

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Enzymatischer Abbau von Phospholipiden in gefrorener Petersilie

*R. Duden und A. Scholz *)*

1 Einleitung

Phospholipide gehören ebenso wie Galaktolipide zu den pflanzlichen Strukturlipiden. Beide sind in den Zellmembranen der Blatt- und Stützgewebe lokalisiert. Trotz ihres relativ hohen Gehaltes an essentiellen Fettsäuren sind die Strukturlipide ernährungsphysiologisch praktisch bedeutungslos, da ihr Anteil an der Gesamtnahrung sehr gering ist.

Anlaß zur genaueren Untersuchung geben Phospho- und Galaktolipide u.a. wegen der bei der Lagerung getrockneter und gefrorener Gemüse aus ihnen entstehenden Abbauprodukte, die Vorläufer für die Bildung von Aromastoffen oder von Off-flavor-Stoffen sein können.

Als Ursache für die Bildung sensorisch wirksamer Substanzen wird vielfach eine Reaktionsfolge angenommen, in deren Verlauf zunächst durch Einwirkung von Acylhydrolasen freie Fettsäuren vom Linolsäuretyp entstehen, die auf enzymatischem Wege in Hydroperoxydiensäuren umgewandelt werden. Aus diesen können dann sensorisch hochwirksame Carbonylfragmente entstehen (1–6). Der Weg, auf dem dies geschieht, wird kontrovers diskutiert (vgl. 3, 7, 8). Auch die Reduktion der intermediär entstehenden Hydroperoxydiensäuren durch Wasserstoffdonatoren unter Mitwirkung von Lipoperoxidase, wie sie von Heimann und Mitarbeitern (9) bei Hafer nachgewiesen wurde, ist denkbar.

In gefrorenen Petersilienblättern wurden von uns geringe Mengen konjugierter Diene nachgewiesen, was auf die Entstehung von Hydroperoxydiensäuren hinweist (10). In wesentlich größerem Umfang werden Lipide jedoch unter Gefrierbedingungen durch solche enzymatischen Prozesse verändert, in deren Verlauf keine Fettsäuren freigesetzt werden – was bei der Beurteilung der Bedeutung enzymatischer Prozesse für die Off-flavor-Bildung in gefrorenen pflanzlichen Materialien bisher zu wenig beachtet worden ist: Aus Galaktolipiden entstehen bei der Gefrierlagerung unter dem Einfluß von Acyltransferasen hauptsächlich Acyl-Galaktolipide (11), aus Phospholipiden durch Einwirkung von Phospholipase D Phosphatidsäure (12).

Nachdem wir den Abbau der Galaktolipide in gefrorenen Petersilienblättern bereits näher beschrieben haben (10), wird in dieser Arbeit der Phospholipidabbau in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur untersucht.

*) Herrn Professor Dr. Werner Heimann zum 70. Geburtstag gewidmet.

2 Material und Methoden

2.1 Vorbereitung der Proben und Lagerung

Im Handel bezogene Petersilie wurde gewaschen, von groben Stengeln befreit, in Plastikbeuteln in flacher Schicht verpackt, bei -50°C gefroren und bei -12 , -18 , -24 , -32 und -50°C eingelagert.

Nach den jeweiligen Lagerungszeiten wurden die Abbaureaktionen durch Umlagern nach -50°C gestoppt und die Proben bei dieser Temperatur bis zur Extraktion aufbewahrt.

2.2 Extraktion

Jeweils 1 g der gefrorenen, bei -18°C gemahlenen Petersilienproben wurde mit 10 ml Chloroform/Äthanol 1:2 übergossen und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, der Rückstand in 1 ml Chloroform aufgenommen und die Lösung in Schraubdeckelgläsern mit teflonbeschichteter Dichtung aufbewahrt.

2.3 Dünnschichtchromatographie

Die Trennung der Lipide erfolgte auf $20 \times 20\text{-cm}$ -Kieselgel-Fertigplatten (Merck, Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator). Fließmittel: Chloroform/Methanol/7 n-Ammoniumhydroxyd 60:35:5; Kammersättigung.

2.4 Phosphorbestimmung

Die Flecken wurden nach dem Sichtbarmachen mit Joddampf und Anfeuchten der Schicht abgekratzt und die Proben ohne Abtrennung des Kieselgels verascht.

