

*Institut für Lebensmittelchemie der Bundesforschungsanstalt  
für Ernährung, Karlsruhe*

## **Thermische Inaktivierung und Lagerungsverhalten technologisch wichtiger Enzyme**

### **III. Einfluß von Zusatzstoffen bei Peroxidase und Lipoxigenase**

*K. H. Park, M. Loncin und A. Fricker*

Mit 5 Abbildungen und 1 Tabelle

(Eingegangen am 4. Februar 1977)

#### **1.0. Einleitung**

Seit langem ist bekannt, daß die Zusammensetzung des Milieus, in dem eine thermische Behandlung von Enzymen vorgenommen wird, einen beträchtlichen Einfluß auf die dabei eintretende Inaktivierung ausübt (1, 2). Da in einem Lebensmittel eine Vielzahl von möglicherweise beeinflussen den Komponenten vorliegt, kann das Verhalten eines Enzyms in seiner natürlichen Umgebung, nämlich im Lebensmittel, sehr „kompliziert“ sein. So ist z. B. eine Schutzwirkung durch Anwesenheit von Zellinhaltsmaterial möglich; andererseits kann auch eine Abnahme der Thermostabilität durch Stoffe zustande kommen, die die Struktur des Enzyms thermodynamisch ungünstig verändern.

*Ivanetich* und Mitarb. (3) beobachteten bei Modellversuchen, daß Cytochrom c Komplexe mit den mitochondrialen Phospholipiden bildet. In ähnlicher Weise könnte die Peroxidase im biologischen System in Form von Phospholipid-Peroxidase-Komplexen vorliegen, wobei sich das Enzym thermodynamisch anders verhalten könnte als in „freier“ Form. Die Peroxidation von Lipiden verursacht nun eine Schädigung des biologischen Systems. Eine Zusammenfassung der Proteinschäden bei Peroxidationsreaktionen findet man bei *Tappel* (4). *Chio* und *Tappel* (5) untersuchten die Enzyminaktivierung durch die Lipid-Peroxidation und nahmen an, daß das Abbauprodukt der Lipoperoxide, der Malondialdehyd, eine Enzymdenaturierung bewirke. Bei der Untersuchung der Inaktivierung von Lipoxigenase in Anwesenheit von Linolsäure beobachteten *Svensson* und *Eriksson* (1), daß der Inaktivierungseffekt der Linolsäure von der Konzentration der durch Autoxidation entstandenen Hydroperoxide abhängig ist. Außerdem könnten Begleitstoffe – z. B. Phospholipide – einen Effekt ausüben, der dem von Detergenzien entspricht. Man kann z. B. an eine Korrelation zwischen der Oberflächenspannung und dem Ausmaß der Enzyminaktivierung denken. Es erschien daher erforderlich, nicht nur den Verlauf der Inaktivierung von Enzymen in reiner Lösung, sondern auch in Anwesenheit von verschiedenen Begleitkomponenten zu untersuchen, um die oft beobachtete Diskrepanz zwischen dem Verhalten von „reinen“

Enzymen und von Enzymen im natürlichen Lebensmittelverbund zu erklären und um ggf. solche Effekte bei Sterilisationsverfahren in der Lebensmittelindustrie ausnutzen zu können.

## 2.0. Experimenteller Teil

### 2.1. Versuchsmaterial

2.1.1. *Enzyme*: Peroxydase aus Meerrettich (Reinheitsgrad I, 250 U/mg, Boehringer), Lipoxigenase aus Sojabohnen (50 000 U/mg, Roth).

2.1.2. *Zusatzstoffe*: Linolsäure (> 99%, Sigma), Ölsäure und Laurinsäure (für biochemische Zwecke, Merck), Dodecyldimethylbenzylammoniumchlorid (DMBA, Sopura AM 50, Sopura), Tween 20 und Monoolein (Roth), Natriumdodecylsulfat (Serva). Lecithin aus Eiern (Merck) wurde durch Säulenchromatographie an Kieselsäure weiter gereinigt.

### 2.2. Thermische Behandlung

Die Enzymlösungen wurden nach der „Kolbenmethode“ (6) hitzebehandelt. Für die Versuche unter Stickstoff oder Sauerstoff wurde ein als Rückflußkühler wirkendes 50 cm langes Glasrohr eingesetzt und ca. 15 min vor dem Versuch das betreffende Gas durch die Pufferlösung perlen gelassen. Bei Untersuchungen mit Zusatzstoffen wurde die jeweilige Substanz bereits in der Pufferlösung gelöst bzw. dispergiert und auf die erwünschte Temperatur gebracht.

