

## Enzymatischer Carotinabbau in Erbsen, Sojabohnen, Weizen und Leinsamen

Franziska Weber, Gudrun Laskawy und Werner Grosch\*

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie München (BRD)

Eingegangen am 7. Mai 1973

### Enzymatic Carotene Destruction in Peas, Soy Beans, Wheat and Flax Seed.

*Summary.* Extracts from peas, soy beans, wheat and flax seed were separated by gel or ion-exchange chromatography. The carotene-bleaching-activity was tested in the eluates: The lipoxigenase isoenzymes with a pH optimum of 6,5 are very potent carotene oxidases if linoleic acid is present in the incubation medium. Such carotene oxidases occur in peas, soy beans and wheat. — In contrast the alkaline lipoxigenase isoenzyme from soy beans, the hydroperoxide isomerase from flax seed and the peroxydases from wheat and soy beans are very poor carotene oxydases. The carotene-bleaching activity of the pH 6,5 lipoxigenases was inhibited by NDGA. During the test on carotene oxydases activity the carotene was not oxidized by the linoleic acid hydroperoxides.

*Zusammenfassung.* Extrakte aus Erbsen, Sojabohnen, Weizen und Leinsamen wurden durch Gel- oder Ionenaustauschchromatographie getrennt. Die Bestimmung der Carotin-Abbau-Aktivität der Eluate ergab: Die Lipoxigenase-Isoenzyme mit einem pH-Optimum bei 6,5 sind sehr wirksame Carotinoxidasen, wenn Linolsäure im Incubationsansatz vorhanden ist. Solche Carotinoxidasen kommen in Erbsen, Sojabohnen und im Weizen vor. Im Unterschied dazu bauen die alkalische Lipoxigenase aus Sojabohnen, die Hydroperoxidisomerase aus Leinsamen und die Peroxydase aus Weizen und Sojabohnen nur sehr langsam das Carotin ab. Gehemmt wird die Carotin-Bleichung der pH 6,5-Lipoxigenasen durch NDGA. Linolsäurehydroperoxide oxydieren nicht das  $\beta$ -Carotin während der Bestimmung der Carotinoxidase-Aktivität.

### Einleitung

Die in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft vorkommenden Carotinoide unterliegen einem Abbau, wenn Sauerstoff in das Gewebe eindringen kann. Als Folge davon treten Veränderungen in der Farbe (Bleichung) und im Aroma auf. — In der Literatur wird eine Mitwirkung verschiedener Enzyme am Polyen-Abbau diskutiert:

1. Das Enzym Lipoxigenase (EC 1.13.1.13) wurde von Sumner u. Sumner [1] als „Carotin-Oxydase“ identifiziert. In Gegenwart von Linolsäure oxydiert es  $\beta$ -Carotin nacheinander zum  $\beta$ -Carotin-5,6-epoxid und Luteochrom [2]. Außerdem bricht das  $C_{40}$ -Kohlenstoffgerüst auseinander und es entsteht u. a. das  $\beta$ -Ionon [3]. Den Ablauf der Co-Oxydation der Carotinoide durch das System Lipoxigenase/Linolsäure/Sauerstoff erklären Tappel [4] und Smith u. Lands [5] mit den Vorstellungen, die über die Vorgänge bei der Autoxidation der Carotinoide in Gegenwart von Fettsäuren entwickelt worden sind [6]. Wie bei der Fettautoxidation, so sollen auch bei der Lipoxigenasekatalyse im gewissen Umfang Oxyl- und Peroxylradikale entstehen. Diese Radikale abstrahieren H-Atome der Polyene oder addieren, z. B. bei der Bildung des  $\beta$ -Carotin-5,6-epoxids, Sauerstoff an bestimmte Doppelbindungen. Folgereaktionen können einsetzen, aus denen niedermolekulare aromaaktive Verbindungen hervorgehen. Auch Häm- und Hämiproteine können peroxidierte Lipide in Oxyl- und Peroxylradikale zersetzen. Blain u. Mitarb. [8, 9] führen auf diese Reaktion den Lycopin-Abbau in der Tomate zurück, während Großman u. Mitarb. [10—12] Extrakte aus Lucerne an CM-Cellulose in Fraktionen trennen konnten, in denen entweder Hämverbindungen oder Lipoxigenase-ähnliche Enzyme vorkommen, die in Gegenwart bestimmter Fettsäuren eine Bleichung des Carotins beschleunigten.

