

- [21] H. W. Gardner & D. Weisleder, *Lipids* 5, 678 (1970).
- [22] R. C. Badami & L. J. Morris, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 42, 1119 (1965).
- [23] W. H. Tallent, J. Harris, I. A. Wolff & R. E. Lundin, *Tetrahedron Letters* 36, 4329 (1966).
- [24] B. E. Philips, C. R. Smith, Jr. & L. W. Tjarks, *Biochim. biophys. Acta* 210, 353 (1970).
- [25] A. Graveland, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 47, 352 (1970).
- [26] B. O. Christophersen, *Biochim. biophys. Acta* 164, 35 (1968).
- [27] G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).
- [28] K. Surrey, *Plant Physiol* 39, 65 (1964).
- [29] R. T. Holman, *Arch. Biochemistry* 15, 403 (1947).
- [30] E. Stahl (Hrsg.), «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl. Springer, Berlin–Heidelberg–New York 1967.

302. Über das Lipoxygenase-«Liperoxidase»-System in Cerealien:

II. Charakterisierung des Hydroperoxide-abbauenden Enzyms¹⁾

von P. Schreier und W. Heimann

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe

(10. IX. 71)

Zusammenfassung. Durch an Hafer mit einem Ammoniumsulfatpräparat ausgeführten Untersuchungen wird bestätigt, dass am enzymatischen Linolsäurehydroperoxid (LHPO)-Abbau eine Peroxidase beteiligt ist, welche die Bildung von Hydroxy-*cis-trans*-dienfettsäuren aus LHPO katalysiert. Dabei fungieren die aus der H₂O₂-Peroxidase-Katalyse bekannten Verbindungen als Wasserstoffdonatoren. Durch Messungen mit *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid als Wasserstoffdonator werden die für das Enzym charakteristischen Eigenschaften ermittelt.

Unsere bisherigen Ergebnisse [1] fügen sich zwanglos in die von Rothe u. Mitarb. formulierten Vorstellungen [2] über das Prinzip der enzymatischen Veränderungen

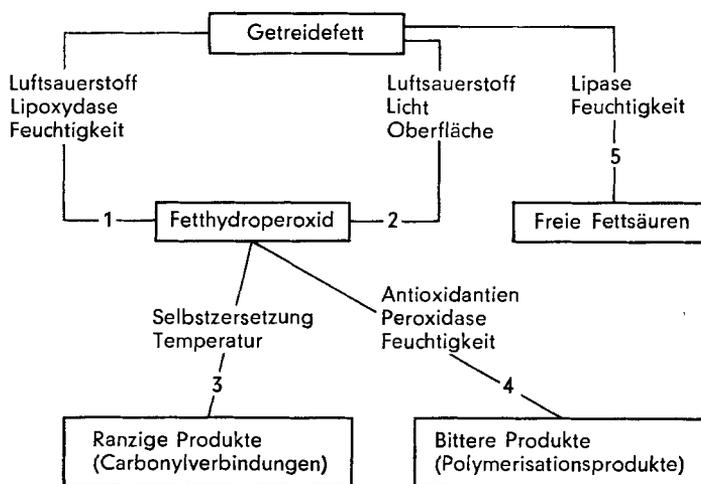


Fig. 1. Wege der Fettveränderungen in Getreideprodukten (nach Rothe u. Mitarb. [2])

¹⁾ I. Mitteilung s. [1].

am Lipidanteil in Cerealien-Samen (Fig. 1) ein. Zur eindeutigen Charakterisierung wurde in unseren weiteren Arbeiten das Verhalten des Hydroperoxide abbauenden Enzyms von kinetischer Seite angegangen.

Solange eine Trennung der Enzyme nicht erfolgt ist, sind definierte Aussagen über die Kinetik des Hydroperoxide umsetzenden Enzyms ohne vorherige Ausschaltung der Lipoxygenase nicht möglich. Wie schon bei den bisherigen Versuchen [1] wurden daher die aus einer Soja-Lipoxygenase-Katalyse stammenden Linolsäurehydroperoxide (LHPO) eingesetzt.

Für den bereits mehrfach postulierten Peroxidase-Mechanismus bei der LHPO-Abbaureaktion boten sich als Wasserstoffdonatoren die von der H_2O_2 -Peroxidase-Katalyse bekannten Substrate an. Vorversuche hatten gezeigt, dass die bei der H_2O_2 -Peroxidase-Reaktion wirksamen Wasserstoffdonatoren auch von dem LHPO abbauenden Enzym umgesetzt werden (Guajakol, Pyrogallol, *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid, *o*-Tolidin, *o*-Dianisidin, Homovanillinsäure). Die Aktivitätsmessungen wurden mit *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid und einem im Bereich von 25–50-proz. Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällten Präparat (ASP.) ausgeführt, wobei die dehydrogenierte Verbindung spektralphotometrisch bei 490 nm bestimmt wurde.

