

*Institut für Lebensmittelchemie der Bundesforschungsanstalt für  
Ernährung, Karlsruhe*

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

### **II. Lipase aus *Geotrichum candidum* und Lipoxigenase aus Sojabohnen**

*K. H. Park und A. Fricker*

Mit 5 Abbildungen und 1 Tabelle

(Eingegangen am 4. Februar 1977)

#### **1.0. Einleitung**

Im Gegensatz zu Peroxidase, deren Inaktivierung sehr häufig zur Kontrolle des Blanchierprozesses benutzt wird, wurde die Hitzeinaktivierung von Lipasen und Lipoxigenasen bisher relativ wenig untersucht, obwohl diese für die Lagerungsstabilität von Lebensmitteln eine wichtige, manchmal sogar dominierende Rolle spielen können.

##### *1.1. Lipasen*

*Hottenroth* (1) untersuchte das Problem der Hitzeinaktivierung von Pankreaslipase im Hinblick auf die Schutzwirkung des Fettes. *Driessen* und *Stadhouders* (2) überprüften die Thermoresistenz bakterieller Lipase und stellten fest, daß extrazelluläre Lipase aus gramnegativen Bakterien relativ hitzeresistent ist. *Loncin* (3) fand in auf über 100 °C erhitzten verschimmelten Palmkernen eine Lipaserestaktivität, die von *Geotrichum candidum* herrührte. Die Lipase aus diesem Schimmelpilz scheint eine sehr hohe Hitzebeständigkeit zu besitzen, weshalb dieses Enzym isoliert und in die vorliegende Untersuchung einbezogen wurde.

##### *1.2. Lipoxigenasen*

Bei zahlreichen Gemüsearten verändern sich während der Lagerung infolge einer Lipoxigenasewirkung Farbe und Aroma in unerwünschter Weise. Auch bei der Lagerung vollfetter Sojamehle verursacht die Lipoxigenase einen „off-flavor“. Über die Kinetik der thermischen Inaktivierung von Lipoxigenase aus Sojabohnen wurde mehrfach berichtet (z. B. 4, 5). *Svensson* und *Eriksson* (6, 7) untersuchten die Hitzeinaktivierung von Erbsen-Lipoxigenase hinsichtlich pH-Abhängigkeit und Einfluß von Begleitstoffen.

#### **2.0. Experimenteller Teil**

##### *2.1. Versuchsmaterial*

###### *2.1.1. Lipase aus *Geotrichum candidum**

Der verwendete Stamm En 0203 wurde vom Institut für Gärungsgerwebe und Biotechnologie der TU Berlin zur Verfügung gestellt. Die Kul-

turlösung [nach Alford (8)] wurde durch Filterpapier filtriert und das Filtrat mit Ammoniumsulfat (30–60 % Sättigung) versetzt. Der in Phosphat-Puffer pH 7,0 gelöste Niederschlag wurde durch Fällung mit Aceton (–50 °C, Endgehalt der Lösung 75 %) gereinigt, das ausfallende Enzym im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und bei –25 °C gelagert. Der Anreicherungsfaktor betrug etwa 10 bezogen auf den Proteingehalt.

2.1.2. *Lipoxigenase aus Sojabohnen (50 000 U/mg) wurde von Fa. Roth (Karlsruhe) bezogen.*

## 2.2. Bestimmung der Lipaseaktivität

Die Bestimmung erfolgte nach der Hydroxamsäuremethode (9).

## 2.3. Bestimmung der Lipoxigenaseaktivität

Die Herstellung der Substratlösung erfolgte nach Ben Aziz (10). Zu 2,4 ml Substratlösung pH 9,0 ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M Linolsäure, 0,025 % Tween 20) wurden 0,1 ml Enzymlösung gegeben. Die Enzymaktivität wurde durch kontinuierliche Messung der Extinktionsänderung bei Zimmertemperatur ermittelt (Zeiss-Spektralphotometer, 234 nm).

Die Hitzebehandlung geschah nach der bereits in der I. Mitteilung (13, siehe auch 11) beschriebenen „Kolbenmethode“. Die Inaktivierung der Enzyme wurde in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, zwischen 50 ° und 80 °C Lipase bzw. zwischen 60 ° und 75 °C Lipoxigenase durchgeführt.