Zur Herstellung der Suspensionen von Monoolein und Lecithin wurde die entsprechende Menge der jeweiligen Substanz zu 0,1 M Phosphatpufferlösung zugegeben und 1 min im Biosonik III (Bronwill Scientific) ultrabeschallt.

Für die Hitzeinaktivierung in Anwesenheit von freien Fettsäuren wurde eine Stammlösung von Fettsäure in Äthanol hergestellt, von der die entsprechende Menge jeweils in 0,1 M Phosphatpuffer dispergiert wurde. Die Äthanolkonzentration in der Pufferlösung war dabei so minimal, daß Äthanol die thermische Inaktivierung nicht beeinflussen konnte.

Zur Untersuchung des Lagerungsverhaltens der erhitzten Enzyme wurden die in Anwesenheit von Zusatzstoffen hitzebehandelten Enzymlösungen bei Zimmertemperatur gelagert und die Aktivität nach 20 Stunden bestimmt.

### 2.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

*Peroxidase-Aktivität*: Guajakol-Methode (6).

*Lipoxigenaseaktivität*: Verfahren nach Ben-Aziz (siehe 7).

### 2.4. Regenerierung

Die erhitzten Enzymlösungen wurden bei Zimmertemperatur 20 h gelagert. Anschließend erfolgte die Aktivitätsbestimmung.

## 3.0. Ergebnisse

### 3.1. Einfluß von Tensiden auf die Hitzeinaktivierung von Peroxidase

3.1.1. *Abhängigkeit von der Tensidkonzentration*: Meerrettich-Peroxidase wurde in Anwesenheit verschiedener Tenside jeweils 2 min bei 70 °C

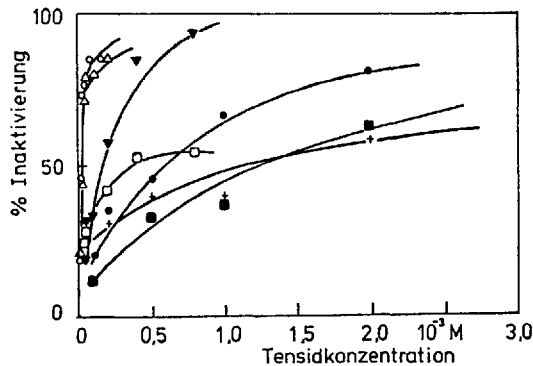


Abb. 1. Inaktivierung von Peroxidase (Meerrettich) als Funktion der Zusatzstoffkonzentration. Hitzebehandlung: 120 s bei 70 °C und pH 6,0. ○ Lecithin, △ Monoolein, ▼ Ölsäure, □ Laurinsäure, ● Tween 20, + Dodecyldimethylbenzylammoniumsalz, ■ Natriumdodecylsulfat.

und 1 min bei 90 °C inaktiviert. Wie man aus Abbildung 1, welche die bei 70 °C erhaltenen Werte wiedergibt, ersieht, hatten alle Tenside einen mehr oder weniger großen Effekt auf die Inaktivierung. Dabei wirkten die in Wasser quellenden Tenside Lecithin und Monoolein am stärksten, gefolgt von Ölsäure und Laurinsäure. Bei 90 °C waren die Verhältnisse ähnlich.

**3.1.2. Abhängigkeit des Tensideinflusses vom pH-Wert:** Erhitzt man die mit Tensiden versetzten Peroxidaselösungen in Puffer von pH 4,0 bis 8,0 bei 70 °C und ermittelt aus den Inaktivierungskurven die D-Werte, so ergab sich das in Tabelle 1 wiedergegebene Bild. Dabei wurde, um den Wirkungsgrad der Tenside in Abhängigkeit vom pH-Wert vergleichen zu können, das Verhältnis der D-Werte in reiner Pufferlösung zu den D-Werten in Anwesenheit von Tensiden bei entsprechendem pH-Wert ermittelt. Eine große Verhältniszahl bedeutet einen großen Wirkungsgrad. Die Verhältniszahlen für alle untersuchten Tenside sind bei pH 6,0 am niedrigsten, d. h. die Wirksamkeit der Tenside ist im allgemeinen bei pH 6,0 am ge-

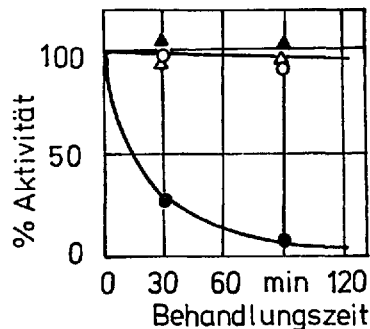


Abb. 2. Verhalten von Peroxidase (Meerrettich) in Anwesenheit von Lecithin (100 µM) bei 0 °C. △ ohne Zusatzstoff bei pH 6,0, ▲ mit Lecithin bei pH 6,0, ○ ohne Zusatzstoff bei pH 4,0, ● mit Lecithin bei pH 4,0.