Hierzu wurden sie mit jeweils 1 ml einer Mischung aus 10 n-Schwefelsäure, 0,1 m-Perjodsäure und 95%igem Äthanol (3:1:6) 45 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt (13). Die Mischungen wurden mit 2,5 ml Wasser verdünnt, mit 0,5 ml einer 10%igen Ammoniummolybdatlösung versetzt und zur Extraktion des entstandenen Phosphormolybdänsäurekomplexes mit 3 ml Benzol/Butanol 1:1 15 s kräftig geschüttelt (14)¹⁾. Nach dem Trennen der Phasen durch Zentrifugieren wurden 2 ml von der organischen Phase mit 3 ml einer 3,2%igen methanolischen Schwefelsäurelösung verdünnt und mit 0,5 ml Zinnchloridlösung versetzt (Blaufärbung).

Die Zinnchloridlösung wurde täglich frisch durch Verdünnen von 0,1 ml einer Standardlösung (1 g SnCl_2 in 2,5 ml konz. HCl) mit 4 ml 1 n H_2SO_4 bereit.

Die Messung erfolgte bei 740 nm gegen eine Blindprobe; diese wurde dadurch erhalten, daß eine substanzfreie Kieselgelzone von adäquater Größe der Veraschungs- und Extraktionsprozedur unterworfen wurde. Die Berechnung des P-Gehaltes erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit definierten Mengen Dinatrium-hydrogenphosphat erstellt wurde. Das Phosphat wurde dazu der Veraschungsprozedur in Gegenwart von Kieselgel unterworfen und wie die Phospholipide weiterbehandelt.

3 Ergebnisse

In Abbildung 1 ist ein Dünnschichtchromatogramm von Lipidextrakten aus Petersilienproben, die 3 Tage bei verschiedenen Temperaturen gelagert worden waren, dargestellt. Die Lipide wurden durch ihre R_f -Werte in verschiedenen Fließmitteln sowie durch Standard-Farbreaktionen identifiziert. Für die Phosphatidsäure ist der große Unterschied der

¹⁾ Benzol kann durch Toluol ersetzt werden, wie inzwischen durchgeführte Untersuchungen ergaben.

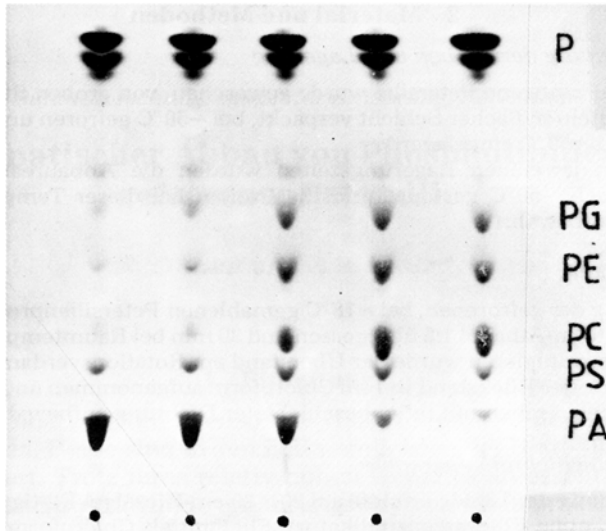


Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm von Lipidextrakten gefrorener, unblanchierter Petersilie nach 3tägiger Lagerung bei -12 , -18 , -24 , -32 und -50 °C (von links nach rechts). Fließmittel: Chloroform/Methanol 7 n-Ammoniumhydroxyd 60:35:5
Sichtbarmachung: Phosphat-Sprühareagens

P: Pigmente

PG: Phosphatidylglycerin

PE: Phosphatidyl-ethanolamin (Kephalin)

PC: Phosphatidylcholin (Lecithin)

PS: Phosphatidylserin

PA: Phosphatidsäure

Rf-Werte in sauren und alkalischen Fließmitteln charakteristisch: Der Rf-Wert in dem hier verwendeten Fließmittel beträgt 0,2, während mit Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 85:25:15:3 ein Wert von 0,8 gemessen wurde (vgl. 15 und 16).