## 3.0. Ergebnisse

### 3.1. Thermische Inaktivierung von Lipase aus *Geotrichum candidum*

In Abbildung 1 sind die Inaktivierungskurven dargestellt. Bei 50 °C tritt wie bei anderen Enzymen (vergl. 13) ein Knickpunkt auf. Bei höheren Temperaturen verläuft die Hitzeinaktivierung der Lipase nach einer

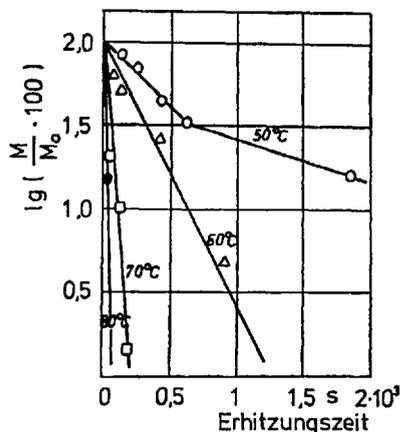


Abb. 1. Hitzeinaktivierung von Lipase aus *Geotrichum candidum* bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit bei pH 7,0. Mo: Anfangsenzymaktivität, M: Restenzymaktivität

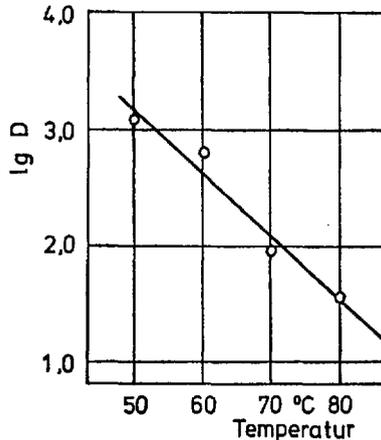


Abb. 2. D-Werte von Lipase aus *Geotrichum candidum* in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7,0

Reaktion 1. Ordnung. Die D-Werte sind für verschiedene Temperaturen in Abbildung 2 dargestellt. Aus der Neigung der Geraden ergibt sich ein z-Wert von 19.

### 3.2. Inaktivierungsverlauf von Sojalipoxigenase

Die in Abbildung 3 dargestellten Inaktivierungskurven weisen bei Temperaturen von 60 bis 64 °C ähnliche Knickpunkte auf wie die Lipase. Zwischen 66 und 75 °C ist ein solcher Knickpunkt nicht mehr sichtbar. Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit von log D von der Erhitzungstemperatur. Der daraus ermittelte z-Wert beträgt 9,8.

Da die bei der Hitzebehandlung verwendete Enzymkonzentration ein wichtiges Kriterium zur Standardisierung von Erhitzungsversuchen im

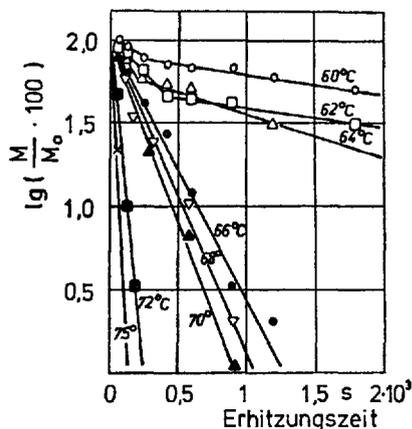


Abb. 3. Hitzeinaktivierung von Lipoxigenase aus Sojabohnen bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit bei pH 7,0.

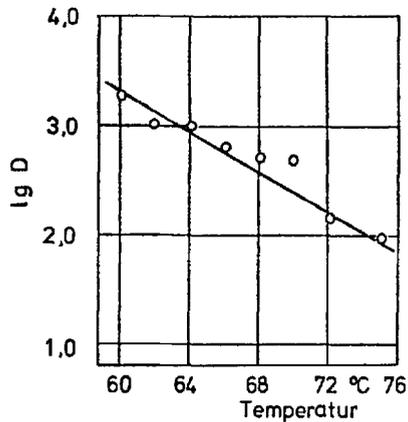


Abb. 4. D-Werte von Lipoxigenase aus Sojabohnen in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7,0.

Modellsystem sein könnte, wurde auch die Abhängigkeit der thermischen Inaktivierung des Enzyms von der Konzentration ermittelt. Abbildung 5 zeigt jedoch, daß kaum Unterschiede im Bereich von Enzymkonzentrationen zwischen 10 und 80  $\mu\text{g/ml}$  auftreten. Die nach der „Transition-state-Theorie“ ermittelten thermodynamischen Konstanten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

#### 4.0. Diskussion

Der für Lipase aus *Geotrichum candidum* gefundene z-Wert von 19 °C war größer als die in der Literatur angegebenen Werte von ca. 3,5 °C für Pankreaslipase und 5,5 °C für Milchlipase (1). *Driessen* und Mitarbeiter (2) berichteten über eine sehr hohe Hitzebeständigkeit ( $D = 16$  min bei 130 °C) der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*. Da dieser hohe D-Wert aus dem

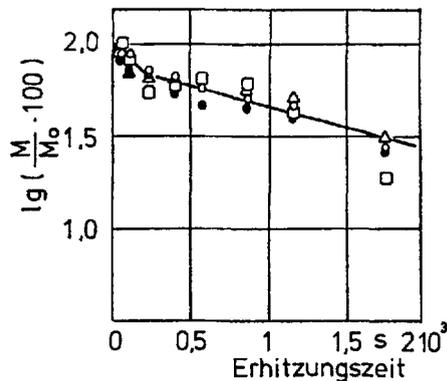


Abb. 5. Hitzeinaktivierung von Sojalipoxigenase in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei 60 °C und pH 7,0. ● 10  $\mu\text{g/ml}$ , □ 20  $\mu\text{g/ml}$ , △ 40  $\mu\text{g/ml}$ , ○ 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 1. Thermodynamische Konstanten für die Inaktivierung der Lipase aus *Geotrichum candidum* und der Lipoxigenase aus Sojabohnen.