2. Versuche von Kies u. Mitarb. [13] weisen darauf hin, daß ein weiteres Enzym die Carotinbleichende Wirkung der Lipoxigenase erheblich steigern kann. So zeigten Incubationsansätze mit einem Soja-Extrakt und der daraus isolierten Lipoxigenase: Das gereinigte Enzym bleicht zwar das Carotin, doch ist seine auf die Lipoxigenase-Aktivität bezogene Carotin-Oxydase-Aktivität 10<sup>6</sup>mal geringer als die des rohen Extraktes. Wird der Extrakt 6 min auf 68° C erhitzt, so verschwindet die „Carotin-Oxydase“ bei unveränderter Lipoxigenase-aktivität. Zimmerman u. Vick [14] nehmen an, daß hier die Carotin-Bleichung durch das Enzym Hydroperoxid-Isomerase

\* Die Arbeit wurde durch eine Beihilfe des Fonds der chemischen Industrie gefördert.

verursacht wird. Das Enzym wurde in Leinsamen, Mais, Gerste, Weizenkeimen und Sojabohnen gefunden. Es isomerisiert die aus der Lipoxygenase-Katalyse hervorgehenden Hydroperoxide zu  $\alpha$ -Ketolen, die im Zuge eines Tautomerie-Gleichgewichts in Endiole übergehen. Es wird nun angenommen, daß die Endiol-Fettsäuren das Carotin zu farblosen Verbindungen reduzieren können.

3. Dicks u. Friend [15, 16] entdeckten in Zuckerrübenblättern ein System, bestehend aus einer Peroxidase, Oxalsäure und einem thermolabilen Faktor, das bei pH 3,8 den Carotinoidgentiobioseester Crocin oxydativ abbaut. Möglicherweise wird Oxalsäure durch den thermolabilen Faktor in ein Substrat für die Peroxidase umgewandelt, denn in Incubationsversuchen mit der Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7) wurde eine Abnahme der Crocin-Konzentration beobachtet, wenn die für die Peroxidase-Katalyse bekannten H-Donatoren ( $H_2O_2$ , Indolylessigsäure oder Dihydroxyfumar säure) zugegen waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Carotin-Abbau-Aktivitäten von Extrakten aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft untersucht, in denen von den unter 1.–3. genannten Enzymen die Lipoxygenase allein (Erbse), Lipoxygenase + Peroxidase (Soja, Weizen) oder Lipoxygenase + Hydroperoxidisomerase (Leinsamen) vorkommen. Durch eine chromatographische Auftrennung der genannten Enzyme wurde sichtbar, daß von den Lipoxygenasen mit einem pH-Optimum bei pH 6,5 die größte Carotin-Abbau-Aktivität ausgeht.

## Experimenteller Teil

### 1. Material und Reagentien

$\beta$ -Carotin (Hoffmann-La Roche)<sup>1</sup>; Linolsäure (Sigma, Grade III, 99%), Tween 20 u. Tween 80 (Schuchardt); Lipoxygenase (Sigma, Type I, 50000 E/mg), EDTA (Merck, Titriplex III); Guajacol (Merck), Nordihydroguajaretsäure (Roth),  $H_2O_2$  (Merck), Sephadex G 50 und G 200 (Pharmacia); DEAE-Cellulose (Serva); CM-Sephadex (Pharmacia). Alle weiteren Reagentien waren pro-analysi-Substanzen. Erbsen (*Pisum sativum* L., „Mignon“), Sojabohnen<sup>1</sup> (*Glycine hispida*), Weizen<sup>1</sup> (*Triticum aestivum* L., „Kolibri“), Leinsamen (*Linum usitatissimum*).

### 2. Herstellung der Extrakte (Alle Arbeiten bei 2–4° C)

a) Leinsamen. 20 g gemahlener Leinsamen (entfettet mit Aceton) 10 min mit 120 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 rühren. Nach Grobfiltration durch eine Lage Baumwolltuch klar zentrifugieren (30 min; 15000  $\times$  g). Mit  $(NH_4)_2SO_4$  den Überstand zu 50% sättigen, die ausgefallenen Proteine abzentrifugieren und in 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 lösen.

b) Erbsen. 10 g gemahlene Erbsen mit 100 ml 0,01 m-Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 extrahieren, grob filtrieren und klar zentrifugieren (30 min; 15000  $\times$  g). Den Extrakt über Sephadex G 50 filtrieren; die mit  $V_0$  eluierten Proteine für die Chromatographie an DEAE-Cellulose sammeln.

c) Soja (gemahlen und mit Petroläther entfettet). Extraktion und Abtrennung der niedermolekularen Inhaltsstoffe durch Gelfiltration wie unter 2b beschrieben.

d) Weizen. 40 g gemahlene und mit Petroläther entfettete Weizenkörner 30 min mit 400 ml 0,05 m Na-Citrat-Puffer pH 5,5 rühren. Nach Zentrifugieren (30 min; 15000  $\times$  g) im Überstand eine Proteinfraction durch Sättigen mit  $(NH_4)_2SO_4$  (30–60%) fällen. Nach Zentrifugation (30 min; 15000  $\times$  g) den Niederschlag in 30 ml 0,05 m-Na-Citrat-Puffer pH 5,5 lösen und 18 Std dialysieren. Die dialysierte Proteinlösung vor der Aufgabe auf eine CM-Sephadex-Säule klar zentrifugieren.

