

DAS VERHALTEN DER ENZYME IM WASSERARMEN MILIEU ALS BIOCHEMISCHES MODELL TIEFGEKÜHLTER LEBENSMITTEL

R. AMMON (HOMBURG)

Kiermeier¹ hat 1948 über Versuche berichtet, die direkt als Modell für die enzymatische Situation bei der Tiefkühlkost dienen können. Die Abbildung 1 zeigt Ergebnisse, die beweisen, dass die Schweinepankreaslipase bei einer Temperatur von -25° eine, in Vergleich zu der Temperatur von $+25^{\circ}$, wesentlich schwächere enzymatische Aktivität gegenüber dem benutzten Fett (Schweinefett) zeigt.

Die Kälte ist ein verzögernder Faktor, sie hebt die fermentative Fähigkeit aber nicht auf. Aus der Abbildung ergibt sich weiterhin, dass die Versuchsansätze den Ammoniumchlorid- und Ammoniak-Puffer enthielten. Bei der tiefen Temperatur muss zweifellos alles Wasser gefroren sein, bis auf den Rest, der die Salze des Puffers enthält.

Ein Analogon finden wir bei der Tiefkühlkost: es bleibt dort auch ein ungefrorener Rest Wasser mit allen Salzen, wie Karbonaten, Chloriden, Sulfaten, Phosphaten, den Eiweissionen sowie mit Aminosäuren, Kohlenhydraten usw. zurück. In unserem Falle ist das angewandte Fett, worauf Kiermeier hinweist, gefroren. Bei Lebensmitteln, die mehr oder weniger ungesättigte Fettsäuren in den Lipiden enthalten, werden diese wohl noch flüssig bleiben und dann noch eher angegriffen werden können, worauf kürzlich Acker² hinwies.

Unter den Verhältnissen der Tiefkühlkost herrscht also ein stark wasserarmes Milieu. Daher ist es von Wichtigkeit, zu prüfen, wieweit

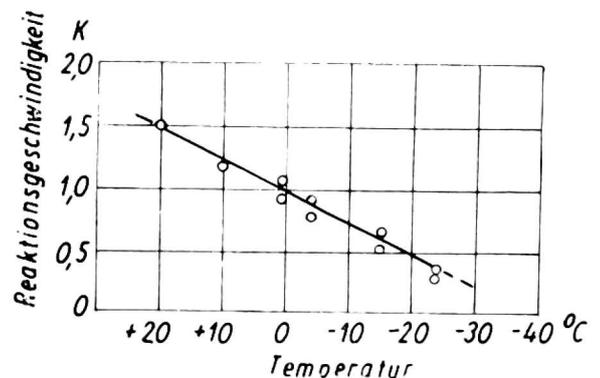


Abb. 1. Der Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Lipase in festen Fett-emulsionen. (Reaktionszeit: $2,4 \cdot 10^2$ bis $3,6 \cdot 10^5$ Min., NH_4Cl — NH_4OH -Puffer, pH = 8,9 bei 30° , Lipase aus Schweinepankreas).

Nach F. Kiermeier, 1948

enzymatisch katalysierte Reaktionen bei wasserarmen oder sogar wasserfreien Bedingungen verlaufen.

Zu dieser Frage soll auf Versuchsergebnisse der Rona-Schule in Ber-

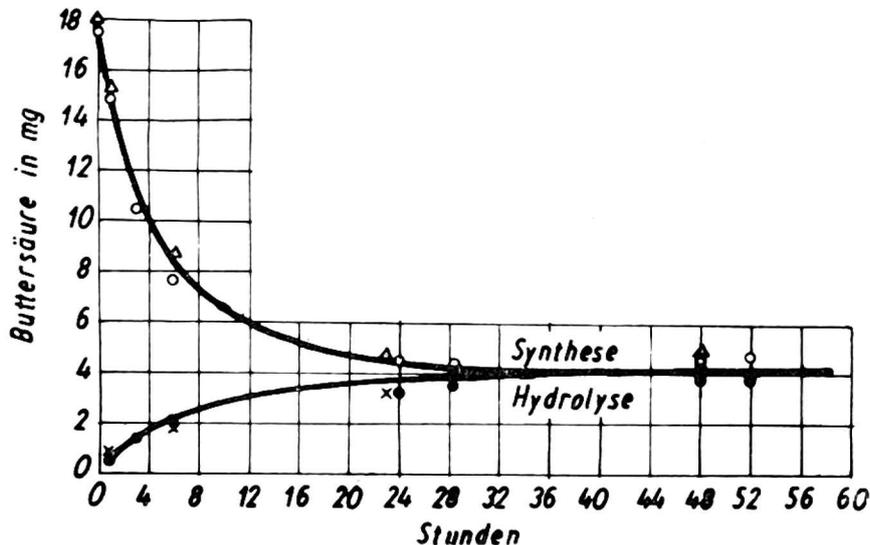


Abb. 2. Das durch Schweinepankreaspulver von beiden Seiten erreichte Gleichgewicht bei der Spaltung und Bildung von n-Butyl-n-butyrat (in Gegenwart von 10% Wasser). Nach P. Rona u. R. Ammon (1932)