Man sieht, daß schon bei -18 °C ein weitgehender Abbau der Phospholipide eingetreten ist und daß sich gleichzeitig entsprechende Mengen an Phosphatidsäure gebildet haben. Auch bei -32 °C ist noch eine geringfügige Bildung von Phosphatidsäure zu erkennen. Die rechte Fleckenreihe gibt den nativen Zustand wieder, da bei dieser Temperatur (-50 °C) keine Lagerungsveränderungen eintreten.

In Abbildung 2 (oben) ist der Lecithinabbau graphisch dargestellt. Die Abbaukurven verlaufen bei allen Temperaturen nach anfänglich steilem Abfall bereits nach wenigen Tagen annähernd parallel zur Zeitachse – d.h., der Abbau kommt je nach der Lagerungstemperatur auf höheren oder niedrigeren Niveaus praktisch vollständig zum Stillstand.

Die Kurven für die Bildung der Phosphatidsäure (Abb. 2, unten) verlaufen ziemlich genau spiegelbildlich zu den Lecithinabbau-Kurven, woraus sich der unmittelbare Bezug der beiden Reaktionen zueinander ergibt.

Der Lecithinabbau ist bei allen Temperaturen nach ca. 1 Woche praktisch abgeschlossen. Nach dieser Zeit sind bei -12°C nur noch etwa 16 % des ursprünglich vorhandenen Lecithins übrig; bei -18°C sind es noch ca. 25, bei -24°C ca. 43 und bei -32°C ca. 82 %.

