

# Über Phospholipasen insbesondere pflanzlicher Herkunft

Von Priv.-Doz. Dr. LUDWIG ACKER

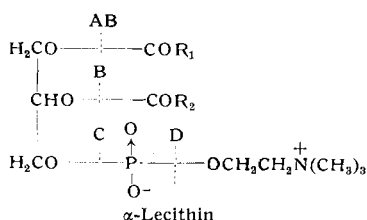
Universitätsinstitut für Lebensmittelchemie, Frankfurt/M.

Von den vier bekannten Phospholipasen kommen Phospholipase A und C in tierischen Giften, B und D vorwiegend in Pflanzen vor. Über den Nachweis der pflanzlichen Phospholipasen sowie deren praktische Bedeutung für die Milchwirtschaft und die Lagerung Lecithin-haltiger Lebensmittel wird berichtet.

## Einleitung

Enzyme, die Lecithin aufzuspalten vermögen, werden als Lecithinasen oder auch Lecithasen bezeichnet. Diese Bezeichnung verdanken sie dem Umstand, daß ihre Wirkung zuerst und überwiegend an Lecithin studiert worden ist. Da sie aber, wie sich später zeigte, meist auch andere Phosphatide wie Kephalin und mitunter auch Sphingomyelin anzugreifen vermögen, hätte man sie eigentlich Phosphatidasen nennen sollen. Die im englisch-amerikanischen Sprachbereich neuerdings dafür gebrauchte Bezeichnung Phospholipasen (abgeleitet von *phospholipids*) trägt diesem weiteren Wirkungsbereich Rechnung. Sie beginnt sich auch in der deutschen Literatur einzuführen; es wäre ihr im Interesse einer Vereinheitlichung der Nomenklatur eine allgemeine Verbreitung zu wünschen.

Die Phosphatide, die aus verschiedenen Bausteinen durch Ester-artige Verknüpfung aufgebaut sind, können auf verschiedene Weise gespalten werden. Entsprechend den vier am Beispiel des Lecithins angedeuteten, primären Angriffsmöglichkeiten sind vier Phospholipasen denkbar und heute auch bekannt. Hinsichtlich der Einteilung hat sich in geringer Abwandlung der ursprünglich von A. Contardi und A. Ercoli<sup>1)</sup> vorgeschlagenen Klassifizierung folgendes Schema durchgesetzt, das am Beispiel des Lecithins als Substrat näher erläutert sei:



Phospholipase A trennt aus Lecithin eine Fettsäure ab unter Zurücklassung von Lysolecithin (oder Lysokephalin bei Kephalin als Substrat).

Phospholipase B spaltet zwei Fettsäuren ab, wobei bei Einwirkung auf Lecithin Glycero-phosphorsäure-cholinester übrig bleibt.

Phospholipase C greift Lecithin unter Bildung von Diglycerid und Phosphorylcholin an. Dieser Cholinester kann auch aus Sphingomyelin gebildet werden.

Phospholipase D setzt aus Lecithin Cholin (aus Kephalin Colamin) frei, wobei als weiteres Spaltprodukt Phosphatidsäure entsteht.

Danach sind also unter Phospholipasen nur diejenigen Enzyme zu verstehen, die den Angriff auf die Phosphatid-Molekel einleiten. Beim weiteren Abbau der Spaltprodukte sind andere Enzyme beteiligt (wenn man davon absieht, daß Phospholipase B auch Lyso-phosphatide spaltet), z. B. bei Phosphorsäure-haltigen Bruchstücken, Phospho-mono-esterasen oder Phospho-diesterasen.

Von den Phospholipasen sind besonders die Phospholipasen A und C beachtet und bearbeitet worden, weil sie Bestandteile von Giften sind, deren toxischer Charakter

eng mit ihrer lecithinolytischen Fähigkeit verbunden zu sein schien. Wenn dies auch nicht der Fall zu sein braucht (Bienengift<sup>2)</sup>, Gift der brasilianischen Klapperschlange [*Crotalus terrificus terrificus*<sup>3)</sup>], so hat dies doch dazu geführt, daß man auch heute noch vielfach dazu neigt, mit der Bezeichnung Lecithinase die Vorstellung einer toxischen Wirkung zu verbinden<sup>4)</sup>. Dem gegenüber sind die Phospholipasen B und D weniger bearbeitet worden, einerseits weil sie harmloser sind, andererseits weil ihre Wirkung nur schwer verfolgt werden kann, da die Spaltprodukte von andern Enzymen meist weiter abgebaut werden. Hier sei in erster Linie ein Überblick über unsere Kenntnisse von den pflanzlichen Phospholipasen, die alle den Typen B und D zuzuordnen sind, gegeben.

## Phospholipase A

Die bemerkenswert hitzestabile<sup>5)</sup> Phospholipase A, Komponente von Bienen- und Schlangengiften<sup>6)</sup>, die aber auch im Pankreas und anderen Organen vorkommt<sup>7)</sup>, ist spezifisch nur auf Lecithin und Kephalin eingestellt. Sie spaltet nur eine, aber nicht — wie man lange meinte<sup>7)</sup> — ausschließlich eine ungesättigte Fettsäure ab. Gestützt wurde eine solche Auffassung zwar zunächst durch A. Contardi und P. Latzer<sup>8)</sup> und E. A. Zeller hat sie noch referiert<sup>7)</sup>, aber bald konnte er nachweisen<sup>9)</sup>, daß Schlangengift auch gesättigtes Lecithin anzugreifen vermag. D. J. Hanahan und Mitarbeiter haben in mehreren Untersuchungen gezeigt, daß das Enzym spezifisch nur die in  $\alpha$ -Stellung gebundene Fettsäure abtrennt, gleichgültig ob sie gesättigt oder ungesättigt ist<sup>10)</sup>. Allerdings sind die meisten Lecithine so gebaut, daß sie in  $\alpha$ -Stellung eine ungesättigte Fettsäure tragen<sup>11)</sup>, so daß der Schluß, die Phospholipase A spalte nur eine ungesättigte Fettsäure ab, durchaus verständlich war. Hanahan hat die von ihm sorgfältig gereinigten Lecithine in Äther gespalten, also in einem für enzymatische Vorgänge ungewöhnlichen Medium. Er hatte früher beobachtet<sup>12)</sup>, daß der Phospholipase A-Lecithin-Komplex — nicht aber das Enzym selbst — mit Äther ausschüttelbar ist, und daß hier die Spaltung etwa mit gleicher Geschwindigkeit wie im wäßrigen Milieu abläuft, ein Umstand, welcher die Isolierung der Spaltprodukte erheblich vereinfacht.

<sup>2)</sup> W. Neumann, Naturwissenschaften 41, 322 [1954].

<sup>3)</sup> W. P. Neumann, Naturwissenschaften 42, 370 [1955]; W. P. Neumann u. E. Habermann, Biochem. Z. 327, 170 [1955].

<sup>4)</sup> Übrigens werden die Phospholipasen — und zwar alle Typen — in dem neuesten Standardwerk der Enzymologie: The Enzymes von J. B. Sumner u. K. Myrbäck, New York 1950, Bd. I. Teil 2 S. 986, unter dem Titel „Enzymes as essential components of bacterial and animal toxins“ geführt.