lin eingegangen werden, die bereits in 1930—32 durchgeführt wurden. Wir beschäftigten uns damals mit der Frage der synthetisierenden Wirkung des Schweinepankreaspulvers, das bekanntlich durch vorherige

Behandlung mit Azeton und Äther weitgehend fett- und wasserfrei gemacht werden kann.

Mit einem solchen Pulver, des unter anderen Fermenten die Lipase enthält, liessen sich die verschiedensten Ester von Fettsäuren und aliphatischen sowie aromatischen Alkoholen bereiten. So haben Rona, Boris Chain und Ammon³ eine Ester-Synthese von 76% bei dem System: Äthyl-phenyl-carbinol und n-Buttersäure in wasserfreiem Milieu erreicht. Ja, wir konnten in

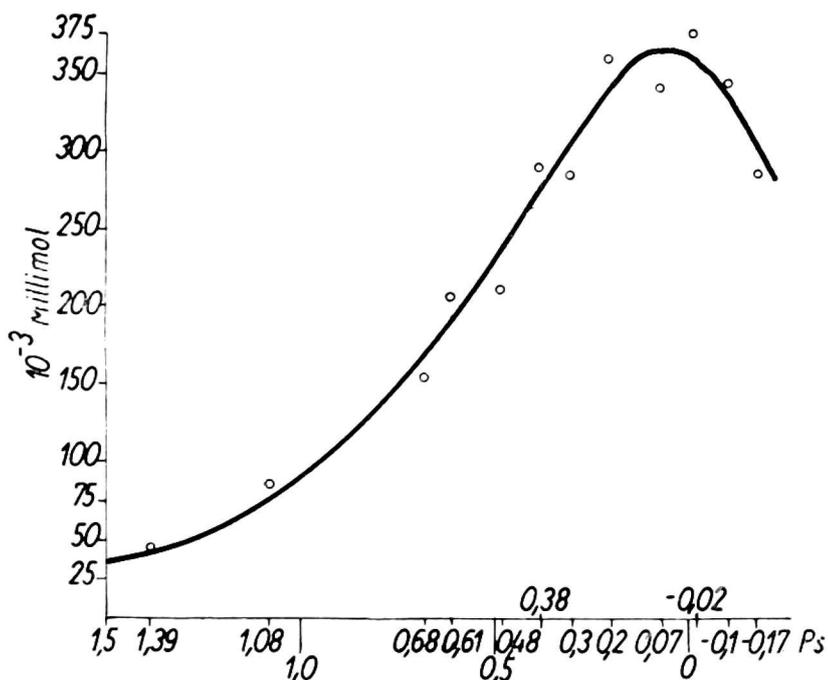
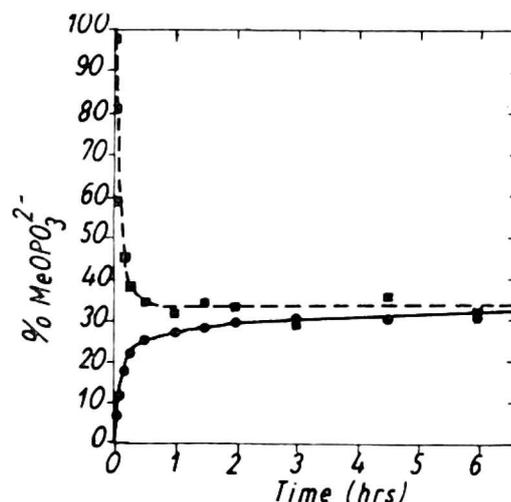


Abb. 3. Aktivitäts- p_s -Kurve für die durch Schweinepankreaspulver katalysierte Synthese von n-Butyl-n-butyrat. Nach P. Rona, R. Ammon u. H. Fischgold (1931)

einem Versuchsansatz, bestehend aus 500 mg Pankreaspulver in 25 ml einer 0,1 m Palmitinsäure und 0,5 m Cetylalkol in einem Azeton-Äthergemisch 1 : 1 nach 5-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur eine

