

## Co-Oxydation von $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin durch gereinigte Lipoxygenasen aus Sojabohnen

Werner Grosch\*, Gudrun Laskawy und Klaus-Peter Kaiser

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie; Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, D-8046 Garching, Bundesrepublik Deutschland

### Co-oxidation of $\beta$ -Carotene and Canthaxanthine by Purified Lipoygenases from Soya Beans

**Summary.** Isolation and purification of soya bean lipoxygenase (linoleate:  $O_2$  oxidoreductase, EC, 1.13.11.12) on Sephadex G-200, DEAE-cellulose and by isoelectric focusing yields two isoenzymes of the L-2 type (optimum pH 6.5) and two of the L-1 type (optimum pH 9.0). Different crude extracts from soya beans as well as the purified L-2 isoenzymes exhibit the same capacity for co-oxidation of  $\beta$ -carotene and canthaxanthine, when the comparison is based upon equal lipoxygenase activities. In contrast to L-2 the alkaline lipoxygenase L-1 is a poor „carotene oxidase“.

**Zusammenfassung.** Die Isolierung und Reinigung der Sojabohnen-Lipoxygenase (Linolsäure:  $O_2$  Oxydoreduktase EC 1.13.11.12) an Sephadex G-200, DEAE-Cellulose und durch isoelektrische Fokussierung ergab zwei Isoenzyme vom L-2-Typ (pH-Optimum 6,5) und zwei von L-1-Typ (pH-Optimum 9,0). Verschiedene Rohextrakte aus Sojabohnen und die gereinigten L-2-Isoenzyme besaßen dieselbe Co-Oxydations-Kapazität gegenüber  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin. Im Unterschied dazu ist die alkalische Lipoxygenase L-1 eine schwache „Carotin-Oxydase“.

von Luftsauerstoff in Linol- und Linolensäure unter Bildung bestimmter Hydroperoxysäuren katalysiert [3]. In der Soja kommen zwei Formen der Lipoxygenase vor [4], die sich im pH-Optimum, der Substrat- und Wirksamkeit unterscheiden. L-1, die alkalische Lipoxygenase ( $pH_{opt}$ : 9,0), peroxydiert die freien Fettsäuren zu den 13-LOOH [5]. L-2, das neutrale Enzym, peroxydiert nicht nur die Fettsäuren, sondern auch Methylester und Triglyceride [6, 7]. Außerdem verläuft die Reaktion des L-2 nicht so gerichtet, denn es werden aus Linolsäure die 9- und 13-LOOH im Verhältnis 1:1 gebildet [8, 9].

L-1 und L-2 lassen sich in Isoenzyme trennen. Axelrod et al. [10] haben zwei neutrale und eine alkalische Lipoxygenase isoliert. Verhue u. Francke [7] bestätigten das Ergebnis, soweit es die neutralen Lipoxygenasen betrifft; fanden aber zwei alkalische Enzyme.

Bei der Isolierung und Reinigung einer Lipoxygenase aus Erbsen und bei der Gewinnung von L-1 aus Soja wurde der Quotient aus Lipoxygenase- und Carotin-Abbau-Aktivität (Co-Oxydations-Quotient) gemessen. Bei der Aufarbeitung der Erbsen wurde keine Veränderung des Quotienten festgestellt. Die isolierte Lipoxygenase, die in ihren Eigenschaften L-2 (Soja) ähnelt, ist für die hohe Carotin-Abbau-Aktivität des Rohextraktes verantwortlich [11]. Bei Soja liegen die Verhältnisse anders. Hier veränderte sich der Co-Oxydations-Quotient bei der Isolierung der alkalischen Lipoxygenase drastisch [12], denn  $\beta$ -Carotin wird von L-1 im Vergleich zum Rohextrakt mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit abgebaut.

Durch Chromatographie an einem DEAE-Ionenaustauscher können die neutralen Lipoxygenasen von dem alkalischen Enzym getrennt werden [10, 13]. Untersuchungen der Eluate ergaben, daß die Fraktionen, in denen die neutralen Lipoxygenasen vorkamen, wesentlich schneller  $\beta$ -Carotin abbauten als L-1 [13, 14]. Durch diese Versuche mit Rohpräparaten ist aber für die Soja noch nicht gesichert, daß die Co-Oxydation der Carotinoide allein von den neutralen Enzymen katalysiert wird. Die vorliegende Arbeit dient einer Klärung dieser Frage.