<sup>5)</sup> Nach A. C. Roy, Indian J. med. Res. 26, 249 [1938]; C. A. 1939 11, 1108 verträgt z. B. die Phospholipase A des Cobra- und Viperidengifts 15–20 min Erhitzen auf Siedetemperatur.

<sup>6)</sup> Neuere Übersichten: W. Neumann, Naturwissenschaften 41, 322 [1954]; K. Slotta, Experientia 9, 81 [1953].

<sup>7)</sup> Siehe z. B. E. A. Zeller in: The Enzymes, herausgeg. v. J. B. Sumner u. K. Myrbäck, New York 1950, Bd. I. Teil 2. S. 989.

<sup>8)</sup> A. Contardi u. P. Latzer, Biochem. Z. 197, 222 [1928].

<sup>9)</sup> E. A. Zeller, Federation Proc. 11, 316 [1952].

<sup>10)</sup> D. J. Hanahan, M. Rodbell u. L. D. Turner, J. biol. Chemistry 206, 431 [1954]; D. J. Hanahan, ebenda 207, 879 [1954] u. 211, 313 [1954].

<sup>11)</sup> D. J. Hanahan, ebenda 211, 313 u. 321 [1954].

<sup>12)</sup> D. J. Hanahan, ebenda 195, 199 [1952].

<sup>1)</sup> A. Contardi u. A. Ercoli, Biochem. Z. 267, 275 [1933].

Bei diesem interessanten Arbeitsverfahren<sup>12)</sup>, das sowohl auf Phospholipase A aus Schlangengift (von *Naja naja* und *Crotalus*) als auch auf diejenige aus Pancreatin (Handelspräparate amerikanischer Herkunft) anwendbar war, wird das Enzympräparat bei  $p_H$  6,0 mit reinem Lecithin gemischt und anschließend — also erst nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes — wird zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte stellt man zur Bebrütung bei Raumtemperatur ab. Die Hydrolyse wird an der Bildung freier Fettsäuren verfolgt und ist im übrigen erkennbar am Auftreten einer Trübung, die schließlich in einen gelatinösen Niederschlag übergeht, der als Lysolecithin zweifelsfrei identifiziert werden konnte. Das für die Hydrolyse notwendige Wasser steht in diesem mit Wasser gesättigten Äther-Auszug ausreichend zur Verfügung. Chloroform oder Petroläther können den Äther nicht ersetzen.

Beim Bienengift läßt sich die Phospholipase A von den anderen für die Giftwirkung wesentlicheren Komponenten gut abtrennen<sup>2)</sup>, beim Gift der Klapperschlange (*Crotalus terrificus terrificus*) ist dies erst vor kurzem<sup>3)</sup> einwandfrei gelungen. Der Hauptbestandteil des Klapperschlangengiftes, das Crotoxin, das in sich neurotoxische und hämolytische Aktivität vereinigt, verhält sich in der Ultrazentrifuge<sup>13)</sup> und bei der Elektrophorese<sup>14)</sup> wie eine einheitliche Substanz und ist auch in Form schön ausgebildeter Kristalle (quadratische Plättchen) zu gewinnen<sup>14a)</sup>. Einige Beobachtungen wiesen jedoch darauf hin<sup>15)</sup>, daß die beiden Wirkungen verschiedenen Proteinen zukommen. Die Trennung dieser einheitlich erscheinenden Substanz in zwei verschiedene Eiweißkörper gelang *W. P. Neumann*<sup>3)</sup> durch Chromatographie an Amberlite IRC 50. Bei Verwendung von 0,2 m Phosphatpuffer vom  $p_H$  6,8 bleibt die Phospholipase A auf der Säule zurück, während das für die Allgemein-Toxizität verantwortliche Toxin eluiert wird. Mit einem Phosphatpuffer vom  $p_H$  7,4 (0,4 m bezüglich  $PO_4^{3-}$ , 1,0 m bezüglich NaCl) ließ sich anschließend die Phospholipase A von der Säule ablösen. Der die Gesamtoxizität des Crotoxins in sich vereinigende Eiweißkörper, das Crotoxin, ist frei von Phospholipase A-Wirkung. Umgekehrt besitzt die abgetrennte Phospholipase A keine Allgemein-Toxizität.

Die hämolytische Eigenschaft gewinnt die Phospholipase A von Bienen- und Schlangengift erst bei der Einwirkung auf Lecithin, wobei ein Hämolsin, das Lysolecithin, gebildet wird<sup>2)</sup>. Daneben enthält aber das Bienengift zum Unterschied vom Klapperschlangengift noch einen direkt wirkenden hämolytischen Faktor<sup>2, 16)</sup>.

Phospholipase A wird für die Hemmung der Hitzekoagulation des Eigelbs durch Bienengift verantwortlich gemacht<sup>17)</sup>. Weiterhin vermag sie einige an der Dehydrierung verschiedener Substanzen beteiligten Enzymssysteme zu inaktivieren. So wird die Bernsteinsäure-Dehydrierung durch Bienengift und Schlangengifte gehemmt<sup>17, 18)</sup>. Daß dafür die Phospholipase A und nicht etwa andere Inhaltsbestandteile der Gifte verantwortlich zu machen sind, geht schon allein aus der Tatsache hervor, daß die Phospholipase A aus Pankreas im gleichen Sinne wirksam ist<sup>18a)</sup>.

- <sup>12)</sup> *N. Gralen* u. *The Svodberg*, *Biochemic. J.* 32, 1375 [1938].  
<sup>13)</sup> *Ch. H. Li* u. *H. Fraenkel-Conrat*, *J. Amer. chem. Soc.* 64, 1586 [1942].  
<sup>14a)</sup> *K. Slotta* u. *H. Fraenkel-Conrat*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 71, 1076 [1938].  
<sup>15)</sup> Näheres siehe *K. Slotta*, *Experientia* 9, 85 u. 86 [1953].  
<sup>16)</sup> *W. Neumann*, *E. Habermann* u. *H. Hansen*, *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.* 217, 130 [1953].  
<sup>17)</sup> *W. Neumann*, *Naturwissenschaften* 41, 323 [1954]; *A. Fleckenstein* u. *B. Fettig*, *Z. Naturforsch.* 6b, 213 [1951].  
<sup>18)</sup> *A. Fleckenstein*, *H. Tippelt* u. *H. Kroner*, *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.* 210, 380 [1950]; a) *A. P. Nygaard* u. *J. B. Sumner*, *J. biol. Chemistry* 200, 723 [1953]; b) *B. M. Braganca*, *Biochemic. J.* 53, 88 [1953].