Abb. 4. Yield of methyl phosphate in percent of total phosphate, dependent on the reaction time in 50% methanol at 0°. Reaction mixture: 0.5 ml of substrate solution (pH 8.0 (●—●, $^{32}\text{PO}_4^{3-}$; ■---■ $\text{MeO}^{32}\text{PO}_3^{2-}$), 2,5 ml methanol, and 2,0 ml sonicated chloroplast suspension (2.1 mg chlorophyll/ml) in 10^{-3} M Tris buffer (pH 8.0). Samples were taken at the given intervals and immediately heated to 70°. The final percentage of methyl phosphate after 4 days reaction time was approx. 33.5% in both mixtures. Nach J. Ulrich u. M. Calvin



Synthese von 20% Cetyl-palmitat erzielen⁴. Die in dem Pankreaspulver enthaltene Lipase zeigt auch bei solchen Syntheseversuchen eine ausgesprochene stereochemische Spezifität, ein Problem, auf das hier nicht eingegangen werden kann.

Wir konnten unter etwas abgeänderten Bedingungen und bei Gegenwart von 10% Wasser — also in wasserarmem Milieu — die enzyma-

PERCENTAGE OF METHYL PHOSPHATE FORMED BY DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIALS IN THE USUAL 4-DAY TEST

| Tested material | 50% MeOH | | 80% MeOH | |
|--|--------------------|---------------------|----------|--------|
| | 0° | 20-25° | 0° | 20-25° |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , whole organisms | 25.4 | 16.0 | 3.6 | 4.0 |
| Alkaline phosphatase, commercial ⁵ | 24.3 | 29.0 | 9.3 | 8.5 |
| Acidic phosphatase ⁶ , purified from commercial "Polidase" [*] | 25.1 | 25.5 | 9.5 | 31.2 |
| Rat blood, fresh, containing some heparin | 19.5 ^{**} | 17.4 ^{***} | 2.5 | 1.3 |
| Bovine albumin, commercial | 0 | — | — | — |

^{*} In acidic acetate buffer.

^{**} 3 additional spots on the chromatogram.

^{***} 1 additional spot on the chromatogram.

Abb. 5. Nach J. Ulrich u. M. Calvin (1962)

tische Synthese und Hydrolyse des n-Butyl-n-Butyrats nachweisen⁵. Die Abbildung 2 veranschaulicht dies und beweist, dass ein von beiden Seiten erreichbares Gleichgewicht in dem makroheterogenen System durch Schweinepankreaspulver erreichbar ist.

Es gelang uns auch, in Ansätzen aus Pankreaspulver, n-Butylalkohol und n-Buttersäure, unter variierenden Bedingungen eine s-förmige

Kurve, s. Abb. 3, zu erhalten⁴, die zwar den berühmten Idealtyp nach Leonor Michaelis und Miss Maud Menton nur unvollkommen wiedergibt, immerhin lässt sich folgern, dass auch unter den unphysiologischen Bedingung dieser enzymatischen Estersynthese Ferment-Zwischenverbindungen entstehen. Die genannte stereochemische Spezifität beweist dies auch.

Das wasserarme Milieu und das makraheterogene System ermöglichen also enzymatische Reaktionen unter Bedingungen, wie sie z. B. auch bei der Lagerung der Tiefkühlkost eintreten.

Unsere längere Zeit zurückliegenden Versuche möchte ich durch neue ergänzen. Aus der Schule von Calvin⁶ in den USA zeige ich eine Abbildung, aus der zu erkennen von Methylphosphat durch Chloroplastenphosphatase des Spinats noch in Gegenwart von 50% Methylalkohol zu erreichen ist. Auch hier haben wir es mit einem makroheterogenen System zu tun, denn die Chloroplasten wurden mit Ultraschall behandelt, um eine genügend haltbare Suspension zu erhalten. Aus der Arbeit von Calvin soll noch auf die folgende Tabelle hingewiesen werden:

Wir erkennen, dass höhere Konzentration als 50% an Methylalkohol die Phosphatase schädigen, dass aber auch Phosphatasen anderer Herkunft, wie z. B. die des Rattenblutes, ebenfalls wirksam sind, was sogar auf eine andere Tatsache hinweist: dass nämlich bei niedriger Temperatur eine durchaus gute enzymatische Aktivität mitunter festzustellen ist. Bei der Rattenblutphosphatase ist sogar bei 0°C eine etwas bessere Wirksamkeit zu beobachten als bei 20—25°C.

