

- [8] J. Chatt & B. L. Shaw, J. chem. Soc. 1960, 1718; H. Yamazaki, T. Nishido, Y. Matsumoto, S. Sumida & N. Hagihara, J. Organomet. Chem. 6, 86 (1966); R. G. Miller, R. D. Stauffer, D. R. Fahey & D. R. Parnell, J. Amer. chem. Soc. 92, 1511 (1970); M. D. Rausch & F. E. Tibbets, Inorg. Chem. 9, 512 (1970); M. L. H. Green & M. J. Smith, J. chem. Soc. (A) 1971, 639.
- [9] M. J. Hudson, R. S. Nyholm & M. H. B. Stiddard, J. chem. Soc. (A), 1968, 40.
- [10] T. P. Dang & H. B. Kagan, Chem. Commun. 1971, 481; H. B. Kagan & T. P. Dang, J. Amer. chem. Soc. 94, 6429 (1972).

## 37. Über den enzymatischen Hydroperoxidabbau in Cerealien Enzymcharakterisierung und Reaktionsprodukte

von W. Heimann und P. Dresen

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe

(27. X. 72)

*Zusammenfassung.* Durch Haferenzymextrakte erfolgt bei Linolsäurehydroperoxiden (LHPO) sowohl ein Abbau der Hydroperoxidgruppe als auch der Dienstruktur. Die Umsetzung der Hydroperoxide verläuft enzymatisch (Isomerase) und führt nach Hydrolyse zur Bildung von 9,12,13-Trihydroxy-*trans*-10-octadecensäure und 9,10,13-Trihydroxy-*trans*-11-octadecensäure.

Das in Hafer wie auch in anderen Cerealien vorkommende Enzym Lipoxygenase (E.C. 1.13.1.13) katalysiert die Bildung von optisch aktiven Dienhydroperoxiden aus ungesättigten *cis*-1-*cis*-4-Pentadiensystemen [1, 2]. Bisher konnten jedoch nach Inkubation von Linolsäure mit Haferenzym-Rohextrakten keine Linolsäurehydroperoxide (LHPO) isoliert werden, da diese sofort durch Abbaureaktionen umgesetzt werden [3].

Die vorliegende Untersuchung soll im speziellen zeigen, ob enzymatisch gebildete Linolsäurehydroperoxide durch Haferenzyme sowohl an der Hydroperoxidgruppe als auch an der Dienstruktur verändert werden.

Von Balls *et al.* wurde bereits 1943 festgestellt, dass in Soja-Lipoxygenasepräparaten ein Hydroperoxid abbauender Faktor vorhanden ist [4]. Blain & Barr vermuteten in diesem Faktor ein Enzym, da er hitzestabil und nicht dialysierbar war. Der damals beobachtete Peroxidabbau war von keiner Änderung der Dienstruktur begleitet [5]. Heimann & Schreier stellten bei Hafer fest, dass durch Lipoperoxidasen ein LHPO-Abbau zu Monohydroxysäuren unter Erhaltung der Dienstruktur erfolgt [6]. Zimmermann fand bei Leinsamen und Gardner bei Mais eine LHPO-Isomerase, die aus Linolsäurehydroperoxiden die Bildung von einfach ungesättigten Hydroxyketosäuren katalysiert [7, 8]. Graveland *et al.* berichtete über LHPO-Isomerasen in Gerste, die die Bildung von zwei isomeren  $\alpha$ -Hydroxyketosäuren, zwei  $\gamma$ -Hydroxyketosäuren und zwei Dihydroxysäuren katalysieren [9].

*Charakterisierung des LHPO-abbauenden Haferenzym.* Zum Nachweis des LHPO-abbauenden Faktors wurden Haferenzymextrakte mit LHPO (9-Hydroperoxy-*trans*-10-*cis*-12-octadecadiensäure  $\sim 30\%$  und 13-Hydroperoxy-*cis*-9-*trans*-11-octadecadiensäure  $\sim 70\%$ ) versetzt und die Extinktionsänderung im Dienabsorptionsbereich (bei 234 nm) verfolgt. Es fand eine rasche Extinktionsabnahme statt.