Auch die an der Oxydation von Brenztraubensäure und l-Glutaminsäure in Gehirnhomogenaten beteiligten Enzym-systeme werden inaktiviert<sup>18 b)</sup>. Andere Enzyme wie Cytochromoxydase des Gehirns und Cholinoydase der Leber werden weniger stark beeinflusst<sup>18 a, b)</sup>. Die oxydative Phosphorylierung in Leberhomogenat wird ebenfalls durch die Phospholipase A aus Bienen- und Schlangengiften gehemmt<sup>19)</sup>. Vermutlich wird in diesen Fällen eine für die Wirksamkeit der Enzymssysteme wesentliche Komponente, ein Phosphatid, abgebaut<sup>17)</sup>. Zwingend ergibt sich eine solche Erklärung aus den Beobachtungen von *W. W. KIELLEY* und *O. MEYERHOFF*<sup>20)</sup>, die durch Phospholipase C aus *Clostridium welchii* die mit Mg aktivierbare Adenosintriphosphatase, ein Lipoprotein mit einem alle Phosphatid-Gruppen umfassenden Phosphatid-Anteil, inaktivieren konnten. Die Inaktivierung des Enzyms und die Hydrolyse des Phosphatid-Anteils gingen parallel.

Der Beschäftigung mit der Phospholipase A stehen von der analytischen Seite her keine besonderen Schwierigkeiten im Wege. Das aus Lecithin entstehende Lysolecithin läßt sich an der Auflöser gewaschener Erythrocythen verfolgen<sup>21, 22)</sup>. Ein weiterer Abbau dieses primären Spaltproduktes und damit eine Komplizierung der enzymatischen Untersuchung ist nicht zu befürchten, da er eine Vergesellschaftung mit der Phospholipase B zur Voraussetzung hätte, die aber bei Bienen- und Schlangengiften im Gegensatz zum Wespengift<sup>21)</sup> nie beobachtet wurde.

### Phospholipase C

Die Phospholipase C ist in den Kulturfiltraten einiger pathogener Mikroorganismen vom Typ der Gasbranderreger festgestellt worden<sup>23)</sup> und scheint wesentlichen Anteil an der Giftwirkung zu haben. Für *Clostridium welchii* scheint jedenfalls die Identität des Enzyms mit dem  $\alpha$ -Toxin erwiesen, denn seine Wirksamkeit läßt sich durch  $\alpha$ -Antitoxin hemmen<sup>24)</sup>. Die Phospholipase C dieser Gifte ist spezifisch auf Lecithin eingestellt, greift Kephalin nicht an, vermag aber Sphingomyelin, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit als Lecithin, abzubauen<sup>25)</sup>. Ihre Wirksamkeit (optimaler Bereich bei  $p_H$  7,0–7,6) ist an das Vorhandensein von Ca-Ionen gebunden; darin sowie in ihrer Hitzeresistenz ist sie der Phospholipase A ähnlich. Die hämolytische Eigenschaft dieses Typs ist allerdings von anderer Art als diejenige der Phospholipase A. Während letztere diese Eigenschaft erst durch die Bildung eines Hämolsins, des Lysolecithins, gewinnt, wirkt die Phospholipase C unmittelbar, und zwar durch eine strukturelle Veränderung in der Wand der roten Blutkörperchen infolge des Lecithin-Abbaus<sup>26)</sup>. Zwischen den einzelnen Phospholipasen C aus den verschiedenen Stämmen bestehen, so weit es *Cl. welchii* und *Cl. oedematicus* anbelangt, nur immunologische Unterschiede, aber keine hinsichtlich ihrer Enzym-Eigenschaften<sup>27)</sup>. Dagegen unterscheidet sich das Phosphatid-spaltende Enzym aus *Cl. welchii* auch enzymologisch von der Phospholipase C aus

- <sup>19)</sup> *E. Habermann*, *Naturwissenschaften* 41, 429 [1954]. *F. Netzer*, *Dissertat. Würzburg* 1952, zit. nach *W. Neumann*, *Naturwissenschaften* 41, 322 [1954].  
<sup>20)</sup> *W. W. Kielley* u. *O. Meyerhof*, *J. biol. Chemistry* 183, 391 [1950]; 176, 591 [1948].  
<sup>21)</sup> *M. Francioli* u. *A. Ercoli* in: *Methoden der Fermentforschung*, herausgeg. v. *E. Bamann* u. *K. Myrbäck*, Leipzig 1941. Bd. 2, S. 1689.  
<sup>22)</sup> *W. Neumann* u. *E. Habermann*, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 296, 166 [1954].  
<sup>23)</sup> Neuere Übersicht: *W. E. van Heyningen*, *Bacterial Toxins*, Oxford 1950. S. 29.  
<sup>24)</sup> *M. G. Macfarlane* u. *B. C. J. G. Knight*, *Biochemic. J.* 35, 884 [1941].  
<sup>25)</sup> *M. G. Macfarlane*, ebenda 42, 587 [1948].  
<sup>26)</sup> *W. E. van Heyningen*, ebenda 35, 1257 [1941].  
<sup>27)</sup> *M. G. Macfarlane*, ebenda 42, 590 [1948].

dem verhältnismäßig harmlosen *Cl. bifementans*. Diese hat ein anderes  $p_H$ -Optimum und ist in ihrer Wirksamkeit von Ca-Ionen unabhängig. Bei gleicher Enzymaktivität ist sie 60–75 mal weniger toxisch als das  $\alpha$ -Toxin aus *Cl. welchii*<sup>28)</sup>. Möglicherweise steht die unterschiedliche Toxizität mit diesen differierenden Enzymeigenschaften in Zusammenhang, vielleicht sind aber auch noch andere, von Stamm zu Stamm schwankende Faktoren außerhalb der phospholipatischen Wirksamkeit für die Giftigkeit verantwortlich.

Die Aktivität des Enzyms wird meist an der Trübung einer Lecithovitellin-Lösung<sup>24)</sup> verfolgt oder aber manometrisch an der Menge der von Phosphorylcholin aus  $\text{NaHCO}_3$  freigemachten Kohlensäure gemessen<sup>29)</sup>. Neuerdings wird auch über eine Phospholipase C aus tierischen Geweben berichtet<sup>30)</sup>. Sie soll im Gehirn verschiedener Tiere nachgewiesen worden sein. Sie ist strukturgebunden und geht erst bei längerer Autolyse in den Extrakt über. Ihr Wirkungsoptimum soll im gleichen  $p_H$ -Bereich wie die Phospholipase C aus *Cl. welchii* liegen.

Die Phospholipase C ist gelegentlich auch zur Klärung von Konstitutionsfragen beim Lecithin herangezogen worden. *C. Long* und *M. F. Maguire*<sup>30a)</sup> haben gereinigtes Ei-lecithin mit Phospholipase C aus *Cl. welchii* inkubiert, das gebildete Diglycerid nach Hydrieren in Phosphatidsäure übergeführt und dann an dem nach vorsichtigem Verseifen gewonnenen Glycerophosphat die 1- $\alpha$ -Konfiguration des Ei-lecithins erhärtet. (Hier hätte die Phospholipase D rascher zum Ziele geführt). *D. J. Hanahan* und *R. Vercamer*<sup>30b)</sup> haben das gleiche Ergebnis mit Hilfe der Phospholipase C aus *Cl. perfringens* durch Isolierung und Identifizierung der 1,2-Diglyceride erzielt. Dabei wurde übrigens — ähnlich wie bei der Phospholipase A — in einer Mischung von 98% Äther und 2% Alkohol bebrütet.

