

MEETOD POLÜFENOOLOKSÜDAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMISEKS TAIMMATERJALIS

U. MARGNA

Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramiseks taimsetes kudedes kasutatakse sageli meetodeid, mis põhinevad askorbiinhappe fermentatiivse oksüdatsiooni intensiivsuse astme määramisel pürokatehiini kui polüfenooloksüdaasi spetsiifilise substraadi juuresolekul. Fermendi aktiivsust väljendab selles reaktsioonis oksüdeeritud askorbiinhappe hulk. Tähendatud printsipi kasutas esimesena Sreerangachar (1943). Hiljem on sama ideed rakendanud ka mõned teised autorid iseseisvate variantmeetodite väljatöötamisel. Neist on meil sagedamini kasutatavaks Mihlini ja Bronovitskaja mikromeetod (Михлин, Броновицкая, 1949), mis on sisse võetud Jermakovi ja tema kaasautorite koostatud taimebiokeemia käsiraamatusse (Ермаков jt., 1952). Nimetatud meetodiga määratakse aga ainult polüfenooloksüdaasi vees lahustuv osa. Arvestamata jääb selle fermendi vees mittelahustuv fraktsioon, mis kirjanduse andmeil hõlmab suurema osa polüfenooloksüdaasi üldisest aktiivsusest kudedes. Näiteks teepõõsa lehtede polüfenooloksüdaasist on Bokutšava ja Šuberti (Бокучава, Шуберт, 1950) ning Popovi (Попов, 1958) andmetel ekstraheeritav keskmiselt ainult 15%, kusjuures taime erinevate füsioloogiliste seisundite puhul võib polüfenooloksüdaasi fraktsioonide vahekorrd tunduvalt muutuda, lahustuv fraktsioon aga ka hoopiski puududa. Seda kinnitavad ka käesoleva artikli autori tähelepanekud ploomi, kreegi, toominga ja ristiku lehtede polüfenooloksüdaaside kohta, mis samuti osutusid real juhtudel vees lahustumatuks. Andmeid polüfenooloksüdaasi lahustuva ja mittelahustuva fraktsiooni vahekorrdi kohta mõningates teistes taimedes esitasid Povolotskaja ja Sedenko (Поволоцкая, Седенко, 1955). Li ja Bonner (1947) näitasid, et polüfenooloksüdaas on tugevasti adsorbeerunud kloroplastide struktuurilistele elementidele, mistõttu ta on ainult vähesel määral ekstraheeritav.

Oigema pildi polüfenooloksüdaasi üldisest aktiivsusest kudedes võimaldab saada Povolotskaja ja Sedenko esitatud meetod, kus ekstraktide asemel kasutatakse taimmaterjalist valmistatud suspensioone (Поволоцкая, Седенко, 1955). Selle meetodi rakendamist takistab aga asjaolu, et suspensioonid pole täpselt doseeritavad, mistõttu meetod on ebatäpne.

Käesolevas artiklis esitatakse uus variantmeetod polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramiseks taimsetes kudedes, mis üldnimetatud meetoditega võrreldes pretendeerib suuremale täpsusele ja objektiivsusele. Kõige tähtsamaks uuenduseks selles meetodis on atsetoonpreparaatide (s. o. atsetooniga töödeldud taimmaterjali) kasutamine analüüside tegemiseks. Atsetooniga käsitlemisel eemaldub materjalist suurem osa polüfenoole ja tanniinitaolisi ühendeid, mis ekstraktide ja suspensioonide kasutamisel võisid fermendi aktiivsuse määramist segada. Atsetoonpreparaat iseloomustab antud koe polüfenooloksüdaasi kõikide fraktsioonide summaarset aktiivsust (Li, Bonner, 1947; Бокучава, Шуберт, 1950). Askorbiinhappe tiitrimiseks kasutatakse esitatud meetodis kaaliumjodaadilahust. Meetod on eriti kohane suurte seeriaviisiliste ja võrdlevate analüüside tegemiseks ning ta on kasutatav igas laboratooriumis.