### Einführung

Die im Weizenmehl vorkommenden Carotinoide können bei der Teigherstellung durch die Zugabe bestimmter Sojapräparate gebleicht werden. Auf die verbreitete Anwendung dieses Verfahrens in den USA hat Wolf [1] hingewiesen.

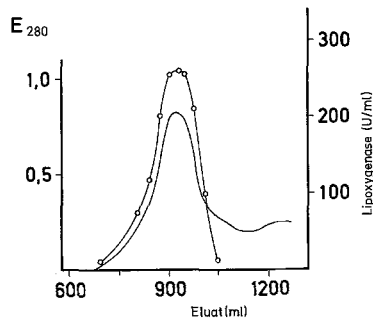
Für den Abbau von Carotinoiden wurde das Enzym Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) verantwortlich gemacht [2], das den Einbau

\* Die Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft Bonn-Bad Godesberg

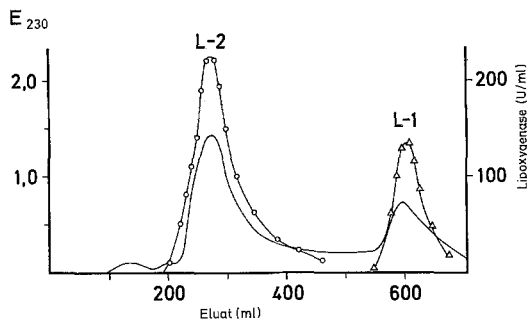
### Material und Reagentien

Sojabohnen<sup>1</sup> mahlen und mit Petroläther entfetten, Linolsäure (>99% Nu Chek Prep),  $\beta$ -Carotin<sup>1</sup>, Canthaxanthin<sup>1</sup>, Tween 80 (Serva), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), Sephadex G-200 (Pharmacia), DEAE-Cellulose (Servacel Type DEAE 23 SS), Ampholine Trägerampholyten pH 5—8 (LKB Producter AB, Nr.

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



**Abb. 1.** Chromatographie an Sephadex G-200. — Säule (90 × 5 cm): Gel in 0,02 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,8; Probe: 430 mg Protein aus der Ammoniumsulfatfällung gelöst in 35 ml des Puffers. Aufsteigende Elution (70 ml/Std; Fraktionen à 10 ml) mit demselben Puffer. Eluat von 800—1020 ml vereinigen. — Protein, —○—○— Lipoxygenase-Aktivität bei pH 6,5



**Abb. 2.** Chromatographie an DEAE-Cellulose. — Säule (30 × 2,5 cm): Cellulose in 0,02 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,8. Probe: 120 mg Protein aus der Gelchromatographie gelöst in 25 ml des Puffers. Elution (30 ml/Std; Fraktionen à 10 ml) mit linearem Gradienten aus 800 ml 0,02 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,8 und 800 ml Puffer mit 14 g (0,3 mol) NaCl. Eluate von 230—460 ml (L-2) bzw. von 570—650 ml (L-1) vereinigen. — Protein, Lipoxygenase-Aktivitäten bei pH 6,5 (—○—○—) und pH 9,0 (—△—△—)

1809—126), 3,3'-Dimethoxybenzidin-HCl (Sigma), EDTA (Merck Titriplex III), N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoäthansulfonsäure (TES; Sigma), Triäthanolamin (TEA; Schuchardt), Rindersealbumin (Merck). Linolsäurehydroperoxyde (LOOH), wie in [15] beschrieben, herstellen und dünnschichtchromatographisch reinigen. Visking-Dialysierschlauch 20/32 (Serva).

## Methoden

**Lipoxygenase-Aktivität:** Die Bestimmungen erfolgten bei 21° C, entsprechend den Angaben von Surrey [16]. Das Substrat (2 ml 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,5 oder 0,1 m-Na-Borat-Puffer pH 9,0) enthält 2  $\mu$ mol Linolsäure, 0,61  $\mu$ l Tween 80, 0,25 mg EDTA. Nach Zugabe von 10—50  $\mu$ l Enzymlösung den Anstieg der Extinktion ab der 15. Sekunde bei 234 nm messen. 1 Enzym-Einheit (U) verursacht im Reaktionsansatz von 2 ml  $\Delta E_{234}^{15} = 1,0$  pro min. Die Konzentration der Dien-Verbindungen mit  $E_{234} = 26000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [26] berechnen.