### Phospholipase B und D

Phospholipasen B sind in verschiedenen tierischen Geweben, aber auch in Pflanzen beobachtet worden. Ihre Wirksamkeit läßt sich nicht ganz einfach verfolgen, da in den untersuchten Geweben auch mit weiteren Veränderungen der primären Spaltprodukte durch andere Enzyme gerechnet werden muß. Manche Autoren<sup>31)</sup> haben sich daher mit der Tatsache begnügt, daß Cholin und (oder) Phosphorsäure bei der Einwirkung auf Lecithin auftreten, andere wie *Contardi* und *Ercoli*<sup>1)</sup> sowie *Kahane* und Mitarbeiter<sup>32)</sup> haben durch Isolierung eines charakteristischen Spaltproduktes, des Glycerophosphorsäure-cholinesters, den Phospholipase B-Typ sichergestellt.

Daß in tierischen Geweben auch Phospholipasen vom Typ D vorkommen, ist bisher noch nicht sicher erwiesen, darf aber als wahrscheinlich gelten. Allerdings darf die Bildung von Cholin allein noch nicht als Kriterium für eine Phospholipase D-Wirkung gelten, da Cholin aus Lecithin enzymatisch auf verschiedenen Wegen freierwerden kann.

<sup>28)</sup> A. A. u. E. M. Miles, J. gen. Microbiology 1, 385 [1947]; 4, 22 [1950].

<sup>29)</sup> P. C. Zamecnik, L. E. Brewster u. F. Lipmann, J. exp. Med. 85, 381 [1947].

<sup>30)</sup> K. V. Drushinina u. M. G. Kritzman, Biochemie (russ.) 17, 77 [1952].

<sup>30a)</sup> C. Long u. M. F. Maguire, Biochemic. J. 55, 15 [1953].

<sup>30b)</sup> D. J. Hanahan u. R. Vercamer, J. Amer. chem. Soc. 76, 1804 [1954].

<sup>31)</sup> R. Kay, Biochemic. J. 20, 791 [1926]; 22, 855 [1928]; J. biol. Chemistry 89, 249 [1930]; E. J. King, Biochemic. J. 25, 799 [1931]; E. J. King u. J. H. Page, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 191, 234 [1930]; A. Göbel, Biochem. Z. 319, 196 [1948]; A. Göbel u. H. Seckfort, ebenda 319, 203 [1948]; M. Holden, Biochemic. J. 51, 433 [1952].

<sup>32)</sup> E. Kahane u. J. Lévy, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 219, 431 [1944]; Bull. Soc. Chim. biol. 27, 544 [1945]; E. Kahane u. J. Pettifils, ebenda 32, 482 [1950]; M. Diament, E. Kahane u. J. Lévy, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 235, 1058 [1952]; G. Ducet, Ann. agronom. 19, 184 [1949].

## Pflanzliche Phospholipasen

### Phospholipase D

Die Forschung über pflanzliche Phospholipasen, durch die Untersuchungen von *A. Contardi* und *A. Ercoli*<sup>1)</sup> begonnen, hat lange Zeit ausgesetzt und ist erst wieder durch die Untersuchungen von *D. J. Hanahan* und *I. L. Chaikoff*<sup>34)</sup> in Gang gekommen, die durch unterschiedliche Ausbeuten an Phosphatiden aus Karotten je nach deren Vorbehandlung auf ein Phosphatid-spaltendes Enzym aufmerksam geworden waren<sup>35)</sup>. Bei der Einwirkung von Karottenpreßsaft auf Soja-Phosphatide konnten sie am Rückgang des Cholins im Ätherextrakt bei gleichbleibendem Phosphatid/P-Gehalt oder anders ausgedrückt, an der Änderung des P/Cholin-Verhältnisses ein Cholin-abspaltendes Enzym nachweisen. Damit war zum ersten Male eine Phospholipase D nachgewiesen. Das Enzym erwies sich als verhältnismäßig thermostabil, sein  $p_H$ -Optimum wurde zu 5,2–5,9 bestimmt. Daß bei dieser Einwirkung Phosphatidsäuren auftreten, erkennbar am P/N-Verhältnis der Lipide, führte zur Vermutung, daß die früher von *A. C. Chibnall* und *H. J. Channon*<sup>36)</sup> aus Kohl isolierten Phosphatidsäuren vielleicht garnicht ursprünglich in diesem Material vorgelegen haben, sondern erst beim Aufarbeiten unter der Einwirkung dieses Enzyms entstanden sein könnten. Tatsächlich fanden *Hanahan* und *Chaikoff* bei den Phosphatiden aus Kohl ähnliche Verhältnisse wie bei den Karotten-Phosphatiden: Nur bei vorhergehender Dampfbehandlung, nicht aber bei der Extraktion des rohen Kohls konnten sie Phosphatide mit hohem Cholin-Gehalt isolieren<sup>37)</sup>. Damit waren also die Phosphatidsäuren als Artefakte anzusprechen, die bei dem von *Chibnall* und *Channon* gewählten Verfahren (Mahlen der Blätter und allmähliches Erhitzen auf 70 °C, wodurch das Enzym noch keineswegs vollständig inaktiviert ist) leicht gebildet werden. Die Extraktion mit Äther wirkte zusätzlich fördernd, denn *M. Kates*<sup>38)</sup> konnte zeigen, daß durch Äther-Sättigung der Ansätze die enzymatische Wirksamkeit erheblich gesteigert werden kann.

Die Befunde von *Hanahan* und *Chaikoff* haben auf verschiedene Arbeitskreise anregend gewirkt. Die Ergebnisse sind bald bestätigt worden<sup>38, 39)</sup>, und das Enzym wurde auch in anderem pflanzlichem Material nachgewiesen: in Weizen, Gerste, Hafer<sup>40)</sup>, Spinat, Zuckerrübenblätter<sup>38)</sup>, Baumwollsamensamen<sup>43)</sup>, besonders aktiv wurde es in Weizenkeimen und Gerstenmalz<sup>40)</sup> gefunden. Auch in *Hevea brasiliensis* wurde eine solche Phospholipase nachgewiesen<sup>41)</sup>.

*Hanahan* und *Chaikoff*<sup>34)</sup> hatten Soja-Phosphatide als Substrat verwendet und dabei wahrscheinlich machen können, daß auch Kephalin von diesem Enzym gespalten wird. *W. G. Rose*<sup>42)</sup> hat später in Ansätzen aus Karotten- und Kohlpreßsäften mit Soja-Phosphatiden (Gemischen, in denen neben Lecithin auch Kephalin vorliegt) nach Perjodat-Einwirkung das aus den Spaltprodukten (Colamin, Serin) gebildete Ammoniak bestimmt und damit bewiesen, daß auch Kephalin hydrolysiert wird. Mit der gewählten Methodik war allerdings eine Entscheidung darüber, ob sowohl Colaminkephalin als auch Serinkephalin, (die beide in Soja-Phosphatiden vorkommen sollen) aufgespalten wird, nicht zu treffen. *H. L. Tookey* und *A. K. Balls*<sup>43)</sup> haben neuerdings mit der gleichen Methodik und ebenfalls

<sup>34)</sup> D. J. Hanahan u. I. L. Chaikoff, J. biol. Chemistry 169, 699 [1947].