### 3. Gel- und Ionenaustauschchromatographie

Die experimentellen Einzelheiten sind in den Legenden zu den Abb. angegeben.

### 4. Bestimmung der Enzymaktivitäten (bei 23° C) in den Eluaten

a) Lipoxygenase nach Surrey [18]. Linolsäure-Emulsion: 40 mg Linolsäure in 5 ml Wasser mit 50  $\mu$ l Tween 20 durch Zugabe von n-NaOH lösen. Mit HCl den pH einstellen. Auf 100 ml mit 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,5 oder 0,1 m-Na-Borat-Puffer pH 9,0 verdünnen.

Test: in eine 1-cm-Quarzküvette 2,9 ml Substrat pipettieren. Nach Zugabe von 0,01–0,1 ml Enzymlösung die Zunahme von  $E_{234}$  zwischen der 30. und 90. sec messen.

b) Peroxidase nach Chance u. Machly [19]. 20 mmol Guajacol; 10 mmol  $H_2O_2$  ( $E_{240} = 0,400$ ). Test: In eine 1-cm-Küvette zu 2 ml Enzymlösung (die Probe gegebenenfalls mit dem Elutionspuffer auf 2 ml verdünnen) 0,05 ml Guajacol und 0,04 ml  $H_2O_2$  pipettieren. Messen der Zunahme von  $E_{470}$  zwischen der 15. und 90. sec.

c) Hydroperoxidisomerase. Linolsäurehydroperoxid-Emulsion (LOOH): 50 mg Linolsäure in 4 ml 1,25% Tween 20 durch Zugabe von n-NaOH lösen. Mit 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 8,3 auf 50 ml verdünnen und mit einigen Tr. HCl den pH auf 8,3 nachstellen.

<sup>1</sup> Freundlicherweise wurden uns zur Verfügung gestellt:  $\beta$ -Carotin von der Fa. Hoffmann-La Roche; Sojabohnen von der Fa. Harburger Ölwerke, Brinckmann & Mergell; Weizen von der Fa. K. Kampfmeyer Mühlenvereinigung KG.

Nach Abkühlung auf 3° C 1 mg Lipoxygenase in 1 ml 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 8,3 lösen und zum Substrat pipettieren. Incubation (3 Std) unter Rühren in einem 250 ml-Becherglas bei 1—3° C. Umsatz 98—100%. Die Emulsion 1:40 mit 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 verdünnen.

Test nach Zimmerman u. Vick [14]: Zu 2,45 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 0,53 ml LOOH-Emulsion und bis zu 0,2 ml aus jeder Fraktion pipettieren. Messen der Abnahme von  $E_{234}$  zwischen der 15. und 60. sec.

d) Carotin-Abbau mit Linolsäure als Cosubstrat. Mit 0,02—0,1 ml aus jeder Fraktion den Test nach Ben-Aziz u. Mitarb. [2] durchführen. Messen der Abnahme von  $E_{460}$  zwischen der 15. und 60. sec.

e) Carotin-Abbau mit Linolsäurehydroperoxiden als Cosubstrat. Carotin-Emulsion nach Großman u. Mitarb. [10]: 25 mg  $\beta$ -Carotin und 0,9 ml Tween 80 in 25 ml  $\text{CHCl}_3$  lösen.  $\text{CHCl}_3$  im Vakuum abziehen und den Rückstand in 250 ml EDTA-Lsg. (2,5 mg/ml) aufnehmen.

LOOH-Emulsion: Hergestellt und verdünnt, wie unter 4c beschrieben.

Test: Zu einer Mischung aus 1 ml Carotin- und 1 ml LOOH-Emulsion aus jeder Fraktion 0,1—0,5 ml pipettieren. Messen der Abnahme von  $E_{460}$  zwischen der 15. u. 60. sec.

f) Carotin-Abbau mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Cosubstrat. Carotin-Emulsion wie unter e) hergestellt; 10 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Test: Zu einer Mischung aus Carotin-Emulsion und 1 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 0,05 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung pipettieren. Nach Zugabe von 0,5 ml der Probelösung die Abnahme von  $E_{460}$  von der 15.—60. sec. messen.

### 5. Proteinbestimmung

Nach Beisenherz u. Mitarb. [7] über die Biuret-Reaktion mit Rinderserumalbumin als Eichprotein.

### 6. Darstellung der 12-Keto-13-hydroxiocitadeca-9-ensäure

*Hydroperoxidisomerase-Rohextrakt*: 20 g gemahlene und entfettete Leinsamen nach Zimmerman u. Vick [14] mit 120 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 extrahieren und durch Sättigung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40—50%) eine Protein-Fraktion mit Hydroperoxidisomerase-Aktivität fällen. Nach Zentrifugation ( $15000 \times g$ , 30 min) das Protein in 20 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 lösen.

*LOOH-Emulsion*: 100 mg Linolsäure wie in [21] beschrieben, bei pH 8,3 mit 1,5 mg Soja-Lipoxygenase peroxidieren. Anschließend mit verd. HCl pH 6,6 einstellen.

