

*Institut für Lebensmittelchemie der Bundesforschungsanstalt für  
Ernährung, Karlsruhe*

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

### **IV. Lipid-Acyl-Hydrolase in Spinat**

*K. H. Park, R. Duden und A. Fricker*

Mit 5 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 4. Februar 1977)

#### **1.0. Einleitung**

In grünen Pflanzenteilen scheinen Triglycerid-Lipasen nur in geringen Mengen vorzuliegen; dagegen entfalten Phospho- und Galaktolipase hohe Aktivität [s. z. B. (1)]. Ihre Substrate – Phospho- bzw. Galaktolipide – stellen den Hauptanteil der Pflanzenlipide. Daher können Aktivitäten von Enzymen, die die polaren Lipide aufspalten, für die Qualitätserhaltung pflanzlicher Lebensmittel bedeutsam sein. So wiesen *Lee* und *Mattick* (2) einen beträchtlichen Abbau von Phospholipiden in rohen Erbsen während der Lagerung bei  $-17,8^{\circ}\text{C}$  nach. *Pendlington* (3) beobachtete einen Lipidabbau bei unblanchierten Erbsen, wobei eine entsprechende Zunahme von Cholin und Phosphat nachweisbar war. *Lea* und *Parr* (4) beschrieben einen Fischgeschmack, der als Folge des Abbaus von Phospholipiden und Galaktolipiden entstand.

Von Phospholipase  $A_2$  aus Schlangengift ist bekannt, daß sie außerordentlich hitzestabil ist. Es schien daher möglich, daß pflanzliche Phospholipasen ebenfalls relativ hitzestabil sind. Untersuchungen über die Hitzestabilität pflanzlicher Phospholipasen bzw. Galaktolipasen sind aber noch kaum durchgeführt worden. *Helmsing* (5) hat die Hitzestabilität der Galaktolipasen aus Blättern von „runner bean“ nur am Rande untersucht, so daß technologisch brauchbare Daten nicht erhalten wurden. Es war daher unser Ziel, solche für die Lebensmittelverarbeitung verwendbare Inaktivierungsdaten für die Gruppe der die polaren Lipide abbauenden Enzyme zu ermitteln.

*Galliard* (6) und *Hirayama* (7) isolierten ein Enzym aus Kartoffeln, das sowohl mit Phospholipiden als auch mit Galaktolipiden reagierte. Ob auch das im Spinat vorkommende Lipidhydrolase-System ein multifunktionelles Enzym darstellt oder ob es sich um verschiedene Einzelenzyme handelt, ist noch nicht erwiesen (s. Diskussion). Zur Klärung dieser Frage untersuchten wir das thermische Verhalten von Phospho- und Galaktolipide spaltenden Enzymen. Gleiche thermische Daten würden die Annahme stützen, daß nur ein Enzym mit verschiedenen Aktivitäten (multi-

funktionelles Enzym) vorliegt. Verschiedene Inaktivierungskennzahlen würden dagegen darauf hindeuten, daß es sich um getrennte, individuelle Enzyme handelt.

Nach eigener Erfahrung war die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit bei Verwendung von synthetischem bzw. aus Eierlecithin isoliertem Lecithin wesentlich geringer als im Falle von nativem im Spinat vorhandenem Lecithin. Da eine absolut gleichmäßige Herstellung von Substratemulsionen kaum möglich ist, ist die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Enzymaktivität schlecht. Daher wurde eine geeignetere Methode zur Bestimmung pflanzlicher Phospholipasenaktivität entwickelt und zur Charakterisierung der thermischen Inaktivierung verwendet.