<sup>35)</sup> Ebenda 168, 233 [1947].

<sup>36)</sup> A. C. Chibnall u. H. J. Channon, Biochemic. J. 21, 233 [1927].

<sup>37)</sup> D. J. Hanahan u. I. L. Chaikoff, J. biol. Chemistry 172, 191 [1948].

<sup>38)</sup> M. Kates, Nature [London] 172, 814 [1953].

<sup>39)</sup> L. Acker, W. Diemair u. R. Jäger, Biochem. Z. 322, 471 [1952].

<sup>40)</sup> L. Acker u. G. Ernst, ebenda 325, 253 [1954].

<sup>41)</sup> R. H. Smith, Biochemic. J. 56, 240 [1954].

<sup>42)</sup> W. G. Rose, Food Technol. 4, 230 [1950].

<sup>43)</sup> H. L. Tookey u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 218, 213 [1956].

an Soja-Phosphatiden die Spaltbarkeit des Kephals durch eine Phospholipase D aus Baumwollsamens bestätigen können. Sie haben indessen bei der papierchromatographischen Analyse der Spaltstücke kein Serin, sondern lediglich Colamin gefunden. Sie schließen jedoch daraus weniger auf mangelnde Angreifbarkeit des Serinkephals durch ihr Enzym, sondern bezweifeln vielmehr das Vorkommen von Serinkephalin in Soja-Phosphatiden. Die Frage, ob die Phospholipase D auch die Hydrolyse von Serinkephalin katalysiert, ist somit nach wie vor unentschieden.

Die in verschiedenem pflanzlichen Material bisher nachgewiesenen Enzyme von Phospholipase-D-Wirkung stimmen in ihren wesentlichsten Eigenschaften gut überein. Das Temperaturoptimum der Aktivität liegt bei 25 bis 30°C<sup>34, 37, 39, 40, 41</sup>) und die Temperaturabhängigkeitskurve verläuft nach höheren Temperaturen ziemlich flach, gleichgültig ob es sich um das Enzym aus Karotten<sup>34</sup>), Kohl<sup>37</sup>) oder Gerstenmalz<sup>40</sup>) handelt. *M. Kates*<sup>44</sup>) hat bei der Phospholipase D der Spinat-Chloroplasten nach 10 min Erhitzung auf 70°C eine vollständige Inaktivierung erreicht. Das  $p_{\text{H}}$ -Optimum ist flach und liegt zwischen  $p_{\text{H}}$  5 und 6<sup>34, 37, 39, 40, 41, 43</sup>), nur bei dem Enzym der Chloroplasten von Spinat und Zuckerrübenblättern hat *Kates*<sup>44</sup>) ein etwas abweichendes Optimum bei  $p_{\text{H}}$  4,7–4,8 gefunden.

Die Aktivität in den Extrakten oder Preßsäften liegt verhältnismäßig niedrig. Dies hat neben den analytischen Schwierigkeiten bei der Erfassung der Spaltprodukte dazu beigetragen, daß die Existenz eines solchen Enzyms so lange verborgen blieb. Starke Aktivitäten, die schon in wenigen Minuten zu erheblichen Spaltungsgraden führen, hat *M. Kates*<sup>38, 44</sup>) durch Ultrazentrifugieren erhalten. Bei seinen Preßsäften aus Spinat, Zuckerrübenblättern, Karotten und Kohl ließ sich bei diesem Vorgehen die gesamte Aktivität im Rückstand anreichern, und zwar war sie in den Chloroplasten bzw. Plastiden lokalisiert. Das durch Ultrazentrifugieren geklärte Cytoplasma war frei von Phosphatid-spaltender Wirkung. *Kates* berichtet sogar von einer gewissen Hemmwirkung des Cytoplasmas auf die enzymatische Lecithin-Spaltung. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß unsere negativen Befunde an Preßsäften aus Spinat<sup>39</sup>) durch diese Befunde von *Kates* erklärt werden. Andererseits scheint das Enzym nicht in allen Sorten in gleich aktiver Form vorzuliegen. So haben wir im Falle der Karotten<sup>39</sup>) bei manchen Sorten völlig inaktive Preßsäfte gefunden. *Kates* vermutet nach seinen Ergebnissen, daß die Phospholipase D auch in anderen Pflanzen an Plastiden gebunden sei. Wir sind bei Versuchen mit Extrakten aus Gerstenmalz dieser Frage nachgegangen und haben dabei in den durch Ultrafiltration und Ultrazentrifugieren (68000 g) geklärten Extrakten die volle Aktivität in der klaren Lösung gefunden, die Rückstände waren inaktiv<sup>45</sup>). *H. L. Tooke*y und *A. K. Balls*<sup>43</sup>) haben an der Phospholipase D aus Baumwollsamens ebenfalls zeigen können, daß das Enzym wasserlöslich ist und durch Ultrazentrifugieren (bei 26360 g) nicht abgeschieden werden kann. Dieser Widerspruch zu den Befunden von *Kates* läßt sich vielleicht durch die Annahme erklären, daß die Lokalisierung des Enzyms sich in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze ändern kann. Ähnliche Verhältnisse sind z. B. von der Phosphorylase bekannt geworden<sup>46</sup>), die im embryonalen Gewebe im Zellsaft frei vorliegt, bei der ausgewachsenen Pflanze sich aber in den Plastiden konzentriert.

<sup>44</sup>) *M. Kates*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32, 571 [1954].

<sup>45</sup>) *L. Acker* u. *H. Bücking*, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* (im Druck); diese *Ztschr.* 68, 120 [1956]. *H. Bücking*, *Diss. Frankfurt/M.* 1955.

<sup>46</sup>) *E. Kreck*, *Beitr. z. Biologie d. Pflanzen* 30, 394 [1954].