Ebenso wurden die LHPO auf einen Abbau der Hydroperoxidgruppe nach der  $\text{Fe}^{++}/\text{NH}_4\text{SCN}$  Methode getestet [10]. Es wurde hierzu ein durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung

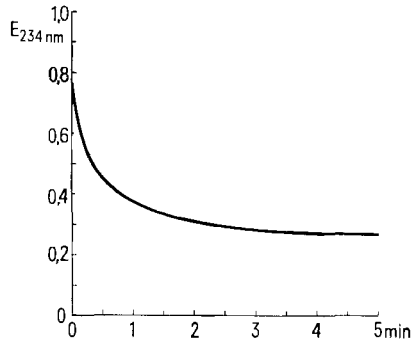


Fig. 1. LHPO-Abbau der Dienabsorption bei 234 nm. Durchführung mit  $3,3 \times 10^{-5}$  Mol/l LHPO; 0,2 ml Enzymlösung (Sephadex G-150 Filtrat Fr. Nr. 46) zu 3 ml Phosphatpuffer pH 5,5

und Gelfiltration (Sephadex G-150) gereinigter Enzymextrakt (Abwesenheit von freien, niedermolekularen H-Donatoren), der hohe Dienabbauaktivität zeigte, eingesetzt. Dabei konnte auch ein deutlicher Abbau an Hydroperoxidgruppen festgestellt werden.

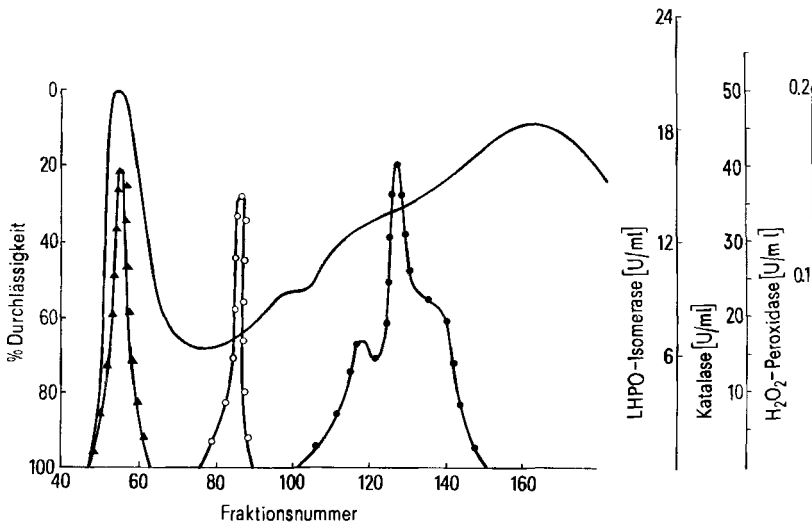


Fig. 2. Proteinkurve und Aktivitätsverteilung von Haferenzymen bei der Gelchromatographie (Sephadex G-150)

Proteinkurve: ———; LHPO-Isomerase: —▲—▲—▲—  
Katalase: —○—○—○—;  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Peroxidase: —●—●—●—

Zur Charakterisierung der Enzymnatur des Abbaufaktors wurden Hitzeinaktivierungsversuche, Inhibierungsversuche mit KCN,  $\text{Na}_2\text{S}$  und *p*-Phenylendiamin-HCl durchgeführt. Ausserdem wurde die Abhängigkeit der Dienabbauaktivität von der Enzym- und LHPO-Konzentration und dem pH festgestellt:

Die Hitzeinaktivierungsversuche ergaben ab 70° eine deutliche Abnahme der Aktivität. Eine Totalinaktivierung trat nach 6 Min. Erhitzen auf 90° ein.

Die KCN-Inhibierungsversuche ergaben eine 50proz. Inhibierung bei  $1 \times 10^{-3}$  M, d. h. das Enzym ist erheblich Cyanid-unempfindlicher als  $H_2O_2$ -Peroxidase ( $H_2O_2$ -Peroxidase:  $1 \times 10^{-5}$  M) [11]. Die Sulfidhemmbarkeit (50proz. Inhibierung) liegt bei  $1,8 \times 10^{-6}$  M. Eine völlige Inhibierung der Abbaureaktion wird bei  $3 \times 10^{-4}$  M *p*-Phenyldiamin-HCl erreicht.