*Incubation und Isolierung des  $\alpha$ -Ketols*: Die LOOH-Emulsion (100 ml) und der Hydroperoxidisomerase-Rohextrakt bei 23° C 30 min incubieren. Nach Ansäuern (pH 2,0) mit verd. HCl den Ansatz mit  $3 \times 100$  ml Äther (peroxidfrei) extrahieren. Die vereinigten ätherischen Lösungen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  trocknen und zur DC einengen (unter  $\text{N}_2$ ). Das  $\alpha$ -KetoI dünnschichtchromatographisch (Kieselgel HF<sub>254</sub>; mit Heptan/Äther/Eisessig (50 + 50 + 1) 2mal entwickeln) abtrennen, mit Äther eluieren und nach Abzug des Elutionsmittels (unter  $\text{N}_2$ ) in 2 ml Äthanol lösen.

*Qualitative Analyse*: Die Keto-hydroxyfettsäure nach Schlenk u. Gellerman [22] methylieren und den Methyl ester dünnschichtchromatographisch [Kieselgel: Isooctan-Äther (2:3 v/v)] reinigen. Das IR-Spektrum war identisch mit dem von Zimmerman u. Vick [14] angegebenen Spektrum.

*Quantitative Analyse*: In einem Aliquot der äthanolischen Lösung die Keto-hydroxyfettsäure mit äthanol. 0,01 n-NaOH titrieren.

## Ergebnisse

Extrakte aus reifen Erbsen, Sojabohnen, Weizen und Leinsamen wurden durch Gel- oder Ionenaustauschchromatographie getrennt. Die Fraktionen wurden auf das Vorkommen von Lipoxygenase (bei pH 6,5 und 9,0), Hydroperoxidisomerase und Peroxidase untersucht. Parallel dazu wurden die Carotin-Abbau-Aktivitäten in Gegenwart der Cosubstrate Linolsäure, Linolsäurehydroperoxid (LOOH) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt.

### 1. Erbsen

In Rohextrakten traten Lipoxygenase- und Peroxidase-Aktivitäten auf. Carotin wurde in Gegenwart von Linolsäure schnell abgebaut. Auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  förderte die Bleichung von Carotin durch den Rohextrakt, doch verlief die Reaktion wesentlich langsamer als mit Linolsäure als Cosubstrat. Die aus der hier untersuchten Erbsensorte „Mignon“ extrahierte Peroxydase war sehr labil. Ihre Aktivität nahm in Lösung so rasch ab, daß sie nach einer Trennung des von niedermolekularen Inhaltsstoffen befreiten Extraktes an DEAE-Cellulose nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 1). Sichtbar wurden aber Proteine mit Lipoxygenase-Aktivität (pH-Optimum: 6,3; Linolsäure/Tween 20-Substrat). Die Fraktionen, in denen die Lipoxygenase vorkam, bleichten auch Carotin, wenn der Incubationsansatz Linolsäure enthielt. — Das

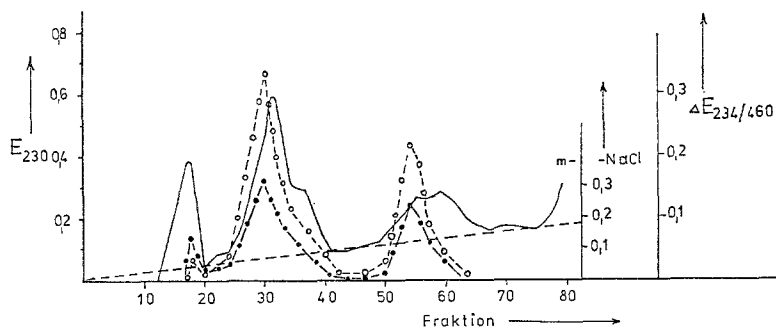


Abb. 1. Extrakt aus Erbsen, Chromatographie an DEAE-Cellulose. Säule  $32 \times 2,5$  cm; Elution:  $0,01$  m-Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 mit linearem NaCl-Gradient ( $0,0 \rightarrow 0,18$  m). — Probe:  $80$  mg Protein;  $8,75$  ml pro Fraktion. Die Aktivitäten wurden bei pH 6,5 bestimmt. — —○—○— Lipoxygenase ( $10 \mu\text{l}$ )<sup>2</sup>, —●—●—●— Carotinoxidase mit Linolsäure als Cosubstrat ( $100 \mu\text{l}$ ), — Protein

in den Fraktionen 25–40 (Abb. 1) auftretende Isoenzym (Lipoxygenase-2) wurde isoliert [23]. Es zeigte sich keine Veränderung in dem Verhältnis der Lipoxygenase-zur Carotinoxidase-Aktivität während der Aufarbeitung [26]; d. h. dieses Isoenzym ist mit einer Carotinoxidase identisch. Ebenso wie die Lipoxygenase-, so wird auch die Carotinoxidase-aktivität des Erbsen-Enzyms durch Nordihydroguajaretsäure (NDGA) gehemmt;  $5 \cdot 10^{-5}$  m-NDGA bringen die Carotin-Bleichung sofort nach der Zugabe in der 90. sec zum Stillstand (Abb. 2).

