so askorbat oksidaza, katalaza, peroksidaza, polifenol oksidaza, glutation peroksidaza in lipoksigenaza (Hammer, 1993). Med fenol oksidazne encime prištevamo encime, ki oksidirajo fenolne substrate v kinone. Mednje prištevamo polifenol oksidaze in peroksidaze (Ryan in sod., 1982).

2.1 Polifenol oksidaze (PPO)

Polifenol oksidaze so metaloproteini, saj sta v molekuli vezana dva bakrova iona. Encim je sestavljen kot enojna polipeptidna veriga ali pa je sestavljen iz več podenot (Martinez in Whitaker, 1995). V grozdju se pojavljata dve skupini polifenol oksidaz, in sicer tirozinaze v zdravem, nepoškodovanem grozdju ter lakaze v grozdju okuženim z botritisom (*Botrytis cinerea*, Pers.). Tirozinaze so encimi, ki oksidirajo *o*-difenoole (kateholaza ali katehol oksidaza EC 1.10.3.1 (Walker in Ferrar, 1998) v *o*-kinone in hidroksilirajo monofenole (kresolaza ali monofenol monoooksigenaze EC 1.14.18.1) *o*-difenoole. Posamezne ali obe omenjeni aktivnosti encima izražajo aktivnost polifenol oksidaze v grozdju (Harel in sod., 1973; Espin in sod., 1997). Vredno je omeniti še aktivnost lakaze, ki katalizira oksidacijo tako *o*-, kot *p*-difenolov, ne pa tudi monofenolov. Prisotnost kateholaze in kresolaze so dokazali v več vrstah trte, tudi v *Vitis vinifera* in *Vitis labrusca* in nekraterih hibridih (Harel in Mayer, 1971; Cash in sod., 1976; Kidron in sod., 1978; Hooper in sod., 1985). Aktivnost kateholaze je v primerjavi z aktivnostjo kresolaze večja (Interesse in sod., 1984; Sanchez-Ferrer in sod., 1988; Valero in sod., 1988). Aktivnost obeh encimov je največja v kožici rdečih sort grozdja, medtem ko je v soku jagode rdečih in belih sort precej manjša (Montedoro, 1969; Wissemann in Lee, 1980; Sapis in sod., 1983).



Slika 1: Reakcije fenol oksidazne (kateholaze in kresolaze) aktivnosti (Mayer in Harel, 1979).

Polifenol oksidaze povzročajo nezaželene oksidacije, ki jih je možno vsaj delno preprečiti, saj se zapis za te encime nahaja v jedru, medtem ko so fenolni substrati od encimov ločeni, saj so locirani predvsem v vakuolah. Pri poškodbi vakuole pridejo fenolne snovi v stik z oksidacijskimi encimi (Hunt in sod., 1993).

Po oksidaciji fenolov nastajajo kinoni, ki so zelo reaktivne spojine in se lahko vežejo z nekaterimi nukleofilnimi aminokislinami (histidin, cistein, metionin, triptofan in lizin), kar zavira razvoj nekaterih žuželk, ki se prehranjujejo z rastlinskim tkivom (Hunt in sod., 1993).

Aktivnost oksidaz se preko zorenja grozdja spreminja. Kidron in sod. (1978), Nakamura in sod. (1984) in Macheix in sod. ? (cit. po Macheix in sod., 1991) navajajo, da je aktivnost kateholaze največja v začetku zorenja grozdja, medtem ko se aktivnost z zorenjem zmanjša. Najmanjšo aktivnost kateholaze navajajo v času zrelosti grozdja (Montedoro, 1969; Traverso-Rueda in Singleton in Kramling, 1976; Kidron in sod., 1978). Kidron in sod. (1978) in Nakamura in sod. (1984) navajajo, da je aktivnost kateholaze v grozdju največja v začetku junija, kasneje pa se

aktivnost zmanjša, kar potrjujejo še Cash in sod. (1976), Wissemann in Lee (1980), Sapis in sod. (1983), Nakanishi in sod. (1987) in Valero in sod. (1989). Wissemann in Lee (1980) navajata, da sta dobila večjo aktivnost fenol oksidaz v grozdju od konca avgusta do začetka oktobra. Traverso in Singleton (1973) navajata, da je aktivnost encimov v grozdju odvisna tudi od količine sladkorja v jagodah, saj so pri rdečih sortah določili največjo aktivnost kateholaze med 16 in 24 °Brix, medtem ko pri belih sortah med 9 in 21,3 °Brix.

De Pieri Troiani in sod. (2003) navajajo, da je aktivnost kateholaze v grozdju odvisna tudi od sorte, kot je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Aktivnost polifenol oksidaz (v grozdju po sortah leta 2003 (De Pieri Troiani in sod., 2003).