Die Abbauprodukte zeigte im schwach sauren Bereich (pH 5,5) ein Maximum. Ab pH 8 war nur noch eine geringe Aktivität vorhanden.

Maximale Abbauprodukte wurde bei einer Konzentration von  $4-7 \times 10^{-5}$  M LHPO erreicht. Bei höheren Konzentrationen an LHPO wurde die Reaktion zunehmend inhibiert.

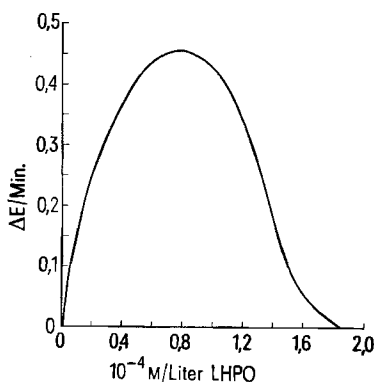


Fig. 3. Dienabbauaktivität in Abhängigkeit von der LHPO-Konzentration (0,1 ml Rohextrakt;  $E_{234 \text{ nm}}$ ).

Die Dienabbauaktivität war direkt proportional der zugesetzten Enzymmenge. Jedoch fand auch in gereinigten Enzympräparaten (Gelfiltration) mit hoher Aktivität ab einer bestimmten Proteinkonzentration in der Probe eine zunehmende Reaktionshemmung statt (50proz. Hemmung bei 0,7 mg Protein/ml; Protein aus Fr. Nr. 52 Sephadex G-150 Filtrat). Die Inhibierung der Reaktion ist vermutlich auf einen in der Proteinlösung befindlichen Inhibitor zurückzuführen. Mit dieser Frage sind wir weiter befasst.

*Gewinnung und Analyse der Reaktionsprodukte.* Zur Vermeidung von Inhibierungsreaktionen wurden 50 ml Enzymlösung (Gelfiltrat aus Fr. Nr. 45–60) mit 250 ml Phosphatpuffer pH 5,5 verdünnt und langsam tropfenweise mit 0,05 mMol LHPO (in 3 ml Äthanol) versetzt. Nach 30 Min. wurde mit 2 N HCl auf pH 2 angesäuert und die Lösung mit peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt. Zur analytischen DC. der Reaktionsprodukte auf Kieselgel G war die Mischung Äther/Äthanol/Eisessig 96:3:1 (v/v/v) am besten geeignet (Fließmittel 1). Zur präparativen Trennung die Mischung Äther/Äthanol/Eisessig 98:1:1 (v/v/v) (Fließmittel 2). Ausserdem wurden die Reaktionsprodukte mit dem Laufmittel Benzol/Äther/Äthanol/Eisessig 50:40:2:0,2 (v/v) nach *Freeman & West* [12] getrennt (Fließmittel 3). Die Platten wurden anschliessend mit 50proz.  $H_2SO_4$  besprüht und bei 150° im Trockenschrank 10 Min. erhitzt.

Neben der LHPO-Haferenzyminkubation wurden 50 mg Linolsäure direkt mit 15 g entfettetem Haferschrot in 150 ml Phosphatpuffer pH 7,0 unter Sauerstoffbelüftung 1 Std. lang gerührt. Die Reaktionsprodukte wurden in gleicher Weise extrahiert und dünnschichtchromatographisch getrennt.

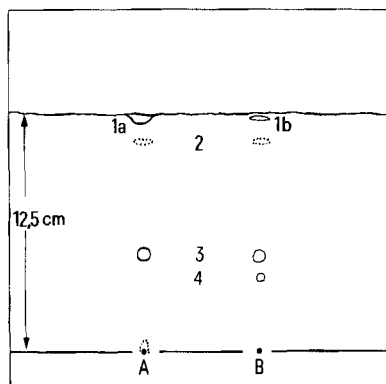


Fig. 4. *Dünnschichtchromatogramm der enzymatisch gebildeten Umsetzungsprodukte*  
 A: Linolsäure-Hafer    B: LHPO-Haferenzympräparat  
 Äther/Äthanol/Eisessig 96:3:1 (v/v)