Atsetoonpreparaadi valmistamine ja omadused

Värske taimmaterjal lõigatakse kääridega võimalikult peeneks ning hõõrutakse uhmris veevaba atsetooni all pulbriks, atsetooni korduvalt vahetades. Preparaadi valmistamiseks piisab tavaliselt 5—6-kordsest atsetooni vahetamisest. Valmistamise käigus preparaadilt eemaldatavad atsetooni hulgad valatakse filtrile ning sinna sattunud pulbriosakesed ühendatakse hiljem pulbri põhimassiga. Parimaks kriteeriumiks, kunas atsetooni lisamise võib lõpetada, on moment, millal materjalist on suurem osa klorofülli välja ekstraheeritud ja uued atsetooni kvantumid enam rohelisteks ei värvu. Saadav preparaat ehk nn. atsetoonpreparaat on praktiliselt veevaba, enamasti heleda-värvuline pulber. Preparaadi polüfenooloksüdaasne aktiivsus püsib tema säilitamisel veevaba atsetooni all 0° C temperatuuris enamikul juhtudel vähemalt 3—4 ööpäeva muutumatuna. Sellest piisab täielikult ka kõige mahukamate võrdluskatsete tegemiseks. Mitmesugustest objektidest valmistatud atsetoonpreparaatide suurt stabiilsust illustreerivad tabelis 1 esitatud andmed.

Tabel 1

Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse muutumine atsetoonpreparaadi säilitamisel 0° C juures veevaba atsetooni all (ekspositsiooniaeg 2 min.; pH = 7,21)

Objekt	Fermendi aktiivsus 0,01 n KJO ₃ ml-tes 1 g atsetoonpreparaadi kohta				
	Valmistamis-momendil	24 t. pärast	%-des algaktiiv-susest	96 t. pärast	%-des algaktiiv-susest
Toominga lehed	11,7	11,5	98,3	11,6	99,1
Kartuli lehed	13,8	13,8	100	11,9	86,2
Ploomi lehed	7,9	8,0	101,3	7,9	100
Nõgese lehed	44,3	44,4	100,2	44,4	100,2
Enela lehed	17,8	17,7	99,4	18,1	101,7
Lepa lehed	24,0	24,0	100	23,8	99,2
Saialille lehed	4,4	4,4	100	4,4	100
Sireli lehed	58,1	58,2	100,2	58,1	100
Saare lehed	46,5	46,5	100	46,3	99,6
Ristiku lehed	27,2	27,2	100	27,0	99,3

Edasised manipulatsioonid atsetoonpreparaadiga sõltuvad selle peensusastmest ja aktiivsusest. Kui preparaadi aktiivsus on suhteliselt madal ning ta ise on ühtlane peen pulber, milles silmaga nähtavaid koelemente pole võimalik eristada, siis ei valmista täpne doseerimine raskusi ning atsetoonpreparaati võib polüfenooloksüdaasi määramiseks kasutada vahetult sellisena. See on võimalik siiski ainult üksikutel juhtudel. Tavaliselt tuleb preparaadi kasutatavamaks muutmiseks teda kindlates vahetades «lahjendada» mõne indiferentse pulbriga ning alles siis fermendi määramiseks tarvitusele võtta. Kõige paremini sobivad selleks mineraalse päritoluga pulbrid, näit. alumiiniumoksüüd või talk.

Atsetoonpreparaadi «lahjendamisega» saavutatakse kaks eesmärki. Esiteks, «lahjenduste» e. trituraatide üks kaaluühik sisaldab suhteliselt vähem atsetoonpreparaati ja vastavalt sellele on suhteliselt madalam ka polüfenooloksüdaasi aktiivsus, mistõttu määramisel võib kasutada suuremaid kaalutisi. Teiseks, algpreparaadi tritureerimisel mineraalse pulbriga peenestuvad kõik seni terveks jäänud koosakesed ja saadakse täiesti ühtlane, kõrge peensusastmega, hästidoseeritav pulber. Mõlemad faktorid on olulise tähtsusega kogu meetodi täpsuse suurendamisel. Seepärast on üldse kõikidele juhtudel soovitatav atsetoonpreparaatide asemel kasutada nende trituraate.

Polüfenooloksüdaasi määramise tingimused

Määramised viiakse läbi toatemperatuuris, 17—23° C juures, jälgides, et ka kasutatavate reaktiivide t^o ei ületaks neid piire. Ekspositsioonajaks võib valida 1—5 minutit, kuid parem on kasutada lühikesi, 1—2 minuti pikkusi intervalle. Võrdlevates uurimistöodes tuleb fermenti toime aktiivsust mõõta kogu aeg samas ajavahemikus. Fermenti ja substraadi kontakti soodustamiseks segatakse või loksutatakse reaktsiooniseгу pidevalt.