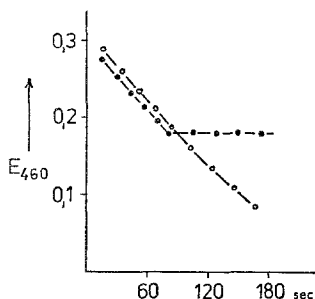


Abb. 2. Hemmung des Carotin-Abbaus durch NDGA. Im Ansatz ( $2,1$  ml):  $1,9 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{mol}$   $\beta$ -Carotin,  $0,98 \mu\text{l}$  Tween 80,  $0,25$  mg EDTA,  $1,75 \mu\text{mol}$  Linolsäure,  $0,5 \mu\text{g}$  Lipoxygenase (Erbsen),  $2,1$  ml  $0,05$  m-Na-Phosphatpuffer pH 6,6. — In der 90. sec: —○—○— Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  Äthanol, —●—●— Zugabe von  $30 \mu\text{g}$  NDGA gelöst in  $10 \mu\text{l}$  Äthanol

Bei der äroben Incubation wird die Linolsäure von der Lipoxygenase zur Hydroperoxisäure (LOOH) oxydiert [24]. Zur Prüfung, ob diese Verbindung den Carotin-Abbau verursacht, wurden  $8,5 \cdot 10^{-6}$  m- $\beta$ -Carotin (emulgiert mit Tween 80 in  $0,05$  m-Na-Phosphatpuffer pH 6,6)  $2$  min mit steigenden LOOH-Konzentrationen ( $1,25 \cdot 10^{-4}$  —  $2,5 \cdot 10^{-3}$  m) incubiert. Gefunden wurde auch in Gegenwart von  $2,5 \cdot 10^{-3}$  m-LOOH kein Carotin-Abbau, obwohl diese LOOH-Konz. um den Faktor 100 größer ist als die LOOH-Konz., die sich unter den Bedingungen des Carotinoxidase-Tests bildet.

<sup>2</sup> Anm. In ( ) sind die Probevolumina angegeben, die aus jeder Fraktion für die Aktivitätsbestimmungen eingesetzt worden sind (Gilt für alle Abb.).

## 2. Soja

In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Christopher u. *Mitarb.* (25) konnte ein Rohextrakt durch Chromatographie an DEAE-Cellulose in zwei Lipoxygenasen getrennt werden, die bei pH 6,5, und eine Lipoxygenase, die bei pH 9,0 maximal aktiv sind (Abb. 3). Bemerkenswert ist, daß von diesen drei Lipoxygenasen nur die bei pH 6,5 optimal aktiven Proteine (Lipoxygenasen-2 und -3 nach der Nomenklatur von Christopher u. *Mitarb.* [25] Carotin mit Linolsäure als Cosubstrat mit schneller Reaktion abbauen. Das Theorell-Enzym (Lipoxygenase-1) vollzieht dagegen eine Cooxydation des  $\beta$ -Carotins nur sehr langsam. Diese geringe Carotinoxidase-Aktivität wurde auch von Kies u. *Mitarb.* [13] beobachtet.

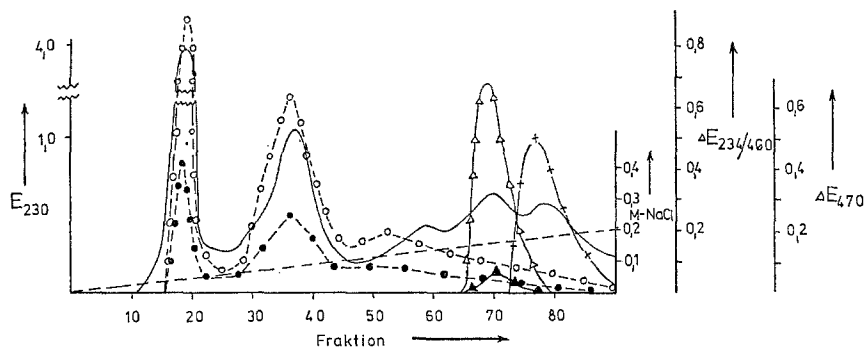


Abb. 3. Extrakt aus Sojabohnen; Chromatographie an DEAE-Cellulose. Säule und Elution wie Chromatographie des Erbsenextraktes (vgl. Abb. 1). — Probe: 238 mg Protein, 8,75 ml pro Fraktion. Die Aktivitäten wurden bei pH 6,5 und pH 9,0 bestimmt. ---○---○ Lipoxygenase pH 6,5 (10  $\mu$ l), ---●---● Carotinoxidase mit Linolsäure als Cosubstrat pH 6,5 (20  $\mu$ l), ---△---△ Lipoxygenase pH 9,0 (10  $\mu$ l), ---▲---▲ Carotinoxidase mit Linolsäure als Cosubstrat pH 9,0 (20  $\mu$ l), -+--+ Peroxydase, — Protein