Die Fig. 2 und 3 geben den Verlauf der Enzymreaktion und die Abhängigkeit deren Geschwindigkeit von der eingesetzten Enzymmenge wieder. Die graphisch ermittelte Anfangsgeschwindigkeit (v_0) hängt im angegebenen Bereich linear von der Enzymkonzentration ab. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Kinetik des LHPO abbauenden Enzyms lässt sich demnach mit diesem Verfahren bestimmen. Hierzu wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration der LHPO und der verschiedenen Wasserstoffdonatoren und vom pH untersucht. Versuche über Hitzeinaktivierung des Enzyms schlossen sich an. Zur Überprüfung der

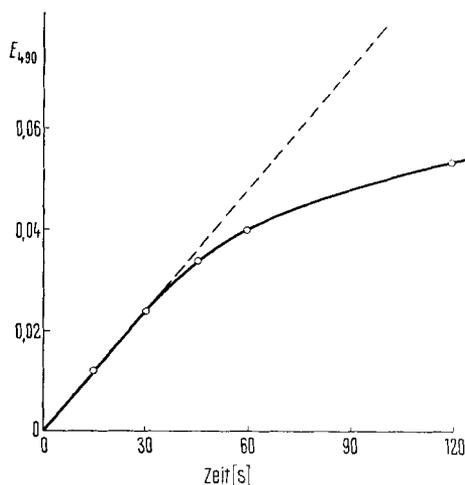


Fig. 2. Zeitlicher Verlauf der LHPO-abbauenden Enzymreaktion

Im Testvolumen von 3,05 ml: $1,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l LHPO in 0,05 ml Äthanol, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid, 270 μ g Protein, 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, mit bidest. Wasser aufgefüllt

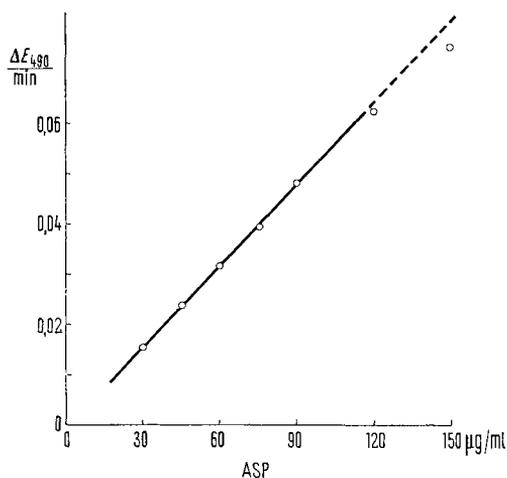


Fig. 3. Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymkonzentration

Im Testvolumen von 3,05 ml: $1,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l LHPO in 0,05 ml Äthanol, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *p*-Phenylen-diamin-dihydrochlorid, 90, 135, 180, 225, 270, 360 und 450 μg Protein, 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, mit bidest. Wasser aufgefüllt

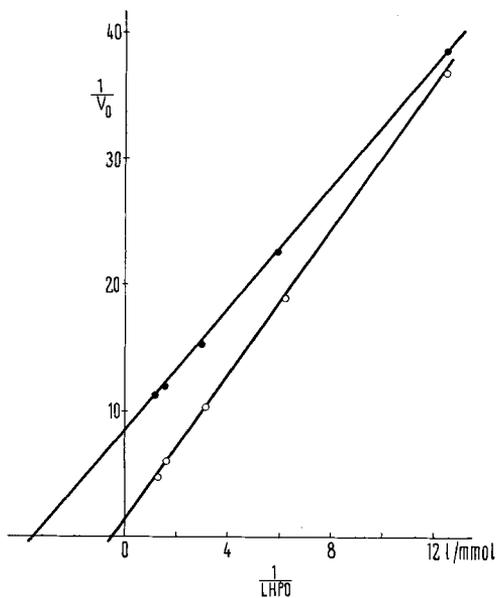


Fig. 4. Darstellung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der LHPO-Konzentration (nach Lineweaver-Burk)

—•—•— [D] = $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l —○—○— [D] = $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

mit dem Enzym-Rohextrakt erhaltenen Ergebnisse [1] wurden Messungen im Bereich der Dien-Absorption (234 nm) ausgeführt.