Oluline on, et määramised toimuksid uuritavale objektile optimaalse pH juures. Erinevatest taimedest ja taimeorganitest pärinevate polüfenooloksüdaaside toime optimum võib olla täiesti erinevates pH piirkondades. Selle kohta toovad arvukaid näiteid Povolotskaja ja Sedenko (Поволоцкая, Седенко, 1955), samuti Bokutšava ja Subert (Бокучава, Шуберт, 1950). Seetõttu pole õigustatud ühe kindla pH kasutamine eranditult kõikide taimede puhul. Sobiv pH tuleb iga uue objekti korral eelkatsetega kindlaks määrata. Kui seda pole võimalik teha, on soovitatav määramised läbi viia kas neutraalses, nõrgalt leeliseses või nõrgalt happelises keskkonnas, s. o. pH intervallis 6,0—8,0. Selles vahemikus on polüfenooloksüdaasi aktiivsus enamikul juhtudel piisavalt kõrge. Teine võimalus on määrata polüfenooloksüdaasi aktiivsus paralleelselt kahe või mitme pH väärtuse juures.

Allpool esitatakse meetodi kasutamise üksikasjalik kirjeldus.

Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramise käik

Käsikaaludel kaalutakse väikesesse keeduklaasi adekvaatne hulk (mitte alla 50 mg) kindlas vahekorras valmistatud atsetoonpreparaadi trituraati ja valatakse üle 10 ml vastava pH-lise tsitraat-fosfaat-puhverlahusega. Lisatakse 2 ml värskest valmistatud 0,2%-list askorbiinhappelahust ja 1 ml samuti värskest valmistatud 0,5%-list pürokatehiinilahust. Loksutatakse 2 minutit (või mõni teine valitud ajavahemik), mille järel fermenti toime katkestatakse 2 ml 10%-lise väävelhappe lisamisega. Seejärel lisatakse reaktsiooniseгusse mõned kristallid kaaliumjodiidi, 5 tilka 1%-list tärgliselahust ja oksüdeerimata jäänud askorbiinhape tiitritakse mikrobüretist 0,01 n kaaliumjodaadilahusega kuni püsiva sinise värvuse tekkimiseni. Niisuguseid paralleelmääramisi tehakse ühest preparaadist kas viis või rohkem, kuid mitte alla kolme, lugedes lõpptagajärjeks paralleelkatsete tulemuste keskmise. Samaaegselt viiakse läbi kontrollkatsed, s. o. määratakse kindlaks, kui palju 0,01 n kaaliumjodaadilahust kulub 2 ml 0,2%-lise askorbiinhappelahuse tiitrimiseks, kui fermenti toime on välistatud.

Kontrollkatsed viiakse üldreeglina läbi põhikatsetega samades tingimustes, ainult selle vahega, et nüüd inaktiveeritakse ferment tugeva happega juba enne askorbiinhappe- ning pürokatehiinilahuse lisamist. Spetsiaalproovid on aga näidanud, et käesolevas meetodis pole kontrollkatsete läbiviimisel põhieeskirja tingimusi vaja täpselt järgida ning et inaktiveeritud fermentpreparaadi juuresolekuta, samuti loksutamisetä saadakse samad tulemused. Seetõttu määratakse 2 ml 0,2%-lise askorbiinhappelahuse tiitrimiseks kuluv 0,01 n kaaliumjodaadilahuse hulk vahetult segus, mis koosneb 10 ml puhverlahusest, 2 ml 0,2%-lisest askorbiinhappelahusest, 1 ml 0,5%-lisest pürokatehiinilahusest ja 2 ml 10%-lisest väävelhappelahusest, lisades enne tiitrimist mõne kristalli kaaliumjodiidi ning 5 tilka tärgliselahust.

Polüfenooloksüdaasi aktiivsust iseloomustab kontrollkatsete ja põhikatsete keskmiste vahe, mis näitab, mitu ml 0,01 n kaaliumjodaadilahust kuluks polüfenooloksüdaasi poolt oksüdeeritud askorbiinhappe hulga tiitrimiseks. Tulemus väljendatakse kas 0,01 n kaaliumjodaadilahuse ml-tes või askorbiinhappe mg-des 1 g atsetoonpreparaadi (mitte trituraadi!) kohta, pidades meeles, et 1 ml 0,01 n kaaliumjodaadilahusele vastab 0,88 mg askorbiinhapet.

