

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Enzymatische Oxydationsreaktionen in gefrorener Petersilie*)

R. Duden und G. Hübner

(Eingegangen am 25. August 1981)

1 Einleitung

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß in gefrorener, unblanchierter Petersilie Lipidabbaureaktionen mit beachtlicher Geschwindigkeit ablaufen (1). Aus den ursprünglich vorhandenen Galaktolipiden entstehen dabei unter der Einwirkung von Acyltransferasen hauptsächlich 6-Acyl-monogalaktosyldiglyceride, aus den Phospholipiden durch Phospholipase-D-Wirkung Phosphatidsäuren; freie Fettsäuren konnten wider Erwarten nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.

Es fragt sich nun, ob diese – durch Lipidacylhydrolasen bewirkte – geringfügige Abspaltung freier Fettsäuren für die Qualitätsminderung von Petersilie verantwortlich gemacht werden kann, wie sie nach Gefrierlagerung unter praxisüblichen Bedingungen zu beobachten ist. Ein in diesem Zusammenhang häufig diskutierter Verderbsmechanismus besteht in der durch Lipoxygenase katalysierten Bildung von Fettsäurehydroperoxiden (Hydroperoxydiensäuren, HPDS) und deren Zerfall zu flüchtigen, sensorisch sehr wirksamen Oxoverbindungen. Daß HPDS z. B. aus Linolensäure bei –5, –10 und –15 °C tatsächlich gebildet werden, haben Fennema und Sung (2) in Modellversuchen gezeigt.

Wir versuchten, die Bildung von HPDS in gefrorenem biologischem Material nachzuweisen und ihre mögliche Relevanz für die Off-flavor-Bildung zu ermitteln. Als Untersuchungsmaterial dienten Petersilienblätter – u. a. deswegen, weil dieses Material in der Praxis vor dem Einfrieren nicht blanchiert wird, die betreffenden Enzymsysteme also noch intakt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Vorbereitung der Petersilie

Zwei Chargen handelsüblicher Petersilie wurden von groben Stengeln befreit, in Plastiktüten in flacher Schicht verpackt, bei –50 °C schockgefroren und anschließend bei –5, –12, –18, –24 und –50 °C eingelagert.

*) In dieser Arbeit sind die wesentlichen Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefaßt, die von G. Hübner in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung im Rahmen ihrer Diplomarbeit an der Fachhochschule Isny der Naturwissenschaftlich-technischen Akademie Prof. Dr. Grübler durchgeführt wurden.

2.2 Extraktion der Gesamtlipide

Nach den jeweiligen Lagerungszeiten wurden Proben von 1 g in einem Gefrierraum ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingewogen, dort im Mörser zerkleinert und sofort mit 2 ml absolutem Methanol übergossen, um die Abbauvorgänge zu unterbrechen. Die erhaltenen Suspensionen wurden mit 2 ml Acetat-Puffer (0,5molar; pH 5,0) versetzt und 2mal mit je 5 ml n-Hexan mit Hilfe einer Schüttelvorrichtung bei Raumtemperatur 30 min lang extrahiert (auf weitere Extraktionsschritte konnte verzichtet werden, da nur Relativwerte bestimmt werden sollten). Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und die überstehenden Phasen vorsichtig in einen Scheidetrichter abdekantiert. Die wäßrig-methanolische Phase wurde verworfen.

Die Hexanphasen der beiden Extraktionen wurden vereinigt und auf das ursprüngliche Volumen von 10 ml aufgefüllt.

2.3 Extraktion der Hydroperoxydiensäuren (HPDS)

Eine direkte Messung der in den Hexanextrakten enthaltenen HPDS war nicht möglich, da die mitextrahierten Begleitsubstanzen wegen ihrer zu hohen Eigenextinktion störten. Es war also erforderlich, die Produkte der Lipoxygenase-Reaktion vor ihrer Bestimmung von der Hauptmenge der Störsubstanz abzutrennen, um die Extinktionswerte in einen Bereich größerer Ablesegenauigkeit zu verschieben.

Dies wurde durch Ausschütteln der HPDS aus den Hexanextrakten mit 0,5molarer Natriumhydrogencarbonatlösung erreicht. Hierfür wurden von den einzelnen Hexanlösungen jeweils 3 ml entnommen und mit 3 ml Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die etwas trüben wäßrigen Phasen wurden abgetrennt und ultrazentrifugiert (15 000 g; 12 min); die so erhaltenen klaren farblosen Lösungen konnten direkt gemessen werden.