## 2.0. Experimenteller Teil

### 2.1. Behandlung des Versuchsmaterials: [siehe Park (1)]

### 2.2. Bestimmung der Enzymaktivität

0,05 g feingemahlendes gefriergetrocknetes Spinatpulver wurden in 2,5 ml 0,1 M Phosphatpufferlösung pH 7,0 suspendiert, die bereits auf 30 °C temperiert war und bei dieser Temperatur gerührt wurde. Die Reaktion wurde nach jeweils 20 und 60 min durch Hinzufügen von 2,5 ml Methanol gestoppt. Aus den durch Abzentrifugieren erhaltenen Niederschlägen wurden die Lipide mit 3 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) extrahiert. Jeweils 2 ml der Überstände wurden im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und in 0,5 ml Chloroform aufgenommen. Die Extrakte wurden auf Kieselgel-G-Platten (Merck; Aktivierung: 20 min bei 110 °C) aufgetragen und in einer Normalkammer chromatographiert (Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 75:25:4). Die nicht umgesetzten Mengen von Lecithin, Monogalaktolipiden und Digalaktolipiden wurden „in situ“ durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Hierzu wurde die Platte mit Sulfurylchlorid/Wasser behandelt, 7 min bei 110 °C erhitzt und anschließend mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer (Meßanordnung M-Pr) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm (Sperrfilter FL 43) und spaltförmiger Meßfläche ausgemessen (8). Aus Halbwertsbreite und Höhe der vom Schreiber registrierten Kurven wurden die Peakflächen [F] ermittelt und die entsprechenden Lipidmengen aus Eichkurven entnommen. Zur Aufstellung der Eichkurven wurde ein Lipidextrakt aus unverändertem Spinatmaterial verwendet, von dem jeweils mehrere Verdünnungen zusammen mit dem zu untersuchenden Extrakt chromatographiert wurden.

Die Abnahme der Lipidmenge („Umsatz“) in einer bestimmten Reaktionszeit ist das Maß der Enzymaktivität. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde das unbehandelte Spinatpulver zur Unterbindung der Reaktion in ein Gemisch von 2,5 ml Puffer und 2,5 ml Methanol gegeben und wie oben weiterbehandelt.

### 2.3. Thermische Behandlung

0,05 g feingemahlendes, gefriergetrocknetes Spinatpulver wurde schnell in 2,5 ml 0,1 M Pufferlösung pH 7,0 eingeführt das in einem Reagenzglas auf die gewünschte Temperatur vorerhitzt worden war. Durch in-

tensives Mischen mittels eines Magnetrührers war eine sehr kurze Aufheizungszeit erreichbar. Nach der jeweiligen Reaktionszeit wurden die Proben schnell bis auf 30 °C abgekühlt und unmittelbar – wie bei der Bestimmung der Enzymaktivität beschrieben – reagieren gelassen. Für die Bestimmung des Blindwertes der hitzebehandelten Proben wurden diese unmittelbar nach der jeweiligen thermischen Behandlung mit Methanol versetzt, da ein Teil der Lipide bereits während des Erhitzens bei 45 °C und 50 °C abgebaut wurde.

### 3.0. Ergebnisse

#### 3.1. Bestimmung der Enzymaktivität

In Abbildung 1 ist ein Chromatogramm dargestellt, auf welchem der Extrakt von hitzebehandelter und unbehandelter Spinatsuspension nach einer Inkubationszeit von 20 bzw. 60 min aufgetragen wurde. Man erkennt die stärkere Abnahme der Substratmenge in der unbehandelten Probe gegenüber der hitzebehandelten, wobei der Umsatz der Substrate (Lecithin, Di- und Monogalaktolipid) auf Enzymwirkung während der Inkubation zurückzuführen ist. Die aus der Abnahme der Substratmenge erhaltenen Umsatz-Zeit-Kurven sind für Monogalaktosyldiglyceride innerhalb der ersten 60 min linear. Die Enzymaktivitäten entsprechen der Steigung der jeweiligen Umsatz-Zeit-Kurven.

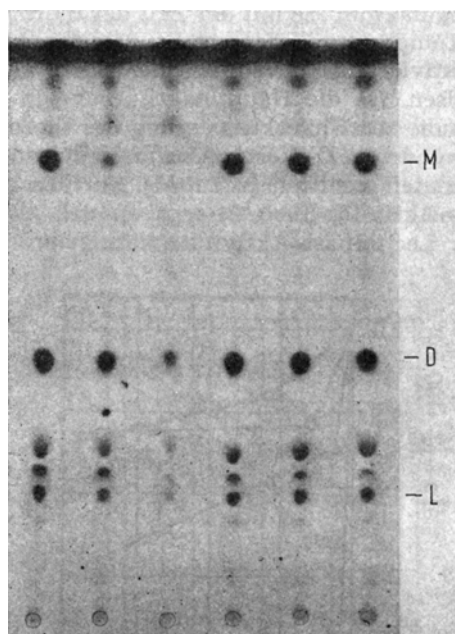


Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm von Lipidextrakten aus pulverisiertem, gefriergetrocknetem Spinat nach der Inkubation in Phosphatpuffer bei 30 °C. Links: unbehandeltes, rechts: 1 min bei 60 °C behandeltes Material. Inkubationszeiten: jeweils 0, 20 und 60 min. M = Monogalaktosyldiglyceride; D = Digalaktosyldiglyceride; L = Lecithin.