Table 1: Polyphenol oxidase activity in grape according vine cultivar in the year 2003.

Sorta Cultivar	Vzorec Sample	Aktivnost PPO (enot/100g) Activity PPO (units/100 g)
Rubi	Kožica Skin	17,4±0,01
	Sok Pulp	60,4±0,01
Borbon	Kožica Skin	102,6±0,03
	Sok Pulp	100,2±0,02
Benitaka	Kožica Skin	26,2±0,01
	Sok Pulp	48,6±0,01

Glede na navedbe vidimo, da se aktivnost med rastno dobo vinske trte zelo spreminja, podatki o tem so precej skopi in nasportujoči, kar pripisujejo različnim metodam določanja aktivnosti ter načinu podajanja podatkov (Macheix in sod., 1991).

Celice se pogosto same borijo proti nezaželenim oksidacijam, saj so polifenol oksidaze pogosto v latentni obliki ali je substrat glikoliziran, kar preprečuje oksidacijo (Escribano in sod., 1997). Ko pa pride substrat poln fenolnih snovi v stik z encimi se aktivira oksidacija oziroma rjavenje mošta.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

Izbrani, poskusni vinograd se nahaja v vinorodnem okolišu Goriška brda, lega Brdice pri Neblem. Vinograd je star 7 let, terasiran in vključen v integrirano pridelavo grozdja. Teraso so dvo in večvrstne z medvrstno razdaljo 2,5 m in medtrtno razdaljo 1m. Ob vsakem kolu sta posajeni dve trti. Trte so speljane v gojitveno obliko modificiran dvojni Guyot z ravno vezanimi šparoni.

V poskus smo vključili 10 trt na obravnavanje. Izvedli smo bločni poskus s tremi ponovitvami. Poskus je bil postavljen na trivrstni terasi, tako da je zajemal vse tri vrste v enaki dolžini in številu trt. V poskus so vključena tri obravnavanja: obravnavanje – 'K' = kontrola - brez uporabe bakrovih spojin, obravnavanje – 'IPG' = uporaba bakrovih spojin dovoljenih v integrirani pridelavi grozdja 1-krat v rastni dobi in obravnavanje – 'BB' - uporaba bakrovih

spojin v obliki Bordojske brozge, kot v konvencionalni pridelavi povprečno 5-krat v rastni dobi.

Preglednica 2: Koledar uporabe bakrovih spojin (bordojska brozga) v poskusnem vinogradu leta 2003. Oznaki '+' pomeni uporaba bordojske brozge; '-' brez bordojske brozge.

Table 2: Time-table of the treatments with copper compounds (Bordeaux mixture) in vineyard in the year 2003. Sign '+' treat with Bordeaux mixture; '-' without mixture

Datum Date	2.6. 2 nd of June	10.6. 10 th of June	19.6. 19 th of June	10.7. 10 th of July	25.7. 25 th of July
Obravnavanje Treatment					
BB	+	+	+	+	+
IPG	-	-	-	-	+
K	-	-	-	-	-

Liste in vršičke smo vzorčili zgodaj zjutraj okrog 7 ure. Vzorec je bil sestavljen iz nekaj naključno izbranih listov in vršičkov iz vse listne površine trte. Vzorci so bili takoj dani v hladilno torbo in nemudoma prinešeni v laboratorij, kjer smo jih zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalniku pri -20°C . Vzorce smo pred analizo fino zmleli s tekočim dušikom in jih takoj analizirali. Grozdne jagode smo naključni zbirali tako po grozdu kot po trti. Za vsak vzorec smo nabrali povprečno 50 jagod in jih takoj postavili v hladilno torbo. Jagode smo takoj prinesli v laboratorij, kjer smo jih shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C vse do analize.

3.1 Priprava vzorcev za analizo aktivnosti PPO

Zaradi obsega dela in velikega števila vzorcev smo izbrali precej hitro metodo, ki je tudi pri nas izvedljiva ob razpoložljivi laboratorijski opreми. Metoda je povzeta po avtorjih Sharma in sod., (1994) in Donko (2001) z manjšimi modifikacijami. Polifenol oksidaze in peroksidaze smo ekstrahirali iz odraslih listov in vršičkov s tekočim dušikom, ki so bili kratek čas hranjeni pri temperaturi -20°C . Pri delnem čiščenju in ekstrakciji encimov smo uporabili neionski blagi detergent Triton TX-100, saj omogoča ekstrakcijo encimov v latentni obliki. Triton TX-100 omogoča popolno odstranitev klorofila, ki bi lahko v nadaljnji analizi povzročal motnje. Vzorce grejemo pri 35°C , da klorofil preide s Tritonom TX-100 v sedimentno fazo, medtem ko polifenol oksidaze ostanejo v supernatantu, kjer je manj Tritona. Da bi se izognili vezavi fenolnih spojin na beljakovine in morebitno oborenje smo v pufrsko mešanico dodali polivinilpolipirrolidon (3 g PVPP/100 ml dd vode). Za inhibicijo proteolitičnih encimov oziroma proteinaz, ki so v rastlinskem materialu precej pogosti, smo v pufrsko raztopino dodali fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF). Zaradi slabe topnosti PMSF v vodi, smo ga raztopili v minimalni količini n-propanola.