Enzym	Temp. (°C)	pH	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol · K)
Lipase ( <i>Geotrichum candidum</i> )	60	7,0	120,4	96,97	73
Lipoxigenase (Sojabohnen)	60	7,0	196,5	102,5	288,7

$\Delta H^*$  = Aktivierungsenthalpie

$\Delta G^*$  = freie Aktivierungsenthalpie

$\Delta S^*$  = Aktivierungsentropie

zweiten flachen Teil der Inaktivierungskurve ermittelt wurde, lassen sich diese Daten nicht mit denen der vorliegenden Mitteilung vergleichen, denn diese wurden aus dem ersten steilen Teil der Inaktivierungskurven gewonnen.

Der z-Wert von 9,8 °C für die Lipoxigenaseinaktivierung war in guter Übereinstimmung mit den von anderen Autoren angegebenen Daten  $z = 8,73$  °C (4)<sup>1</sup> und  $z = 8,13$  °C (5) für Sojalipoxigenase. Der z-Wert für Lipoxigenase aus Erbsen von 3,7 °C (nach 7) wich dagegen davon stark ab.

Bei Überlegungen zur technologischen Bedeutung der Inaktivierung von Lipasen und Lipoxidasen in Lebensmitteln ist auch daran zu denken, daß Triglyceride in Anwesenheit von Lipase sozusagen „indirekte“ Substrate für Lipoxigenase im Hinblick auf die ungesättigten Fettsäuren, die durch Lipasewirkung abgespalten werden, darstellen könnten. Zwar sind Lipoxigenasen bekannt, die Fettsäuren im Triglyceridverband direkt angreifen können; die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber mit freien ungesättigten Fettsäuren wesentlich größer. Untersuchungen über den Hitzeinaktivierungsverlauf der beiden Enzyme im Hinblick auf etwaige gekoppelte Reaktionen könnten demnach von lebensmitteltechnologischem Interesse sein.

#### Zusammenfassung

Die thermische Inaktivierung von Lipase aus *Geotrichum candidum* und von Lipoxigenase aus Sojabohnen wurde in Phosphatpufferlösung untersucht. Ähnlich wie bei Peroxidase wurde ein Knickpunkt bei den Inaktivierungskurven beider Enzyme beobachtet. Dabei ergab Lipase aus *Geotrichum candidum* einen z-Wert von 19 °C, der größer war als die in der Literatur angegebenen Werte für Pankreaslipase und Milchlipase. Für die Sojalipoxigenase wurde ein z-Wert von 9,8 °C ermittelt.

#### Summary

The thermal inactivation of lipase out of *Geotrichum candidum* and of lipoxigenase out of soybeans was investigated in phosphate buffer solution. Comparable to peroxidase, a sharp bend was observed in the inactivation curves

<sup>1</sup> Dieser z-Wert wurde aus der angegebenen Aktivierungsenergie  $E_a$  nach der Gleichung  $z = \frac{2,3RT_M^2}{E_a}$  (vgl. 11) errechnet.

of both enzymes. The z-value of 19 °C for lipase out of *Geotrichum candidum* was higher than the values indicated in the pertinent literature for pancreas lipase and milk lipase. The z-value for soy lipoxigenase was found to be 9.8 °C.

#### Literatur

1. Hottenroth, B., *Die Fleischwirtschaft* 54, 1071 (1974).
2. Driessen, F. M., *J. Stadhouders*, J. officiel Orgaan, Koninklijke Nederlandse Zuivelbond 65, 949 (1973).
3. Loncin, M., Persönliche Mitteilung.
4. Farkas, D. F., S. A. Goldblith, *J. Food Sci.* 27, 262 (1962).
5. Shibasaki, K., S. Hukano, K. Okubo, *J. Food Sci. Technol. (Japan)* 20, 415 (1973).
6. Svensson, S. G., C. E. Eriksson, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 5, 124 (1972).
7. Svensson, S. G., C. E. Eriksson, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 5, 118 (1972).
8. Alford, J. A., J. L. Smith, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 42, 1038 (1965).
9. Park, K. H., R. Duden, A. Fricker, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 157, 327 (1975).
10. Ben-Aziz, A., S. Grossman, I. Ascarelli, P. Dudowski, *Anal. Biochem.* 34, 88 (1970).
11. Park, K. H., Diss. Uni. Karlsruhe (1976).

#### Anschrift der Verfasser:

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