Tab. 1. Einfluß von Tensiden auf die Hitzeinaktivierung von Peroxidase (Meerrettich) in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 70°C.

| pH | ohne Zusatzstoff |       | Ölsäure (100 $\mu$ M) |       | Palmitinsäure (100 $\mu$ M) |       | Linolsäure (100 $\mu$ M) |       | DMBA (200 $\mu$ M) |       | Tween 20 (500 $\mu$ M) |       | Lecithin (10 $\mu$ M) |       |
|----|------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|-------|-----------------------|-------|
|    | $D_A$            | $D_T$ | $D_A/D_T$             | $D_T$ | $D_A/D_T$                   | $D_T$ | $D_A/D_T$                | $D_T$ | $D_A/D_T$          | $D_T$ | $D_A/D_T$              | $D_T$ | $D_A/D_T$             | $D_T$ |
| 4  | 500              | 60    | 8,33                  | 300   | 1,67                        | 42    | 11,9                     | 54    | 9,3                | 240   | 2,1                    | 24    | 20,8                  |       |
| 6  | 702              | 330   | 2,13                  | 540   | 1,3                         | 180   | 3,9                      | 384   | 1,8                | 360   | 1,95                   | 144   | 4,9                   |       |
| 8  | 1080             | 240   | 4,5                   | 450   | 2,4                         | 120   | 9,0                      | 228   | 4,7                | 276   | 3,9                    | 108   | 10,0                  |       |

 $D_A$ : D-Wert in Abwesenheit von Tensid $D_T$ : D-Wert in Anwesenheit von jeweiligem Tensid

DMBA: Dodecylmethylbenzylammoniumchlorid

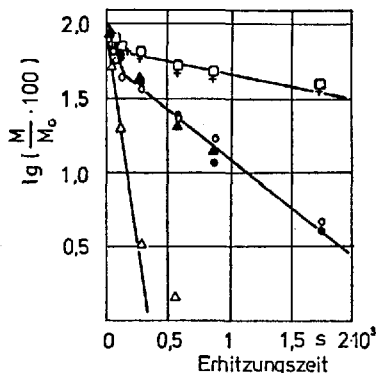


Abb. 3. Hitzeinaktivierung von Peroxidase (Meerrettich) in Anwesenheit von verschiedenen Fettsäuren unter Sauerstoff oder Stickstoff. Hitzebehandlung: 70 °C bei pH 6,0. + Palmitinsäure unter O<sub>2</sub>, ○ Ölsäure unter O<sub>2</sub>, ● Ölsäure unter N<sub>2</sub>, ▲ Linolsäure unter N<sub>2</sub>, △ Linolsäure unter O<sub>2</sub>, □ ohne Fettsäure. M<sub>0</sub>: Anfangsenzymbaktivität. M: Restenzymbaktivität.

ringsten. Ölsäure, DMBA und Lecithin zeigten einen größeren Effekt bei pH 4,0 als bei pH 8,0, während Palmitinsäure, Linolsäure und Tween 20 bei beiden pH-Werten etwa gleich wirksam waren.

**3.1.3. Inaktivierung der Peroxidase in Anwesenheit von Lecithin, Monoolein und Fettsäuren bei pH 4,0 und 0 °C:** Peroxidaselösung wurde in Anwesenheit der genannten Stoffe im Eisbad stehen gelassen. Aus Abbildung 2 ist zu ersehen, daß die Peroxidase bei pH 4,0 in Anwesenheit von Lecithin sehr stark inaktiviert wurde (nur noch etwa 6 % Restaktivität nach 90 min), während bei pH 6 keine Wirkung gefunden werden konnte. Ölsäure, Linolsäure und Palmitinsäure sowie Monoolein hatten bei beiden pH-Werten keine Wirkung.