3.1.1 Ekstrakcija

V centrifugirko 1,5 ml (epico) natehemo 200 mg zamrznjenih in s tekočim dušikom homogeniziranih listov in vršičkov vinske trte, katerim dodamo 1 ml ledeno mrzli ekstrakcijski pufer. Zmes premešamo in ekstrahiramo za 15 min na ledu oziroma okolju pri temperaturi zraka med 0 in 4°C . Zmes večkrat premešamo in pazimo, da ne zmrzne. Zmes centrifugiramo 15 min pri 12.000 g v hlajeni centrifugi. Supernatant 'a' prenesemo v novo centrifugirko, sediment 'a' pa zavržemo. Odpipetiramo 800 μl supernatanta 'a', kateremu dodamo 600 μl raztopine prečiščenega Tritona TX-100 v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 7,3. Zmes dobro premešamo in grejemo 10 min v vodni kopeli pri temperaturi 35°C . Med gretjem zmes večkrat premešamo. Po gretju zmes centrifugiramo za 15 min pri 12.000 g. Po centrifugiranju pazljivo ločimo supernatant 'b' od sedimenta 'b', ki je zelene barve zaradi klorofila. Supernatant 'b' uporabimo, kot ekstrakt encima oziroma za spektrofotometrično

določanje polifenol oksidazne in peroksidazne aktivnosti. Potrebni reagenti: a) raztopina Triton TX-100; b) polivinilpolipirolidon (PVPP); c) metilfenilsulfonilfluorid (PMSF); d) ekstrakcijski pufer: 0,1 M fosfatni pufer pH=7,3; 1mM PMSF, 3 g PVPP/100 ml, 1,5 g Triton TX-100/ 100 ml.

3.1.2 Določanje aktivnosti encimov PPO

Metoda temelji na spektrofotometričnem spremljanju spremembe barve oziroma oksidacije substrata. Za kateholazo smo uporabili substrat 4-metil katehol medtem ko za kresolazo *p*-kresol. V 250 ml merilno bučko smo natehtali 64 mg 4-metil katehola ali 811,1 mg *p*-kresola in razredčili do oznake z 0,1 M fosfatnim pufrom, pH 7,3. Za merjenje smo uporabili 3 ml kivete za enkratno uporabo. 2,9 ml substrata smo dodali 0,1 ml encimskega ekstrakta (supernatant 'b'). Kiveto smo ročno štirikrat stresli (dol:gor) in jo takoj postavili v spektrofotometer Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio20. Spremembo absorpcije smo spremljali 5 min, pri sobni temperaturi in valovni dolžini 400 nm. Spektrofotometrični program samodejno izbere najbolj linearni del spremembe absorbance, katero poda kot $\Delta A \text{ min}^{-1}$. Reagenti: ekstrakcijski pufer: 0,1 M fosfatni pufer pH=7,3; 4-metil katehol (4-MC)...0,064g 4-MC/250 ml ekstrakcijskega pufera); *p*-kresol 0,811 g *p*-kresola/250 ml ekstrakcijskega pufera.