2.4 Messung

Die Extinktion der gebildeten HPDS wurde bei 234 nm gegen Extrakte aus einer bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagerten Probe gemessen; bei dieser Temperatur finden praktisch keine enzymatischen Umsetzungen mehr statt. Die Extinktionswerte wurden entsprechend den Versuchen von Fennema und Sung als ein Maß für die HPDS-Konzentration angesehen (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon = 28\ 000$).

3 Ergebnisse

In Abbildung 1 sind die Extinktionswerte der aus den gefrierengelagerten Petersilienproben extrahierten Hydroperoxydiensäuren als Funktion der Lagerungszeit bei verschiedenen Lagerungstemperaturen dargestellt. Jeder einzelne Meßpunkt wurde aus 18 Einzelwerten nach statistischer Behandlung mittels Nalimov-, F- und t-Test ermittelt.

Die Extinktionsunterschiede zwischen den Extrakten aus den bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben sind bei einer Lagerungszeit von 2 Monaten hochsignifikant, während zwischen den $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ - und $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Werten kein signifikanter Unterschied besteht.

In Abbildung 2 ist die Temperaturabhängigkeit der Lipoxygenase-Reaktion nach verschiedenen Lagerungszeiten wiedergegeben. Die Kurven laufen auf einem Abszissenpunkt in der Nähe der $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Marke zusammen. Diese Temperatur ist also ein Grenzwert, unterhalb dessen Reaktionsstillstand eintritt.

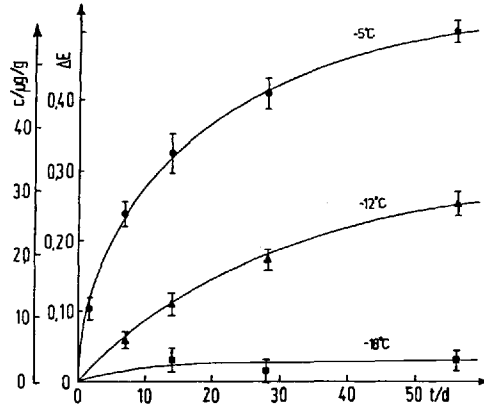


Abb. 1. Kinetik der Bildung von Hydroperoxydiensäuren während der Gefrierlagerung von Petersilie bei verschiedenen Temperaturen.

$\Delta E = E_T - E_{-50^\circ\text{C}}$; $c/\mu\text{g/g}$ = HPDS-Konzentration im gefrorenen Material

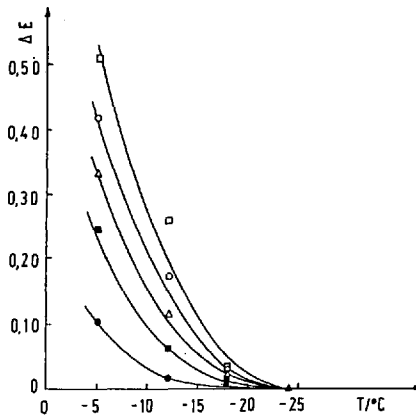


Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der Bildung von Hydroperoxydiensäuren bei verschiedenen Lagerungszeiten.

$\Delta E = E_T - E_{-50^\circ\text{C}}$

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß in gefrorenen Petersilienblättern neben Transferase- und Phospholipase-D-Wirkung auch Lipoxygenase-katalysierte Umsetzungen ablaufen, die zur Bildung von Hydroperoxydiensäure (mit konjugierten Doppelbindungen) führen. Mengenmäßig fallen diese Umsetzungen bei praxisüblichen Lagerungstemperaturen nicht ins Gewicht; sie machen nach 2monatiger Lagerung

bei $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 % und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0,1 % der im Ausgangsmaterial enthaltenen (an die Esterlipide gebundenen) Fettsäuren aus¹⁾.

Es fragt sich nun, ob diese Mengen ausreichen, um die Off-flavor-Bildung zu erklären, die bei $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach ca. 1 Monat und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach 3 Monaten zu beträchtlichen Qualitätseinbußen führt (1).