**3.1.4. Einfluß von Öl- und Linolsäure auf die Peroxidaseaktivierung in An- und Abwesenheit von Sauerstoff und Stickstoff:** Um feststellen zu können, ob der Inaktivierungsprozeß in Anwesenheit von Fettsäuren durch deren Oxydationsprodukte beeinflusst wird, wurde das Enzym in Öl- bzw. Linolsäure-Emulsion im Sauerstoff- bzw. Stickstoffstrom erhitzt. Die Inaktivierungskurven bei Versuchsansätzen mit Ölsäure im Sauerstoff- bzw. Stickstoffstrom und mit Linolsäure im Stickstoffstrom verlaufen sehr ähnlich (Abb. 3). Dagegen wirkte sich die Anwesenheit von Sauerstoff im Falle der Linolsäure sehr stark aus. Dies ist wohl auf die Bildung von Linolsäureperoxid zurückzuführen. Palmitinsäure war ohne Wirkung auf die Hitzeinaktivierung.

### 3.2. Einfluß von Zusatzstoffen auf die Hitzeinaktivierung von Lipoxigenase

Verschiedene Fettsäuren beschleunigen die Lipoxigenaseinaktivierung, wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist. In der Reihenfolge Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure nimmt dieser beschleunigende Einfluß ab. Während Linolsäure bei der Peroxidaseinaktivierung den größten Effekt zeigte, bewirkte Ölsäure die größte Inaktivierung bei

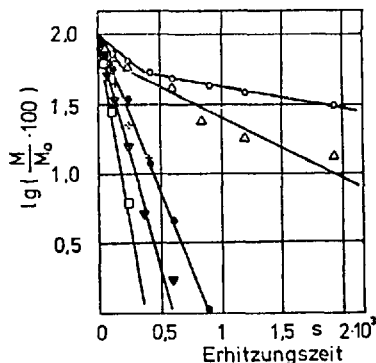


Abb. 4. Hitzeinaktivierung von Sojalipoxigenase in Anwesenheit von verschiedenen Fettsäuren (je 100  $\mu\text{M}$ ) bei 60 °C und pH 7,0.  $\circ$  ohne Fettsäure,  $\triangle$  Stearinsäure,  $\bullet$  Palmitinsäure,  $+$  Myristinsäure,  $\blacktriangledown$  Linolsäure,  $\square$  Ölsäure.

Lipoxigenase. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Peroxidase hat Palmitinsäure bei der Lipoxigenaseinaktivierung auch einen großen Effekt.

Der Einfluß von Lecithin auf die Lipoxigenaseinaktivierung wurde bei pH 7,0 und 60 °C untersucht. Aus Abbildung 5 ist zu ersehen, daß dieser nicht so stark ist wie bei Peroxidase (Abb. 2).

### 3.3. Einfluß von Zusatzstoffen auf die Regenerierung von erhitzter Meerrettich-Peroxidase und Sojalipoxigenase

Ölsäure und DMBA verhinderten im Verlaufe der 20stündigen Lagerung der Peroxidaselösungen bei Zimmertemperatur eine Regenerierung, die in Abwesenheit von Zusatzstoffen stark ausgeprägt war [vgl. (6)]. Die anderen Zusatzstoffe führten dagegen zu weiterer Inaktivierung.

Bei Sojalipoxigenase wurde nur der Einfluß von Linolsäure untersucht. Diese bewirkte eine zusätzliche Inaktivierung; eine Regenerierung trat nicht auf.

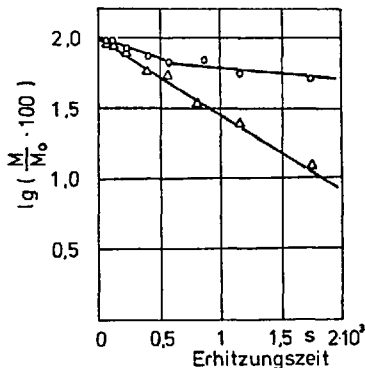


Abb. 5. Hitzeinaktivierung von Sojalipoxigenase in Anwesenheit von Lecithin (26,6  $\mu\text{M}$ ) bei 60 °C und pH 7,0.  $\circ$  ohne Lecithin,  $\triangle$  mit Lecithin.