Wir haben bei den neueren Untersuchungen<sup>45</sup>) die Methodik, um die Phospholipase D-Aktivität zu verfolgen, dahingehend abgeändert, daß wir als Maß für die Wirkung nicht mehr den Rückgang des Lecithins, sondern das Auftreten freien Cholins in den Ansätzen genommen haben. Das in den Ansätzen wegen störender Stoffe schwer zu bestimmende Cholin läßt sich nach *A. Rejcek* und *S. Šir*<sup>50</sup>) durch Adsorption an Permutit isolieren. Man kann es dadurch auch von Lecithin und von Cholinestern wie Glycerophosphorsäure-cholinester und Phosphoryl-cholin abtrennen. Eluiert wird mit Kaliumnitrat-Lösung. Das nicht aufgespaltene Lecithin wird durch Ausschütteln mit Äther oder noch besser durch Behandeln mit Isopropanol/Benzol ausgezogen. So lassen sich die Cholin-Verbindungen glatt in drei Fraktionen trennen: Lecithin, freies Cholin und wasserlösliche Cholinester. Die Mengenverhältnisse werden über die Cholin-Gehalte (bei Lecithin und den Estern nach Hydrolyse) ermittelt. Da die Bestimmung des Cholins nach der Methode von *Roman* (Fällung als Cholin-eneajodid und Titration des komplex gebundenen Jods; bei Benützung des berichtigten<sup>47, 48</sup>) Faktors 0,1515 mg für 1 ml 0,01 n Natriumthiosulfat-Lösung nunmehr genau arbeitend) in Gegenwart von Eiweißstoffen Schwierigkeiten bereitet, haben wir uns statt dessen der von *G. Ducet* und *E. Kahane*<sup>47</sup>) empfohlenen Behandlung mit 20–30proz. Salpetersäure bedient und dabei sehr gute Erfolge erzielt. Bei nur zweistündigem Erhitzen mit 20proz. Salpetersäure wird Cholin nur in zu vernachlässigender Menge angegriffen; bei Modellversuchen wurden die eingesetzten Cholin-Mengen immer quantitativ wiedergefunden<sup>49</sup>). Durch diese Behandlung wird allerdings auch Glycerophosphorsäure-cholinester vollständig hydrolysiert, nicht aber Phosphorylcholin, das eine solche drastische Behandlung fast unverändert übersteht. Das extrahierte Lecithin wurde zur Cholin-Bestimmung ebenso hydrolysiert. Durch Verwendung eines besonders sorgfältig gereinigten Lecithins — nach der Vorschrift von *W. C. Pangborn*<sup>51</sup>) — haben wir die Möglichkeit der Bildung anderer N-haltiger Spaltprodukte von vornherein ausgeschlossen.

Somit haben wir die Eigenschaften der Phospholipase D aus Gerstenmalz exakter verfolgen können, als dies bisher möglich war. Die Erhöhung der Aktivität durch Äther haben wir bestätigt, allerdings nur um etwa 75%, während bei *Kates*<sup>38</sup>) sich die phospholipatische Aktivität in den Chloroplasten um das 7–8fache hatte steigern lassen. Man darf vielleicht annehmen, daß bei Zugabe von Äther die Micellen des gelösten Lecithins aufgelockert und dadurch leichter angreifbar werden. Calcium beeinflußt die Phospholipase D nicht, Natriumfluorid hemmt dagegen etwas, ohne aber an die Hemmwirkung auf Phosphatasen heranzukommen. Durch diese unterschiedliche Hemmwirkung des Natriumfluorids ließen sich bei unseren Untersuchungen an Gerstenmalzextrakten die bei der Lecithin-Spaltung entstehenden Phosphatidsäuren nachweisen, die ohne diese Hemmung glatt — offenbar von Phosphatasen — weiter aufgespalten werden.

*M. Kates*<sup>50 a</sup>) hat in neueren Untersuchungen die bei der Einwirkung seiner Plastidenfraktionen auf Lecithin gebildete Phosphatidsäure isoliert, die in diesem Milieu von der weiteren enzymatischen Aufspaltung (der Abspaltung von Phosphorsäure) in nur geringem Umfange betroffen wird. Überraschend ist seine Beobachtung, daß Spinat-chloroplasten aus Lecithin neben freiem Cholin auch Phosphoryl-cholin freisetzen. Die Möglichkeit der Bildung dieses Cholinesters durch Phosphorylierung freien Cholins oder durch Spaltung eines etwa intermediär gebildeten Glycerophosphorsäure-cholinesters konnte *Kates* ausschließen. Wenn dieser Befund sich bestätigen sollte, so wäre zum ersten Male in Pflanzen auch eine Phospholipase C aufgefunden worden.

### Phospholipase B

Die ersten Untersuchungen über eine Phospholipase B gehen auf *A. Contardi* und *A. Ercoli*<sup>1</sup>) zurück, die dieses

<sup>47</sup>) *G. Ducet* u. *E. Kahane*, *Bull. Soc. Chim. biol.* 28, 799 [1946].

<sup>48</sup>) *L. Acker* u. *H. Bücking*, *Z. analyt. Chem.* 143, 352 [1954].

<sup>49</sup>) *L. Acker* u. *G. Ernst*, ebenda 142, 5 [1954].

<sup>50</sup>) *A. Rejcek* u. *S. Šir*, *Naturwissenschaften* 41, 119 [1954]; a) *M. Kates*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 33, 575 [1955].

<sup>51</sup>) *W. C. Pangborn*, *J. biol. Chemistry* 188, 471 [1951].

Enzym in Reiskleie und Extrakten aus *Aspergillus oryzae* nachgewiesen haben. Bei den Untersuchungen an Reiskleie wurde das Enzym von störenden Begleitenzymen, welche das primäre Spaltprodukt hätten weiter auftrennen können, insbes. von dem von den Autoren (etwas unglücklich) als Cholino-phosphatase bezeichneten, auf Glycero-phosphorsäure-cholinester eingestellten Enzym durch Bleiacetat-Fällung abgetrennt. Die Phospholipase B, die nach Behandlung des Bleiacetat-Niederschlages mit H<sub>2</sub>S und Zentrifugieren in der überstehenden Flüssigkeit vorliegt, war allerdings von geringer Aktivität. So war Lysolecithin erst nach neun Tagen vollständig gespalten, die Ansätze mit Lecithin blieben mitunter 20 Tage stehen. Extrakte aus *Aspergillus oryzae* wurden rascher aufgespalten, gleichzeitig fiel aber hier der Cholinester schneller der weiteren enzymatischen Hydrolyse anheim.

In tierischen Geweben wurden später Enzymwirkungen der gleichen Art festgestellt<sup>52</sup>). Jedoch ist über eine Phospholipase B in Pflanzen lange nicht mehr berichtet worden. Im Arbeitskreis von E. Kahane hat dann G. Ducet<sup>53</sup>) zeigen können, daß in verschiedenen von ihm untersuchten Pflanzen wie Sojabohnen, Erbsen, Kartoffeln, Getreide, zu Beginn der Wachstumsvorgänge nicht nur Cholin, sondern auch Glycerophosphorsäure-cholinester aus dem pflanzeigenen Lecithin gebildet wird. Er hat zwar in seinen Untersuchungen vorwiegend die Veränderungen und relativen Verschiebungen in den drei Cholin-Fractionen (Lecithin-cholin, Glycero-phosphorsäure-cholinester und freies Cholin) während der einzelnen Wachstumsstadien dieser Pflanzen verfolgt<sup>54</sup>), ohne die daran beteiligten Enzymsysteme zu studieren, hat aber doch aus seinen Ergebnissen den Schluß ziehen können, daß in diesen Pflanzen neben einer Phospholipase D auch noch eine solche vom B-Typ vorkommen müsse<sup>55</sup>).

Einige Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Phospholipase D des Gerstenmalzes<sup>45</sup>), waren nur durch eine gleichzeitige Phospholipase B-Wirkung erklärbar.