3.1.3 Določanje količine skupnih proteinov

Skupne proteine v vzorcih določamo po kolorimetrični metodi, ki jo navaja Shibuya in sod., (1989). Pripravili smo raztopino reagenta A (bel) (BCA protein, assay reagent A) in reagenta B (moder) (BCA protein, assay reagent B) v razmerju 20:1 (mešanica=A:B = 20:1). V ependorf epico odpipetiramo 50 μ l encimskega ekstrakta, kateremu dolijemo 950 μ l mešanice. Mešanico inkubiramo 30 min pri temperaturi 37°C. Po inkubaciji posameznemu vzorcu določimo absorbanco pri valovni dolžini 562 nm. Glede na umeritveno krivuljo med koncentracijo proteina (mg/ml) in absorbanco, na grafu ob izmerjeni absorbanci vzorca, očitamo koncentracijo proteina (mg/ml) v vzorcu. Kot encimsko enoto (EE) definiramo količino encima, ki omogoči nastanek nmol novega konjugiranega produkta ali razgradnjo substrata v min (nmol/min) oziroma količino encima, ki v eni minuti razgradi 1 nmol substrata. Dobljeno absorbanco preračunamo v koncentracijo substrata. Nato preračunamo število molov nastalega produkta ali razgrajenega substrata v reakcijski mešanici; pri spektrofotometru na 1 ml. Izračunana vrednost velja za izhodni volumen vzorca, ki smo ga dali v test. Preračunamo količino nastalega substrata, ki bi ga povzročil celoten volumen vzorca, ki ga dobimo iz testnih živali. Vrednost definiramo kot totalno encimsko aktivnost. Specifična encimska aktivnost je količnik totalne encimske aktivnosti (EE) in totalne količine proteinov (mg). Totalna količina proteinov je količina proteinov v celotnem vzorcu. Specifična encimska aktivnost je število encimskih enot, ki jih vsebuje 1 mg beljakovin v encimskem pripravku.

4 REZULTATI

4.1 Aktivnost polifenol oksidaz (PPO) v listih

Polifneol oksidaze so encimi, ki so prisotni po vsej rastlini. Znotraj skupine polifenol oksidaz smo določili aktivnost kateholaze in kresolaze z uporabo substratov, ki jih navajajo Kidron in sod. (1978). Za merjenje aktivnost kateholaze smo uporabili substrat 4 metil katehol (naprej beri 4MC), za kresolazo pa *p*-kresol. O aktivnosti PPO v listih rastlin je zelo malo znanega oziroma zapisanega.

Preglednica 3: Aktivnost kateholaze v odraslih listih vinske trte leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 3: Acitivity of cateholase in vine leaves in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Datum Date	4.6.	19.6.	28.7.	15.9.	Povprečje Average
	4 th of June	19 th of June	28 th of July	15 th of Septembre	
Obravnavanje Treatment	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein
BB	10,47±2,50	14,76±3,17	7,36±1,32	15,60±2,54	12,93±1,34
IPG	9,30±1,68	9,20±2,32	9,09±2,13	15,54±1,20	12,04±1,12
K	10,40±1,91	8,75±1,30	9,34±1,94	16,63±2,46	11,62±1,13
Povprečje (Average)	10,05±1,11	13,62±1,77	9,37±1,04	15,92±1,20	

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

Povprečna aktivnost kateholaze v listih vinske trte v rastni dobi vinske trte je bila, ne glede na obravnavanje med 11,62 in 12,93 EE/mg proteina. Pri prvem in drugem vzorčenju smo največjo aktivnost kateholaze določili pri obravnavanju BB, pri tretjem in četrtem merjenju, pa pri kontroli oziroma obravnavanju IPG. Pri ugotavljanju povprečne aktivnosti po obravnavanjih, glede na vse meritve se je največja aktivnost kateholaze pokazala pri obravnavanju BB, sledi obravnavanje IPG in nazadnje kontrola. Največja povprečna aktivnost kateholaze je bila v času fenofaze 'jagode velikosti graha', v času zorenja se je aktivnost zmanjšala, kasneje pa spet povečala. Kljub tendenci večanja aktivnosti kateholaze z večanjem števila aplikacij z bakrovimi spojinami na liste vinske trte se med obravnavanji niso pokazale statistično značilne razlike, zato sklepamo, da dane količine bakrovih spojin ne vplivajo na aktivnost kateholaze v listih v taki meri, da bi bile le-te statistično značilne.

Preglednica 4: Aktivnost kresolaze v odraslih listih vinske trte leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 4: Acitivity of cresolase in vine leaves in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Datum Date	4.6.	19.6.	28.7.	15.9.	Povprečje Average
	4 th of June	19 th of June	28 th of July	15 th of Septembre	
Obravnavanje Treatment	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein
BB	88,10±17,90	98,68±27,24	138,01±36,84	183,96±62,78	127,19±36,19
IPG	72,56±21,72	114,59±17,23	110,19±28,50	129,88±60,23	106,81±31,92
K	57,98±16,92	130,13±17,99	143,17±41,48	93,99±31,55	106,32±26,99
Povprečje (Average)	72,88±18,85	114,47±20,82	130,46±35,61	135,94±51,52	