#### 4.0. Diskussion

Lumry und Mitarb. (8) nahmen an, daß die Wirkung von Detergenzien auf die Proteindenaturierung auf *van der Waals'sche* Wechselwirkung zwischen dem organischen Anteil des Detergenmoleküls und den lipophilen Gruppen des Eiweißes zurückzuführen sei. Ein Ladungseffekt (9) wurde ebenfalls als mögliche Erklärung zur Diskussion gestellt. Meyer und Mitarb. (10) vermuten eine Wirkung des Detergens auf das Protein, welche eine Schwächung der hydrophoben Bindungen im Protein hervorruft, wodurch die Tertiärstruktur modifiziert wird. Man könnte demnach für die Erklärung der Wirkung von Tensiden auf die Enzyminaktivierung diesen Detergenseffekt heranziehen.

Wie aus Abbildung 2 zu ersehen, wirkt Lecithin schon bei 0 °C und pH 4,0 sehr stark inaktivierend auf die Peroxidase. Ivanetich und Mitarb. (11) haben nun beobachtet, daß durch die Komplexbildung zwischen Phospholipid und Ferricytochrom c der Hämspalt des Ferricytochroms verändert wurde. Man kann sich daher vorstellen, daß auch die Peroxidase in Anwesenheit von Lecithin einen Komplex bildet, welcher den Hämspalt der Peroxidase so beeinflußt, daß die Zugänglichkeit der Hämin-Apoprotein-Bindungsstelle erhöht und dadurch die Abspaltung der Hämingruppe vom Apoprotein durch Einwirkung des sauren Mediums erleichtert wird.

Linolsäure zeigt im Sauerstoffstrom einen größeren Einfluß auf die Peroxidaseinaktivierung als in Anwesenheit von Stickstoff, im Stickstoffstrom aber einen ähnlichen Einfluß wie Ölsäure, die unter N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> die gleiche Wirkung hat. Man kann also neben der Tensidwirkung der Fettsäuren einen deutlichen zusätzlichen Effekt der Lipidperoxide annehmen, die durch Autoxidation während der Erhitzung entstehen können. Es ist etwa 1–3 % Lipidperoxidbildung aus Linolsäure während der Erhitzung zu erwarten (1). Chio und Tappel (12) fanden in ähnlicher Weise einen starken Einfluß von Lipidperoxiden auf die Inaktivierung von Ribonuclease, wobei die Autoren sich einen Komplex mit inner- und zwischenmolekularen Bindungen zwischen dem Enzymmolekül und einem Abbauprodukt der Lipidperoxide (Malondialdehyd) vorstellen.

Der beschleunigende Einfluß freier Fettsäuren auf die Lipoxigenaseinaktivierung wurde auch von anderen Autoren (1) beobachtet. Dabei wurde postuliert, daß dieser Effekt auf das während der Erhitzung entstandene Linolsäurehydroperoxid zurückzuführen ist. Nach unseren Versuchen übt Ölsäure einen stärkeren Einfluß als Linolsäure aus. Da jedoch die Lipidperoxidbildung bei Ölsäure um mehrere Größenordnungen langsamer verläuft als bei Linolsäure, kann der beschleunigende Effekt nicht nur auf die Lipidperoxide zurückgeführt werden. Mitsuda und Mitarb. (13) berichteten über die reversible Hemmung von Lipoxigenase durch gesättigte Alkohole (C1–C7) und nahmen an, daß das Enzym mit einer hydrophoben Bindungsstelle neben dem aktiven Zentrum ausgestattet ist [vgl. auch (14)]. Aufgrund unserer Ergebnisse kann man annehmen, daß die Fettsäure mit hydrophoben Bindungen in der Nähe des aktiven Zentrums der Lipoxigenase in Wechselwirkung tritt und dort eine Konformationsänderung verursacht, durch welche die thermische Inaktivierung beschleunigt wird.

Fricker (15) hat zusammenfassend über das Verhalten von Emulgatoren in Lebensmitteln bei der Hitzesterilisierung berichtet. Daraus geht hervor, daß eine Wechselwirkung mit Lebensmittelinhaltsstoffen möglich scheint, wobei auch Enzyme als Reaktionspartner in Betracht kommen. Würde man die thermischen Behandlungsprozesse auf die destabilisierende Wirkung von Zusatzstoffen wie Monoolein, Fettsäuren und Lecithin abstimmen, so könnte man vielleicht den erforderlichen Inaktivierungsgrad der Enzyme bei einer geringeren thermischen Belastung des Gutes erreichen. Außerdem ließe sich vielleicht durch kleine Mengen bestimmter Zusatzstoffe – z. B. Lecithin – eine Regenerierung der Peroxidase nach der Hitzesterilisierung vollständig unterbinden.