**Carotinoid-Abbau nach Ben-Aziz et al. [17]:** Die Substrate nach [14] herstellen. Sie enthalten außer den für die Bestimmung der Lipoxygenase-Aktivität notwendigen Substanzen noch 10 nmol/ml  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin. Die Extinktionen der Substrate (gegen Wasser):  $E_{460} = 0,800$  (10 nmol/ml  $\beta$ -Carotin) und  $E_{480} = 1,10$  (10 nmol/ml Canthaxanthin). Nach Zugabe von 50  $\mu$ l Enzym-

Lösung<sup>2</sup> zu 2 ml Substrat die Abnahme der Extinktion ab der 15. sec bei 234 nm ( $\beta$ -Carotin) oder 480 nm (Canthaxanthin) bei 21° C messen.

**Co-Oxydations-Quotient:** Lipoxygenase- und Carotinoid-Abbau zwischen der 15. und 45. Sekunde nach dem Start der Reaktion messen. Quotient aus  $\Delta E_{460}/\Delta E_{234}$  ( $\beta$ -Carotin) bzw.  $\Delta E_{480}/\Delta E_{234}$  (Canthaxanthin) berechnen.

**Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese:** Proteinlösung durch Druckfiltration entsalzen und konzentrieren. Die diskontinuierliche PAG-Elektrophorese nach Orr et al. [18] im TEA-TES-System (Gele mit 5% Acrylamid) durchführen. Die Elektrophorese erfolgt bei 4° C anodisch bei einer Stromstärke von 5 mA pro Röhren. — Die Proteinzonen nach Reisner et al. [19] mit Coomassie Brilliant Blue anfärben und lipoxygenaseaktive Zonen nach De Lumen u. Kazeniac [20] nachweisen<sup>3</sup>.

**Isoelektrische Fokussierung:** Die Experimente in einer 110 ml-Säule (LKB) in der in [27] beschriebenen Weise durchführen. L-2 zunächst in einer 2%igen Ampholinlösung pH 5-8 fokussieren, das Eluat der Fraktionen 52-63 (pH 5,65-6,15) in einer 1%igen Ampholinlösung pH 5-8 refokussieren. L-1 nur in einer 1%igen Ampholinlösung pH 5-8 fokussieren. Max. Spannung: 1600 V; Leistungsbegrenzung: 14 W; 20 Std; 4° C; pH-Messung im Durchfluß (pH-Gradienten Meßzelle Ingold Typ 130—92) bei 20° C unmittelbar nach der Säule; Fraktionierung: 1 ml.

**Protein:** Mit der Biuret-Reaktion [21] im Rohextrakt und im Ammoniumsulfatpräparat bestimmen (Standard: Rinderserumalbumin). — Chromatographische Trennungen: Extinktionen der Eluate bei 280 nm oder 230 nm messen. Von den vereinigten Fraktionen Extinktionen bei 280 nm messen und Proteingehalt mit  $E_{280}^{1\text{mg}} = 1,0 \pm 0,7$  mg/ml Protein [10] berechnen. — Isoelektrische Fokussierung: Die Eluate bei sehr niedrigen Protein-Konzentrationen mit Coomassie Brilliant Blue G-250 [22] anfärben. (vgl. Abb. 5), sonst Durchlässigkeit (T) bei 280 nm bestimmen.

**Druckfiltration:** Gerät der Fa. Amicon (DIAFLO Ultrafilter) mit Membran PM 30.

### Isolierung und chromatographische Reinigung der Lipoxygenasen

Alle Arbeiten bei 2—4° C durchführen. 30 g Mehl aus entfetteten Sojabohnen in 300 ml 0,1 m-Na-Acetatpuffer pH 4,5 suspendieren, 45 min rühren und 20 min mit 10000  $\times$  g zentrifugieren. Im Überstand (ca. 270 ml) festes  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lösen und Proteine, die im Sättigungsbereich 30—60% ausfallen, durch Zentrifugation (10000  $\times$  g; 20 min) sammeln. Ammoniumsulfatpräparat in 30 ml 0,02 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,8 lösen, 3  $\times$  45 min gegen je 1,6 l desselben Puffers dialysieren und 20 min mit 10000  $\times$  g klar zentrifugieren. Überstand (ca. 40 ml) an Sephadex G-200 aufsteigend chromatographieren (Abb 1). Eluat mit Lipoxygenase-Aktivität von 800—1020 ml vereinigen, durch Druckfiltration auf 25 ml konzentrieren und an DEAE-Cellulose, wie in Abb. 2 angegeben, chromatographieren. Im Eluat Lipoxygenase-Aktivitäten bei pH 6,5 und pH 9,0 bestimmen. Fraktionen, die zu den Gipfeln L-1 bzw. L-2 gehören, jeweils vereinigen, durch Druckfiltration auf 15 ml einengen, mit 3  $\times$  10 ml Wasser waschen und zum isoelektrischen Fokussieren auf 10 ml konzentrieren.