Im Eluat der DEAE-Cellulose-Chromatographie trat auch eine Peroxydase auf (Abb. 3). Für einen nachweisbaren Carotin-Umsatz in Gegenwart von  $H_2O_2$  war jedoch ihre Aktivität zu gering. Mit den LOOH als Cosubstrat wurde ein langsamer Carotin-Abbau festgestellt, wenn Fraktionen mit Lipoxygenase-Aktivität getestet wurden. Hydroperoxidisomerase-Aktivität wurde aber nicht beobachtet.

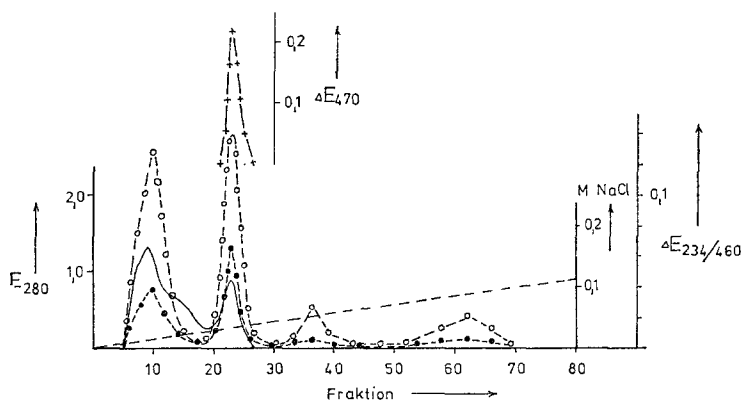


Abb. 4. Ammonsulfatpräparat aus Weizen; Chromatographie an CM-Sephadex. Säule: 24  $\times$  1 cm; Elution: 0,05 m-Na-Citrat-Puffer pH 5,5 mit linearem NaCl-Gradienten (0,0  $\rightarrow$  0,11 m). — Probe: 72 mg Protein; 3 ml pro Fraktion. Die Aktivitäten werden bei pH 6,6 bestimmt. ---○---○ Lipoxygenase (20  $\mu$ l), ---●---● Carotinoxidase mit Linolsäure als Cosubstrat (100  $\mu$ l), -+--+ Peroxydase (0,1 ml), — Protein

## 3. Weizen

In Anlehnung an Graveland [17] wurde ein Ammoniumsulfat-Präparat aus Weizen an CM-Sephadex getrennt. Im Eluat (Abb. 4) traten zwei Proteinfractionen mit hoher und zwei mit geringer Lipoxygenase-Aktivität auf, wenn der Test bei pH 6,6 durchgeführt wurde. Eine alkalische Lipoxygenase wurde nicht beobachtet. Von jeder Lipoxygenase ging auch Carotinoxidase-Aktivität aus (Abb. 4), doch war die Relation zwischen den beiden Aktivitäten unterschiedlich. Nur das in den Fractionen 20–26 auftretende Enzym erreichte das Lipoxygenase-/Carotinoxidase-Aktivitätsverhältnis der pH 6,5-Lipoxygenase-Isoenzyme aus Leguminosen. – Diese Lipoxygenase konnte von einer Peroxydase nicht getrennt werden. Diese Peroxydase wurde geprüft, ob sie Carotin mit  $H_2O_2$  als Cosubstrat bleichen kann (Tab. 1). Gefunden wurde ein sehr langsamer Abbau; d. h. die Carotinoxidase-Aktivität dieser Peroxydase bleibt um Zehnerpotenzen hinter der der Lipoxygenase zurück. Bemerkenswert ist nur die Beschleunigung der Reaktion, wenn der pH auf 3,6 abgesenkt wird (Tab. 1). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Dicks u. Friend [15, 16] überein.

Tabelle 1. Carotin-Abbau durch die Peroxydase aus Weizen<sup>a</sup>

pH	$\Delta E_{460} \times 10^3$ von der 15.–60. sec
6,6	4
3,6	12

<sup>a</sup> Im Ansatz: 0,5 ml aus Fraktion 23 (Abb. 4) — 2,0 ml Carotin-Emulsion (2 ml 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 oder 0,1 m-Na-Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,6; 10  $\mu$ g  $\beta$ -Carotin, 0,66  $\mu$ l Tween 80, 0,5 mg EDTA) — 0,05 ml 10 mmol- $H_2O_2$ .