Alle mitgeteilten Ergebnisse weisen daraufhin, dass unter den Bedingungen der Lagerung der Lebensmittel bei tiefen Temperaturen, wie sie bei der Tiefkühlkost vorliegen, durchaus noch enzymatische Reaktionen möglich sind. Dieser Fragenkomplex bedarf weiterer Untersuchungen.

LITERATUR

1. F. Kiermeier: Biochem. Zschr. 1948, 318, 275.
2. L. Acker: Münster/Westf., persönliche Mitteilung, 1965.
3. P. Rona, B. Chain, R. Ammon: Biochem. Zschr. 1932, 247, 113.
4. P. Rona, R. Ammon, H. Fischgold: Biochem. Zschr. 1931, 241, 460.
5. P. Rona, R. Ammon: Biochem. Zschr. 1932, 249, 446.
6. J. Ulrich, M. Calvin: Biochem. Biophys. Acta 63, 1962, 1.

Streszczenie

ZACHOWANIE SIĘ ENZYMÓW W ŚRODOWISKU SŁABO
UWODNIONYM JAKO BIOCHEMICZNY MODEL BADANIA
ZACHOWANIA SIĘ ŚRODKÓW ŻYWNOŚCI GŁĘBOKO
ZAMROŻONYCH

R. AMMON (HOMBURG)

Produkty głęboko zamrożone wykazują szczególnie niską zawartość wody. Zbadano możliwości reakcji enzymatycznych w takich warunkach. Doświadczenie wykazuje, że podczas przechowania zamrożonych środków żywności w bardzo niskich temperaturach nie następuje całkowite zahamowanie reakcji enzymatycznych i że w pewnych wypadkach szczególnych mogą one przebiegać nawet z większą intensywnością.

Résumé

LE COMPORTEMENT DES ENZYMES EN MILIEU PEU HYDRATÉ
COMME MODÈLE BIOCHIMIQUE D'ÉTUDE DU COMPORTEMENT
DES ALIMENTS SURGELÉS

R. AMMON (HOMBURG)

La teneur en eau des produits surgelés est particulièrement faible. On a étudié les possibilités de développement des réactions enzymatiques dans ces conditions. L'expérience démontre qu'au cours du stockage des aliments surgelés à très basses températures, les réactions enzymatiques ne sont pas totalement supprimées et que dans certains cas particuliers, elles sont même activées.

Summary

ENZYME BEHAVIOUR IN A STRONGLY DEHYDRATED MEDIUM
AS A BIOCHEMICAL MODEL FOR THE STUDY OF THE
BEHAVIOUR OF DEEP-FROZEN FOODS

R. AMMON (HOMBURG)

The water content of deep-frozen products is particularly low. The possibilities for enzymic reactions to occur in these conditions have been studied. Experience shows that during storage of deep-frozen foods at very low temperatures enzymic reactions are not totally suppressed, and that in some particular cases they are even activated.

Zusammenfassung

DAS VERHALTEN DER ENZYME IN WASSERARMEM MILIEU ALS
BIOCHEMISCHES MODELL ZUM STUDIUM TIEFGEKÜHLTER
LEBENSMITTEL

R. AMMON (HOMBURG)

Unter den Verhältnissen der Tiefkühlkost herrscht ein stark wasserarmes Milieu. Es wurde untersucht, wieweit enzymatisch katalysierte Reaktionen unter solchen Bedingungen verlaufen. Die Ergebnisse zeigen, dass unter den Bedingungen der Lagerung der Lebensmittel bei tiefen Temperaturen, wie sie bei der Tiefkühlkost vorliegen, enzymatische Reaktionen noch möglich sind und in bestimmten Fällen selbst eine Aktivierung eintritt.

Резюме

ПОВЕДЕНИЕ ЭНЗИМОВ В СРЕДЕ С НЕБОЛЬШИМ
СОДЕРЖАНИЕМ ВОДЫ КАК БИОХИМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ
ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕДЕНИЯ СИЛЬНО ЗАМОРОЖЕННЫХ
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

P. AMMON (ГАМБУРГ)

Сильно замороженные продукты содержат особенно мало воды. Исследована возможность enzymатических реакций в таких условиях. Опыт показывает, что во время хранения замороженных пищевых продуктов при очень низких температурах, не происходит полное торможение enzymатических реакций, а в некоторых особых случаях они могут проходить даже с большей интенсивностью.