Die Konzentration der LHPO wurde in einem Bereich von mehreren Zehnerpotenzen bis auf 2,5 mMol/l erhöht. Messungen bei höheren Konzentrationen waren wegen Trübung der Lösung nach Zugabe der LHPO nicht mehr möglich. Aus Fig. 4 geht hervor, dass gegenüber LHPO die *Michaelis*-Konstante von der Wasserstoffdonatorkonzentration abhängt²⁾.

Die Kinetik der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Wasserstoffdonatorkonzentration zeigt (Fig. 5), dass die Anfangsgeschwindigkeit der Donator-Konzentration $[D]$ nicht proportional ist. Bei konstant gehaltenen übrigen Bedingungen erreicht bei steigender Donatorkonzentration die Anfangsgeschwindigkeit asymptotisch einen oberen Grenzwert.

Das pH-Optimum liegt mit pH 6,8 (für *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid) in dem allgemein für Peroxidasen angegebenen Bereich (Fig. 6).

Bei den Versuchen zur Inhibierung des Enzyms (Fig. 7) wurde eine 50-proz. Hemmung mit $4 \cdot 10^{-4} \text{ M CN}^-$ und $4 \cdot 10^{-5} \text{ M S}^{2-}$ erreicht.

Auf die relativ hohe Thermoresistenz der Peroxidase und des untersuchten LHPO abbauenden Enzyms wurde bereits hingewiesen [1]. Zur Totalinaktivierung war Erhitzen auf 100° erforderlich.

Bei den Kontrollmessungen im Bereich der Dien-Absorption (234 nm) wurden statt Linolsäure [1] LHPO und *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid eingesetzt. Die Extinktion bei 234 nm (LHPO) nahm im Verlauf der Enzymreaktion nicht nur nicht ab, sondern sogar etwas zu infolge der Absorption des dehydrogenierten Wasserstoffdonators (Fig. 8).

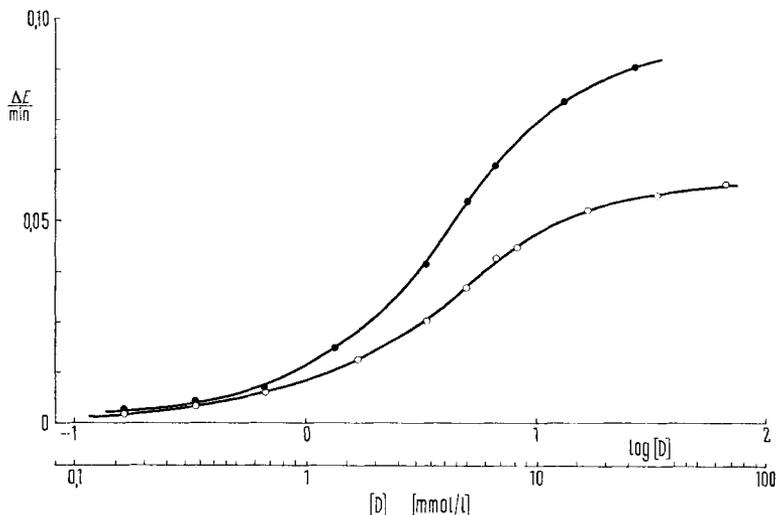


Fig. 5. Abhängigkeit der Reaktionsanfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion von der Konzentration des H-Donators

—●—●— *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid —○—○— Pyrogallol

²⁾ In einer weiteren Mitteilung werden wir auf das Problem des Reaktionsmechanismus näher eingehen.

Im Gegensatz zu der bei der «Guajakol-LHPO-Oxydoreductase» beschriebenen Abnahme der Dien-Konjugation [3] und in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen [1] und früheren Befunden bei Sojabohnen [4] bleibt die konjugierte Dienstruktur in den aus LHPO gebildeten Produkten erhalten.