Bei einer Cholin-Bilanz nach Einwirkung von Gerstenmalz auf gereinigtes Lecithin war uns aufgefallen, daß trotz vollständiger Aufspaltung des Lecithins nur etwa 40% des ursprünglich im Lecithin gebundenen Cholins als freies Cholin hatten erfaßt werden können. Es zeigte sich, daß dieser fehlende Anteil als wasserlöslicher Cholinester vorlag. Da er im Gegensatz zum Phosphoryl-cholin, dem einzigen Cholinester, der hier noch in Frage kam, bei der von uns üblicherweise angewendeten zweistündigen Behandlung mit Salpetersäure vollständig hydrolysiert wurde, konnte es sich nur um Glycero-phosphorsäure-cholinester handeln; das Enzym mußte also eine Phospholipase B sein. Tatsächlich ließen sich auch die der Menge des wasserlöslichen Cholinesters entsprechenden Äquivalente an freien Fettsäuren nachweisen. Für die weiteren Untersuchungen war richtungweisend, daß die Phospholipase B-Wirkung in Gerstenmalzsuspensionen stärker war als in Extrakten aus der gleichen Menge. Die Vermutung, daß das Enzym an Zellelemente gebunden sein könnte, bestätigte sich: Mehrfach mit Wasser behandelte Malzmehle blieben aktiv, die trüben Extrakte verloren beim Ultrafiltrieren und Ultrazentrifugieren (68000 g) ihre Phospholipase B-Wirkung weitgehend, ohne aber die Phospholipase D-Aktivität einzubüßen. Die Phospholipase B fand sich im unlöslichen Anteil und war ihrerseits frei von Phos-

<sup>52</sup>) S. Belfanti, A. Ercoli u. A. Contardi, *Ergebn. Enzymforsch.* 5, 213 [1936].

<sup>53</sup>) G. Ducet, *Ann. agron.* 19, 184 [1949].

<sup>54</sup>) G. Ducet, *Diss. Paris* 1949. Aus der nachträglich zugänglichen Dissertation ist zu entnehmen, daß Ducet das freie Cholin in der gleichen Weise wie Rejek und Šir<sup>50</sup>) und wir abtrennt hat.

<sup>55</sup>) G. Ducet, ebenda S. 79.

pholipase D. Da die Phospholipase B durch gewöhnliches Zentrifugieren (etwa 3000 U/min) nicht abgetrennt wird, ist das Enzym vielleicht in Plastiden, die erst bei hohen Zentrifugalbeschleunigungen sedimentieren<sup>44</sup>), lokalisiert. Wahrscheinlich war auch das von A. Contardi und A. Ercoli<sup>1</sup>) gefundene Enzym strukturgebunden.

Noch wirksamer und dabei einfacher gelingt die Abtrennung der beiden Lecithin-spaltenden Enzyme beim Durchlauf durch eine Permutitsäule\*), die, wie schon A. Rejek und S. V. Šir<sup>50</sup>) fanden, die Phospholipase D quantitativ festhält oder aber, was vorläufig nicht auszuschließen ist, inaktiviert. Die Phospholipase B dagegen läuft nach unseren Feststellungen<sup>45</sup>) ohne jeglichen Verlust an Aktivität durch. Damit ließen sich nun die Eigenschaften der Phospholipase B bequem studieren. Das Enzym besitzt ein p<sub>H</sub>-Optimum bei 6,0–6,3 und ein Temperaturoptimum bei 25 °C.

Die Phosphatid-spaltende Wirkung der unbehandelten Gerstenmalzextrakte geht also auf zwei verschiedene Enzyme zurück, von denen sich die Phospholipase B als das bei weitem wirksamere erwies. Nach den bisherigen Befunden muß angenommen werden, daß die Phospholipase B im ruhenden Gerstenkorn noch nicht in aktiver Form vorliegt, sondern sich erst beim Keimen bildet. Die Phospholipase D dagegen ist bereits im Ruhezustand des Kornes nachweisbar und scheint beim Keimen an Aktivität nicht zuzunehmen.

Bei der Suche nach den Phosphatidsäuren als den Beweisstücken für eine Phospholipase D-Wirkung war uns<sup>45</sup>) aufgefallen, daß mehr freies Cholin gefunden wurde, als der Menge der ermittelten Phosphatidsäure entsprach. Bei diesen Untersuchungen waren die beiden Enzyme noch nicht getrennt worden, weil wir damals die Gegenwart zweier verschiedener Phospholipasen noch gar nicht vermutet hatten. Erst nachträglich kam der Gedanke, daß die zusätzliche Menge an Cholin aus einer Aufspaltung des Glycero-phosphorsäure-cholinesters stammen könnte. Daß der Gerstenmalzextrakt dazu wirklich in der Lage ist, haben wir in Ansätzen zeigen können, die diesen Cholinester frei von freiem Cholin und Lecithin enthielten. Wir vermuteten, daß hierfür das gleiche Enzym verantwortlich sein könnte, das auch aus Lecithin Cholin frei setzt, so daß dann die Phospholipase D — im Gegensatz zu den anderen Typen — nicht ein spezifisch auf Phosphatide eingestelltes Enzym wäre, sondern eine Phospho-diesterase, die auch andere Phosphorsäure-diester allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit auftrennt. Dafür sprach, daß Extrakte aus Gerstenmalz, die durch Permutit gelaufen waren, also frei von Phospholipase D sein mußten, bei Einwirkung auf Lecithin wohl Glycero-phosphorsäure-cholinester, aber kein freies Cholin liefern. Also war auch das für die enzymatische Spaltung des Cholinesters verantwortliche Enzym adsorbiert (oder inaktiviert) worden und war möglicherweise identisch mit der Phospholipase D.

### Praktische Bedeutung der Phospholipasen

Bei A. Ercoli und A. Contardi<sup>1</sup>) findet man — allerdings ohne Quellenangabe oder nähere Einzelheiten — die Bemerkung, daß bei Verfütterung von Reiskleie an Kühe eine Lecithin-spaltende Wirkung in der Milch nachgewiesen werden konnte. Wenn das stimmt, so hätte die Beeinflussung oder überhaupt das Vorkommen eines Phosphatid-spaltenden Enzyms in der Milch je nach Art des Futters

\*) Für diesen Zweck sowie für die Abtrennung des freien Cholins hat sich das Permutit G der Fa. Permutit A.-G., Berlin-Schmargendorf bewährt, der wir auch an dieser Stelle für die Überlassung der benötigten Mengen unseren Dank aussprechen.

einige praktische Bedeutung, auch wenn die Rolle, die die Phosphatide bei einzelnen Vorgängen in der Milchwirtschaft ohne Zweifel spielen, noch nicht restlos geklärt ist. Daß Butter bei der Lagerung mitunter „fischig“ wird, scheint allerdings mehr auf Oxydationsvorgänge zurückzugehen als auf eine enzymatische Abspaltung von Cholin aus Lecithin<sup>56)</sup>. Auf praktische Erwägungen gehen Untersuchungen von R. H. Smith<sup>41)</sup> zurück, der eine Phospholipase D in dem Latex von *Hevea brasiliensis* fand. Nach Ansäuern der Latex auf  $p_H$  4 mit Ameisensäure und nach Zugabe von Alkohol bis auf eine Konzentration von 80% wurde eine Phospholipase D aktiv. Mit diesem eigenartigen Verhalten im alkoholischen Medium erklärt Smith die niedrigen Ausbeuten an Latex-Phosphatiden, die einige Bearbeiter<sup>57)</sup> beim Ausziehen mit Alkohol erhalten haben. Seine Vermutung, daß die Phospholipase D bei der Koagulation des Latex eine Rolle spiele, hat sich nicht bestätigen lassen.