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

Povprečna aktivnost kresolaze v listih preko rastne dobe je bila, ne glede na vzorčenje med 106,32 in 127,19 EE/mg proteina. Povprečna aktivnost kresolaze je bila, glede na obravnavanja največja 127,19 EE/mg proteina pri obravnavanju BB, sledi IPG z 106,81 EE/mg proteina in najmanjša aktivnost 106,32 EE/mg proteina pri kontroli. V nobenem od navedenih primerov se v aktivnosti kresolaze med obravnavanji niso pokazale statistično značilne razlike. Povprečna aktivnost kresolaze se med rastno dobo spreminja, saj smo največjo aktivnost določili, enako

kot za aktivnost kateholaze pri fenofazi 'jagode velikosti graha', najmanjšo aktivnost pa v času trgatve. Glede na uporabo navedenih substratov smo v listih določili večjo aktivnost kresolaze, kot pa kateholaze, čeprav Interesse in sod. (1984), Sanchez-Ferrer in sod. (1988) in Valero in sod. (1988) navajajo, da je aktivnost kateholaze večja od aktivnosti kresolaze. Iz navedenih podatkov (preglednici 28, 29) sklepamo, da uporaba bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost PPO v listih v taki meri, da bi se med obravnavanji pojavile statistično značilne razlike, čeprav se pri obravnavanjih z apliciranimi bakrovimi spojinami pokaže večja aktivnost. Večkratna uporaba bakrovih spojin v času raste vinske trte ne vpliva na aktivnost PPO v listih v taki meri, da bi morali število aplikacij bakrenih pripravkov zmanjšati oziroma omejiti, čeprav je še vpliv le-teh na delovanje PPO v celicah precej neznan.

4.2 Aktivnost polifenol oksidaz (PPO) v vršičkih

V prvih fenofazah rasti vinske trte smo določili aktivnost PPO v vršičkih. Ker moramo pri določeni razvojni fazi mladike prikrajševati, smo aktivnost PPO v vršičkih lahko določili samo dvakrat, zato lahko primerjamo samo obravnavanje BB in kontrolo.

Preglednica 5: Aktivnost kateholaze v vršičkih vinske trte leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 5: Acitivity of cateholase in shoot tips of vine in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Datum Date	4.6. 4 th of June	19.6. 19 th of June	Povprečje Average
Obravnavanje Treatment	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein
BB	152,39±32,49	14,76±3,17	83,58±17,83
K	125,37±22,46	8,75±1,30	67,06±11,88
Povprečje (Average)	138,88±27,48	11,76±2,24	

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

Pri določanju aktivnosti kateholaze v vršičkih smo pri prvem vzorčenju, ne glede na obravnavanje določili povprečno aktivnost kateholaze 138,9 EE/mg proteina. Po aplikaciji bakrovih spojin oziroma ob drugem vzorčenju smo določili največjo povprečno aktivnost kateholaze 14,76 EE/mg proteina pri obravnavanju BB, manjšo 8,75 EE/mg proteina, pa pri kontroli. Ob drugem vzorčenju je bila aktivnost kateholaze v vršičkih precej manjša, glede na aktivnost pri prvem vzorčenju, zato sklepamo, da se aktivnost kateholaze v vršičku v rastni dobi spreminja. V vršičkih je aktivnost kateholaze, glede na aktivnost encima v listih večja, kar pripisujemo rastnemu potencialu oziroma hitrim spremembam vršička. Glede na podatke v preglednici 30 sklepamo, da bakrove spojine v določeni meri vplivajo na aktivnost kateholaze v vršičkih, čeprav ne toliko, da bi se med obravnavanji pokazale statistično značilne razlike.

Preglednica 6: Aktivnost kresolaze v vršičkih vinske trte leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 6: Acitivity of cresolase in shoot tips of vine in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Datum Date	4.6. 4 th of June	19.6. 19 th of June	Povprečje Average
Obravnavanje Treatment	EE/mg protein	EE/mg protein	EE/mg protein
BB	88,37±31,93	98,68±27,24	93,53±29,59
K	87,04±17,20	130,13±17,99	108,59±17,60
Povprečje (Average)	87,71±24,57	114,41±22,62	

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

Aktivnost kresolaze v vršičkih je nekoliko manjša od aktivnosti kresolaze v listih vinske trte. Povprečna aktivnost kresolaze je bila, ne glede na obravnavanja 87,71 EE/mg proteina. Največjo povprečno aktivnost kresolaze 130,13 EE/mg proteina smo določili pri kontroli, najmanjšo 98,68 EE/mg proteina pa pri obravnavanju BB ob vzorčenju po tretiranju z bakrovimi spojinami. Razlike v aktivnosti kresolaze med obravnavanji niso bile statistično značilne, zato sklepamo, da bakrove spojine ne vplivajo na aktivnost kresolaze v vršičkih. Pri primerjavi aktivnosti kateholaze in kresolaze v vršičkih med obravnavanji vidimo, da je bila aktivnost kresolaze večja po uporabi bakrovih spojin, medtem ko se je aktivnost kateholaze ob drugem vzorčenju zmanjšala. Uporaba bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost PPO v vršičkih v toliki meri, da bi se med obravnavanji pokazale statistično značilne razlike.