## 4. Leinsamen

Die Auftrennung der Enzyme erfolgt durch Gelchromatographie (Abb. 5). Auch hier war die Lipoxygenase-Aktivität von einem Carotin-Abbau begleitet, wenn Linolsäure bei der Incubation als Cosubstrat mitwirkte. „Carotinoxidase“- und Lipoxygenase-Gipfel sind aber nicht kongruent; deutlich verschoben treten die Aktivitätsmaxima auf. Auch ist die Carotinoxidase – im Verhältnis zur Lipoxygenase-Aktivität – wesentlich geringer als bei den Leguminosen. Außerdem wurde eine kleine Aktivitätsspitze mit Carotinabbau-Aktivität im Bereich des Hydroperoxidisomerase-gipfels beobachtet.

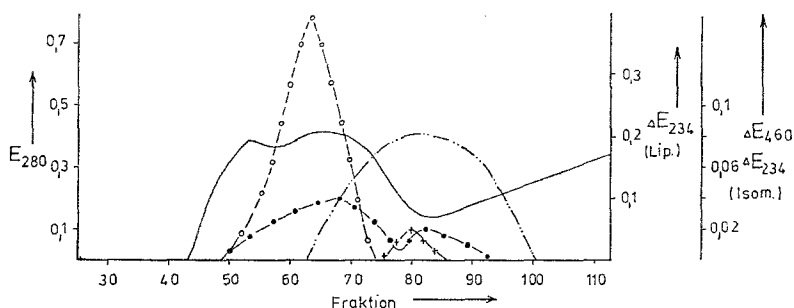


Abb. 5. Extrakt aus Leinsamen: Säule mit Sephadex G 200 (2,5 × 90 cm). Elution mit 0,05 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,6 (20 ml/h). — Probe: 96 mg Protein; 4 ml pro Fraktion. Aktivitäten bei pH 6,6 bestimmt. —○—○— Lipoxygenase (0,1 ml), —. —. — Hydroperoxidisomerase (0,1 ml), —●—●— Carotinoxidase mit Linolsäure als Cosubstrat (0,2 ml), —+—+— Carotin-Abbau mit LOOH als Cosubstrat (0,5 ml), — Protein

Folgt man den Vorstellungen von Zimmerman u. Vick [14], so müßte das Carotin durch die Hydroperoxidisomerase in Gegenwart von LOOH gebleicht werden. Tatsächlich trat auch mit diesem Cosubstrat in den Fraktionen mit Hydroperoxidisomerase-Aktivität ein Carotin-Abbau auf (Abb. 5), doch war die Geschwindigkeit gering. Zur Prüfung, ob die Bleichung durch die aus der Hydroperoxidisomerase-Katalyse hervorgehende Ketohydroxyfettsäure verursacht wird, wurde diese Verbindung nach den Angaben von Zimmerman u. Vick [14] aus den LOOH hergestellt. Der Abb. 6 ist zu entnehmen, daß erst ein erheblicher Überschuß an  $\alpha$ -Ketol bei pH 6,6 zu der erwarteten Abnahme in der Carotin-Konz. führt. Der Farbstoff reagiert nur langsam, wobei eine Verschiebung des pH in den sauren oder alkalischen Bereich die Reaktion verzögert. Wurde das Medium Puffer/Tween/EDTA durch Chloroform ersetzt, so unterblieb die Reaktion.

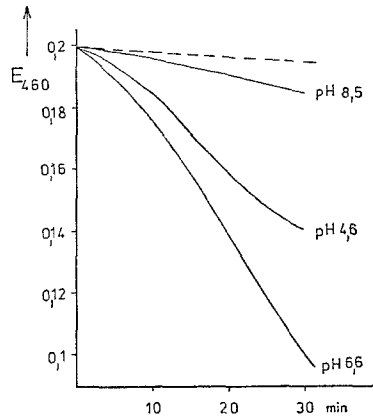


Abb. 6. Reaktion von  $\beta$ -Carotin mit dem  $\alpha$ -Ketol. Im Ansatz (2,1 ml):  $1,9 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ mol  $\beta$ -Carotin, 3  $\mu$ mol 12-Keto-13-hydroxyoctadeca-9-ensäure, 0,36  $\mu$ l Tween 80, 0,25 mg EDTA, 2 ml 0,05 m-Puffer (Na-Borat pH 8,5 — Na-Phosphat pH 6,6 — Na-Acetat pH 4,6). — — — — Kontrollen ohne  $\alpha$ -Ketol

### Diskussion

Eine vergleichende Untersuchung von Extrakten aus verschiedenen Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft ergab nach chromatographischer Trennung Hinweise, daß es sich bei den Lipoxygenase-Isoenzymen, deren Aktivitäts-Optimum im neutralen Bereich liegt, um Carotinoxydasen handelt. Diese Enzyme, die mit Linolsäure als Cosubstrat einen sehr schnellen Abbau von  $\beta$ -Carotin vollziehen, kommen in Erbsen, Sojabohnen und im Weizen vor. In einer gesonderten Arbeit wurde eines dieser Lipoxygenase-Isoenzyme aus Erbsen isoliert und seine Identität mit einer Carotinoxydase bestätigt [23, 26].