## Ergebnisse

Zur Isolierung der Lipoxygenasen wurde Sojamehl bei pH 4,5 extrahiert. Gegenüber einer Extraktion bei pH 7,0 bietet dieses Verfahren den Vorteil der Gewinnung

<sup>2</sup> Die Lösung auf eine Lipoxygenase-Aktivität von ca. 4 U/ml verdünnen

<sup>3</sup> Zur Vermeidung von Kristallisation wurde die Konzentration des 3,3'-Dimethoxybenzidins halbiert

**Tabelle 1.** Vergleich der Extraktionen bei pH 4,5 und pH 7,0

Extraktion <sup>a</sup> von 2 g Sojamehl mit	Protein (mg/ml)	Spezifische Lipoxygenase-Aktivität bei pH 6,5 (U/mg)	Co-Oxydations-Quotient	
			$\Delta E_{460}/\Delta E_{234}$ ( $\beta$ -Carotin)	$\Delta E_{480}/\Delta E_{234}$ (Canthaxanthin)
20 ml 0,1 m-Na-Acetat-Puffer pH 4,5	3,1	73	0,83	1,14
20 ml 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 7,0	10,1	28	0,79	1,16

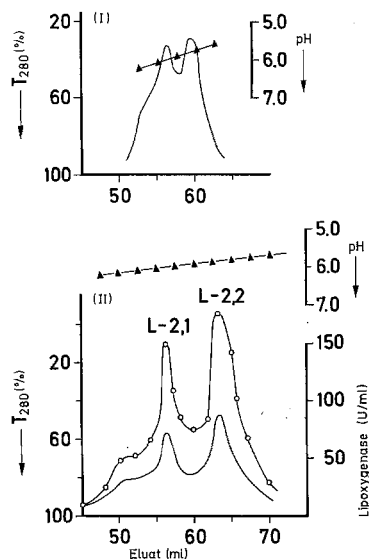
<sup>a</sup> Die Extraktionen wurden durchgeführt, wie auf S. 78 angegeben.

einer um den Faktor 2,5 erhöhten spezifischen Lipoxygenase-Aktivität im Rohextrakt (Tab. 1). Der Co-Oxydations-Quotient verändert sich dadurch weder beim  $\beta$ -Carotin noch beim Canthaxanthin-Abbau (Tab. 1).

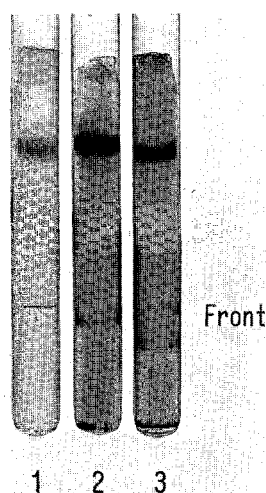
Das durch Ammoniumsulfat-Fällung gewonnene Präparat wurde zur Abtrennung der Lipoxygenasen dialysiert und an Sephadex G-200 chromatographiert (Abb. 1). Bei der folgenden Chromatographie an DEAE-Cellulose werden L-2 und L-1 getrennt (Abb. 2). L-2 wurde einer zweimaligen isoelektrischen Fokussierung unterworfen. Nach dem ersten Lauf ist eine Differenzierung in zwei Isoenzyme zu erkennen (Abb. 3, oben). Durch Refokussierung des Eluats vom pH 5,65–6,15 in Ampholyten vom pH 5–8 erreicht man eine Abflachung des pH-Gradienten im IP-Bereich der Enzyme und damit eine vollständige Trennung der Isoenzyme (Abb. 3, unten). Ihre isoelektrischen Punkte betragen 6,02 (L-2,1) und 5,82 (L-2,2).