4.3 Aktivnost polifenol oksidaz (PPO) v zelenih jagodah

Kidron in sod. (1978) in Macheix in sod. (1991) navajajo, da se aktivnost PPO med zorenjem različno spreminja. Skušali smo ugotoviti odziv encimov PPO na foliarno uporabo bakrovih spojin. V času fenofaze 'jagode velikosti graha' smo določili aktivnost PPO v zelenih jagodah. Ker takrat obravnavanje IPG še ni bilo izvedeno, lahko primerjamo samo obravnavanji BB in kontrolo.

Preglednica 7: Aktivnost PPO v zelenih jagodah vinske trte leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 7: The PPO acitivity in green berries in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Obravnavanje Treatment	Encim Enzyme	Kateholaza Cateholase	Kresolaza Cresolase
		EE/mg protein	EE/mg protein
BB		1,91±0,38	828,21±37,80
K		1,30±0,49	687,82±107,13

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

Tudi v zelenih jagodah, tako kot v listih smo določili večjo povprečno aktivnosti kresolaze, kot pa kateholaze. Povprečna aktivnost kateholaze v zelenih jagodah je bila med 1,30 in 1,91 EE/mg proteina. Največjo povprečno aktivnost kateholaze 1,91 EE/mg proteina smo določili pri obravnavanju BB, manjšo pa pri kontroli 1,30

EE/mg proteina. Enako razmerje aktivnosti se je pokazalo tudi pri kresolazi, saj smo največjo aktivnost 828,2 EE/mg proteina določili pri obravnavanju BB, najmanjšo 687,8 EE/mg proteina pa pri kontroli. V nobenem od navedenih primerov se med obravnavanju v aktivnosti PPO niso pokazale statistično značilne razlike, zato sklepamo, da uporaba bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost PPO v zelenih jagodah, čeprav je povprečna aktivnost PPO pri obravnavanjih tretiranih z bakrovimi spojinami večja od kontrole.

Aktivnost obeh encimov smo spremljali še v nadaljevanju zorenja grozdja.

4.4 Aktivnost polifenol oksidaz (PPO) v zrelih jagodah

Tudi v času tehnološke zrelosti grozdja smo določili večjo aktivnost kresolaze, kot aktivnost kateholaze. De Piero Troiani in sod. (2003) navajajo, da je aktivnost PPO odvisna od sorte in da je aktivnost PPO v soku grozdja v povprečju med 48,6 in 100,2 $\Delta A/\text{min}/100\text{g}$.

Preglednica 8: Aktivnost PPO v moštu grozdja ob tehnološke zrelosti leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 8: The PPO acitivity in must of grape at pre-ripe time in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Obravnavanje Treatment	Encim Enzyme	Kateholaza Cateholase	Kresolaza Cresolase
		EE/mg protein	EE/mg protein
BB		33,51±3,36	379,12±85,00
IPG		27,44±2,73	341,85±65,55
K		34,67±2,36	342,37±102,30

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

V povprečju je bila aktivnost kateholaze, ne glede na obravnavanja v moštu med 27,44 in 34,67 EE/mg proteina. V moštu kontrole smo določili največjo aktivnost 34,7 EE/mg proteina, medtem ko najmanjšo aktivnost 33,5 EE/mg proteina pri obravnavanju IPG. Povprečna aktivnost kresolaze v moštu je bila med 342,4 in 379,1 EE/mg proteina. S primerjavo aktivnosti PPO po sortah, ki jih navajajo De Pieri Troiani in sod. (2003) smo v našem poskusu dobili manjše aktivnosti PPO v moštu grozdja, ne glede na obravnavanje. Razloge lahko iščemo v lastnostih sorte in v času, terminu vzorčenja grozdja, kot jih navajajo Macheix in sod. (1991). Pri primerjavi aktivnosti PPO v grozdju med fenofazo 'jagode velikosti graha' ter grozdju tehnološke zrelosti vidimo, da se je aktivnost kresolaze povečala, medtem ko se je aktivnost kresolaze zmanjšala. Kidron in sod. (1978), Nakamura in sod. (1984) in Macheix in sod. (1991) navajajo, da je aktivnost kateholaze največja v času začetka zorenja grozdja in z zorenjem grozdja naj bi se aktivnost zmanjšala. Navedenim aktivnostim encimov, kot jih navajajo avtorji je sledila samo kresolaza, ne pa kateholaza.

Zanimalo nas je, kako se aktivnost posameznega encima spreminja v nadaljevanju zorenja grozdja in sicer vse tja do polne zrelosti grozdja, saj Wissemann in Lee

(1980) navajata, da je aktivnost fenol oksidaze največje od konca avgusta do začetka oktobra.