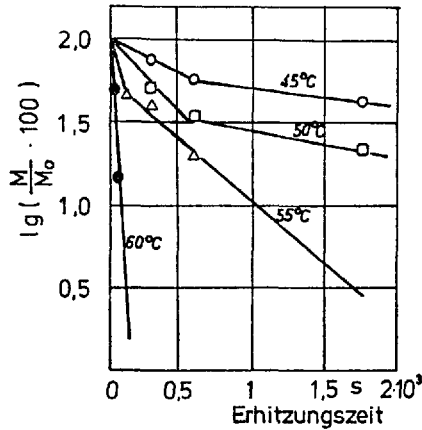


Abb. 2. Abnahme der Lecithinase-Aktivität in Suspensionen von gefriergetrocknetem Spinat (Phosphatpuffer) als Funktion der Erhitzungszeit bei verschiedenen Temperaturen.  $M$  = umgesetzte Substratmenge;  $M_0$  = Ausgangssubstratmenge.

### 3.2. Inaktivierungsverlauf

In den Abbildungen 2, 3 und 4 ist die Abnahme der Aktivität von Phospho-, Mono- und Digalaktolipase mit der Zeit der thermischen Behandlung bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Aus den Abbildungen ersieht man, daß die Inaktivierungskurven bei niedrigen Temperaturen einen Knickpunkt aufweisen. Da die Hauptinaktivierung in der Anfangsphase stattfindet, wurden die zur Charakterisierung des thermischen Verhaltens üblicherweise verwendeten  $D$ -Werte (Dezimalreduktionszeiten) aus dem ersten steilen Kurventeil ermittelt (s. Tab. 1). Für den thermischen Abbau der Digalaktolipase-Aktivität (Abb. 3) ergaben sich kleinere  $D$ -Werte als für den Abbau der Lecithinase-Aktivität (Abb. 2) und der Monogalacto-

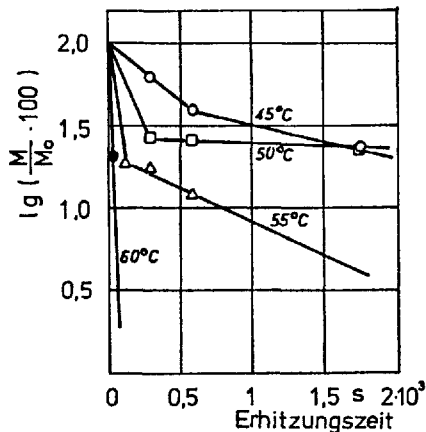


Abb. 3. Abnahme der Digalaktolipase-Aktivität.  $M$  = umgesetzte Substratmenge;  $M_0$  = Ausgangssubstratmenge.

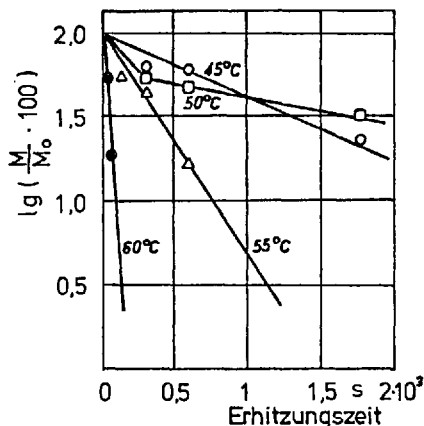


Abb. 4. Abnahme der Monogalactolipase-Aktivität.  $M$  = umgesetzte Substratmenge;  $M_0$  = Ausgangssubstratmenge.

lipase-Aktivität (Abb. 4). Aus Abbildung 5 ist jedoch ersichtlich, daß die drei Temperaturabhängigkeitskurven der  $D$ -Werte fast parallel verlaufen, so daß sich sehr ähnliche  $z$ -Werte ergeben (Tab. 1).

In Tabelle 2 wurden die nach „Transition state-Theorie“ (9) berechneten thermodynamischen Konstanten zusammengestellt.

#### 4.0. Diskussion

Oftmals treten Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten in pflanzlichen Extrakten auf. Z. B. können Farbstoffe oder trübe Teilchen in der Meßlösung störende Faktoren darstellen. Bei der hier entwickelten Methode werden störende Begleitstoffe durch Chromatographie vom Substrat abgetrennt.