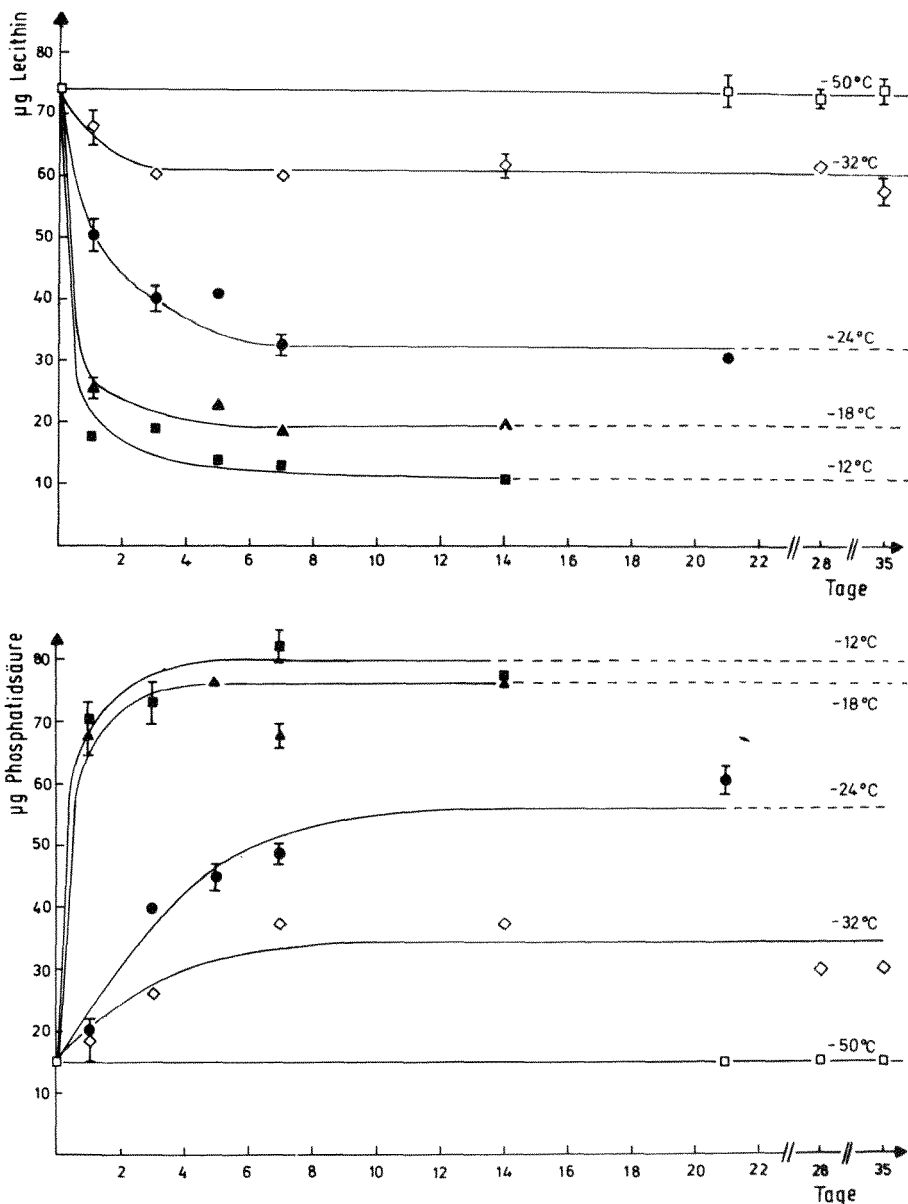


Abb. 2. Zeitverlaufskurven des Lecithinabbaus (oben) und der Phosphatidsäurebildung (unten) in unblanchierter tiefgefrorener Petersilie bei verschiedenen Temperaturen.

4 Diskussion

Die Lecithinabbau-Kurven lassen erkennen, daß auch unter praxisüblichen Gefrierlagerungsbedingungen in Petersilie noch Enzymreaktionen mit beträchtlicher Geschwindigkeit ablaufen können. Die Phospholipase D entfaltet dabei eine besonders hohe Aktivität; diese ist um etwa das 10fache größer als die Aktivität der den Galaktolipidabbau bewirkenden Acyltransferasen (vgl. 11). Die Reaktionen werden offenbar durch die Gefrierschädigung der Zellmembranen ausgelöst. (Im Gegensatz zur Gefrierlagerung bleiben nach unseren Beobachtungen die Phospholipide bei Kühlagerung [$+5^{\circ}\text{C}$] über Wochen unverändert erhalten.)

Die Dominanz der Phospholipase-D- und Acyltransferasewirkungen bei den Lipidabbauvorgängen läßt Zweifel aufkommen, ob dem eingangs erwähnten lipolytisch-oxydativen Abbaumechanismus auch in gefrorenen Blattgeweben Bedeutung zukommt. Mit dem Nachweis der Phosphatidsäure und dem 6-Acyl-monogalaktosyldiglycerid als den hauptsächlichen Abbauprodukten der Phospho- bzw. Galaktolipide ist allerdings die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß in geringem Umfang auch Fettsäuren aus den nativen Lipiden abgespalten und über die Bildung von Hydroperoxyden in sensorisch wirksame Substanzen umgewandelt werden. Trotz der geringen Umsatzmengen könnten solche Reaktionsfolgen im Hinblick auf ihre sensorischen Wirkungen von Belang sein, da die Geschmacksschwellenwerte der Reaktionsprodukte im ppb-Bereich liegen können (17). Um diese Frage zu klären, wäre es jedoch erforderlich, entsprechende Carbonylverbindungen in den gefrierengelagerten Produkten direkt nachzuweisen.

Daß die Abbaureaktionen bereits nach wenigen Tagen auf bestimmten, durch die Lagerungstemperatur gegebenen Niveaus zum Stillstand kommen, hängt möglicherweise damit zusammen, daß die Mobilität der Reaktionspartner mit sinkender Temperatur als Folge der immer weiter eingengten Bereiche flüssiger Phasen in zunehmendem Maße eingeschränkt wird. So sind in Obst- und Gemüsesäften bei -18°C noch etwa 8 %, bei -32°C nur noch 4 % des insgesamt vorhandenen Wassers nicht kristallisiert (18), stehen also für Diffusionsprozesse noch zur Verfügung. Angaben über den Anteil flüssiger Phasen in Blattgeweben liegen uns nicht vor – jedoch kann auch bei diesen davon ausgegangen werden, daß bis herab zu sehr tiefen Temperaturen bestimmte Anteile des Gesamtwassers nicht ausgefroren sind und somit den Ablauf enzymatischer Reaktionen in eingeschränktem Maße zulassen.