Fliessmittel 1: Substanz **1a** besteht aus nicht näher untersuchten Carbonylverbindungen zusammen mit wenig nicht abgetrennten 13- und 9-Hydroxy-*cis,trans*-octadecadiensäuren (Heimann & Schreier [3]); Substanz **1b** besteht aus nicht umgesetzten LHPO; Substanz **2** (Rf 0,87) ist nur in Spuren vorhanden; Substanz **3** (Rf 0,39) stellt das Hauptumsetzungsprodukt dar; Substanz **4** (Rf 0,29) tritt ausschliesslich bei der enzymatischen LHPO-Inkubation und nur in geringer Menge auf. Sie besitzt keine Dienstruktur und ist vermutlich ein Artefakt.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde der LHPO-Abbau mit [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter LHPO durchgeführt. Durch radiometrische Auswertung der DC. konnte bestätigt werden, dass die Substanzen 2–4 Umsetzungsprodukte der LHPO darstellen.

Das Hauptumsetzungsprodukt **3** (Rf 0,39) wurde durch Aufnahme der UV-, IR-, NMR- und Massenspektren als das Isomerengemisch der 9,12,13-Trihydroxy-*trans*-10-octadecensäure und 9,10,13-Trihydroxy-*trans*-11-octadecensäure identifiziert.

Versuche, das Isomerengemisch dünn-schichtchromatographisch zu trennen, führten nicht zum Ziel.

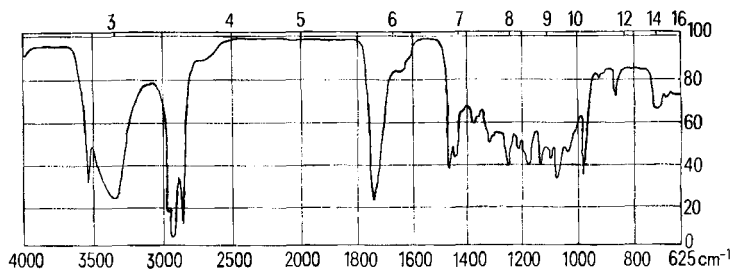


Fig. 5. *IR-Spektrum der 9,12,13-trans-10-octadecensäure-methylester und 9,10,13-Trihydroxy-trans-11-octadecensäure-methylester*

Die in Spuren vorhandene Substanz **2** (Rf 0,87) konnte noch nicht sicher identifiziert werden. Es handelt sich jedoch wahrscheinlich um das Isomerengemisch der 9-Hydroxy-*cis*-12,13-epoxy-*trans*-10-octadecensäure und *cis*-9,10-Epoxy-13-hydroxy-*trans*-11-octadecensäure.

Von Graveland wurde die Bildung dieser Säuren bei der Oxydation von Linolsäure in Weizenmehlteig, d. h. im wasserarmen Medium festgestellt. Er fand, dass im wässrigen Medium (wässrige Weizenmehlsuspensionen) die Hydroxy-epoxysäuren völlig zu den entsprechenden Trihydroxysäuren hydrolysiert werden [13].