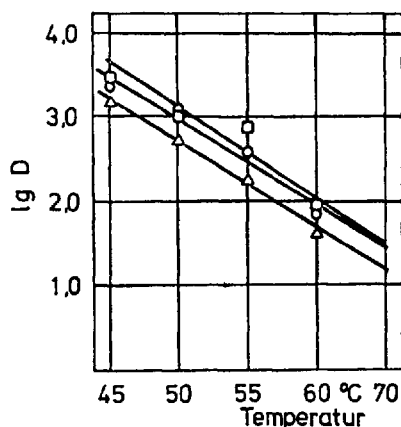


Abb. 5. Abnahme der  $D$ -Werte mit der Erhitzungstemperatur bei pH 7.  $\circ$  Lecithinase-,  $\triangle$  Digalactolipase-,  $\square$  Monogalactolipase-Inaktivierung.

Tab. 1. Thermischer Abbau von Lecithinase-, Digalaktolipase- und Monogalaktolipase-Aktivitäten in Spinat bei pH 7,0.

	D (sec)				z (°C)
	45°C	50°C	55°C	60°C	
Lecithinase-Aktivität	2400	1140	372	72	9,75
Digalaktolipase-Aktivität	1500	540	174	42	10,0
Monogalaktolipase-Aktivität	2640	1200	768	84	9,0

Galliard (6) postulierte, daß ein unbekannter Faktor in rohem Extrakt die Deacylierung der Phospholipide aktiviert. Ein solcher „Faktor“ könnte den schnellen Abbau der polaren Lipide im Spinat, der nach der Zerstörung des Zellverbandes durch Gefrieren eintritt, erklären. Daß bei unseren Versuchen eine Emulsion von synthetischem Lecithin bzw. Eierlecithin durch Spinatpartikel nur in geringem Maße angegriffen wurde, mag eine Frage der Konzentration des Aktivators sein, könnte jedoch auch durch mangelhaften Kontakt der Komponenten innerhalb des Systems Aktivator-Enzym-Lecithinmicelle erklärt werden.

Der Vorteil der von uns angewendeten Methode liegt darin, daß materialeigenes Substrat in natürlicher Verteilung verwendet wird; die Schwierigkeit der Herstellung stabiler Substrat-Emulsionen mit stets gleicher Micellstruktur wird umgegangen. Natürliche Aktivatoren werden in die Reaktion einbezogen. Der Nachteil liegt darin, daß nur relative Aktivitäten ermittelt werden können.

Galliard (6) und Hirayama (7) führten aus, daß das von ihnen isolierte Enzym, welches nicht weiter aufzutrennen war, sowohl Galaktolipase- als auch Phospholipase-Aktivität aufweist (vgl. Einleitung). Auf Phospholipide hatte dieses multifunktionelle Enzym eine ähnliche Wirkung wie Phospholipase B und Glycerylphosphorylcholidiesterase. Eine „Lipid-Acyl-Hydrolase“ wird zur Zeit von Frei und Tevini (10) untersucht. Nach ihren bisherigen Ergebnissen kann dieses multifunktionelle Enzym im Spinat ebenfalls vorkommen.

In unserem Versuch umfaßt die „Lecithinase-Aktivität“ die Aktivitäten von Phospholipase A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C und D, da alle diese Aktivitäten an dem gemessenen Substratabbau teilhaben.

Tab. 2. Thermodynamische Konstanten.

	Temp. (°C)	pH	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol · K)
Lecithinase-Aktivität	50	7,0	203	95,6	330
Digalaktolipase-Aktivität	50	7,0	203	93,6	336,5
Monogalaktolipase-Aktivität	50	7,0	185	95,7	275,6

$\Delta H^*$  = Aktivierungsenthalpie

$\Delta G^*$  = freie Aktivierungsenthalpie

$\Delta S^*$  = Aktivierungsentropie

Aus Tabelle 1 ist zu erkennen, daß zu den drei verschiedenen Aktivitäten (Mono- und Digalaktolipase- sowie Lecithinase-Aktivität) sehr ähnliche *z*-Werte gehören. Außerdem weichen die *D*-Werte in ihrer Größenordnung nicht so voneinander ab wie zwischen anderen Enzymen. Dazu weisen die thermodynamischen Konstanten (s. Tab. 2) ebenfalls fast gleiche Werte auf. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß das hier untersuchte Lipid-Acyl-Hydrolase-System ein multifunktionelles Enzym darstellt.