Von L-2 und den daraus isolierten Isoenzymen L-2,1 und L-2,2 wurden PAG-Disk-Elektrophoregramme hergestellt (Abb. 4). Gearbeitet wurde mit dem TEA-TES-System (pH im Trenngel um 7,0) nach Orr [18], da bei Verwendung alkalischer Systeme Zersetzung der neutralen Lipoxygenasen eintritt. Incubation der Gele mit Linolsäure bei pH 6,5 und Nachweis der gebildeten Hydroperoxyde mit 3,3'-Dimethoxybenzidin ergab, daß es sich bei der in Abb. 4 sichtbaren Proteinbande um die Lipoxygenase handelt. Abb. 4 zeigt aber auch, daß L-2,1 und L-2,2 in dem verwendeten PAG-System gleich weit wandern.

Die Aktivität der neutralen Lipoxygenase ist bei Abwesenheit eines Emulgators sehr gering. Bei Zusatz eines Emulgators (hier Tween 80) hängt sie stark von seiner Konzentration und auch von dem Alter des Substrates ab. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden deshalb Aliquote von den bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten gewonnenen Präparaten eingefroren gelagert ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Nach dem gesamten Durchgang wurden die Aktivitäten der aufgetauten Proben mit demselben Substrat bestimmt und in Tab. 2 eingetragen.



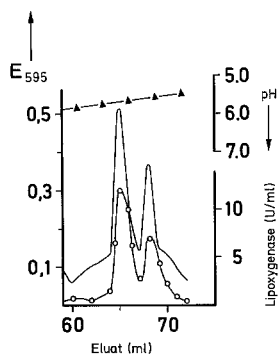
**Abb. 3.** Isoelektrische Fokussierung von L-2. — Oberes Bild: Probe: 9,4 mg Protein (L-2 von DEAE-Cellulose). Fokussierung in 2% Ampholine pH 5–8. — Unteres Bild: Refokussierung des Eluats (52–63 ml) in 1% Ampholine pH 5–8. — Protein (%  $T_{280}$ ): —○—○— Lipoxygenase-Aktivität bei pH 6,5; ▲—▲—▲ pH-Gradient



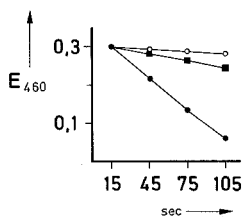
**Abb. 4.** PAG-Disk-Elektrophorese. — 20  $\mu\text{g}$  L-2 nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie (1), 50–100  $\mu\text{g}$  L-2, 1 (2) bzw. L-2, 2 (3)

**Tabelle 2.** Isolierung der neutralen Lipoxygenasen L-2, 1 und L-2, 2.

Aufarbeitungsschritt	Protein (mg)	Lipoxygenase-Aktivität (U)	Spezifische Lipoxygenase-Aktivität (U/mg)	Co-Oxydations-Quotient	
				$\Delta E_{460}/\Delta E_{234}$ ( $\beta$ -Carotin)	$\Delta E_{480}/\Delta E_{234}$ (Canthaxanthin)
1. Extraktion mit 0,1 m-Na-Acetat-Puffer pH 4,5	940	64800	69	0,85	1,13
2. Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Dialyse	430	53800	125	0,81	1,21
3. Sephadex G-200	130	29900	230	0,87	1,17
4. DEAE-Cellulose	28	8700	311	0,83	1,19
5. Isoelektrische Fokussierung (2-fach)					
Fraktion 56 (L-2,1)			480	0,87	1,12
Fraktion 63 (L-2,2)			520	0,82	1,15

**Abb. 5.**

**Abb. 5.** Isoelektrische Fokussierung von L-1. — Probe: 2,3 mg Protein (L-1 von der DEAE-Cellulose-Chromatographie). Zur Proteinbestimmung im Eluat wurden nach Bradford [22] 0,5 ml aus jeder Fraktion mit 2,5 ml Coomassie Brilliant Blue Reagens gemischt. — Protein, —○—○— Lipoxygenase-Aktivität bei pH 9,0 ▲—▲—▲— pH-Gradient

**Abb. 6.**

**Abb. 6.** Abbau von  $\beta$ -Carotin. — Ansatz 1 (●—●): 2 ml 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 6,5 enthielten 2  $\mu\text{mol}$  Linolsäure, 0,61  $\mu\text{l}$  Tween 80, 0,25 mg EDTA, 20 nmol,  $\beta$ -Carotin und 0,22 U Lipoxygenase L-2, 2. — Ansatz 2 (○—○) wie Ansatz 1, aber mit 2  $\mu\text{mol}$  LOOH anstelle der Linolsäure. — Ansatz 3 (■—■): 2 ml 0,1 m-Na-Phosphat-Puffer pH 9,0 enthielten 2  $\mu\text{mol}$  Linolsäure, 0,61  $\mu\text{l}$  Tween 80, 0,25 mg EDTA, 20 nmol  $\beta$ -Carotin und 0,22 U Lipoxygenase L-1