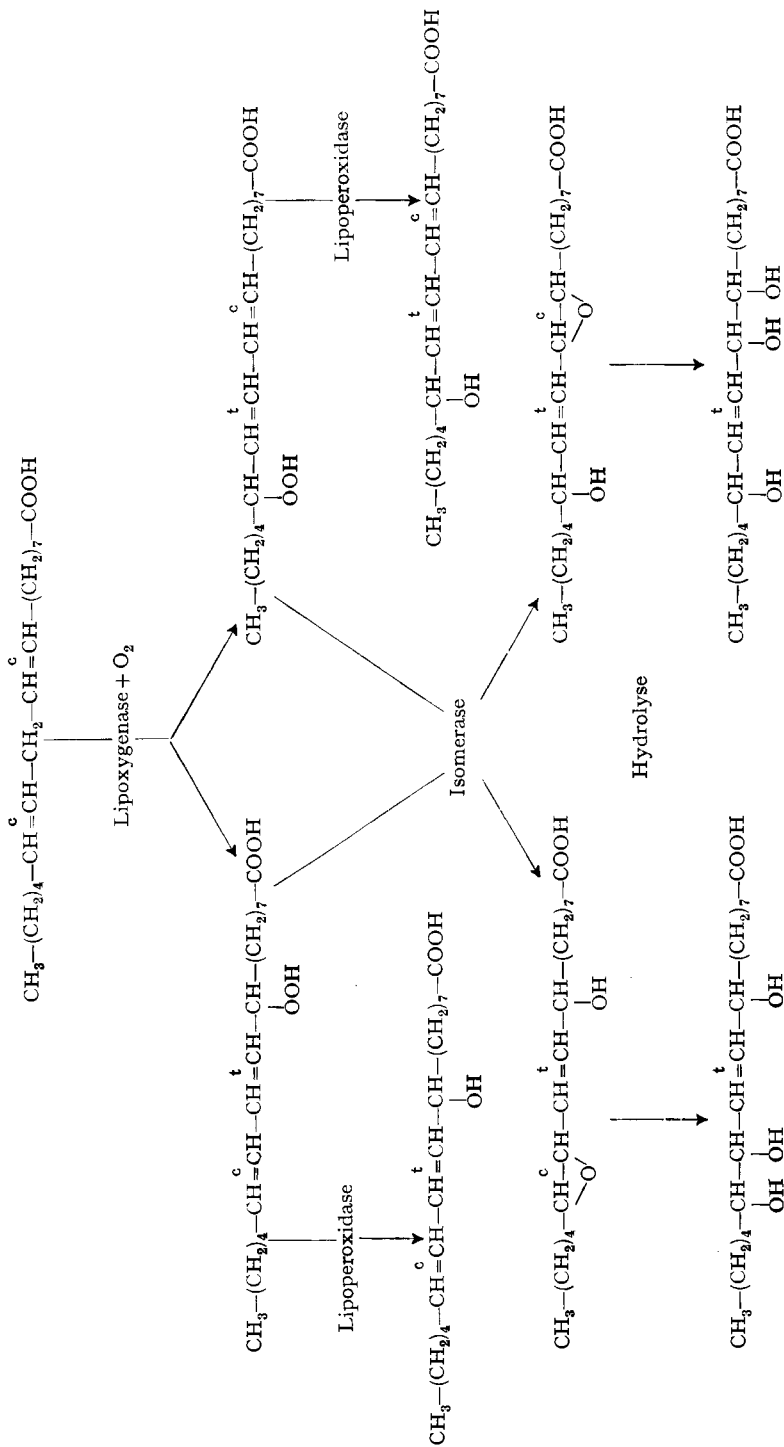


Fig. 6

Unter Berücksichtigung dieser Feststellung kann nun ein erweitertes Reaktionsschema über die enzymatische Bildung und den enzymatischen Abbau der Linolsäurehydroperoxide in wässrigen Haferenzymlösungen aufgestellt werden:

Die Abbauprodukte und die Enzymnatur des Abbaufaktors zeigen, dass die LHPO-Umsetzung durch eine Isomerase katalysiert wird. Der Abbau kann somit sowohl durch eine Lipoperoxidase unter Erhaltung der Dienstruktur zu Monohydroxysäuren erfolgen [6], als auch durch eine Isomerase zu Hydroxy-epoxy-säuren, wobei letztere sofort weiter zu den entsprechenden Trihydroxysäuren hydrolysiert werden.

### Experimentelles

*Allgemeines.* Als Versuchsmaterial diente unpräparierter entpelzter Schweden-Hafer.

Die Aktivitäten wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Schreiber Vitatron UR 400 bestimmt. Protein wurde nach *Beisenherz et al.* [14] bestimmt.

*Herstellung der Enzympräparate.* 125 g mit Aceton kalt entfetteter Haferschrot wurde in 625 ml 0,1 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und 5 Std. bei 0–5° gerührt. Nach Klarzentrifugation (30 Min. bei 20000 × g) wurde aus dem Rohextrakt durch Ammoniumsulfat mit 25–50-proz. Sättigung eine Proteinfraktion gefällt, die mit 20000 × g 30 Min. bei 5° zentrifugiert wurde. Der Niederschlag wurde in 75 ml eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen und die Lösung mit 20000 × g bei 5° klarzentrifugiert.