Die Inaktivierungsdaten sind jedoch nicht *völlig* gleich. Die relativ geringfügigen, jedoch deutlich erkennbaren Unterschiede können so erklärt werden, daß die drei Substrate jeweils verschiedenartige Positionen innerhalb des Enzymmoleküls besetzen, die beim Erhitzen verschiedenen großen Konformationsänderungen unterworfen sind. Ähnliches wurde auch von Helmsing (5) bei der Inaktivierung von Mono- und Digalaktolipasen festgestellt.

Vergleicht man die Hitzestabilität der Lipid-Acyl-Hydrolase im Spinat mit der von Phospholipase  $A_2$  aus Schlangengift, so ist diese extrem verschieden: Die Lipid-Acyl-Hydrolase im Spinat wurde etwa zu 90 % nach 1 min bei 60 °C inaktiviert, während die Phospholipase  $A_2$  aus Schlangengift nach 30 min bei 90 °C noch nicht angegriffen war [vgl. (1)]. Dies beruht möglicherweise darauf, daß die Lipid-Acyl-Hydrolase im Spinat ein Oligomeres (Mol. Gew. 70 000) (7) ist. Dagegen besitzt die Schlangengiftphospholipase  $A_2$  ein kleines Molekulargewicht (Mol. Gew. 15 000). Sie hat 6 bis 8 Disulfidbindungen und kugelförmige Struktur (11), was beides für hitzeresistente Enzyme charakteristisch ist.

#### *Zusammenfassung*

Das thermische Verhalten einer Lipid-Acyl-Hydrolase, die für die Qualitätserhaltung pflanzlicher Lebensmittel wichtig erscheint, wurde im Falle von Spinat näher untersucht. Zur Enzymbestimmung wurde eine einfache dünn-schichtchromatographische „In situ“-Methode entwickelt und mit deren Hilfe die thermische Inaktivierung der Lipid-Acyl-Hydrolase durch Messung des Abbaus von Lecithin, Mono- und Digalaktosyldiglycerid verfolgt. Nach Ausweis der Inaktivierungskurven besitzt das Enzym eine relativ geringe Hitzestabilität. Da die aus den Inaktivierungskurven für Phospholipase-, Mono- und Digalaktolipase-Aktivitäten ermittelten *D*- und *z*-Werte nahezu gleich sind, wird angenommen, daß die Lipid-Acyl-Hydrolase im Spinat ein multifunktionelles Enzym ist.

#### *Summary*

The thermal reaction of a lipid-acyl-hydrolase which seems to be important for the quality preservation of vegetable foods, was investigated in spinach. The authors applied a simple in-situ method using thin-layer chromatography which had been developed for the enzyme determination, to follow the thermal inactivation of the lipid-acyl-hydrolase by measuring the decomposition of lecithine, mono- and digalactosyl diglycerides. According to the inactivation curves, the enzyme is relatively little resistant to heat. Since the *D*- and *z*-values resulting from the inactivation curves for phospholipase, mono- and digalactolipase activities are almost the same, it can be assumed that the lipid-acyl-hydrolase is a multi-function enzyme in spinach.

*Literatur*

1. Park, K. H., Diss. Uni. Karlsruhe, 1976. – Park, K. H., A. Fricker, Z. Ernährungswiss. 16, 81 (1977). – 2. Lee, F. A., L. R. Mattick, J. Food, Sci. 26, 273 (1961). – 3. Pendlington, S., 1st Intern. Congr. Food Sci. and Technol. Abstr. S. 120 (1962). – 4. Aylward, F. and D. R. Haisman, Adv. Food Res. 17, 1 (1969). – 5. Helmsing, P. J., Biochim. Biophys. Acta 178, 519 (1969). – 6. Galliard, T., Biochem. J. 121, 379 (1971). – 7. Hirayama, O., H. Matsuda, H. Takeda, K. Maenaka, H. Takatsuka, Biochim. Biophys. Acta 384, 127 (1975). – 8. Duden, R., Lebensm.-Wiss. u. Technol. (1976), im Druck. – 9. Eyring, H., Chem. Revs. 17, 65 (1935). – 10. Frei, R., M. Tevini, persönliche Mitteilung. – 11. De Haas, G. H., N. M. Postema, W. Nieuwenhuizen, L. L. M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 159, 103 (1968).

## Anschrift der Verfasser:

K. H. Park, R. Duden und A. Fricker, Institut für Lebensmittelchemie  
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, 7500 Karlsruhe