Aus unseren Beobachtungen, daß Getreide und auch daraus hergestellte Mahlprodukte Phosphatide spalten<sup>58)</sup>, schlossen wir, daß der schon seit Jahren bekannte Lecithin-Rückgang, der in Eierteigwaren bei der Lagerung auftritt (meist erst nach Wochen oder Monaten bemerkbar), enzymatisch bedingt sein könnte. Enzymatische Veränderungen in wasserarmen Lebensmitteln sind an sich nicht unbekannt, obwohl nur wenige systematische Untersuchungen darüber vorliegen<sup>59)</sup>. Als „Lecithin-Rückgang“ bezeichnet man einen Rückgang an Alkohol-löslicher Phosphorsäure in Eierteigwaren, die als Maß für das vorhandene Lecithin (daher auch nicht ganz korrekt als Lecithin-Phosphorsäure bezeichnet) und damit als Grundlage für die Berechnung des Eigenhaltes dieser Erzeugnisse dient. Die Ursache für diese Veränderung wurde einmal gesucht in kolloid-chemischen Veränderungen, in dem Eingehen symplexartiger Bindungen des Lecithins an das Eiweiß, zum anderen aber in biochemischen, d. h. enzymatischen Einwirkungen<sup>60)</sup>.

Die dritte Möglichkeit einer mikrobiologischen Einwirkung scheidet wegen des niedrigen Wassergehaltes (etwa 10%) solcher Erzeugnisse aus. Hier stehen sie im hygroscopischen Gleichgewicht mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von unter 70–75%, die als untere Grenze für die Lebenstätigkeit der in Frage kommenden Mikroorganismen angesehen wird<sup>61)</sup>.

Keine der Deutungsmöglichkeiten ließ sich bisher einwandfrei bestätigen. Wir haben die Veränderungen nochmals an verschiedenen Erzeugnissen nachgeprüft und eine

deutliche Abhängigkeit von dem Wassergehalt bestätigt gefunden<sup>58)</sup>. Es ließ sich beweisen, daß die Phospholipase D bei diesen Veränderungen mitwirkt durch Nachweis des beim Lecithin-Rückgang freigemachten Cholins und durch Verhinderung des Lecithin-Rückganges bei Zugabe von Inhibitoren<sup>62)</sup>. Inaktiviert man das Enzym in den einzelnen Rohstoffen durch entsprechende Vorbehandlung, dann zeigen die daraus hergestellten Erzeugnisse keinen Lecithin-Rückgang mehr. Selbstverständlich können solche Herstellungsmöglichkeiten aus lebensmittelrechtlichen und anderen Gründen nur theoretisches Interesse beanspruchen. Die Bedeutung der Ergebnisse liegt auf analytischem Gebiet, weil damit endgültig dargelegt ist, daß die Beurteilung eines Eigenhaltes nach der Menge der Alkohol-löslichen Phosphorsäure nicht zulänglich ist.

Enzymatische Vorgänge in derartigen wasserarmen Systemen sind nicht leicht zu verfolgen, einmal weil sie in langen Zeiträumen ablaufen, zum anderen weil die äußeren Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) konstant gehalten werden müssen und schließlich, weil sich verschiedene Enzymwirkungen überlagern. So wird z. B. der Lecithin-Rückgang nicht nur durch die Phospholipase D allein (die ja zu einer Alkohol-löslichen Phosphatidsäure führt) bewirkt, sondern zusammen mit der Phosphatase, welche die Phosphatidsäure weiter aufspaltet.

Über die analytische Bedeutung des Sonderfalles hinaus stellen die von uns<sup>58, 62)</sup> am Lecithin-Rückgang studierten Vorgänge einen Modellfall für enzymatische Veränderungen in wasserarmen Lebensmitteln dar, Veränderungen, über deren Ausmaß und über deren Abhängigkeit von den Feuchtigkeitsverhältnissen noch zu wenig bekannt ist<sup>63)</sup>. Systematische Untersuchungen über die Abhängigkeit der Geschwindigkeit solcher Enzymreaktionen in wasserarmen Systemen von der mit diesen Systemen im Gleichgewicht stehenden relativen Luftfeuchtigkeit sind am Modellgemisch Gerstenmalz-Lecithin in Angriff genommen. Die Phospholipasen B und D haben sich dabei als gut geeignete Leitenzyme erwiesen, da sie auch in derartigen trockenen Systemen noch in tragbaren Zeiträumen meßbare Aktivitäten entfalten. Die bisherigen Ergebnisse<sup>64)</sup> lassen eine deutliche Parallelität zwischen der Sorptionsisotherme dieses Systems und dem Ausmaß der enzymatischen Einwirkung in den die Praxis interessierenden Bereichen erkennen. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge ist für die Lagerung und für die Haltbarkeit von wasserarmen Lebensmitteln, deren Enzyme im Herstellungsgang nicht inaktiviert worden sind, von grundsätzlicher Bedeutung.

*Herrn Prof. Dr. Dr. W. Diemair bin ich für die Förderung der in dieser Zusammenfassung erwähnten eigenen Arbeiten sehr zu Dank verpflichtet.*

*Dem Verband der chemischen Industrie - Fonds der chemischen Industrie danke ich für eine Beihilfe.*

Eingegangen am 6. Oktober 1955 [A 693]

<sup>56)</sup> Zusammenfassende Darstellung dieses Problems bei K. J. Demeter: Dtsch. Lebensm.-Rdsch. 50, 169 [1954].

<sup>57)</sup> E. Rhodes u. R. O. Bishop, Quart. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 2, 125 [1930]; G. R. Trisham, Biochemic. J. 36, 400 [1942]; R. F. A. Altman, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 65, 919 [1946]; W. L. Resing, J. Rubb. Res. Inst. Malaya 13, 141 [1951], zit. nach R. H. Smith, Biochemic. J. 56, 240 [1954].

<sup>58)</sup> L. Acker, W. Diemair u. R. Jäger, Z. Lebensm.-Unters. u. -Forsch. 97, 373 [1954].

<sup>59)</sup> F. Kiermeier u. E. Coduro, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 98, 119 [1954]; 102, 7 [1955]; Biochem. Z. 325, 280 [1954].

<sup>60)</sup> Überblick über die diesbezügliche Literatur: Handbuch der Lebensmittel-Chem., Berlin 1938, Bd. V, S. 267, sowie bei L. Acker, W. Diemair u. R. Jäger, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 97, 373 [1954].

<sup>61)</sup> B. Stille, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 88, 9 [1948].

<sup>62)</sup> L. Acker u. R. Jäger, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 99, 13 [1954].

<sup>63)</sup> S. z. B. F. Kiermeier, diese Ztschr. 60, 175 [1948].

<sup>64)</sup> L. Acker u. E. Lück, unveröffentl.