Tabelle 2 zeigt, daß nach der Gelchromatographie die spezifische Aktivität bei pH 6,5 schon sehr hoch ist und die Abtrennung von L-1 durch die Chromatographie an DEAE-Cellulose nur noch zu einer mäßigen Steigerung führt. Durch die isoelektrische Fokussierung wird L-2 aufgetrennt und weiter angereichert. L-2,1 und L-2,2 weisen etwa die gleichen spezifischen Aktivitäten auf.

Der übereinstimmende Verlauf von Aktivitäts- und Proteinkurve im Diagramm der isoelektrischen Fokussierung (Abb. 3, unten) und das einheitliche Verhalten bei der PAG-Elektrophorese weisen darauf hin, daß die beiden isolierten Isoenzyme rein sind. Gegenüber dem pH 4,5-Extrakt erfolgte eine Anreicherung

um den Faktor 7 und gegenüber dem pH 7-Extrakt um den Faktor 18.

Auch L-1 wurde isoelektrisch fokussiert. Abb. 5 zeigt, daß die alkalische Lipoxygenase ebenfalls aus zwei Isoenzymen besteht, deren isoelektrische Punkte 5,70 und 5,55 betragen.

Bei der Anreicherung der Lipoxygenasen wurden die Co-Oxydation von  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin gemessen. Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß sich die Co-Oxydations-Quotienten bei der Reinigung der Enzyme nicht wesentlich ändern. Sowohl L-2,1 als auch L-2,2 besitzen das gleiche Co-Oxydationsvermögen wie der Rohextrakt. Diese beiden neutralen Lipoxygenase-Isoenzyme sind demnach die für die Carotin-Bleichungsaktivität von Sojapräparaten maßgebenden Inhaltsstoffe.

Die Unterschiede, die in der Tabelle für die Geschwindigkeit der Co-Oxydation von  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin auftreten, sind nur scheinbar. Werden die Extinktionsverhältnisse mit Hilfe der im experimentellen Teil angegebenen Daten (vgl. S. 78) auf molare Umsätze umgerechnet, so ergibt sich, daß zwischen der 15. und 75. Sekunde etwa 0,25 mol  $\beta$ -Carotin bzw. Canthaxanthin pro mol gebildeter Dien-Fettsäure abgebaut werden.

In Abb. 6 ist das unterschiedliche Co-Oxydationsverhalten des neutralen Isoenzymes L-2,2 im Vergleich zu dem alkalischen Enzym L-1 zu erkennen: Obwohl die Lipoxygenase-Aktivität gleich ist, wird das  $\beta$ -Carotin durch L-2,2 wesentlich schneller gebleicht als durch L-1. Wird Linolsäure im Ansatz mit L-2,2 durch ein Gemisch aus 13- und 9-LOOH ersetzt, so findet keine Co-Oxydation statt.

## Diskussion

Die Versuche zur Isolierung der Lipoxygenase sind im Einklang mit den Ergebnissen von Verhue u. Francke [7], denn es trennt sich sowohl das neutrale als auch

das alkalische Enzym in zwei Isoenzyme auf, deren isoelektrische Punkte jedoch in dem hier verwendeten System etwas niedriger liegen als von den Autoren angegeben.

Bei der Chromatographie von L-2 an DEAE-Celulose bzw. -Sephadex kann es unter Umständen schon zu einer Trennung kommen [10, 13]. Untersuchungen solcher Präparate durch isoelektrische Fokussierung ergaben aber, daß die Trennungen nicht vollständig sind. So handelt es sich bei der früher [13, 14] als L-3 bezeichneten Fraktion um ein Gemisch aus L-2,1 und L-2,2 und bei der Fraktion L-2 um L-2,2 mit einer kleinen Beimengung von L-2,1.