Preglednica 9: Aktivnost PPO v moštu grozdja ob polni zrelosti leta 2003. Podatki predstavljajo povprečja s standardno napako, dvosmerna ANOVA.

Table 9: The PPO acitivity in must og grape at post-ripe time in the year 2003. Means and standard errors are presented, two-way ANOVA.

Obravnavanje Treatment	Encim Enzyme	Kateholaza Cateholase	Kresolaza Cresolase
		EE/mg protein	EE/mg protein
BB		14,94±3,98	292,96±80,66
IPG		17,05±3,89	333,59±76,51
K		14,80±5,53	280,49±97,88

EE/mg protein - specifična aktivnost encima (encimske enote na miligram proteina)

V času polne zrelosti grozdja smo v moštu določili povprečno aktivnost kateholaze med 14,80 in 17,05 EE/mg proteina. Največjo povprečno aktivnost kateholaze smo določili pri obravnavanju IPG. Med obravnavanji se v aktivnosti kateholaze niso pokazale statistično značilne razlike, zato sklepamo, da količina apliciranih bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost kateholaze v moštu v času polne zrelosti grozdja. Povprečna aktivnost kresolaze v moštu je bila v času polne zrelosti med 280,5 in 333,6 EE/mg proteina. Največjo povprečno aktivnost kresolaze smo določili pri obravnavanju IPG, sledi obravnavanje BB in kot zadnja kontrola.

Glede na primerjavo aktivnosti PPO v grozdju ob tehnološki zrelosti se je v polni zrelosti v povprečju aktivnost zmanjšala. Razloge lahko iščemo v procesu zorenja grozdja, kot navajata Traverso in Singleton (1973). V nobenem navedenem primeru se med obravnavanji niso pokazale statistično značilne razlike v aktivnosti PPO v moštu ob polni zrelosti grozdja, zato sklepamo, da uporaba bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost PPO v grozdju ob polni zrelosti, čeprav se je pokazala nekoliko večja aktivnost PPO pri obravnavanjih, kjer so bile med zorenjem grozdja uporabljene bakrove spojine. Poznavanje aktivnosti PPO v grozdju je pomembno, saj jo Joslyn in Ponting (1951) in Matheis (1983) povezujejo z oksidacijo in napakami mošta. Ker je kakovost vina neposredno odvisna od kakovosti mošta je pomembno, da poznamo njegove biokemijske lastnosti, ki jih določajo tudi ogljikovi hidrati in organske kisline.

5 ZAKLJUČEK

Vpliv bakrovih spojin na aktivnost kresolaze in kateholaze v listih vinske trte je neznatn, saj se med obravnavanji niso pokazale statistično značilne razlike. Največjo povprečno aktivnost PPO smo določili pri obravnavanju z največjim številom foliarnih aplikacij, najmanjšo pa pri kontroli. Aktivnost PPO v listih se v času rastne dobe spreminja, saj smo največjo aktivnost PPO določili ob fenofazi 'jagode velikosti graha', najmanjšo pa v času zorenja grozdja oziroma ob trgatvi. Večkratna aplikacija bakrovih spojin ne vpliva na aktivnost kresolaze in kateholaze v vršičkih vinske trte. Med obravnavanji se v aktivnosti PPO niso pokazale statistično značilne razlike, čeprav je bila aktivnost kateholaze nekoliko večja pri obravnavanju z večkratno

aplikacijo bakrovih spojin, medtem ko je največja aktivnost kresolaze pri kontroli. Pri zorenju grozdja se aktivnost PPO spreminja. Največjo aktivnost PPO smo določili v fenofazi 'jagode velikosti graha'. Pri foliarni uporabi bakrovih spojin se povprečna aktivnost PPO statistično ne razlikuje od kontrole, zato sklepamo, da ob dani fenofazi bakrove spojine ne vplivajo na aktivnost PPO. V nadaljevanju zorenja, v času tehnološke zrelosti grozdja se aktivnost PPO zmanjšuje. V povprečni aktivnosti PPO se med obravnavanji niso pokazale statistično značilne razlike, čeprav smo največjo aktivnost tako kateholaze, kot kresolaze določili pri kontroli, najmanjšo pa pri obravnavanju z enkratno aplikacijo bakrovih spojin. V polni zrelosti grozdja smo določili manjšo povprečno aktivnost kateholaze in večjo povprečno aktivnost kresolaze. Med obravnavanji se v povprečni aktivnosti PPO niso pokazale statistično značilne razlike, čeprav smo največjo povprečno aktivnost kresolaze določili pri obravnavanju z enkratno aplikacijo bakrovih spojin, najmanjšo pa pri kontroli. Glede na ugotovitve sklepamo, da preiskušene foliarne aplikacije bakrovih spojin ne vplivajo na povprečno aktivnost PPO v času zorenja in zrelosti grozdja.