Meetodi viga

Üksikmääramiste absoluutset viga iseloomustab katseseeria tulemuste põhjal välja arvutatud standardhälve s ja suhtelist viga viimase suhe seeria keskväärtusesse \bar{x} , väljendatuna protsentides. Nimetatud suurused leiti 50-ne 5—10 paralleelkatses koosneva seeria jaoks. Nende tulemuste põhjal arvutati välja meetodi keskmine absoluutne viga s_k , kasutades selleks alljärgnevat valemit:

$$s_k = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1) + \dots + s_k^2(n_k - 1)}{N - k}}$$

kus s_1^2, s_2^2, \dots on individuaalseeriade dispersioonid, n_1, n_2, \dots paralleelkatsete arvud individuaalseeriates, k — individuaalseeriade arv, ja N — üksikmääramiste koguarv kõigis k individuaalseeriais kokku (Weber, 1957). Meetodi keskmine suhteline viga V_k leiti geomeetrilise keskmisena individuaalseeriade suhtelistest vigadest.

Saadud tulemused on esitatud tabelis 2.

Tabel 2

Atsetoonpreparaadil põhineva polüfenooloksüdaasi aktiivsuse määramise meetodi keskmine absoluutne ja keskmine suhteline viga (vastavalt s_k ja V_k)

Keskmine viga	Polüfenooloksüdaasi aktiivsus 0,01 n KJO ₃ ml-tes määramiseks võetud kaalutises			
	kuni 1,0 ml	1,0—1,5	1,5—2,0	üle 2,0
s_k (ml)	0,014	0,029	0,056	0,090
V_k (%)	1,58	1,94	2,77	3,32

Tabeli andmetest nähtub, et meetodi viga ja seega ka täpsus sõltub määramiseks võetava proovi polüfenooloksüdaasest aktiivsusest. Aktiivsuse suurenemisel suureneb ka viga ja vastavalt väheneb täpsus. Siit tuleneb praktiline järeldus: atsetoonpreparaadi «lahjendamisel» alumiiniumoksidiga tuleb valida selline vahekord, et fermendi aktiivsus määramiseks võetavas trituraadi kaalutises ei ületaks 1,0—1,5 ml 0,01 n kaaliumjodaadilahust. Sellisel juhul ei ole tulemuste suhteline viga mitte suurem kui 2%. Võrdluseks olgu nimetatud, et maksimaalse täpsuse korral, mida mikrobürettide kasutamisega on võimalik saavutada, on suhteline viga ca 1,5%.

Nagu ülaltoodust selgub, võimaldab kirjeldatud meetod sobivalt valitud tingimustes määrata polüfenooloksüdaasi aktiivsuse suure täpsusega. Peamisteks faktoriteks, mis seda soodustavad, on atsetoonpreparaadi stabiilsus ja tema trituraatide hea doseeritavus, aga samuti tiitrimine kaaliumjodaadilahusega. Atsetoonpreparaadiga on kerge teha suur hulk paralleelmääramisi. Kõrvuti polüfenooloksüdaasi üldaktiivsusega on vajaduse korral võimalik määrata ka tema üksikute fraktsioonide aktiivsus. Meetodi rakendamine on lihtne ja võtab vähe aega. Kõik see loob soodsad eeldused selle meetodi kasutamiseks seeriaviisilistel määramistel.

Õigete ja omavahel võrreldavate tulemuste saavutamiseks peab aga meetodi kasutamisel silmas pidama järgmisi asjaolusid:

1) Võrdlevatel määramistel tuleb kogu aeg kasutada kas ainult atsetoonpreparaate või ainult atsetoonpreparaatide trituraate. Preparaadi tritureerimisel alumiiniumoksidiga peenestuvad kõik seni terveks jäänud osakesed. Seetõttu pääseb substraadiga vahetusse kontakti ka see fermendi osa, mis on adsorbeerunud koeosakeste sisemistele struktuurielementidele ja mis enne võis reaktsiooni toimumise sfäärist kõrvale jääda. Sel põhjusel on üks kaaluühik atsetoonpreparaati trituraadis enamasti suurema aktiivsusega kui sama kaaluühik tritureerimata preparaati.

2) Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse suurenemine (vähenemine) ei kulge lineaarselt määramiseks võetava kaalutise suurenemisega (vähenemisega). Seda illustreerib tabel 3.

Tabel 3

Polüfenooloksüdaasi aktiivsuse sõltuvus määramiseks võetava kaalutise suurusest (trituraat 1:10; pH = 7,21; ekspositsiooniaeg 2 min.)