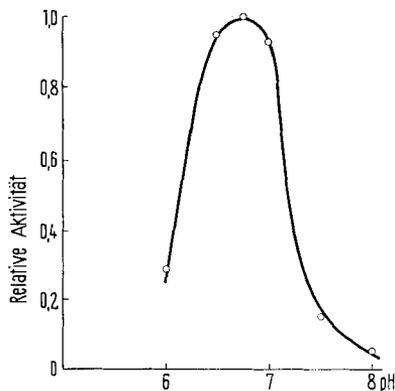


Fig. 6. *pH-Optimum*

Pufferkonzentration im Testvolumen von 3,05 ml: 0,066 M; Phosphatpuffer (pH 6,0–7,5) TRIS/HCl-Puffer (pH 8,0–9,0)

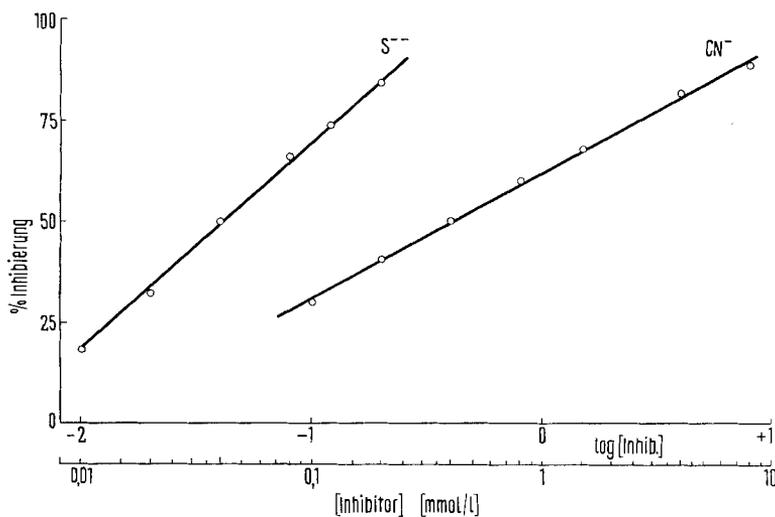


Fig. 7. *Einfluss der Hemmstoff-Konzentration auf die Inhibierungsrate*

Versuchsbedingungen wie in Fig. 3 angegeben, ohne Präinkubation mit dem Inhibitor

Die beschriebenen Versuche ergeben, dass das am antioxydativen System des Hafers beteiligte Enzym eine Peroxidase ist. Dieses Enzym ist also ein die Oxydationsvorgänge am Lipidanteil mitbestimmender Faktor. Als Wasserstoffdonatoren stehen dafür die in Hafer vorkommenden phenolischen Antioxydantien [5] zur Ver-

fügung. Als wesentliche Funktion des Enzyms ist neben dem Schutz oxydationsempfindlicher Lipide die Mitwirkung an einer Nutzung des Luftsauerstoffs für gesteuerte Oxydationen in Betracht zu ziehen.

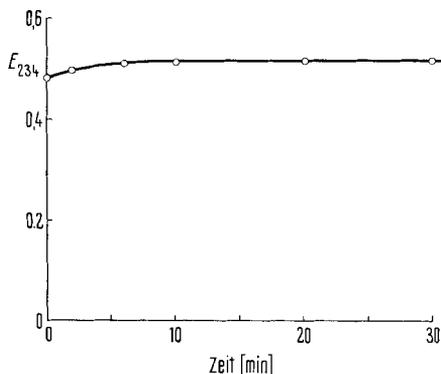


Fig. 8. Verlauf der LHPO abbauenden Enzymreaktion verfolgt bei 234 nm

Im Testvolumen von 3,05 ml: 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l LHPO in 0,05 ml Äthanol, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid, 450 μ g Protein, mit bidest. Wasser aufgefüllt

Experimentelles. – *Allgemeines.* Als Versuchsmaterial diene unpräparierter entspelzter Schweden-Hafer (Ernte 1968).

Die Aktivitäten wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bestimmt.

Protein wurde nach *Beisenherz et al.* [6] bestimmt.

Herstellung der Enzympräparate. Der Enzym-Rohextrakt wurde wie in [1] beschrieben hergestellt. Aus dem Rohextrakt wurde durch Ammoniumsulfat mit 25–50-proz. Sättigung eine Proteinfraction gefällt, die mit $20000 \times g$ 30 Min. bei 5° zentrifugiert wurde. Der Niederschlag wurde in eiskaltem 0,05 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 6,8 aufgenommen, wobei das Volumen 10% des Rohextraktvolumens betrug. Die Lösung wurde über Nacht bei 0–5° gegen 10 l 0,005 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 6,8 dialysiert und dann mit $20000 \times g$ bei 5° klarzentrifugiert (= ASP.).

Darstellung der LHPO: s. [1].

Bestimmung des LHPO abbauenden Enzyms: Ansatz: Messung bei 490 nm gegen Luft; Schicht von 1 cm; 25°; Volumen: 3,05 ml.