6 VIRI

- De Pieri Troiani E., Tropiani C.T., Clemente E. 2003. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). *Scienc. agrotec. Lavras*, 27: 635-642.
- Donko M. 2001. Indukcija oksidoreduktaz v listih paradižnika z metil jasmonatom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 114 str.
- Droppa M., Horvath G. 1990. The role of Cu in photosynthesis. *Critical Review of Plant Science*, 9 (2): 111-124.
- Escribano J., Cabanes J., Garcia-Carmona F. 1997. Characterisation of latent polyphenol oxidase in table beat: Effect of sodium dodecyl sulphate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 1: 34-38.
- Espin J.C., Trujano M.F., Tudela J., Garcia-Canovas F. 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4: 1091-1096.
- Hammer F.E. 1993. Oxidoreductases. V: *Enzymes in food processing*. 3rd ed. Nagodawithana T., Reed G. (eds.). San Diego, Academic Press: 221-277.
- Harel E., Mayer A.M. 1971. Partial purification and properties of catechol oxidase in grapes. *Phytochemistry*, 10: 17-22.
- Harel E., Mayer A.M., Lehman E. 1973. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phytochemistry*, 12: 2649-2654.
- Hooper R. L., Collins G. G., Rankine B. C. 1985. Catecholase Activity in Australian White Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 203-206.
- Hunt M.D., Eannetta N.T., Yu H., Newman S.M., Steffens J.C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 21: 59-68.
- Interesse F.S., Alloggio V., Lamparelli F., Davella G. 1984. Characterization of the oxidative enzymatic system of the phenolic compounds from Muscat grapes. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 17: 5-11.

- Joslyn M.A., Ponting J.D. 1951. Enzyme catalyzed oxidative browning of fruit products. *Advise of Food Research*, 3: 1-10.
- Kidron M., Harel E., Mayer A.M. 1978. Catechol oxidase activity in grape and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29: 30-34.
- Macheix J.J., Sapis J.C., Fleuriet A. 1991. Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase in Relation to Browning in Grape and Wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30: 441-486.
- Martinez M.V., Whitaker J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 6: 195-200.
- Matheis G. Enzymatic browning of foods. 1983. Quantitative relationships between browning and food constituents. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 176: 454-463.
- Mayer A.M., Harel E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.
- Montedoro G. 1969. Ricerche sulla polifenolossidasi dell uve. I. Distribuzione ed evoluzione dell'attività enzimatica del frutto di diverse cultivars. *Ind. Agrar.*, 7: 197-203.
- Nakamura K., Amano Y., Kagami M. 1984. Comparison of polyphenol oxidase in 'Normal' and 'Ajinashi' berries of Koshu grapes. *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.*, 19: 7-11.
- Nakanishi K., Makino S., Yokotsuka K. 1987. Changes in polyphenol oxidase activity and must components during fruit maturation. *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.*, 22: 1-6.
- Ryan J.D., Gregory P., Tingey W.M. 1982. Phenolic oxidase activities in glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Phytochemistry*, 21, 8: 1885-1887.
- Sanchez F.A., Bru R., Cabanes J., Garcia C.F. 1988. Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 27: 319-321.
- Sandmann G., Böger P. 1983. The enzymatological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants. V: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, 15A: 563-596 str.
- Sapis J.C., Macheix J.J., Cordonneir R.E. 1983. The browning capacity of grape. I. Changes in polyphenoloxidase activities during development and maturation of fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31: 342-348.
- Shibuya T., Watanabe Y., Nalley K.A., Fusco A., Salafsky B. 1989. The BCA protein determination system: An analysis of several buffers, incubation temperature and protein standards. *Journal of Tokyo Middle College* 47 (4): 677-682.
- Singleton V.L., Kramling T.E. 1976. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27: 157-163.
- Traverso-Rueda S., Singleton V.L. 1973. Catecholase activity in grape juice and its implications in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24: 103-108.
- Valero E., Valero R., Garcia-Carmona F. 1988. Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *Journal of Food Science*, 53: 1482-1490.
- Valero E., Sanchez-Ferrer A., Varon R., Garcia-Carmona. 1989. Evolution of grape polyphenol oxidase activity and phenolic content during maturation and vinification. *Vitis*, 28: 85-91.
- Walker J.R.L., Ferrar P.H. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15: 457-498.

Wissemann K.W., Lee C.Y. 1980. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. American Journal of Enology and Viticulture, 31: 206-611.