Die isolierten neutralen Lipoxygenasen L-2,1 und L-2,2 zeigen die gleichen spezifischen Lipoxygenase-Aktivitäten und das gleiche Co-Oxydationspotential. Basierend auf Molekulargewichten von  $10^5$  Dalton [6, 10] ergeben sich unter den gewählten Versuchsbedingungen Wechselzahlen von  $4000 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$  Linolsäure und  $1000 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$   $\beta$ -Carotin bzw. Canthaxanthin. Diese Werte stimmen in etwa überein mit der in Erbsen vorkommenden Lipoxygenase [11], die sich auch durch isoelektrisches Fokussieren in zwei Formen auftrennen läßt [11, 23].

Da der Co-Oxydations-Quotient der neutralen Lipoxygenasen L-2,1 und L-2,2 genauso groß ist, wie derjenige des Rohextraktes, sind diese beiden Isoenzyme mit den in der Soja vorkommenden Carotin-Oxydasen identisch.

Das Isoenzym L-2,2 baut nur mit Linolsäure, nicht aber mit LOOH als Cosubstrat die Polyene ab. Dies wurde auch für L-1 beobachtet [24], d. h. die an sich schon geringe Bleichungsaktivität der alkalischen Lipoxygenase nimmt in Gegenwart von LOOH noch weiter ab.

L-2,1 und L-2,2 co-oxydieren  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin mit derselben Geschwindigkeit. Das ist im Einklang mit früheren Vorstellungen [25], wonach es sich bei diesem Vorgang um eine unspezifische Oxydation durch Peroxylradikale handelt, die das Enzym aus der Linolsäure bildet.

## Literatur

1. Wolf, W.J.: J. Agr. Food Chem. **23**, 136 (1975)
2. Sumner, J.B., Dounce, A.L.: Enzymologia **7** 130 (1939)
3. Hamberg, M., Samuelson, B.: J. Biol. Chem. **242**, 5329 (1967)
4. Koch, R.B., Stern, B., Ferrari, C.G.: Arch. Biochem. Biophys. **78**, 165 (1958)
5. Christopher, J.P., Axelrod, B.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **44**, 731 (1971)
6. Christopher, J.P., Pistorius, E.K., Axelrod, B.: Biochem. Biophys. Acta **198**, 12 (1970)
7. Verhue, W.M., Francke, A.: Biochim. Biophys. Acta **284**, 43 (1973)
8. Christopher, J.P., Pistorius, E.K., Regnier, F.E., Axelrod, B.: Biochim. Biophys. Acta **289**, 82 (1972)
9. Roza, M., Francke, A.: Biochim. Biophys. Acta **316**, 76 (1973)
10. Christopher, J.P., Pistorius, E.K., Axelrod, B.: Biochim. Biophys. Acta **284**, 54 (1972)
11. Arens, D., Seilmeier, W., Weber, F., Kloos, G., Grosch, W.: Biochim. Biophys. Acta **327**, 295 (1973)
12. Kies, M.W., Haining, J.L., Pistorius, E.K., Schroeder, D.H., Axelrod, B.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **36**, 312 (1969)
13. Weber, F., Laskawy, G., Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **152**, 324 (1973)
14. Weber, F., Laskawy, G., Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **155**, 142 (1974)
15. Barthel, G., Grosch, W.: J. Amer. Oil Chemists' Soc. **51**, 540 (1974)
16. Surrey, K.: Plant Physiol. **39**, 65 (1964)
17. Ben-Aziz, A., Großmann, S., Ascarelli, J., Budowski, P.: Phytochemistry **10**, 1445 (1971)
18. Orr, M.D., Blakley, R.L., Panagou, D.: Anal. Biochem. **45**, 68 (1972)
19. Reisner, A.H., Nemes, P., Buchholtz, C.: Anal. Biochem. **64**, 509 (1975)
20. DeLumen, B.O., Kazeniak, S.J.: Anal. Biochem. **72**, 428 (1976)
21. Beisenherz, G.H., Boltze, J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Z. Naturforsch. **8b**, 555 (1953)
22. Bradford, C.M.: Anal. Biochem. **72**, 248 (1976)
23. Eriksson, C.E., Svensson, S.G.: Biochim. Biophys. Acta **198**, 449 (1970)
24. Ikediobi, C., Snyder, H.E.: J. Agr. Food Chem. **25**, 124 (1977)
25. Weber, F., Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **161**, 223 (1976)
26. Matthew, J.A., Chan, H.W.-S., Galliard, T.: Lipids **12**, 324 (1977)
27. Kaiser, K.-P., Santarius, K.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **165**, 65 (1977)

Eingegangen am 21. Juli 1977