In die Küvette wurden pipettiert: x ml Enzymlösung, 2 ml 0,1 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 6,8, $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid, ad 3 ml bidest. Wasser. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $1,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l LHPO (in 0,05 ml Äthanol) eingeleitet. Ein Blindversuch wurde mit bidest. Wasser an Stelle der Enzymlösung durchgeführt. Die Reaktionsanfangsgeschwindigkeit wurde graphisch ermittelt.

Inhibierungsversuche. Messungen nach Zusatz von KCN (*p. a. Merck*) bzw. Na₂S (*p. a. Merck*) (ohne Präinkubation).

Hitzeinaktivierung. Je 2 ml ASP. wurden bei 60°, 70°, 80°, 90° und 100° jeweils 2, 4, 8, 12 und 20 Min. inkubiert, dann sofort in Eiswasser gekühlt, evtl. zentrifugiert und die Restaktivität bei 25° wie oben bestimmt.

Kontrollmessung mit LHPO und p-Phenylendiamin-dihydrochlorid bei 234 nm: In eine 1-cm-Quarzküvette wurden pipettiert: 2 ml 0,1 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 6,8, $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l LHPO (in 0,05 ml Äthanol), $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid, ad 3 ml bidest. Wasser. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung ausgelöst. Die Absorption des Donators und des Enzyms bei 234 nm wurden kompensiert. Die Reaktion wurde 30 Min. lang verfolgt.

Wir danken der Fa. Knorr, Heilbronn, für die Überlassung des Untersuchungsmaterials, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung eines Zeiss-Spektralphotometers PMQ II und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie sowie der AIF für die Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Heimann & P. Schreier, *Helv.* 54, 2794 (1971).
 [2] M. Rothe, G. Wölm & I. Voigt, *Nahrung* 17, 149 (1967).
 [3] J. Schormüller, J. Weber, B. Höxer & W. Grosch, *Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch.* 139, 357 (1968).
 [4] J. A. Blain & T. Barr, *Nature* 190, 538 (1961).
 [5] D. G. H. Daniels, H. G. C. King & H. F. Martin, *Nature* 191, 1302 (1961); D. G. H. Daniels & H. F. Martin, *Chemistry & Ind.* 1964, 2058; 1965, 1763; *J. Sci. Food Agric.* 18, 589 (1967).
 [6] G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).

303. Heterogenität der *Drosophila*-Aldolase und Hybridisierung mit Säugeraldolase

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

20. Arbeit über Aldolasen¹⁾

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(13. X. 71)

Summary. – 1. FDP aldolase from pupae of *Drosophila melanogaster* is shown by the following findings to be a tetrameric molecule with two non-identical subunits: a) Disc electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecylsulfate yields a subunit molecular weight of 40 000 (equal to that of rabbit muscle aldolase). b) Hybridisations of *drosophila* aldolase with type C aldolase from rabbit and calf brain lead to a five-membered set of isoenzymes.

2. The non-identity of the subunits is suggested by the behaviour on isoelectro focussing. While rabbit muscle aldolase and human liver aldolase show five isoenzymes (hybrids from the non-identical subunits), *drosophila* aldolase can be separated into three peaks only. This result may be interpreted in two ways: a) The isoenzymes α_4 and $\alpha_3\alpha'$ are not separated from each other in the pH range 5–8, neither are $\alpha\alpha'_3$ and α'_4 . Or b) α_2 and α'_2 are not split under the condition of isoelectro focussing and therefore 3 isoenzymes α_4 , $\alpha_2\alpha'_2$, and α'_4 are obtained only.

3) Isoenzyme I (supposedly mainly α_4) and isoenzyme III (supposedly mainly α'_4) are identical in the following respects: *Michaelis* constant, pH profile, FDP/F-1-P activity ratio, inactivation by carboxypeptidase A, disc electrophoresis on polyacrylamide and molecular weight. The only difference found between isoenzyme I and III is the specific activity: isoenzyme I is nearly twice as active as isoenzyme III.

4. The fact that hybridisation between *drosophila* aldolase and type C aldolase from rabbit and calf brain yields a set of isoenzymes proves that interspecies hybridisation is possible between FDP aldolases from vertebrates and invertebrates. FDP aldolases from vertebrates and invertebrates seem to be homologous enzymes. Our results suggest that the conformation of aldolases remained relatively unchanged during evolution.

Die FDP-Aldolase (EC 4.1.2.13, Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase) aus Puppen der *Drosophila melanogaster* (Wildtyp) ist der Muskelaldolase des Kaninchens in verschiedenen Eigenschaften sehr ähnlich [2] [3] [4]. Sie

¹⁾ 19. Arbeit über Aldolasen: s. [1].