Wollte man die Abbaureaktionen durch Absenkung der Lagerungstemperatur unterbinden, wären hierzu Temperaturen unter -32°C erforderlich, die sich in der Praxis nicht realisieren ließen. Wie sensorische Untersuchungen ergaben, beeinflussen die bei -24°C noch stattfindenden Umsetzungen die sensorische Qualität der Petersilie auch bei Lagerungsperioden von etwa einem Jahr höchstens in unbedeutendem Maße (11). Auch diese Temperatur kann jedoch aus Gründen der Energieeinsparung nicht empfohlen werden.

Bei -18°C verschlechtert sich die sensorische Qualität schon nach 2 Monaten deutlich (11). Unblanchiert eingefrorene Petersilie sollte daher nur kurzfristig gelagert werden. Durch Blanchieren (1 min in siedendem Wasser) kann man den Lipidabbau ebenso wie andere, möglicherweise

qualitätsverschlechternde Enzymreaktionen unterbinden. Auf diese Weise lassen sich längere Lagerungszeiten erreichen, ohne daß dadurch die sensorischen Eigenschaften der Petersilie wesentlich beeinträchtigt werden.

Zusammenfassung

In nichtblanchierter gefrorener Petersilie werden die Phospholipide mit beträchtlicher Geschwindigkeit durch Phospholipase D abgebaut. Die Abbaureaktionen kommen jedoch bereits nach wenigen Tagen zum Stillstand, wobei je nach der Temperatur mehr oder weniger große Restmengen an unveränderten Lipiden zurückbleiben. Bei -12°C sind dies ca. 16 %, bei -18°C ca. 25, bei -24°C ca. 43 und bei -32°C ca. 82 %.

Die Bedeutung der Lipidabbaureaktionen für die bei der Gefrierlagerung eintretende Qualitätsverschlechterung wird diskutiert.

Summary

In non-blanchied deep-frozen parsley, the phospholipids are rapidly decomposed by phospholipase D. However, the degradation reactions stop already after a few days, with varying quantities of unchanged lipids remaining depending on the temperature. At -12°C approx. 16 % are retained, at -18°C approx. 25 %, at -24°C approx. 43 % and at -32°C approx. 82 %.

The importance of the lipid-degradation reactions for the quality loss during frozen storage is discussed.

Schlüsselwörter: Petersilie, Gefrierlagerung, Lecithin, Phosphatidsäure, Phospholipase D

Literatur

1. Whitfield, F. B., J. Shipton: *J. Food Sci.* **31**, 328–331 (1966).
2. Bengtsson, B., I. Bosund: *J. Food Sci.* **31**, 474–481 (1966).
3. Rhee, K. S., B. M. Watts: *J. Food Sci.* **31**, 675–679 (1966).
4. Purr, A.: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **72**, 725–732 (1970).
5. Galliard, T., Mitarb.: *Phytochemistry* **15**, 1647–1650 (1976).
6. Galliard, T., M. P. Rayward-Smith: *J. Food Biochem.* **1**, 351–359 (1977).
7. Galliard, T., D. R. Phillips: *Biochem. Biophys. Acta* **431**, 278–287 (1976).
8. Grosch, W., G. Laskawy, K.-H. Fischer: *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* **7**, 335–338 (1964).
9. Heilmann, W., P. Dresen, P. Schreier: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **152**, 147–151 (1973).
10. Duden, R., G. Hübner: *Z. Ernährungswiss.* **20**, 270–274 (1981).
11. Duden, R., A. Fricker: *Z. Ernährungswiss.* **20**, 172–181 (1981).
12. Kates, M.: *Adv. Lipid Res.* **8**, 225–265 (1970).
13. Rosenthal, A. F., C.-H. Han: *J. Lipid Res.* **10**, 243–245 (1969).
14. Kilroe-Smith, T. A.: *J. Chromatog.* **41**, 116–117 (1969).
15. Tevini, M.: In: *Biol. Arbeitsbücher* Nr. 21, S. 109, Quelle & Meyer (Heidelberg 1978).
16. Ongun, A., W. W. Thomson, J. B. Mudd: *J. Lipid Res.* **9**, 409–415 (1968).
17. Grosch, W.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **157**, 70–83 (1975).
18. Riedel, L.: *Kältetechnik* **2**, 195–202 (1950).

Für die Verfasser:

Dr. R. Duden, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20,
7500 Karlsruhe