	Atsetoonpreparaadi hulk mg-des				
	25	20	15	10	5
Aktiivsus 0,01 n KJO ₃ ml-tes 1 g atset. prep. kohta	87,7	88,4	93,5	96,5	99,2
%-des	100	100,8	106,6	110,0	113,1

Seepärast tuleb võrdlevates uurimistöodes alati kasutada samas vahekorras valmistatud atsetoonpreparaatide trituraate ning määramiseks võetav trituraadi kaalutis peab olema alati sama.

3) Kirjanduse andmeil esineb looduses mitu polüfenooloksüdaasi vormi (Sisler, Evans, 1958; Попов, 1960), mis erinevad üksteisest substraadi spetsiifilisuse poolest. Kõige tavalisem neist on orto-polüfenooloksüdaas, mis on aktiivne orto-fenoolseid grupeeringuid sisaldavate ühendite suhtes. Harvemini esinevad meta-polüfenooloksüdaas (Neufeld jt., 1958) ja para-polüfenooloksüdaas (Смирнов, Пшенова, 1941), mille substraatideks on vastavalt meta- või para-fenoolseid rühmi sisaldavad ühendid. Käesoleva meetodiga, mis baseerub pürokatehiini kui substraadi kasutamisel, määratakse ära orto-polüfenooloksüdaasne aktiivsus. Seetõttu kehtivad selle meetodi abil tehtavad otsused ka ainult orto-polüfenooloksüdaasi kohta. Täiesti negatiivse tulemuse korral võib konstateerida ainult orto-polüfenooloksüdaasi puudumist, pole aga välistatud fermenti teiste vormide esinemine.

KIRJANDUS

- Li Lien Piao, Bonner J., 1947. Experiments on the localization and nature of tea oxidase. *Biochem. J.*, **41**, 1, 105—110.
- Neufeld H. A., Latterell F. M., Green L. F., Weintraub R. L., 1958. Oxidation of meta-polyhydroxyphenols by enzymes from *Piricularia oryzae* and *Polyporus versicolor*. *Arch Biochem. and Biophys.*, **76**, 2, 317—327.
- Sisler E. C., Evans H. J., 1958. A comparison of chlorogenic acid and catechol as substrates for the polyphenol oxidase from tobacco and mushroom. *Plant Physiol.*, **33**, 4, 255—257.
- Sreerangachar H., 1943. Studies on the fermentation of Ceylon tea. *Biochem. J.*, **37**, 653.
- Weber E., 1957. *Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner*. Jena.
- Бокучава М. А., Шуберт Т. А., 1950. Основные принципы изучения окислительных ферментов чая. Сб.: Биохимия чайного производства, VI, 90—99.
- Фрмаков А. И., Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И., Мурри И. К., 1952. Методы биохимического исследования растений. М.—Л.
- Михлин Д. М., Броновицкая З. С., 1949. Иодометрический метод определения полифенолоксидазы и пероксидазы. *Биохимия*, т. 14, вып. 4, 379—381.
- Поволоцкая К. Л., Седенко Д. М., 1955. Метод совместного определения активности аскорбиноксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы. *Биохимия*, т. 20, вып. 1, 88—93.

- Попов В. Р., 1958. Полифенолоксидазная активность побегов чая при их росте и технологической переработке. Биохимия, т. 23, вып. 6, 856—861.
- Попов В. Р., 1960. О ферментативном окислении флороглюцина в растениях. Биохимия, т. 25, вып. 2, 273—275.
- Смирнов А. И., Пшенова К. В., 1941. Специфичность табачной полифенолоксидазы к субстрату. Биохимия, т. 6, вып. 1, 29—36.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut*

Saabus toimetuse
21. XI 1961

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

У. Маргна

Резюме

В работе предложен новый метод определения активности полифенолоксидазы в растительных объектах, в основе которого лежит использование изготовленных с помощью ацетона ферментных препаратов из растительных тканей. В качестве субстратов используются аскорбиновая кислота и пирокатехин, а в качестве окислительного реагента для титрования аскорбиновой кислоты 0,01 н раствор иодата калия. Ацетоновые препараты имеют ряд преимуществ по сравнению с экстрактами и суспензиями. Их ферментативная активность при хранении под слоем безводного ацетона в температуре около 0°C сохраняется без изменений по крайней мере в течение нескольких суток. Они легко поддаются дозированию, особенно при смешивании и растирании (тритурировании) с индифферентными минеральными порошками, как, например, окись алюминия или тальк. Эти свойства ацетоновых препаратов существенно способствуют повышению точности анализов.