### Zusammenfassung

Der Einfluß von Milieufaktoren auf die thermische Inaktivierung von Peroxidase und Lipoxigenase wurde untersucht. Kationogene, anionogene, nicht-ionogene und amphotere Tenside hatten einen mehr oder weniger großen Effekt auf die Inaktivierung der Meerrettich-Peroxidase. Dabei wirkten die in Wasser quellenden Stoffe Lecithin und Monoglycerid am stärksten. Peroxidase wurde in Anwesenheit von Lecithin schon bei 0 °C und pH 4,0 stark inaktiviert. Linolsäure hatte im Sauerstoffstrom einen größeren Einfluß auf die Peroxidaseinaktivierung als in Anwesenheit von Stickstoff, im Stickstoffstrom aber einen ähnlichen Einfluß wie Ölsäure. Daraus ist auf einen zusätzlichen Effekt von Lipidperoxiden zu schließen, die während der Erhitzung aus Linolsäure entstehen. Die Regenerierung der erhitzten Peroxidase wurde durch die Anwesenheit von Tensiden verhindert.

Im Falle der Lipoxigenase wurde der Einfluß des Lecithins und verschiedener Fettsäuren auf die thermische Inaktivierung bei 60 °C und pH 7 untersucht. Lecithin beschleunigte die Inaktivierung weniger stark, als dies bei Peroxidase der Fall war. Die beschleunigende Wirkung der Fettsäuren nahm in der Reihenfolge Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure ab.

### Summary

The influence of milieu factors on the thermal inactivation of peroxidase and lipoxigenase was investigated. Cationogenic, anionogenic, non-ionogenic and amphoteric tensides were more or less effective in inactivating horseradish peroxidase. Most effective in this respect were lecithine and monoglyceride, both capable of swelling in water. In presence of lecithine, peroxidase was inactivated already at 0 °C and pH 4.0. Linoleic acid was more efficient in an oxygen stream than in presence of nitrogen, in a stream of nitrogen its influence was comparable to oleic acid. This suggests an additional effect by lipid peroxides which are formed of linoleic acid under the heating process. Tensides prevented the regeneration of the heated peroxidase.

In the case of lipoxigenase, the authors investigated the influence of lecithine and various fatty acids on the thermal inactivation at 60 ° and pH 7.0. Lecithine accelerated the inactivation less distinctly than with peroxidase. The accelerated the inactivation less distinctly than with peroxidase. The accelerating effect of the fatty acids decreased in the order oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, myristic acid and stearic acid.

### Literatur

1. Svensson, S. G., C. E. Eriksson, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 5, 124 (1972). –
2. Lu, A. T., J. R. Whitaker, *J. Food Sci.* 39, 1173 (1974). – 3. Ivanetich, K. M.,



- J. J. Henderson, L. S. Kaminsky*, Biochemistry **12**, 1822 (1973). – 4. *Tappel, A. L.*, Federation Proc. **24**, 73 (1965). – 5. *Chio, K. S., A. L. Tappel*, Biochemistry **8**, 2821 (1969). – 6. *Park, K. H., A. Fricker*, Z. Ernährungswiss. **16**, 81 (1977). – 7. *Park, K. H., A. Fricker*, Z. Ernährungswiss. **16**, 92 (1977). – 8. *Lumry, R., H. Eyring*, J. Phys. Chem. **58**, 110 (1954). – 9. *Putnam, F. W.*, Adv. Protein Chem. **4**, 79 (1948). – 10. *Meyer, M. L., W. Kauzmann*, Arch. Biochem. Biophys. **99**, 348 (1962). – 11. *Ivanetich, K. M., J. J. Henderson, L. S. Kaminsky*, Biochemistry **13**, 1469 (1974). – 12. *Chio, K. S., A. L. Tappel*, Biochemistry **8**, 2827 (1969). – 13. *Mitsuda, H., K. Yasumoto, A. Yamamoto*, Arch. Biochem. Biophys. **118**, 664 (1967). – 14. *Egmond, M. R., M. Brunori, P. M. Fasella*, Eur. J. Biochem. **61**, 93 (1976). – 15. *Fricker, A.*, Ernährungswirtschaft/Lebensmitteltechnik **22**, 16 (1975).

Anschrift der Verfasser:

*K. H. Park, M. Loncin und A. Fricker*, Institut für Lebensmittelchemie  
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, 7500 Karlsruhe