Der oben angegebene „ $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wert“ entspricht einer HPDS-Konzentration von ca. $3\text{ }\mu\text{g/g}$. Bei vollständiger Zersetzung im Sinne einer zu Hexanal führenden Spaltung [vgl. (5)] würde daraus ca. $1\text{ }\mu\text{g/g}$ Hexanal entstehen – was dem 10^2 - bis 10^4 -fachen des Geschmacksschwellenwertes entspräche (6).

Daraus folgt, daß bereits die Zersetzung sehr geringer Anteile der bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach zwei Monaten entstandenen HPDS-Menge (1 % oder weniger) sensorisch erfaßbar wäre.

Obwohl die HPDS bei Gefriertemperaturen relativ stabil sind, worauf der Verlauf der in Abbildung 1 dargestellten Kurven hindeutet, kann eine Abbaurate in dieser Größenordnung nicht ausgeschlossen werden. Es ist also möglich, daß die durch sensorische Untersuchungen erfaßbaren Off-flavor-Substanzen Hydroperoxydiensäuren entstammen; jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß für ihre Bildung andere Reaktionsabläufe wesentlich sind.

Für die Praxis ergibt sich aus dem Verlauf der in Abbildung 2 dargestellten Kurven, daß erst unterhalb einer Lagerungstemperatur von $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Bildung von HPDS über längere Zeiträume sicher auszuschließen ist.

Zusammenfassung

Im Verlaufe der Gefrierlagerung von (unblanchierter) Petersilie entstehen Substanzen, die eine für Fettsäure-Hydroperoxyde mit konjugierten Doppelbindungen charakteristische Absorption bei 234 nm aufweisen.

Mengenmäßig treten diese Verbindungen allerdings gegenüber anderen enzymatisch gebildeten Lipidabbauprodukten stark zurück; es werden z. B. in zwei Monaten bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nur 0,1 % der im frischen Material vorhandenen (an polare Lipide gebundenen) Fettsäuren in Diensäuren überführt. Bereits der Zerfall geringer Anteile hiervon würde dennoch ausreichen, um die Bildung von „off-flavor“ zu erklären, da die sensorischen Schwellenwerte der Zerfallsprodukte im Bereich weniger ppb liegen.

Bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten nach 2monatiger Lagerung keine Hydroperoxydiensäuren nachgewiesen werden, so daß diese Temperatur auch bei längeren Lagerungszeiten praktisch vollständigen Schutz vor Lipoxygenase-katalysierten Verderbsreaktionen bietet, was für die praxisüblichen Bedingungen ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) nicht zutrifft.

Summary

During frozen storage of (non-blanched) parsley, substances are formed showing absorption (234 nm) typical for hydroperoxydienoic acids with conjugated double bonds.

However, only small quantities of these compounds are found in the frozen material as compared to other lipid degradation products; for instance, during 2 months at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ only 0.1 % of the fatty acids (bound to polar lipids) present in

¹⁾ Bei der Berechnung dieses Anteils wurde ein Gesamtlipidgehalt von 0,4 % der Frischsubstanz angenommen (3) und ein Anteil von 75 % der Esterlipide an den Gesamtlipiden zugrunde gelegt; der letzteren Angabe liegen die für Spinatlipide ermittelten Daten (4) zugrunde.

fresh parsley are transformed into dienoic acids. These low dienoic acid concentrations are nevertheless sufficient to explain off-flavour formation since the sensory threshold values of the degradation products are in the range of some ppb only.

After storage for 2 months at $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ no hydroperoxydienoic acids were found, which means that this temperature, in contrast to the usual storage temperature of $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, provides practically full protection against lipoxygenase-catalyzed spoiling reactions.

Schlüsselwörter: Petersilie, Gefrierlagerung, Lipoxygenase, Hydroperoxydienesäuren, „off-flavor“

Literatur

1. Duden, R., A. Fricker: *Z. Ernährungswiss.* **20**, 172–181 (1981).
2. Fennema, O., J. C. Sung: *Cryobiol.* **17**, 500 (1980).
3. Souci, Fachmann, Kraut: *Die Zusammensetzung von Lebensmitteln, Nährwert-Tabellen, Bd. II.*
4. *Jahresbericht 1977, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe.*
5. Ohloff, G.: *Fette als funktionelle Bestandteile von Lebensmitteln*, S. 119, Forster-Verlag (Zürich 1973).
6. Pangborn, R., Vortrag 3. Weurman Symposium, München 1981, z. Zt. im Druck.

Für die Verfasser:

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