Для определений берут адекватное количество тритурированного ацетонового препарата и обливают 10 мл буферного раствора с оптимальной для данного объекта реакцией среды. Прибавляют 2 мл свежеприготовленного 0,2%-го раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 0,5%-го раствора пирокатехина. Встряхивают 2 минуты, прибавляют 2 мл 10%-й серной кислоты, несколько кристалликов иодистого калия, 5 капель 1%-го раствора крахмала, и оставшееся неокисленным количество аскорбиновой кислоты титруют 0,01 н раствором иодата калия. Параллельно определяют, сколько миллилитров 0,01 н раствора иодата калия затрачивается для титрования 2 мл 0,2%-го раствора аскорбиновой кислоты без присутствия активного ферментного препарата. Активность полифенолоксидазы характеризуется разницей между результатами этих двух определений и выражается в миллилитрах 0,01 н раствора иодата калия или в миллиграммах аскорбиновой кислоты на 1 г нетритурированного ацетонового препарата, имея в виду, что 1 мл 0,01 н раствора иодата калия эквивалентен 0,88 мг аскорбиновой кислоты.

Средняя относительная ошибка метода около 2% (при теоретически максимальной точности ошибка около 1,5%). При использовании ацетоновых препаратов определяется активность всех фракций полифенолоксидазы, в том числе и активность адсорбированной и неэкстрагируемой фракции, которая, согласно литературным данным, составляет большую часть этого фермента. Благодаря легкости проведения, большой точности и объективности результатов предложенный метод превосходит используемые до сих пор методы и пригоден для сравнительных исследований, в частности при массовых анализах.

В статье показаны возможные источники ошибок при практическом применении метода и истолковании полученных результатов.

*Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
21. XI 1961

A METHOD FOR THE DETERMINATION OF POLYPHENOLOXIDASE ACTIVITY IN PLANTS

U. Margna

Summary

A new method for the determination of polyphenoloxidase activity in plants has been proposed. The method involves acetone dried powder from vegetable tissues as the enzymic preparation, ascorbinic acid and catechol as the substrates, and a 0.01 N solution of potassium iodate as the oxidizing reagent for titration of ascorbinic acid. There are some advantages in using acetone dried preparations instead of water extracts or suspensions which were used in earlier methods. The acetone dried preparations show no decrease in enzymic activity during at least several days when kept under a layer of water-free acetone at about 0° C. Moreover, they are easily dosed out, especially when mixed and triturated with an indifferent powder of mineral origin like aluminium oxide or talc. These properties of acetone dried preparations are the most important factors promoting a considerable increase in the accuracy of the method.

The enzymic activity is determined as follows. An adequate quantity of triturated acetone dried preparation is poured over by 10 ml of phosphate-citric acid buffer with an appropriate pH and 2 ml of freshly prepared 0.2% solution of ascorbinic acid, and 1 ml of 0.5% solution of catechol are added. After 2 min. shaking, 2 ml of 10% sulphuric acid are added and the reaction mixture is titrated by the 0.01 N solution of potassium iodate in the presence of some crystals of potassium iodide and 5 drops of 1% solution of starch. Simultaneously, another 2 ml of 0.2% solution of ascorbinic acid is titrated without any enzymic preparation in the mixture. The activity of polyphenoloxidase is measured by the difference between the results of the two experiments and is expressed as the number of ml-s of the 0.01 N solution of potassium iodate or mg-s of ascorbinic acid per 1 g of acetone dried preparation, 1 ml of 0.01 N solution of potassium iodate being equivalent to 0.88 mg of ascorbinic acid.

The average relative error of the method was found to be approximately 2 per cent, which is a high degree of accuracy (the minimum theoretical value of the relative error being about 1.5 per cent). The use of acetone dried preparations enables to estimate the whole activity of all fractions of polyphenoloxidase, including the insoluble part which is the major constituent of this enzyme. Because of the simple technique, the exactness and the objectivity of results, it is preferable to employ the method suggested here rather than the ones recommended formerly. It is especially suitable for the purposes of comparative investigations, in particular in the case of large-scale analysis.

In the paper the author points out the possible errors which may arise in the actual application of the method and in the interpretation of the results obtained.

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,
Institute of Experimental Biology

Received
Nov. 21st, 1961