Zur Gelchromatographie wurde die Proteinlösung auf eine 90 × 5 cm Sephadex G-150 Säule aufgegeben. Durchflussgeschwindigkeit: 45 ml/Std.; Temperatur: 4°; Elution: 0,1 M *Sörensen*-Phosphatpuffer pH 7,0; 10 ml Fraktionen.

*Isomeraseaktivität.* 1 mU entspricht einer Extinktionsabnahme bei 234 nm von 0,001/Min. in einer  $3,3 \times 10^{-6}$  M LHPO-Lösung. In eine 1-cm-Quarzküvette werden pipettiert: x ml Enzymlösung zu 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,5. Die Reaktion wird durch Zugabe einer äthanolischen LHPO-Lösung gestartet und mit einem Schreiber 2 Min. lang verfolgt.

*Katalaseaktivität.* Durch Messung der Extinktionsabnahme bei 240 nm in einer  $12,5 \times 10^{-3}$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1 M Phosphatpufferlösung pH 7,0) 25°;  $\epsilon_{240} = 43,6$  cm<sup>2</sup>/mMol; 1 U bedeutet Spaltung von 1  $\mu$ Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Min. [15].

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Peroxidaseaktivität.* Die Messung wurde mit *p*-Phenylendiamin-HCl nach *Westphal* durchgeführt.  $\epsilon_{490} = 5,5$  cm<sup>2</sup>/ $\mu$ Mol [16].

*Inhibierungsversuche.* Messungen nach Zusatz von KCN, Na<sub>2</sub>S und *p*-Phenylendiamin ohne Präinkubation.

*Hitzeinaktivierung.* Die Enzymlösung wurde auf 70°, 80°, 90° und 100° jeweils 2, 6, 12 und 20 Min. lang erhitzt, dann sofort gekühlt, evtl. filtriert und die Restaktivität wie oben bestimmt.

*Linolsäurehydroperoxide (LHPO).* Enzymatische Herstellung (Soja-Lipoxygenase) von 9-Hydroperoxy-*trans*-10-*cis*-12-octadecadiensäure (~30%) und 13-Hydroperoxy-*cis*-9-*trans*-11-octadecadiensäure (~70%) [11]. Zweifache chromatographische Reinigung; Präparative DC. auf Kieselgel-PF<sub>254</sub>; Fließmittel: Pentan/Äther/Eisessig 60:40:1 (v/v). Die <sup>14</sup>C-LHPO wurden analog unter Einsatz von 25  $\mu$ Ci (U)-<sup>14</sup>C CFB40 Linolsäure (Radiochemical Centre *Amersham*) hergestellt.

*Messung radioaktiver Proben.* Zur Aktivitätsmessung wurde der Dünnschichtscanner LB 2721 der Fa. *Berthold*, Wildbad, benutzt.

*Analytische DC.* Sorptionsschicht Kieselgel-G 0,1 mm; Fließmittel 1: Äther/Äthanol/Eisessig 96:3:1 (v/v); Fließmittel 3: Benzol/Äther/Äthanol/Eisessig 50:40:2:0,2 (v/v).

*Präparative DC.* Sorptionsschicht Kieselgel-PF<sub>254</sub> und Kieselgel-H 0,5–1,0 mm. Fließmittel 2: Äther/Äthanol/Eisessig 98:1:1 (v/v).

*Bestimmung des Hydroperoxidgruppenabbaus.* Aus dem Enzym-LHPO-Inkubationsansatz wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen und der Hydroperoxidgehalt durch die Fe<sup>++</sup>/NH<sub>4</sub>SCN-Methode bestimmt [10].

*UV.-Spektrum.* Substanz **3** (Rf 0,39), kein Maximum im Dienabsorptionsbereich.

*IR.-Spektrum.* Substanz **3** wurde mit Diazomethan methyliert. KBr-Pressling. Gerät *Perkin Elmer* 257. Bei 3550 cm<sup>-1</sup> scharfes Absorptionsmaximum (OH in starker intramolekularer H-Brücke). 3360 cm<sup>-1</sup> (OH-Valenzschwingung). 975 cm<sup>-1</sup> (–CH=CH–, *trans*).