Im Vergleich zu den neutralen Lipoxygenasen reagieren sehr langsam mit dem  $\beta$ -Carotin die alkalische Lipoxygenase aus Soja (Cosubstrat: Linolsäure), die Hydroperoxidisomerase aus Leinsamen (Cosubstrat: LOOH) und die Peroxydasen aus Sojabohnen und Weizen (Cosubstrat:  $H_2O_2$ ). Diese Enzyme dürften nur dann eine Bleichung von Carotinoiden in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft verursachen, wenn keine neutralen Lipoxygenasen zur Verfügung stehen und sehr lange Reaktionszeiten, z. B. bei der Lagerung, möglich sind.

Noch unklar ist der Reaktionsablauf, der zu einer Oxydation von  $\beta$ -Carotin durch das System neutrale Lipoxygenase/Linolsäure/Sauerstoff führt. Die Hemmung der Carotin-Bleichung durch NDGA und das Ausbleiben der Reaktion, wenn nur das Reaktionsprodukt der Lipoxygenase-Katalyse, die LOOH, bei der Incubation zuge-

gen ist, weisen darauf hin, daß sie unmittelbar am Enzym stattfindet. Auch die hohe Wechselzahl von  $10^3$  Molekülen  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin, die für die pH 6,5-Lipoxygenase aus Erbsen gefunden wurde [23], macht eine Bindung des Polyens an das Enzym wahrscheinlich.

Unsere weiteren Versuche zielen darauf ab, die aus dem Polyenabbau und der Linolsäure hervorgehenden Reaktionsprodukte zu identifizieren. Außerdem muß geklärt werden, welche aus der Fettsäure und dem Sauerstoff hervorgehenden Intermediate der Lipoxygenase-Katalyse die Carotinoide oxydieren.

### Literatur

1. Sumner, J.B., Sumner, R.J.: *J. Biol. Chem.* **134**, 531 (1940).
2. Zinsou, Cl.: *Physiol. Vég.* **9**, 149 (1971).
3. Stevens, M.A.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **95**, 461 (1970).
4. Tappel, A.L.: Hematin compounds and lipoxidase as biocatalysts. In: Schultz, H.W. (Hrsg.): *Lipids and their oxidation*. Westport, Conn.: AVI Publ. Comp. Inc. 1962.
5. Smith, W.L., Lands, W.E.M.: *J. Biol. Chem.* **247**, 1038 (1972).
6. Venkatarao, P., Achaya, K.T.: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **71**, 270 (1969).
7. Beisenherz, G.H., Boltze, J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
8. Blain, J.A., Patterson, S.D.E., Pearce, M.: *J. Sci. Food Agric.* **19**, 713 (1968).
9. Blain, J.A.: *J. Sci. Food Agric.* **21**, 1 (1970).
10. Großman, S., Ben-Aziz, A., Budowski, P., Ascarelli, J., Gertler, A., Birk, J., Bondi, A.: *Phytochemistry* **8**, 2287 (1969).
11. Ben-Aziz, A., Großman, S., Budowski, P., Ascarelli, J.: *Phytochemistry* **10**, 1823 (1971).
12. Ben Aziz, A., Ascarelli, J., Budowski, P.: *Phytochemistry* **11**, 509 (1972).
13. Kies, N.W., Haining, J.L., Pistorius, E., Schröder, D.H., Axelrod, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 312 (1969).
14. Zimmerman, D.C., Vick, B.A.: *Plant Physiol.* **46**, 445 (1970).
15. Dicks, J.W., Friend, J.: *Phytochemistry* **7**, 1933 (1968).
16. Dicks, J.W.: *Phytochemistry* **9**, 1433 (1970).
17. Graveland, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 427 (1970).
18. Surrey, K.: *Plant Physiol.* **39**, 65 (1964).
19. Chance, B., Maehly, A.C.: In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Hrsg.): *Methods in enzymology*. Band II, S. 770. New York: Academic Press Inc. Publ. 1955.
20. Ben-Aziz, A., Großman, S., Ascarelli, J., Budowski, P.: *Phytochemistry* **10**, 1445 (1971).
21. Grosch, W., Senser, F., Fischer, K.: *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **147**, 140 (1971).
22. Schlenk, H., Gellerman, J.L.: *Anal. Chem.* **32**, 1412 (1960).
23. Arens, D., Seilmeier, W., Weber, F., Kloos, G., Grosch, W.: In Vorbereitung.
24. Hamberg, M., Samuelsson, B.: *J. Biol. Chem.* **242**, 5329 (1967).
25. Christopher, J.P., Pistorius, E.K., Axelrod, B.: *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 54 (1972).
26. Weber, F., Arens, D., Grosch, W.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **152**, 152 (1973).

PD Dr. W. Grosch  
 Deutsche Forschungsanstalt  
 für Lebensmittelchemie  
 D-8000 München 40, Leopoldstr. 175  
 Bundesrepublik Deutschland