*NMR.-Protonenspektrum.* Das NMR.-Spektrum der methylierten Substanz **3**, gelöst in DCCl<sub>3</sub>, 99,5%, wurde mit einem 90-MHz-Spektrometer der Fa. *Bruker-Physik AG*, Forchheim, aufge-

nommen. Innerer Standard TMS. Es wurden folgende Signale erhalten: Triplett bei  $\delta$  0,9 ppm (3H;  $\text{CH}_3$ -); Pik bei 1,3 ppm (2H;  $-(\text{CH}_2)_n-$ ); Pik bei 1,4 ppm (2H;  $-\text{CH}_2-\text{CHOH}$ ); Multipllett zwischen 2-2,4 ppm (2H;  $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$  und  $-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ ); breiter Pik zwischen 3,2-3,6 ppm (1H;  $\text{H}-\text{COH}$ ); breiter Pik zwischen 3,7-4,2 ppm (2H;  $\text{H}-\overset{\text{OH}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{H}$ ); Singulett bei 3,6 ppm (3H;  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ); Multipllett bei 5,7 ppm (2H;  $\text{HC}=\text{CH}$ ) [18] [19].

*Massenspektrum.* Substanz **3** wurde methyliert und mit Bis-trimethylsilylacetamid silyliert. Das Spektrum wurde mit einem einfach fokussierten Spektrometer *Hitachi-Perkin Elmer* Typ RMU 6 aufgenommen; 70 eV; es traten die charakteristischen TMS-Pike bei 73, 75, 103, 147 auf. Weitere charakteristische Pike bei 155, 173, 259, 301, 439 und 460 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Si}_3$ -100 (Hexanal)) [17] [13].

Herrn Dr. *Benjamins, Bruker-Physik*, Forchheim, danken wir bestens für die Aufnahme der NMR.-Protonenspektren. Der Fa. *Knorr*, Heilbronn, danken wir für die Überlassung des Untersuchungsmaterials sowie dem *Forschungskreis der Ernährungsindustrie* und der *AIF* für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] O. S. Privett, C. Nickell, W. O. Lundberg & P. D. Boyer, J. Amer. Oil Chem. Soc. 32, 505 (1955).
- [2] A. Dolev, W. K. Rohwedder, T. L. Mounts & H. J. Dutton, Lipids 2, 33 (1967).
- [3] W. Heimann & P. Schreier, Helv. 54, 2794 (1971).
- [4] A. K. Balls, B. Axelrod & M. W. Kies, J. biol. Chemistry 149, 491 (1943).
- [5] J. A. Blain & T. Barr, Nature (New York) 190, 538 (1961).
- [6] W. Heimann & P. Schreier, Helv. 53, 2296 (1970).
- [7] D. C. Zimmermann, Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 398 (1966).
- [8] H. W. Gardner, J. Lipid Res. 11, 311 (1970).
- [9] A. Graveland, L. Pesman & P. v. Erede, Technical Quarterly 9, 98 (1972).
- [10] J. A. Blain & E. C. C. Styles, Nature (London) 184, 1141 (1959).
- [11] A. C. Maekly in Colowick & Kaplan Methods in Enzymolog., Bd. 2, 801, Acad. Press New York (1955).
- [12] C. P. Freeman & D. West, J. Lipid Res. 7, 324 (1966).
- [13] A. Graveland, J. Amer. Oil chem. Soc. 47, 352 (1970).
- [14] G. Beisenherz, H. J. Bolze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer, Z. Naturforsch. 86, 555 (1953).
- [15] H. U. Bergmeyer, Methoden der enzym. Analyse Bd. 1, 636, Verlag Chemie Weinheim, 2. Auflage (1970).
- [16] N. Westphal, Dissert. TH Karlsruhe 1969.
- [17] P. Capella & C. M. Zorzut, Anal. Chemistry 40, 1458 (1968).
- [18] K. P. Henrikson in Biochemistry & Methodology of Lipids von Johnson & Davenport, Wiley-Interscience New York 1971.
- [19] A. P. Tulloch, J. Amer. Oil chem. Soc. 43, 670 (1966).